文章编号:1000-5404(2008)12-1193-04

论著

转化生长因子β1在风湿性心脏病心房颤动患者心房纤维化中的作用

肖 骅,雷 寒,王 曦,胥雪莲,游小均 (重庆医科大学附属第一医院心血管内科,重庆 400016)

摘 要:目的 观察转化生长因子β1(TGF-β1)在风湿性心脏病(风心病)心房颤动(房颤)患者心房组织中的表达情况,探讨其在风心病房颤心房纤维化中的作用及意义。**方法** 38例风心病接受换瓣手术者于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20例。对各组心房组织,应用羟脯氨酸含量测定法及Masson染色检测胶原含量及分布;应用免疫组化技术检测TGF-β1蛋白表达及分布;应用RT-PCR检测TGF-β1 mRNA水平,应用Western blot检测TGF-β1的蛋白表达。**结果** TGF-β1主要表达在心肌细胞的细胞质;与风心病窦性心律组相比,TGF-β1的mRNA和蛋白表达及胶原含量在阵发性房颤组($P<0.05$)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TGF-β1 mRNA和蛋白表达及胶原含量继续明显增加($P<0.05$)。相关分析发现TGF-β1的mRNA、蛋白表达程度与心房胶原含量均呈正相关($r=0.37$, $P<0.05$; $r=0.45$, $P<0.01$)。**结论** 风心病患者心房组织中TGF-β1的mRNA和蛋白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起一定的作用。

关键词: 风湿性心脏病;心房颤动;转化生长因子β;纤维化
中图法分类号: R341;R394.3;R541.202 **文献标识码:** A

Expression and significance of TGF-β1 in atrial tissue of atrial fibrillation patients with rheumatic heart disease

XIAO Hua, LEI Han, WANG Xi, XU Xue-lian, YOU Xiao-jun (Department of Cardiovascular Diseases, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the role of TGF-β1 in the atrial myocardial fibrosis in the patient with rheumatic heart disease (RHD). **Methods** Of 38 RHD patients, 8 were with sinus rhythm, 10 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 and distribution of myocardium specimens were obtained by hydroxyproline detection and Masson staining. Expression and distribution of TGF-β1 were examined by immunohistochemical staining. The mRNA content of TGF-β1 was measured by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Proteins of TGF-β1 was measured by Western blotting. **Results** RHD atrial myocardium had high content of collagen. TGF-β1 was distributed mainly in myocardium cells. Both of the collagen content and mRNA or protein expression of TGF-β1 in pAF group ($P<0.05$) and cAF group ($P<0.01$) was stronger than that in sinus rhythm group; cAF group was stronger than that in pAF group ($P<0.05$). The mRNA and protein expression of TGF-β1 in RHD was increased and correlated positively with the content of myocardial collagen. **Conclusion** The mRNA and protein expression of TGF-β1 in human atria may have correlation with the initiation or maintenance of AF, and contribute for the development of atrial fibrosis in patients with RHD, which produces a structural basis for AF.

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

心房颤动(atrial fibrillation, AF,简称房颤)是临床最常见的心律失常,是许多疾病的临床表现之一,发病率和致死率较高[1]。风湿性心脏病(简称风心病)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

基金项目: 重庆市卫生局项目(2007-2-041)
Supported by the Funds of Chongqing Health Bureau (2007-2-041)
作者简介: 肖 骅,女,重庆市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事风心病基础与临床方面的研究。电话:(023)89012011, E-mail: yychxh@163.com
通信作者: 雷 寒,电话:(023)89012011,E-mail: cqlhlq@163.com
收稿日期: 2007-10-20;**修回日期:** 2008-01-10

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,转化生长因子-β1(transforming growth factor-beta, TGF-β1)是促进胶原合成的主要影响因素之一。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、RT-PCR、Western blot 检测 TGF-β1 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 材料与方法

1.1 患者资料

38 例风湿性心脏病二尖瓣病变接受开胸换瓣手术患者均为重庆医科大学附属第一医院 2006 年 3 月至 2007 年 6 月住院患者,其中男性 18 例,女性 20 例,年龄 28 ~ 59(41.2 ± 9.1)岁。分为 3 组,窦性心律组 8 例,阵发性房颤组 10 例,持续性房颤组 20 例。对照为同期先天性心脏病(先心病)窦性心律接受开胸手术患者共 10 例。手术前常规行心电图、X 线胸片、超声心动图等检查。所有病例心功能在Ⅱ ~ Ⅲ级(NYHA 标准),并且近 6 个月内均未服用血管紧张素转换酶抑制剂类药物,剔除伴有高血压病、冠状动脉粥样硬化性心脏病、甲状腺功能亢进、心肌病、慢性肺原性心脏病、恶性肿瘤和年龄超过 60 岁的患者。

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(>100 mg),除去血液和脂肪组织后,分成两部分,一部分迅速置入液氮中保存拟行胶原含量、RT-PCR、Western blot 等检测,一部分放入 4% 甲醛溶液固定石蜡包埋切片,拟行免疫组织化学及 Masson 染色检测。

1.3 检测方法

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),按试剂盒说明操作说明进行检测。心肌组织漂洗后吸干水分称量,加入水解液,沸水浴水解 20 min,调 pH 值,加入活性炭,离心取上清 1 ml,加入羟脯氨酸显色剂,用紫外分光光度计在波长 550 nm 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(μg/mg)。

1.3.2 心房组织胶原分布检测 用 Masson 染色法检测。所用 Weigent 苏木精液、1% 盐酸、1% 醋酸水溶液、丽春红一品红溶液等均自行配制。染色步骤参照文献[2]进行。结果判断:胶原纤维呈蓝色,肌肉组织呈红色。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),测定胶原容积分数(collage volume fraction, CVF)(胶原面积/视野面积)。

1.3.3 心房组织 TGF-β1 表达及分布检测 用免疫组织化学染色法检测。按 S-P 试剂盒(由福州迈新生物技术开发有限公司提供)说明书进行,以枸橼酸盐溶液进行抗原热修复,DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片。用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。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,计算面密度(阳性积分光密度值/阳性信号面积)。

1.3.4 心房组织 TGF-β1 mRNA 水平检测 用 RT-PCR 法检测。参照 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)操作说明进行。①一步法提取组织总 RNA。将 RNA 溶于 50 μl 去核酸酶的水中,-20 ℃冻存备用。取 4.2 μl 总 RNA 稀释后,紫外分光光度计测 $D(260)/D(280)$,标本均为 1.8 ~ 2.0。②取 1 μg 总 RNA 逆转录成 cDNA;③PCR 扩增目的条带:目标基因 TGF-β1 引物(5′-ACTATCGACATGGAGCTGGT-3′, 5′-GGAGCTGAAGCAATAGTTGG-3′)和内参照基因 GAPDH 引物(5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′, 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′)(上海英骏公司合成);反应体系(50 μl):cDNA 2 μl, 25 mmol/L $MgCl_2$ 5 μl, 10 ×Buffer 5 μl, 10 mmol/ L dNTP 1 μl, *Taq* 酶 2.5 U, 目标基因和内参照基因的上下游引物各 10 pmol/L,加去离子水至 50 μl;反应条件:94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 30 s, 53 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 60 s; 35 个循环后 72 ℃再延伸 5 min 后 4 ℃保存;阴性对照:以去离子水代替模板总 RNA ,其他如反应体系、反应条件等无改变。④计算相对含量:1.5% 琼脂糖, 电压 5 V/cm,电泳时间 60 min。同一反应体系中 GAPDH 和 TGF-β1 共扩增产物电泳后在 ImageMaster VDS2CL 凝胶成像系统(Amersham Pharmacia Biotech 公司)上扫描, 测目标基因产物 761 bp 和内参条带产物 450 bp 的光密度值, 用两者的光密度比值代表目的基因的相对表达含量。

1.3.5 心房组织 TGF-β1 蛋白水平检测 用 Western blot 法检测。①提取总蛋白:参照蛋白提取试剂盒(TaKaRa 公司)操作说明进行,Bradford 方法测定蛋白浓度。②SDS-PAGE 电泳、转膜、显色:将各组细胞样品的蛋白浓度调整一致后, 各取 20 μl 上样进行 SDS-PAGE,电泳完毕后,将凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜上, PVDF 膜以含 2% 脱脂奶粉的 TTBS 室温封闭 2 h,加 TGF-β1 多克隆抗体(工作浓度 1∶300), 4℃孵育过夜, 鼠抗兔二抗(1∶1 000)室温孵育 2 h,DAB 显色。于自动电泳凝胶成像分析系统(Chemi Imager 5500, AlPha InnCh, USA)下成像,FluorChen V.2.0 系统采集扩增条带的整合光密度值, 作为条带的强度指标。以 β-actin 为阳性对照,测 25×10^3 的目标条带和 43×10^3 的 β-actin 的光密度值, 用两者的光密度比值代表目的基因的蛋白相对表达含量。重复试验 3 次。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验和相关性分析。

2 结果

2.1 患者的临床特征

风心病持续性房颤组左房内径(LAd)明显大于风心病窦性心律组($P<0.05$),各组间年龄、性别、左室射血分数(LVEF)及瓣膜病变等差异无显著性($P>0.05$),见表 1。

2.2 各组心房胶原含量比较

根据各组心房组织中检测出的羟脯氨酸的量,折算出胶原的含量(μg/mg)结果见表 1。胶原分布 Masson 染色可见蓝色胶原纤维主要分布在心肌间质中。先心病窦性心律对照组、风

心病窦性心律组、风心病阵发性房颤组、风心病持续性房颤组,在各组心肌中表达阳性逐渐增强,见图 1。

胶原的含量及胶原染色图像半定量分析显示,与风心病窦性心律组相比,胶原含量在阵发性房颤组($P<0.05$)和持续性房颤组均显著增加($P<0.01$);与阵发性房颤组相比,持续性房颤组中胶原含量继续明显增加($P<0.05$);与先心病窦性心律组相比,风心病窦性心律组胶原含量也明显增加($P<0.05$)。

2.3　各组心房 TGF-β1 的表达水平比较

2.3.1　免疫组化检测结果　　TGF-β1 弥漫表达于心房心肌细胞质,部分呈颗粒状,少部分表达于细胞核;在风心病窦性心律组、风心病阵发性房颤组、风心病持续性房颤组,TGF-β1 在心肌中表达阳性逐渐增强,见图 2;图像分析的半定量结果显示,与风心病窦性心律组相比,TGF-β1 表达在阵发性房颤组($P<0.05$)和持续性房颤组均显著增加($P<0.01$);与阵发性房颤组相比,持续性房颤组中的表达继续明显增加($P<0.05$);与先心病窦性心律组相比,风心病窦律组的表达明显增加($P<0.05$),见表 1。

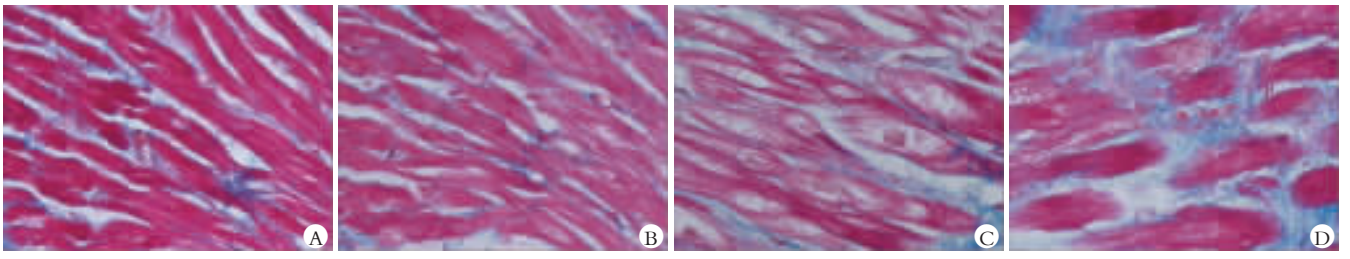
2.3.2　mRNA 含量 RT-PCR 检测结果　　在风心病窦性心律组、风心病阵发性房颤组、风心病持续性房颤组,TGF-β1 在心肌中 mRNA 水平逐渐增加,见图 3;图像半定量分析显示,与风心病窦性心律组相比,TGF-β1 mRNA 水平在阵发性房颤组($P<0.05$)和持续性房颤组均显著增加($P<0.01$);与阵发性房颤组相比,持续性房颤组中 mRNA 水平继续明显增加($P<0.05$),见图 3。

2.3.3　蛋白含量 Western blot 检测结果　　在风心病窦性心律组、风心病阵发性房颤组、风心病持续性房颤组,25×10^3 的 TGF-β1 在心肌中蛋白表达水平逐渐增加,见图 4。图像半定量分析(与 43×10^3 的 β-actin 比较)显示,与风心病窦性心律组相比,TGF-β1 蛋白表达水平在阵发性房颤组($P<0.05$)和持续性房颤组均显著增加($P<0.01$);与阵发性房颤组相比,持续性房颤组中蛋白表达水平继续明显增加($P<0.05$),见图 4。

表 1　各组患者的临床资料及检测结果比较　($\bar{x}\pm s$)

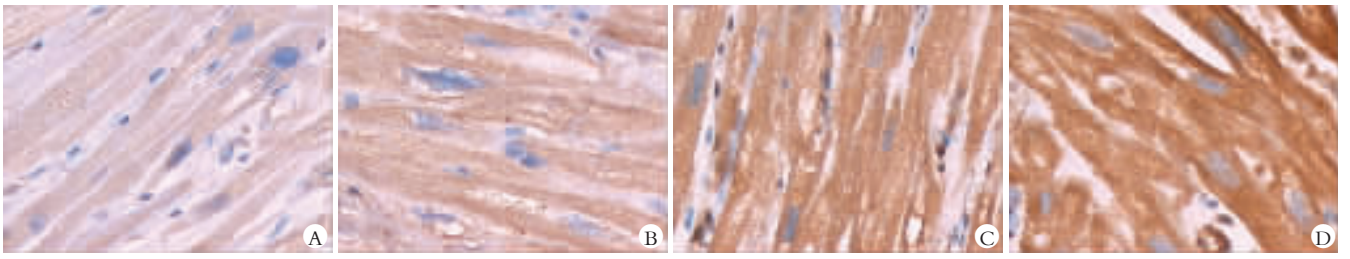
组别	n	年龄(岁)	LAd(mm)	LVEF(%)	TGF-β1 表达量	胶原含量(μg/mg)	胶原分布 CVF(%)
先心病窦律	10	18.2±7.8	42.6 ±6.2	53.32 ±8.72	35.2±8.3	150.16±25.42	18.0±4.3
风心病窦律	8	40.6±8.2	46.6 ±6.8	55.32 ±7.93	42.2±9.5	174.59±29.53	22.2±5.7
风心病阵发性房颤	10	41.5±8.9	52.2 ±8.5	53.76 ±8.21	51.8±11.7[a]	203.48±33.62[a]	29.8±8.5[a]
风心病持续性房颤	20	42.2±9.4	55.4 ±9.4[a]	51.25 ±8.96	61.2±14.5[bc]	229.62±41.81[bc]	37.2±9.8[bc]

a: $P<0.05$,与风心病窦性心律比较; b: $P<0.01$,与风心病窦性心律比较; c: $P<0.05$,与风心病阵发性房颤比较



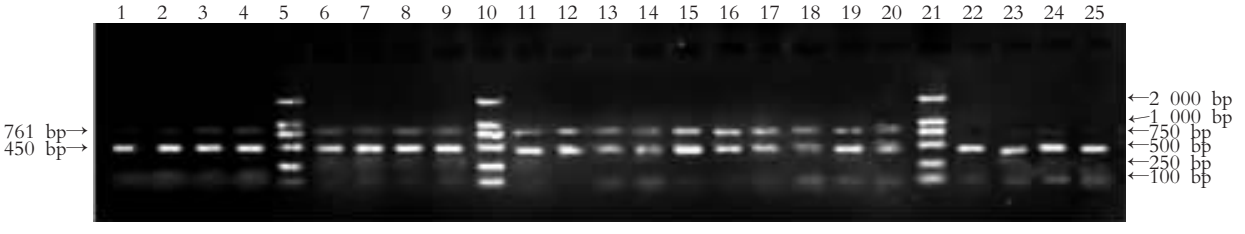
A:先心病窦性心律; B:风心病窦性心律; C: 风心病阵发性房颤; D: 风心病持续性房颤

图 1　心肌胶原染色检测　(Masson 染色 ×400)



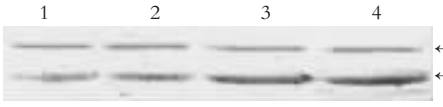
A:先心病窦性心律; B:风心病窦性心律; C: 风心病阵发性房颤; D: 风心病持续性房颤

图 2　心肌 TGF-β1 免疫组化检测　(S-P ×400)



5,10,21: DNA 标准(DL 2000); 1－4: 风心病窦性心律; 11－20:风心病持续性房颤; 6－9: 风心病阵发性房颤; 22－25:先心病窦性心律

图 3　风心病心房肌中 TGF-β1 mRNA RT-PCR 检测



1:先心病窦性心律; 2:风心病窦性心律; 3: 风心病阵发性房颤; 4: 风心病持续性房颤

图4 风心病心房肌中 TGF-β1 Western blot 检测

2.4 TGF-β1 的表达与心房胶原含量的相关性分析

TGF-β1 与胶原含量进行相关分析,发现 TGF-β1 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,TGF-β1 的 mRNA ($r=0.37$, $P<0.05$) 和蛋白表达 ($r=0.45$, $P<0.01$)表达增强。见表 1。

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,有利于房颤的发生和维持,为房颤的发生提供了病理基础[3]。本研究通过羟脯氨酸含量测定法及 Masson 染色检测,发现在风心病窦性心律组、阵发性房颤组、持续性房颤组中,心房组织胶原含量逐渐增加,差异有显著性,进一步提示房颤的发生和维持与心房纤维化胶原代谢有关。

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,而是受到多种因素调控。研究表明,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[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-β1 在体细胞系中所占的比例最高,与纤维化关系最为密切,在纤维化性疾病的发生、发展过程中起着重要作用,如在肝纤维化、胰腺纤维化、肺纤维化、肾纤维化等器官纤维化中作用明显[5]。TGF-β1 能呈剂量依赖性地诱导肾小管上皮细胞表达结缔组织生长因子,从而促进肾间质纤维化[6]。

研究表明,TGF-β1 在心脏纤维化中起重要作用。TGF-β1 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[7]。TGF-β1 转基因造成的选择性心房纤维化小鼠模型中,在没有离子重构、没有心房扩大和心力衰竭的血流动力学改变情况下,单纯的心房间质纤维化足以促进房颤发生[8]。Nakajima 等[9]发现,持续表达 TGF-β1 的小鼠可选择性的引起心房而不是心室纤维化,提示心房成纤维细胞可能对 TGF-β1 的刺激更敏感。表明 TGF-β1 在心房纤维化中起重要作用。

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、RT-PCR、Western blot 等方法,从 mRNA 水平、蛋白水平检测了 TGF-β1 在风心病右心房中的表达,发现其主要表达在心肌细胞中,弥漫表达于细胞质。TGF-β1 mRNA 水平、蛋白水平在风心病窦性心律组、阵发性房颤组、持续性房颤组中表达逐渐增强,差异有显著性;羟脯氨酸含量测定法及 Masson 染色检测,发现 3 组心房组织胶原含量逐渐增加,差异有显著性;并且 TGF-β1 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 TGF-β1 表达上调可能是胶原合成增加导致心房纤维化发生的分子机制之一,在风心病心房胶原代谢及房颤的发生和维持中起一定作用。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以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。推测通过抑制 TGF-β1 基因表达,控制和逆转心房间质胶原网的重建,有可能为防治心房纤维化,临床防治风心病患者房颤的发生提供了新的途径。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(6868): 219-226.

[2] 张 威, 朱小兰, 王朝杰, 等. 改良 Masson 染色法在肾穿刺活检组织染色中的应用[J]. 中华病理学杂志, 2005, 34(6): 375-376.

[3] Xu J, Cui G, Esmailian F, *et al*. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation[J]. Circulation, 2004, 109(3): 363-368.

[4] 肖 骅, 雷 寒. 心房颤动患者心房纤维化研究进展[J]. 心血管病学进展, 2007, 28(5): 693-696.

[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): 10-24.

[6] 卓文磊, 张 璟, 杨惠标, 等. 转化生长因子 β1 诱导人肾小管上皮细胞表达结缔组织生长因子[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(19): 1717-1719.

[7] Lim H, Zhu Y Z. Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(22): 2584-2596.

[8] Verheule S, Sato T, Everett T 4th. , *et al*. Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1 [J]. Circ Res, 2004, 94(11): 1458-1465.

[9] Nakajima H, Nakajima H O, Salcher O, *et al*. Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-beta (1) transgene in the heart[J]. Circ Res, 2000, 86(5): 571-579.

(编辑 邓强庭)