

· 论 著 ·

风湿性心脏病心房颤动患者心房组织碱性成纤维细胞生长因子及转化生长因子 β_1 的表达及意义*

肖 骅, 雷 寒, 覃 数, 马康华, 胥雪莲, 叶 强

(重庆医科大学附属第一医院心内科 400016)

摘要:目的 观察风湿性心脏病(风心病)心房颤动(房颤)患者心房组织中碱性成纤维细胞因子(bFGF)及转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 的表达情况,并探讨其在风心病房颤心房纤维化中的作用及意义。方法 将 38 例风心病二尖瓣病接受换瓣手术者术中获取的右心耳分为 3 组,其中窦性心律组 8 例,阵发性房颤组 10 例,持续性房颤组大于或等于 6 个月 20 例。应用羟脯氨酸含量测定法检测各组心房组织胶原含量;应用免疫组织化学技术检测各组心房组织中 bFGF 和 TGF- β_1 的蛋白表达及分布。结果 bFGF 和 TGF- β_1 主要表达在心肌细胞的胞质;与风心病窦性心律组相比,bFGF 和 TGF- β_1 表达及胶原含量在阵发性和持续性房颤组均显著增加($P < 0.01$);与阵发性房颤组相比,持续性房颤组中这两种细胞因子的表达及胶原含量继续明显增加($P < 0.05$)。bFGF 和 TGF- β_1 与胶原含量进行相关分析,发现 bFGF 及 TGF- β_1 的表达程度与心房胶原含量均呈正相关,即随心房胶原含量的增加,bFGF ($r=0.52, P < 0.05$)、TGF- β_1 ($r=0.70, P < 0.01$) 表达增强。结论 风心病患者心房组织中 bFGF 和 TGF- β_1 的表达上调可能是心房纤维化发生的分子机制之一,在风心病房颤的发生和维持中可能起重要作用。

关键词: 风湿性心脏病;心房颤动;碱性成纤维细胞生长因子;转化生长因子 β_1 ;纤维化

中图分类号:R541.2

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2009)24-3109-02

Expression and significance of bFGF and TGF- β_1 in atrial tissue of patients with atrial fibrillation*

XIAO Hua, LEI Han, QIN Shu, et al.

(Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the expressive feature of bFGF and TGF- β_1 in atrial tissue of the patient with rheumatic heart disease(RHD), and the effects of bFGF and TGF- β_1 on rheumatic atrial myocardial fibrosis. **Methods** Of 38 RHD patients, 8 were with sinus rhythm, 10 were with paroxysm atrial fibrillation (pAF), and 20 with chronic AF(cAF) (≥ 6 months). The right atrial muscle specimens were obtained during the operation on mitral valve replacement. The collagen content of myocardium specimens was obtained by hydroxyproline detection; the expression and distribution of bFGF and TGF- β_1 were examined by immunohistochemical stain. Imaging analysis was employed to measure the degree of immunohistochemical staining. **Results** RHD atrial myocardium showed high content of collagen. Both bFGF and TGF- β_1 were stained major in myocardium cells. Both of the collagen content and bFGF or TGF- β_1 expression in pAF group and cAF group were stronger than those in sinus rhythm group ($P < 0.01$); cAF group was stronger than that in pAF group ($P < 0.05$). The positive expression degree of bFGF and TGF- β_1 in RHD was increased and correlated positively with the content of myocardial collagen (bFGF: $r=0.52, P < 0.05$; TGF- β_1 : $r=0.70, P < 0.01$). **Conclusion** The expression of bFGF or TGF- β_1 in human atria may have correlation with the initiation or maintenance of AF, and may contribute as a molecular mechanism for the development of atrial fibrosis in the patients with RHD, which produces a structural basis for AF.

Key words: rheumatic heart disease; atrial fibrillation; basic fibroblast growth factor; transforming growth factor beta; fibrosis

心房颤动(atrial fibrillation, AF, 房颤)是临床最常见的心律失常,是许多疾病的临床表现之一,有很高的致病率和致死率^[1]。风湿性心脏病(风心病)是引起房颤的常见原因之一,房颤的发生和维持与心房重构有关。心房纤维化是房颤患者心房结构重构最突出的表现,目前被认为是发生房颤的结构基础,是房颤发生、维持的一个重要因素,但是房颤心房纤维化发生的机制还不清楚。研究表明,胶原代谢异常是心血管系统发生纤维化病变的重要原因,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和转化生长因子- β_1 (transforming growth factor-beta, TGF- β_1)是促进胶原合成的主要影响因素之一^[2]。本研究以临床风心病患者右心房肌为研究对象,用免疫组织化学方法检测 bFGF 和 TGF- β_1 在风心病右心房中的表达,并探讨其在风心病房颤心房纤维化胶原代谢中的作用及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 38 例风心病二尖瓣病接受开胸换瓣手术患者均为重庆医科大学附属第一医院住院患者,其中男 18 例,女 20 例,年龄 28~65 岁,平均(38.2±10.4)岁。分为 3 组,窦性心律组 8 例,阵发性房颤组 10 例,持续性房颤(房颤持续时间超过 6 个月)组 20 例。手术前常规行心电图、X 线胸片、超声心动图等检查。所有病例心功能均在 II~III 级(NYHA 标准),排除肿瘤、感染等疾病。临床资料见表 1。

1.2 样品采集及保存 所有患者于外科手术时,在体外循环插管前及右心房打开后立即取右心耳组织(大于 100mg),除去血液和脂肪组织后,分成二部分;一部分迅速置入液氮中保存,拟行胶原含量检测;一部分放入 4% 甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,拟行免疫组织化学检测。

1.3 检测方法

* 基金项目:重庆市卫生局自然科学基金资助项目(2007-2-041)。

1.3.1 心房组织胶原含量检测 采用羟脯氨酸检测试剂盒(由南京建成生物工程研究所提供),按操作说明进行检测。心肌组织漂洗后吸干水分称重,剪碎,超声波匀浆(冰水中进行),离心 10min 取上清液,37℃ 消化 3h,加入羟脯氨酸显色剂,用紫外分光光度计在波长 550nm 检测吸光度,推算每毫克心肌组织中羟脯氨酸的含量,各样品中羟脯氨酸的量乘以 7.46 即为胶原的含量($\mu\text{g}/\text{mg}$ 组织)。

1.3.2 心房组织 bFGF、TGF- β_1 表达及分布检测 用免疫组织化学染色法检测。所用兔抗人 bFGF、TGF- β_1 多克隆抗体、兔抗超敏 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒等均购自福州迈新生物技术开发有限公司。实验步骤按说明书进行,以枸橼酸盐溶液进行抗原热修复,DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。用试剂公司提供的已知乳腺癌阳性片作为阳性对照,PBS 代替一抗作为阴性对照。二者均以细胞质内颗粒状或弥漫棕黄染色为阳性细胞。每张切片在显微镜下随机选取 5 个高倍视野,输入自动图像分析仪(成都金盘多媒体图像处理系统),测定阳性积分光密度值和阳性信号面积,计算面积密度(阳性积分光密度值/阳性信号面积),所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.4 统计学方法 所有数据均用 SPSS12.0 统计软件包进行统计学处理,统计方法采用 *t* 检验、相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的临床特征 持续性房颤组左房内径(LAd)明显大于窦性心率组,差异有统计学意义($P < 0.05$),各组间年龄、性别、左室射血分数(LVEF)及瓣膜病变等差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2.2 各组心房胶原含量比较 用羟脯氨酸检测试剂盒检测各组心房组织中羟脯氨酸的量,折算出胶原的含量($\mu\text{g}/\text{mg}$ 组织),结果见表 2。表 2 显示与风心病窦性心率组相比,胶原含量在阵发性和持续性房颤组均显著增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与阵发性房颤组相比,持续性房颤组中胶原含量继续明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 各组心房 bFGF 及 TGF- β_1 的表达水平比较 bFGF 及 TGF- β_1 均弥漫表达于风心病心房心肌细胞质,部分呈颗粒状,少部分表达于细胞核。在风心病窦性心率组、风心病阵发性房颤组、风心病持续性房颤组,二者在心肌中表达阳性逐渐增强,见图 1。图像分析的半定量结果亦显示,与风心病窦性心率组相比,bFGF 和 TGF- β_1 表达在阵发性和持续性房颤组均显著增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与阵发性房颤组相比,持续性房颤组中这两种细胞因子的表达继续明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.4 bFGF 及 TGF- β_1 的表达与心房胶原含量的相关性分析 bFGF 和 TGF- β_1 与胶原含量进行相关分析,发现 bFGF 及 TGF- β_1 的表达强度与心房胶原含量均呈正相关,即随心房胶原含量的增加,bFGF($r = 0.52, P < 0.05$)、TGF- β_1 ($r = 0.70, P < 0.01$)表达增强,见表 2。

表 1 3 组患者的临床资料比较($\bar{x} \pm s$)

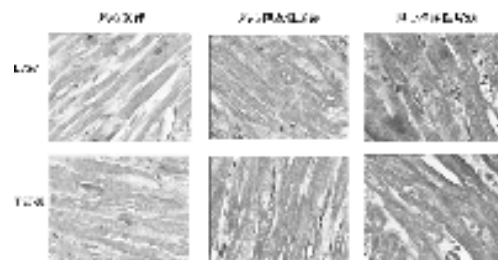
分组	样本量 (n)	年龄(岁)	LAd(mm)	LVEF(%)
风心病窦性心率	8	40.6 \pm 8.2	41.4 \pm 6.7	55.32 \pm 7.93
风心病阵发性房颤	10	42.5 \pm 8.9	50.2 \pm 8.5	53.76 \pm 8.21
风心病持续性房颤	20	43.2 \pm 9.4	58.4 \pm 9.6*	51.25 \pm 8.96

*: $P < 0.05$ 。

表 2 3 组患者心房组织 bFGF 及 TGF- β_1 表达量和胶原含量($\bar{x} \pm s$)

分组	样本量 (n)	bFGF	TGF- β_1	胶原 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
风心病窦性心率	8	46.2 \pm 9.5	48.5 \pm 10.1	174.59 \pm 9.53
风心病阵发性房颤	10	52.5 \pm 11.7*	56.4 \pm 13.9*	211.48 \pm 13.62#
风心病持续性房颤	20	65.6 \pm 14.5*#	73.8 \pm 16.6*#	245.62 \pm 17.81*#

*: $P < 0.05$; #: $P < 0.01$ 。



免疫组化染色,10 \times 40,棕黄色为阳性表达信号,可见二者均主要表达于心肌细胞的胞质。

图 1 风心病心房肌中 bFGF 和 TGF- β_1 表达情况

3 讨论

心房激动的均一传导不仅有赖于心肌细胞的同步活动,而且与激动传导过程中细胞外基质与心肌细胞的相互作用有关。胶原是最主要的细胞外基质蛋白,心脏间质成分约 85% 由 I 型胶原和 III 型胶原构成。心房间质纤维化干扰了心房局部兴奋或冲动的传导,引起不连续的冲动传导以及传导的空间分布离散,导致房内传导的不均一性,易于形成折返,有利于房颤的发作和维持,为房颤的发生提供了病理基础^[3]。

bFGF 是成纤维细胞生长因子家族中的一员,它能促进细胞分裂增殖、促血管生成、趋化刺激各类细胞增殖与迁移,因此在肿瘤的发生发展、动脉粥样硬化斑块形成、损伤组织修复等过程中发挥重要作用^[4]。TGF- β 被认为是关键的致纤维化因子,是迄今发现的最强的细胞外基质沉积促进剂。TGF- β 共有 5 种异构体,其中 TGF- β_1 在体细胞系中所占的比例最高,与纤维化关系最为密切,如在肝脏、胰腺、肺、肾脏等器官纤维化中作用明显^[5]。

心房纤维化发生的机制至今仍然不清楚。在心房纤维化过程中,细胞外基质改变不是受单一因素调控影响,而是受到多种因素调控。研究发现,胶原代谢异常与细胞因子、血管紧张素转化酶、基质金属蛋白酶等多种因素调控有关^[6]。细胞因子,特别是 bFGF 和 TGF- β_1 在纤维化性疾病的发生发展过程中起着重要作用。bFGF 及 TGF- β_1 在实验性肝硬化不同发展阶段,其表达逐渐增高,可作为评价肝纤维化严重程度的重要指标之一^[7]。在人类风心病心肌组织中表达情况的研究表明,TGF- β_1 是风心病心肌重构发生的重要细胞因子,而 bFGF 在心肌结构重塑中有一定的作用^[8]。TGF- β_1 在容量或压力超负荷致心室重构心肌中表达水平增高,可能是介导心肌肥厚发生的因素之一^[9]。

任崇雷等^[10]对风心病左室乳头肌进行免疫组化检测发现,bFGF 和 TGF- β_1 在风心病心肌中均表达增强,表达强度与心肌纤维化面积呈正相关,且主要定位于心肌细胞质中,说明 bFGF 和 TGF- β_1 在风心病心肌胶原增生中有协同上调作用。本研究发现 bFGF 和 TGF- β_1 在风心病右心(下转第 3114 页)

它们成活;与细胞因子协同,SDF-1 可增加外周血 CD34 和 CD34(high)CD38(low)细胞的扩增并增加它们的集落形成,提示 SDF-1 可促进骨髓干/祖细胞分裂增殖。但这些研究均未涉及衰老 EPCs。

本实验采用不同浓度的 K1 蛋白处理老龄小鼠骨髓源性 EPCs,发现 K1 可浓度依赖性增强老龄小鼠骨髓源性 EPCs 分裂增殖能力。表明 K1 可用于 EPCs 的体外扩增,并提示 K1 可能有促进老龄小鼠中新生血管生成和再内皮化损伤血管的作用。

本研究观察了月龄对小鼠外周血 K1 水平和 EPCs 的影响,并初步探讨了 K1 与 EPCs 数量和部分生物学功能之间的关系,为 K1 在干/祖细胞治疗领域中的应用提供了部分实验依据,这为保护内皮功能,预防和治疗 AS 提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Kuro OM, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing[J]. *Nature*, 1997, 390(1):45.
- [2] 陈剑飞,黄岚,晋军,等. 年龄对骨髓内皮祖细胞功能的影响及意义[J]. *四川医学*, 2006, 27(5):441.
- [3] Shimada T, Takeshita Y, Murohara T, Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse[J]. *Circulation*, 2004, 110(9):1148.
- [4] 崔斌,黄岚,耿召华,等. 人循环内皮祖细胞的分离培养和诱导分化[J]. *重庆医学*, 2006, 35(5):420.
- [5] Kuro M, Klotho and aging[J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)*, 2009, 1790(10):1049.
- [6] Xiao NM, Zhang YM, Zheng Q, et al. Klotho is a serum factor related to human aging[J]. *Chin Med J*, 2004, 117(5):742.
- [7] Tang JM, Wang JN, Kong X, et al. Vascular endothelial growth factor promotes cardiac stem cell migration via the PI3K/Akt pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(20):3521.
- [8] Dimitris Tousoulis, Ioannis Andreou, Charalambos Antoniadis, et al. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: Therapeutic implications for cardiovascular diseases[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 201(2):236.
- [9] Zhao XH, Huang L, Yin YG, et al. Estrogen induces endothelial progenitor cells proliferation and migration by estrogen receptors and PI3K-dependent pathways[J]. *Microvas Res*, 2008, 75(1):45.
- [10] Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival [J]. *Blood*, 2000, 95(3):756.

(收稿日期:2009-06-05)

(上接第 3110 页)

房组织中,主要表达于心肌细胞的胞质。在风心病窦性心率组、阵发性房颤组、持续性房颤组中,两种细胞因子的表达逐渐增强,差异有显著性。羟脯氨酸含量测定法检测发现,3 组心房组织胶原含量逐渐增加,差异有显著性;并且两种细胞因子的表达量与胶原含量均呈正相关。本研究表明风心病患者心房组织中 bFGF 和 TGF- β_1 表达上调可能是胶原合成增加致心房纤维化发生的分子机制之一,在风心病房颤的发生和维持中可能起重要作用。

本研究以临床风心病患者右心房肌为研究对象,用免疫组织化学方法检测了 bFGF 和 TGF- β_1 在风心病右心房中的表达,发现二者在风心病房颤胶原代谢及房颤持续中有重要作用,为进一步阐明风心病胶原增生的发生和调控机制,为预防和逆转风心病心肌胶原增生为基础的房颤心房纤维化提供了理论依据及新的思路,但房颤心房纤维化发生的具体分子机制及信号传导调控网络需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on [J]. *Nature*, 2002, 415(3):219.
- [2] 肖骅,雷寒. 转化生长因子- β_1 在心房颤动患者心房纤维化中的作用研究进展[J]. *重庆医学*, 2007, 36(20):2105.
- [3] Xu J, Cui G, Esmailian F, et al. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation[J]. *Circulation*, 2004, 109(3):363.
- [4] 白秉学,徐东刚,范明,等. 碱性成纤维细胞生长因子的研究进展[J]. *国外医学遗传学分册*, 2004, 27(4):197.
- [5] Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia[J]. *Immunology*, 2006, 118(1):10.
- [6] Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Cardin S, et al. Mechanisms of atrial remodeling and clinical relevance[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2005, 20(1):21.
- [7] 张愚,屈文东,黄华. bFGF 及 TGF- β_1 在实验性肝硬化中的免疫组化研究[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2005, 14(1):40.
- [8] 邓世雄,谭明红. TGF- β_1 及 bFGF 在扩张型心肌病中的表达及其意义研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2003, 28(1):62.
- [9] Lim H, Zhu YZ. Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(22):2584.
- [10] 任崇雷,刘维永,张近宝,等. 风湿性心脏病乳头肌中生长因子的表达及其意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2000, 4(5):274.

(收稿日期:2009-05-21 修回日期:2009-08-03)