

# 体内外获取心脏起搏细胞的方法学探讨\*

张进<sup>1</sup> 魏飞宇<sup>1</sup> 王礼琳<sup>1</sup> 丁立群<sup>1</sup> 张曦<sup>1</sup>  
匡晓晖<sup>1</sup> 李颖<sup>1</sup> 白鹤群<sup>1</sup> 范洁<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:体外诱导人诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)分化为心脏起搏细胞,体内解剖精确定位获得兔窦房结组织,进而直接获得心脏起搏细胞。方法:体外 Cellapy 法高效诱导人 iPS 细胞分化为心肌细胞和心脏起搏细胞,肉眼观察心脏起搏细胞形态及起搏频率,免疫荧光检测人 iPS 源性心脏起搏细胞中特异性标志物 HCN4 阳性比例。体内解剖精确定位获得兔心脏起搏细胞后,应用 qRT-PCR 及免疫印迹法检测兔心脏起搏细胞 HCN4 mRNA 及蛋白表达水平。结果:运用 Cellapy 方法成功将人 iPS 细胞诱导分化为具有自发跳动特性的心脏起搏细胞,显微摄像记录显示心脏起搏细胞搏动频率为(70.60±2.71)次/min,且细胞形态以梭型为主;免疫荧光显示人 iPS 源性心脏起搏细胞中 HCN4 蛋白阳性细胞占(9.42±1.57)%。同时,qRT-PCR 及 Western blot 结果显示兔窦房结组织中心脏起搏细胞 HCN4 表达明显高于心房肌和心室肌( $P<0.01$ )。结论:体外 Cellapy 诱导法和动物体内解剖精确定位是获得心脏起搏细胞的两种有效方法。这为研究病态窦房结综合征的发病机制提供了可靠的细胞来源,同时为病态窦房结综合征的治疗提供了移植细胞。

**[关键词]** iPS 细胞;起搏细胞;窦房结组织;HCN4;病态窦房结综合征;方法学

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2017.04.017

[中图分类号] R541.7 [文献标志码] A

## The methodology of harvesting cardiac pacemaker cells by vivo and vitro

ZHANG Jin WEI Feiyu WANG Lilin DING Liqun ZHANG Xi

KUANG Xiaohui LI Ying BAI Hequn FANG Jie

(Department of Cardiology, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, 650032, China)

Corresponding author: FANG Jie, E-mail: fanj913@sina.com

**Abstract Objective:** To establish a new method of human iPS cells differentiate into cardiac pacemaker cells in vitro and separation of rabbit sinoatrial node tissue by accurate anatomy positioning in vivo. **Method:** Inducing of human iPS cells differentiation into pacemaker cells by Cellapy method, macroscopic was used to observe the pacemaker cell morphology and pacing rate. Immunofluorescence was used to detect expression of HCN4 positive ratio of the differentiation of pacemaker cells. Meanwhile, rabbit sinoatrial node tissue was separate by the precise anatomical, qRT-PCR and immune blotting was performed to detect HCN4 relative mRNA and protein expression level. **Result:** Human iPS cells was successfully induced differentiate into spontaneously beating pacemaker cells by Cellapy method. The morphological forms of pacemaker cell were mainly fusiformis cells and the beating rate was about (70.60±2.71) beats per minute; immunofluorescence showed that the HCN4 positive cells was accounted for(9.42±1.57%) in the induced differentiation of cells; qRT-PCR and blotting results showed that the mRNA and protein of HCN4 expression was significantly higher in sinoatrial node tissue than the atrial and ventricular myocytes ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** The present study demonstrated that human iPS cells was induced differentiate into cardiac pacemaker cells by Cellapy method and accurate separation of rabbit sinoatrial node were effective methods to harvesting cardiac pacemaker cells, which provides an important cell resources for studying molecular mechanism and treatment of sick sinus syndrome.

**Key words** iPS stem cells; pacemaker cell; sinoatrial node; sick sinus syndrome; HCN4

病态窦房结综合征是一种由不同病因引起的,由于心脏窦房结组织中起搏细胞冲动发放频率减低或冲动传导障碍导致的缓慢性心律失常,其临床表现为显著心动过缓,窦性停搏,窦性静止等。如

果不积极给予心脏起搏器干预治疗,会显著增加患者死亡率。目前其发病机制仍未完全阐明<sup>[1]</sup>,究其主要原因在于:在体外,难以获得与人窦房结组织中起搏细胞电生理特性相似的细胞系;在动物体内,由于窦房结组织解剖结构在不同物种之间的差异性较大,导致窦房结组织分离十分困难,因而影响了起搏细胞的获取。诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)的出现及窦房结解剖定位认识的不断加深弥补了以上缺陷。iPS 细

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(No: 81260038, 81360039);云南省心律失常诊治研究中心研究基金项目(No: 2014NS260, 2014NS259)

<sup>1</sup> 云南省第一人民医院心内科(昆明,650032)  
通信作者:范洁, E-mail: fanj913@sina.com

胞可诱导分化为多种功能细胞,包括心肌细胞和起搏细胞。iPS 细胞首次由 Takahashi 和 Yamanaka 通过逆转录病毒介导的 Oct-4、Sox2、Klf4 及 c-Myc 4 个“多能性基因”转入小鼠皮肤的成纤维母细胞,将成体细胞重编程为具有多分化潜能的干细胞<sup>[2]</sup>。由赛贝公司研发出的 Cellapy 法可高效诱导人 iPS 细胞分化为心房肌、心室肌细胞及部分起搏细胞<sup>[3-4]</sup>。目前,在动物体内通过解剖定位获得高纯度的动物窦房结组织及其起搏细胞仍然面临许多挑战<sup>[1]</sup>,国内研究的不多<sup>[5]</sup>。本研究旨在通过体内、外方法获取动物起搏细胞或人源性起搏细胞,为后期研究病态窦房结综合征的发病机制及细胞移植治疗提供一个可靠的细胞来源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Human fibroblast-driven iPS cells (北京赛贝公司, CA2001106); CardioEasy 心肌细胞 (北京赛贝公司, CA2001506); CardioEasy 心肌纯化及分化试剂盒 (北京赛贝公司, CA2005100 及 CA2004500); RNA 提取试剂盒 (德国 Qiagen 公司, 74134); 反转录试剂盒 (大连 TaKaRa 公司, A360); SYBR (美国 ABI 公司, 4367659); 一抗: 兔来源的 Anti-HCN4 antibody (sc-28750); 二抗: Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) HRP (Thermo Fisher, 65-6120)。兔, 雌雄不限。

### 1.2 兔窦房结细胞分离培养

将新西兰乳兔呈仰卧位固定, 消毒胸腹部皮肤, 沿胸骨右缘剪开并去除胸前壁, 暴露心脏, 迅速取下心脏, 逆向灌注 35~37℃ 含钙离子的 2.5 mmol/L 台氏液, 洗去心腔和冠状动脉内的血液, 同时保持心脏有节律的跳动, 由于兔子心脏的最高起搏点即窦房结组织呈逗号状, 其头部分布在上腔静脉与右心房交界处, 尾部向下延伸接近下腔静脉, 用无钙的 Henselei 液灌注后按照上述解剖定位 (以上腔静脉与右心房交界处为起始, 向下延伸接近下腔静脉) 钳取 2 mm<sup>2</sup> 的逗号状组织块。具体解剖定位参考文献<sup>[1,6]</sup>。

### 1.3 Cellapy 法诱导人 iPS 分化为 CardioEasy 细胞及其纯化

37℃ 水浴预热 CardioEasy 心肌接种培养基、PBS 溶液和 Accutase 传代工作液, 取出包被过 Matrix 的培养皿→吸走 CardioEasy 心肌维持培养基, 并且加入 PBS 溶液清洗 1 次→加入 Accutase 传代工作液使之完全覆盖皿底→37℃ 孵育 15~30 min, 显微镜下观察到大部分细胞相互分离, 且呈现“圆形”, 表明细胞消化时间理想→用移液枪轻柔吹打, 制成单细胞悬液。将细胞悬液转至 15 ml 离心管中, 再向皿中加入适量 PBS 溶液→弃去上清, 用 Cardio Easy 心肌接种培养基重悬细胞, 轻柔吹

打混匀, 并按 2 : 1~3 : 1 的比例接种到准备→5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h, 更换为 CardioEasy 心肌维持培养基→待心肌细胞稳定搏动 1~2 d 后, 吸走 CardioEasy 心肌维持培养基, 加入 PBS 溶液清洗 1 次, 更换为 CardioEasy 心肌纯化完全培养基进行纯化→5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 恒温培养箱中培养 4 d, 过程中无需换液。纯化结束后, 加入 PBS 溶液清洗 1 次去除死细胞, 更换为 CardioEasy 心肌维持培养基, 维持培养。人 iPS cells 来源、培养、诱导及分化参考文献<sup>[3-4]</sup>。

### 1.4 免疫荧光

将人 iPS 细胞诱导分化成的起搏细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.2% triton100 破膜 20 min, 10% 山羊血清封闭 1 h, 加入一抗 Anti-HCN4 antibody, HCN4 标记窦房结细胞特异性离子通道蛋白, 4℃ 孵育过夜, 次日 PBS 洗 3 遍, 根据一抗来源加相应二抗室温孵育 1 h, DAPI 染细胞核 10 min, 荧光倒置显微镜观察。

### 1.5 qRT-PCR 检测

用 Qiagen 试剂盒提取兔窦房结组织总 RNA。采用 SYBR 法在 Real-time-PCR 7900 仪上行定量 PCR 扩增, 反应体系: cDNA 1 μl、上游引物 0.5 μl、下游引物 0.5 μl, SYBR 5 μl、水 3 μl, 反应条件: 95℃ 1 min→95℃ 15 s→60℃ 60 s→95℃ 15 s→60℃ 15 s→95℃ 15 s, 第 2~4 步 35~40 个循环, 以 GAPDH 为内参, 利用 TaKara-PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒反转录出 cDNA, -20℃ 保存备用, 利用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法统计结果。

### 1.6 Western blot 实验

取兔窦房结组织, 提取总蛋白, BCA 法测蛋白浓度。取相同量总蛋白行 SDS-PAGE 电泳, 80 V 电压 20~30 min, 120 V 电压约 90 min。300 mA 湿转印 120 min, 将蛋白转印到 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 根据需要加入一抗 Anti-HCN4 antibody, 4℃ 孵育过夜, 次日 TBST 洗膜 3 次, 根据一抗来源加入相应的二抗, TBST 洗膜 3 次, ECL 发光液在 ChemiDoc™ XRS+ System (BIO-RAD) 显影, 用 image 软件曝光加灰度值分析。

### 1.7 统计学处理

每个实验重复 3 次, 每次至少 3 个样本。数据用 ( $\bar{x} \pm SD$ ) 表示, 所有的数据统计均使用 SPSS 17.0 软件, 根据需要用 Student *t* 检验进行统计学显著性分析, 3 组比较用单因素方差分析。P < 0.05 则认为差别有统计学意义。

## 2 结果

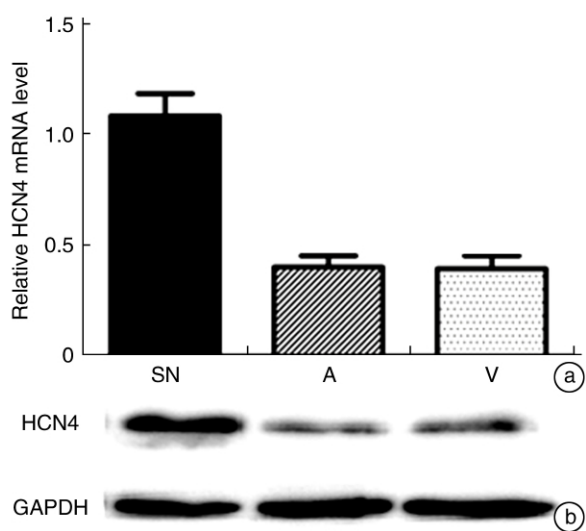
### 2.1 iPS 细胞成功诱导分化成起搏细胞

人皮肤成纤维细胞起源的 iPS 在 Cellapy 方法下可成功诱导分化为起搏细胞。荧光倒置显微镜观察细胞呈梭型, 细胞搏动频率约 (70.60 ± 2.71)

次/min,免疫荧光染色结果显示起搏细胞特异性蛋白 HCN4 染色阳性率为 $(9.42 \pm 1.57)\%$ 。

## 2.2 兔窦房结起搏细胞 HCN4 高表达

本实验通过在显微镜下解剖定位精确分离兔窦房结组织,兔窦房结组织呈逗号状,其头部分布在上腔静脉与右心房交界处,尾部向下延伸接近下腔静脉,位于界嵴边缘中部静脉窦侧薄层区域<sup>[1,6]</sup>。我们取该部位组织进行检测,对窦房结起搏细胞特异性蛋白 HCN4 进行检测,qRT-PCR 显示分离出的窦房结组织 HCN4 的 mRNA 表达明显高于心室肌细胞及心房肌细胞 $[(1.083 \pm 0.101) : (0.399 \pm 0.0526) : (0.392 \pm 0.060), P < 0.01, n = 3]$ (图 1a)。免疫印迹结果显示相似的结果(图 1b)。



a: 荧光定量 PCR 显示兔窦房结、心房、心室三种组织中 HCN4 mRNA 表达水平; b: Western blot 显示兔窦房结、心房、心室三种组织中 HCN4 蛋白表达水平。SN: 窦房结; A: 心房组织; V: 心室组织。

图 1 兔窦房结、心房、心室三种组织中 HCN4 mRNA 及蛋白表达水平

Figure 1 The HCN4 expressions in mRNA and protein levels in different tissues of rabbits

## 3 讨论

窦房结是一个位于右心房上腔静脉入口处控制心脏有节律跳动的特殊组织,是心脏正常起搏点,由起搏细胞(功能细胞)和各种过渡细胞构成,其主要功能就是起搏细胞根据生理需求维持心率在一个适当的水平<sup>[1,7]</sup>。多种病因包括缺血,炎症、退行性病变、老龄化等均可引起窦房结及其外周组织发生病变而导致窦房结功能减退及病态窦房结综合征的发生<sup>[1,8-9]</sup>。由于病态窦房结综合征与心血管疾病严重程度和死亡率明显相关而日益受到重视。探索其发病机制并改善窦房结功能是目前缓慢性心律失常领域研究的热点和难点。而准确

获取心脏窦房结组织及其起搏细胞是研究病态窦房结综合征发病机制及其细胞移植治疗的关键环节。

人心脏窦房结是一个“位于”上腔静脉附近耳廓形的组织浓缩区,多成逗号状或长梭型,大部分(头部)位于上腔静脉与右心房交界的界沟上 1/3 的心外膜下,跳动频率 60~100 次/min<sup>[10]</sup>。而目前应用较多的大鼠窦房结与人定位不同,其大部分位于上腔静脉,紧邻右心耳嵴,向下可延伸到房间隔沟,心电图显示跳动频率为 300~400 次/min<sup>[11]</sup>。而兔窦房结组织位于界嵴边缘中部静脉窦侧,上腔静脉全层薄层区域,跳动频率 180~250 次/min<sup>[6]</sup>,解剖定位及自律性更接近人类心脏窦房结,且相对于其他小动物体型稍大。由于兔窦房结组织体积稍大,取材相对容易,是目前研究病态窦房结综合征发病机制的理想动物模型。窦房结的取材是影响起搏细胞分离成功的关键因素,而准确定位兔窦房结的取材部位是培养起搏细胞的最关键步骤,直接影响着培养细胞中起搏细胞所占的比例。我们参考之前研究报道方法,在解剖显微镜下于上腔静脉与右心房交界处,界嵴中部静脉窦侧对兔窦房结进行取材<sup>[1,6,12]</sup>。本研究通过显微镜下解剖精确定位找到窦房结组织,并对窦房结组织进行分子水平鉴定。结果显示:心脏起搏细胞特异性基因 HCN4 在窦房结组织高表达,而心房及心室肌表达极少或者不表达。研究表明,HCN4 是调控起搏电流及维持窦房结起搏细胞电生功能的关键和特异的基因<sup>[1]</sup>。据此,可以判断窦房结取材方法准确可靠。为后期研究窦房结相关疾病的发病机制提供可靠的组织和细胞来源。

病态窦房结综合征导致的缓慢性心律失常治疗主要是起搏器植入治疗,60 岁以上的患者占置入人工心脏起搏器的 50% 以上<sup>[13]</sup>,而生物起搏器为目前研究热点,利用干细胞移植构建“生物起搏器”来改善病态窦房结综合征患者窦房结功能是目前心律失常研究领域较前沿的课题<sup>[14]</sup>。用于诱导分化的干细胞较多,但效率都不高,主要有胚胎干细胞(ESCs)、间充质干细胞(MSCs)、iPS。iPS 是一种类似胚胎干细胞的新型干细胞,iPS 细胞可以从各种不同动物的不同体细胞转化而来,理论上,它可以分化为任何特定细胞,当然也包括心房肌、心室肌、起搏细胞。由于 iPS 细胞来源广泛,避免了免疫排斥反应,目前被认为是细胞治疗以及组织器官再生最有前景的种子细胞。研究报道人 iPS 细胞诱导分化为心肌细胞移植心肌梗死后心脏,可改善心肌梗死后的心脏功能及预后<sup>[15]</sup>。同时小鼠起源的 iPS 细胞在细胞诱导因子 Tbx3 作用下定性分化为超过 80% 具有生理和药理功能的起搏细胞的聚集体,这些聚集体表现为快跳动频率(300~400

次/min),接近小鼠心脏体内的心率<sup>[16]</sup>。但是目前对起搏细胞的研究多数为哺乳动物起源的 iPS,其电生理特性、细胞跳动频率、动作电位等和正常人细胞之间存在差异,同时也存在排斥反应,这也成为临床应用 iPS 诱导分化的起搏细胞治疗窦房结功能低下的主要障碍<sup>[17]</sup>。因此,寻找人 iPS 分化而来的起搏细胞及其高效的分化率尤其关键。本研究利用 Cellapy 方法中的特殊培养体系及其诱导方法,成功将人上皮成纤维细胞起源的 iPS 高效诱导分化成起搏细胞。该培养体系于 2011 年由 Chen 等提出<sup>[18]</sup>,它摒弃了既往配方复杂、成分不明确的含有动物成分的 hESC/iPSC 培养基,创新性地提出了化学成分明确的人源 hESC/iPSC 无饲养层培养基,该方法较传统的血清培养体系优势在于:化学成分明确、无动物源成分、支持无饲养层培养;简单的组分减少了对细胞自身生化过程的影响,避免了对进行测试的外部因子和药物作用的干扰;不同批次的培养基质量稳定、可重复性高;培养得到的 hESC/iPSC 克隆形态规则、紧密、不易分化,多能性标志物高表达,并具有向三胚层分化的能力。因而,该培养体系及其基础上的诱导方法是目前干细胞的主流培养和诱导技术。利用上述的 Cellapy 方法成功诱导出的起搏细胞在显微镜下成梭型,与人起搏细胞相似,跳动频率(70.60±2.71)次/min,更接近人自身起搏细胞跳动频率,同时对起搏细胞进行心脏起搏细胞特异性基因 HCN4 染色,结果提示其阳性率约为(9.42±1.57)%,提示该方法可使人源性 iPS 高效诱导分化为起搏细胞,可能成为未来构建“生物起搏器”的细胞源。同时,由于目前缺乏与人起搏细胞相似的细胞模型,其也可成为研究人起搏细胞电生理和病态窦房结综合征发病机制理想的工具。

总之,本研究利用体外 Cellapy 诱导法和动物体内解剖精确定位法成功获得了动物及人心脏起搏细胞,为以后研究病态窦房结综合征的发病机制及其细胞移植治疗提供了稳定的细胞来源。

#### 参考文献

- [1] DOBRZYNSKI H, BOYETT M R, ANDERSON R H. New insights into pacemaker activity; promoting understanding of sick sinus syndrome [J]. *Circulation*, 2007, 115:1921-1932.
- [2] 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.
- [3] LIANG P, LAN F, LEE A S, et al. Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease specific patterns of cardiotoxicity [J]. *Circulation*, 2013, 127: 1677-1691.
- [4] YU Y, SUN S, WANG S, et al. Liensinine- and niferine-induced cardiotoxicity in primary neonatal rat cardiomyocytes and human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17:E186.
- [5] 田野,张陈匀,王志,等. 人胚胎窦房结细胞原代培养及纯化方法探讨 [J]. *临床心血管病杂志*, 2013, 29 (1):70-72.
- [6] DOBRZYNSKI H, LI J, TELLEZ J, et al. Computer three-dimensional reconstruction of the sinoatrial node [J]. *Circulation*, 2005, 111:846-854.
- [7] KOJIMA A, KITAGAWA H, OMATSU-KANBE M, et al. Inhibitory effects of sevoflurane on pacemaker activity of sinoatrial node cells in guinea-pig heart [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 166:2117-2135.
- [8] 张进,范洁,王礼琳,等. 心室感知反应的心脏再同步化治疗对慢性心力衰竭伴持续性心房颤动的疗效 [J]. *临床心血管病杂志*, 2014, 30(10):914-915.
- [9] 张进,王礼琳,丁立群,等. 微伏极 T 波电交替筛选慢性心衰患者预防性植入心脏复律除颤器的临床研究 [J]. *临床心血管病杂志*, 2014, 30(4):302-304.
- [10] SANCHEZ-QUINTANA D, CABRERA J A, FARRE J, et al. Sinus node revisited in the era of electroanatomical mapping and catheter ablation [J]. *Heart (British Cardiac Society)*, 2005, 91:189-194.
- [11] YAMAMOTO M, DOBRZYNSKI H, TELLEZ J, et al. Extended atrial conduction system characterised by the expression of the hcn4 channel and connexin45 [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72:271-281.
- [12] YE SHENG X, QU Y, DAN P, et al. Isolation and characterization of atrioventricular nodal cells from neonate rabbit heart [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2011, 4:936-946.
- [13] MOND H G, PROCLEMER A. The 11th world survey of cardiac pacing and implantable cardioverter-defibrillators; Calendar year 2009—a world society of arrhythmia's project [J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2011, 34:1013-1027.
- [14] VEDANTHAM V. New approaches to biological pacemakers: Links to sinoatrial node development [J]. *Trends Mol Med*, 2015, 21:749-761.
- [15] IGLESIAS-GARCIA O, BAUMGARTNER S, MACRI-PELLIZZERI L, et al. Neuregulin-1beta induces mature ventricular cardiac differentiation from induced pluripotent stem cells contributing to cardiac tissue repair [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24:484-496.
- [16] JUNG J J, HUSSE B, RIMMBACH C, et al. Programming and isolation of highly pure physiologically and pharmacologically functional sinus-nodal bodies from pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Rep*, 2014, 2:592-605.
- [17] RIMMBACH C, JUNG J J, DAVID R. Generation of murine cardiac pacemaker cell aggregates based on es-cell-programming in combination with myh6-promoter-selection [J]. *J Vis Exp*, 2015, 96:e52465.
- [18] CHEN G, GULBRANSON D R, HOU Z, et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture [J]. *Nat Methods*, 2011, 8, 424-429.

(收稿日期:2016-11-03)