维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)02-0187-04

ACEI 对风湿性心脏病心房颤动患者心房 ACE、ERK 表达和纤维化改变的影响

张 安,殷跃辉

(重庆医科大学第二临床学院心内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究风湿性心脏病(风心病)心房颤动(房颤,AF)患者用血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)时心房组织血管紧张素转换酶(ACE)、细胞外信号调节激酶(ERK)表达与心房纤维化改变。方法:35 例风心病二尖瓣狭窄接受外科手术患者,手术时取右心耳处心房组织 400mg,通过逆转录—聚合酶链反应技术,以 GAPDH 为内参照,测量 ACE,ERK2 mRNA 变化,用 Western Blotting 观察 ACE、磷酸化 ERK(pERK)在蛋白水平表达的差异,经 Masson 染色研究胶原纤维容积分数(CVF)改变情况。结果:与窦性节律患者比较,慢性房颤患者在 mRNA 水平上 ACE、ERK2 表达上调,在蛋白水平上 ACE、pERK 表达上调($P<0.01$ 或 $P<0.05$),CVF 也显著增加($P<0.01$);与未应用 ACEI 组比较,用 ACEI 组 ERK2 mRNA、pERK 蛋白表达下调($P<0.05$),ACE 表达无差异,CVF 虽有减少趋势,但无统计学意义($P>0.05$)。结论:风心病慢性房颤患者较窦性节律患者 ACE、ERK 表达增加,纤维化加重;而在应用 ACEI 的慢性房颤患者,ERK2,pERK 表达有显著下降,纤维化减轻,说明在房颤时,局部激活的肾素—血管紧张素系统(RAS)经 ERK 途径介导了心房纤维化,ACEI 在一定程度上减轻心房的纤维化。

【关键词】心房颤动;血管紧张素转换酶;血管紧张素转换酶抑制剂;细胞外信号调节激酶;胶原纤维容积分数

【中国图书分类法分类号】R541.202 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-06-22

Effects of ACEI on the expression of ACE and ERK and the changes of atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation

ZHANG An, et al

(*Department of Cardiology, The Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of angiotensin-converting enzyme(ACE), extracellular signal-regulated kinase(ERK), and the changes of atrial fibrosis in patients with rheumatic heart disease(RHD) and atrial fibrillation(AF) treated with angiotensin-converting enzyme inhibitor(ACEI). *Methods*: Atrial tissues were obtained from the right appendage during open surgery in 35 patients with RHD. The mRNA of ACE and ERK2 were semi-qualified by reverse transcription-ploymerase chain reaction (RT-PCR) and normalized to the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH). Western blotting analysis was employed to examine the expressions of ACE and phosphorylated ERK(pERK). Atrial collagen volume fraction(CVF) was detected by Masson's stain. *Results*: The mRNA of ACE and ERK2 or the protein of ACE and pERK were significantly increased, and CVF was significantly increased in patients with chronic atrial fibrillation(CAF) compared with sinus rhythm group(SR)($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with CAF patients treated without ACEI, the mRNA of ERK2 and protein of pERK were significantly decreased in CAF patients treated with ACEI($P<0.05$), but there was no difference in ACE, and decrease in CVF was not statistically significant($P>0.05$). *Conclusion*: The expressions of ACE, ERK2 and pERK increase, and fibrosis is more severe in RHD patients with CAF as compared with those with SR. Compared with CAF patients treated without ACEI, the expressions of ERK2 and pERK significantly decrease($P<0.05$) and decrease in CVF is detected($P>0.05$) in CAF patients treated with ACEI. This suggests that the increasing expression of ERK2 and pERK resulting from local renal angiotensin-converting enzyme system activation mediates the development of atrial fibrosis, and ACEI may contribute to lesser atrial fibrosis in RHD patients with AF.

【Key words】Atrial fibrillation; Angiotensin-converting enzyme; Angiotensin-converting enzyme inhibitor; Extracellular signal-regulated kinase; Collagen volume fraction

---

作者简介:张 安(1970-),男,主治医师,硕士,主要研究方向:心律失常。

基金项目:重庆市科委科研基金项目(03-8010)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

房颤是最常见的心律失常,随着年龄的增长其发病率逐渐增加。房颤的发生机制复杂,至今尚未完全阐明。以心房间质纤维化改变为特征的组织学重构在房颤的发生、发展和持续过程中有重要作用。心房肌局部的肾素—血管紧张素系统(RAS)激活,经丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径介导组织学改变是一重要机制,也是多种促增殖信号转导途径的细胞外终点。基础和临床研究已证实 ACEI 可改善或逆转房颤时心房局部电与组织学重构。本文通过研究房颤患者心房 ACE、ERK2 和 pERK 表达与纤维化改变,以及 ACEI 对其表达的影响,对进一步明确房颤组织学重构的机制及 ACEI 逆转组织学重构的机理将是很有帮助的。

1 资料与方法

1.1 病例选择与分组

35 例均为 2002 年 11 月～2003 年 12 月住院接受开胸换瓣手术的风心病二尖瓣狭窄患者,其中男 19 例,女 16 例,年龄 33～60 岁。将其分为 3 组:A 组 9 例,为窦性节律患者;B 组(未用 AECI)14 例,为慢性房颤患者(房颤持续时间>6 月),病程中未用过或间断服用 ACEI,但术前 6 月未服用;C 组(用 AECI)12 例,为慢性房颤患者(房颤持续时间>6 月),病程中使用且术前 6 月内仍坚持服用 ACEI。所有患者术前作常规心电图、超声心动图检查,心功能均为Ⅱ～Ⅲ级(NYHA 标准)。三组患者在年龄、左右房直径、右房压、二尖瓣口面积及左室射血分数(LVEF)方面,组间无显著性差异($P>0.05$)。

1.2 标本采集及保存

外科手术时,于体外循环插管前,打开右心房后立即取右心耳组织,取 200mg 放入甲醛中,备 Masson 染色用,余下组织立即放入液氮中保存备用。

1.3 心房组织总 RNA 提取及逆转录—聚合酶链反应

(1)总 RNA 提取:取组织 100mg,用 Trizol 试剂(上海生物工程公司提供)提取右心耳组织总 RNA,经紫外分光光度仪分析 OD260/OD280,所有标本 OD260/OD280 比值均>1.8。(2)引物序列及设计(上海生物工程公司):见表 1。(3)cDNA 合成与基因扩增:取总 RNA 产物 5μg 作 GAPDH、ACE、ERK2 等模板的浓度和循环梯度周期曲线,确定反应体系 50μl,包括 10×buffer 5μl,10mmol/L dNTP 4μl,25mmol/L$MgCl_2$ 3μl,Taq 酶 2.5u,cDNA 4μl(约 0.5μg),引物量 25pmol。反应条件为 94℃ 预变性 5min,随即进入 PCR 循环,即 94℃ 变性 30s,退火 30s,各目标基因退火温度分别为 65℃(ACE)、60℃(ERK2),72℃ 延伸 60s,共 38 个循环,72℃ 再延伸 5min。阴性对照:反应体系中未加入模板总 RNA,代之以去离子水,其他均相同。(4)电泳及图象扫描:取扩增产物 10μl,于 2% 琼脂糖上电泳(电压 90V,时间 30min),然后于 Gel Doc 2000 凝胶成像系统(Bio-RAD)扫描,分别测目标基因和 GAPDH 条带的 OD 值比,后者代表目的基因的相对表达含量。

表 1 目标基因及内参照引物序列设计

基因	方向	引物序列
ACE(297bp)	上游	5'-ACTGGTGGTATCTTCGAACC-3'
	下游	5'-GACCATGTCCTTCAGCACC-3'
ERK2(218bp)	上游	5'-CATCGCCGAAGCACCATTCAAG-3'
	下游	5'-GATAAGCCAAGACGGGCTGGAG-3'
GAPDH(376bp)	上游	5'-TCCATGACAACTTTGGCATCGTGG-3'
	下游	5'-GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC-3'

1.4 Western Blotting

(1)总蛋白提取与含量测定:加入组织裂解液进行匀浆,离心,取上清液,以比色法进行定量。(2)聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):积层胶浓度为 5%,分离胶浓度为 5%、10%。蛋白质样品经稀释并煮沸后,取同样浓度等体积的蛋白质样品加入到样品孔中(样品 2μl 及上样 buffer2μl),80V 电泳至分离胶,100V 电泳至溴酚蓝到达凝胶底部为止。(3)转膜:制作好三明治,于 4℃,电流 90mA,电转移过夜。(4)免疫学检测:PVDF 膜经 5%(W/V)脱脂奶粉封闭后加入以封闭液稀释的第一抗体:鼠抗 ACE 单克隆抗体(Novocastra Laboratories Ltd, Unided Kingdom)1∶30,兔抗 pERK 多克隆抗体(Santa Cruz,CA)1∶400,再加入辣根过氧化物标记的二抗,经 DAB 显色,待蛋白条带清晰后以自来水冲洗,照相。(5)结果分析:结果用 Gel Doc 2000 凝胶成像系统(Bio-RAD,美国)对目的条带进行密度分析,蛋白含量以相对光密度(ROD)×面积表示。

1.5 统计学分析

各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用 q 检验,$P<0.05$ 有统计学意义,使用 SPSS 软件分析。

2 结 果

2.1 ERK2、ACE、GAPDH 的 mRNA 转录

以 100bp plus ladder 为 Marker,3 个基因的 RT-PCR 产物电泳条带的位置与理论值相符(见图 1)。

2.2 心房组织 ACE、ERK2 mRNA 相对表达量的改变(见表 2)

与 A 组比较,B、C 两组 ACE、ERK2 显著上调($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与 B 组比较,C 组 ERK2 有显著下调($P<0.05$),而 ACE 无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 心房肌 pERK(pERK1/2)、ACE 蛋白印迹图(见图 2)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 房颤患者心房肌 ERK2、ACE mRNA 水平变化($\bar{x} \pm s$)

组别	ACE	ERK2
A 组($n=9$)	0.49±0.19	1.03±0.24
B 组($n=14$)	0.67±0.21*	1.39±0.28** #
C 组($n=12$)	0.70±0.18*	1.21±0.27*

注:与 A 组比较,*$P<0.05$;与 A 组比较,**$P<0.01$;与 C 组比较,#$P<0.05$

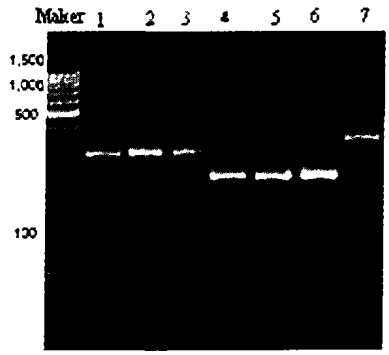


图 1 心房 ACE、ERK2 和 GAPDH mRNA 转录水平 1、4 分别为 A 组的 ACE,ERK2 电泳条带,2、5 分别为 B 组的 ACE,ERK2 电泳条带,3、6 分别为 C 组的 ACE,ERK2 电泳条带,7 为 GAPDH

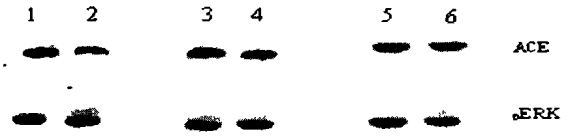


图 2 抗 ACE 单克隆抗体和抗 pERK 多克隆抗体免疫印迹图 从左到右,1、2 为 A 组,3、4 为 B 组,5、6 为 C 组

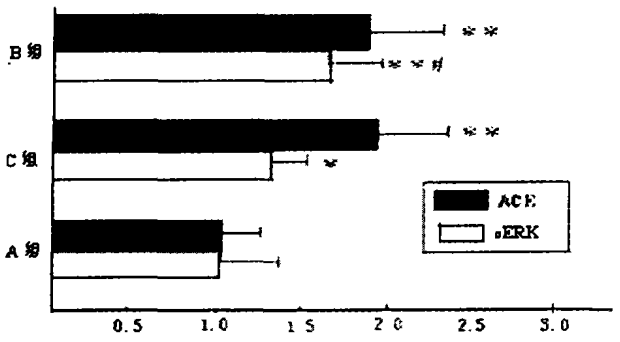


图 3 ACE 和 P-ERK 相对蛋白含量

注:与 A 组比较,*$P<0.05$;与 A 组比较,**$P<0.01$;与 C 组比较,#$P<005$

2.4 心房肌 pERK(pERK1/2)、ACE 蛋白相对含量(见图 3)

与 A 组比较,B、C 两组 ACE、pERK 显著上调($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与 B 组比较,C 组 pERK 有显著下调($P<0.05$),而 ACE 无显著性差异($P>0.05$)。

2.5 心房纤维化指标 CVF 的改变(见表 3)

与 A 组比较,B、C 两组 CVF 均显著升高($P<0.01$);与 B 组比较,C 组降低,但无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 房颤患者心房 CVF($x \pm s$)

组别	CVF(%)
A 组($n=9$)	9.36±1.91
B 组($n=14$)	16.49±2.01*
C 组($n=12$)	15.71±2.23*

注:与 A 组比较,*$P<0.05$

3 讨 论

在 RAS 中,血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)是最为重要的效应分子,Ang Ⅱ的生成有三条途径:ACE 途径(经典途径)、糜酶途径和非 ACE 非胃促胰酶途径。据研究,在人体完整的心脏中,血管紧张素Ⅰ(AngⅠ)的转化有 80% 是经 ACE 途径完成的,说明 ACE 仍是 AngⅡ生成的限速因素[1]。但在心房心室的 ACE 和糜酶活性是有差异的,右心房 ACE 活性是左心室的 3-4 倍,右心室 ACE 活性是左心室的 2 倍,相反,心室糜酶活性是心房的 2 倍,而左右心室则相似[2],故对心房而言,AngⅡ的生成仍是以 ACE 经典途径为主。心房 ACE 的表达对局部 RAS 一系列病理生理效应有重要的影响。本研究提示,慢性房颤患者心房 ACE 表达在 mRNA、蛋白水平升高,与文献报道一致[3,4],而慢性房颤时心房局部 RAS 中由于 ACE 表达的增加,导致 AngⅡ在心房局部生成增加,与伍炜锋等[4]的报道一致,说明慢性房颤时存在局部 RAS 的激活,而不论循环或局部的 RAS,通过 AngⅡ与 AT_1 受体(AT_1R)结合,经受体偶联的 G 蛋白途径而产生效应。AngⅡ与 AT_1R 结合后,主要通过 Gq 型 G 蛋白激活磷脂酶 C 激活,从而激活相关信号通路。

本研究还发现,慢性房颤患者心房 ERK2 在 mRNA 水平以及 pERK 在蛋白水平上表达明显上调,与有关文献报道一致[2,5]。已如前述,慢性房颤患者心房局部生成增加的 AngⅡ与心房成纤维细胞膜上 AT_1R 结合后,相应生理效应增强。其间通过了 MAPK 多级信号转导,已知 ERK 是 MAPK 途径主要的和经典的通路,本研究结果说明慢性房颤患者心房局部存在 ERK 途径的激活。增加的 pERK 移位至细胞核,催化转录因子磷酸化、活化,增加调节基因的表达和开放,导致细胞活化,相应功能增

维普资讯 http://www.cqvip.com

强,如成纤维细胞分泌胶原增加,同时其分泌生长因子,如转化生长因子 - β_1(TGF - β_1)也增加。而 TGF - β_1 可减少基质金属蛋白酶 - 1(MMP - 1)的合成,并促进 MMP - 1 的抑制物(TIMP - 1)的合成,从而抑制胶原降解,促进纤维化的发生[6],TGF - β_1 还可增加纤维连接蛋白和胶原在细胞外基质的沉积[7],导致心房间质纤维化。

在纤维化方面,也观察到慢性房颤患者 CVF 较窦性节律组明显增加,同时,在慢性房颤患者,用 ACEI 组较未用 ACEI 组其心房 ERK2、pERK 表达明显下调,可能与 ACEI 减少局部 Ang Ⅱ 的生成,减弱后者在局部的效应,表现为信号通路(如 MAPK 途径)中 ERK2、pERK 表达下调,进一步证实了慢性房颤时心房局部 RAS 的激活,经 MAPK 途径介导了组织学重构。在纤维化指标方面,用 ACEI 组较未用 ACEI 组 CVF 有下降趋势,但无统计学意义,这可能与以下几个方面有关:①本研究样本数量有限;②心房局部 Ang Ⅱ 的生成除了 ACE 经典途径外,还有糜酶途径的存在,单用 ACEI 只能部分抑制其生成;③房颤持续时间不一,ACEI 只是对新的胶原沉积、基质增加有影响,应用后对已沉积的胶原和增加的基质影响不大,并且部分未用 ACEI 组患者,在其病程中亦曾间断服用 ACEI。

房颤时心房间质纤维化所涉及的信号通路较为复杂,ERK 信号通路是迄今研究得最为透彻的一条 MAPK 信号通路。本研究也发现风心病房颤患者心房 ERK 途径中 ERK2、pERK 表达和相应的纤维化指标的增加,Ang Ⅱ 与 AT_1R 结合后,除了经 ERK 途径产生效应外,还可能通过其它信号转导途径。相信通过对这些途径的深入研究,可以进一步明确其在房颤心房组织学重构中的作用。

参 考 文 献

[1] De Mello WC, Jan Denser A. H. Angiotensin and the heart on the intracrine RAS[J]. Hypertension, 2000; 35(6): 1183 - 1188.

[2] Horiuchi M, Hayasbida W, Kambe T, et al. Angiotensin type2 receptor dephosphorylates BCL - 2 by activating mitogen activated protein kinase phosphatetase - 1 and induces apoptosis [J]. Biol Chem, 1997; 272(30): 18022 - 19026.

[3] Goette A, Stack T, Rocken C, et al. Increased expression of extracellular signal - regulated kinase and angiotensin - converting enzyme in human atria during atrial fibrillation[J]. J Am Coll Cardiol, 2000; 35(6): 1669 - 1677.

[4] 许春萱,黄明方,张建成,等.心房颤动患者心房组织中血管紧张素转换酶和血管紧张素受体 mRNA 表达的研究[J].中华心血管病杂志,2003;31(1):55 - 56.

[5] 伍伟峰,黄从新,刘唐威,等.风湿性心脏病心房颤动患者心房细胞外信号调节蛋白与纤维化的关系[J].中国心脏起搏与心电生理杂志,2002;16(2):100 - 103.

[6] Conception L, Nerea V, Javier F, et al. Abnormalitier of the extracellular degradation of collagen type Ⅰ in essential hypertension[J]. Circulation, 1998; 98(5): 535 - 540.

[7] Lijnen P, Petrov V. Induction of cardiac fibrosis by aldosterone[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000; 32(6): 865 - 879.

(上接第 186 页)

diagnosis of genital tract infection with Chlamydia trachomatis [J]. J Clin Microbiol, 2003; 41: 3784 - 3789.

[5] Anguenot JL, de Marval F, Vassilakos P, et al. Combined screening for Chlamydia trachomatis and squamous intra - epithelial lesions using a single liquid - based cervical sample[J]. Hum Reprod, 2001; 16: 2206 - 2210.

[6] Schachter J, Stature WE, Quirm JC, et al. Ligase chain reaction to detect Chlamydia trachomatis infection of the cervix [J]. J Clin Microbiol, 1994; 32: 2540.

[7] Dille BJ, Butzen CC, Birkenmeyer LG. Amplification of Chlamydia trachomatis DNA by ligase chain reaction[J]. J Clin Microbiol, 1993; 31: 729 - 731.

[8] Golden MR, Astete SG, Galvan R, et al. Pilot study of COBAS PCR and ligase chain reaction for detection of rectal infections due to Chlamydia trachomatis[J]. J Clin Microbiol, 2003; 41: 2174 - 2175.

[9] Kacena KA, Dohnal K, Benesova V, et al. Chlamydia, gonorrhea, and HIV - 1 prevalence among five populations of women in the Czech and Slovak Republics[J]. Sex Transm Dis, 2001; 28: 356 - 362.

[10] Noguchi Y, Yabushita H, Noguchi M, et al. Detection of Chlamydia trachomatis infection with DNA extracted from formalin - fixed paraffin - embedded tissues[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2002; 43: 1 - 6.

[11] Braverman PK, Schwarz DF, Mph M, et al. Use of ligase chain reaction for laboratory identification of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in adolescent women[J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2002; 15: 37 - 41.