

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.32.019

# 风湿性心瓣膜病心房颤动患者心房组织纤维化重构与 TGF- $\beta_1$ 表达的相关性研究\*

肖祥彬<sup>1</sup>, 刘丽<sup>1</sup>, 刘婷婷<sup>1</sup>, 李奎<sup>1</sup>, 雷开健<sup>2</sup>, 常光磊<sup>3</sup>

(1. 四川省宜宾市第二人民医院心血管内科 644000; 2. 四川省宜宾市第二人民医院肿瘤分子医学实验室 644000; 3. 重庆医科大学附属第一医院心血管内科 400016)

**[摘要]** **目的** 探讨风湿性心脏病(风心病)心房颤动(房颤)患者心房组织纤维化重构及其可能机制。**方法** 收集四川省宜宾市第二人民医院 2013 年 10 月至 2015 年 10 月风湿性心瓣膜病行二尖瓣置换术或先天性心脏病开胸修补术患者的临床资料和右心房组织标本,分为窦性心律组(RHD-SR 组)、阵发性房颤组(RHD-pAF 组)、持续性房颤组(RHD-cAF 组),以行先天性心脏病开胸修补术且为窦性心律组(CHD-SR 组)。普通光镜下观察各组患者心房组织结构,苦味酸天狼猩红染色偏振光显微镜分析各组 I、III 型胶原容积分数(CVF)及 I/III 型 CVF 比值,Western blot 及逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测各组 TGF- $\beta_1$  的表达。**结果** RHD-cAF 组患者左心房内径(LAd)明显大于 RHD-SR 组( $P < 0.05$ ),其余临床资料各组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。苦味酸天狼猩红染色提示胶原分布于心肌间质中, I、III 型 CVF 及其比值在 CHD-SR 组、RHD-SR 组、RHD-pAF 组和 RHD-cAF 组逐渐升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。TGF- $\beta_1$  蛋白和 mRNA 的表达在 CHD-SR 组、RHD-SR 组、RHD-pAF 组和 RHD-cAF 组逐渐增加。**结论** 心房组织纤维化重构是风湿性心瓣膜病患者房颤的重要机制,TGF- $\beta_1$  高表达可能参与心组织纤维化重构。

**[关键词]** 风湿性心瓣膜病;心房纤维化;心房颤动;转化生长因子  $\beta_1$ **[中图分类号]** R541.7+5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)32-4529-04

## Study on the correlation between atrial fibrosis remodeling and TGF- $\beta_1$ expression in patients with rheumatic heart\*

Xiao Xiangbin<sup>1</sup>, Liu Li<sup>1</sup>, Liu Tingting<sup>1</sup>, Li Kui<sup>1</sup>, Lei Kaijian<sup>2</sup>, Chang Guanglei<sup>3</sup>

(1. Department of Cardiology, the Second People's Hospital of Yibin City, Yibin, Sichuan 644000, China; 2. Cancer Molecular Medicine Laboratory, the Second People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan 644000, China; 3. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the remodeling of atrial fibrosis in rheumatic heart disease (RHD) patients with atrial fibrillation and its possible mechanism. **Methods** The clinical data and right atrial tissue specimens were obtained from patients who had undergone mitral valve replacement for rheumatic valvular disease or who had undergone thoracotomy for congenital heart disease in the Second People's Hospital of Yibin from Oct. 2013 to Oct. 2015. According to the heart rhythm characteristics, the specimens obtained from these patients were divided into sinus rhythm group (RHD-SR group, 18 cases), paroxysmal atrial fibrillation group (RHD-pAF group, 21 cases) and persistent atrial fibrillation group (RHD-cAF group, 42 cases). The right atrial tissue specimens obtained from those who had undergone thoracotomy for congenital heart disease with sinus rhythm were taken as the control group(CHD-SR group, 21 cases). The structures of atrial tissues were observed under a light microscope. The picric acid-sirius red staining was used to detect collagen volume fraction (CVF) of type I and III collagen and the type I/III collagen CVF ratio. The expressions of TGF- $\beta_1$  protein and mRNA were detected by using Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The left atrial diameter (LAd) in the RHD-cAF group was significantly higher than that in the RHD-SR group ( $P < 0.05$ ), but no statistically significant difference was found in other clinical data among these groups ( $P > 0.05$ ). The results of picric acid-sirius red staining demonstrated that the volume fraction of type I and type III collagen and the ratio of type I/III collagen were increased in CHD-SR group, RHD-SR group, RHD-pAF group and RHD-cAF group, gradually, there were statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). The expression levels of TGF- $\beta_1$  protein and mRNA were increased gradually in CHD-SR, RHD-SR, RHD-pAF and RHD-cAF groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Atrial fibrosis remodeling is an important mechanism of atrial fibrillation in patients with RHD. High expression of TGF- $\beta_1$  may be involved in the remodeling of atrial fibrosis.

**[Key words]** rheumatic heart disease; atrial fibrillation; fibrosis remodeling; transforming growth factor beta 1

心房颤动(房颤)是临床常见心律失常之一,是最严重的风心性心律失常,约占住院心律失常患者的 1/3。房颤是导致血栓栓塞,心力衰竭及生活质量低下等的重要原因,严重威胁患者的生命与健康,由于其发病机制尚未完全清楚,目前无特别有效的治疗手段。越来越多的研究表明心房组织纤维化重构是房颤发生、维持及进展的重要机制之一<sup>[1]</sup>。国内外基础和临床

研究提示,转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 信号转导机制与组织纤维化等密切相关<sup>[2]</sup>。本试验研究风湿性心瓣膜病房颤患者心房组织纤维化重构及 TGF- $\beta_1$  在蛋白和基因水平的表达情况,探索房颤患者心房组织纤维化重构的机制。

### 1 资料与方法

#### 1.1 一般资料

收集 2013 年 10 月至 2015 年 10 月四川省宜

\* 基金项目:宜宾市自然科学基金资助项目(2013SF013)。 作者简介:肖祥彬(1973—),副主任医师,博士,主要从事心律失常方面的研究。

滨市第二人民医院风湿性心瓣膜病行二尖瓣置换术或先天性心脏病开胸修补术患者的临床资料和右心房组织标本,有效病例共 102 例,所有符合入选条件的患者均签署知情同意书。按照心律特点分为分为窦性心律组(RHD-SR 组) 18 例,阵发性房颤组(RHD-pAF 组) 21 例,持续性房颤组(RHD-cAF 组) 42 例,以行先天性心脏病开胸修补术且为窦性心律组(CHD-SR 组) 21 例。排除标准:高龄患者(>65 岁);合并症状明显的呼吸道感染者;甲亢或甲低者;高血压 3 级者;冠状动脉血管三维成像或冠状动脉造影提示左前降支(LAD)、回旋支(LCX)或右冠状动脉(RCA)狭窄 70%以上者;扩张型心肌病者;慢性肺源性心脏病者;合并全身结缔组织疾病者。本研究经医院伦理委员会审批。

## 1.2 方法

**1.2.1 临床资料采集** 收集研究对象性别、年龄、发病史、家族史、体格检查、心电图、心脏彩超等资料。

**1.2.2 标本采集** 具有心胸外科手术指征并符合入选条件的患者在体外循环下行二尖瓣置换术或先天性心脏病开胸修补术。打开右心房后立即切去 300 mg 左右的右心耳组织,去掉脂肪组织,并用生理盐水洗净血迹后分成两部分。一部分锡纸包裹,液氮保存 30 min,然后转入 -80 °C 冰箱冷冻保存;另一部分 4% 甲醛溶液固定,乙醇脱水,石蜡包埋切片(5~6 μm),HE 或苦味酸天狼猩红染色,树胶封固。

**1.2.3 组织病理学检查** 石蜡切片 HE 染色,普通光镜下观察心房组织结构。

**1.2.4 苦味酸天狼猩红染色** 以 0.1 g 天狼猩红溶解于 100 mL 苦味酸饱和液配制成苦味酸天狼猩红染色液;石蜡切片脱蜡至水,于苦味酸天狼猩红染色液浸染 1 h,脱水及二甲苯透明,树胶封固。根据在偏振光显微镜下双折光强度和颜色可以鉴别 I 型和 III 型胶原:I 型胶原纤维呈很强的双折光性,排列紧密,粗大,呈亮红色或桔黄色;III 型胶原呈弱折光性,排列成网状,纤细,呈绿色。在镜下不含血管区域随机选取 6 个视野,Image Pro Plus 4.0 病理图像分析软件计算两种胶原容积百分

比,并分别求其平均值,即胶原容积分数(CVF),进一步计算 I 型/III 型 CVF 比。

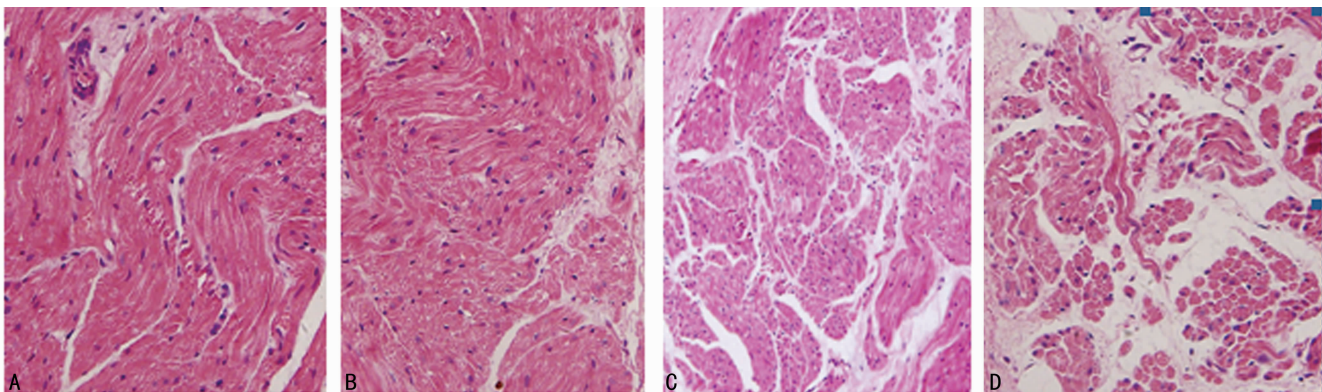
**1.2.5 Western blot 检测 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达** 磷酸化蛋白裂解液提取蛋白并测定蛋白样品浓度;配制 SDS-PAGE 凝胶并取适量蛋白样品,经 SDS-PAGE 缓冲液 100 °C 预热 5 min 蛋白充分变性。上样与电泳分离:冷却至室温并将蛋白样品上样到 SDS-PAGE 凝胶加样孔内,设置电压 100 V,电泳时间 100 min。转膜:在冰浴中使用 PVDF 膜(FFP36/FFP39),设置转膜电流 400 mA,转膜时间为 30 min。漂洗与封闭:蛋白膜 Western 洗涤液(P0023C)漂洗 2 min,吸尽洗涤液,并加入封闭液,置于摇床上缓慢摇动,室温封闭 60 min。一抗孵育:按照操作说明步骤,Western 一抗稀释液(P0023A)稀释一抗,4 °C 摇床缓慢摇动孵育 1 h,Western 洗涤液(P0023C)缓慢摇动洗膜 3 次。二抗孵育:按比例使用 Western 二抗稀释液(P0023D)稀释辣根过氧化物酶标记的二抗,4 °C 缓慢摇动孵育 1 h,Western 洗涤液(P0023C)缓慢摇动洗涤 3 次。DAB 显色。Bio-Rad 凝胶成像系统分析;β-actin 为参考条带,测定条带吸光面积积分比值,计算目的条带/β-actin 条带值,并对目的蛋白进行分析。

**1.2.6 逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 的表达** 总 RNA 提取:心房组织 200 mg,1 mL Triol,0.2 mL 氯仿,室温振荡离心,吸取上层液,分别加入异丙醇、75%乙醇振荡离心弃上清液,DEPC 沉淀,-80 °C 冻存。逆转录合成 cDNA:反应体系[10×RT buffer 1 μL,MgCl<sub>2</sub> 2 μL,Taq mix DNA polymerase 3 μL,RNase Free 双蒸超纯水 4 μL,dNTP Mixture (10 mm/mol) 1 μL,RNase 抑制剂 0.3 μL,Random Premiers 0.5 μL]混匀快速离心 1 次。PCR 反应:RT 产物 5 μL 加入 dd H<sub>2</sub>O 至总体积 25 μL。反应条件:94 °C 2 min,1 个循环;94 °C 40 s,55 °C 40 s,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 5 min,1 个循环。PCR 产物 -20 °C 冻存。取产物 10 μL,Buffer 2 μL,2% 琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad 凝胶成像系统分析,测定目的片段与 β-actin 吸光度比值。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

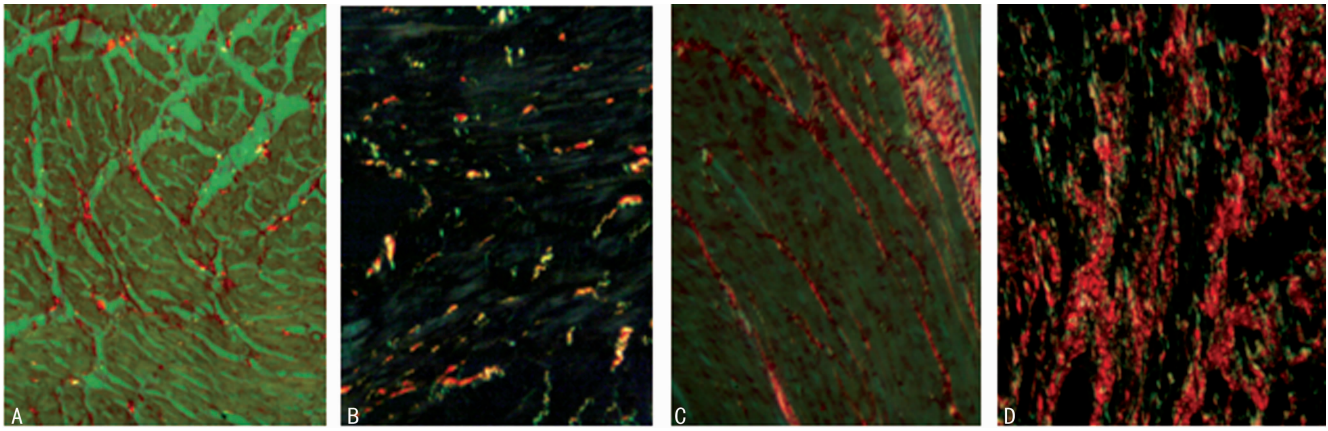
引物	引物序列	基因库代码	产物大小(bp)	温度(°C)
TGF-β <sub>1</sub>	5'-ACA ATG GTG ATG ATG CTC CT-3'	NM_000660	480	53
	5'-ATC CCA GAA TCA ATA ATT CC-3'			
β-actin	5'-GAG GGA AAT CGT GCG TGA C-3'	NM_031144	720	—
	5'-GGA GCC AGG GCA GTA ATC G-3'			

—:此项无数据



A:CHD-SR 组;B:RHD-SR 组;C:RHD-pAF 组;D:RHD-cAF 组

图 1 各组心房肌组织结构变化(HE×400)



A:CHD-SR 组;B:RHD-SR 组;C:RHD-pAF 组;D:RHD-cAF 组

图 2 各组心房肌 Cx43 比较 (苦味酸天狼猩红染色×100)

1.3 统计学处理 采用 SPSS V19.0 数据统计软件分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析进行两组间及多组间比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料分析 RHD-cAF 组患者左心房内径(LAd)明显大于 RHD-SR 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。年龄、性别、左室射血分数(LVEF)等在各组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组患者的临床资料比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	年龄(岁)	LAd(mm)	LVEF(%)
CHD-SR 组	21	16.2±8.8	43.2±6.0	51.89±8.21
RHD-SR 组	18	35.1±7.2	45.3±7.1	54.55±8.29
RHD-pAF 组	21	36.2±8.2	51.8±8.1	53.98±7.89
RHD-cAF 组	42	37.5±7.8	56.7±8.2 <sup>a</sup>	52.33±8.34

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与 RHD-SR 组比较

2.2 组织病理学检查 普通光镜下,HE 染色显示在 CHD-SR 组、RHD-SR 组、RHD-pAF 组、RHD-cAF 组,心肌细胞周围间质纤维化逐渐增多,心肌细胞数量逐渐减少,大小逐渐增粗,排列紊乱程度逐渐加重,见图 1。

表 3 各组心房肌 Cx43 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	I型	III型	I型/III型
CHD-SR 组	21	4.30±0.54	1.42±0.22	3.21±0.24
RHD-SR 组	18	5.45±1.02	1.75±0.33	3.62±0.31
RHD-pAF 组	21	13.11±1.04 <sup>a</sup>	3.14±0.18 <sup>a</sup>	4.98±0.25 <sup>a</sup>
RHD-cAF 组	42	20.06±1.52 <sup>a</sup>	4.32±0.36 <sup>a</sup>	6.88±0.45 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与 CHD-SR 组比较

表 4 各组心房肌 TGF-β<sub>1</sub> 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	mRNA	蛋白质
CHD-SR 组	21	0.72±0.08	0.63±0.45
RHD-SR 组	18	0.84±0.05	0.76±0.22
RHD-pAF 组	21	1.88±0.06 <sup>a</sup>	1.12±0.44 <sup>a</sup>
RHD-cAF 组	42	2.81±0.20 <sup>a</sup>	2.88±0.22 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与 CHD-SR 组比较

2.3 各组心房肌 Cx43 比较 苦味酸天狼猩红染色提示胶原分布于心肌间质中。I、III 型 Cx43 及其比值在 CHD-SR 组、RHD-SR 组、RHD-pAF 组和 RHD-cAF 组逐渐升高,差异有统

计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 3、图 2。

2.4 各组 TGF-β<sub>1</sub> 的表达比较 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白和 mRNA 的表达在 CHD-SR 组、RHD-SR 组、RHD-pAF 组和 RHD-cAF 组逐渐增加,见表 4、图 3、4。

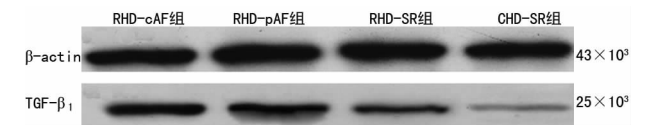
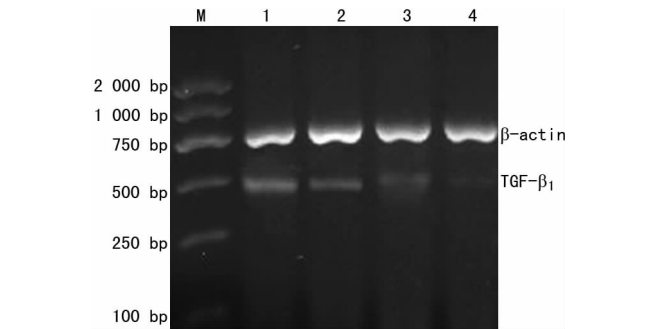


图 3 各组心肌组织中 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达



M: marker; 1: RHD-cAF 组; 2: RHD-pAF 组; 3: RHD-SR 组; 4: CHD-SR 组

图 4 各组心肌组织中 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 表达

3 讨论

房颤是心血管领域重大难题之一,探索其有效的治疗手段是该领域热门课题,这一问题关键在于对房颤发生机制的明确。1997 年法国科学家 Haissaguerre 提出肺静脉肌袖电位是房颤驱动和触发因素,并提出环肺静脉电隔离可终止房颤。近 20 年,国内外心脏电生理学学者对房颤触发、维持机制及其临床问题的研究已形成热点。房颤发生与维持机制存在多子波折返学说、心房离子通道电学重构学说及心房组织结构重构学说。近年大量研究关注心房组织的结构重构,许多研究提示结构重构在房颤发生与维持机制的作用大于电学重构<sup>[3-4]</sup>。

TGF-β 是一类多功能的细胞因子,在结构上存在 3 种不同的亚型(TGF-β<sub>1</sub>、β<sub>2</sub> 和 β<sub>3</sub>),其中 TGF-β<sub>1</sub> 生物学功能最重要,TGF-β<sub>1</sub> 介导的细胞内 Smads 信号转导通路与组织结构纤维化密切相关<sup>[5]</sup>。动物实验表明,如果诱导结构正常心脏 TGF-β<sub>1</sub> 过度表达也可导致心肌组织纤维化。

本研究发现,房颤组心肌间质纤维化明显增加,心房细胞异常增大增粗且断裂,大小不均、排列紊乱、细胞核增大。进一步研究发现,I 型和 III 型 Cx43 及其比值较窦性心律组明显升

高,提示房颤心房肌成纤维细胞增殖活跃,胶原蛋白合成与分泌增加。心房组织纤维化过程既是心房损伤修复过程,也是心房组织适应新的生理病理状态的调节过程,这一过程涉及心房成纤维细胞和肌成纤维细胞肥大增生,合成分泌纤维网状胶原增加。国外大量研究也表明,心房组织纤维化是心房结构重构的重要机制<sup>[6-8]</sup>,本研究结果与国外报道一致。

既往国内外研究发现,TGF- $\beta_1$  细胞内信号转导与心房组织纤维化重构密切相关<sup>[9-11]</sup>。TGF- $\beta_1$  能诱导人心房成纤维细胞 I 型胶原表达增加,动物实验发现,TGF- $\beta_1$  高表达导致小鼠心房间质纤维化加重。细胞实验发现,TGF- $\beta_1$  诱导心房成纤维细胞 I 型胶原表达增加,同时使 P-Smad2、Smad4 mRNA 和蛋白水平表达增加。本研究发现,TGF- $\beta_1$  无论在蛋白质翻译和基因转录水平的表达在 RHD-pAF 组明显增加,在 RHD-cAF 组更为显著。

本研究提示,风心病房颤发生机制与心房组织纤维化重构密切相关,I 型/III 型胶原网络重构在这一过程中发挥重要作用。综合国内外研究发现,TGF- $\beta_1$  过度表达可能是心房组织纤维化网络重构的分子机制之一,但 TGF- $\beta_1$  通过何种信号转导途径或如何介导心房间质纤维化的具体分子机制有待进一步基础与临床研究。

#### 参考文献

- [1] Adeniran I, Maciver DH, Garratt CJ, et al. Effects of persistent atrial Fibrillation-Induced electrical remodeling on atrial Electro-Mechanics-insights from a 3D model of the human atria[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0142397.
- [2] Jiao L, Yajuan Y, Chee YN, et al. Association of plasma transforming growth factor- $\beta_1$  levels and the risk of atrial fibrillation: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155275.
- [3] Lévy S, Sbragia P. Remodelling in atrial fibrillation[J]. Arch Mal Coeur Vaiss, 2005, 98(4): 308-312.
- [4] Allesie M, Ausma J, Electrical SU. Contractile and struc-

tural remodeling during atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res, 2002, 54(2): 230-246.

- [5] Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling[J]. Cardiovasc Res, 2007, 74(2): 184-195.
- [6] Boldt A, Wetzel U, Lauschke J, et al. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease[J]. Heart, 2004, 90(4): 400-405.
- [7] Paulus K, Gregory YL, Isabelle C, et al. Comprehensive risk reduction in patients with atrial fibrillation: emerging diagnostic and therapeutic options-a report from the 3rd Atrial Fibrillation Competence NETwork/European Heart Rhythm Association consensus conference[J]. Europace, 2012, 14(1): 8-27.
- [8] Trayanova NA. Mathematical approaches to understanding and imaging atrial fibrillation significance for mechanisms and management[J]. Circ Res, 2014, 114(9): 1516-1531.
- [9] Rahmutula D, Marcus GM, Wilson EE, et al. Molecular basis of selective atrial fibrosis due to overexpression of transforming growth factor-1[J]. Cardiovasc Res, 2013, 99(4): 769-779.
- [10] Cao HL, Zhou Q, Lan RF, et al. A functional polymorphism C-509T in TGF beta-1 promoter contributes to susceptibility and prognosis of lone atrial fibrillation in Chinese population[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e112912.
- [11] Laura D, Jiawei J, Weijin S, et al. Mkk4 is a negative regulator of the transforming growth factor beta 1 signaling associated with atrial remodeling and arrhythmogenesis with age[J]. J Am Heart Assoc, 2014, 3(2): e000340.

(收稿日期:2017-04-28 修回日期:2017-07-16)

(上接第 4528 页)

- [11] 王贺,周亮,石敏,等. 不育男性精子形态与体外受精妊娠结局的相关性研究[J]. 中国男科学杂志, 2012, 26(1): 23-26.
- [12] Li B, Ma YF, Huang JL, et al. Probing the effect of human normal sperm morphology rate on cycle outcomes and assisted reproductive methods selection [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113392.
- [13] 徐艳霞. 男性精液参数与体外受精-胚胎移植妊娠结局的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(11): 1505-1507.
- [14] 李晓晔,白晓红,宋学茹,等. 精子形态对体外受精胚胎移植妊娠结局的影响[J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38(1): 72-75.
- [15] Kashanian JA, Brannigan RE. Sperm morphology and reproductive outcomes: a perplexing relationship[J]. Fertil Steril, 2014, 102(6): 1561-1562.
- [16] 方丛,庄广伦,张敏芳,等. 精子形态对体外受精的影响作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2001, 22(6): 367-369.
- [17] Cheng WX, Agbo C, Dahan MH. Comparison of pregnan-

cy rates in pre-treatment male infertility and low total motile sperm count at insemination[J]. Arch Gynecol Obstet, 2015, 293(1): 211-217.

- [18] Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, et al. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion [J]. J Assist Reprod Genet, 2009, 26(11/12): 591-596.
- [19] Sivanarayana T, Krishna CR, Prakash GJ, et al. CASA derived human sperm abnormalities: correlation with chromatin packing and DNA fragmentation[J]. J Assist Reprod Genet, 2012, 29(12): 1327-1334.
- [20] Palomo MJ, Mogas T, Izquierdo D, et al. The influence of sperm concentration, length of the gamete co-culture and the evolution of different sperm parameters on the in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes[J]. Zygote, 2010, 18(4): 345-355.

(收稿日期:2017-04-09 修回日期:2017-06-13)