

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.07.0905

• 综述 •

生物心脏起搏器治疗缓慢型心律失常的研究进展

胡雁南, 张浩, 郎希龙*

第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

[摘要] 电子心脏起搏器治疗已成为心律失常特别是严重缓慢型心律失常的首选治疗方法。虽然电子心脏起搏器的技术逐渐完善,但仍存在一定的缺陷。近十多年来,研究证实可以通过基因治疗和细胞治疗构建生物起搏器;随着分子生物学和细胞生物学的发展,生物心脏起搏技术不断取得突破。目前构建生物心脏起搏器的方法有两种,一种是将起搏相关基因导入间充质干细胞,另一种是将多能干细胞诱导分化为窦房结样起搏细胞。本文针对生物心脏起搏器的最新研究进展进行综述,并归纳分析生物心脏起搏过程中存在的问题以及未来的重点研究方向。

[关键词] 心动过缓;基因治疗;细胞治疗;生物起搏器

[中图分类号] R 541.72 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)07-0905-05

Biological pacemaker in treatment of bradycardiac arrhythmia: research progress

HU Yan-nan, ZHANG Hao, LANG Xi-long*

Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Electronic pacemakers has become the preferred treatment for arrhythmia, especially for severe bradycardiac arrhythmia. Although the technology of electronic pacemaker was gradually improving, it still has some shortcomings. Over the past 10 years, research has confirmed that biological pacemaker can be created by gene therapy and cell therapy; with the development of molecular biology and cell biology, biological pacemaking technology has been continuously broken. Currently there are two approaches to construct biological pacemakers: one is to introduce pacemaker genes into mesenchymal stem cells, and the other is to induce pluripotent stem cells to sinoatrial node cells. In this paper, we reviewed the latest research progress of biological pacemakers, so as to analyze the existing problems in biological cardiac pacing and future research directions.

[Key words] bradycardiac; gene therapy; cell therapy; biological pacemaker

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(7): 905-909]

在美国,每年有大约 20 万名缓慢型心律失常患者植入电子心脏起搏器^[1],其中约有 5% 的患者因各种并发症需进一步治疗,如心律失常、气胸、血气胸、感染、出血等^[2]。此外,当电子心脏起搏器的电池耗尽,就可能导致患者的心脏骤停并需手术更换电池。为解决这些问题,一种新型的起搏方式——生物心脏起搏器应运而生(图 1)。生物心脏起搏器,顾名思义就是通过细胞或基因技术对受损的节律点或特殊传导系统进行修复,使心脏的正常起搏得以恢复^[3-4]。与电子心脏起搏器相比,生物心脏起搏器无需电池、电极、导线等,并且具有更好的自主

反应性^[5]。因此,生物心脏起搏器有望为缓慢型心律失常患者提供更为安全、有效的治疗手段。本文从基因技术和细胞技术两方面综述了生物心脏起搏器的研究进展。

1 基因治疗策略

1.1 转染起搏电流基因 *HCN* 心脏的搏动主要由内向超极化电流(即 *I_f* 电流)来调控,*I_f* 电流的编码基因为 *HCN*,目前已知的哺乳动物 *HCN* 包括 3 种亚型: *HCN1*、*HCN2*、*HCN4*。Qu 等^[5-7] 利用 *HCN2* 的腺病毒载体(Ad. *HCN2*)体外转染新生大

[收稿日期] 2016-10-01 **[接受日期]** 2017-04-23

[基金项目] 国家自然科学基金(81271707)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81271707)。

[作者简介] 胡雁南,硕士生。E-mail: m15026763130@163.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-31161765, E-mail: langxl666@sohu.com

鼠的心肌细胞,发现其搏动频率较对照组正常心肌细胞明显上升;将 Ad. *HCN2* 开胸注射到犬左房心外膜下,刺激迷走神经诱导窦性停搏,其房性逸搏心律较仅注射等量绿色荧光蛋白(GFP)的对照组明显上升;将 Ad. *HCN2* 经颈动脉导管注射到犬左束支,刺激迷走神经诱导房室传导阻滞,其交界性心律较对照组明显上升。研究表明,窦房结中高度表达的钙离子刺激腺苷酸环化酶(CaAC)可以增强窦房结细胞对 Ca^{2+} 的反应性,提高细胞内环磷酸腺苷

(cAMP)水平,从而影响窦房结细胞的起搏电流^[8]。CaAC的编码基因为 *AC1*,有学者将载有 *AC1* 的腺病毒转染到房室传导阻滞的犬的左束支上,对照组转染 *AC1+HCN2*,结果显示转染了 *AC1* 的犬的心率为 60/min 且对自主神经高度敏感,而转染了 *AC1+HCN2* 的犬的心率比单独转染了 *AC1* 的犬的心率更快(167/min),并具有高度敏感的自主反应性^[9]。

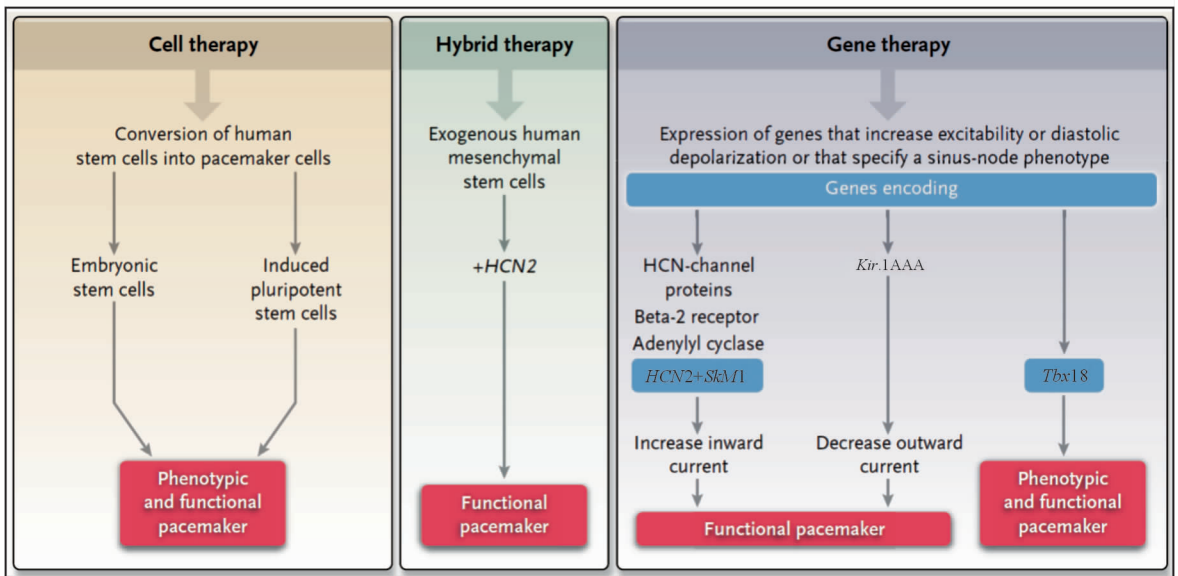


图1 生物心脏起搏器的构建途径

Fig 1 The approach of constructing biological pacemaker

目前有研究者认为转染多组与起搏电流相关的基因可进一步提高心脏的搏动频率,其中结果最显著的是转染 *HCN2+SkM1*。Boink 等^[10]利用射频消融技术将成年犬诱导为完全性房室传导阻滞,然后植入电子起搏器 VVI 并使其心率维持在 35/min,而后他们将载有 *HCN2+SkM1* 的腺病毒转染到犬的左束支杀过,结果显示犬的心率达到 80/min 并具有敏感的自主反应性。上述研究表明,转染起搏电流基因可使心肌细胞产生自律性或提高自律性,从而产生起搏功能。但通过这种方法所表达的蛋白质一般不会超过 4 周,而且利用腺病毒做载体会增加机体成瘤的风险。

1.2 心肌细胞的重编程 心脏的正常起搏由窦房结所控制,心肌细胞并不具备起搏功能。然而一种新型的基因技术可以将心肌细胞重新编程为起搏细胞,这种治疗方法的优点是不通过干细胞诱导分化而将心肌细胞直接转化为起搏细胞。2013 年,

Kapoor 等^[11]用携带多种转录因子的腺病毒作为载体来重新编程幼鼠的心肌细胞,结果发现在这些转录因子中 *Tbx18* 产生搏动的能力最强。而后他们又将 *Tbx18* 注入豚鼠的左室尖部,人为诱导窦性心动过缓和完全房室传导阻滞,结果显示实验组豚鼠的生物起搏频率约为 160/min,并且起搏兴奋点来源于注射 *Tbx18* 的部位。这项研究首次证实了单个基因能够使心肌细胞转变为真正的起搏细胞,这些重编程的细胞能自发地产生电脉冲,并且与体内的起搏细胞没有区别。

在大动物实验中,*Tbx18* 的起搏功能进一步被证实。Hu 等^[12]利用射频消融技术将 14 只猪诱导为完全性房室传导阻滞,后植入电子心脏起搏器 VVI 使其心率维持在 50/min,然后分为 2 组,一组将载有 *Tbx18* 和 *GFP* 的病毒转染到猪的右室后间隔,一组将仅载有 *GFP* 的病毒转染到猪的右室后间隔。在连续 14 d 的观察中发现,转染了 *Tbx18* 和

GFP的猪的心率(70/min)明显高于仅转染GFP的猪的心率(60/min)。但是11 d以后,两组猪的心率都开始下降,可能是由于腺病毒本身对心率有所影响,联合*Tbx18*以后对心率的影响作用更强^[13]。

2 细胞治疗策略

干细胞是一类具有自我复制能力的多功能细胞,在一定条件下,它可以分化成多种细胞。根据干细胞所处的发育阶段可将其分为胚胎干细胞和成人间充质干细胞。胚胎干细胞在体外可以无限扩增和全能分化,但间充质干细胞只有有限的分化和再生能力^[14-15]。

2.1 间充质干细胞 间充质干细胞广泛分布于人体各个组织,尤其是骨髓,它是具备多分化潜能的成体干细胞,具有容易分离培养、多系分化增殖、无免疫排斥等优点^[16]。

2004年, Potapova等^[17]测试了人间充质干细胞(hMSC)传递生物起搏基因的能力,他们通过电击孔法将2型超极化激活的环核苷酸门控离子通道(*mHCN2*)基因转染到hMSC中使hMSC表现起搏电流I_f的特性(记为mHCN2-hMSC),将这种细胞和新生大鼠心肌细胞混合培养,细胞的搏动频率约为161/min,明显高于正常干细胞和新生大鼠心肌细胞混合培养的对照组(93/min)。2013年,Zhang等^[18]人为诱导猪的房室传导阻滞模型,而后将HCN4-MSC植入到猪的右室外膜下,其生物起搏频率约为55/min,明显高于对照组的38/min。Zhou等^[19]将HCN1导入大鼠间充质干细胞中,发现实验组心肌搏动频率约130/min,远高于对照组(正常间充质干细胞)的80/min。

2.2 胚胎干细胞 胚胎干细胞可能是重建心脏传导系统结构和心肌结构比较理想的细胞来源,其在特定的培养条件下能够进行增殖并分化为各类细胞,如起搏细胞、心房细胞、心室细胞、浦肯野细胞样细胞等^[20]。Kehat等^[21]研究发现胚胎干细胞源性的心肌细胞能与猪的心室肌细胞形成电机械和功能的连接,发挥起搏功能,使人为诱导的完全房室传导阻滞的猪模型左心室起搏。人为诱导完全房室传导阻滞,将胚胎干细胞分化成的心肌细胞植入到猪左心室侧后壁,50%的猪(6/13)能诱发病理的室性心律失常并对肾上腺素有反应,测得起搏频率为(59±

11)/min,持续时间为1~3周,并且证实异位起搏部位与移植细胞注射点一致。Xue等^[22]研究证实胚胎干细胞分化的心肌细胞植入天竺鼠左心室后,可加快新生大鼠的心率,并对肾上腺素具有良好的反应性。

由上述研究可以看出,人胚胎干细胞能分化成早期心肌细胞,并具备自发起搏特性。此项技术前景广阔,但目前尚有以下问题有待解决:(1)伦理问题限制了此项技术的运用;(2)较难精确地控制干细胞分化为起搏细胞并保持其功能长久的稳定性。

2.3 诱导多功能干细胞(iPSC) 日本科学家Takahashi等^[23]于2006年通过反转录病毒载体将多能性相关因子*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*和*c-Myc*转入小鼠成纤维细胞,产生了形态、特性与胚胎干细胞相似的细胞,并能自主增殖、分化为拟胚体,证明其具有多向分化的潜能。这种由体细胞重编程产生的具有多向分化潜能的细胞被称为iPSC。研究证实,由iPSC分化的心肌细胞(iPSC-CM)的分子、结构、功能特性与早期心肌细胞类似,且具有分裂增殖能力^[24]。电生理检测发现iPSC-CM表现室性、房性、结性动作电位,说明其中含有窦房结样起搏细胞,具有构建生物起搏器的潜能。Mandel等^[25]于2012年对人毛囊细胞源iPSC-CM连续15 d行细胞外电描记,发现iPSC-CM的搏动与窦房结细胞相似,并且对肾上腺素刺激物反应敏感,证实了iPSC-CM具有起搏潜能,但是平均搏动频率过慢(39~70/min)。Kuzmenkin等^[26]发现虽然iPSC可分化为心房肌、心室肌以及传导系统的细胞,但大部分分化而来的细胞还是表现为心室肌细胞样的动作电位。因此如何将iPSC更多地转化为起搏样细胞成为生物起搏亟需解决的问题。

3 小结

生物心脏起搏器避免了电子心脏起搏器电池更换、电磁干扰、缺乏自主反应等缺点,为缓慢性心律失常患者带来了新的希望。虽然这一全新技术的出现只有15年左右的时间,但在最近几年内却取得了巨大的突破,大动物实验的成功标志着其向临床转化又迈出了一大步。然而生物心脏起搏器还处于研究阶段,应用于临床还有很多问题需要研究和解决,例如生物心脏起搏器的安全性、功能表达持久性、合

适的移植细胞起搏位点和植入方法,以及如何分化、控制、分离纯度高的具有起搏潜能的起搏基因,如何避免基因工程技术带来的不良后果,如形成肿瘤、心律失常等^[27]。

现阶段的生物心脏起搏器主要包括细胞生物起搏器、基因生物起搏器以及细胞和基因结合的生物起搏器。HCN 家族因其具有在超极化期激活、不影响动作电位的复极过程、受 cAMP 调控等优势,现为研究对象,但其制备的生物起搏器起搏频率较慢,需要通过基因工程进行改造或共同表达相关基因才能具有起搏功能。在细胞生物起搏器方面,虽然间充质干细胞不具有免疫原性,但移植后远期免疫性未见报道,并且其获取过程较为复杂,而胚胎干细胞因涉及伦理问题等限制了其应用^[28]。因此,iPSC 的发明具有里程碑意义,其具有多潜能分化特性并且获取方法简单,甚至可从自身的尿液细胞中获得,同时不具有免疫原性,诱导分化为具有起搏功能的细胞后,不需要进行免疫抑制,具有无可比拟的优势。然而 iPSC 来源的起搏细胞的起搏频率尚未达到临床需求水平,且存在 iPSC 的重编程机制尚未完全阐明、重编程及诱导分化技术尚缺少统一的标准及其远期的安全性等问题^[29]。

综上所述,虽然生物心脏起搏器不能短期内应用于临床治疗,但其具有广阔的应用前景,相信在不久的将来,生物起搏器的研究将会取得更大的进步。

[参考文献]

[1] GREENSPON A J, PATEL J D, LAU E, OCHOA J A, FRISCH D R, HO R T, et al. Trends in permanent pacemaker implantation in the United States from 1993 to 2009: increasing complexity of patients and procedures [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60: 1540-1545.

[2] EBERHARDT F, BODE F, BONNEMEIER H, BOGUSCHEWSKI F, SCHLEI M, PETERS W, et al. Long term complications in single and dual chamber pacing are influenced by surgical experience and patient morbidity [J]. *Heart*, 2005, 91: 500-506.

[3] MIAKE J, MARBÁN E, NUSS H B. Biological pacemaker created by gene transfer [J]. *Nature*, 2002, 419: 132-133.

[4] CHAUVEAU S, BRINK P R, COHEN I S. Stem

cell-based biological pacemakers from proof of principle to therapy: a review [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16: 873-880.

- [5] QU J, BARBUTI A, PROTAS L, SANTORO B, COHEN I S, ROBINSON R B. HCN2 overexpression in newborn and adult ventricular myocytes: distinct effects on gating and excitability [J]. *Circ Res*, 2001, 89: E8-E14.
- [6] QU J, PLOTNIKOV A N, DANILO P Jr, SHLAPAKOVA I, COHEN I S, ROBINSON R B, et al. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart [J]. *Circulation*, 2003, 107: 1106-1109.
- [7] PLOTNIKOV A N, SOSUNOV E A, QU J, SHLAPAKOVA I N, ANYUKHOVSKY E P, LIU L, et al. Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates [J]. *Circulation*, 2004, 109: 506-512.
- [8] KRYUKOVA Y N, PROTAS L, ROBINSON R B. Ca²⁺-activated adenylyl cyclase 1 introduces Ca²⁺-dependence to β -adrenergic stimulation of HCN2 current [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52: 1233-1239.
- [9] BOINK G J, NEARING B D, SHLAPAKOVA I N, DUAN L, KRYUKOVA Y, BOBKOV Y, et al. The Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclase AC1 generates efficient biological pacing as single gene therapy and in combination with HCN2 [J]. *Circulation*, 2012, 126: 528-536.
- [10] BOINK G J, DUAN L, NEARING B D, SHLAPAKOVA I N, SOSUNOV E A, ANYUKHOVSKY E P, et al. HCN2/SkM1 gene transfer into canine left bundle branch induces stable, autonomously responsive biological pacing at physiological heart rates [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61: 1192-1201.
- [11] KAPOOR N, LIANG W, MARBÁN E, CHO H C. Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18 [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 54-62.
- [12] HU Y F, DAWKINS J F, CHO H C, MARBÁN E, CINGOLANI E. Biological pacemaker created by minimally invasive somatic reprogramming in pigs with complete heart block [J/OL]. *Sci Transl Med*, 2014, 6: 245ra94. doi: 10.1126/scitranslmed.3008681.
- [13] ROSEN M R. Gene therapy and biological pacing [J].

- N Engl J Med, 2014, 371: 1158-1159.
- [14] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, WAKNITZ M A, SWIERGIEL J J, MARSHALL V S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282: 1145-1147.
- [15] PSALTIS P J, ZANNETTINO A C, WORTHLEY S G, GRONTHOS S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair[J]. Stem Cells, 2008, 26: 2201-2210.
- [16] 李北方,刘仁光,朱明星. 干细胞移植与心脏生物起搏的研究现状[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13: 7151-7154.
- [17] POTAPOVA I, PLOTNIKOV A, LU Z, DANILO P Jr, VALIUNAS V, QU J, et al. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers[J]. Circ Res, 2004, 94: 952-959.
- [18] ZHANG H, LI S, QU D, LI B, HE B, WANG C, et al. Autologous biological pacing function with adrenergic-responsiveness in porcine of complete heart block[J]. Int J Cardiol, 2013, 168: 3747-3751.
- [19] ZHOU Y F, YANG X J, LI H X, HAN L H, JIANG W P. Genetically-engineered mesenchymal stem cells transfected with human *HCN1* gene to create cardiac pacemaker cells[J]. J Int Med Res, 2013, 41: 1570-1576.
- [20] MINGUELL J J, ERICES A, CONGET P. Mesenchymal stem cells [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2001, 226: 507-520.
- [21] KEHAT I, KHIMOVICH L, CASPI O, GEPSTEIN A, SHOFTI R, ARBEL G, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22: 1282-1289.
- [22] XUE T, CHO H C, AKAR F G, TSANG S Y, JONES S P, MARBAN E, et al. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers[J]. Circulation, 2005, 111: 11-20.
- [23] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006, 126: 663-676.
- [24] ZWI L, CASPI O, ARBEL G, HUBER I, GEPSTEIN A, PARK I H, et al. Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells[J]. Circulation, 2009, 120: 1513-1523.
- [25] MANDEL Y, WEISSMAN A, SCHICK R, BARAD L, NOVAK A, MEIRY G, et al. Human embryonic and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes exhibit beat rate variability and power-law behavior[J]. Circulation, 2012, 125: 883-893.
- [26] KUZMENKIN A, LIANG H, XU G, PFANNKUCHE K, EICHHORN H, FATIMA A, et al. Functional characterization of cardiomyocytes derived from murine induced pluripotent stem cells *in vitro*[J]. FASEB J, 2009, 23: 4168-4180.
- [27] CHEN W, ZHANG L, SHAO S X, WANG H P, CUI S J, ZHANG Y N, et al. Transcription factors GATA4 and TBX5 promote cardiomyogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stromal cells[J]. Histol Histopathol, 2015, 30: 1487-1498.
- [28] BEN-ARI M, SCHICK R, BARAD L, NOVAK A, BEN-ARI E, LORBER A, et al. From beat rate variability in induced pluripotent stem cell-derived pacemaker cells to heart rate variability in human subjects[J]. Heart Rhythm, 2014, 11: 1808-1818.
- [29] BEN-DAVID U, BENVENISTY N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11: 268-277.

[本文编辑] 孙岩