



房颤动物模型及其在细胞和分子疗法研究中的应用进展

黄家园^{1,2}, 吴剑³, 杨丰华^{2,4}, 陈灿^{5*}

(1. 广东医学院, 广东 湛江 524023; 2. 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663; 3. 复旦大学附属中山医院, 上海 200032; 4. 广东省实验动物监测所, 广州 510663; 5. 广东医学院附属医院, 广东 湛江 524023)

【摘要】 房颤是多原因引起的心律失常, 可导致运输到各器官组织的血量不足, 引发血栓、心衰或其他相关的复杂病情。房颤的动物模型分类根据其疾病的症状或诱发因素可分为电生理性模型、神经激素和血管生理失常模型和结构变异模型等。不断涌现的新技术如 microRNA、CRISPR-Cas9 体系等为构建房颤疾病动物模型提供了新的技术手段并引导其在疗法研究上的应用新方向。目前房颤治疗方法的研究已经从传统的侵入式电生理方法和抗心律失常药物的使用转向细胞和分子疗法, 并在房颤分子机理、靶向治疗和药物筛选等方面都有重要的新进展。本文综述了几类常见的房颤动物模型的构建和特性及其在细胞和分子疗法研究中的应用进展。

【关键词】 房颤; 动物疾病模型; 细胞和分子疗法; 疾病分子机理

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 02-0205-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.02.019

Use of animal models of atrial fibrillation in the study of cellular and molecular therapy

HUANG Jia-yuan^{1,2}, WU Jian³, YANG Feng-hua^{2,4}, CHEN Can⁵

- (1. Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;
2. Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animal Sciences, Guangzhou 510663;
3. Zhongshan Hospital Fudan University, Shanghai 200032;
4. Guangdong Laboratory Animal Monitoring Institute, Guangzhou 510663;
5. Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023)

【Abstract】 Atrial fibrillation (AF) is an abnormal heart rhythm characterised by rapid and irregular beating. It is caused by multiple factors and can lead to ischemia-associated thrombosis, heart failure and other complex symptoms. Based on the etiology and characteristics of AF, animal models have 3 main categories including electrical, neurohormonal or vessel-related, and structural remodeling models. New technologies such as microRNA knock-down/overexpression or CRISPR-Cas9 gene editing provide tools for constructing animal AF models and directions in the development of AF therapeutic strategies. Currently these strategies have largely focused on the cellular and molecular therapeutics rather than traditional invasive electrophysiological methods or antiarrhythmic drugs. With the aid of new tools, progress has been greatly made in a broad range of therapeutic research areas including molecular mechanisms, drug targeting and screening. This review summarizes the animal models of atrial fibrillation currently used in studies of the molecular and cellular therapeutics and notes their contributions to this research area.

【Key words】 Atrial fibrillation; Animal disease model; Cellular and molecular therapy; Molecular mechanisms, diseases

[基金项目] 广东省实验动物重点实验室开放课题(No. 2013061402001); 国家自然科学基金青年项目(No. 81200086)。

[作者简介] 黄家园(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 心血管方向, Email: 361985790@qq.com

[通讯作者] 陈灿, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, Email: chencan-21@163.com

房颤是由心房主导折返环引起许多小折返环导致的心房节律紊乱,表现为心跳频率快而不规则。房颤的发生和先天性的基因改变或心房基质的改变(重构)密切相关。据流行病学的调查我国约有 0.65% 的人口受累于房颤,这个数字并随着社会人口的老龄化而增长^[1],2013 年的《中国心血管病报告》中指出在心内科住院患者中约有 10% 是因房颤入院^[2]。目前房颤的治疗和预防仍然是个难题,一方面药物的副作用使超过一半的患者不得不放弃使用,另一方面在房颤治疗中常用的除颤器和不断改善的射频消融技术也各有其缺点—前者容易并发功能性的损伤^[3],而后者的作用具有局限性^[4,5]。因此研究新的房颤治疗方法、开发新的动物疾病模型势在必行。由于对房颤疾病机理的深入了解及分子生物工程技术在动物建模上的广泛应用,使细胞和分子疗法的研究取得了快速的发展。本文综述了现代房颤动物模型的构建及其在细胞和分子疗法研究中的应用进展。

1 房颤动物模型

房颤的动物模型是指各种自发或人工诱导的具有房颤表型的动物模型,其广泛应用于研究房颤的病理生理如离子电流的改变、结构改变和分子信号的调控。房颤动物模型根据其疾病的症状或诱发因素可分为电生理性模型、神经激素和血管生理异常模型以及结构变异模型等。必须注意的是这些模型之间有不少表现型是重复的,这个归纳分类只是为了让阅读此文的研究者们可以更方便的追溯参考文献。

1.1 动物电生理模型

房颤的电生理模型是指根据心肌的电生理特性结合房颤产生的机理来构建的动物模型。房颤引起的主要问题之一是心房内产生的冲动没有传导到心室并使之充盈,或者传导过量直接导致心动过速,其直接诱因是心肌细胞中 4 大离子通道系统包括钠、钙、钾、和氯通道体系中某个或某些离子通道基因的突变。基于这个机理,房颤的电生理模型是通过局部给予心脏电刺激和改变心律来构建,如在犬、羊、猪等实验动物上产生的房性心动过速模型^[6-8]。其次,拉伸心房产生房颤模型也相对容易制作,这项技术可以在体外完成。我们项目组通过连接生理记录仪和离体心脏灌流系统记录到了典型的房颤信号并检测到调控心律的信号分子翻译后再修饰的异常

(本实验室的未发表数据)。另外,给与心房化学性的刺激如乌头碱等都是各个实验室较常用的方法。

对动物电生理特性的改造随着基因操纵技术的发展而日渐成熟。目前已经具备了培育各种携带突变或过表达离子通道基因并具有房颤表型的实验动物的技术,如已应用于研究的过表达内向整流钾离子通道 Kir2.1 的房颤模型^[9]。同时,近十年来发展的局部的、非性繁殖依赖型的基因改造技术也为研究者们提供了新的工具,如 siRNA 基因表达下调技术或多肽转染技术。更引人注目的是近年发展的能够快速编辑基因的 CRISPR-Cas9 技术体系,它使构建具有房颤表型的动物模型能够快速高效的完成,极大的发挥了大型实验动物在研发房颤细胞和分子疗法上的优势。

1.2 神经激素和血管生理异常的动物模型

神经激素和血管异常模型的构建是以房颤的诱因是循环系统或内分泌异常为依据。自主神经调控、肾上腺素机制的改变以及肺静脉在左心房上延伸部分的解剖结构异常都可导致房颤^[10,11]。在此类模型中神经系统相关的模型特别是迷走神经刺激引起的房颤模型最为广泛使用,其特点是制作成本低、稳定、容易制作并且不涉及复杂的疾病机理。其次利用肾上腺素型对离子通道的异常调控而致房颤的模型也较为常用。此外,局部性的电子活动和左房斜静脉相关的发现直接导致了现代房颤治疗中常用的射频消融疗法的发展。

1.3 结构重构性动物模型

结构重构模型是根据房颤发生的组织学特性而构建。心衰可继发于各种充血性心衰、二尖瓣返流、非感染性心包炎、房室阻滞、慢性容量超负荷、高血压、过负荷运动等,表现为心房压力和体积的改变以及心脏功能和机体的需求不匹配的现象。这种不匹配可引起心脏结构的重构,在早期心脏尚能代偿部分输出功能的不足,但是随着不可逆的重构进程的发展,传导的不均一性和间质纤维化也逐渐出现,并最终导致了房颤发生。在构建此类动物模型时,各种可致心脏结构异常的方法例如冠状动脉结扎、主动脉狭窄、过量运动等被广泛的应用于诱导继发性房颤。除此以外,操纵信号调控系统也可诱导重构型房颤,例如激活转化生长因子-beta1 或过表达肿瘤坏死因子-alpha^[9]。

2 房颤动物模型在细胞和分子疗法研究中的应用进展

房颤的细胞和分子疗法涵盖了干细胞治疗、基

因修饰、microRNA 治疗等领域。作为一种新兴的疗法,房颤的细胞和分子疗法在各方面都有待完善。研究者们直到 1999 年才在共聚焦显微镜技术的帮助下确认人的心肌细胞具有增生能力^[12],这极大的支持了心脏再生和心血管疾病的细胞分子疗法的研发。虽然自美国 FDA 于 1992 年第一次批准基因治疗进入临床实验阶段到现在,已经有超过 2000 例正在进行基因治疗的各级临床试验^[13],但是其中并没有一个由 FDA 批准的特定的针对房颤基因治疗的临床试验^[14]。这提示了应用房颤实验动物模型在验证各种细胞和分子疗法的效果方面仍有很大的发展空间,最新研究进展如下。

2.1 房颤的机理和靶向治疗

动物模型在确定治疗房颤的靶向中可帮助确定哪些基因对此疾病的发生起决定性的作用。首先是利用这些模型来发现房颤发生的关键机理,例如研究者们利用房颤动物模型发现了房颤与钠离子电流密切相关,当钠通道基因 SCN5A 的突变、心衰或心功能急性改变时都可以导致钠电流的改变。其次,房颤动物模型可以协助确定哪个是起决定作用的调控体系。例如在验证抗节律异常的基因治疗中,猪的短阵快速起搏引起的房颤模型使研究者们能够在短期内验证连接蛋白-43 (connexin-43) 基因的表达^[15]和突变^[16]都是决定因素,而抑制 G 蛋白的 α 亚单位^[17]可以防止房颤的发生。在了解了某个基因能够决定疾病的机理后,研究者们需要进一步的探索在房颤发生时这些基因的改变是受哪些机理调控的,这个过程也依赖于使用合适的实验动物模型来验证。例如在确定了一个可抑制 G 蛋白信号受体基因后,把此基因表达的蛋白注射于猪心脏起搏组织来验证其是否能直接控制心律^[18]。

2.2 治疗效果的评价

应用房颤动物模型来评价细胞和分子疗法使研究者们可以直观的判定结果,判定这个新疗法能否调控细微而复杂分子机理并达到修复受损的传导体系的目的。目前已有不少实验室利用不同物种制作的模型对防治房颤的疗法进行了评价,在猪的模型中发现了钾通道的抑制剂^[19]或者减少连接蛋白-43 都可以减少房颤^[15],在狗的模型中发现了应用成纤维细胞可延长房室结的传导时间^[20],在猪植入心脏起搏器引发心房快速起搏器的模型中发现了减少 caspase-3 的活性也可以抑制房颤的发生。

2.3 新的分子治疗技术

分子生物学技术的发展为房颤治疗提供了新的手段。新技术如 MicroRNA 敲除和过表达、CRISPR-Cas9 基因修饰体系的出现,使研究者在更深入的了解房颤的分子机理外还能够利用此技术来发展新的房颤疗法。其中最典型的研究结果是发现敲除 miR-106b-25 -/- 基因可以改善小鼠的房颤状况,并确定了这和心肌细胞内控制钙的受体有直接关系^[21]。由于钙离子失常是房颤的主要引发因素之一,这个研究结果提示了改变特定的 MicroRNA 基因可能是一个非常直接而有效的治疗方法。另外,利用 CRISPR-Cas9 的基因操纵原理来减少或清除房颤的诱因也是一个正在探索的方法。研究者们顺利的应用此技术在羊上敲除了一个导致房颤的基因^[22],表明了利用 CRISPR-Cas9 的基因编辑体系来确定药物靶点和发展疗法具有可行性。除此以外,在房颤治疗上,分子疗法和传统疗法结合也是一个趋势,例如,离子通道抑制剂和抗凝血剂的联合使用^[23]效果已经在动物模型上得到了验证。

3 结论和展望

房颤疾病动物模型已经被广泛用来阐明疾病发生的分子机理和识别病灶,并通过与成像、记录、导管、消融等新技术结合,使治疗房颤的细胞和分子疗法的研究从基础到临床前试验等各方面都取得了巨大的进展。同时,当前的研究对象也转向了多基因遗传病相关的房颤如冠心病和心衰卒死而不只是局限于传统的遗传性房颤,从而使探索细胞和分子治疗(包括干细胞治疗、基因编辑/修饰、microRNA 治疗)的可行性成为研究热点。房颤细胞和分子疗法的可行性的实现需要从更多的活体分析和优化疾病模型入手,理顺从复杂的遗传多样性到临床表现型之间的关系,并对其在临床上的个体间的遗传变异加以考虑。

参 考 文 献

- [1] Zhou Z, Hu D. An epidemiological study on the prevalence of atrial fibrillation in the Chinese population of mainland China [J]. J Epidemiol. 2008, 18: 209-216.
- [2] 中国心血管病报告 2013 编委会. 中国心血管病报告 2013 [G]. 北京, 国家心血管病中心; 2013.
- [3] Saad EB, Marrouche NF, Martin DO, et al. Frequency and associations of symptomatic deterioration after dual-chamber defibrillator implantation in patients with ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. Am J Cardiol. 2002, 90: 79-82.
- [4] Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, et al. Guidelines for the man-

- agement of atrial fibrillation; the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. *Eur Heart J*. 2010, 31: 2369–2429.
- [5] Nishida K, Datino T, Macle L, et al. Atrial fibrillation ablation; translating basic mechanistic insights to the patient [J]. *J Am Coll Cardiol*. 2014, 64: 823–831.
- [6] Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, et al. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats [J]. *Circulation*. 1995, 92: 1954–1968.
- [7] Fareh S, Villemain C, Nattel S. Importance of refractoriness heterogeneity in the enhanced vulnerability to atrial fibrillation induction caused by tachycardia-induced atrial electrical remodeling [J]. *Circulation*. 1998, 98: 2202–2209.
- [8] Dudley SC, Jr., Hoch NE, McCann LA, et al. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage; role of the NADPH and xanthine oxidases [J]. *Circulation*. 2005, 112: 1266–1273.
- [9] Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, et al. Mechanisms of atrial fibrillation; lessons from animal models [J]. *Prog Cardiovasc Dis*. 2005, 48: 9–28.
- [10] Arora R. Recent insights into the role of the autonomic nervous system in the creation of substrate for atrial fibrillation; implications for therapies targeting the atrial autonomic nervous system [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012, 5: 850–859.
- [11] Steiner I, Hajkova P, Kvasnicka J, et al. Myocardial sleeves of pulmonary veins and atrial fibrillation; a postmortem histopathological study of 100 subjects [J]. *Virchows Arch*. 2006, 449: 88–95.
- [12] Kajstura J, Leri A, Finato N, et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95: 8801–8805.
- [13] Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update [J]. *J Gene Med*. 2013, 15: 65–77.
- [14] Wolfram JA, Donahue JK. Gene therapy to treat cardiovascular disease [J]. *J Am Heart Assoc*. 2013, 2: e000119.
- [15] Bikou O, Thomas D, Trappe K, et al. Connexin 43 gene therapy prevents persistent atrial fibrillation in a porcine model [J]. *Cardiovasc Res*. 2011;92:218–225.
- [16] Soucek R, Thomas D, Kelemen K, et al. Genetic suppression of atrial fibrillation using a dominant-negative ether-a-go-go-related gene mutant [J]. *Heart Rhythm*. 2012, 9: 265–272.
- [17] Lugenbiel P, Thomas D, Kelemen K, et al. Genetic suppression of Galphas protein provides rate control in atrial fibrillation [J]. *Basic Res Cardiol*. 2012, 107: 265.
- [18] Sasano T, McDonald AD, Kikuchi K, et al. Molecular ablation of ventricular tachycardia after myocardial infarction [J]. *Nat Med*. 2006, 12: 1256–1258.
- [19] Amit G, Kikuchi K, Greener ID, et al. Selective molecular potassium channel blockade prevents atrial fibrillation [J]. *Circulation*. 2010, 121: 2263–2270.
- [20] Bunch TJ, Mahapatra S, Bruce GK, et al. Impact of transforming growth factor-beta1 on atrioventricular node conduction modification by injected autologous fibroblasts in the canine heart [J]. *Circulation*. 2006, 113: 2485–2494.
- [21] Chiang DY, Kongchan N, Beavers DL, et al. Loss of microRNA-106b-25 cluster promotes atrial fibrillation by enhancing ryanodine receptor type-2 expression and calcium release [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2014, 7(6): 1214–1222.
- [22] Hu S, Wang Z, Polejaeva I. 40 knockout of goat nucleoporin 155 (nup155) gene using crispr/cas9 systems [J]. *Reprod Fertil Dev*. 2013, 26(1): 134.
- [23] Cleland JG, Coletta AP, Buga L, et al. Clinical trials update from the American Heart Association Meeting 2010; EMPHASIS-HF, RAFT, TIM-HF, Tele-HF, ASCEND-HF, ROCKET-AF, and PROTECT [J]. *Eur J Heart Fail*. 2011; 13(4): 460–465.

[收稿日期] 2015-01-23