

生物起搏的研究进展

王方媛 黄从新

摘要 目前临床已经使用电子起搏器来治疗由房室传导阻滞或窦房结功能障碍引起的心动过缓,虽然不断改进,但仍然存在很多弊端。随着分子生物学的迅猛发展,心脏生物起搏为治疗开辟了一个全新的领域。生物起搏是指利用细胞分子生物学及相关技术对受损的自律性节律点或特殊传导系统的细胞进行修复或替代,从而达到恢复心脏起搏或传导功能的目的。本文总结近年来生物起搏中的一些研究进展,希望为今后的临床应用提供理论依据。

关键词 生物起搏 窦房结 离子通道 基因治疗 细胞治疗

中图分类号 R541

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.045

心力衰竭是世界上最常见的死因之一,对严重心力衰竭患者的治疗仍然有限。手术包括心脏移植和心室辅助装置的置入仅可用于有限数量的患者。全世界每年有多达 60 万患者接受心脏起搏器。这些装置成功地治疗了广泛的电生理异常,但是存在很多缺点,在 5% ~ 10% 的置入手术中出现并发症,急性并发症包括轻微的血肿到更严重的感染、气胸和心脏穿孔^[1];慢性的包括导线断裂、电磁干扰、囊袋感染、电池寿命有限以及缺乏对自主神经系统的反应性等。这些限制已经促使寻找替代品。在过去几年中广泛公开的一种方法是通过基因修饰技术创建生物起搏。

一、 β_2 肾上腺素能受体

首次尝试通过基因调节心率是 Edelberg 等^[2],将携带有 β_2 肾上腺素能受体的质粒注入小鼠右心房,载体在 81% 的心肌细胞中表达,并观察到治疗组的心率为 550 次/分,其显著高于在对照组的 370 次/分。随后将肾上腺素基因质粒扩展到大型动物猪模型,结果接受了实验组心率为 163 次/分,相对于对照的 127 次/分明显提高,进一步说明基因治疗对于生物起搏模型构建的重要意义,并对以后通过基因转导构建生物起搏提供了实验基础^[3]。这些研究结果带来希望,但此方法仍有一些不足:研究者没有报告小鼠心率增加的具体时间过程;实验效应的短暂性(质粒介导的基因转移效应一般持续几周^[4]);心房肌细胞心率增加的潜在机制是腺苷酸环化酶的 Gs 介导的

激活,引起细胞内级联反应,最终导致 1 型钙通道和兰诺定受体的磷酸化,钙处理蛋白活性增加,最终激活钙时钟机制引起自动化,而细胞内钙的持续增加是有毒性的,具有潜在心律失常风险;依赖肾上腺素刺激才能获得较快心率。

二、减少超极化电负载

阻断内向整流钾通道 (IK1) 以释放内源性起搏活性的想法是生物起搏的方法之一。IK1 可被显性阴性蛋白 (Kir2.1- $\Delta\Delta\Delta$) 抑制,而 IK1 负突变可降低膜静息电位超级化电流,使内向电流易触发起搏。在心率调节中, Miake 等^[5] 使用编码 IK1 通道基因的缺失突变 (KCNJ2 GYG144-146AAA) 来产生自动性,观察到有 40% 表达 KCNJ2-AAA 心室肌细胞产生自动性。进一步的研究发现,至少需要消除 80% 的内源性 IK1 才能引发 4 期去极化^[6]。研究者报告了在转基因的表达下都发生了一定程度的复极化延迟和 QT 间期延长,而且缺乏自主神经刺激的直接调节。在过去几年中,这一概念在很大程度上被放弃。但是最近,在 Kir2.1 $\Delta\Delta\Delta$ 与 HCN2 的共表达引发了 90 ~ 95 次/分的搏动速率,形成了有效的生物起搏。因此对于 IK1 敲除成为生物起搏策略的一部分,还应进行谨慎评估。

三、过表达超级化环核苷酸电压门控通道 (HCN)

自诱导起搏以来,大量研究都是通过过表达超级化环核苷酸电压门控通道 (HCN) 以诱导起搏电流 (IF 电流)。研究者分别往豚鼠的左心房^[7] 和左束支^[8] 中注入编码野生型 HCN2 的腺病毒载体。在正常窦性心律动物中效应不明显,但在迷走神经刺激诱导的窦性停搏期间,表达转基因的动物具有比对照显

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2105kfD229)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心内科、武汉大学心血管病研究所、心血管病湖北省重点实验室

通讯作者:黄从新,电子邮箱:huangcongxin@vip.163.com

著增高的逸搏节律,并且该节律映射到靶区域。但逸搏节律不足以成为可行的起搏器替代品。Cai 等^[9]往猪心室中注入了携带野生型 HCN4 与绿色荧光蛋白(GFP)的腺病毒(单独 GFP 的腺病毒作为对照组)。在基因转移后第 3~4 天,进行 AV 结消融并观察心室率。表达 HCN4 的实验组有 69 次/分的心室逸搏节律,且节律起源于靶区域。而对照组的速率仅为 41 次/分。然而测量心率是一个急性研究,没有提供关于速率稳定性的数据。

HCN2-E324A 突变可以改变激活电压依赖性,使得通道在较低的膜电位下激活,从而增加细胞复极期间通道开放的概率。Bucchi 等^[10]将编码野生型 HCN2 和 HCN2-E324A 突变体的腺病毒注射到犬的左束支。当比较野生型和突变体通道(两者都优于 GFP 对照)时,没有观察心率显著增加,而且与野生型相比,表达 HCN2 突变体的动物更需要后备电子起搏器。当研究这种与预期的差异时,研究者发现突变通道确实具有预测的动力学,但是与野生型通道相比,由于表达的减少,峰电流也随之减少。研究人员推测表达降低的原因是突变通道产生了某种细胞毒性,因为野生型和突变体 HCN2 基因的病毒载体和 DNA 控制元件是相同的。

Tse 等^[11]报道了另一种改善 HCN1 同种型突变的起搏策略。HCN1-EVY235-237 $\Delta\Delta\Delta$ 是一种缺失突变,其缩短了通道的 S3-4 接头,具有增加通道开放概率的生物物理效应。研究者消融猪的窦房结(SAN)导致病窦综合征,置入电子双腔起搏器(编程为 DDD 模式,具有较低的速率限制 60 次/分)后分别注射编码 HCN1 突变体或盐水的腺病毒载体到左心房。每组只有两只动物。在基因转移后,治疗组具有 64 次/分的自发搏动频率,仍需要 14% 的电子起搏器,但在报告中未提供对照组注射盐水动物的速率或节律数据,很难评价其生物起搏的整体效应。

Plotnikov 等^[12]报道了 HCN 突变的危害,他们将编码 HCN1 和 HCN2 嵌合通道的腺病毒注入左束支第 2 天,犬发生了室性心动过速(VT)。研究者通过在注入伊伐布雷定(具有相对 HCN1 特异性的 If 阻断剂)后显示 VT 消除,进一步证明心律失常与基因转移相关。

总的来说,HCN 家族基因转移表明自动化是可以实现的,但是在该方法变得可行之前,关于基础心率、心率随时间的稳定性,当然最重要的是心律失常的问题需要解决。

四、过表达腺苷酸环化酶

β_2 肾上腺素能受体通过激活 G-蛋白偶联受体而增加自动性,该信号级联中的下游事件包括腺苷酸环化酶的活化,蛋白激酶 A 活性的增加和许多靶点的磷酸化,包括 HCN 家族,HCN4 和 CACNA1C 离子通道(分别为 If、IKs 和 ICa,L 的 α -亚基)。该信号通路不具有特异性,因此其下游信号——腺苷酸环化酶(AC)成为更佳的研究选择。Edelberg 等^[3]假设腺苷酸环化酶(ADCY)的过表达将刺激 If 电流并增加自律性,将编码 ADCY6 的腺病毒注入猪的左心室。注射后第 12 天,Ruhparwar 消融猪的 AV 结并评估消融后的心室率。接受 ADCY6 的动物具有源自基因注射部位附近的稳定逸搏节律,而对照组没有。但是显著缺点是对肾上腺素受体刺激的持续依赖性,因此需要寻找部分受体独立刺激的替代方案,考虑到 ADCY1 和 ADCY8 有固有的高环化酶活性和 Ca^{2+} 的额外刺激,基因表达将能够诱导恒定起搏功能的环磷酸腺苷(cAMP)信号。体外实验表明 ADCY1 增加基础 cAMP 水平,明显增强 HCN2 V1/2 的活化,增加过表达 HCN2 乳鼠心肌细胞的自发搏动频率。

Boink 等^[14]将 HCN2 与 ADCY1 进行了比较,他们将分别编码 HCN2 与 ADCY1 基因的腺病毒注射到具有完全房室传导阻滞犬的左束支中。在基因转移后 5~7 天,检测到 HCN2 组具有 50 次/分的基础心率,平均逸搏时间为 2.4s,以及对备用电子起搏器的依赖时间为 34%,与之前讨论的 HCN 研究一致的结论。ADCY1 组具有 60 次/分的基础心率,超速起搏之后的平均逸搏时间为 1.3s,使用备用电子起搏器时间为 2%,95% 的起搏来自注射区。这些数据表明 ADCY 比 HCN 家族更有可能创建生物起搏。

五、组合基因共表达

考虑到窦房结功能的复杂性,很可能需要操纵多个基因以构建具有足够基础心率,应激反应,能够从过度刺激中快速恢复以及完全不依赖电子起搏器特性的生物起搏。Boink 等^[14]将编码 HCN2 和腺苷酸环化酶 ADCY1 的腺病毒嵌合体注射到具有完全房室传导阻滞的犬的左束支中。HCN2 + ADCY1 的组合具有 120 次/分的基础心率,平均逸搏时间为 1.1s,后备电子起搏器时间为 1%。与单独的 HCN2 或 ADCY1 相比,HCN2 + ADCY1 更接近狗的正常心率。这些数据都表明 HCN2/AC1 联合表达优于两者单一表达。

在后续研究中,Boink 等^[15]将携带 HCN2 和

SCN4 的腺病毒(SCN4 是骨骼肌钠通道的变体,其在较小的偏振膜电压下具有连续活性,因此具有比心脏钠通道更稳定的功能)以静脉导管方式将载体递送到具有完全房室传导阻滞的犬中,分别通过心内膜进入左束支或者通过心外膜方法进入左心室(LV)游离壁。他们发现当载体被递送到左束支时,HCN2 + SCN4a 相对于单独的 HCN2 组更具有起搏活动,而当置入到左心室(LV)游离壁时没有差异。对于递送至左束的 HCN2 - SCN4a 组,在峰值转基因表达所获取的数据显示平均心率为 80 次/分,并且没有使用备用电子起搏器。

Cingolani 等^[16]评估了 HCN2 和 KCNJ2 - AAA 在具有完全房室传导阻滞的猪模型中的起搏功能。与 Boink 等^[15]的研究一样,他们比较了 LV 游离壁注射与左束支传导注射,而观察到的结果不同。对于 LV 游离壁组,他们看不到任何起搏活动。使用左束支传导注射的组合组中,他们观察到平均心率为 94 次/分和 3% 的备用电子起搏器利用率。在 Boink 等^[15]和 Cingolani 等^[16]报告一致的结果是由于注射部位导致的起搏差异,提示构建生物起搏可能仍然需要内在起搏性,转基因可能是增强而不是重建起搏。这些结果表明通过联合多种离子通道的表达,可优化生物起搏的效能。

六、转录因子

增加生物起搏效应的另一种方法是靶向控制多个基因表达的转录因子。已经显示转录因子可促进胚胎时期中胚层细胞表达起搏基因并抑制工作心肌基因的表达来诱导心脏窦房结的发育成熟^[17,18]。TBX18 是保守的转录因子 TBOX 家族中与心脏静脉极相关的 TBX1 亚族中的一员,是新的祖细胞标志因子之一,TBX18 在动物心脏发育中的原始心外膜、室间隔、瓣膜、上腔静脉及窦房结中都有表达,TBX18 对窦房结头区的发育至关重要,TBX18 基因敲除小鼠显示窦房结(SAN)头部严重发育不良,表现为静脉窦畸形,而 SAN“尾”正常发育。Kapoor 等^[19]最初用该转录因子体外转导乳鼠心肌细胞。他们注意到,9% 的转导细胞具有自发动作电位和形态学变化,包括更小的尺寸和更少的肌节组织;细胞的电生理分析显示静息膜电位降低,IK1 密度降低,If 密度增加,钙从肌浆网定期释放。随后研究者向豚鼠心尖部注射编码 TBX18 的腺病毒,观察到静息膜电位的下降和体内转导细胞的形态学变化,类似于他们的体外实验,且心室率显著增加。即使 8 周分离的心肌细胞中已经检

测不到 TBX18 表达,这些变化仍然存在。

在来自同一组的报告中,Hu 等^[20]在 7 只猪的心室中注射了编码 TBX18 的腺病毒,并且在 AV 节消融后观察心室率。与接受编码绿色荧光蛋白基因(GFP)的对照组比较,在注射 5 ~ 11 天后,即基因表达高峰期间,转导 TBX18 组具有更快的心室率(78 次/分 vs 65 次/分)。TBX18 动物使用备用电子起搏器时间减少(1% vs 10%)。与 Kapoor 等^[19]的报告中 TBX18 基因表达缺失后效应的持续性不同,Hu 等^[20]的报告中基因转移后 11 天自动性开始降低。这些关于转录因子基因转移的效果持续时间的差异需要解决。这一调查线有许多与 HCN 家族的早期发现的相同的问题。转录因子重建生物起搏之前肯定需要更多的研究工作,但前途是光明的。

七、细胞生物起搏

一般来说,通过细胞移植构建起搏器遵循了两种方法:使用间充质干细胞作为基因递送平台或者使用具有内在自动性的细胞(例如,分离的窦房结细胞、胚胎干细胞或多能干细胞起搏器谱系)。

Potapova 等^[21]报道了一种细胞和基因杂交的治疗方法,他们将 HCN2 基因转入人间充质干细胞(hMSC),然后将它们移植到犬左心室。表达 HCN2 的细胞与附近的心室肌细胞偶合并基本上充当心肌细胞 4 期去极化的驱动剂:心肌细胞将在复极期间将其膜电位传递到 MSC,激活 MSC 的 If 电流,并且电流将通过缝隙连接传输到心室肌细胞,导致 4 期去极化并因此产生双细胞单元的自动化。研究者比较了 4 只对照动物和 6 只接受 HCN2 转导的 MSC 的动物。他们使用强迷走神经刺激诱导窦性停搏,所有动物在窦性停搏期间具有窦房结或心室逸搏节律。对照组中两只具有右心室(RV)逸搏节律,另两只具有左心室(LV)逸搏节律,平均逸搏节律为 45 次/分;6 只 HCN2 - hMSC 动物中 5 只具有 LV 逸搏节律,平均逸搏节律为 61 次/分,且逸搏节律映射到 HCN2 - MSC 动物中的注射靶点上。尽管该实验属异种移植,然而在 6 周之后并没有发生任何免疫排斥反应,亦未发现细胞凋亡现象。

Cho 等^[22]改进了 HCN 转导细胞的方法。他们用 HCN1 同种型转导成纤维细胞,然后用聚乙二醇 5000(PEG5000)诱导表达 HCN1 的成纤维细胞与离体的豚鼠心室肌细胞融合,然后将细胞混合物注入豚鼠中,再用乙酰胆碱诱导窦性停搏后非常有限的体内数据显示,只有偶尔的搏动来自注射部位。然而除了

有 HCN1 表达,研究人员推测另一个因素是成纤维细胞/肌细胞复合物增加细胞表面积,从而将肌细胞的 IK1 稀释了大约 20% 从而产生逸搏节律。这项研究显示细胞融合概念的可行性,但将来可否用聚乙二醇作为熔合剂应用于人体生物起搏还有待考虑。

最近一项研究首次使用了源自人类多能干细胞的肌细胞(iPSC-CM)在犬模型构建生物起搏,其由健康志愿者捐赠的人毛囊角质形成细胞衍生。Chauveau 等^[23]将 40~75 个节律性收缩的胚状体[总共为 $(1.3 \sim 2.0 \times 10^6)$ 个 iPSC-CM]注入房室传导阻滞的犬左心室内(使用免疫抑制剂减少异种移植的排斥反应)。每两周进行心电图和 24h 动态心电图监测。4~13 周后,注射肾上腺素($1 \mu\text{g}/\text{kg}$),取出心脏用于组织学或电生理学研究。连续动态心电图监测显示,将人 iPSC 衍生的自发性跳动的心肌细胞聚集移植到房室传导阻滞的免疫抑制犬的左心室游离壁 1~4 周后,60%~80% 的心跳起源于细胞注射部位,生物起搏的平均和最大搏动频率分别为每分钟 45 和 75 次。在 4 周时,注射位点搏动的最大夜间和日间频率分别为 53.0 ± 6.9 次/分和 69.0 ± 10.4 次/分。在使用肾上腺素输注的肾上腺素能受体刺激期间,肾上腺素将心率从 35.0 ± 4.3 次/分提高到 65.0 ± 4.0 次/分,表明异位搏动对儿茶酚胺敏感。最后,研究人员在移植前用亲脂性膜染色 DiI 标记了 iPSC 心肌细胞,并且在心肌内注射后 9 天,组织学显示在注射部位附近发现 DiI+ 细胞。最值得注意的是,这些 DiI+ 细胞也表达了缝隙连接蛋白 43,表明与现有心肌形成有效的电耦合。该研究表明 iPSC-CM 可以整合到宿主心肌中创建生物起搏,但 13 周后犬因为严重的免疫反应被安乐死,起搏速率和节律仍有待优化。

综上所述,到目前为止,研究中用于评价诱导的、衍生的或重编程的起搏样细胞(PC)的标准不一致。虽然使用了电生理,基因表达和形态学标准来评价,但很少与真正的 PC 的定量比较;由于胚胎心肌细胞表现出强大的自动性,因此很难区分未分化的胚胎心肌细胞和真正的 PC 祖细胞;目前方法的另一个潜在限制是缺乏对最早 PC 祖细胞的详细了解,这些祖细胞尚未在哺乳动物胚胎中被分离或表征,可能存在对早期 PC 发育至关重要但还未鉴定的转录调节因子或信号转导通路,因此对 SAN 最早发育阶段的进一步研究可能揭示如何选择和编程前体细胞到 PC 的新线索。心脏生物起搏器技术尚处于基础研究阶段,

还存在许多问题有待解决。在应用到临床之前,需要开发更好的工具和方法来进行大型动物重编程研究,相信随着相关技术的发展以及向未知领域的不断涉足,生物起搏前景是光明的。

参考文献

- Baiarinen S, Oikarinen L, Toivonen L. Short-term implantation-related complications of cardiac rhythm management device therapy: a retrospective single-center 1-year survey[J]. *Europace*, 2010, 12(1): 103-108
- Edelberg J, Aird W, Rosenberg R. Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human beta2 adrenergic receptor cDNA[J]. *Clin Invest*, 1998, 101(2): 337-343
- Edelberg J, Huang D, Josephson M, et al. Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy[J]. *Heart*, 2001, 86(5): 559-562
- Ziady AG, Kim J, Colla J, et al. Defining strategies to extend duration of gene expression from targeted compacted DNA vectors[J]. *Gene Ther*, 2004, 11(10): 1378-1390
- Miake J, Marban E, Nuss H. Biological pacemaker created by gene transfer[J]. *Nature*, 2002, 419(6903): 132-133
- Miake J, Marban E, Nuss H. Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression[J]. *Clin Invest*, 2003, 111(10): 1529-1536
- Qu J, Plotnikov A, Danilo PJ, et al. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart[J]. *Circulation*, 2003, 107(8): 1106-1109
- Plotnikov A, Sosunov E, Qu J, et al. Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch receptive ectopic rhythms that have physiologically acceptable rates[J]. *Circulation*, 2004, 109(4): 506-512
- Cai J, Yi FF, Li YH, et al. Adenoviral gene transfer of HCN4 creates a genetic pacemaker in pigs with reduced atrioventricular block[J]. *Life Sci*, 2007, 80(19): 1746-1753
- Bucchi A, Plotnikov A, Shlapakova I, et al. Wild-type and mutant HCN channels in a tandem biological-electronic governmental pacemaker[J]. *Circulation*, 2006, 114(10): 992-999
- Tse H, Xue T, Lau C, et al. Bioartificial sinus node constructed via in vivo gene transfer of an engineered pacemaker HCN channel reduces the dependence on electronic pacemaker in a sick-sinus syndrome model[J]. *Circulation*, 2006, 114(10): 1000-1011
- Plotnikov AN, Bucchi A, Shlapakova I, et al. HCN212-channel biological pacemakers manifesting ventricular tachyarrhythmias are responsive to treatment with I(f) blockade[J]. *Heart Rhythm*, 2008, 5(2): 282-288
- Ruhparwar A, Kallenbach K, Klein G, et al. Adenylyl cyclase VI transforms ventricular cardiomyocytes into biological pacemaker cells[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(6): 1867-1872
- Boink GJ, Nearing BD, Shlapakova IN, et al. Ca^{2+} -stimulated adenylyl cyclase AC1 administered efficient biological pacing as single gene therapy and in combination with HCN2[J]. *Circulation*, 2012, 126(5): 528-536

(下转第 193 页)

- artery[J]. *Neurosci Methods*,2009, 184: 95 – 103
- 5 Guzel A, Rolz R, Nikkhah G, *et al.* A microsurgical procedure for middle cerebral artery occlusion by intraluminal monofilament insertion technique in the rat;a special emphasis on the methodology[J]. *Exp Transl Stroke Med*,2014, 6: 6
- 6 Rupadevi M, Parasuraman S, Rav eendran R. Protocol for middle cerebral artery occlusion by an intraluminal suture method[J]. *Pharmacol Pharmacother*, 2011, 2: 36 – 39
- 7 Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose[J]. *NeuroRx*,2005, 2: 396 – 409
- 8 Hata R, Maeda K, Hermann D, *et al.* Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice[J]. *Cereb Blood Flow Metab*,2000, 20: 937 – 946
- 9 Sun WH, Chen HS. A new middle cerebral artery occlusion model for intra – arterial drug infusion in rats[J]. *Neurosci Lett*,2015, 607: 102 – 107
- 10 Gerriets T, Li F, Silva MD, *et al.* The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Neurosci Methods*,2003, 122: 201 – 211
- 11 Ding G, Jiang Q, Li L, *et al.* MRI of combination treatment of embolic stroke in rat with rtPA and atorvastatin[J]. *Neurol Sci* 2006, 246: 139 – 147
- 12 Watson BD, Dietrich WD, Busto R, *et al.* Ind uction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis [J]. *Ann Neurol*,1985, 17:497 – 504
- 13 管兴志,匡培根. 光化学法诱导的脑梗死动物模型[J]. *国外医学·脑血管疾病分册*, 2000,1085:278 – 280
- 14 杨峰,赵雅宁,李建民. 光化学法诱导建立大鼠局灶性脑梗死模型的效果评价[J]. *河北联合大学大学:医学版*,2012; 14 (3) : 301 – 302
- 15 Hulya K,Sefik EE,*et al.* Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl₃ application: a novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies [J]. *J Cerebral Blood Flow Metab*,2011,31: 1452 – 1460
- 16 包玉龙.线栓法与改良三氯化铁法致大鼠脑中动脉闭塞模型的对比研究[J]. *动物医学进展*,2014,35(5) :68 – 71
- 17 Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. *Stroke*,1979,10: 267 – 272
- 18 Li H, Klein G, Sun P, *et al.* Buchan. CoQ10 fails to protect brain against focal and global ischemia in rats[J]. *Brain Res*,2000,877:7 – 11
- 19 严智文,董河,冯伟,等. 改良血管阻塞方法建立大鼠全脑缺血模型[J]. *中国医学创新*,2013, 10(1) :1 – 3
- 20 Kameyama M, Suzuki J, Shirane R, *et al.* A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat – three vessel occlusion model[J]. *Stroke*, 1985, 16: 489 – 493
- 21 张颖,高金环,韩松,等. 一种改良的三血管闭塞小鼠缺血性脑卒中模型的建立[J]. *基础医学与临床*,2017,1(37) :38 – 42
- 22 Eklof B, Siesjo BK. The effect of bilateral carotid artery ligation upon acid – base parameters and substrate levels in the rat brain[J]. *Acta Physiol Scand*,1972, 86: 528 – 538
- 23 武钊,黄伟青,文锐玲,等. 改良二血管阻断加低血压法制作大鼠全脑缺血再灌注模型[J]. *中国现代药物应用*,2012, 6(19) : 4 – 5
- 24 Kofler J, Hattori K, Sawada M, *et al.* Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice[J]. *Neurosci Methods*,2004, 136: 33 – 44. 21
- 25 Siemkowicz E, Hansen AJ. Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo –, normo – and hyperglycemic rats[J]. *Acta Neurol Scand*,1978, 58: 1 – 8
- 26 Barber PA, Hoyte L, Colbourne F, *et al.* Temperature-regulated model of focal ischemia in the mouse: a study with histopathological and behavioral outcomes[J]. *Stroke* ,2004, 35:1720 – 1725
- 27 黄亚平,胡克,雷琳,等. 脑梗死合并肺部感染临床动物模型的制作[J]. *中华医院感染学杂志*,2013, 6(23) :1256 – 1258
(收稿日期:2017 – 09 – 12)
(修回日期:2017 – 10 – 07)

(上接第 189 页)

- 15 Boink GJ, Duan L, Nearing BD, *et al.* HCN2/SkM1 gene transfer into canine left bundle branch in gt stable stable, autonomically responsive biomass pacing at physiological heart rates[J]. *Am Coll Cardiol*, 2013, 61(11) : 1192 – 1201
- 16 Cingolani E, Yee K, Shehata M, *et al.* Biological pacemaker created by percutaneous gene delivery via venous catheters in a porcine model of complete heart block[J]. *Heart Rhythm* , 2012,9(8) : 1310 – 1318
- 17 Wang J, Bai Y, Li N, *et al.* Pitx2 – microRNA pathway that delimits sinoatrial node development and inhibits predisposition to atrial fibrillation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2014,111(25) : 9181 – 9186
- 18 Franco D, Christoffels VM, Campione M. Homeobox transcription factor Pitx2: the rise of an asymmetry gene in cardiogenesis and arrhythmogenesis[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2014, 24(1) : 23 – 31
- 19 Kapoor N, Liang W, Marban E, *et al.* Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18[J]. *Nat Biotechnol*,2013,31(1) : 54 – 62
- 20 Hu YF, Dawkins JF, Cho HC, *et al.* Biological pacemaker created by minimally invasive somatic reprogramming in pigs with complete heart block[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(245) : 245ra94
- 21 Plotnikov AN, Shlapakova I, Szabo MJ, *et al.* Xenografted adult human mesenchymal stem cells provided a platform for cured biological pacemaker function in canine heart[J]. *Circulation*, 2007, 116(7) : 706 – 713
- 22 Cho HC, Kashiwakura Y, Marbn E. Creation of a biological pacemaker by cell fusion[J]. *Circ Res*, 2007, 100(8) : 1112 – 1115
- 23 Chauveau S, Anyukhovsky EP, Ben – Ari M, *et al.* Induced pluripotent stem cell – derived cardiomyocytes provide in vivo biological pacemaker function [J]. *Circ Arrhythmic Electrophysiol*, 2017, 10 (5) : e004508
(收稿日期:2017 – 11 – 02)
(修回日期:2017 – 12 – 04)