

ISL-1 和 Tbx18 联合转染对乳鼠心室肌细胞重编程的作用研究

张健 杨安康 杨媚 唐艳红 王晞 赵庆彦 王腾 陈玉婷 黄从新

【摘要】 目的:探讨 ISL-1 和 Tbx18 联合转染对乳鼠心室肌细胞重编程的作用,及能否在体外构建生物起搏点。 方法:将乳鼠心室肌细胞随机分成空白对照组、GFP 组、ISL-1 组、Tbx18 组、ISL-1 + Tbx18 组,分别转染相应病毒,培养 5~7 d 后 qRT-PCR、Western blot 和免疫荧光检测超极化激活环核苷酸门控离子通道蛋白亚型 4(HCN4)的表达情况,观察细胞形态和搏动频率变化,并用膜片钳技术记录细胞内电流活动。 结果:ISL-1 组、Tbx18 组和 ISL-1 + Tbx18 组的细胞搏动频率和 HCN4 的 mRNA 和蛋白表达水平较空白对照组和 GFP 组明显升高,其中 ISL-1 + Tbx18 组的细胞搏动频率和 HCN4 的 mRNA 和蛋白表达水平明显高于 ISL-1 组和 Tbx18 组(P 均 < 0.05)。通过免疫荧光技术,ISL-1 组和 Tbx18 组可检测到 HCN4 不连续表达,ISL-1 + Tbx18 组 HCN4 连续高表达。通过膜片钳技术,ISL-1 组和 Tbx18 组均仅有少数细胞可记录到起搏电流活动,而 ISL-1 + Tbx18 组大多数细胞可记录到起搏电流活动。 结论:ISL-1 和 Tbx18 联合表达能提高乳鼠心室肌细胞重编程为起搏样细胞的效率。

【关键词】 生物起搏;ISL-1;Tbx18;重编程

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2018.06.009

The effect of combined transfection of ISL-1 and Tbx18 on reprogramming of neonatal rat ventricular cardiomyocytes ZHANG Jian, YANG Ankang, YANG Mei, TANG Yanhong, WANG Xi, ZHAO Qingyan, WANG Teng, CHEN Yuting, HUANG Congxin. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute of Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Cardiology, Hubei 430060, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of combined transfection of ISL-1 and Tbx18 on reprogramming of neonatal rat ventricular cardiomyocytes and whether it could construct biological pacemaker in vitro. **Methods:** The neonatal rat ventricular cardiomyocytes were randomly divided into five groups: Bank, GFP, ISL-1, Tbx18, ISL-1 + Tbx18, which were transfected virus by grouped. After cultured 5~7 d, we observed the changes of cell morphology and beat rate, estimated the expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels protein subtype 4 (HCN4) by real-time fluorescence quantitative polymerase reaction (qRT-PCR), western blot, and immunofluorescence, and recorded cell current activity by patch clamp technique. **Results:** Compared with the bank group and GFP group, the cell beat rates and the expression levels of HCN4 mRNA and protein were significantly increased in ISL-1 group, Tbx18 group and ISL-1 + Tbx18 group. Of those, the mRNA and protein expression level of HCN4 and the cell beat rate in ISL-1 + Tbx18 group were significantly higher compared with ISL-1 group and Tbx18 group (all $P < 0.05$). By immunofluorescence, ISL-1 group and Tbx18 group could be detected discontinuous expression of HCN4, meanwhile the ISL-1 + Tbx18 group showed a continuous high expression of HCN4. The pacing current activity could

基金项目:湖北省技术创新专项(重大项目)(2016ACA153);中央高校基本科研业务费专项资金(2042015kf0229)

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

通信作者:黄从新,Email:huangcongxin@vip.163.com

be recorded by the patch clamp technique in the experimental group, while most of the cells could record the pacing current activity in group ISL-1 + Tbx18. **Conclusions:** The combination of ISL-1 and Tbx18 could improve the efficiency of reprogramming that neonatal rat ventricular cardiomyocytes translate into pacemaker-like cells.

【Key words】 Biological pacing; ISL-1; Tbx18; Reprogramming

缓慢性心律失常是由心脏起搏功能障碍或传导功能减退引起的以心率减慢为特征的一组疾病,心脏电子起搏器置入术的出现明显改善了缓慢性心律失常患者的生活质量。随着基因工程和分子生物学的进展,生物起搏器有望成为更为理想的治疗方式。与传统的治疗方式相比,生物起搏器更符合心脏的生理功能^[1]。生物起搏利用在胚胎发育中对窦房结起重要作用的转录因子,诱导心肌细胞重编程,向起搏样细胞转化^[2-4]。

多基因联合转染能有效提高细胞重编程效率^[5]。胰岛素基因增强子结合蛋白 1 (insulin gene enhancer binding protein 1, ISL-1) 是 LIM 同源结构域转录因子,是第二生心区心脏前体细胞的分子标志,对心脏发育和分化起重要作用;转录因子 Tbx18 是 T-box 家族中的一员,是胚胎期心脏前体外膜祖细胞群的分子标志,对窦房结的形成和发育起重要作用。本研究以慢病毒为载体,使 ISL-1 和 Tbx18 在乳鼠心室肌细胞(NRVM)中共表达,实现对窦房结胚胎发育通路的再激活,观察 NRVM 向起搏样细胞的转化情况,探讨其在体外构建生物起搏的可能性。

1 资料与方法

1.1 实验动物

出生后 1~3 d 的 SD 乳鼠 10~15 只,雌雄不限,由湖北省疾病预防控制中心提供,动物许可证号:SCXK(鄂)2015-0018。

1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清(美国 Gibco 公司), II 型胶原酶(武汉 Biosharp 公司), 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU, 美国 Sigma 公司), DMEM/F-12 培养基、胰酶细胞消化液(武汉碧云天公司), 携带 ISL-1 基因的慢病毒质粒(上海吉凯基因科技有限公司), 携带 Tbx18 基因的慢病毒质粒(上海汉恒生物科技有限公司), 大鼠环核苷酸门控离子通道蛋白亚型 4 (HCN4) 抗体(美国 Abcam 公司, ab32675), Alexa Fluor 647 标

记的山羊抗大鼠 IgG (美国 Abcam 公司, ab150159), SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)。实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)仪(美国 Life technologies 公司), 超高分辨共聚焦荧光显微镜(德国 Leica 公司, Leica-LCS-SP8-STED), 膜片钳系统(美国 MD 公司)。

1.3 NRVM 的分离和培养

采用 0.125% 胰酶 + II 型胶原酶消化法分离 SD 乳鼠的心室肌细胞, 差速贴壁法去除成纤维细胞, 前 2 d 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 BrdU 抑制成纤维细胞生长, 心肌细胞的接种浓度为 5×10^5 /mL, 每 48 h 换液一次。

1.4 慢病毒转染

将 NRVM 接种于孔板中, 调节各孔细胞数量相同, 随机分为空白对照组、GFP 组、ISL-1 组、Tbx18 组和 ISL-1 + Tbx18 组。各组分别以感染复数(MOI) = 50 转染 ISL-1、Tbx18、ISL-1 + Tbx18 和阴性对照病毒, 空白对照组不进行病毒转染。采用病毒液 + 感染增强液 (enhanced infection solution, ENI, S.) + 助染剂 (polybrene) 的转染方案, 将细胞放置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 8~12 h 后换回常规培养基, 48 h 后荧光显微镜下观察, 72~96 h 后流式细胞仪检测病毒转染效率。成功转染病毒后第 2、5、7 天在倒置显微镜和荧光显微镜下观察细胞形态和搏动频率。

1.5 qRT-PCR 法检测 HCN4 mRNA 表达水平

病毒转染 5~7 d 后 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA, 使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒将其逆转录为 cDNA, 进行 PCR 扩增, 每个样品均作 3 个复孔, 反应条件为: 95 °C 预变性 1 min, 95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 40 个循环, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因 mRNA 的相对表达水平, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参, 各引物序列见表 1。

表 1 各基因的引物序列及产物长度

引物名称	引物序列	产物长度/bp
GAPDH	上游引物 5'- CGCTAACATCAAATGGGGTG-3'	201
	下游引物 5'- TTGCTGACAATCTTGAGGGAG-3'	
HCN4	上游引物 5'- CACTAAGGGCAACAAGGAGACC-3'	281
	下游引物 5'- GGTAGTTGAAGACGCTGAGTTG-3'	
Tbx18	上游引物 5'- TCCAAGGTACTGGGAATGGC-3'	173
	下游引物 5'- TGTGCTGTATCGGTTGAGGG-3'	
ISL-1	上游引物 5'- GGCAATCAAATTCACGACCA-3'	124
	下游引物 5'- CCCTAACAAAGCACGTACAGCT-3'	

1.6 Western blot 检测 HCN4 蛋白表达水平

病毒转染 5~7 d 后 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳后转至 PVDF 膜,室温封闭 1 h,加入 HCN4 一抗 4 ℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 30 min,洗膜后 ECL 显影,用 AlphaEaseFC 软件处理系统对目标条带的灰度值进行半定量分析。

1.7 免疫荧光技术检测 HCN4 蛋白的表达

在共聚焦皿中培养细胞 5~7 d,4%多聚甲醛室温固定 15 min,用含 0.2% Titon X-100 和 0.3% H₂O₂ 的甲醇溶液封闭 15 min,2%BSA 封闭 15 min,加入 HCN4 一抗 4 ℃ 孵育过夜,荧光二抗室温孵育 1 h,DAPI 室温核染 10 min 后,抗荧光淬灭封片剂封片,超高分辨共聚焦荧光显微镜下观察。

1.8 膜片钳技术记录起搏电流

病毒转染 5~7 d 后,加入终浓度为 180 μmol/L 的 2-氨基乙酯二苯基硼酸(2-APB),于 37 ℃ 培养箱中孵育 15 min,阻断细胞间连接后,置于灌流槽内,灌流细胞外液,充灌电极内液后电极阻抗为 5~7 MΩ,室温控制在(25±2) ℃。应用 Axonpatch 700B 膜片钳放大器,Digital 700 AD/DA 转换器和倒置荧光显微镜,使用 Clampex 程序采样,膜片钳方式进行电流记录,钳制电位 -30 mV,封接破膜后采用全细胞记录模式,引发从 -140 mV 到 -40 mV、1.5 s 的超极化脉冲以测量起搏电流(I_f 电流),步阶为 10 mV,使用 4 mmol/L 氯化铯检测 I_f 电流的变化。记录数据应用 pCLAMP6.0.4 软件进行分析处理。

1.9 统计学分析

数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料均以均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

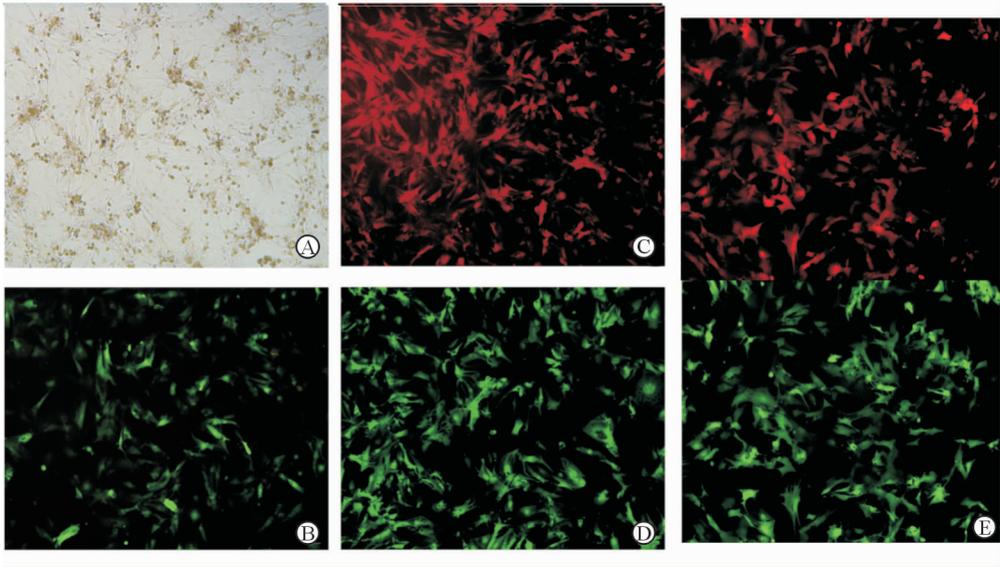
2 结果

2.1 各组细胞形态和搏动频率

病毒成功转染 48 h 后荧光显微镜下可见 ISL-1 组、Tbx18 组和 ISL-1 + Tbx18 组 NRVM 分别发出红色、绿色和红色 + 绿色荧光,同簇中细胞同步搏动,5 d 后多数细胞连接成网状,细胞成片搏动,7 d 后细胞均已相互形成连接,全部细胞搏动呈同步化。其中,GFP 组与空白对照组细胞搏动频率无明显差异,表明按最适 MOI 值转染慢病毒对 NRVM 影响不大,ISL-1 组、Tbx18 组、ISL-1 + Tbx18 组的细胞搏动频率较 GFP 组和空白对照组升高,其中 ISL-1 + Tbx18 组的细胞搏动频率较 ISL-1 组和 Tbx18 组明显升高(P 均 < 0.05),各组细胞搏动频率均于转染后第 5 天达高峰,同组之间相较于第 2 天和第 7 天有统计学差异(P 均 < 0.05)。见图 1、表 2。

2.2 各组 HCN4 的表达水平

空白对照组和 GFP 组 HCN4 mRNA 和蛋白表达水平的差异无统计学意义;ISL-1 组、Tbx18 组和 ISL-1 + Tbx18 组 HCN4 的 mRNA 和蛋白表达水平较空白对照组和 GFP 组明显升高,ISL-1 + Tbx18 组 HCN4 的 mRNA 和蛋白表达水平较 ISL-1 组和 Tbx18 组明显升高(P 均 < 0.05)。见表 3、图 2。



注: A 为空白对照组; B 为 GFP 组; C 为 ISL-1 组; D 为 Tbx18 组; E 为 ISL-1 + Tbx18 组

图 1 不同慢病毒转染后的乳鼠心室肌细胞(×100)

表 2 各组转染后不同天数的细胞搏动频率/次·min⁻¹

分组	2 d	5 d	7 d
空白对照组	51.20 ± 13.97	69.20 ± 8.93 ⁽⁵⁾	42.20 ± 7.46
GFP 组	50.00 ± 15.30	69.40 ± 7.93 ⁽⁵⁾	40.80 ± 7.79
ISL-1 组	55.80 ± 9.01 ⁽¹⁾⁽²⁾	74.60 ± 6.69 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁵⁾	57.20 ± 6.53 ⁽¹⁾⁽²⁾
Tbx18 组	65.40 ± 7.80 ⁽¹⁾⁽²⁾	82.80 ± 11.97 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁵⁾	63.80 ± 8.14 ⁽¹⁾⁽²⁾
ISL-1 + Tbx18 组	74.20 ± 11.26 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	98.40 ± 8.05 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾	70.00 ± 5.61 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾

注:与空白对照组相比,⁽¹⁾*P*<0.05;与 GFP 组相比,⁽²⁾*P*<0.05;与 ISL-1 组相比,⁽³⁾*P*<0.05;与 Tbx18 组相比,⁽⁴⁾*P*<0.05;与第 2 天和第 7 天相比,⁽⁵⁾*P*<0.05

表 3 各组 HCN4 的 mRNA 和蛋白相对表达水平比较

分组	mRNA 表达水平	蛋白表达水平
空白对照组	1.00 ± 0.00	(2.29 ± 0.09) × 10 ⁷
GFP 组	1.21 ± 0.16	(2.26 ± 0.07) × 10 ⁷
ISL-1 组	3.89 ± 0.34 ⁽¹⁾⁽²⁾	(3.09 ± 0.02) × 10 ⁷ ⁽¹⁾⁽²⁾
Tbx18 组	4.06 ± 0.29 ⁽¹⁾⁽²⁾	(3.83 ± 0.11) × 10 ⁷ ⁽¹⁾⁽²⁾
ISL-1 + Tbx18 组	6.19 ± 0.51 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	(6.85 ± 0.24) × 10 ⁷ ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾

注:与空白对照组相比,⁽¹⁾*P*<0.05;与 GFP 组相比,⁽²⁾*P*<0.05;与 ISL-1 组相比,⁽³⁾*P*<0.05;与 Tbx18 组相比,⁽⁴⁾*P*<0.05

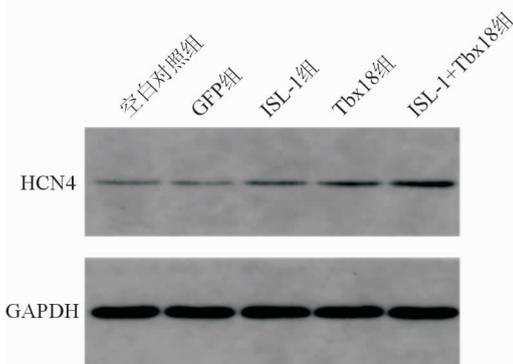
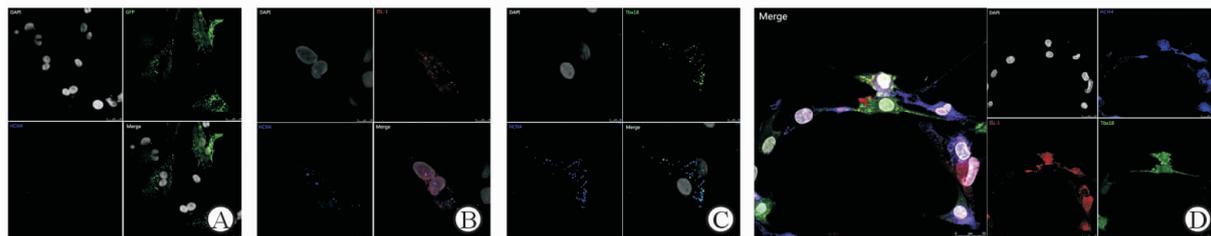


图 2 各组 HCN4 的蛋白表达水平

2.3 各组 HCN4 的免疫荧光表达情况

共聚焦荧光显微镜下可见,GFP 组细胞未见明显 HCN4 表达,但横纹肌明显;ISL-1 组多数细胞可检测到 HCN4 表达,主要分布在细胞膜和胞质中;Tbx18 组少数细胞可检测到 HCN4 表达,表现为大小不一、不连续、散在的荧光点;而 ISL-1 + Tbx18 组几乎每个细胞均可见 HCN4 表达,表现为大小不一、连续的荧光团或荧光点,表达 HCN4 的 NRVM 形态发生改变,触角减少,多为梭形,横纹肌不明显。见图 3。



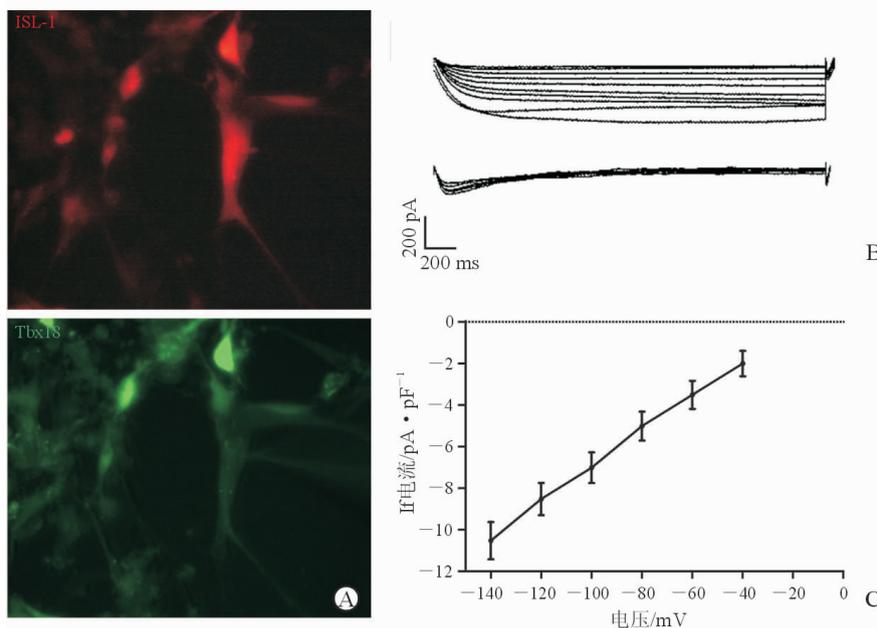
注: A 为 GFP 组; B 为 ISL-1 组; C 为 Tbx18 组; D 为 ISL-1 + Tbx18 组; 其中灰色荧光为细胞核, 红色荧光为 ISL-1, 绿色荧光为 Tbx18, 蓝色荧光为 HCN4

图 3 共聚焦荧光显微镜检测小鼠心室肌细胞 HCN4 的表达 (×400)

2.4 膜片钳技术记录各组 If 电流

在倒置荧光显微镜下选取细胞膜光滑、细胞体饱满、同时携带绿色和红色荧光的梭形细胞进行检测(见图 4A)。全细胞膜片钳结果显示, 空白对照组和 GFP 组均未记录到超极化激活的内向电流, ISL-1 组和 Tbx18 组均有少数细胞可以记录到超极

化激活的内向电流, 但 ISL-1 + Tbx18 组大多数细胞可以记录到超极化激活的内向电流, 且对 Cs⁺ 敏感, 当细胞外液中加入 4 mmol/L CsCl 阻断剂后, 该内向电流被阻断, 当细胞外液中的 CsCl 被洗脱后, 内向电流又迅速恢复(见图 4B), 该电流具有明显的电压依赖特性(见图 4C)。



注: A 为用于膜片钳记录的乳鼠心室肌细胞 (×200); B 中上图为 ISL-1 + Tbx18 组记录到的细胞内向电流, 下图为 CsCl 阻断后的电流; C 为 If 电流-电压关系

图 4 膜片钳技术检测细胞的起搏电流

3 讨论

心脏的起搏部位在胚胎发育过程中存在从左向右的转移。最开始产生自发动作电位的部位为心脏的左侧流入道, 即静脉窦区域, 而成年心脏产生自发动作电位的部位主要为右心房后^[6]。小鼠早在胚胎 9.5 d 时就可以在形态上鉴别窦房结结构, 在 12.5 d 时, 窦房结有了初步的形态和功能, 约在 14.5 d 时窦房结形成典型结构, 出现动作电位^[7]。

而在胚胎 9.5 d 时, ISL-1 主要表达在静脉窦, 即早期胚胎的原始起搏区, 其表达量随发育明显增加^[8]。小鼠胚胎从 8.5 d 开始, 流入道的腹面和侧面开始出现 Tbx18⁺ 细胞, 从 12.5 d 开始, Tbx18 逐渐在心室、心房及窦角区中表达, 参与静脉窦心肌细胞的分化, 此时可以从形态学上分辨窦房结^[9]。随着胚胎进一步发育, ISL-1 和 Tbx18 的表达均逐渐减少。研究发现, 虽然 ISL-1 和 Tbx18 在窦房结的胚胎发

育过程中分别代表着两个不同的且保持着物理分离的祖细胞系,但从胚胎 8.5 d 起,流入道的最外侧间质层可见二者的表达有部分重叠,在右心房的胚胎发育后期,这个表达区域越来越局限。此区域表达窦房结特异性基因 *Tbx3*,不表达 *Nkx2.5*,提示 *ISL-1* 和 *Tbx18* 的表达部位与胚胎发育期窦房结的位置有所重合,*ISL-1* 和 *Tbx18* 在窦房结的胚胎发育中起着重要的调控作用,若实现 *ISL-1* 和 *Tbx18* 的共表达可能会重建窦房结^[8-9]。本研究采用慢病毒载体将 *ISL-1* 和 *Tbx18* 基因整合至 NRVM 的基因组中,利用在窦房结发育中起关键调控作用的转录因子,促进 NRVM 向窦房结细胞转化,实现起搏样细胞的重编程,而不仅是增强或修复窦房结的功能。

心脏的自律性起源于窦房结起搏细胞舒张期产生的自动去极化。起搏机制中主要有两个时钟,包括 HCN 产生的膜时钟(If 电流)和局部肌浆网雷诺定受体的钙自动释放形成的钙时钟,二者相互依存、相互影响,并受自主神经调节^[10]。HCN 基因家族为 If 电流形成的分子基础,共有 4 个亚型(*HCN1*、*HCN2*、*HCN3* 和 *HCN4*),是影响起搏细胞自动去极化的关键因素^[11]。几个不同物种的研究表明,*HCN4* 在窦房结的发育中起重要作用^[12-15],但在出生之前,*HCN4* 在窦房结中的表达大幅下降,在心室中低表达或不表达^[16]。因此,*HCN4* 可作为窦房结发育的特异性标志物。在我们的研究中,*ISL-1* 组、*Tbx18* 组和 *ISL-1 + Tbx18* 组均可检测到 *HCN4* 的表达,其中 *ISL-1 + Tbx18* 组表达水平最高,表明 *ISL-1* 和 *Tbx18* 共表达能明显提高 *HCN4* 的表达水平,而免疫荧光检测进行了定位验证。If 电流是重要的起搏电流,我们的研究显示,*ISL-1* 和 *Tbx18* 联合表达的大多数 NRVM 能记录到 If 电流。同时,各实验组 NRVM 搏动频率均有明显提升,*ISL-1 + Tbx18* 组搏动频率提升最为明显。本研究表明,*ISL-1* 和 *Tbx18* 均能将一定的 NRVM 重编程为起搏样细胞,这与之前的研究一致^[17-20]。

本研究首次探讨 *ISL-1* 和 *Tbx18* 联合表达对 NRVM 重编程的作用,结果证明两者共表达能显著提高 NRVM 重编程为起搏样细胞的细胞数量和质量,能在体外构建一个全新且稳定的生物起搏点,但其能否在宿主体内实现起搏功能并维持这一功能,尚需进一步动物实验证实。另外,本实验中 *HCN4* 的扩增倍数不高,推测可能与种属差异有

关。窦房结的胚胎发育有多种因子参与,是否存在更好的组合方式,仍需进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Boink GJ, Christoffels VM, Robinson RB, et al. The past, present, and future of pacemaker therapies [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2015, 25(8):661-673.
- [2] Wiese C, Grieskamp T, Airik R, et al. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by *Tbx18* and *Tbx3* [J]. *Circ Res*, 2009, 104(3):388-397.
- [3] Kapoor N, Galang G, Marbán E, et al. Transcriptional suppression of *connexin43* by *TBX18* undermines cell-cell electrical coupling in postnatal cardiomyocytes [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(16):14073-14079.
- [4] Kapoor N, Liang W, Marbán E, et al. Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of *Tbx18* [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1):54-62.
- [5] Addis RC, Ifkovits JL, Pinto F, et al. Optimization of direct fibroblast reprogramming to cardiomyocytes using calcium activity as a functional measure of success [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 60(1):97-106.
- [6] Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells [J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(11):826-835.
- [7] Ye W, Song Y, Huang Z, et al. Genetic regulation of sinoatrial node development and pacemaker program in the venous pole [J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2015, 2(4):282-298.
- [8] Mommersteeg MT, Domínguez JN, Wiese C, et al. The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 87(1):92-101.
- [9] Christoffels VM, Mommersteeg MT, Trowe MO, et al. Formation of the venous pole of the heart from an *Nkx2-5*-negative precursor population requires *Tbx18* [J]. *Circ Res*, 2006, 98(12):1555-1563.
- [10] Maltsev VA, Lakatta EG. Dynamic interactions of an intracellular Ca^{2+} clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 77(2):274-284.
- [11] Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12(5):206-212.
- [12] Shi W, Wymore R, Yu H, et al. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues [J]. *Circ Res*, 1999, 85(1):e1-e6.
- [13] Liu J, Dobrzynski H, Gianni J, et al. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 73(4):729-738.
- [14] Zicha S, Fernández-Velasco M, Lonardo G, et al. Sinus node dysfunction and hyperpolarization-activated (HCN) channel

- subunit remodeling in a canine heart failure model [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 66(3):472-481.
- [15] Li N, Csepe TA, Hansen BJ, et al. Molecular mapping of sinoatrial node HCN channel expression in the human heart [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2015, 8(5):1219-1227.
- [16] Schweizer PA, Yampolsky P, Malik R, et al. Transcription profiling of HCN-channel isoforms throughout mouse cardiac development[J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(6):621-629.
- [17] 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.
- [18] Vedantham V, Galang G, Evangelista M, et al. RNA sequencing of mouse sinoatrial node reveals an upstream regulatory role for Islet-1 in cardiac pacemaker cells[J]. *Circ Res*, 2015, 116(5):797-803.
- [19] Liang X, Zhang Q, Cattaneo P, et al. Transcription factor ISL1 is essential for pacemaker development and function[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(8):3256-3268.
- [20] Dorn T, Goedel A, Lam JT, et al. Direct nkx2-5 transcriptional repression of *isl1* controls cardiomyocyte subtype identity[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(4):1113-1129.

(收稿:2018-05-04 修回:2018-09-02)

(本文编辑:胡晓静)

~~~~~  
(上接第 343 页)

- [18] Sizer AJ, Martin KA. Respecting boundaries: CTCF, chromatin structural organization, and heart failure[J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9(12):4889-4892.
- [19] Heinz S, Romanoski CE, Benner C, et al. The selection and function of cell type-specific enhancers[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(3):144-154.
- [20] Li XL, Wu ZQ, Fu X, et al. LncRNA: insights into their function and mechanics in underlying disorders[J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2014, 762:1-21.
- [21] 廉瑞, 宋春莉, 留志贤, 等. 环状 RNA 与心血管疾病研究进展[J]. *国际心血管病杂志*, 2017, 44(2):93-95.
- [22] 王霖, 刘洁. 竞争性内源核糖核酸的研究进展[J]. *生物医学工程学杂志*, 2017, 34(6):967-971.
- [23] Wang K, Long B, Liu F, et al. A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223 [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(33):2602-2611.
- [24] Wang K, Liu F, Zhou L, et al. The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489 [J]. *Circ Res*, 2014, 114(9):1377-1388.
- [25] Viereck J, Thum T. Long noncoding RNAs in pathological cardiac remodeling [J]. *Circulation Research*, 2017, 120(2):262.
- [26] Han P, Li W, Lin CH, et al. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy[J]. *Nature*, 2014, 514(7520):102-106.

(收稿:2018-03-27 修回:2018-10-08)

(本文编辑:丁媛媛)