

山西省医学重点科研 项目计划任务书

项目类别 重大科技攻关专项 ☐ 重点攻关专项 ☐

引导性科技专项 ☒

项目编号 2021XM45

项目名称 通过调控心脏 Sema3a 和 NGF 的平衡表达

改善交感神经重塑抑制心梗后心律失常

起止年月 2022 年 1 月至 2023 年 12 月

项目负责人 王海雄

通讯地址 太原市万柏林区漪汾街 18 号

联系电话 邮政编码 030024

项目联系人 王海雄 (盖章)

联系电话 电子邮箱 www.cz1976whx@126.com

填表日期： 2021 年 11 月 24 日

山西省卫生健康委员会

二〇二一年制

项目负责人承诺：

一、我保证不存在、不出现以下违反科研诚信行为：

1. 自己不搞科研，但把名字列为第一负责人、论文第一作者、专利第一完成人、奖项第一主持人等挂名问题；

2. 通过挂名或侵占他人科研项目和成果，并由此在职务升迁、职称晋升、人才头衔、奖金奖励、绩效分配等方面获利问题；

3. 作为项目负责人同期主持多个项目，以相同或非常相近科研内容同时申报多项省级项目，违规列支或占用他人科研经费的问题；

4. 违规插手或干预科研项目、成果奖励、人才计划、职称评定等各种评审活动问题；

5. 涉及干细胞、体细胞等需要提前在国家备案的临床研究项目，在机构、项目通过国家正式备案之前，私自开展临床研究等问题；

6. 其他严重违背科研诚信、科研道德、学术规范、学术作风的问题。

二、我保证任务书内容的真实性，承诺履行项目负责人职责，严格遵守中共中央办公厅、国务院办公厅《关于进一步弘扬科学家精神加强作风和学风建设的意见》及山西省科技厅等7部门《关于进一步弘扬科学家精神加强作风和学风建设的实施意见》等文件规定，严格遵守《山西省卫生健康委科研项目管理办法》（试行）规定，加强科研诚信建设，切实保证研究工作时间，认真开展工作，按时报送有关材料。若填报失实和违反规定，本人将承担全部责任。

签字：

年 月 日

填表说明

一、本项目计划任务书系山西省卫生健康委员会为所组织的医学重点科研项目研究而设计。

二、本项目任务书编写请使用 A4 普通纸张打印填报，各栏空格不够时，请自行加页。左侧装订成册（不要采用胶圈、文件夹等带有突出棱边的装订方式）。

三、本项目计划任务书各项内容要实事求是，逐条认真填写，外来语同时用原文和中文表达。

四、研究起始年月日统一规定为申请年度 1 月 1 日，项目实施周期为 2 年。

五、所属学科要求尽可能填写到三级学科，在没有三级学科情况下填写二级学科。

六、单位名称填写必须与所盖公章一致，否则无效。

七、本项目计划任务书一式三份，经山西省卫生健康委员会正式审定签章之日起，即作为正式文本合同生效。

一、简表

项目 负责 人	姓名	王海雄	性别	男	出生年月	1976 年 7 月		
	学历	研究生	学位	博士	职称	主任医师	职务	科主任
	工作单位	山西省心血管病医院			部门	心内科		
	从事专业 心内科							
研 究 课 题	名称：通过调控心脏 Sema3a 和 NGF 的平衡表达改善交感神经重塑抑制心梗后心律失常							
	类别： ☐ 基础研究 ☒ 应用研究 ☐ 开发研究 ☐ 其它（ ）							
	所属学科	心内科						
	相关学科 1							
	相关学科 2							
	相关学科 3							
	资助金额（万元）	10 万						
	研究内容和预期成果摘要（限 400 字） 心律失常性猝死不仅在急性心梗患者发生率高，也发生于陈旧性心肌梗死患者，后者的关键触发因素是心交感神经芽生。交感神经芽生由神经生长因子（NGF）和神经生长排斥因子 Sema3a 配合调控。已知单独干涉 NGF 或 Sema3a 反而引起或加重心律失常。本项目提出：通过调控心肌梗死后心肌细胞 NGF 和 Sema3a 的动态平衡表达可抑制心梗后交感神经芽生及 SAD。利用 CRISPR/Cas9 和基因条件性敲入技术，建立三种小鼠品系，实现：（1）心梗灶纤维化期由心肌野生 TGF-beta1 基因表达驱动敲入的 Sema3a 基因表达；（2）由心肌野生 NGF 基因表达驱动敲入的 Sema3a 基因表达。以这些不同措施对抗心梗后 NGF 高表达引起的交感神经芽生，最终找到抑制心梗后交感神经芽生诱发 SAD 的最佳方案，并为将来设计防治 SAD 的相关新药提供理论基础。							

二、立题依据

包括国内外研究现状、水平和发展趋势（含知识产权和技术标准状况）、经济建设和社会发展需求，当前需解决的主要问题、学术价值等。

在我国每年约有 54.4 万人发生心源性猝死（sudden cardiac death, SCD），SCD 绝大多数直接原因是室性心动过速（ventricular tachycardia, VT）和室颤（ventricular fibrillation, VF）。心肌梗死（myocardial infarction, MI）是 SCD 的最常见病因，约 75% 的 SCD 病例有心肌梗死病史，心肌梗死后发生的 SCD 既可在急性期，也可在慢性期。心肌梗死急性期，室颤的发生率大约为 15%，心肌梗死慢性期发生室速的中位时间为 3 年，心室收缩功能下降的室速患者死亡风险明显增加[1-3]。植入型心律转复除颤器（implantable cardioverter defibrillator, ICD）是高危 SCD 患者的最有效、最主要的治疗措施之一。在我国，由于医疗条件和费用所限，高危 SCD 患者接受 ICD 治疗的比率较低，VT/VF 一旦发生，常由于得不到及时心脏复律而突然死亡。

心肌梗死后发生致命性心律失常的机制复杂，但自主神经支配和活动的失衡，特别是交感神经的活动加强、再生和重构，已被广泛认为是心肌梗死患者心律失常的触发因素（trigger）[4]。有研究表明，接受心脏移植的心梗患者中原有的心脏发生了严重的交感神经重塑，交感神经轴突围绕心梗瘢痕灶周围形成“鸟巢”样发芽再生（简称“芽生”）（sprouting）（图 1），并且此种改变与致命性心律失常的发生高度正相关[5, 6]。用神经生长因子（nerve growth factor, NGF）注射于心梗犬左侧星状神经节导致心脏交感神经芽生增多，犬心梗修复期及修复后期的 VT、VF 和 SCD 明显增加[7, 8]。其它研究也表明，交感神经重塑及异常活动加强确实是心梗乃至其他心脏病患者发生室性心律失常的触发因素[9, 10]。因此，防治心梗患者发生 SCD，除了治疗原发病和改善心肌重构外，重点是降低心交感神经的病理性重塑和异常活动，调节交感-迷走神经的张力平衡，包括抑制交感神经活动或/和提高迷走神经的活动，即心血管疾病神经调制治疗（neuromodulation therapy）[11-13]。心梗后心肌中分布的交感神经会发生严重的芽生和重塑，造成心脏的自主神经分布严重不均一，有些心肌部位自主神经分布密度过高，有些心肌部位则出现交感神经分布缺如（去神经）。心肌局部交感神经分布密度过高会导致其递质释放过多而触发心律失常；去交感神经会使局部心肌对儿茶酚胺的敏感性增加，也会触发心律失常。如何使心梗后的心脏中交感神经支配密度不至于发生严重失衡，特别是抑制心梗瘢痕区周围交感神经芽生，是预防心梗后 SCD 的一个重要思路。

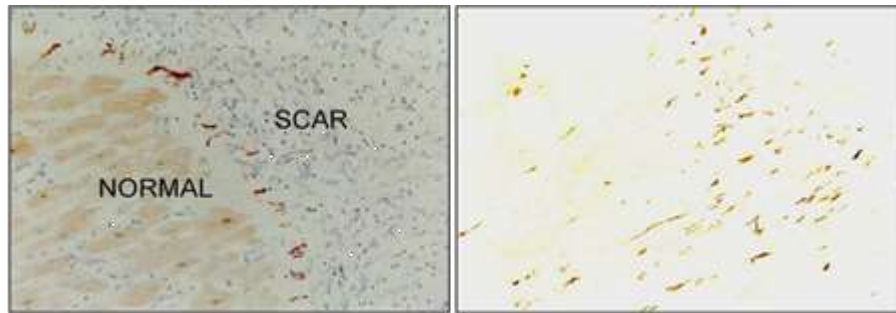


图 1 陈旧性心梗患者心室肌中交感神经芽生和重塑

左图：围绕心肌梗死瘢痕形成的“鸟巢”样交感神经芽生模式（引自 Chen PS, et al. *Cardiovasc Res*, 2001, 50(2):409-416）。右图(申请人未发表资料)：心梗患者心室肌某区域不均一的交感神经高密度分布。

近年来，有关控制交感神经发育和生长的机制研究有了较大进展。此处讨论的神经生长主要是针对心梗后交感神经轴突末梢的芽生。目前已发现有两类因子，一种是促进和诱导交感神经发育和定向生长的因子，称为神经的化学趋化物（**neural chemoattractants**），主要是 NGF。NGF 主要促进交感神经和感觉神经的生长，而对副交感神经无明显作用。有人发现内皮素-1（**endothelin-1**）也有促进 NGF 表达的作用，但其也是通过 NGF 对交感神经生长实现刺激作用[14]。另一种是排斥和阻止交感神经定向生长的因子，称为神经的化学排斥物（**neural chemorepellents**），主要是 **Semaphorin 3a (Sema3a)** (脑信号蛋白 3a) [15, 16]。另外一些因子也被发现有神经化学排斥物的作用，如硫酸软骨素蛋白多糖[17]，但 **Sema3a** 是最主要的交感神经化学排斥物。作用于交感神经的化学趋化物和化学排斥物就像“阴阳”两面，构成一对调节交感神经在心脏分布的关键因子（图 2）。**Sema3a** 是一种分泌蛋白质，在心脏中主要由心肌细胞合成和分泌[15,16]。**Sema3a** 在胚胎心脏中表达较高，并呈现心内膜侧-心外膜侧表达梯度（心内膜侧心肌表达较高，外膜侧几乎不表达），由此也形成交感神经支配的空间密度梯度（心外膜侧心肌中交感神经支配密度高于心内膜侧）；在出生后 **Sema3a** 的表达逐渐降低。



图 2. 交感神经生长趋化物 NGF 和排斥物 Sema3a 对心脏交感神经的调节作用及其与心源性猝死的关系。左: Sema3 表达过高或过低会导致心肌中交感神经支配过少或过多及支配模式失衡, 导致心律失常。中: 心梗后 (特别是梗死灶边缘带存活的) 心肌细胞表达大量的 NGF, 导致局部交感神经支配密度增高, 诱发心律失常。右: 糖尿病时, 心肌细胞表达 NGF 减少, 导致心肌中交感神经 (和感觉神经) 区域性支配密度降低, 引发儿茶酚胺敏感性增高所致的心律失常和无痛性心肌缺血 (图片引至 Fukuda K, et al. Circ Res, 2015, 116(12): 2005–2019)。

既然心脏交感神经过度增生或去交感神经都会导致心律失常, 那么是否可通过改变 Sema3a 或/和 NGF 的表达而抑制交感神经支配异常所致的心律失常呢? 目前的研究结果不尽如人意。Leda 等于 2007 年在 Nature Medicine 期刊报道[18], 大多数 Sema3a 敲除小鼠在出生后一周内因交感神经节形成紊乱而死于心动过缓等心律失常, 只有 20%可存活到断奶期; Sema3a 转基因小鼠可导致心脏交感神经支配密度降低以及由外膜到内膜神经密度梯度减弱, 并由于去神经使心肌对儿茶酚胺的敏感性增高和细胞动作电位时程延长而发生室性早搏 (PVC); 程序性电刺激诱导的室性心动过速 (VT); 部分 (约 25%) Sema3a 转基因小鼠在十月龄时发生猝死。由此可以推论, 试图通过单纯影响 Sema3a 的表达水平而达到影响心脏交感神经支配进而期望抑制心律失常的尝试是很困难的。但也有报道将 Sema3a 转染于大鼠的左侧星状交感神经节内可降低心梗后室性心律失常的发生[19]。因此, Sema3a 的表达水平对于交感神经的生长和重塑乃至心梗后心律失常的作用仍有待仔细研究验证。特别需要指出的是, Sema3a 表达的时空模式, 以及和 Sema3a 作用相反的交感神经轴突生长趋化物 NGF 的相对表达情况, 对于心脏正常的交感神经支配时空模式的形成, 是非常重要的。NGF 是交感神经轴突导向生长的最重要的化学趋化因子, 心肌 NGF 的表达水平

基本与交感神经的支配密度相一致。在心脏中, NGF 主要由心肌细胞合成和分泌[20, 21]。有研究发现在心肌中高表达 NGF 有保护缺血心肌、促进受损心肌修复的作用[22, 23], 但另有研究表明, 单用促进 NGF 表达的方法防治心脏去交感神经也不是一个好办法。心脏选择性 NGF 转基因小鼠表现为心脏交感神经支配密度增高、心肌肥大、异位神经嵴衍生细胞增生[24]; 心肌细胞 Ito 和 IK_{Kur} 通道电流减小、动作电位时程延长、心肌细胞对异丙肾上腺素的反应性减弱(意味着 β -肾上腺素受体表达降低)[25]; 既往我校生理教研室的工作也证明大鼠心脏中高表达 NGF 会导致心肌中交感神经支配密度增高、Ito 和 IK_1 电流密度降低、心梗康复期对室颤的易感性增高[26-28]。另一方面, 过度降低 NGF 表达可能会造成心脏感觉神经减少, 有发生无痛性心梗及心律失常的潜在风险, 因而也不应考虑单纯通过降低心肌中 NGF 的水平而达到抑制心交感神经过度芽生的目的。因此, 就防治心梗后 SCD 的方略来说, 调控心肌细胞中 NGF 和 Sema3a 的动态平衡表达才是最重要的, 关键是如何实现这种状态, 使心梗修复期及修复后心脏交感神经的分布密度达到合理水平, 从而减少因交感神经异常再生和活动造成的迟发性心律失常性猝死。本项目的主要思路是利用基因工程技术调控心肌细胞中 NGF 和 Sema3a 的动态平衡表达, 具体思路如下。

1: 利用基因敲入等技术, 构建由心肌细胞分泌的促纤维化因子 TGF- β 1 基因表达驱动 Sema3a 表达的小鼠品系(品系 1), 以实现心梗修复期由内源性 TGF- β 1 基因表达调控敲入的 Sema3a 表达、用 Sema3a 过表达对抗 NGF 高表达的后果。炎症是心梗后的一个重要病理过程。心梗后在梗死区及其边缘带迅速发生炎性反应, 包括炎性细胞浸润及各种炎性因子的释放等反应。在心梗急性期, 以促炎因子释放和炎性细胞浸润为特点。代表性促炎因子有 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18 和补体等, 其主要功能是促进坏死细胞残骸的吸收; 也可能作用于边缘带, 使梗死面积扩大。当心梗度过急性期进入修复期(约心梗发生后第 4 天开始, 持续约 3 周)后, 心肌的病理反应转变为以抗炎因子释放和纤维化为主, 以促进梗死灶的纤维化修复; 在此期间以释放具有抗炎活性的 IL-10、IL-6(IL-6 有促炎和抗炎双重活性)和促纤维化的 TGF- β 1 为主 [29, 30]。由于心梗后交感神经芽生开始于心梗灶纤维化开始时, 思路 1 主要是想了解, 在心梗灶纤维化修复期通过 Sema3a 过表达是否可有效抑制交感神经芽生。

思路 2: 利用基因敲入技术, 设计由心肌细胞野生 NGF 基因表达驱动的 Sema3a 表达, 以实现 NGF 和 Sema3a 的时空平衡表达, 从而避免 NGF 和 Sema3a 其中

之一过度表达引起的交感神经严重重塑及心律失常性猝死。实现路径是，利用 CRISPR/Cas9 技术构建心肌细胞由野生 NGF 基因表达驱动的敲入 Sema3a 基因表达的小鼠品系（品系 2）。这样的设计使得心肌细胞表达 NGF 时，Sema3a 也表达；反之亦然。这样就可以达到在心梗心脏中 NGF 和 Sema3a 的表达水平达到某种适当的时空动态平衡，从而抑制甚或避免心梗后心肌细胞高表达和分泌 NGF 所致的交感神经芽生和由此诱发的致命性心律失常。

本项目将在上述两种方案和相应的两种小鼠品系的基础上结扎冠状动脉造成心梗，利用心电图遥测长期观察心律失常和猝死的发生情况；利用电化学金丝电极和碳纤维电极技术实时监测心脏交感神经递质释放的变化以评估交感神经活动的变化情况；配合其它基因分子生物学方法，观察和摸索出实现 NGF 和 Sema3a 在表达和功能方面达到动态平衡的最佳方案，最终目的是实现人为控制心梗后交感神经再生和重塑的模式，以期减少心梗后交感神经病理性重塑所引发的致命性心律失常和 SCD，为临床上防治冠心病/心梗所致的 SCD 找到一条新路。本项目为理论探索，其科学意义除了基础理论创新外，更可为今后依据相关理论设计相应抗心律失常药物提供依据。

参考文献

1. Myerburg RJ, Castellanos A. Cardiac arrest and sudden cardiac death. In: Braunwald E, ed. Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 4th ed, Philadelphia, Pa: WB Saunders, 1992, 756 –789
2. Zaman S, Kovoov P. Sudden cardiac death early after myocardial infarction: pathogenesis, risk stratification, and primary prevention. Circulation 2014, 129(23):2426-2435
3. Waks JW, Buxton AE. Risk Stratification for Sudden Cardiac Death After Myocardial Infarction. Annu Rev Med 2018, 69:147-164
4. Shen MJ, Zipes DP. Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias. Circ Res 2014, 114:1004-1021
5. Chen PS, Chen LS, Cao JM, Sharifi B, Karagueuzian HS, Fishbein MC, Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling and the mechanisms of sudden cardiac death. Cardiovasc Res 2001, 50:409-416
6. Cao JM, Fishbein MC, Han JB, Lai WW, Lai AC, Wu TJ, Czer L, Wolf PL, Denton

- TA, Shintaku IP, Chen PS, Chen LS. Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. *Circulation* 2000, 101:1960-1969
7. Cao JM, Chen LS, KenKnight BH, Ohara T, Lee MH, Tsai J, Lai WW, Karagueuzian HS, Wolf PL, Fishbein MC, Chen PS. Nerve sprouting and sudden cardiac death. *Circ Res* 2000, 86:816-821
 8. Zhou S, Jung BC, Tan AY, Trang VQ, Gholmieh G, Han SW, Lin SF, Fishbein MC, Chen PS, Chen LS. Spontaneous stellate ganglion nerve activity and ventricular arrhythmia in a canine model of sudden death. *Heart Rhythm* 2008, 5:131-139
 9. Tan AY, Verrier RL. The role of the autonomic nervous system in cardiac arrhythmias. *Handb Clin Neurol* 2013, 117:135-145
 10. Li CY, Li YG. Cardiac Sympathetic Nerve Sprouting and Susceptibility to Ventricular Arrhythmias after Myocardial Infarction. *Cardiol Res Pract* 2015, 2015:698368
 11. Xia W, Liu Y. Targeted ablation of cardiac sympathetic neurons: A promising approach to prevent sudden cardiac death. *Int J Cardiol* 2016, 202:425-426
 12. Kishi T. Deep and future insights into neuromodulation therapies for heart failure. *J Cardiol* 2016, 68:368-372
 13. Hou Y, Zhou Q, Po SS. Neuromodulation for cardiac arrhythmia. *Heart Rhythm* 2016, 13:584-592
 14. Kimura K, Ieda M, Fukuda K. Development, maturation, and transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves. *Circ Res* 2012, 110:325-336
 15. Fukuda K, Kanazawa H, Aizawa Y, Ardell JL, Shivkumar K. Cardiac innervation and sudden cardiac death. *Circ Res* 2015, 116:2005-2019
 16. Ieda M, Fukuda K, Hisaka Y, Kimura K, Kawaguchi H, Fujita J, Shimoda K, Takeshita E, Okano H, Kurihara Y, Kurihara H, Ishida J, Fukamizu A, Federoff HJ, Ogawa S. Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest* 2004, 113:876-884
 17. Chien PN, Ryu SE. Protein tyrosine phosphatase σ in proteoglycan-mediated neural regeneration regulation. *Mol Neurobiol* 2013, 47:220-227.
 18. Ieda M, Kanazawa H, Kimura K, Hattori F, Ieda Y, Taniguchi M, Lee JK, Matsumura

- K, Tomita Y, Miyoshi S, Shimoda K, Makino S, Sano M, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K. Sema3a maintains normal heart rhythm through sympathetic innervation patterning. *Nat Med* 2007, 13:604-612
19. Yang LC, Zhang PP, Chen XM, Li CY, Sun J, Hou JW, Chen RH, Wang YP, Li YG. Semaphorin 3a transfection into the left stellate ganglion reduces susceptibility to ventricular arrhythmias after myocardial infarction in rats. *Europace* 2016, 18:1886-1896
20. Yang Gea, Anke M. Smitsc, J. Conny van Munsteren, Adriana C. Gittenberger-de Groot, Robert E. Poelmann, Thomas J. van Brakel, Martin J. Schalij, Marie-José Goumans, Marco C. DeRuiter, Monique R.M. Jongbloed. Human epicardium-derived cells reinforce cardiac sympathetic innervation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2020, 143:26–37
21. Rana OR, Saygili E, Meyer C, Gemein C, Krüttgen A, Andrzejewski MG, Ludwig A, Schotten U, Schwinger RH, Weber C, Weis J, Mischke K, Rassaf T, Kelm M, Schauerte P. Regulation of nerve growth factor in the heart: the role of the calcineurin-NFAT pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2009, 46:568-578
22. Meloni M, Caporali A, Graiani G, Lagrasta C, Katare R, Van Linthout S, Spillmann F, Campesi I, Madeddu P, Quaini F, Emanuelli C. Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction. *Circ Res* 2010, 106:1275-1284
23. Meloni M, Cesselli D, Caporali A, Mangialardi G, Avolio E, Reni C, Fortunato O, Martini S, Madeddu P, Valgimigli M, Nikolaev E, Kaczmarek L, Angelini GD, Beltrami AP, Emanuelli C. Cardiac Nerve growth factor overexpression induces bone marrow-derived progenitor cells mobilization and homing to the infarcted heart. *Mol Ther* 2015, 23(12):1854-1866
24. Hassankhani A, Steinhilber ME, Soonpaa MH, Katz EB, Taylor DA, Andrade-Rozental A, Factor SM, Steinberg JJ, Field LJ, Federoff HJ. Overexpression of NGF within the heart of transgenic mice causes hyperinnervation, cardiac enlargement, and hyperplasia of ectopic cells. *Dev Biol* 1995, 169:309-321
25. Heath BM, Xia J, Dong E, An RH, Brooks A, Liang C, Federoff HJ, Kass RS. Overexpression of nerve growth factor in the heart alters ion channel activity and

- beta-adrenergic signalling in an adult transgenic mouse. *J Physiol* 1998, 512:779-791
26. Ren C, Wang F, Li G, Jiao Q, Bai J, Yu D, Hao W, Wang R, Cao JM. Nerve sprouting suppresses myocardial $I_{(to)}$ and $I_{(K1)}$ channels and increases severity to ventricular fibrillation in rat. *Auton Neurosci* 2008, 144:22-29
27. Lü J, Gao X, Gu J, Zhou L, Guo S, Hao W, Zhou Z, Cao JM. Nerve sprouting contributes to increased severity of ventricular tachyarrhythmias by upregulating iGluRs in rats with healed myocardial necrotic injury. *J Mol Neurosci* 2012, 48:448-455
28. Bai J, Ren C, Hao W, Wang R, Cao JM. Chemical sympathetic denervation, suppression of myocardial transient outward potassium current, and ventricular fibrillation in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 2008, 86(10):700-709
29. Ong SB, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan GE, Mukhametshina RT, Kwek XY, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther* 2018, 186:73-87
30. Wu X, Liu W, Ding H. A *Pdgfr-cCreERT2* knock-in mouse model for tracing PDGF- β cell lineages during development. *Genesis* 2018, 56(2). Epub 2018 Jan 31. doi: 10.1002/dvg.23092

三、项目研究的总目标和特色、创新点，主要研究内容及所需要解决的技术难点

1. 研究内容、技术路线、拟解决的关键问题。

研究内容

(1)小鼠品系 1 的构建:利用 CRISPR/Cas9 技术方案,构建由心肌细胞野生 TGF- β 1 基因驱动的 Sema3a 过表达,品系全称为 C57BL/6J-Tgfb1^{em1(2A-Sema3a-Wpre-pA)}Smoc。设计在 Tgfb1 基因后面用 2A 连接 Sema3a 基因,这样就实现了由 TGF- β 1 驱动的心肌 Sema3a 表达,由此在心梗康复期心肌梗死灶纤维化瘢痕形成期间,也就是在心梗后交感神经芽生的起始阶段和最活跃的阶段,通过高表达的 TGF- β 1 基因来驱动 Sema3a 的高表达来对抗 NGF 的促交感神经芽生作用及其致心律失常后果(具体方案详见研究方法)。

(2)小鼠品系 2 的构建:利用 CRISPR/Cas9 技术方案,构建由心肌细胞野生 NGF 基因驱动的、敲入的 Sema3a 基因过表达,以达到由 NGF 表达来控制 Sema3a 的表达。品系 2 全称为 C57BL/6J-NGF^{em2(2A-Sema3a)}Smoc(具体方案详见研究方法)。这样的设计可实现下述效果:当 NGF 表达增高时,Sema3a 的表达也增高;当 NGF 表达降低时,Sema3a 的表达也降低;这种情况使得心梗后的心肌中不会出现 NGF 或 Sema3a 各自单独表达过高,而是达到一个动态平衡,以避免交感神经芽生因 NGF 单独过表达而太多,或因 Sema3a 单独高表达而被抑制,以期抑制心梗后交感神经过度重塑和心律失常。至于该品系可能存在的心肌细胞野生 Sema3a 表达,可能被敲入的 Sema3a 表达所“淹没”,或被负反馈控制,可在实验中观察。

利用小鼠品系 1(不影响发育期 NGF 和 Sema3a 的表达)作为主要观察对象,摸索出用 Sema3a 对抗 NGF 过表达、抑制心梗后交感神经芽生的最佳时间方案;利用品系 2 探讨用 NGF 和 Sema3a 联动表达抑制心梗后交感神经芽生的效果;最终找到控制交感神经芽生及其致心律失常后果的最佳方案。

(3)利用心电长期遥测技术,观察上述三种品系小鼠在心梗后发生室性心律失常的情况,并与同源品系单纯心梗组和正常对照组小鼠相比。室性心律失常的观察点包括:室性早搏(PVC)、室性心动过速(VT)和室颤(VF)等;也注意观察是否出现本研究中无法预知的心律失常,如缓慢性心律失常、房性心律失常等。预期效果是,两种品系小鼠心梗后交感神经再生和重塑的严重性明显减轻,相应地心律失常和 SCD

的发生率都降低。

(4) 利用电化学金丝电极和碳纤电极技术, 研究上述品系小鼠在整体情况下(采用金丝电极技术), 应激(如心肌缺血、缺氧)或去极化时交感神经递质去甲肾上腺素(NE)释放是否减少; 在离体心肌组织切片条件下(采用碳纤电极技术), 观察诱导性 NE 释放是否降低。

(5) 利用小动物超声技术, 观察上述两种品系小鼠是否出现心脏结构和功能的改变, 也注意观察这两种品系小鼠在心梗后是否有心功能改善(与单纯心梗组相比)。因交感神经过度活动和心梗都可引起心肌肥大, 而上述两种品系小鼠通过影响交感神经生长的关键调控因子 NGF 和 Sema3a, 因而可能都有改善心梗后由交感神经活动加剧所导致的的心脏重塑和心功能改变的作用。

(6) 应用免疫组化或免疫荧光技术, 及全心脏免疫荧光技术, 显示上述品系动物心肌中的交感神经分布情况, 特别关注基因敲入小鼠心梗后心脏交感神经支配和重塑情况是否有改善。注意分析上述品系小鼠心梗后, 心肌中的交感神经再生和密度分布以及空间不均一性是否有改善。

(7) 利用分子生物学技术, 观察调节交感神经生长的有关因子和标志蛋白的表达情况, 如 NGF、Sema3a、ET1(内皮素 1)、TH(酪氨酸羟化酶)、GAP43、S100 等在心肌和交感神经的表达水平, 并与其它结果比较, 以证明上述两种品系小鼠心梗后交感神经再生和重塑的分子基础。

(8) 汇总上述各种结果, 例如心电遥测、电化学、心脏超声、交感神经分布形态、关键基因表达水平等, 分析上述两种品系方案, 是否能降低小鼠心梗后致命性心律失常的发生率和改善心交感神经重塑、心脏重塑和心功能改变, 并是否可避免已被证明的单独干涉 NGF 或 Sema3a 所引起的严重后果(例如交感神经发育异常和心律失常)。



研究目标

利用基因敲入技术, 人为调控心脏中决定交感神经生长的两个关键因子 NGF 和 Sema3a 的表达和功能实现动态平衡, 从而抑制心梗后交感神经病理性芽生/重塑以及由此引起的心梗后心律失常和猝死。本项目从理论角度探讨调控心梗后交感神经芽生和重塑的新方案的有效性和安全性, 最终目的是为以后研发有相应效应和特点的抗心律失常新药做理论准备。

拟解决的关键科学问题

本项目拟解决的关键科学问题只有一个: 即如何[有效、合理](#)地控制心梗后交感神经芽生及由此引发的心律失常性猝死? 具体来说, 拟利用条件性基因敲入等技术, 从调节交感神经生长的两个关键因子 NGF 和 Sema3a 入手, 使 Sema3a 的表达实现内源性、时相性控制 (品系 1), 配合 NGF 和 Sema3a 基因联动表达方案 (品系 2), 力求避免已报道的单独影响其中一个因子所带来的心律失常的高发性和高易感性, 以对抗 NGF 高表达的促交感神经芽生和致心律失常作用,

期望达到抑制心梗后交感神经病理性重塑和由此引发的心律失常性猝死的目的。

创新点

本项目首次提出利用基因敲入等技术，实现对心脏中调控交感神经生长的两个关键因子 NGF 和 Sema3a 表达的人为控制，以期实现抑制心梗后交感神经病理性再生和重塑、从而达到降低心梗后心律失常和猝死发生率的目的，设计思想独辟蹊径，未见报道；其独特优势是：可能避免已报道的利用基因敲除或转基因手段单独影响 NGF 或 Sema3a 的表达水平所引起的心律失常风险，对于如何抑制心梗后交感神经病理性重塑所致的致命性心律失常这一科学问题来讲，是一种全新的思路，具有明显的特色和创新性。如果项目实施成功，将可能为防治陈旧性心梗患者致命性心律失常的发生提供一种新思路甚或新防治措施。

四、项目完成形式和考核指标

主要技术指标、形成的专利、标准、新技术、新产品、新装置、论文专著等数量、指标及其水平等；社会、经济效益考核指标；人才培养情况。

(1) 品系 1 小鼠 (由心肌细胞野生 TGF- β 1 基因表达驱动的 Sema3a 表达): 由于品系设计的原因, 在心梗度过急性期后, 心肌细胞开始表达 TGF- β 1 使坏死灶纤维化; TGF- β 1 的表达引起 Sema3a 的过表达, 以对抗 NGF 过表达导致的交感神经过度芽生和高发心律失常。这一效应随着心肌梗死区纤维化高峰期的结束和纤维瘢痕形成而逐渐减弱。这部分工作的意义是探讨如何利用内源性机制来抑制心梗后交感神经芽生及由此诱发的心律失常。

(2) 品系 2 小鼠 (由心肌细胞野生 NGF 基因表达驱动的 Sema3a 过表达): 该品系小鼠在整个生命周期中可能一直存在这种表达模式, 实现由 NGF 控制 Sema3a 表达的效果, 使 NGF 和 Sema3a 的表达呈现动态平衡, 由此可能减少甚或避免在心梗后心肌细胞 NGF 过表达导致的交感神经过度芽生和高发心律失常。鉴于上述原因, 这一品系大概不会出现心肌中 NGF 或 Sema3a 单独异常增高或降低的现象, 对交感神经的发育应该不会产生很强的影响, 但有待实验观察。

(3) 两种小鼠品系有可能实现“殊途同归”和相互映证的效果, 可摸索出人为控制心梗后交感神经芽生及其致心律失常效应的最佳措施和最佳时间历程, 最终找到降低心梗后心律失常性猝死发生率的最佳措施。

五、项目年度计划及年度目标

年度	项目的年度计划及年度目标（按季度划分工作节点，要求明确关键的、必须实现的节点目标）
2022 年	2022/1-2022/3: 查阅文献，制定实验计划，购买实验小鼠及所需试剂； 2022/4-2022/6: 培育并繁殖 2 种品系小鼠，品系 2 与心脏选择性 cre 小鼠杂交，获得子代小鼠； 2022/7-2022/9: 同时开展其他方面的初步研究，如心梗模型制作、心电遥测和 ECG 分析、交感神经形态学研究，心脏免疫组化或免疫荧光实验； 2022/10-2022/12: 大量培育和繁殖动物，扩大各品系小鼠数量，开展大量正式实验，包括心梗模型制作、心电图遥测及数据分析、心脏交感神经支配的研究。
2023 年	2023/1-2023/3: 开展心电图遥测及数据分析、心脏交感神经支配的（二维、三维）形态学研究、交感神经标志蛋白及调控因子等（如 NGF、Sema3a、GAP43、S100、ET1 等）的表达水平的研究，如 Western blot、RT-qPCR、免疫组化、免疫荧光等实验。扩大实验样本数量，得到主要实验结果；结果的初步总结； 2023/4-2023/6: 探索心脏交感神经三维分布的重建手段； 2023/7-2023/9: 撰写部分实验结果的论文并投稿，完善实验内容；参加相关的国内、国际学术会议，发表研究论文； 2023/10-2023/12: 申报相关专利；撰写结题报告。
本项目应于 2023 年 12 月 31 日前进行验收	

六、工作条件和环境保障

项目申请单位情况；已具备的实验条件；已做的工作基础；项目组织机制设计；保障和加快工作进展的设想等。

(1) 申请人长期从事房颤等心律失常的研究，曾率先报道左前左后分支联合起搏治疗顽固性心衰，这些研究产生了广泛的影响，并推动了生理性起搏这一领域的发展。本项目是对心梗后心律失常进行深入研究，具有很强的研究背景。

(2) 申请人随后仍继续了这一领域的研究工作，已发表的结果有：

1) Haixiong Wang , Na Li , Liping Guo , Xingyan Yu , Xiaofang Li, Xuebin Han. Increased plasma sestrin2 concentrations in patients with chronic heart failure and predicted the occurrence of major adverse cardiac events: A36-month follow-up cohort study.Clin Chim Acta.2019, 495:338-344.

2) Haixiong Wang,Xin Du, Lizhu Guo, Xueyuan Guo,Jianzeng Dong, Changsheng Ma. Ablation Versus Medical Therapy for Atrial Fibrillation in the Elderly: A Propensity Score- Matched Compariso.Med Sci Monit. 2019, 25:9875-9881

3) Jun Li , Haixiong Wang,Yanqing Guo. Radiofrequency ablation for the pre-excitation syndrome of functionally corrected transposition of great arteries.J Card Surg.2020,35(5):1100-1103.

4) Haixiong Wang , Jian An , Zhixin Wang, Huiyuan Han, Jingwei Hu, and Yanqing Guo. Simultaneous pacing of left anterior/posterior fascicular areas as an alternative to left bundle branch pacing: a case report.Europace,2020,35(5):100-110

5) Shun Wang , Haixiong Wang, Xiaoling Su , Beilei Liu , Congxin Huang , Mian Cheng , Gang Wu . β -adrenergic activation may promote myosin light chain kinase degradation through calpain in pressure overload-induced cardiac hypertrophy: β -adrenergic activation results in MLCK degradation.Biomedicine & Pharmacotherapy, 129(2020)110438.

已具备的实验条件：

(1) 依托山西医科大学 SPF 级动物房和普通动物房，可用于小鼠饲养和手术等动物模型操作。

(2) 小鼠心电图遥测技术平台：包括主机、接收器、植入子及其分析软件。本校实验室已从北京软隆生物技术有限公司购买了这些设备及心电分析软件。该设备可

分析各种类型的心律失常以及心率变异性（HRV）。

（3）电化学平台：1）用于在体心脏交感神经递质释放实时记录的金丝电极技术；2）用于离体心脏切片标本交感神经递质释放实时记录的碳纤电极技术：本校实验室均已具备这些实验平台。

（4）微透析+高压液相（HPLC）技术平台：用于心肌微透析及微透析液中交感神经递质及其代谢产物的分析。本校实验室已购买了这些设备。

（5）小动物超声仪：本校实验室已经具备。

（6）电生理实验平台：本校实验室已具备了常规心电记录仪器、膜片钳仪器等电生理仪器，可对心肌细胞离子通道及心电活动进行记录和分析。

（7）激光共聚焦显微镜：可开展交感神经分布信号的获取、二维成像和较简单的三维重建，本实验室已具备。

（8）其他常规实验仪器：包括小动物麻醉机、手术室、Langendorff 心脏灌流装置、各种切片机、组织化学和免疫组化、免疫荧光染色、心肌细胞分离和培养以及常规分子生物学技术（如 real-time PCR 仪，Western blot 用仪器等，本校实验室均已具备。

（9）依托单位的转化医学中心配备了一些大型仪器设备，可供本项目研究使用，如电镜、流式细胞仪、超速离心机等。

此外，免疫组化和免疫荧光技术+图像处理软件分析也可用于心脏交感神经分布密度的计算和分析。

七、项目完成后的预期社会效益、经济效益

1、效益分析：

将两种小鼠品系的基础上结扎冠状动脉造成心梗，利用心电图遥测长期观察心律失常和猝死的发生情况；利用电化学金丝电极和碳纤电极技术实时监测心脏交感神经递质释放的变化以评估交感神经活动的变化情况；配合其它基因分子生物学方法，观察和摸索出实现 NGF 和 Sema3a 在表达和功能方面达到动态平衡的最佳方案，最终目的是实现人为控制心梗后交感神经再生和重塑的模式。

2、成果应用趋向和应用单位：

减少心梗后交感神经病理性重塑所引发的致命性心律失常和 SCD，为临床上防治冠心病/心梗所致的 SCD 找到一条新路。本项目为理论探索，其科学意义除了基础理论创新外，更可为今后依据相关理论设计相应抗心律失常药物提供依据。

八、单位伦理委员会意见



Red circular stamp of the Ethics Committee. The text around the border reads "伦理委员会" (Ethics Committee). Inside the circle, there is a signature and the date "2023年10月".

九、合作形式、内容和合作单位意见

1、合作形式和内容

2、合作单位意见（对合作内容、形式、参加人员素质及保证工作条件等）签署具体意见：

负责人签章
公 章
年 月 日

此项目如与国外合作，签有协议的请附合作协议复印件。

十、项目组成员登记表

	姓 名	性 别	出 生 年 月	职 称 (职务)	单 位 (部门)	项 目 中 的 分 工	每 年 从 事 本 项 目 的 工 作 月 数	本 人 签 名
负责人	王 海 雄	男	1976.7	科主任	山西省心血管病医院	实 验 设计	9	
课 题 参 加 人 员	牛 怀 明	男	1971.1 0	副 主 任 医师	山西省心血管病医院	整 理 资料	6	
	郭 李 平	男	1984.4	主 治 医 师	山西省心血管病医院	查 阅 文献	6	
	李 军	男	1987.1 0	主 治 医 师	山西省心血管病医院	论 文 撰写	6	
	邵新	男	1987.1 0	主 治 医 师	山西省心血管病医院	实 验 操作	6	
	李娜	女	1990.7	医师	山西省心血管病医院	实 验 操作	9	

十一、项目经费预算表（金额单位：万元）

经费来源合计：20		
其 中	1、山西省卫生健康委员会资助	10
	2、自筹（单位配套）	10

项目支出预算

支出科目	金额	备注/计算依据
（一）直接费用	20.0	
1、设备费	0.0	
2、资料费	2.4	
3、材料费	12.4	实验细胞 2.40 万元；WB 检测试剂盒 4.40 万元；免疫组化试剂盒 2.0 万元；QPCR 引物套餐 3.60 万元。
4、测试、化验加工费	1.2	
5、数据或样本采集费		
6、燃料动力费	0.0	
7、车辆使用费	0.0	
8、差旅费		
9、会议费、会务费	0.6	
10、办公费	0.2	
11、国际合作与交流费	0.4	
12、国内协作费	0.2	
13、印刷出版费	1.2	
14、知识产权事务费	0.0	
15、劳务费	1.2	
16、专家咨询费	0.2	
17、其他		
（二）间接费用		
其中：绩效支出		

十二、项目承担单位

韩斌印

单位负责人签章
公章
年 月 日

心血管病防治中心

十三、上级主管部门

主管部门负责人签章
公章
年 月 日

十四、山西省卫生健康委员会

主管部门负责人签章

段朝斌印

山西省卫生健康委员会
科技教育处
公章
年 月 日