

## 生物起搏细胞调控方法的研究进展

刘江文 杨双 唐艳红 黄从新

(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,湖北 武汉 430060)

**【摘要】**自从电子起搏器进入临床以来,无数房室传导阻滞和病态窦房结综合征患者的生活质量得到了极大改善,但它仍存在感染、缺乏生理反应性和电池寿命有限等问题。生物起搏就此应运而生,生物起搏核心的问题是获得和正常窦房结细胞具有相同功能的起搏细胞,目前调控生物起搏细胞生成的方法多种多样,例如可通过单基因、多基因联合以及信号通路调控等方法来构建生物起搏细胞,现就当前生物起搏细胞的调控方法做一综述。

**【关键词】**生物起搏;基因调控;联合基因转染

**【DOI】**10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2022.03.003

## Regulation of Biological Pacemaker Cells

LIU Jiangwen, YANG Shuang, TANG Yanhong, HUANG Congxin

(Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute of Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Cardiology, Wuhan 430060, Hubei, China)

**【Abstract】** Since the electronic pacemaker entered the clinic, the quality of life of countless patients with atrioventricular block and sick sinus syndrome has been greatly improved, but it still has some problems, such as infection, lack of physiological reactivity and limited battery life. Biological pacemaker aims to solve these problems, and its core issue is to acquire pacemaker cells with the same function as normal sinoatrial node cells. There are many ways to regulate biological pacemaker cells, such as single-gene, multigene combination and signal pathway regulation and so on. This paper reviews the current regulation methods of biological pacemaker cells.

**【Key words】** Biological pacemaker; Gene regulation; Combined gene transfection

完全性房室传导阻滞和病态窦房结综合征等缓慢性心律失常是临床上常见的心律失常疾病,电子起搏器仍然是这类疾病的主要治疗方式。虽然电子起搏器功能越来越强大,体积越来越小,但它仍存在很多缺点,例如术后感染、电池寿命有限、导线容易脱落以及缺乏生理反应性<sup>[1]</sup>。这些不足之处都限制电子起搏器成为治疗这些疾病的最理想的方法,科学家们开始寻找符合正常人体生理的生物起搏器,生物起搏能克服当前电子起搏器存在的缺点,更加符合人体正常的生理状态。生物起搏指通过干细胞基因调控、基因过表达或抑制等方法来构建出类似“窦房结”的结构,以此来治疗缓慢性心律失常。当前构建生物起搏细胞的方法主要是单基因、多基因联合以及信号通路调控等,选择一项适合的调控方法对于成功构建生物起搏器至关重要。

### 1 窦房结发育过程涉及的基因

窦房结自干细胞分化开始到具有正常功能的起

搏细胞涉及一系列基因表达和沉默。目前普遍接受涉及窦房结调控表达的基因有 *Shox2*、*Tbx3*、*Tbx18*、*Pitx2*、*Nkx2.5*、*Isl-1* 和 *HCN* 通道等,不同的基因在窦房结发育的不同阶段发挥着不同的作用。当前生物起搏中广泛研究的基因有 *Tbx*、*HCN* 和 *Shox2*,而其他生物起搏相关基因(*Pitx2*、*Nkx2.5* 和 *Isl-1*)的研究仍然匮乏。*Tbx* 家族有一系列同源因子,如 *Tbx1*、*Tbx3*、*Tbx5* 和 *Tbx18* 等,不同的因子在心脏发育过程中发挥不同的作用,目前在生物起搏中研究较多的是 *Tbx3* 和 *Tbx18*。*Tbx3* 基因位于染色体 12q24.1 上,同源基因位于 5 号染色体,全长为 9.0 kb,在进化上具有高度保守性,在胚胎形成时期多个组织及器官均有表达<sup>[2]</sup>。*Tbx18* 是与心外膜器官发育相关的 *Tbx1* 亚家族成员,在心外膜、中胚层和体节前半部分等结构均有表达<sup>[3]</sup>。*Tbx18* 参与窦房结头部的发育,但并不影响窦房结尾部的功能,而 *Tbx3* 不影响窦房结的形态发育,

基金项目:湖北省技术创新专项(重大项目)(2016ACA153)

通信作者:黄从新, E-mail: huangcongxin@vip.163.com

但对窦房结的功能具有重要的影响<sup>[4]</sup>。胰岛素样生长因子-1 是第二心脏区未分化的心脏祖细胞的分子标志,对促进心脏发育和分化起着非常重要的作用<sup>[5]</sup>。有研究<sup>[6]</sup>发现 *Isl-1* 基因敲除的鼠胚在第 9.5 天停止心脏发育或出现心脏严重畸形。*Shox2* 对于窦房结的发育和正常结构的形成必不可少,研究<sup>[7]</sup>表明在 *Shox2* 基因缺乏或突变的大鼠胚胎中会导致严重窦房结和窦瓣发育不良及起搏细胞的分化失败。*Shox2* 过表达能促进 *Isl-1* 的表达,进而促进与窦房结相关基因如 *Tbx3* 和 *HCN4* 等的表达,从而促进干细胞向窦房结细胞的分化<sup>[8]</sup>。此外 Hashem 等<sup>[9]</sup>研究表明,*Shox2* 基因敲除会导致胚胎产生缓慢的收缩频率。窦房结细胞区别于心房和心室肌细胞的一个重要特征是 4 期自动去极化,其中  $I_f$  电流(也称“有趣电流”,起搏特征电流)是导致 4 期自动去极化的关键, $I_f$  电流主要由 *HCN4* 基因决定。*HCN* 家族有 4 个成员,分别是 *HCN1*、*HCN2*、*HCN3* 和 *HCN4*。在哺乳动物心脏中主要存在的是 *HCN1*、*HCN2* 和 *HCN4*,未检测到 *HCN3* 的表达<sup>[10]</sup>。有研究<sup>[11]</sup>表明 *HCN4* 通道贡献了窦房结约 70% 的  $I_f$  电流,是最主要的组成部分。此外,与 *HCN1* 相比,*HCN2* 和 *HCN4* 都对环磷酸腺苷具有较强的反应性,但 *HCN2* 对环磷酸腺苷的反应更加敏感<sup>[12]</sup>。

目前生物起搏主要通过起搏细胞的移植来实现。而生物起搏细胞可利用慢病毒或腺病毒载体构建过表达上述如 *Tbx3*、*Shox2* 和 *HCN4* 等窦房结调控基因的载体转染干细胞,从而调控干细胞在分化为心肌细胞的过程中分化为起搏细胞<sup>[13]</sup>。起搏细胞的鉴定则通过观察心肌细胞搏动频率,检测  $I_f$  电流及窦房结发育相关标志基因的表达获得<sup>[14]</sup>。获得的起搏细胞主要通过左心室游离壁注射以进行体内验证,体外光学标测显示注射位点的自发搏动则证明移植的细胞存活并发挥了作用<sup>[15]</sup>。而在此之前,起搏细胞的获得及调控方法则显得更为重要。

## 2 单基因表达构建生物起搏细胞

通过单基因表达来构建生物起搏细胞是长久以来使用最为广泛的方法。目前广泛研究的单基因主要有 *Shox2*、*Tbx18* 和 *Tbx3*。干细胞在分化过程中能产生心房肌细胞、心室肌细胞和窦房结细胞。有研究<sup>[16]</sup>表明,在胚胎干细胞分化的拟胚体中,用腺病毒构建人 *Shox2* 基因表达载体转染能提高干细胞向窦房结细胞的转化效率,检测结果显示 *Shox2* 组起搏细胞比例(61.9%)显著高于对照组(26.1%)。同时,起搏细胞标志物如 *HCN4*、缝隙连接蛋白(connexin, Cx)45 以及细胞自发收缩频率在 *Shox2* 组也明显高于对照组,且 *Shox2* 组对异丙肾上腺素和乙酰胆碱具有更好的反应

性。同样,Kapoor 等<sup>[17]</sup>通过腺病毒构建过表达 *Tbx18* 的载体并转染新生大鼠心室肌细胞(neonatal rat ventricular myocyte, NRVM),成功诱导出具有起搏功能的细胞,将诱导分化而来的起搏细胞与正常细胞进行比较,可发现在细胞形态、电生理特性、表观遗传学以及对激素的反应等方面均具有高度相似性。研究者将转染 *Tbx18* 的 NRVM 组(*Tbx18*-NRVMs)与转染绿色荧光蛋白的 NRVM 组(GFP-NRVMs)比较,发现与心房、心室肌细胞相关标志的 mRNA 和蛋白表达水平如 *Cx43*、*Kir2.1* 和 *Actc2* 在 *Tbx18* 实验组中明显下降,同时 *Tbx18*-NRVMs 组细胞跳动频率 $[(95 \pm 23) \text{ 次/min}]$ 明显高于 GFP-NRVMs 组 $[(46 \pm 10) \text{ 次/min}]$ 。而在此之前,Bakker 等<sup>[18]</sup>研究表明 *Tbx3* 能让终末分化的心室肌细胞重编程为起搏细胞,这项研究通过转基因构建携带“Cre 可诱导的 *Tbx3* 表达构建体(CT3)”,然后通过他莫昔芬诱导携带 CT3 的小鼠产生 *Tbx3*,通过检测 *Cx40*、*Cx43*、 $\text{Na}_v1.5$  和 *Kir* 基因的表达情况,在 *Tbx3* 诱导组中检测到起搏细胞的生成。以上实验结果均表明单基因过表达构建生物起搏细胞的可行性。

## 3 联合基因转染构建生物起搏细胞

过去几十年,绝大部分的研究都集中在与窦房结发育相关的单基因研究,但近年来通过联合基因转染来构建生物起搏细胞的方法逐渐兴起。联合基因转染指同时将两个或多个与窦房结发育相关的基因同时转入干细胞中,使干细胞能分化为起搏细胞。其中涉及窦房结发育的相关基因多种多样,因而也就产生了不同的联合基因转染方式。

### 3.1 *Isl-1* 和 *Tbx18* 联合转染

虽然有研究<sup>[19-20]</sup>表明将过表达的 *Isl-1* 或 *Tbx18* 基因单独导入干细胞均能诱导其分化为起搏细胞,但存在起搏细胞转化效率低下,起搏细胞与正常窦房结细胞功能存在差距等问题。为了寻找能提高干细胞转化为窦房结细胞的转化效率的方法,Zhang 等<sup>[21]</sup>将过表达的 *Isl-1* 和 *Tbx18* 慢病毒与  $8 \mu\text{g/mL}$  聚凝胺混合转染脂肪源性干细胞,7 d 后收集转染细胞并进行生物起搏功能及标记基因的检测。实验结果发现,无论是与  $I_f$  电流相关的 *HCN* 基因表达情况,还是在细胞的自律性方面,*Isl-1* 和 *Tbx18* 基因联合组均较任何单一基因转染组高,这表明二者联合转染干细胞比单一基因转染干细胞能得到更高的转化率。

### 3.2 *Tbx3* 和 *HCN2* 联合转染

*Tbx3* 在小鼠的胚胎发育中扮演着重要的作用。Boogerd 等<sup>[22]</sup>发现斑马鱼在转染 *Tbx3* 时,能显著抑制传导性较强的 *Cx40* 和 *Cx43* 的表达,这与 Zhao 等<sup>[23]</sup>

的研究结果一致。在人诱导多能干细胞过表达 Tbx3 能使 Cx40、Cx43 和 SCN5A (心房细胞和心室细胞相关基因标志) 表达减少, 而 Cx45 和 Cx30.2 (窦房结细胞相关基因标志) 表达增加, 但通过全细胞膜片钳技术并未检测到  $I_f$  电流的表达。另一项研究利用腺病毒构建过表达的 Tbx3 和 HCN2 基因载体, 并在人诱导多能干细胞向心肌细胞分化的过程中加入该病毒载体共培养, 5 d 后收集细胞进行电生理检测。膜片钳技术可检测到  $I_f$  电流的表达, 同时与 Tbx3 和 HCN2 基因单独转染相比, Tbx3 和 HCN2 联合转染的细胞表现出了更快的收缩频率, 这表明干细胞成功转化为起搏细胞<sup>[24]</sup>, 这也提示 Tbx3 和 HCN2 基因联合转染诱导的起搏细胞具有更加完善的生物学功能。

### 3.3 Shox2、HCN2 和 Tbx5 联合转染

Raghunathan 等<sup>[25]</sup>将慢病毒构建的 Shox2、HCN2 和 Tbx5 三个基因表达载体分别转入心脏祖细胞将其诱导分化为起搏细胞, 最终在诱导的细胞中未检测到起搏器特异性靶基因 (Cx30.2、KCNN4 和 Tbx3) 的表达升高, 但利用四环素控制的转录激活共同诱导三者来调节它们在心肌祖细胞中的瞬时表达时, 以上指标相对于单基因转染的细胞表达水平明显升高。此外, 联合转染诱导的起搏细胞表现出强烈的 HCN4 电流, 而这是起搏细胞的特征电流。转录组学也表现出联合转染的细胞表达丰富的起搏特异性基因及特异性钾和钙通道 (KCND2、KCNC2 和 CACNB1), 结果表明联合基因转染诱导的起搏细胞具有更加完善的生物学功能。

### 4 信号通路调控构建生物起搏细胞

目前发现与窦房结发育有关的信号通路主要有 Wnt 信号通路和骨形态生成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 信号通路<sup>[26-27]</sup>, 通过药物干预这两条信号通路能调控干细胞向窦房结样细胞分化。Wnt 信号通路包括经典 Wnt 信号通路和非经典的 Wnt 信号通路<sup>[28]</sup>, 在窦房结的发育过程中经典 Wnt 信号通路发挥正向的调控作用。BMP 属于转化生长因子  $\beta$  超家族并拥有 20 个以上的亚族成员。大量研究<sup>[29]</sup>表明 BMP 在胚胎早期发育中具有关键作用, 例如 BMP2 基因敲除的大鼠会在心管形成后死亡, BMP5 和 BMP7 同时敲除的大鼠胚胎会在第 10.5 天死亡<sup>[30]</sup>。最近的一项研究<sup>[31]</sup>表明经典的 Wnt 信号通路 (Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路) 使得心脏中胚层祖细胞向起搏细胞分化而抑制其向心房和心室肌细胞分化。在 Flk1<sup>+</sup>/Pdgfr- $\alpha$ <sup>+</sup> 细胞分化的第 3 周, 移除 Wnt 信号通路的天然抑制剂 Dkk1 能明显增加 Shox2、Tbx18 和 HCN4 的表达以及 Tbx3 和 HCN4 阳性细胞的比例。同时加入 Wnt 信号

通路激动剂 Wnt3a 可进一步增加 Shox2、Tbx18 和 HCN4 的表达水平, 而 Nkx2.5 的表达水平明显下降, 这与 Wnt 信号通路能抑制 Nkx2.5 的祖细胞分化为起搏细胞的研究一致<sup>[32]</sup>。此外, 调控 Wnt 信号通路能提高人胚胎干细胞分化为起搏细胞的效率<sup>[33]</sup>, BMP 信号通路也被发现有类似的效应。Protze 等<sup>[34]</sup>将 BMP 信号通路诱导剂 BMP4 加入人诱导多能干细胞中诱导分化, 结果发现 BMP4 诱导产生的起搏细胞能表达 Tbx3, 而未检测到心室肌标志物 MLC2V 和 Nkx2.5 的表达。之后将获得的起搏细胞转入大鼠心脏中发现能产生异位节律, 这表明通过 BMP 信号通路诱导剂成功诱导出起搏细胞。有趣的是, 只有在胚胎分化的第 3 天加入 BMP4 才能最大效率地诱导起搏细胞产生, 在分化第 2 天或第 4 天加入都会导致起搏细胞产生效率变低, 这表明 BMP 信号通路只在特定的时间发挥关键作用。BMP 在低浓度能促进人诱导多能干细胞分化为窦房结样细胞, 但高浓度时诱导转化效率变低<sup>[35]</sup>。因而在通过调节信号通路获得起搏细胞时, 要特别注意信号通路调节药物使用的时间和剂量, 只有这样才能最大效率地获得起搏细胞。

### 5 总结与展望

目前为止, 大部分研究都集中在单基因诱导起搏细胞的相关研究, 但近年来多基因联合诱导干细胞分化也逐渐受到人们的重视, 目前对这方面的研究还很缺乏。窦房结的发育涉及一系列基因的作用, 多个基因同时诱导生成的起搏细胞会更加符合窦房结的正常发育过程。但由于病毒载体只能携带一定长度的基因, 联合转染对病毒载体提出了更高的要求。目前通过信号通路来构建生物起搏细胞能克服病毒载体, 会损害正常细胞, 以及部分基因转染时会导致转染细胞死亡等问题<sup>[36]</sup>。虽然可通过多种方法调控干细胞分化为起搏细胞, 如本文所述的有单基因表达、联合基因转染和信号通路的调控, 但目前获得的起搏细胞和正常的窦房结细胞特性之间存在一定的差距。同时干细胞存在多向分化潜能, 定向分化为起搏细胞的效率仍然较为低下。未来仍需努力克服这些问题来高效率获取正常生理功能的起搏细胞, 为生物起搏细胞的在体研究打下坚实基础, 并最终克服电子起搏器的缺陷而进入临床。

### 参考文献

- [1] Mulpuru SK, Madhavan M, McLeod CJ, et al. Cardiac pacemakers: function, troubleshooting, and management: part 1 of a 2-part series [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 69(2):189-210.
- [2] Saito Y, Nakamura K, Yoshida M, et al. Enhancement of spontaneous activity by HCN4 overexpression in mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes—A

- possible biological pacemaker[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e138193.
- [3] Kraus F, Haenig B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene *Tbx18*[J]. *Mech Dev*, 2001, 100(1): 83-86.
  - [4] Wiese C, Grieskamp T, Aitrik 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.
  - [5] Engleka KA, Manderfield LJ, Brust RD, et al. *Islet1* derivatives in the heart are of both neural crest and second heart field origin[J]. *Circ Res*, 2012, 110(7): 922-926.
  - [6] Pandur P, Sirbu IO, Kühl SJ, et al. *Islet1*-expressing cardiac progenitor cells: a comparison across species[J]. *Dev Genes Evol*, 2013, 223(1-2): 117-129.
  - [7] Espinoza-Lewis RA, Yu L, He F, et al. *Shox2* is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing *Nkx2-5*[J]. *Dev Biol*, 2009, 327(2): 376-385.
  - [8] Barbuti A, Robinson RB. Stem cell-derived nodal-like cardiomyocytes as a novel pharmacologic tool: insights from sinoatrial node development and function[J]. *Pharmacol Rev*, 2015, 67(2): 368-388.
  - [9] Hashem SI, Lam ML, Mihardja SS, et al. *Shox2* regulates the pacemaker gene program in embryoid bodies[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(21): 2915-2926.
  - [10] 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.
  - [11] Verkerk AO, Wilders R. Hyperpolarization-activated current, *I<sub>f</sub>*, in mathematical models of rabbit sinoatrial node pacemaker cells[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 872454.
  - [12] Kaupp UB, Seifert R. Molecular diversity of pacemaker ion channels[J]. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63: 235-257.
  - [13] Gorabi AM, Hajighasemi S, Tafti HA, et al. *TBX18* transcription factor overexpression in human-induced pluripotent stem cells increases their differentiation into pacemaker-like cells[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1534-1546.
  - [14] 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.
  - [15] Cingolani E, Goldhaber JL, Marbún E. Next-generation pacemakers: from small devices to biological pacemakers[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(3): 139-150.
  - [16] Ionta V, Liang W, Kim EH, et al. *SHOX2* overexpression favors differentiation of embryonic stem cells into cardiac pacemaker cells, improving biological pacing ability[J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 4(1): 129-142.
  - [17] Kapoor N, Liang W, Marbún E, et al. Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of *Tbx18*[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 54-62.
  - [18] Bakker ML, Boink GJJ, Boukens BJ, et al. T-box transcription factor *TBX3* reprogrammes mature cardiac myocytes into pacemaker-like cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 94(3): 439-449.
  - [19] Zhang J, Yang M, Yang AK, et al. Insulin gene enhancer binding protein 1 induces adipose tissue-derived stem cells to differentiate into pacemaker-like cells[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 879-889.
  - [20] Yang M, Zhang GG, Wang T, et al. *TBX18* gene induces adipose-derived stem cells to differentiate into pacemaker-like cells in the myocardial microenvironment[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(5): 1403-1410.
  - [21] Zhang J, Huang C. A new combination of transcription factors increases the harvesting efficiency of pacemaker-like cells[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(5): 3584-3592.
  - [22] Boogerd CJ, Wong LY, van den Boogaard M, et al. *Sox4* mediates *Tbx3* transcriptional regulation of the gap junction protein *Cx43*[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(23): 3949-3961.
  - [23] Zhao H, Wang F, Zhang W, et al. Overexpression of *TBX3* in human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) increases their differentiation into cardiac pacemaker-like cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110612.
  - [24] Zhao H, Wang F, Tang Y, et al. *HCN2* and *TBX3* reprogram human-induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes into pacemaker-like cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2020, 39(2): 289-298.
  - [25] Raghunathan S, Islas JF, Mistretta B, et al. Conversion of human cardiac progenitor cells into cardiac pacemaker-like cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 138: 12-22.
  - [26] Klaus A, Müller M, Schulz H, et al. *Wnt/β-catenin* and *Bmp* signals control distinct sets of transcription factors in cardiac progenitor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(27): 10921-10926.
  - [27] Klaus A, Saga Y, Taketo MM, et al. Distinct roles of *Wnt/β-catenin* and *Bmp* signaling during early cardiogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(47): 18531-18536.
  - [28] Cohen ED, Tian Y, Morrissey EE. *Wnt* signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal[J]. *Development*, 2008, 135(5): 789-798.
  - [29] Zhang H, Bradley A. Mice deficient for *BMP2* are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development[J]. *Development*, 1996, 122(10): 2977-2986.
  - [30] Solloway MJ, Robertson EJ. Early embryonic lethality in *Bmp5*; *Bmp7* double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup[J]. *Development*, 1999, 126(8): 1753-1768.
  - [31] Liang W, Han P, Kim EH, et al. Canonical *Wnt* signaling promotes pacemaker cell specification of cardiac mesodermal cells derived from mouse and human embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2020, 38(3): 352-368.
  - [32] Ren J, Han P, Ma X, et al. Canonical *Wnt5b* signaling directs outlying *Nkx2.5<sup>+</sup>* mesoderm into pacemaker cardiomyocytes[J]. *Dev Cell*, 2019, 50(6): 729-743.
  - [33] Lian X, Hsiao C, Wilson G, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical *Wnt* signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(27): E1848-E1857.
  - [34] Protze SI, Liu J, Nussinovitch U, et al. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(1): 56-68.
  - [35] Lee JH, Protze SI, Laksman Z, et al. Human pluripotent stem cell-derived atrial and ventricular cardiomyocytes develop from distinct mesoderm populations[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(2): 179-194.
  - [36] 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.

收稿日期: 2021-11-08