

房颤患者血清 PICP 和 TGF- β 1 水平可作为评估心房结构重构的敏感血液学指标

赵 飞, 褚 鹏, 王思博, 王 伟

(南京医科大学第一附属医院胸外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**了解心房重构与纤维蛋白血清标记物的相关性,从而筛选出能够反映心房重构的敏感血液标志物。**方法:**收集 90 例瓣膜置换手术患者的左右心房标本。患者被分为窦性节律($n=30$)、阵发性房颤($n=30$)和持续性房颤($n=30$)3 组,检测心房组织中钙-整合素结合蛋白(calcium and integrin binding protein, CIB1)、钙调神经磷酸酶 A(calcineurinA)、钙调神经磷酸酶 B(calcineurinB)、核内活化 T 细胞核因子 3(nuclear factor of activated T3, NF-AT3)、核内活化 T 细胞核因子 4(nuclear factor of activated T4, NF-AT4)、I 型纤维蛋白、III 型纤维蛋白表达情况。同时使用 ELISA 法检测了血清中的 I 型前纤维羧基端肽(carboxy-terminal peptide of procollagen type I, PICP)、III 型前纤维氨基端前肽和 I 型前纤维氨基端前肽以及 TGF- β 1 的水平。另取 10 例窦性心律先天性心脏病手术患者作为对照。**结果:**房颤组的 CIB1、calcineurinA、calcineurinB、核内 NF-AT3、核内 NF-AT4、I 型纤维蛋白、III 型纤维蛋白的表达明显增高,特别是左心房中。持续性房颤组 calcineurin 系统各蛋白的表达明显高于窦性心律组。房颤患者核内 NF-AT3、核内 NF-AT4 的表达水平与心房中的 I、III 型纤维蛋白水平明显相关。血液中的 PICP 和 TGF- β 1 的水平可作为反映心房重构的重要指标。**结论:**calcineurin 系统参与了心房的结构重构特别是纤维化的过程, PICP 和 TGF- β 1 可作为评估房颤过程中心房重构的敏感血清生物标志物。

[关键词] 房颤;心房纤维化;calcineurin 系统;PICP;TGF- β 1

[中图分类号] R541.7*5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)11-1572-08

doi:10.7655/NYDXBNS20151115

The levels of PICP and TGF- β 1 can be regarded as serum markers for estimating atrial structural remodeling in patients with atrial fibrillation

Zhao Fei, Chu Peng, Wang Sibao, Wang Wei

(Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, china)

[Abstract] **Objective:** Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia in clinical practice. Unfortunately, the sensitive serum biomarkers of atrial remodeling in AF remain unclear. The aim of this study was to determine sensitive serum markers for estimating atrial structural remodeling of AF. **Methods:** Right and left atrial specimens were obtained from 90 patients undergoing valve replacement surgery. The patients were divided into the sinus rhythm ($n = 30$), the paroxysmal atrial fibrillation ($n = 30$), and the persistent atrial fibrillation ($n = 30$) groups. CIB1, calcineurinA, calcineurinB, nuclear factor of activated T3 (NF-AT3), nuclear factor of activated T4 (NF-AT4), collagen I and III protein expression in atria were measured. We also tested the levels of the carboxyl-terminal peptide of pro-collagen I (PICP), the N-terminal type I procollagen propeptides, the N-terminal type III procollagen propeptides, and TGF- β 1 in serum using an enzyme immunosorbent assay. **Results:** Key protein expression in calcineurin system was increased in the AF groups, especially in the left atrium. In patients with AF, the expression levels of nuclear NF-AT3 and NF-AT4 were correlated with those of collagens I and III in the atria and with PICP and TGF- β 1 in blood. **Conclusion:** These data support the hypothesis that PICP and TGF- β 1 levels may be sensitive serum biomarkers to estimate atrial structural remodeling with at AF.

[Key words] atrial fibrillation; atrial fibrosis; calcineurin system; PICP; TGF- β 1

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(11): 1572-1579]

心房纤颤(atrial fibrillation, AF)简称房颤,是临床实践中最常见的心律失常^[1-2]。除年龄、冠心病、糖尿病、甲状腺功能异常等病因外,心脏瓣膜病也是引发房颤的重要病因。目前临床多以瓣膜置换术来预防严重心瓣膜病患者发生心衰^[3-4]。房颤所导致的电生理重构和组织结构重构产生了适合房颤继续发展的基质^[5],而在这两者中结构重构是促进房颤发生发展的重要原因^[6-7]。随着研究的不断深入,研究者发现心房纤维化和心肌肥大在结构重构中扮演着关键角色^[8],但是,房颤中有关心房重构的确切机制仍未阐明,同时能够准确反映心房重构证据的血清学标志物也不得而知。近来,钙调神经磷酸酶-活化细胞核因子通路(calcineurin-NFAT)通路在房颤引起的心房异构中的作用受到了越来越多的重视。

心房纤维化主要是由 I 型纤维蛋白(collagen I)、III 型纤维蛋白(collagen III)参与^[9-10]。心肌纤维化是以成纤维细胞大量增生,同时产生纤维蛋白、纤连蛋白、细胞黏合素等细胞外基质蛋白沉积为特征^[11]。这些变化可能会导致心房心肌细胞内电传导延迟,产生替代性传导通路;也会导致各向异性传导,形成折返激动^[12]。心脏纤维化的过程由一系列纤维增殖信号来调节,其中包括 TGF- β 1 和 Ang II^[2,13]。钙调神经磷酸酶(calcineurin)是一种受钙离子和钙调素(CAM)调节的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶,在钙依赖性的信号通路中广泛表达并发挥重要作用。钙调神经磷酸酶由催化亚基 calcineurinA(CnA)和调节亚基 calcineurinB(CnB)组成。CnA 包括 5 个不同结构域: N-末端区、催化区、CnB 结合区、CAM 结合区以及自动抑制区。CnB 可以与 Ca²⁺结合,当细胞内钙超载时,高水平的 Ca²⁺将与 CnB 结合并导致 CAM 过饱和,二者与 CnA 相应部位结合后促使 CnA 构象改变,同时与 AI 区分离,暴露其活化位点从而激活 calcineurin。相关研究表明,钙-整合素结合蛋白 1(calcium and integrin binding protein, CIB1)可能是与 CnB 结合并激活 calcineurin 的必需物质^[14]。据报道,在房颤患者心房组织中活化的 calcineurin 水平明显升高^[15]。激活的 calcineurin 使活化 T 细胞核因子 3(nuclear factor of activated T3, NF-AT3)、活化 T 细胞核因子 4(nuclear factor of activated T4, NF-AT4)去磷酸化,诱导 NF-AT3、NF-AT4 易位进入细胞核内与锌指转录因子作用,从而诱导心肌细胞肥大相关基因的转录^[15-17]。心肌细胞过度表达 calcineurin 的转基因小鼠会出现心肌的明显增厚肥大,且在退

化心肌细胞的周围伴有纤维蛋白沉积^[17-18]。作为 calcineurin 系统下游的 NF-AT3 和 NF-AT4^[17-19],当其激活并表达在转基因小鼠时,小鼠心脏会出现明显的心脏壁纤维化。许多实验已经证明了 calcineurin 抑制剂如环孢菌素 A 和 FK506 能通过抑制 calcineurin 表达来阻碍心肌细胞外基质的累积进而阻止纤维化发生。这些研究都直接或间接地表明了 calcineurin 系统在心脏纤维化和心肌肥厚过程中的重要性^[17]。另外,血浆中的 I 型前纤维羧基端肽(carboxy-terminal peptide of procollagen type I, PICP)、III 型前纤维氨基端肽(carboxy-terminal peptide of procollagen type III, PIII NP)和 I 型前纤维氨基端肽(amino-terminal peptide of procollagen type I, PI NP)被认为是 I、III 型合成纤维蛋白的有效标记物^[20]。

本研究目的就在于确定房颤过程中 calcineurin 系统上下游蛋白的表达是否明显升高并激活,同时了解核内 NF-AT3、NF-AT4 与血清纤维蛋白标记物的相关性,从而筛选出反映心房异构的敏感血液指标,为临床判定心房异构的程度找到可行方法。

1 对象和方法

1.1 对象

选取 2012 年 1 月—2013 年 1 月在南京医科大学第一附属医院进行瓣膜置换手术的患者 90 例。根据患者术前情况将其分为 3 组:窦性心律组($n=30$)、持续性房颤组($n=30$)和阵发性房颤组($n=30$)。除此之外选取 10 例接受了先天性心脏手术的窦性心律患者构成对照组($n=10$)。研究过程中排除 4 类患者:①肾功能不全(血清肌酐 $>136 \mu\text{mol/L}$)或 II 型糖尿病患者;②冠状动脉造影和超声心动图评估确诊为冠心病的患者;③70 岁以上合并有相关增加房颤风险病史(如甲亢)者;④患有影响血清纤维化标志物疾病和纤维化异常的患者。术前药物(除华法令阻凝剂和血管紧张素转化酶抑制剂外)需一直给药到手术当天清晨。术前由 1 名研究员评估患者术前临床特征;术后由另 1 名研究员记录详细手术数据。该研究经过南京医科大学伦理委员会讨论通过,所有受试者签署知情同意书,符合赫尔辛基宣言条款。

1.2 方法

1.2.1 心肌组织采取和储存

所有手术均由相同的心脏麻醉师、灌注师和手术团队执行。在低温(33~34℃)环境下对患者进行体外循环心脏手术,经灌注管顺灌冷的心脏停搏液,同时使用冰屑局部降温,使心脏迅速停搏。在心脏

手术体外循环开始之前,于腔静脉置管处切取约 250 mg 右心耳组织以及从持续性房颤组和阵发性房颤组患者中切取约 250 mg 左心耳组织。对于风湿性瓣膜病伴房颤者来说,我科多常规行左心耳组织结扎和切除术,而对窦性心律组患者来说则没有必要切除左心耳。其中 50 mg 的左、右心耳组织固定于 4% 的多聚甲醛溶液中用于组织学研究。剩余组织则快速冷冻于液氮中供后续研究使用。

1.2.2 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)

通过逆转录反应合成 cDNA。步骤如下:2 μg RNA,加入适量 0.1% DEPC 水使总体积达 10 μL ,加入 1.5 μL oligo(dT)18 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)混匀离心。70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 后立即冰浴冷却。在 TC9600-G-230V 热循环仪中 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后,开始反应。于 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 min 终止反应,立即冰浴。反应产物 cDNA 则被用作后续的 PCR 模板。于 94 $^{\circ}\text{C}$ 下 5 min 预变性;然后 PCR 扩增 30 个循环,每个循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 变性,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 退火以及 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 延伸;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 下 5 min 再延伸。分别使用特异引物对 CIB1、calcineurin A、calcineurin B、collagen I、collagen III、NF-AT3、NF-AT4 进行基因扩增:CIB1(sense:5'-GACGGAACCTTGAACAGAGAA-3',antisense:5'-ACGGAGCAATGACAACAGC-3');calcineurin A(sense:5'-GAGTCCGCTGAAGGGATTTA-3',antisense:5'-TTGAGGAAGCCAGAAGATGG-3');calcineurin B(sense:5'-TGTAGTTTCAGCTGCAGCCCGGA-3',antisense:5'-TGGCACTTTGCAGGCTCTGCC-3');collagen I(sense:5'-TTCCTGCGCTGATGTCC-3',antisense:5'-GGTTCAGTTTGGGTTGCTTGT-3');collagen III(sense:5'-TCAACACCGATGAGATTATGAC-3',antisense:5'-CAAAGGATTGGCACTTATGC-3');NF-AT3(sense:5'-GGGACAACAGAACCAGAGTAAC-3',antisense:5'-AAACAGAATAGTCCACCTTGAGA-3');NF-AT4(sense:5'-TTGGAACACCAGCCATCAGG-3',antisense:5'-GCTGCTCCTGTTCTTTTGGC-3')。GAPDH 作为内参。通过数码相机和图像分析系统半定量分析 PCR 产物的水平。

1.2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测

在组织提取的全过程中,使用裂解液裂解心房组织样本,并加入含有 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)、150 mmol/L NaCl、1% Na_3VO_4 、1% Triton X-100、0.1% SDS 的 RIPA 缓冲液于冰上进行匀浆。9 300 r/min 离心 10 min,取上层清液-70 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。核内蛋白提取物制备如下:用预冷的 PBS 缓冲液漂

洗心房组织并进行匀浆,然后在 1 mL 的低渗缓冲液中重悬 10 min 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 800 r/min 离心 10 min。0.15 mL 的高渗缓冲液重悬,于冰上反应 20 min 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 13 000 r/min 离心 10 min。取部分上层清液(提取的核内蛋白)-80 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。用 Lowry 法检测蛋白浓度,分光光度计测量蛋白吸光度。变性样本如下处理:10%的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 25 μg 蛋白样本,然后转至 NC 膜上,5%的脱脂奶粉室温封闭,然后加入抗 CIB1、calcineurin A、calcineurin B、collagen I、collagen III、NF-AT3、NF-AT4 的抗体(Santa Cruz 公司,美国)4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。用抗 GAPDH 和抗 lamin B 抗体(Santa Cruz 公司,美国)作为对照指标。将与一抗反应后的薄膜 37 $^{\circ}\text{C}$ 下置于含二抗(含 5%的脱脂奶粉和 0.1%的 Tween-20 的 PBS 中稀释羊抗兔 IgG)的封闭液中反应 2 h。ECL 化学发光检测目的蛋白,每个样本至少重复 3 次。

1.2.4 血液采样和酶联免疫吸附测定法(ELISA)

手术麻醉前取患者静脉血样本置于 EDTA 抗凝管中,用于外周血的提取。室温下 1 800 r/min 离心 5 min 后分离血清,80 $^{\circ}\text{C}$ 储存用以分析。按照试剂盒说明书的步骤,用敏感的 ELISA 试剂盒检测血清中的 P III NP、P I NP、TGF- β 1 和 P I CP 水平。

1.2.5 组织学和免疫组织化学检查

在 pH7.4 的 PBS 液中,用 4%的多聚甲醛固定左、右心耳组织 24 h。酒精脱水后石蜡包埋,切片。用 V-G 法染色 2 μm 的连续切片并在显微镜下观察。另外在 4 μm 的石蜡组织切片上对 CIB1、NF-AT3 和 NF-AT4 的表达进行检测,抗体同 1.2.3。细胞或细胞膜棕染则为阳性。用肥厚性心脏的心室组织作为阳性对照,用预先和抗 NF-AT3、NF-AT4 肽链的抗体(Santa Cruz 公司,美国)反应的切片组织作为阴性对照。

1.3 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 GraphPad Prism version 5.01 和 STATA version 10.0.530.0 对数据进行统计学处理。多组间的差异用 Kruskal-Wallis 法检测,任意两组总体均数间的差异用 Mann-Whitney U 法检测。组间差异用 Chi-square 和 Fisher's exact 检测确定。用一元回归分析来评估核 NF-AT3、NF-AT4 的表达、心房组织中的 collagen I、collagen III 的表达以及血浆中的 P III NP、P I NP、TGF- β 1、P I NP 水平之间的联系。使用 Spearman 法进行相关性分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床特征和血液动力学数据

表 1 为术前血液动力学和超声心动图的相关数据,数据分析显示,除对照组外,所有组的左心房直径均大于右心房直径,持续性房颤组的左心房直径明显大于窦性心律组。另外在各组中右心室直径、左室收缩末期尺寸和左室舒张末期尺寸并没有明显差异。不同心功能患者的构成比也没有明显的区别。

2.2 房颤组心房组织中的 CIB1、calcineurinA、calcineurinB、NF-AT3、NF-AT4、I 型纤维蛋白、III 型纤维蛋白的 mRNA 和蛋白质的表达明显增高

免疫组织化学检查结果显示:房颤组中的 CIB1 表达水平高于窦性心律组和对照组(图 1)。Western

blot 结果也证明了在房颤组中 calcineurin A、calcineurin B、NF-AT3、NF-AT4 表达水平上调(图 2、3),核内 NF-AT3、NF-AT4 的表达高于窦性心律组(图 3),I、III 型纤维蛋白的表达明显高于窦性心律组(图 4);逆转录聚合酶链式反应通过对 mRNA 表达水平的测定证实了上述结果。

2.3 房颤组血清 P I NP、P III NP、P I CP 和 TGF-β1 水平有明显提高

与阵发性房颤组、窦性心律组、对照组相比,持续性房颤组血清 P I CP、TGF-β1 的水平明显升高;持续性房颤组的 P III NP 水平和阵发性房颤组相比并没有差异,但和窦性心律组、对照组相比略高;持续性房颤组的 PINP 水平明显高于对照组,而与其余组之间没有差异(表 2)。

表 1 患者临床资料分析
Table1 Analysis of clinical data

指标	对照组(n=10)	窦性心律组(n=30)	阵发性房颤组(n=30)	持续性房颤组(n=30)
性别(男/女)	4/6	16/14	13/17	12/18
年龄(年)	16.20 ± 3.31	54.75 ± 3.68	55.61 ± 6.83	53.58 ± 4.63
术前数据				
心律(次/min)	102.40 ± 4.51	79.00 ± 6.00	81.00 ± 7.00	83.00 ± 9.20
心功能 I / II / III / IV	2/7/1/0	0/12/10/8	0/7/13/10	0/5/12/13
心脏超声数据				
左室舒张末直径(mm)	34.00 ± 2.30	53.55 ± 8.70	55.66 ± 14.13	54.97 ± 12.36
左室收缩末直径(mm)	24.00 ± 3.11	36.38 ± 1.26	39.00 ± 10.22	34.13 ± 11.03
射血分数(%)	64.00 ± 4.12	55.01 ± 4.80	53.08 ± 5.32	52.21 ± 5.21
左心房直径(mm)	23.00 ± 6.73	47.25 ± 5.19 ^Δ	55.43 ± 6.80 ^{*Δ}	59.23 ± 5.92 ^{*Δ}
右心房直径(mm)	27.00 ± 8.71	38.40 ± 5.20	38.10 ± 4.64	38.20 ± 5.00
术前住院时间(d)	10.00 ± 9.36	15.00 ± 11.80	16.00 ± 11.53	16.00 ± 13.40
单纯二尖瓣疾病	0	12	15	12
二尖瓣狭窄		4	5	6
二尖瓣关闭不全		5	6	2
二尖瓣狭窄及关闭不全		3	4	4
单纯主动脉瓣疾病	0	10	6	5
主动脉瓣狭窄		6	3	1
主动脉瓣关闭不全		4	3	4
双瓣膜疾病	0	8	9	13
术前用药				
地高辛	0	18	28	30
呋塞米	4	22	24	28
硝酸甘油	0	26	23	27
钙离子拮抗剂	0	10	12	11
B 受体阻滞剂	3	10	22	30
ACEI 类降压药	0	19	21	18
手术相关数据				
二尖瓣/主动脉瓣/双瓣置换	0/0/0	12/10/8	15/6/9	12/5/13
体外循环时间(min)	78.00 ± 11.44	130.00 ± 12.42	141.00 ± 24.4	145.00 ± 13.23
主动脉阻断时间(min)	45.32 ± 33.32	79.00 ± 34.43	82.00 ± 35.26	90.00 ± 42.13

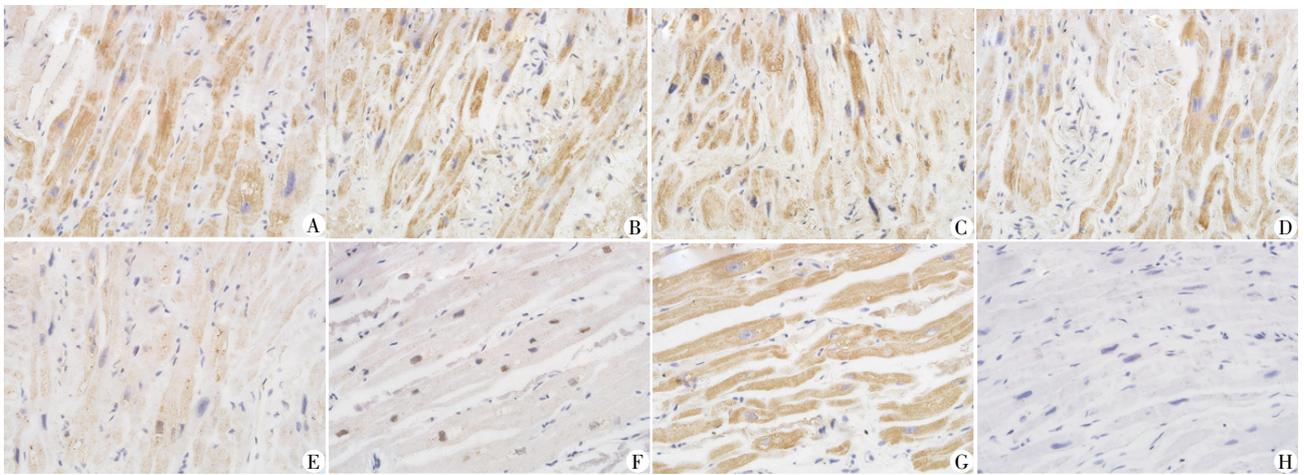
与窦性心律组比较,*P < 0.01;与同组右心房直径比较,^ΔP < 0.01。

2.4 房颤患者左右心房组织中 I、III 型纤维蛋白与核内 NF-AT3、NF-AT4 表达的相关性分析

房颤患者的左心房组织中 I 型纤维蛋白表达与核内 NF-AT3 的表达密切相关($P < 0.01$),而与核内 NF-AT4 相关性无统计学意义; III 型纤维蛋白的表达与核内 NF-AT3($P < 0.01$)、NF-AT4($P < 0.01$)的蛋白质表达密切相关。房颤患者右心房组织中 I 型纤维蛋白的表达与核内 NF-AT3 的表达有相关性($P < 0.01$),和核内 NF-AT4 的相关性无统计学意义; III 型纤维蛋白的表达和核内 NF-AT3 ($P < 0.01$)、NF-AT4 ($P < 0.01$)的表达都具有明显相关性(表 3)。

2.5 房颤患者左右心房组织中 I、III 型纤维蛋白水平与血清 P I NP、P III NP、P I CP、TGF-β1 水平之间的关系

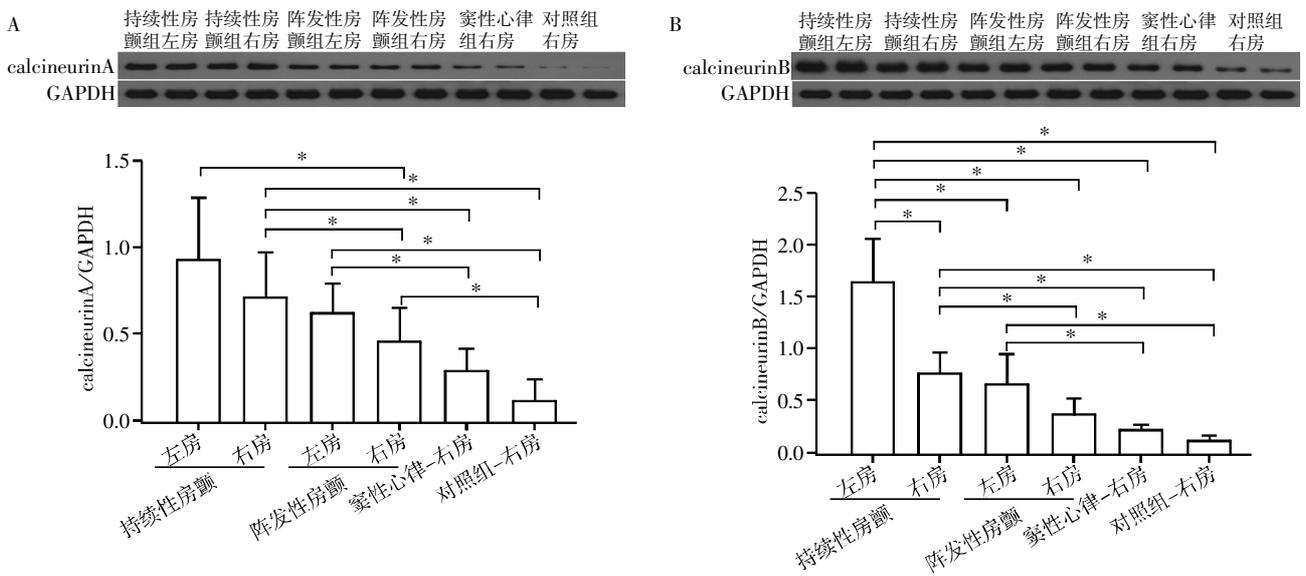
房颤患者左心房组织中 I 型纤维蛋白的水平与 P I NP($r=0.423, P=0.003$)、P I CP($r=0.386, P=0.001$)的水平有相关性, 而和 TGF-β1 的水平无相关性; III 型纤维蛋白的水平与 P III NP ($r=0.291, P=0.042$)、TGF-β1($r=0.469, P < 0.001$)的水平有相关性。房颤患者右心房组织中 I 型纤维蛋白水平和 P I CP ($r=0.336, P=0.019$)、TGF-β1($r=0.258, P < 0.05$)水平有相关性, III 型纤维蛋白水平和 P III NP($r=0.173,$



A:持续性房颤(左房);B:持续性房颤(右房);C:阵发性房颤(左房);D:阵发性房颤(右房);E:窦性心律(右房);F:先心病(右房);G:阳性对照;H:阴性对照。

图 1 各组 CIB1 的免疫组化结果

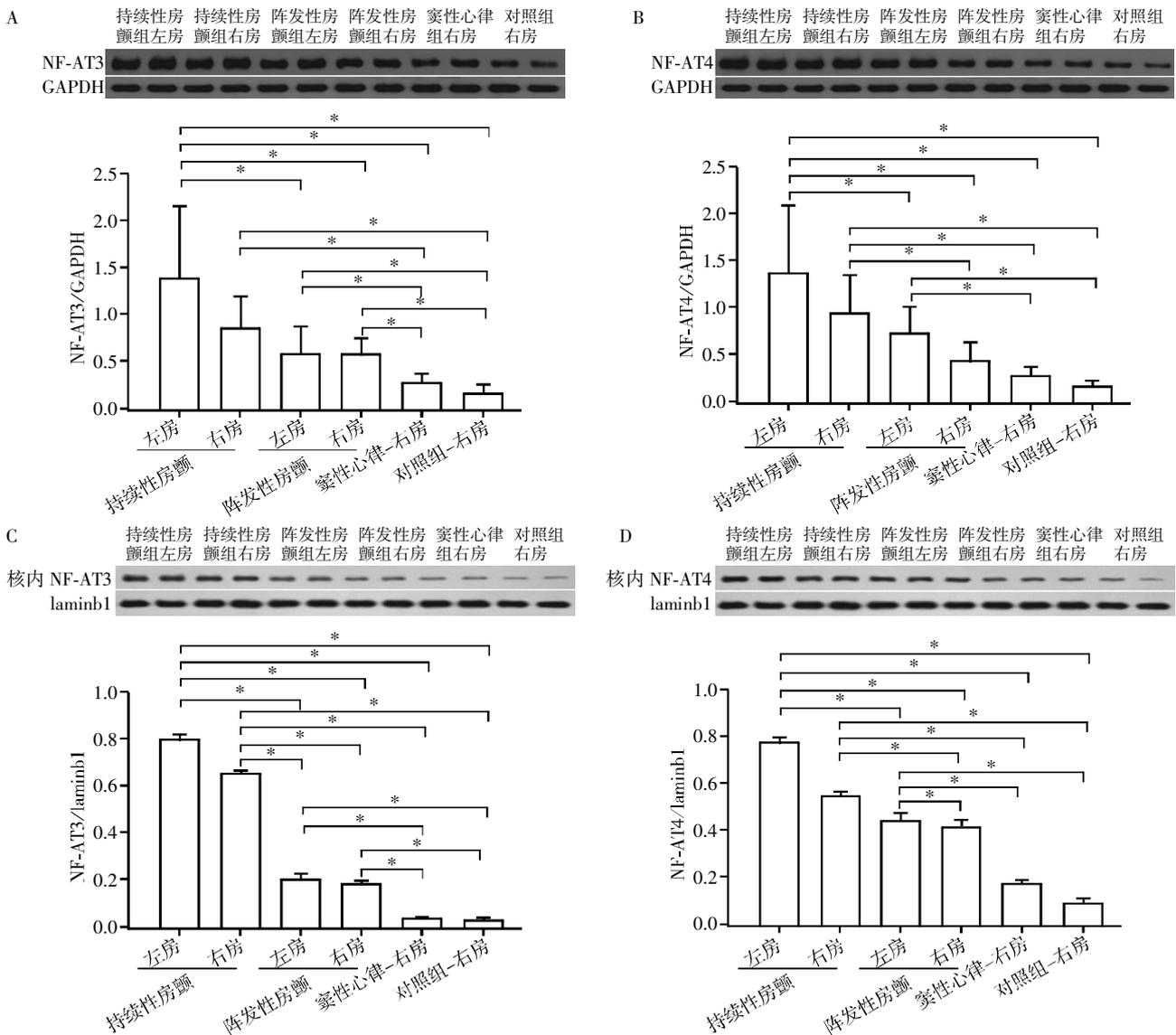
Figure 1 Immunohistochemistry for CIB1 in sections obtained from different groups



A: calcineurinA 在各组的表达; B: calcineurinB 在各组的表达; 两组间比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 calcineurinA 和 calcineurinB 在各组的表达

Figure 2 CalcineurinA and calcineurinB protein expressions in different groups



A: NF-AT3 在各组的表达; B: NF-AT4 在各组的表达; C: 核内 NF-AT3 在各组的表达; D: 核内 NF-AT4 在各组的表达; 两组间比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 NF-AT3、NF-AT4 以及核内 NF-AT3、NF-AT4 在各组的表达

Figure 3 NF-AT3, NF-AT4, nuclear NF-AT3 and nuclear NF-AT4 protein expressions in different groups

$P=0.178$)、TGF-β1 ($r=0.109$, $P=0.213$) 的水平均无相关性。

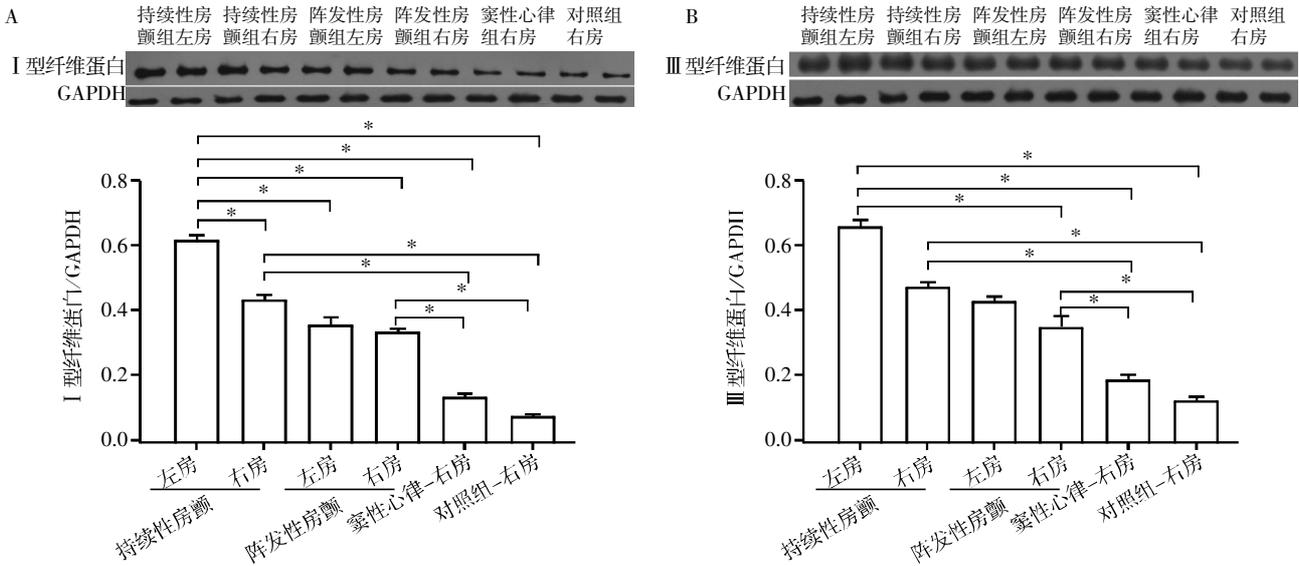
2.6 房颤患者左右心房核内 NF-AT3、NF-AT4 水平与血清 PINP、PⅢNP、PICP、TGF-β1 水平之间的关系

房颤患者的左心房组织中核内 NF-AT3 的水平和 PICP ($r=0.538$, $P < 0.01$)、TGF-β1 ($r=0.044$, $P < 0.01$) 的水平具有相关性,核内 NF-AT4 的水平和 PICP ($r=0.282$, $P < 0.01$)、TGF-β1 ($r=0.324$, $P < 0.05$) 的水平具有相关性。房颤患者的右心房组织中核内 NF-AT3 的水平和 PICP ($r=0.538$, $P < 0.01$)、TGF-β1 ($r=0.387$, $P < 0.01$) 的水平有相关性,核内 NF-AT4 的水平和 PINP ($r=0.316$, $P < 0.01$)、PICP ($r=0.264$, $P < 0.05$) 的水平有相关性。

3 讨论

大量研究表明:心房结构重构是房颤的发病基础,决定着房颤的发生发展。但是,房颤中有关心房重构的确切机制仍未阐明。目前来看,临床上很难了解心房在什么时候出现了由于房颤而引起的结构重构,对于房颤的发生发展特别是心房结构变化如心房纤维化的程度更不好预测,如果能够发现反映心房重构的相关敏感血清学标志物,通过抽取外周静脉血及时了解心房异构发展的程度,这样可全面了解患者的病情,在发生不可逆的结构重构之前及时治疗逆转病情恶化。

通过研究发现:房颤组的 CIB1、calcineurinA、



A: I 型纤维蛋白在各组的表达; B: III 型纤维蛋白在各组的表达; 两组间比较, *P < 0.05。

图 4 I、III 型纤维蛋白在各组的表达

Figure 4 Collagen I and collagen III expressions in different groups

表 2 各组 PIII^{NP}、PINP、PICP 和 TGF-β 的血浆水平

Table 2 Plasma levels of PIII^{NP}, PINP, PICP and TGF-β in different groups

指标	持续性房颤组(n=30)	阵发性房颤组(n=30)	窦性心律组(n=30)	对照组(n=10)	P 值
P III ^{NP} (ng/mL)	88.03 ± 46.08 ^{*#}	72.96 ± 43.30 [*]	52.50 ± 29.32 [*]	14.09 ± 2.732	< 0.01
P I ^{NP} (ng/mL)	45.41 ± 42.17 [*]	34.82 ± 28.60 [*]	18.95 ± 17.34	6.940 ± 3.007	< 0.01
TGF-β1(pg/mL)	49.01 ± 28.67 ^{*#Δ}	27.96 ± 13.16 [*]	24.09 ± 14.10	11.43 ± 2.695	< 0.01
PICP(ng/mL)	43.42 ± 3.699 ^{*#Δ}	36.06 ± 7.710 [*]	29.75 ± 9.241 [*]	12.52 ± 3.033	< 0.01

与对照组比较, *P < 0.05; 与窦性心律组比较; #P < 0.05; 与阵发性房颤组比较, ΔP < 0.05。

表 3 房颤患者的左右心房中核内 NF-AT3、NF-AT4 与 I、III 型纤维蛋白的相关性分析

Table 3 Correlation between expression of collagen I and III and nuclear NF-AT3 and NF-AT4 in the left and right atria of patients with atrial fibrillation

指标	部位	核内 NF-AT3	核内 NF-AT4
I 型纤维蛋白	左房	r=0.447, P < 0.01	r=0.070, P=0.585
	右房	r=0.469, P < 0.01	r=0.141, P=0.267
III 型纤维蛋白	左房	r=0.774, P < 0.01	r=0.421, P < 0.01
	右房	r=0.740, P < 0.01	r=0.404, P < 0.01

calcineurinB、NF-AT3、NF-AT4 的蛋白表达明显增高,特别是左心房中。持续性房颤组 calcineurin 系统的各节点蛋白表达明显高于窦性心律组。实验数据显示:在房颤患者心房组织中,calcineurin 激活所必须的 CIB1 表达显著升高,催化亚基 calcineurinA 和调节亚基 calcineurinB 过度表达,核内 NF-AT3、NF-AT4 表达明显增加。因此推断房颤过程中 calcineurin 系统被完全激活,并可能在房颤的结构变化中起着重要作用。

同时,为了找到能够反映房颤过程中心房异构

的敏感血液学标志物,也进行了深入分析。研究发现对于房颤患者而言,核内 NF-AT3、核内 NF-AT4 的表达水平与心房中的 I、III 型纤维蛋白水平显著相关。这进一步证明了很多学者的推断,calcineurin 系统的激活和组织的纤维化有着千丝万缕的联系。心肌间质胶原网络是保持心脏结构完整、维持心房正常功能的重要成分,主要由 I、III 型纤维蛋白构成。在房颤的发生发展过程中, I、III 型纤维蛋白异常增生所引起的心肌胶原基质重构是导致心肌间质纤维化的主要原因,首先在细胞内合成前纤维蛋白,然后再释放到细胞外才能转换为纤维蛋白。P I C P、P I N P、P III N P 就是脱离前纤维蛋白后以游离形式进入血液的肽段^[19-20],而 P I C P、P I N P、P III N P 可作为 I、III 型纤维蛋白合成的标记物,反映出纤维蛋白合成的活跃程度。TGF-β1 是一种具有多种生物活性的炎性细胞因子,房颤的发生发展过程中,可以通过激活内皮细胞、招募炎症细胞、增加炎性细胞因子的产生等多种途径来促使心肌肥大、心肌细胞纤维化。其在血液中的分泌情况也是组织中炎症及纤维

化活跃程度的反映。

本研究数据显示持续性房颤组血清中的P I NP、P III NP、PICP 水平明显升高。通过分析这些纤维标志物与各个心房纤维蛋白的相关性,我们证明P I NP 和 TGF- β 1 可作为房颤患者左心房纤维化的敏感标记物,P I CP 可作为房颤患者右心房纤维化的敏感标记物。通过分析这些纤维标志物与各个心房核内 NF-AT3 和 NF-AT4 的相关性,证明核内 NF-AT3 在左、右心房的表达与房颤患者血清中的PICP和 TGF- β 1 水平相关;核内 NF-AT4 在左心房的表达与 PICP 和 TGF- β 1 水平有关,在右心房的表达和PICP和P I NP 的水平有关。综合左、右心房纤维化程度与纤维蛋白血清标志的相关性分析,本研究得出推论,对左、右两心房的纤维化程度进行评估时,与其他纤维蛋白血清标志物P I NP和 P III NP 相比较,血清PICP和 TGF- β 1 的水平能更好地反映心房重构程度,同时也可以反映出 calcineurin 系统在心房组织内激活的程度。该课题只研究并讨论了 calcineurin-NFAT 通路中各个节点蛋白在房颤中发生的现象学改变,并未就其分子机制展开进一步地研究和分析,故有待于细胞学实验和动物实验来阐明。

[参考文献]

[1] Wyse DG,Gersh BJ. Atrial fibrillation;a perspective; thinking inside and outside the box[J]. *Circulation*, 2004,109(25):3089-3095

[2] Burstein B,Nattel S. Atrial fibrosis;mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008,51(8):802-809

[3] Ross J Jr. Left ventricular function and the timing of surgical treatment in valvular heart disease[J]. *Ann Intern Med*, 1981,94(4 pt 1):498-504

[4] Otto CM. Valvular aortic stenosis;disease severity and timing of intervention [J]. *J Am Coll Cardiol*,2006,47(11):2141-2151

[5] Wyse DG,Waldo AL,DiMarco JP,et al. Atrial fibrillation follow-up investigation of rhythm management(AFFIRM) investigators. a comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation[J]. *N Engl J Med*,2002,347(23):1825-1833

[6] Lin CS,Pan CH. Regulatory mechanisms of atrial fibrotic remodeling in atrial fibrillation[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008,65(10):1489-1508

[7] Kostin S,Klein G,Szalay Z,et al. Structural correlate of

atrial fibrillation in human patients[J]. *Cardiovasc Res*, 2002,54(2):361-379

[8] Mazzini MJ,Monahan KM. Pharmacotherapy for atrial arrhythmias;present and future[J]. *Heart Rhythm*,2008,5(6Suppl):S26-31

[9] Li D,Fareh S,Leung TK,et al. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs;atrial remodeling of a different sort[J]. *Circulation*,1999,100(1):87-95

[10] Allesie M,Ausma J,Schotten U. Electrical,contractile and structural remodeling during atrial fibrillation [J]. *Cardiovasc Res*,2002,54(2):230-246

[11] Weber KT,Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system[J]. *Circulation*,1991,83(6):1849-1865

[12] 黄从新,马长生,杨延宗,等. 心房颤动:目前的认识和治疗建议(二)[J]. *中华心律失常学杂志*,2006,10(3):167-197

[13] Swartz MF,Fink GW,Sarwar MF,et al. Elevated pre-operative serum peptides for collagen I and III synthesis result in post-surgical atrial fibrillation[J]. *J Am Coll Cardiol*,2012,60(18):1799-1806

[14] Heineke J,Auger-Messier M,Correll RN,et al. CIB1 is a regulator of pathological cardiac hypertrophy[J]. *Nat Med*,2010,16(8):872-879

[15] Bukowska A,Lendeckel U,Hirte D,et al. Activation of the calcineurin signaling pathway induces atrial hypertrophy during atrial fibrillation[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006,63(3):333-342

[16] Diedrichs H,Hagemeister J,Chi M,et al. Activation of the calcineurin/NFAT signalling cascade starts early in humanhypertrophic myocardium[J]. *J Int Med Res*,2007,35(6):803-818

[17] Molkentin JD,Lu JR,Antos CL,et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy [J]. *Cell*,1998,93(2):215-228

[18] Berry JM,Le V,Rotter D,et al. Reversibility of adverse, calcineurin-dependent cardiac remodeling[J]. *Circ Res*, 2011,109(4):407-417

[19] Shibasaki F,Price ER,Milan D,et al. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4[J]. *Nature*,1996,382(6589):370-373

[20] Lijnen PJ,Petrov VV,Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1) [J]. *Mol Genet Metab*,2000,71(1-2):418-435

[收稿日期] 2015-05-27