DOI:10.16016/j.1000-5404.201407101

论著

氧化应激标志物在房颤患者心房结构重构中的变化及意义

易 茜,蹇 朝,李 勇,肖颖彬,陈 林,唐富琴,马瑞彦 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军心血管外科研究中心)

[摘要] **目的** 通过分析多种氧化应激标志物在血清及组织中的动态变化,观察其在心房结构重构中的表达,探讨房颤(atrial fibrillation,AF)的发生机制。**方法** 选择我中心44例2014年2-5月行单纯二尖瓣置换手术的风湿性心脏病患者,根据病史及术前动态心电图记录分为2组:持续性房颤(AF)组26例,窦性心律(SR)组18例。术中取部分右心耳组织,行Masson染色观察纤维化情况,采用免疫组化、免疫荧光染色法观察右心耳组织NOX2蛋白表达,用ELISA法测定右心耳组织中丙二醛(malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、活性氧(reactive oxygen species,ROS)、晚期氧化蛋白产物(advanced oxidative protein products,AOPP)浓度以及血清中ROS、AOPP含量。**结果** AF组心房组织中MDA[(15.41±1.69)μmol/mg]、SOD[(13.32±1.25)μmol/mg]、ROS[(18.53±3.47)μmol/mg]、AOPP[(29.69±2.09)μmol/mg]含量与SR组MDA[(11.46±1.83)μmol/mg]、SOD[(10.65±1.15)μmol/mg]、ROS[(13.65±3.29)μmol/mg]、AOPP[(21.94±1.94)μmol/mg]比较差异有统计学意义($P<0.05$),AF组血清中ROS含量[(34.6±2.61)μmol/L]明显高于SR组[(17.8±1.03)μmol/L],2组患者血清中AOPP含量差异无统计学意义($P>0.05$)。与SR组相比,AF组右心耳组织胶原纤维增生明显,NOX2蛋白表达呈强阳性。**结论** 房颤时发生以间质纤维化改变的心房结构重构,氧化应激参与了房颤发生和结构重构过程。

[关键词] 房颤;心房重构;氧化应激;NADPH氧化酶;晚期氧化蛋白产物
[中图法分类号] R362; R364.33; R541.75 [文献标志码] A

Changes and significance of oxidative stress biomarkers in atrial structural remodeling in atrial fibrillation patients

Yi Qian, Jian Zhao, Li Yong, Xiao Yingbin, Chen Lin, Tang Fuqin, Ma Ruiyan (Center of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the levels and the dynamic expression levels of several oxidative stress biomarkers in the serum and cardiac tissues during atrial remodeling in atrial fibrillation patients in order to investigate the underlying mechanism of atrial fibrillation development. **Methods** A total of 44 patients with rheumatic heart disease undergoing mitral valve replacement in our center from February to May 2014 were enrolled in the present study. The patients were divided into 2 groups according to their history and preoperative electrocardiography (ECG) reports, that is persistent atrial fibrillation group (AF, $n=26$) and sinus rhythm group (SR, $n=18$). Right auricle tissue samples were obtained during the operation, and then stained by Masson trichrome staining to examine the degree of fibrosis. The protein expression of NOX2 was measured by immunohistochemical assay and laser confocal microscopy. Oxidative stress was estimated by the

[基金项目] 国家自然科学基金(81471408)
[通信作者] 马瑞彦,E-mail:maruiyan2008@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141208.0930.002.html(2014-12-08)

amount of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), reactive oxygen species (ROS), advanced oxidative protein products (AOPP) in the right auricle, and by the serum levels of ROS and AOPP by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Significant differences were seen in the amount of MDA (15.41 ± 1.69 *vs* 11.46 ± 1.83 mol/mg), SOD (13.32 ± 1.25 *vs* 10.65 ± 1.15 mol/mg), ROS (18.53 ± 3.47 *vs* 13.65 ± 3.29 mol/mg), AOPP (29.69 ± 2.09 *vs* 21.94 ± 1.94 mol/mg) between the AF group and SR group ($P<0.05$). The serum ROS level was higher in the AF group than SR group (34.6 ± 2.61 *vs* 17.8 ± 1.03 mol/L), but there was no obvious difference in that of AOPP ($P>0.05$). Compared to the SR group, the AF group had markedly more collagenous fibers and stronger NOX2 protein expression in the right auricle. **Conclusion** Myocardial interstitial fibrosis is the main characteristics of atrial structural remodeling in atrial fibrillation, and oxidative stress is involved in the process of atrial fibrillation and structural remodeling.

[**Key words**] atrial fibrillation; atrial remodeling; oxidative stress; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; advanced oxidative protein products

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81471408). Corresponding author: Ma Ruiyan, E-mail: maruiyan2008@hotmail.com

心房纤颤(atrial fibrillation,AF)是临床上最常见的持续性心律失常,其发病率随着年龄的增长而呈明显的上升趋势,成为威胁公众健康的主要问题[1-2]。房颤的发生及维持是心房的电生理重构、结构重构和自主神经重构等多因素相互作用的结果。近年来,心房结构重构一直是研究的热点[3],其突出表现即心房间质纤维化。心房间质纤维化导致心房肌内出现差异性传导,从而形成多个微折返环路,增加房颤易感性。在最近的多项研究中均发现氧化应激在房颤的发生及维持过程中起重要作用[4]。

氧化应激(oxidative stress)是病理状态时机体抗氧化与促氧化失衡导致的细胞损伤。活性氧(reactive oxygen species,ROS)是细胞氧化应激的产物,由多种酶系统生成,包括黄嘌呤氧化酶、线粒体酶、一氧化氮合酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸[还原型辅酶Ⅱ,Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate(NADPH)]氧化酶等[5],心肌细胞内ROS的产生主要来自膜结合的NADPH氧化酶的催化作用。NADPH氧化酶依赖性的活性氧可作为第二信使参与细胞内多种信号传导途径,如心肌细胞的肥大、凋亡和纤维化[6],但其是否参与房颤致心房重构这一过程,尚不清楚。晚期氧化蛋白产物(advanced oxidative protein products,AOPP)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、ROS、NOX2是体内氧化应激的标志物,NOX2是NADPH氧化酶在心肌细胞中表达的主要催化亚基。本研究拟通过观察这些标志物在房颤患者右房组织及血清中的表达,探讨氧化应激在房颤心房重构中的作用和意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集我科2014年2-5月入院,经常规心脏超声检查诊断为单纯二尖瓣病变的风湿性心脏病患者44例,术前均行常规心电图、24 h动态心电图、胸部X线片等检查,根据病史及术前心电图记录分为2组。持续性房颤(AF)组26例,定义为房颤持续时间>6个月,年龄(53.30±8.81)岁;窦性心率(SR)组18例,定义为未发生过房颤,年龄(50.37±13.03)岁。排除标准:①合并糖尿病、冠心病、肝肾功能不全、甲状腺功能亢进及减弱、心肌病、恶性肿瘤等;②术前6个月内服用过任何类型的ACEI和ARB类药物;③三尖瓣反流中度及以上;④房颤持续时间<6个月;⑤年龄<18岁或>70岁。

1.2 标本收集

经本院医学伦理委员会同意,在患者及家属知情同意的基础上,在心脏手术体外循环开始前,切取部分右心耳组织,剪去血块和脂肪组织后置入-80 ℃冰箱待测;并于每组标本中抽取5例置于4%多聚甲醛溶液中固定24~36 h,常规石蜡包埋,连续切片(6~8张,片厚5 μm),用于Masson染色及免疫组化、免疫荧光染色。

1.3 主要试剂和仪器

MDA、SOD、ROS、AOPP ELISA试剂盒均由武汉博士德公司提供,兔抗人NOX2抗体(武汉博士德公司,BA2811),生物素标记山羊抗兔IgG(武汉博士德公司,BA1003),Masson染色试剂盒(武汉博士德公司),多功能酶标仪(Thermo公司),激光共聚焦显微镜(Leica LAS

AF Lite),倒置荧光显微镜(Leica DMI300A)。

1.4 方法

1.4.1 右心耳组织胶原纤维染色 右心耳组织石蜡切片行 Masson 胶原纤维染色,光镜下观察染色后胶原纤维的含量及分布,每张切片在无血管区随机选取 5 个不重复的视野(×20)进行观察。

1.4.2 免疫组化及免疫荧光技术观察 NOX2 蛋白在右房组织的表达 将 4% 多聚甲醛固定的右心耳组织进行石蜡包埋,参考 S-P 免疫组织化学染色试剂盒说明书检测 NOX2 蛋白的表达:将石蜡切片脱水处理后,滴加 5% BSA 封闭液,37 ℃ 孵育 30 min,滴加兔抗人 NOX2 多克隆抗体,4 ℃孵育过夜,37 ℃水浴 5 min,PBS 清洗 3 次,滴加 1∶100 生物素化山羊抗兔 IgG,37 ℃ 孵育 30 min,PBS 清洗 3 次后 DAB 显色,苏木精轻度复染。脱水,透明,封片,显微镜观察并拍照。图像资料导入 Image Pro Plus 6.0 软件进行分析[7],将每张切片随机选取 5 个视野,阳性表达判断标准为:胞内出现棕褐色的颗粒或斑块,面积较大,颜色较深,并采用细胞内颗粒或斑块进行定量分析(积分光密度值)。参考免疫荧光染色试剂盒说明书检测 NOX2 在右房组织的表达:石蜡切片滴加 PBS 洗净,固定,柠檬酸高温修复,山羊血清封闭,滴加兔抗人 NOX2 多克隆抗体,4 ℃ 孵育过夜。再滴加适当 1∶200 稀释的荧光标记山羊抗兔 IgG,37 ℃孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次后晾干,滴加抗荧光淬灭剂,甘油封片。将染好的切片置于激光扫描共聚焦显微镜载物台上,观察并进行图像采集。

1.4.3 氧化应激标志物的检测 通过 MDA、SOD、ROS、AOPP 对右心耳组织及血清中氧化应激水平的测定,均采用酶联免疫吸附法(ELISA 法) 测定,具体实验步骤均按试剂盒说明书进行。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,组间比较采用独立样本 t 检验或 χ^2 检验。

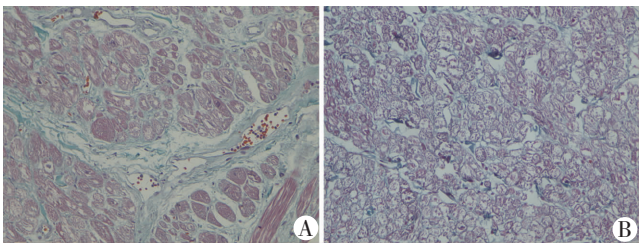
2 结果

2.1 2 组患者基线特征

AF 组 26 例患者中男性 7 例,女性 19 例;SR 组 18 例患者中男性 6 例,女性 12 例。AF 组患者左房内径(LA)大于 SR 组($P < 0.05$),AF 组患者射血分数(EF)低于 SR 组($P < 0.05$),其余年龄、体质量、右房大小(RA)、右室大小(RV)、左室大小(LV)差异均无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

2.2 2 组患者心房纤维化观察

右心耳组织经 Masson 胶原纤维特殊染色后,胶原纤维蓝染,包绕于红色的心肌纤维周围。AF 组患者胶原纤维含量丰富,被大量条索状纤维束分隔,排列紊乱(图 1A),SR 组患者胶原纤维含量少,分布稀疏,心肌呈条状排列(图 1B)。



A:AF 组;B:SR 组

图 1 倒置荧光显微镜观察 2 组二尖瓣病变患者右心耳组织纤维化情况 (Masson 染色 ×200)

2.3 NOX2 蛋白在 2 组患者心房组织内的表达

免疫组化结果可见 2 组患者右心耳组织心肌均有 NOX2 表达,图 2 中蓝色颗粒为细胞核染色,细胞质内的棕褐色颗粒为 NOX2 蛋白表达。AF 组可见细胞质内有大量棕褐色斑块,排列密集,颜色较深,免疫组化染色呈强阳性表达。SR 组可见细胞质内棕褐色颗粒颜色较浅,排列稀疏。AF 组阳性细胞面积(32 005.72 ± 8 885.11)与 SR 组(6 438.32 ± 2 849.63)比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。AF 组积分光密度值(4 705 559 ± 1 225 040)与 SR 组(1 213 255 ± 421 952)比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。免疫荧光结果判断:AF 组细胞质内有颗粒状绿荧光表达,而 SR 组几乎无阳性表达。

2.4 2 组患者心房组织匀浆中 ROS、MDA、SOD、AOPP 及血清中 ROS、AOPP 的表达水平

AF 组右心耳组织内 ROS、SOD、MDA、AOPP 的表达明显高于 SR 组($P < 0.01$),AF 组血清中 ROS 含量明显高于 SR 组($P < 0.05$),2 组患者血清中 AOPP 的含量差异无统计学意义($P > 0.05$,表 2)。

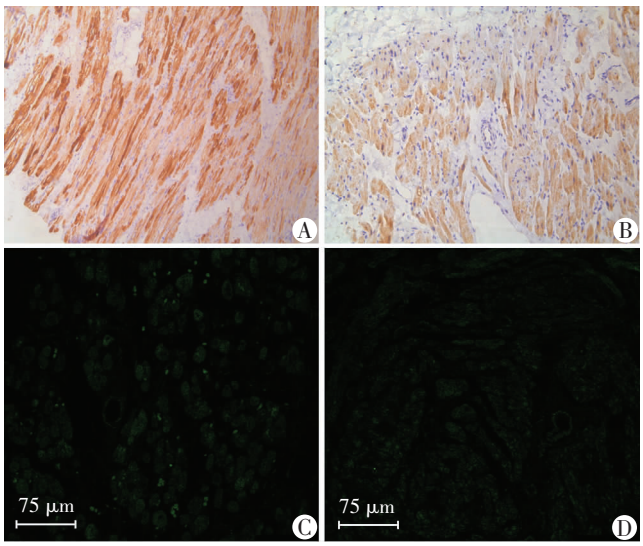
表 1 2 组二尖瓣病变患者术前基线特征的比较

组别	n	年龄(岁,$\bar{x} \pm s$)	体质量(kg,$\bar{x} \pm s$)	LA(mm,$\bar{x} \pm s$)	RA(mm,$\bar{x} \pm s$)	LV(mm,$\bar{x} \pm s$)	RV(mm,$\bar{x} \pm s$)	EF[($\bar{x} \pm s$)%]	合并左房血栓(例)	合并脑梗(例)
AF 组	26	53.30 ± 8.81	58.00 ± 11.71	55.57 ± 10.76	38.46 ± 3.98	47.61 ± 7.08	36.69 ± 4.31	63.12 ± 7.66	11	2
SR 组	18	50.37 ± 13.03	53.22 ± 6.80	43.94 ± 6.21	36.61 ± 6.74	47.56 ± 6.91	35.94 ± 6.40	67.83 ± 4.62	0	0
P 值		0.578	0.127	0.00	0.259	0.977	0.645	0.016	–	–

表2 氧化应激标志物在2组二尖瓣病变患者心房组织及血清中的表达水平

组别	n	组织ROS (μmol/mg)	组织MDA (μmol/mg)	组织SOD (μmol/mg)	组织AOPP (μmol/mg)	血清ROS (μmol/L)	血清AOPP (μmol/L)
AF组	26	18.53±3.47	15.41±1.69	13.32±1.25	29.69±2.09	34.6±2.61	13.64±2.56
SR组	18	13.65±3.69[a]	11.46±1.83[a]	10.65±1.15[a]	21.94±1.94[a]	17.8±1.03[b]	13.27±3.38

a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与AF组比较



A:AF组倒置荧光显微镜观察(S-P ×200);B:SR组倒置荧光显微镜观察(S-P ×200);C:AF组免疫荧光观察(激光共聚焦显微镜);D:SR组免疫荧光观察(激光共聚焦显微镜)

图2 NOX2蛋白在2组二尖瓣病变患者右心耳组织中的表达

3 讨论

心房纤颤是心血管系统常见心律失常之一,因血液长期淤滞于左房,较易形成血栓,导致脑栓塞及体循环栓塞的发生[8],尤其是风湿性心脏病伴房颤患者。如表1所见,26例患者中有11例心脏超声发现左房血栓(近50%),更有2例并发脑栓塞。房颤心房电生理重构主要表现在早期,随着AF的进展,心房出现结构重构,表现为因血液动力学改变出现的左房扩大(表1可见2组患者左房内径差异显著)、心房肌细胞炎性浸润、坏死及纤维化。研究表明,AF发生时存在氧化应激,而氧化应激、炎症导致的心房结构重构可能是AF产生和维持的机制[9-10]。以往的研究多以动物模型[11]和AF伴有瓣膜疾病患者为研究对象,而以非瓣膜疾病的窦性心律患者(冠心病、先心病等)为对照组,实际上,瓣膜疾病本身就可能伴有氧化应激,而且冠心病或者先心病等窦性心律者为研究对照时很难排除这些疾病本身对心房肌结构的影响而非房颤对心房肌的影响。在这样的情况下很难确定氧化应激是否真正参与AF的形成以及参与程度[12]。本研究均选择单纯二尖瓣病变,伴或不伴轻度三尖瓣反流患者,排除瓣膜疾病本身对心房肌的影响,明确氧化应激在AF形成过程中的意义。

3.1 房颤时氧化应激产物增加

心房结构重构过程中,氧化应激损伤产生过量的ROS,促进间质纤维化。ROS的促纤维化作用包括促成纤维细胞增生、向基质分化的肌原纤维转变、促前纤维基因表达的上调等。Kim等通过检测行心脏外科手术患者(54例窦性心律、15例房颤)的右心耳组织和心房细胞中发现AF患者右心耳组织中与ROS产生相关的基因如单胺氧化酶B、酪胺酸酶相关蛋白-1等表达上调,而具有抗氧化作用的基因如谷胱甘肽过氧化物酶-1等表达下调。Leftheriotis等[13]研究发现,房颤患者外周血MDA和NT的含量明显高于非房颤患者,本研究结果显示房颤患者血清及右心耳中氧化应激指标高于窦性心律患者,与既往的研究结果基本一致。

3.2 NADPH氧化酶途径参与心房结构重构

ROS参与众多疾病的发病机制主要源于线粒体内的电子传递链,而NADPH氧化酶与ROS的产生密切相关,并被认为是其主要来源[14-15]。NADPH氧化酶活性受胞内Ca^{2+}浓度及该酶亚组分mRNA表达量的调节,其催化亚基gp91phox/NOX2及其同源物统称为NOX家族蛋白。NOX是公认的能够调节ROS产生的特殊功能酶,其所产生的ROS能作为第二信使,参与细胞分化、增殖、凋亡的调节。其中NOX2亚基在全身各组织分布最广,在心肌细胞中也有表达[14]。之前Kim在进一步的研究中发现NADPH氧化酶与胞膜相关的gp91phox亚单位可能是心房氧自由基产生的主要源头。在另一项研究中,Dudley等[16]快速起搏猪心房1周建立房颤模型后发现左心房及左心耳内氧自由基增加,考虑是由NADPH氧化酶及黄嘌呤氧化酶活性增加引起,增加的氧自由基可能参与房颤病理发展过程,如血栓形成、炎症及结构重塑。为明确NADPH氧化酶在房颤心房结构重构中的作用,我们将二尖瓣病变患者分为房颤组和非房颤组,观察房颤时NOX2在心房肌的表达。结果显示:两组患者心房肌组织均有NOX2蛋白表达,但在AF组患者中的表达明显增强,故推测:患者体内NADPH氧化酶的催化亚基NOX2表达上调,导致机体出现氧化应激反应,产生大量ROS,ROS作为第二信使参与细胞的增殖、分化及

凋亡,使心肌间质纤维化及细胞凋亡加重,增加了房颤的易感性。另外NADPH氧化酶也可能是心脏超氧化物产生的一个重要来源[17]。本研究发现右心耳组织中SOD含量在房颤患者中明显增加,MDA和SOD是一对氧化/抗氧化指标,SOD含量的增加势必导致MDA含量的增加。本研究结果进一步证实了氧化应激与房颤的关系。

3.3 AOPP在房颤患者体内的表达

AOPP作为氧化应激的敏感性指标,是血清白蛋白被自由基和反应性氧系氧化后的产物。在1999年被Witko-Sarsat等在慢性肾衰患者体内首先发现,并证实AOPP与血浆MDA等氧化应激标志物呈正相关[18]。同其他氧化应激指标相比,AOPP不仅是氧化应激的产物,能真正起到炎症介质的作用,而且本身也可诱导或加重氧化应激和慢性炎症反应。AOPP在房颤领域研究较少,在冠状动脉粥样硬化患者血清中表达仅有个别报道[19]。本研究发现AF组患者右心耳组织中AOPP含量高于SR组,而血清中AOPP含量明显低于组织,且2组患者之间差异无统计学意义。分析原因考虑AOPP与氧化应激致心房纤维化的发生程度有关,且在血清中的表达不及组织敏感。

综上所述,我们认为可能存在NADPH氧化酶/NOX2-机体氧化应激/炎症反应-心房结构重构-心房纤颤易感性增强这一因果级联关系。深入研究氧化应激及其标志物在心房结构重构中的作用可为揭示房颤发生的分子机制提供了新的理论依据。

参考文献:

[1] Kirchhof P, Lip G Y, Van-Gelder I 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.

[2] Workman A J, Smith G L, Rankin A C. Mechanisms of termination and prevention of atrial fibrillation by drug therapy[J]. Pharmacol Ther, 2011, 131(2): 221-241.

[3] Munger T M, Wu L Q, Shen W K. Atrial fibrillation[J]. J Biomed Res, 2014, 28(1): 1-17.

[4] Zhao W, Zhao D, Yan R, *et al*. Cardiac oxidative stress and remodeling following infarction: role of NADPH oxidase[J]. Cardiovasc Pathol, 2009, 18(3): 156-166.

[5] Anilkumar N, Sirker A, Shah A M. Redox sensitive signaling pathways in cardiac remodeling, hypertrophy and failure[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2009, 14: 3168-3187.

[6] Tsujimoto I, Hikoso S, Yamaguchi O, *et al*. The antioxidant edaravone attenuates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy[J]. Hypertension, 2005, 45(5): 921-926.

[7] 徐洪, 杨方, 袁媛, 等. 免疫组织化学Image Pro Plus图像半定量分析的参数选择[J]. 解剖学杂志, 2012, 35(1): 37-41.

[8] 李勇, 马瑞彦, 肖颖彬, 等. 风湿性二尖瓣病变并发心房颤动患者483例临床分析[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(10): 1048-1051.

[9] Boos C J, Anderson R A, Lip G Y. Is atrial fibrillation an inflammatory disorder?[J]. Eur Heart J, 2006, 27(2): 136-149.

[10] Anselmi A, Possati G, Gaudino M. Postoperative inflammatory reaction and atrial fibrillation: simple correlation or causation?[J]. Ann Thorac Surg, 2009, 88(1): 326-333.

[11] 戴天医, 罗太阳, 何怡华, 等. 犬房颤模型心房纤维化对心房重塑和炎症水平的影响[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(22): 2409-2414.

[12] Korantzopoulos P, Kolettis T M, Galaris D, *et al*. The role of oxidative stress in the pathogenesis and perpetuation of atrial fibrillation[J]. Int J Cardiol, 2007, 115(2): 135-143.

[13] Leftheriotis D I, Fountoulaki K T, Flevari P G, *et al*. The predictive value of inflammatory and oxidative markers following the successful cardiovascular of persistent lone atrial fibrillation[J]. Int J Cardiol, 2009, 135(3): 361-369.

[14] Bedard K, Krause K H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J]. Physiol Rev, 2007, 87(1): 245-313.

[15] Brandes R P, Weissmann N, Schroder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(5): 687-706.

[16] Dudley S C Jr, Hoch N E, McCann L A, *et al*. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases[J]. Circulation, 2005, 112(9): 1266-1273.

[17] Rodino-Janeiro B K, Paradela-Dobarro B, Castineiras-Landeira M I, *et al*. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology[J]. Vasc Health Risk Manag, 2013, 9: 401-428.

[18] Danzig V, Mikova B, Kuchynka P, *et al*. Levels of circulating biomarkers at rest and after exercise in coronary artery disease patients[J]. Physiol Res, 2010, 59(3): 385-392.

[19] Brandes R P, Weissmann N, Schroder K. NOX family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 76C: 208-226.

(**收稿**:2014-07-03;**修回**:2014-11-03)

(编辑 栾 嘉)