

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.36.003

HL-1 细胞培养及房颤细胞模型的建立 *

孙丽萍¹ 周沫² 徐文静² 金鸿波² 韩薇^{2Δ}

(1 哈尔滨医科大学附属第二医院 黑龙江 哈尔滨 150081; 2 哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:利用 HL-1 细胞建立快速起搏模型,对心房颤动(atrial fibrillation, AF)早期的重构现象进行初步研究。**方法:**培养 HL-1 细胞,建立快速电场刺激起搏细胞模型,利用全细胞膜片钳技术记录刺激前后 HL-1 细胞的动作电位周期,透射电镜观察细胞超微结构的变化。**结果:**将细胞接种于培养皿中,72 h 后细胞呈融合状态,全细胞膜片钳记录培养 HL-1 细胞及经电场刺激(600 次/min, 1 V/cm)24 h 后的心房肌细胞的动作电位周期,动作电位周期分别为 106 ms, 45 ms,刺激前后差异有统计学意义($P < 0.05$)。透射电镜观察到刺激后 HL-1 细胞超微结构发生去分化改变。**结论:**经快速起搏 24 h 后,HL-1 细胞发生了电及结构重构;利用 HL-1 细胞建立快速起搏的房颤模型,可以对房颤早期的重构机制进行研究。

关键词:心房颤动;细胞培养;HL-1 细胞;心脏起搏

中图分类号:R541.75;Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)36-7011-04

Culture of HL-1 Cardiomyocytes and Establishment of Rapid Paced Cells Model*

SUN li-ping¹, ZHOU Mo², XU Wen-jing², JIN Hong-bo², HAN Wei^{2Δ}

(1 The Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China;

2 The First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To explore early electrical and structural remodeling in atrial fibrillation utilizing a rapid paced cultured HL-1 cardiomyocytes model. **Methods:** HL-1 cardiomyocytes were cultured and established as a rapid paced cultured HL-1 cardiomyocytes model. HL-1 cells were cultured in the presence of rapid field stimulation (600 beats per min, 1 V/cm) for 24 h. Action potential duration was recorded from stimulated cells and control cells using whole-cell voltage-clamp techniques. Ultrastructure of HL-1 cells was observed under electron microscope. **Results:** After 72h of culture, the cells were in the confluent phase. The action potential duration was shortened through the rapid pacing compared with those before pacing ($P < 0.05$). Results of electron microscope showed that HL-1 cells generated dedifferentiation through pacing. **Conclusion:** Rapid stimulation of HL-1 cells in culture produces electrical remodeling, recapitulating principal phenotypic features of atrial tachycardia remodeling in vivo. It is available that a rapid paced cell model is established with cultured HL-1 cells to study the mechanism of early electrical and structural remodeling for atrial fibrillation.

Key words: Atrial fibrillation; Cell culture; HL-1 cardiomyocytes; Cardiac pacing

Chinese Library Classification(CLC): R541.75; Q813 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)36-7011-04

前言

心房颤动(房颤)是目前临床上最常见的心律失常。研究表明^[1,2],中国房颤的患病率为 0.77%,男性房颤患病率(0.9%)高于女性(0.7%),患病率有随年龄显著增加的趋势。在美国,房颤占心律失常患者住院总数的 35%以上^[3]。因此,加强对房颤作用机制及防治的研究,具有重要临床意义。目前关于房颤机理的研究主要通过离体动物实验及对临床房颤患者的研究,但都有着不同程度的缺陷。近年,随着 Claycomb 教授等建立 HL-1 细胞系,直接在 HL-1 心房肌细胞上进行研究,建立房颤的细胞模型意义重大^[4]。本研究旨在探索 HL-1 细胞的培养以

及利用 HL-1 细胞建立快速起搏的房颤细胞模型,对房颤早期的重构机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 细胞系

HL-1 细胞系(由美国 William Claycomb 教授惠赠)。

1.2 主要仪器设备

二氧化碳孵箱(Carbon dioxide incubator box, Japan);倒置显微镜(Inverted microscope, Japan);铂电极,YC-2-S 双极型程控刺激器(成都仪器厂);低温超高速离心机(Allerga™ 64R Centrifuge, USA);37℃ 恒温水浴槽(上海医用分析仪器厂);微

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81270251)

作者简介:孙丽萍(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:房颤机制研究, E-mail: 113897922@qq.com

Δ 通讯作者:韩薇(1971-),女,博士研究生,主要研究方向:房颤机制研究, E-mail: hanwei2@medmail.com.cn

(收稿日期:2014-06-03 接受日期:2014-06-29)

波炉(Panasonic, Japan)。

病理图像分析系统(Motic Images Advanced 3.0, China.);透射电镜(JEM-1200EX, Japan);荧光显微镜(CFM-200, Japan);硬质玻璃经微电极拉制器(Narishige PB7);微电极操纵仪(Narishige MD320)膜片钳放大器(Axon-patch 200B)数模转换装置(Digidata 1200)。

1.3 主要试剂

1) 细胞培养主要试剂: Claycomb 培养基(51800C, Sigma);胎牛血清(Hyclone);去甲肾上腺素(Sigma);纤维结合蛋白(Sigma)。2) 电镜检测试剂: 2.5%戊二醛。3) 免疫荧光试剂: α -肌动蛋白抗体(Abcam);兔抗心钠素抗体(Abcam);罗丹明标记山羊抗兔 IgG(北京中杉);DAPI 核染料(碧云天);山羊血清封闭剂(博士德生物工程有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 HL-1 细胞培养 HL-1 细胞系是来源于 AT-1 小鼠心房肌肿瘤细胞, 由路易斯安那州 Claycomb 实验室 William C. Claycomb 教授惠赠。HL-1 细胞可以连续传代, 自主收缩, 并保持有正常心肌形态学、生物化学和电生理学特性。HL-1 细胞的超微结构具有胚胎期心房肌细胞的典型特征^[4]。

为使 HL-1 细胞能够保持心房的收缩性并稳定传代, 按照 Claycomb 细胞培养文档说明, 需要 Claycomb 培养基及必要的添加物, 包括 10% 胎牛血清、100 U/mL:100 μ g/mL 青霉素/链霉素、10 mM 去甲肾上腺素、200 mM L-谷氨酰胺等。将细胞接种于含明胶/纤维结合蛋白的培养瓶中, 加入适量的培养液, 于 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱中进行培养。

1.4.2 HL-1 房颤细胞模型建立 参照文献^[5,6]将 HL-1 细胞接种于含明胶/纤维结合蛋白的培养皿中, 72 h 倒置显微镜观察细胞呈融合状态, 以 1~3 Hz 去极化。更换培养液为正常 Tyrode 液 (mmol/L: NaCl 137, KCl 5.4, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.8, KH₂PO₄ 1.2, Glucose 22, HEPES 10, pH 7.4), 在培养皿中置入两个并联铂电极, 用 YC-2-S 双极型程控刺激器于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中给予刺激, 刺激频率为 600 次/min, 强度 1 V/cm, 连续刺激 24 h, 建立快速起搏的 HL-1 房颤细胞模型。

1.4.3 HL-1 细胞动作电位检测 在起搏前后 HL-1 细胞中选择贴壁好、杆状、横纹清晰、折光性好的细胞行膜片钳全细胞模式记录。APD 测定采用电流钳制方法, 电极选用硬质玻璃经微电极拉制器(Narishige PB7)二次拉制而成。用微电极操纵仪(Narishige MD320)移动电极, 当电极尖端与 HL-1 细胞表面达成高阻抗封接后(>2 G Ω), 弥补电极与细胞膜之间的电容, 进而给予负压吸破细胞膜, 通过电容电流和电极串联补偿即可行全细胞记录。使用膜片钳放大器(Axon-patch 200B)、数模转换装置(Digidata 1200)和 PClamp 软件采集数据。所得的数据采用 Clampfit 及 ORIGIN 6.0 分析及绘图。

1.4.4 透射电镜标本制备与观察 取刺激前后的单层细胞, 去除其培养液, 用细胞刮刮下单层细胞, 移入 EP 管, 加入预冷的 PBS, 以 1000 r/min 离心 5 min; 去除上清液, 加入 2% 戊二醛固定 120 分钟, 1% 四氧化锇再固定 120 分钟, 不同浓度丙酮依次脱水, 应用环氧树脂 618 包埋后切片, 应用醋酸双氧铀、枸橼酸铅进行双重染色, 透射电镜观察。

1.4.5 细胞标本制备及免疫细胞化学染色 将细胞接种于盖玻片上, 待细胞长好, 进行起搏后 PBS 冲洗, 用 4% 多聚甲醛进行固定, 10 min。PBS 冲洗三次, 每次 5 min, 加穿透液常温一小时, PBS 冲洗三次, 每次 5 min, 加山羊血清封闭液 37℃ 1 h, PBS 冲洗三次, 每次 5 min, 加兔抗 α -肌动蛋白抗体, 兔抗心钠素抗体 4℃ 孵育过夜。第二天, 吸去抗体, PBS 冲洗三次, 每次 5 min, 加入罗丹明标记山羊抗兔荧光二抗暗室孵育 2 h, PBS 冲洗五次, 每次 5 min, DAPI 核染料, 暗室孵育 5~6 min, PBS 冲洗五次, 每次 5 min, 封片, 荧光显微镜检。

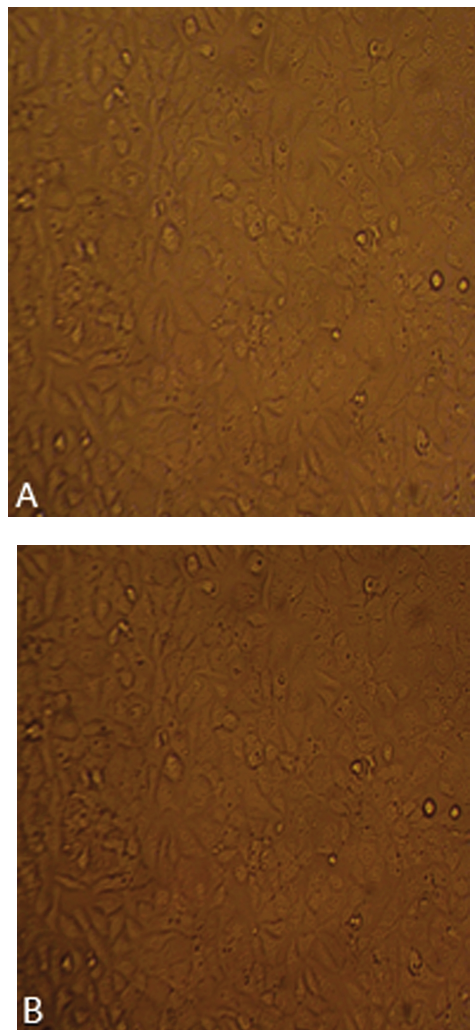
1.5 统计学处理

所有计量数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 使用 SPSS10.0 统计软件, 计量资料应用方差分析, 两两比较用 q 检验。P<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 HL-1 细胞培养及鉴定

图 1 所示, 培养 HL-1 细胞 24 h, 利用倒置显微镜观察到 HL-1 细胞呈现多种形态, 以三角形、不规则形、杆状及梭形为主, 72h 后观察细胞生长融合成片, 多数细胞出现规律性搏动。通过免疫细胞化学鉴定, 90% 以上 HL-1 细胞 α -肌动蛋白抗体染色(+), 心钠素抗体染色(+), 证实 HL-1 细胞具心房肌细胞特性。



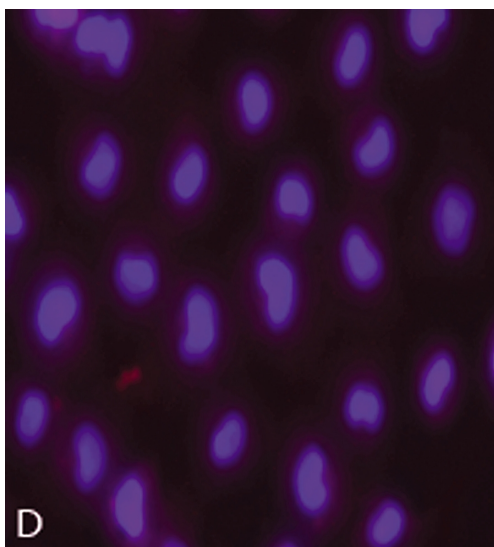
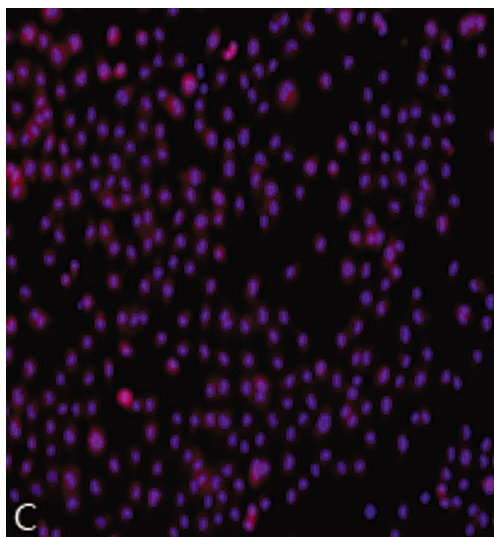


图 1 HL-1 细胞培养

Fig. 1 Cultured HL-1 cells

注: A, HL-1 细胞培养 24 小时, 倒置显微镜下所见; B, HL-1 细胞培养 72 小时, 倒置显微镜下所见; C, HL-1 细胞 α -肌动蛋白抗体染色, 荧光显微镜下所见 (红色为 α -肌动蛋白染色, 蓝色为细胞核染色), 发现 90% 以上 HL-1 细胞 α -肌动蛋白抗体染色阳性 ($100\times$); D, HL-1 细胞心钠素抗体染色 (红色为心钠素染色, 蓝色为细胞核染色 ($400\times$)).

Note: A, HL-1 cells cultured for 24 h, seen under the inverted microscope; B, HL-1 cells cultured for 72 h, seen under the inverted microscope; C, For the HL-1 cells, α -smooth muscle actin antibody staining, seen under the fluorescence microscopy (blue for the HL-1 cells nuclear staining, red for the HL-1 cells, α -smooth muscle actin antibody staining), showing that more than 90% of the HL-1 cells, α -smooth muscle actin antibody staining was positive ($100\times$); D, For the HL-1 cells, atrial natriuretic peptide (ANP) antibody staining (blue for the HL-1 cells nuclear staining, red for ANP antibody staining) ($400\times$).

2.2 HL-1 细胞电生理学特征

如图 2, 经细胞膜片钳技术记录 HL-1 细胞及经电场刺激 24 h 后的 HL-1 细胞的动作电位时程 (APD), APD 分别为 (106.36 ± 15.46) ms, (45 ± 10.59) ms, 起搏后 HL-1 细胞 APD 明显缩短, 刺激前后的 APD 有统计学意义 ($P < 0.05$).

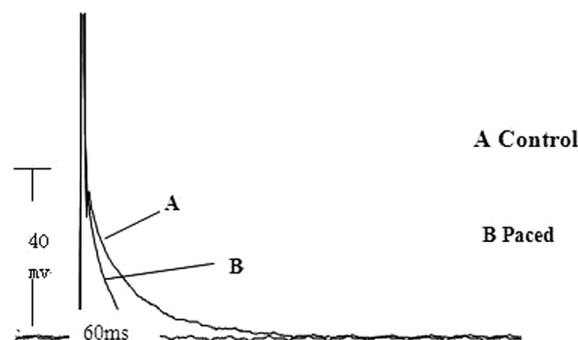


图 2 起搏后 HL-1 细胞动作电位时程缩短

Fig. 2 Reduction in HL-1 cell APD with rapid stimulation

注: 经电场刺激 24 h 后 HL-1 细胞比正常 HL-1 细胞, 动作电位时程 (APD) 明显缩短 ($P < 0.05$).

Note: The HL-1 cells stimulated by electric field for 24 h, the action potential duration (APD) was significantly shorter compared with the normal HL-1 cells ($P < 0.05$).

2.3 电场刺激前后细胞超微结构变化

正常 HL-1 细胞超微结构基本完好: 整体细胞状态良好, 线粒体丰富, 嵴清晰, 线粒体嵴部分断裂; 高尔基体扁平状态; 细胞核发育正常, 双层核膜结构清晰, 核仁明显。起搏后 HL-1 细胞细胞核较大, 表面气球形突起; 大部细胞呈坏死状态, 膜性结构均呈溶解; 线粒体呈溶解状态, 可见残存嵴结构, 肌质密度弥漫性改变, 核固缩, 核内染色质凝聚 (图 3)。

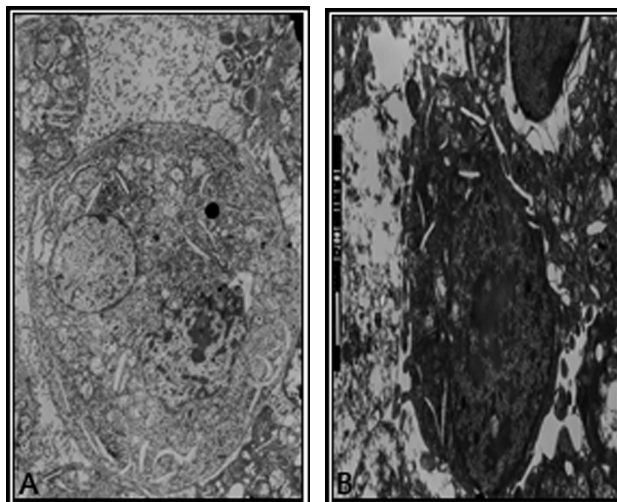


图 3 HL-1 细胞起搏前后电镜所见

Fig. 3 HL-1 cells under electron microscopy before and after pace-making
注: A: 起搏前 ($5000\times$); B: 起搏后 ($8000\times$).

Note: A: Before pace-making ($5000\times$); B: After pace-making ($8000\times$).

3 讨论

心房颤动 (房颤) 是临床最常见的心律失常, 是增加心血管病发病率和死亡率的重要原因, 但其确切机制至今未明。

房颤是一个复杂的心律失常, 最初出现的某些变化提供了房颤持续存在的基质, 即心房出现电生理、结构和功能的改变。研究表明, 房颤的发生与肺静脉口肌袖细胞的自律性及随年龄

增长肌间质的纤维化,肌细胞功能减退具有相关性^[7,8]。也有研究认为氧化应激和炎症可直接导致房颤的病理生理改变^[9],Fu 等在有凋亡基因缺陷的小鼠中发现,炎症反应的增加,可诱导房颤的发生^[10]。

房颤动物模型的建立为进一步认识房颤的发生机制和相关药物干预作用的效果提供了重要途径。如 1995 年 Wijffels 等^[11]通过建立山羊快速心房起搏模型发现房颤时心房肌的改变能够促进房颤自身的发生和维持(房颤促进房颤),此研究成为利用动物模型研究临床相关房颤的重要进展。左房的扩大已被公认是促使房颤发生的决定因素^[12],其已在兔、犬、绵羊等动物上得到证实。由于物种的差别或具体实验方法的不同,得到的观点不统一。且动物模型具有明显缺陷,如不能评估如神经体液、血流动力学等因素的影响程度、不能进行精确合理的预处理^[13]。近年来,有从大鼠心房分离培养原代细胞建立房颤模型^[14],但其存活时间短,起搏后难以长期存活和起搏。

HL-1 细胞系来源于小鼠心房,是目前唯一可获得能连续传代并保持心房特有表现型,如肌节肌球蛋白、心钠素、自动去极化及心房电生理特性的心房细胞系。RT-PCR 证实其基因表达和成年鼠心房细胞相似^[4]。微阵列分析快速起搏 HL-1 细胞,其基因表达变化和细胞重构与人类房颤及动物房颤模型具有高度一致性^[15]。

本研究利用 HL-1 细胞建立房颤细胞模型,对房颤早期电重构机制进行研究。我们从 Claycomb 实验室 (New Orleans, Louisiana, USA) 获得 HL-1 细胞系。基于 HL-1 细胞具有连续传代,自主收缩,并保持有正常心肌形态学、生物化学和电生理学特性的基础上,建立 HL-1 房颤细胞模型。此模型具备了急性分离心肌细胞的时效性,同时还具有体内模型的稳定性,此外,还可以排除其它不确定因素的干扰。本研究利用 HL-1 细胞建立房颤细胞模型,对房颤早期电重构机制进行研究。结果显示:经电场刺激,HL-1 细胞动作电位时程明显缩短,表明 HL-1 细胞经电场刺激后发生了电生理变化;通过电镜观察 HL-1 细胞的超微结构发现:经过电场刺激,HL-1 细胞发生了肌溶解、核固缩及空泡化等去分化改变。上述研究与动物实验及临床房颤患者的研究结果一致^[16]。房颤时,相应离子通道的上调及下调促进心房电重构的发生。研究发现^[17],L 型钙通道(Ica-L) α 亚单位 mRNA 浓度的降低导致 Ica-L 密度下降、电流降低,进而导致动作电位缩短及其频率适应性下降。Viogt 等^[18]发现,持续性房颤患者钙超载,使细胞内钙浓度增加,细胞内外离子失衡进而导致更严重的房颤发生。然而亦有研究显示^[19],在电重构早期 Ica-L β 2 亚单位的表达伴随 Ica-L 下降而下降,认为 β 2 亚单位表达下降引起 L 型钙通道功能下降。上述研究显示,离子通道表达异常构成房颤电重构的基础。然而房颤的发病机制复杂,房颤的发生不仅在个体、种族之间存在差异,也与基因突变等相关^[20,21]。但关于房颤离子通道及基因表达的调控机制迄今未明,利用 HL-1 细胞建立房颤细胞模型,为房颤分子生物学机制的研究及药物对于房颤基因转录、信号转导机制的作用提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] 周自强,胡大一,陈捷,等.中国心房颤动现状的流行病学研究[J].中华内科杂志,2004,43(7):491-494
- [2] 黄从新,张澍,马长生,等.心房颤动:目前的认识和治疗建议-2012[J].中华心律失常学杂志,2012,16(3):246-289
- [3] Ball J, Carrington MJ, McMurray JJ, et al. Atrial fibrillation: profile and burden of an evolving epidemic in the 21st century [J]. International journal of cardiology, 2013, 167(5): 1807-1824
- [4] Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(29): 79-84
- [5] Yang Z, Shen W, Rottman JN, et al. Rapid stimulation causes electrical remodeling in cultured atrial myocytes[J]. Mol Cell Cardiol, 2005, 38(2): 299-308
- [6] Berger HJ, Prasad SK, Davidoff AJ, et al. Continual electric field stimulation preserves contractile function of adult ventricular myocytes in primary culture[J]. Heart Circ Physiol, 1994, 266(1 Pt2): H341-H349
- [7] Sasaki N, Okumura Y, Watanabe I, et al. Pulmonary vein remnant as a trigger site for atrial fibrillation[J]. Circulation, 2013, 77(2): 494-496
- [8] Medi C, Kalman JM, Ling LH, et al. Atrial electrical and structural remodeling associated with longstanding pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy in humans [J]. Cardiovasc Electrophysiol, 2012, 23(6): 614-620
- [9] Van Wagoner DR. Oxidative stress and inflammation in atrial fibrillation: Role in pathogenesis and potential as a therapeutic target [J]. Cardiovasc Pharmacol, 2008, 52(4): 306-313
- [10] Fu G, Cao Y, Lu J, et al. Programmed cell death-1 deficiency results in atrial remodeling in C57BL/6 mice[J]. Mol Med, 2013, 31(2): 423-429
- [11] Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, et al. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats[J]. Circulation, 1995, 92(7): 1954-1968
- [12] Xu Y, Sharma D, Li G, et al. Atrial remodeling: New pathophysiological mechanism of atrial fibrillation [J]. Med Hypotheses, 2013, 80(1): 53-56
- [13] Bosch F, Scherer R, Rub N, et al. Molecular mechanisms of early electrical remodeling:transcriptional downregulation of ion channel subunits reduces Ica,L and hcn in rapid atrial pacing in rabbits[J]. Coll Cardiol, 2003, 41(8): 58-69
- [14] 程伟,肖颖彬.原代心房肌细胞培养及快速起搏细胞模型的建立[J].临床心血管病杂志,2006,22(9):535-537
- [15] Cheng Wei, Xiao Ying-bin. Primary cultured atrial myocytes and establishment of rapid paced cells model [J]. Clinical Cardiology, 2006, 22(9): 535-537
- [16] Maurits A, Jannie A, Ulrich S. Electrical,contractile and structural remodeling during atrial fibrillation [J]. Cardiovasc Res, 2002, 54(2): 230-246

的大鼠中 Th17 细胞和调节性 T 细胞之间功能失衡。Fabrega^[15]发现,肝移植患者术后发生急性排斥反应时血浆中 IL-17 水平升高。这些研究都表明 Th17 细胞可能介导肝移植后急性排斥反应的发生。在对患者进行随访中我们发现,患者术后发生急性排斥反应时 Th17 细胞频率明显升高,并与肝功指标 ALT 正相关。这提示,外周血中 Th17 细胞频率有可能作为诊断急性排斥反应的免疫学指标。由于本研究入组样本量有限,因此,以上结论尚需进一步通过多中心大样本的研究进行验证。Th17 细胞导致急性排斥反应发生的机制还不十分清楚。目前认为 Th17 细胞通过分泌大量效应性细胞因子导致组织损伤,如 TNF- α 、IL-6、IL-9、IL-21、IL-22、IL-23、IL-26 等^[16,17]。而 IL-17 为 Th17 细胞分泌的主要效应性细胞因子,不仅可以调动和激活中性粒细胞,还可以诱导表达一些炎症相关基因^[18]及分泌某些中性粒细胞趋化因子,如 CXCL1、CXCL2 和 CXCL8^[19],从而导致炎症反应发生。Itoh 等^[20]发现,当受体缺失 IL-17 时,招募的同种异体炎症性细胞明显降低。总之,之前的研究与我们的研究提示,肝移植急性排斥反应的发生可能与 Th17 细胞有关, Th17 细胞有可能作为诊断急性排斥反应发生的免疫学指标。

参考文献(References)

- [1] Miura M, El-Sawy T, Fairchild R L. Neutrophils mediate parenchymal tissue necrosis and accelerate the rejection of complete major histocompatibility complex-disparate cardiac allografts in the absence of interferon-gamma[J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(2): 509-519
- [2] Abadja F, Sarraj B, Ansari M J. Significance of T helper 17 immunity in transplantation[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2012, 17(1): 8-14
- [3] Serody J S, Hill G R. The IL-17 differentiation pathway and its role in transplant outcome [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012, 18(1 Suppl): S56-S61
- [4] Chen H, Wang W, Xie H, et al. A pathogenic role of IL- 17 at the early stage of corneal allograft rejection[J]. *Transpl Immunol*, 2009, 21(3): 155-161
- [5] Yuan X, Paez-Cortez J, Schmitt-Knosalla I, et al. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(13): 3133-3144
- [6] Yuan X, Ansari M J, D'Addio F, et al. Targeting Tim-1 to overcome resistance to transplantation tolerance mediated by CD8 T17 cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(26): 10734-10739
- [7] Vanaudenaerde B M, De Vleeschauwer S I, Vos R, et al. The role of the IL23/IL17 axis in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2008, 8(9): 1911-1920
- [8] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 Cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 485-517
- [9] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 Cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 485-517
- [10] Loverre A, Divella C, Castellano G, et al. T helper 1, 2 and 17 cell subsets in renal transplant patients with delayed graft function [J]. *Transpl Int*, 2011, 24(3): 233-242
- [11] Yang J J, Feng F, Hong L, et al. Interleukin-17 plays a critical role in the acute rejection of intestinal transplantation [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(5): 682-691
- [12] Xie X J, Ye Y F, Zhou L, et al. Th17 promotes acute rejection following liver transplantation in rats[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2010, 11(11): 819-827
- [13] Xie X, Ye Y, Zhou L, et al. Kupffer cells promote acute rejection via induction of Th17 differentiation in rat liver allografts [J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(9): 3784-3792
- [14] Li J, Lai X, Liao W, et al. The dynamic changes of Th17/Treg cytokines in rat liver transplant rejection and tolerance [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(8): 962-967
- [15] Fabrega E, Lopez-Hoyos M, San S D, et al. Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation[J]. *Liver Transpl*, 2009, 15(6): 629-633
- [16] Bettelli E, Korn T, Kuchroo V K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(6): 652-657
- [17] Wilson N J, Boniface K, Chan J R, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(9): 950-957
- [18] Sparna T, Retey J, Schmich K, et al. Genome-wide comparison between IL-17 and combined TNF- α /IL-17 induced genes in primary murine hepatocytes[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 226
- [19] Ye P, Rodriguez F H, Kanaly S, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense[J]. *J Exp Med*, 2001, 194(4): 519-527
- [20] Itoh S, Nakae S, Axtell R C, et al. IL-17 contributes to the development of chronic rejection in a murine heart transplant model [J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(2): 235-240

(上接第 7014 页)

- [16] Mace LC, Yermalitskaya LV, Yi Y, et al. Transcriptional remodeling of rapidly stimulated HL-1 atrial myocytes exhibits concordance with human atrial fibrillation[J]. *Mol Cell Cardiol*, 2009, 47(4): 85-92
- [17] Sossalla S, Kallmeyer B, Wagner S, et al. Altered Na⁺ currents in atrial fibrillation effects of ranolazine on arrhythmias and contractility in human atrial myocardium[J]. *Am Coll Cardiol*, 2010, 55(21): 2330-2342
- [18] Voigt N, Li N, Wang Q, et al. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation [J]. *Circulation*, 2012, 125(17): 2059-2070
- [19] Oh S, Kim KB, Ahn H, et al. Remodeling of ion channel expression in patients with chronic atrial fibrillation and mitral valvular heart disease[J]. *Intern Med*, 2010, 25(4): 377-385
- [20] Lipworth L, Okafor H, Mumma MT, et al. Race-specific impact of atrial fibrillation risk factors in blacks and whites in the southern community cohort study[J]. *Cardiol*, 2012, 110(11): 1637-1642
- [21] Mahida S, Ellinor PT. New advances in the genetic basis of atrial fibrillation[J]. *Cardiovasc Electrophysiol*, 2012, 23(12): 1400-1406