

心脏传导系统调控机制的研究

陈 浩综述 徐志伟审校

【摘要】 心脏传导系统(CCS)由几部分功能截然不同的亚单位在信号分子内皮素-1、神经调节蛋白-1和转录因子 Nkx2.5、Tbx 等参与的一系列精确的时空调节机制所组成,确保了正常心律和机体的血液流动;CCS 分化过程的意外缺陷可能会导致严重的节律紊乱发生。对 CCS 各成分起源和诱导分化机制的深入研究将有助于在治疗中运用组织工程的有效方法来修复或重建心脏传导系统。

【关键词】 心脏传导系统;调控机制;Nkx2.5;内皮素-1;神经调节蛋白-1;Tbx

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2010.03.005

高等脊椎动物心脏传导系统(CCS)由网络结构组成。电冲动的(AP)由窦房结发出,至心室肌完成电机械偶联。CCS 发育早期由于缺乏足够的缝隙连接蛋白 Cx45 偶联,心肌细胞各自独立起搏和收缩使电活动呈各向同性。初级心肌分化形成后,电冲动由心管尾侧静脉窦处的窦房结向头侧流出道区域线性单向传导,并随着初级房室腔的形成其传导速度逐渐加快;而房室管成环和房室结的形成虽然部分延缓了 CCS 的传导速度却有效隔离心房和心室的收缩时间,提高了泵血效能。当心室间隔和来源于次级心肌的浦肯野纤维网分化形成,心室电传导方向由“心底-心尖”转变为成熟的“心尖-心底”时,功能完整的 CCS 网络最终形成^[1]。

1 调控网络

CCS 亚结构的形成受到严密的时空调控:慢传导系统的窦房结和房室结组织以及快传导系统的浦肯野纤维网的出现时间分别对应于心管发生、成环和心室腔形成三个阶段;窦房结和房室结分别自流入道和房室管发出,而浦肯野纤维网则来源于心室小梁肌。成熟窦房结和房室结细胞的缝隙连接以 Cx45 为主而 A 型利钠肽(ANP)的含量较低;相反,浦肯野纤维细胞的缝隙连接以 Cx40 和 Cx43 为主且含有丰富的 ANP。心脏发育过程中 CCS 各组分均来源于共同的心肌祖细胞并受 Nkx2.5 等基因的密切掌控。其他一些转录因子如 Tbx 基因家族同样参与了 CCS 的发生过程;位于快传导系统中的

Tbx5 对于浦肯野纤维细胞表达 Cx40 和 ANP 必不可少;而 Tbx2 和 Tbx3 主要表达于慢传导系统如窦房结和房室结,并且作为转录抑制因子与 Nkx2.5 一起下调了以上区域 Cx40 和 ANP 的表达^[2]。

2 Nkx 2.5

Nkx2.5 作为 NK2 家族同源结构域转录因子不仅与心脏早期形态发生关系密切,而且在其后期发育和成体阶段均持续表达。研究发现,Nkx2.5 表达早在原肠胚期出现,既是心脏发生的最早标志物之一,又是包括 CCS 在内的心肌细胞定向分化的重要前提。Nkx2.5 表达缺失会导致严重的心脏发育异常使小鼠胚胎在心脏成环后不久即死亡^[3]。Nkx2.5 突变还与房间隔缺损和房室传导阻滞等先天性畸形有关;Nkx2.5 单倍剂量不足使 QRS 波时限明显延长,增强了心律失常易感性;而 Nkx2.5 单等位基因敲除或心室部位特异性 Nkx2.5 基因沉默则会导致由于房室结或房室束发育不足引起的房室传导缺陷^[4]。

CCS 部位(尤其是由希氏束、左右束支和浦肯野纤维网所组成的心室快传导系统)的 Nkx2.5 表达水平明显高于周围工作心肌。Meysen 等^[5]发现,Nkx2.5 杂合子突变的小鼠浦肯野纤维细胞分化数量严重不足,可引起浦肯野纤维网发育不全和心室传导功能异常。研究证实,浦肯野纤维网与其周围的工作心肌均来源于相同的心肌前体细胞;前者在形成时由前体细胞增殖阶段中撤出而多停留于 G0 期,减弱或失去继续分裂增殖的能力,募集相对幼稚的心肌表型成为传导细胞^[6]。浦肯野纤维网的分化时间被发现与 Cx40 出现和 Nkx2.5 首次峰值时间彼此对应,提示 Nkx2.5 单独或与 Tbx5 一

基金项目:国家自然科学基金(30772143)

作者单位:200127 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心心胸外科

起上调了 Cx40 表达并诱发心室 CCS 分化^[7]。不仅如此, Nkx2.5 在心室 CCS 中的表达水平随胚胎发育进一步升高并在出生前后达到第二次高峰, 说明心室 CCS 功能成熟还具有明显的 Nkx2.5 剂量和时间依赖性; 在此过程中干扰 Nkx2.5 表达会造成传导系统功能异常^[8]。

3 内皮素-1 和神经调节蛋白-1

早在 1930 年, Francis Davies 就发现鸟类心室浦肯野纤维网具有沿冠状动脉周围分布的明显特征。1995 年 Gourdie 等^[9]采用逆转录病毒谱系分析证实, 鸡胚中作为最外周 CCS 结构的动脉旁浦肯野纤维网与心室工作心肌起源相同, 并且其分化时间与胚心冠脉血流的出现时间显著相关; 提示来源于动脉组织(尤其是血流动力学改变所引起的)的旁分泌信号, 可能在浦肯野纤维的诱导分化过程中扮演了重要角色。1998 年 Gourdie 等^[10]进一步发现: 一种由冠状动脉血管床所分泌的剪切力诱导的细胞因子内皮素-1(ET-1), 在体外能够促使胚胎心肌前体细胞向浦肯野纤维分化。

ET-1 的合成开始于前体分子—前内皮素原(preproendothelin), 后者被蛋白酶水解为巨内皮素(Big-ET)后再由内皮素转化酶(ECE)转化为具有完全活性的 ET-1。尽管活化的 ET-1 在循环系统内持续存在并且其浓度在心力衰竭病人内还进一步升高, 但由于肺组织的快速清除作用其半衰期仅为数分钟, 因此仅在血管内膜附近作为旁分泌信号分子, 与相应 G 蛋白受体 ET_A、ET_B 和 ET_{B2} 结合而发挥生物学作用^[11]。干扰内皮素信号通路会导致相应的心血管系统发育畸形。研究发现, 48% 的 ET-1 沉默小鼠发生室间隔缺损, 并且在 ET_A 拮抗剂协同作用下此畸形的发生率上升至 90%; 不仅如此, 并发的心血管畸形还包括心室小梁肌和室间隔嵴肌缩减从而影响了 CCS 形成^[12]。

研究发现, 外源性 ET-1 能够上调小鼠胚胎干细胞分化过程中 sMHC、Cx40 和 Cx45 等 CCS 标志物表达^[13]; 而鸡胚中异位表达 Big-ET 和 ECE-1 则导致传导系统分布的相应改变^[14]。Hall 等^[15]进一步发现, ECE 广泛存在于内皮细胞、间充质细胞和心肌细胞中, 尤其在心室小梁肌和新生心室 CCS 中高表达; 提高血流动力学负荷能够上调 ECE 表达水平同时导致心室 CCS 的过早分化; 而给予 ET-1 双受体拮抗剂波生坦则会推迟鸡胚心室 CCS 的成熟时间^[16]。

神经调节蛋白(NRG)-1 能够诱导心室小梁肌

和瓣膜形成; 同时作为内皮细胞分泌的另一种旁分泌信号, 在心室 CCS 发育过程中也发挥了重要作用。Rentschler 等^[17]发现, NRG-1 能够上调乙酰胆碱酯酶(一种短期 CCS 分化标志物)和心室中早熟 CCS 的异位表达。同样, NRG-1 能够诱使小鼠胚胎心肌细胞向 CCS 转化(上调 ANP、Cx40、Cx45、HF-1b、minK 等分子标志物和 Nkx2.5、GATA4 等转录因子的表达)^[18]。需要注意的是, ET-1 和 NRG-1 体外诱导 CCS 分化能力局限在心脏形态发生的特定时间窗内(如小鼠胚胎发育第 8.5~10.5 d)。

4 TBX

Tbx 基因家族同样在心脏发育过程中扮演了重要角色。心管发育过程中头尾向的确立依赖于受维甲酸调控的 Tbx5 梯度表达, 呈现尾侧高、头侧低的特征分布。Tbx5 缺乏使心管尾侧发育不全导致心脏发育停顿在成环前期, 而 Tbx5 过度表达同样会导致心脏发育停滞; 提示其在窦房结附近区域发育过程(细胞募集和组织扩展)中起到了前导作用^[19]。此外, Tbx3 在窦房结区域持续表达提示其与窦房结形成密切相关; 心房异位表达 Tbx3 会相应增强心房的起搏活性^[20]。

Tbx5 被发现与 Holt-Oram 综合征有关, 后者是一种少见的遗传性疾病, 以肢体缺陷和包括房间隔缺损和房室传导阻滞等心脏畸形为主要特点。Tbx5 杂合子缺失导致 PR 间期延长和左右束支缺陷等类似 Holt-Oram 综合征的表现^[21]。Tbx5 和 Nkx2.5 通过转录因子 Id2 协同作用上调 Cx40 和 ANP 等心室特异性基因表达, 对于心室传导组织尤其是浦肯野纤维网的分化形成意义重大; Tbx5 单倍剂量不足则下调 ANP 和 Cx40 表达而影响心腔和房室传导系统发育^[22]。

与 Tbx5 不同, Tbx2 和 Tbx3 主要局限于缺乏 ANP、Cx40 和 Cx43 表达的初级心肌; 后者由于 Tbx3 的抑制作用使分化能力受限, 其肌细胞增生速度明显低于快速增生和扩展的心室肌。Tbx2、Tbx3 与 Tbx5 竞争, 通过与存在于 ANP 启动子部位的 T-box 结合位点 TBE 偶联而有效抑制了房室管和流出道区域 ANP 和 Cx40 的表达^[23]。Cai 等^[24]则发现, Nmyc1 主要表达于快速增生的心室小梁部, 对于次级心肌发生至关重要; 异位表达 Tbx2 会抑制 Nmyc1 表达从而妨碍心室腔及心室 CCS 发育。

5 展望

CCS 的解剖结构和生理机制已被清晰阐明, 与

心律失常和 CCS 分布特征有密切相关的相关基因突变(包括离子通道、肌节蛋白或缝隙连接)也被逐步发现,但其具体的分子调控机制仍在探索之中。虽然目前关于干细胞或多能前体细胞向心脏传导细胞转化方面的研究方兴未艾,但是仍面临巨大的技术挑战。随着分子生物学技术的日益进步,未来可以操控工程细胞向可以表达任何需要的电生理表型特征的传导细胞方向分化。由此,能够利用这些细胞来构建生物工程窦房结、房室结或浦肯野纤维网等传导组织并将其植入罹患传导系统功能异常的患者体内,成为临床新型的替代治疗途径。

参 考 文 献

- [1] Chi NC, Shaw RM, Jungblut B, et al. Genetic and physiologic dissection of the vertebrate cardiac conduction system [J]. *PLoS Biol*, 2008, 6(5):1006-1019.
- [2] Mikawa T, Hurtado R. Development of the cardiac conduction system[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2007, 18(1):90-100.
- [3] Draus JM Jr, Hauck MA, Goetsch M, et al. Investigation of somatic NKX2-5 mutations in congenital heart disease[J]. *J Med Genet*, 2009, 46(2):115-122.
- [4] Pashmforoush M, Lu JT, Chen H, et al. Nkx2.5 pathways and congenital heart disease; loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block[J]. *Cell*, 2004, 117(3):373-386.
- [5] Meysen S, Marger L, Hewett KW, et al. Nkx2.5 cell-autonomous gene function is required for the postnatal formation of the peripheral ventricular conduction system[J]. *Dev Biol*, 2007, 303(2):740-753.
- [6] Sedmera D, Reckova M, DeAlmeida A, et al. Spatiotemporal pattern of commitment to slowed proliferation in the embryonic mouse heart indicates progressive differentiation of the cardiac conduction system[J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2003, 274(1):773-777.
- [7] Harris BS, Spruill L, Edmonson AM, et al. Differentiation of cardiac Purkinje fibers requires precise spatiotemporal regulation of Nkx2.5 expression[J]. *Dev Dyn*, 2006, 235(1):38-49.
- [8] Briggs LE, Takeda M, Cuadra AE, et al. Perinatal loss of Nkx2.5 results in rapid conduction and contraction defects [J]. *Circ Res*, 2008, 103(6):580-590.
- [9] Gourdie RG, Mima T, Thompson RP, et al. Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinje fibers of the cardiac conduction system[J]. *Development*, 1995, 121(5):1423-1431.
- [10] Gourdie RG, Wei Y, Kim D, et al. Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting Purkinje fibers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(12):6815-6818.
- [11] Raoch V, Martinez-Miguel P, Arribas-Gomez I, et al. The peptidase inhibitor CGS-26303 increases endothelin converting enzyme-1 expression in endothelial cells through accumulation of big endothelin-1[J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 152(3):313-322.
- [12] Hutson MR, Kirby ML. Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2007, 18(1):101-110.
- [13] Gassanov N, Er F, Zagidullin N, et al. Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype[J]. *FASEB J*, 2004, 18(14):1710-1712.
- [14] Boullin J, Morgan JM. The development of cardiac rhythm [J]. *Heart*, 2005, 91(7):874-875.
- [15] Hall CE, Hurtado R, Hewett KW, et al. Hemodynamic-dependent patterning of endothelin converting enzyme 1 expression and differentiation of impulse-conducting Purkinje fibers in the embryonic heart [J]. *Development*, 2004, 131(3):581-592.
- [16] Sedmera D, Harris BS, Grant E, et al. Cardiac expression patterns of endothelin converting enzyme (ECE); implications for conduction system development [J]. *Dev Dyn*, 2008, 237(6):1746-1753.
- [17] Rentschler S, Zander J, Meyers K, et al. Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(16):10464-10469.
- [18] Patel R, Kos L. Endothelin-1 and Neuregulin convert embryonic cardiomyocytes into cells of the conduction system in the mouse[J]. *Dev Dyn*, 2005, 233(1):20-28.
- [19] McDermott DA, Hatcher CJ, Basson CT. Atrial fibrillation and other clinical manifestations of altered TBX5 dosage in typical holt-oram syndrome [J]. *Circ Res*, 2008, 103(7):e96.
- [20] Hoogaars WM, Engel A, Brons JF, et al. Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(9):1098-1112.
- [21] Moskowitz IP, Pizard A, Patel VV, et al. The T-box transcription factor Tbx5 is required for the patterning and maturation of the murine cardiac conduction system[J]. *Development*, 2004, 131(16):4107-4116.
- [22] Moskowitz IP, Kim JB, Moore ML, et al. A molecular pathway including Id2, Tbx5, and Nkx2-5 required for cardiac conduction system development [J]. *Cell*, 2007, 129(7):1365-1376.
- [23] Ribeiro I, Kawakami Y, Büscher D, et al. Tbx2 and Tbx3 regulate the dynamics of cell proliferation during heart remodeling[J]. *PLoS One*, 2007, 2(4):e398.
- [24] Cai CL, Zhou W, Yang L, et al. T-box genes coordinate regional rates of proliferation and regional specification during cardiogenesis[J]. *Development*, 2005, 132(10):2475-2487.

(收稿:2010-02-01)

(本文编辑:金谷英)