

风心病慢性房颤患者左右心房组织纤维化程度及 TGF- β_1 的 mRNA 表达差异的研究

刘玉学^{1,2}, 王欣², 王立清², 王巍², 柳磊²,
李源², 元东¹, 刘立群¹

(1. 潍坊医学院附属医院 胸心外科, 山东 潍坊, 261031; 2. 中国医学科学院 北京协和医学院 心血管病研究所 阜外心血管病医院 心外科, 北京, 100037)

摘要: 目的 探讨风湿性心脏病(风心病)伴慢性心房颤动(房颤)患者左、右心房组织纤维化程度及转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 的 mRNA 表达是否存在差异。方法 选取接受瓣膜置换的风心病慢性房颤患者 40 例, 风心病窦性心律患者 10 例。术中分别收取左、右心耳组织各约 100 mg。通过苦味酸天狼猩红染色法对心房组织中 I、III 型胶原容量分数 (CVF-I, CVF-III) 进行半定量分析; 应用半定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术, 检测心房组织中 TGF- β_1 的 mRNA 表达水平。结果 ① 与风心病窦性心律组(窦律组)相比, 风心病房颤组(房颤组)患者左房内径显著扩大 ($P < 0.05$), 左、右心房组织 TGF- β_1 的 mRNA 表达、CVF-I 及 CVF-I / CVF-III 比值明显增加 ($P < 0.05$), CVF-III 变化不明显 ($P > 0.05$)。② 窦律组患者左心房与右心房 TGF- β_1 的 mRNA 表达、CVF-I 及 CVF-I / CVF-III 比值无明显区别 ($P > 0.05$); 而房颤组患者左心房较右心房组织中 TGF- β_1 的 mRNA 表达、CVF-I 及 CVF-I / CVF-III 比值明显增加 ($P < 0.05$)。③ 相关分析发现无论在左心房还是右心房, TGF- β_1 的 mRNA 表达水平与心房组织 CVF-I 呈正相关(左: $r = 0.786$, $P < 0.05$; 右: $r = 0.858$, $P < 0.05$)。结论 在风心病慢性房颤过程中, 左心房组织纤维化程度及 TGF- β_1 的 mRNA 表达较右心房更加明显, 心房组织 TGF- β_1 的 mRNA 表达增高可能是心房纤维化的分子机制之一。

关键词: 心房颤动; 转化生长因子 β_1 ; 胶原

中图分类号: R 541.7 文献标识码: A 文章编号: 1672-2353(2010)05-0041-04

Differentiation in extent of fibrosis and TGF- β_1 mRNA expression between left and right atria in patients with chronic atrial fibrillation and rheumatic valve disease

LIU Yu-xue^{1,2}, WANG Xin², WANG Li-qing², WANG Wei²,
LIU Lei², LI Yuan², YUAN Dong¹, LIU Li-qun¹

(1. Department of Thoracic Cardiovascular Surgery, Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261031; 2. Department of Cardiovascular Surgery, Cardiovascular Institute & Fu-Wai Cardiovascular Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing, 100037)

ABSTRACT: Objectives To investigate the different levels of the atrial fibrosis and mRNA expression of transforming growth factor beta-1 (TGF- β_1) in the left and right atria in patients with rheumatic valvular disease (RHD) and chronic atrial fibrillation (CAF). **Methods** 40 patients with RHD and CAF (CAF group) and another 10 patients with RHD and sinus rhythm (SR) (SR group) were sampled in this study. The left and right atrial appendages were obtained during heart valvular surgery. Expressions of TGF- β_1 mRNA were detected by semiquantitative RT-PCR technique. CVF-I and CVF-III were observed by sirius red staining. **Results** ① Compared to SR group,

收稿日期: 2009-04-13

基金项目: 美敦力厄尔巴肯 2008 基金资助项目

通讯作者: 王欣(1971-), 男, 医学博士, 副主任医师, E-mail: fuwaiwangxin@188.com

the patients in CAF group had larger left atrial diameter ($P < 0.05$). In both left and right atria the CVF-I, CVF-I / CVF-III and mRNA levels of TGF- β_1 expressions increased ($P < 0.05$) compared to SR group. However, the difference of CVF-III was not significant ($P > 0.05$). ② There were no significant differences in the CVF-I, CVF-I / CVF-III and mRNA levels of TGF- β_1 expressions between the left and right atria of SR group ($P > 0.05$). In CAF group, the CVF-I, CVF-I / CVF-III and mRNA levels of TGF- β_1 expressions in the left atrium was higher than that in the right atrium ($P < 0.05$). ③ The TGF- β_1 mRNA expression has a correlation with the contents of CVF-I (Left: $r = 0.786$, $P < 0.05$; Right: $r = 0.858$, $P < 0.05$). **Conclusions** TGF- β_1 mRNA expression in the atrium might be the molecular basis of atrial interstitial fibrosis in patients with RHD and CAF. Moreover, during CAF development, there is a difference in the extent of atrial fibrosis between the left and right atria.

KEY WORDS: atrial fibrillation; transforming growth factor beta-1; collagen

研究证实,心房间质纤维化在房颤的发生和维持中起着重要的作用^[1-3]。转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 是启动与促进心房间质胶原合成代谢的关键细胞因子,在心房纤维化过程中起到重要的调控作用^[4,6]。但这些研究的取材大都来源于单侧心房,左、右心房的解剖结构和生理功能不同,房颤时左右心房激动发生模式和维持方式也不同^[7]。研究左右心房在参与房颤过程中的差别有助于进一步揭示房颤的本质。本研究拟通过观察风湿性心脏病慢性房颤患者左右心房肌组织中 I、III 型胶原含量及 TGF- β_1 的 mRNA 表达水平,探讨风心病慢性房颤患者左、右心房组织纤维化程度及转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 的 mRNA 表达是否存在差异。

1 材料与方 法

1.1 临床资料

选取 2008 年 1 月~2008 年 9 月在阜外心血管病医院接受瓣膜置换+房颤外科射频消融治疗的风湿性心脏病伴慢性房颤患者 40 例,同时期行瓣膜手术的风湿性心脏病窦性心律患者 10 例作为对照组。详细收集入选患者的术前临床资料,

TGFB1 (277bp) F 5'-TGGCGATACCTCAGCAACC-3',
R 3'-GATGCTGGGCCCTCTCCAG-5';
 β -actin (111bp) F5'-CTCCATCATGAAGTGTGACGTT-3'
R 5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTGTCAG-3'

引物由北京奥科生物技术服务有限公司合成。每个标本各取 1 μ L cDNA 进行目标基因和内参基因的 PCR 反应。反应体系: 1 μ L cDNA, 0.5 μ L Taq 酶, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, 10 pmol/L 上、下游引物各 1

包括一般资料、心电图、超声心动图检查等。入选病例均除外合并病态窦房结综合症、左房血栓、高血压病、甲状腺功能亢进症、慢性肺源性心脏病、冠心病、心肌病、肾脏疾病和二次接受心脏手术者。所有入选病例均在术前经患者和家属同意,并签订知情同意书。

1.2 标本采集与保存

体外循环开始前收取左、右心耳标本各约 100 mg(约 1 cm \times 1 cm \times 2 cm)以生理盐水冲洗并除去脂肪后分为 2 块,1 块迅速置入液氮冻存用于检测 mRNA;一块立刻置 4% 甲醛溶液中固定,4 $^{\circ}$ C 保存,标本脱水后,用石蜡包埋,制备切片待用苦味酸天狼猩红染色做胶原容量分析。

1.3 TGF- β_1 的 mRNA 表达水平测定

用 RT-PCR 法检测,参照 RT-PCR 试剂盒 (TAKARA 公司)操作说明进行。采用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司)抽提心房组织总 RNA,用紫外分光光度计 (BECKMANDU640)测得各 RNA 样本 260 nm/280 nm 光密度的比值为 1.8~2.0。取 1 μ g 总 RNA 逆转录成 cDNA。检索基因库,查找目标基因和内参 β -actin cDNA 序列,设计并合成引物。引物设计:

μ L, 加入去离子水至总体积 25 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,随后进入 PCR 循环,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。阴性对照:反应体系中未加入模板总 RNA,代之以去离子水,其他如反应体

系、反应条件等无改变。相同反应体系中 β -actin 和目标基因各取 PCR 产物 3 μ L, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色, 应用 Image Master VDS-CL 对凝胶成像, 计算 PCR 产物电泳条带灰度积分, 并以 β -actin 的灰度积分进行标准校正。目标基因 PCR 产物的相对量 = 目标基因电泳条带灰度积分 / β -actin 电泳条带的灰度积分。

1.4 胶原容量分析

常规石蜡包埋切片(厚度为 0.5 μ m), 二甲苯脱蜡入水, 0.1% 苦味酸天狼猩红染色 70 min, 流水冲洗 4 min, 蒸馏水冲洗 1 min, 各级浓度乙醇脱水, 二甲苯透明、中性树脂封片; 染色后的心房组织切片置于 olympusBH2 偏振光显微镜下观察。将偏光显微镜调节到正交偏光观察状态, 可以看到 I 型胶原纤维呈红色或明黄色, III 型胶原纤维呈绿色。每张切片避开血管区域随机选取 4 个视野, 在 40 \times 物镜、1 \times 拍摄镜下采用 JVC1481 显微镜用摄像机对视野中图像进行采集。用 Image Pro Plus 4.0 图像分析系统对心房肌组织中 I、III 型胶原组成含量进行半定量分析(胶原容量分数 = 胶原纤维面积 / 视野总面积)。

1.5 统计学处理

数据处理用 SPSS 13.0 统计软件包处理, 所有计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较使用 t 检验, 非参数统计用秩和检验, 计数资料用 χ^2 检验; 变量间相互关系采用直线相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者临床特征见表 1

房颤组左心房内径较窦律组明显增加 ($P < 0.05$)。两组间其他临床资料如年龄、左室射血分数、左室舒张末期径、心功能 NYHA 分级、房颤病史时间等均无明显差异。

表 1 2 组患者一般临床特征比较

	房颤组 (n = 12)	窦性心律组 (n = 10)
年龄(岁)	52.17 \pm 12.31	55.80 \pm 4.02
性别(男/女)	4/8	3/7
房颤时间(月)	30.50 \pm 23.51	-
左房内径(mm)	58.25 \pm 4.59	40.0 \pm 5.17*
左室内径(mm)	49.75 \pm 5.17	51.89 \pm 6.6
2 右室内径(mm)	20.83 \pm 2.92	18.56 \pm 3.88
左室射血分数(%)	60.58 \pm 5.63	60.67 \pm 6.16
心功能分级(NYHA)	2.50 \pm 0.52	2.33 \pm 0.50
瓣膜手术方式		
二尖瓣置换/双瓣置换	8/4	7/3
合并三尖瓣成形	5/7	3/7

与窦性心律组相比, * $P < 0.05$

CVF-I、CVF-III 及 CVF-I / CVF-III 比值, 见表 2。与窦律组相比, 房颤组患者左、右心房组织 CVF-I 及 CVF-I / CVF-III 比值均显著增加 ($P < 0.05$); 房颤组患者中左心房较右心房组织中 CVF-I 及 CVF-I / CVF-III 比值明显增加而 ($P < 0.05$); 窦律组患者左心房与右心房 CVF-I 及 CVF-I / CVF-III 无明显区别 ($P > 0.05$); CVF-III 在窦律组和房颤组之间, 两组的左右心房之间均无明显变化 ($P > 0.05$)。

2.2 TGF- β_1 的 mRNA 表达, 见表 2

与窦律组相比, 房颤组患者左、右心房组织的 TGF- β_1 的 mRNA 均显著增加 ($P < 0.05$); 房颤组患者中左心房较右心房组织中 TGF- β_1 的 mRNA 比值明显增加 ($P < 0.05$); 窦律组患者左心房与右心房 TGF- β_1 的 mRNA 无明显区别。

相关分析发现无论左心房还是右心房, TGF- β_1 的 mRNA 表达水平与心房组织 CVF-I 表达呈正相关(左: $r = 0.786, P < 0.05$; 右: $r = 0.858, P < 0.05$)。

3 讨论

心房间质纤维化为房颤的发生提供了病理基础, 即使是临床上诊断为孤立性房颤的患者的活

表 2 两组心房组织胶原容量分数及 TGF- β_1 的 mRNA 表达结果比较

	CVF-I (%)	CVF-III (%)	CVF-I / CVF-III	TGF- β_1 的 mRNA 表达 (%)
窦律组 左房	7.61 \pm 1.52	6.41 \pm 1.44	1.12 \pm 0.32	22.0 \pm 14.8
右房	6.29 \pm 0.85	5.09 \pm 1.15	1.23 \pm 0.59	19.4 \pm 20.6
房颤组 左房	18.21 \pm 2.61***	6.51 \pm 2.1	2.79 \pm 1.66***	59.8 \pm 22.4***
右房	10.02 \pm 1.54***	5.13 \pm 1.08	1.95 \pm 0.26***	39.8 \pm 26.9***

与窦性心律组相比, * $P < 0.05$; 房颤组内左右心房之间比较, ** $P < 0.05$

检标本中也观察到心房纤维化的存在, 并且心房颤动的发生随着纤维化程度的增加而增加^[8-9]。心房间质成分约 85% 由 I 型和 III 型胶原构成, I

型胶原合成增多被认为是间质纤维化的主要因素, 本研究结果显示, 与窦律组比较房颤组患者左、右心房肌组织中的 CVF-I、CVF-I / CVF-III

均明显增加, CVF-Ⅲ无明显变化。这与其他学者的研究结果类似,表明心房间质纤维化主要表现为 I 型胶原的合成增多,造成心房肌细胞外基质总胶原含量的增加,各型胶原比例发生变化,导致心房间质纤维化,从而促使房颤的发生和维持^[3,10-11]。

目前针对心房纤维化的研究结果大多来源于对单侧心房肌的研究,关于左、右心房对比的研究较少。本研究经过对左、右心房的对比分析后发现,风心病窦性心律患者左右心房中 CVF-I、CVF-Ⅲ、CVF-I / CVF-Ⅲ 的差异无统计学意义;在风心病慢性房颤患者,左房中的 CVF-I、CVF-I / CVF-Ⅲ 明显高于右心房, CVF-Ⅲ 无明显变化。这个结果表明在风心病慢性房颤的过程中,心房纤维化的程度存在心腔差异,左心房的纤维化更加明显。目前已有研究表明^[7, 12],房颤过程中左右心房的颤动频率不一致,存在着频率梯度,这是因为房颤的起源部位不一致和激动模式不一致造成的。房颤过程中,左心房为电激动主动心房,右心房为被动心房,左心房可检测到快速反复的激动波,而右心房则为紊乱的颤动波和传导阻滞区。左右心房纤维化程度的差异可能正是在风心病慢性房颤过程中左、右心房不同生理状态一种作用结果。

TGF- β_1 作为最重要的促纤维性细胞因子之一,在心房肌间质纤维化及房颤发生、维持中起到重要调控作用。TGF- β_1 的 mRNA 增加能提高心房组织局部 TGF- β_1 表达增加,从而增加心肌成纤维细胞 I 型胶原在这些细胞中的合成,促进心房肌细胞间质纤维化的进展^[13]。本研究结果显示无论左右心房组织 TGF- β_1 的 mRNA 表达在房颤组均比窦性心律组明显增加,窦律患者中左右心房之间 TGF- β_1 的 mRNA 表达无统计学意义,在房颤患者中左心房 TGF- β_1 的 mRNA 表达较右心房明显增加,与 CVF-I 在各心腔的变化结果一致。另外相关分析发现无论在左右心房均 TGF- β_1 的 mRNA 表达水平与 CVF-I 呈明显正相关,这两点很好地说明 TGF- β_1 是心房纤维化的重要分子机制,在心房纤维化过程中发挥重要作用。

综上所述,在风心病慢性房颤的过程中,左、右心房间质纤维化均是以 TGF- β_1 的 mRNA 转录为分子基础,作为电生理激动的主要部位,左心房

组织纤维化程度及 TGF- β_1 的 mRNA 表达较右心房更加明显。

参考文献

- [1] Frustaci, A, Chimenti C, Bellocci F, et al. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation [J]. *Circulation*, 1997, 96(4): 1180.
- [2] Everett, TH 4th, Li H, Mangrum J M, et al. Electrical, morphological, and ultrastructural remodeling and reverse remodeling in a canine model of chronic atrial fibrillation[J]. *Circulation*, 2000. 102(12): 1454.
- [3] Allesie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation[J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 54(2): 230.
- [4] Weber K T. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1989, 13(7): 1637.
- [5] Lijnen P J, Petrov V V and Fagard R H. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab*, 2000, 71(1-2): 418.
- [6] Gramley F, Lorenzen J, Koellensperger E, et al. Atrial fibrosis and atrial fibrillation: The role of the TGF-beta(1) signaling pathway. *Int J Cardiol*, 2009.
- [7] Mansour, M, Mandapati R, Berenfeld O, et al. Left-to-right gradient of atrial frequencies during acute atrial fibrillation in the isolated sheep heart[J]. *Circulation*, 2001, 103(21): 2631.
- [8] Goette, A, Juenemann G, Peters B, et al. Determinants and consequences of atrial fibrosis in patients undergoing open heart surgery[J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 54(2): 390.
- [9] Jayachandran J V, Sih H J, Winkle W, et al. Atrial fibrillation produced by prolonged rapid atrial pacing is associated with heterogeneous changes in atrial sympathetic innervation [J]. *Circulation*, 2000, 101(10): 1185.
- [10] Xu J, Cui J, Esmailian F, et al. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation. *Circulation*, 2004, 109(3): 363.
- [11] On Y K, Jeon E S, Lee S Y, et al. Plasma transforming growth factor beta1 as a biochemical marker to predict the persistence of atrial fibrillation after the surgical maze procedure[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 137(6): 1515.
- [12] Wu T J, Doshi R N, Huang H L, et al. Simultaneous biatrial computerized mapping during permanent atrial fibrillation in patients with organic heart disease[J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2002, 13(6): 571.
- [13] Khan R, and 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.