

## OPG/RANK/RANKL 轴与二尖瓣合并房颤患者术后窦性心律稳定性的相关性研究

奚雷<sup>1</sup>,曹海龙<sup>2</sup>,朱锦富<sup>1</sup>,吴延虎<sup>1</sup>,陈亦江<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院胸心外科,江苏 南京 210029;<sup>2</sup>南京大学附属鼓楼医院胸心外科,江苏 南京 210008)

**[摘要]** 目的:探讨 OPG/RANK/RANKL 轴与二尖瓣合并永久性房颤患者术后自动转复的窦性心律稳定性的关系及其临床意义。方法:选取 135 例在行单纯二尖瓣置换术后自动复律的房颤患者,根据术后 7 d 内房颤是否复发分为房颤(AF)组和窦性心律(SR)组。术中取右心耳组织,采用 Western blot 及免疫组织化学法检测组织中 OPG、RANK、RANKL 的表达,用 Masson 三色法检测组织中间质纤维化程度。结果:AF 组 RANK 和 RANKL 表达水平以及 RANKL/OPG 比值均高于 SR 组,胶原容积分数(CVF)在 SR 组显著低于 AF 组,RANK、RANKL 表达水平以及 RANKL/OPG 比值与 CVF 呈显著正相关。结论:OPG/RANK/RANKL 轴可能参与了二尖瓣合并房颤患者术后房颤的复发,因此可作为房颤上游治疗一新靶点。

**[关键词]** OPG/RANK/RANKL 轴;二尖瓣;心房颤动;窦性心律;稳定性

**[中图分类号]** R541.6

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)10-1386-05

## OPG/RANK/RANKL axis in stabilization of spontaneously restored sinus rhythm in permanent atrial fibrillation patients after mitral valve surgery

XI Lei<sup>1</sup>, CAO Hai-long<sup>2</sup>, ZHU Jin-fu<sup>1</sup>, WU Yan-hu<sup>1</sup>, CHEN Yi-jiang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Cardiothoracic Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of osteoprotegerin (OPG)/receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK)/RANK ligand(RANKL) axis in stabilization of spontaneously restored sinus rhythm in permanent atrial fibrillation patients after mitral valve (MV) surgery and study its clinical significance. **Methods:** Clinical data, biopsies of right atrial appendage were collected from 135 atrial fibrillation patients who spontaneously restored sinus rhythm after conventional isolated MV replacement. Comparison was made between patients who had recurrence of atrial fibrillation within 7 days (AF group) vs. patients with persisted sinus rhythm for more than 7 days (SR group). **Results:** The result of Western blot and immunohistochemistry showed an increased expression of RANK, RANKL and RANKL/OPG ratio in AF group than SR group. The degree of interstitial fibrosis reflected by collagen volume fraction (CVF) was also more severe in AF group than SR group, which was positively correlated with the expressions of RANK and RANKL and RANKL/OPG ratio. **Conclusion:** These findings suggest that the OPG/RANK/RANKL axis plays important roles in stabilization of restored sinus rhythm after MV surgery by stimulating AF-related atrial remodeling in atrial fibrillation patients, and possibly represents a new target for upstream treatment of atrial fibrillation.

**[Key words]** OPG/RANK/RANKL axis; mitral valve; atrial fibrillation; sinus rhythm; stabilization

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(10): 1386-1390]

心房颤动(atrial fibrillation, AF)是临床上最常见的心律失常,在接受二尖瓣手术的患者中有 40%~60%存在房颤,并且被证实是二尖瓣置换术后出现

不良结果的重要风险因素之一<sup>[1]</sup>。生存研究证实,术后转复为窦性心律能够改善心功能,减轻临床症状,减少栓塞事件的发生,从而降低房颤患者的病死率。虽然大多数房颤患者在二尖瓣手术后能自动转复为窦性心律,但其中很大一部分在术后很短时间内房颤就复发了,而小部分患者窦性心律能维持很长时

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81170158)

\*通讯作者, E-mail: YJChen@njmu.edu.cn

间,甚至房颤不再复发。因此,探索相应的干预靶点延迟二尖瓣术后房颤的复发,或者不再复发表有着极其重要的临床意义。护骨素(osteoprotegerin,OPG)/细胞核因子 $\kappa$ B受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B,RANK)/RANK配体(RANK Ligand,RANKL)轴在骨组织中的作用近年来得到了充分的研究,但近年来临床试验和流行病学同样证实了该系统与心血管疾病有关<sup>[2]</sup>。RANKL与OPG的比值,是决定该系统活性的关键,研究证实该比值的增大可通过调节组织金属蛋白酶(MMPs)系统从而加剧心肌间质纤维化程度<sup>[3]</sup>。本研究通过检测心房组织OPG/RANK/RANKL轴的表达和活性与纤维化程度,探讨其在二尖瓣术后房颤自动转复患者窦性心律稳定性中的作用。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

选取2007年11月~2010年6月在南京医科大学第一附属医院行二尖瓣置换术的135例房颤患者(术前为永久性房颤,术后自动转复为窦性心律),男54例,女81例,NYHA心功能分级:I级5例,II级45例,III级65例,IV级20例。根据术后7d内房颤是否复发将所有患者分为房颤(AF)组83例,窦性心律(SR)组52例。AF组的平均年龄( $48.8 \pm 10.2$ )岁,SR组的平均年龄( $49.0 \pm 9.4$ )岁(表1)。年龄 $>65$ 岁或有肿瘤病史、合并AF之外的心律失常、半年内有骨折病史、有瓣膜钙化或有风湿活动的征象、患有糖尿病或肾功能不全的病例不纳入研究。本研究得到了所有患者的书面知情同意和医院伦理委员会的批准。

在建立体外循环时获取右心耳组织约250mg,其中约50mg放入多聚甲醛中保存用于免疫组织化学分析,其余的除去血液和脂肪组织后立刻放入液氮中保存。135例患者均在体外循环停止后自动转为窦性心律并维持到手术结束,术后送入监护病房,持续心电图监护至少48h,之后每隔8h进行1次心电图检查,房颤复发的诊断标准为在12导联心电图上有至少持续15min的房颤波形。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Western blot

取冻存的右心耳组织50mg加入200 $\mu$ l蛋白裂解液,冰浴中机械匀浆,12000r/min离心15min,吸取上清,用BCA试剂盒蛋白定量后加上样缓冲液冻存储存。各组样品以40 $\mu$ g/孔加入SDS-PAGE凝胶电泳,电泳完毕后将其中干式转印至PVDF膜,

5%脱脂奶粉封闭后加入稀释一抗(兔多抗人OPG多克隆抗体,大鼠抗人RANK单克隆、大鼠抗人RANKL抗体以及HRP标记的大鼠抗人GAPDH单克隆抗体),室温下作用2h,后加入HRP标记的抗兔、抗鼠IgG二抗,后加入ECL发光液1ml孵化,X线胶片曝光5min,将PVDF膜上的目的蛋白条带在图像分析系统进行光密度扫描,测定积分光密度值。

#### 1.2.2 免疫组化染色

对石蜡包埋的组织标本进行切片,并在65 $^{\circ}$ C烤箱中烘烤1.0~1.5h;切片脱蜡:二甲苯I和二甲苯II各8min,100%乙醇I、95%乙醇I和II、80%乙醇、70%乙醇各5min,流水冲洗1min,PBS浸泡5min;抗原修复:加入10mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH6.0),微波炉加热13min后补充缓冲液后再加热12min,自然冷却至不烫手,蒸馏水洗2次,每次1min,PBS浸泡3min;3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶10min,蒸馏水洗2次,每次1min,PBS浸泡10min;OPG、RANKL和RANK单抗室温孵育1h,蒸馏水洗2次,每次1min,PBS洗3次,每次3min;抗兔及抗鼠IgG抗体室温孵育30min;蒸馏水洗2次,每次1min,PBS洗3次,每次3min;现配的DAB室温孵育5~30min,PBS洗1min,自来水洗1min;苏木素复染1min,自来水洗1min,1%盐酸乙醇分化30s,沸水返蓝1min;脱水:95%乙醇5min,100%乙醇5min,二甲苯I和二甲苯II各2min,吹干;树胶封片,观察。

#### 1.2.3 Masson 三色染色

石蜡切片3~4 $\mu$ m脱蜡至水,Harris苏木素染3min流水冲洗,1%的盐酸酒精分化3~5s流水冲洗,温水返蓝1min流水冲洗,丽春红酸性品红加温染3min,蒸馏水冲洗,1%磷钼酸分化1min,不洗,擦净载玻片上的磷钼酸残液,2%苯胺蓝复染1min,95%的酒精冲洗,95%酒精及无水酒精脱水,冷风吹干,中性树胶封片。染色的结果胶原纤维呈蓝色,胞质、肌纤维和红细胞呈红色,胞核呈蓝褐色。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS17.0软件进行分析,计量数据均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,符合正态分布的均数间比较用 $t$ 检验,非正态分布采用Mann-Whitney U秩和检验。分类变量用 $\chi^2$ 检验,心功能等级用秩和检验。相关分析应用Spearman相关性检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

## 2.1 患者的一般情况

两组患者性别、年龄、AF持续时间、左室舒张末内径、左室收缩末内径、射血分数比较差异无统计学意义;AF组的C反应蛋白、左房内径、右房内径均高于SR组,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ,表1)。

表1 入组患者一般情况

变量	AF组(n=83)	SR组(n=52)	P值
男/女(n)	36/47	18/34	0.312
年龄(岁)	48.8 ± 10.2	49.0 ± 9.4	0.921
C反应蛋白(mg/L)	5.8 ± 2.4	3.6 ± 2.0	<0.001
AF持续时间(年)	2.6 ± 1.5	2.6 ± 1.5	0.953
心功能等级(I/II/III/IV)	3/29/34/17	2/16/31/3	0.067
左室舒张末内径(mm)	52.9 ± 8.2	51.3 ± 9.6	0.116
左室收缩末内径(mm)	36.4 ± 6.9	35.8 ± 8.4	0.283
射血分数(%)	62.0 ± 5.8	62.9 ± 5.2	0.107
左房内径(mm)	60.8 ± 8.2	46.9 ± 5.0	<0.001
右房内径(mm)	46.3 ± 5.9	41.4 ± 3.7	<0.001
术后住院时间(d)	17.1 ± 3.2	14.0 ± 2.5	<0.001

## 2.2 OPG/RANK/RANKL蛋白的相对表达量

免疫组化检测两组心耳组织中OPG、RANK、RANKL蛋白表达情况见图1A,AF组中OPG蛋白表达量为 $0.779 \pm 0.171$ ,SR组中OPG蛋白表达量为 $0.767 \pm 0.123$ ,两组之间的差异无统计学意义(图1B);AF组中RANKL蛋白表达量为 $1.092 \pm 0.195$ ,SR组中RANKL蛋白表达量为 $0.701 \pm 0.147$ ,差异有统计学意义(图1C);AF组中RANK蛋白表达量为 $0.765 \pm 0.143$ ,SR组中RANK蛋白表达量为 $0.666 \pm 0.133$ ,差异有统计学意义(图1D);AF组中RANKL/OPG比值为 $1.444 \pm 0.292$ ,SR组中RANKL/OPG比值为 $0.917 \pm 0.129$ ,差异有统计学意义(图1E)。

## 2.3 心耳组织间质纤维化程度

心耳组织间质纤维化程度用胶原容积分数(collagen volume fraction,CVF)表示,AF组的CVF为 $12.55 \pm 1.75$ ,SR组的CVF为 $9.95 \pm 1.34$ ,两者之间差异有统计学意义( $P < 0.001$ ,图2)。

## 2.4 相关性分析

心耳组织RANK、RANKL表达水平、RANKL/OPG比值与胶原容积分数成显著的正相关,与OPG表达水平无显著相关(表2)。

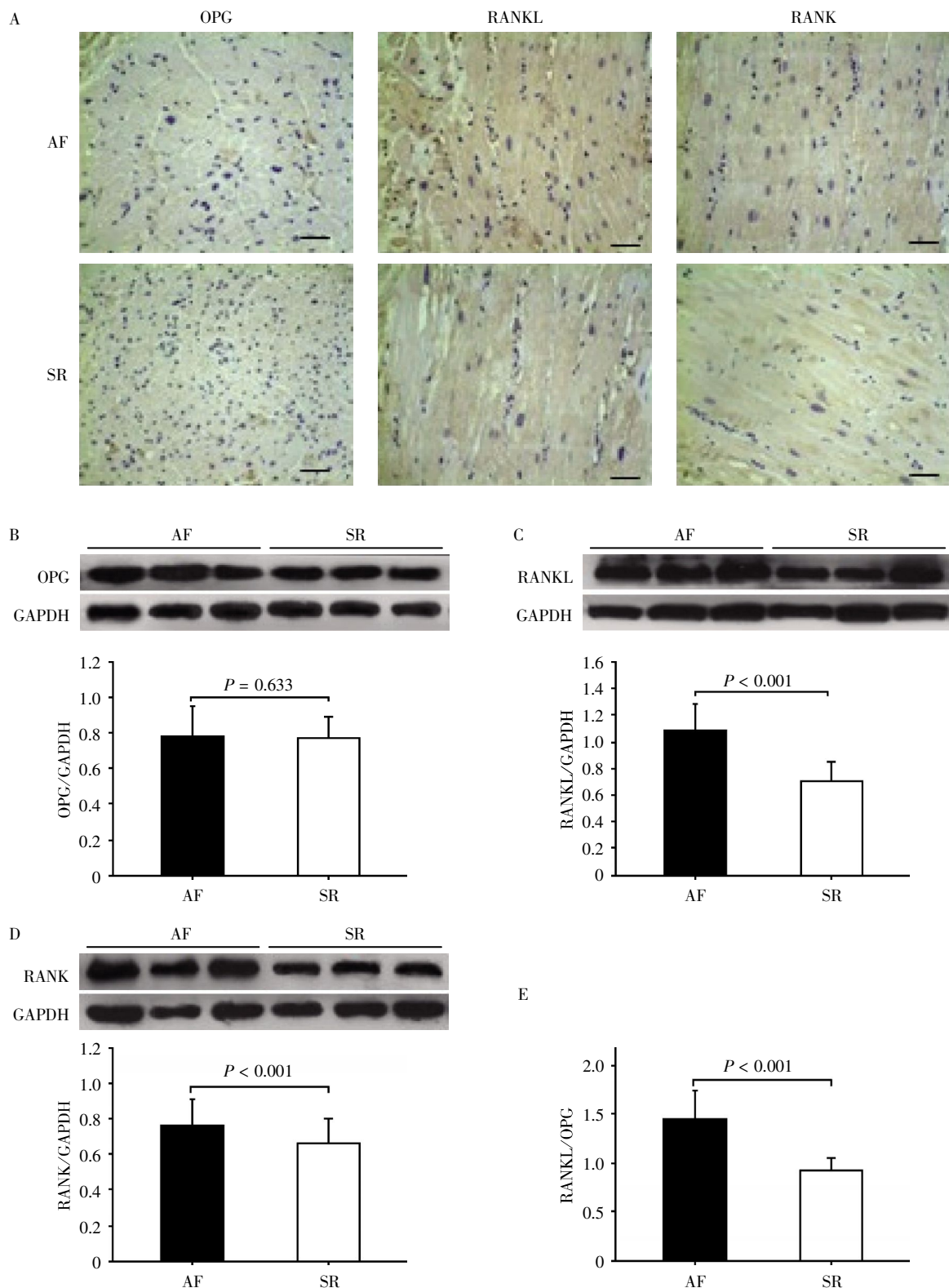
## 3 讨论

之前大量的研究已证实术前巨大左心房( $>55$  mm)、房颤持续时间( $>2$ 年)可作为房颤患者二尖瓣

术后复发的危险因素<sup>[4]</sup>,但目前还没有一个可靠的生物学指标能预示哪些房颤患者在二尖瓣术后能维持稳定的窦性心律。从本研究中发现AF组RANK、RANKL蛋白的表达量以及RANKL/OPG比值均高于SR组,OPG/RANK/RANKL轴活性、表达增加与心房中CVF有较大的相关性,并且更为重要的是我们已经证实术后能稳定维持窦性心律与心房中的OPG/RANK/RANKL轴有关。

房颤的复发可能与心房重构这一生物学现象有关,它会引起心房的结构性能与心肌细胞的不可逆性的改变,从而成为房颤的一个重要基质<sup>[1]</sup>。OPG/RANK/RANKL轴的表达和活性的增加与心房纤维化的程度以及胶原纤维I、III水平成正相关<sup>[7]</sup>,胶原纤维I和胶原纤维III是心脏组织中主要的胶原纤维,并维持着心肌组织的结构完整性,当胶原的合成与降解失衡时正常的胶原纤维网络被破坏并导致心房纤维化的发生<sup>[5]</sup>。

RANKL是肿瘤坏死因子家族成员之一,可以与RANK结合,OPG是RANKL的可溶性诱骗受体,OPG通过与RANKL结合从而阻止RANKL与RANK的结合,阻止破骨细胞分化、活化<sup>[6]</sup>。Ueland等<sup>[7]</sup>发现在人类的纤维母细胞中,RANKL的高调控表达与MMPs活性的增加以及其抑制剂基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)表达的减少有关。而MMPs活性增高和TIMPs表达水平降低可能在房颤心肌重构中起一定作用,两者之间的动态失衡会加速心肌重构的进程<sup>[8]</sup>。从该实验中本研究推测OPG/RANK/RANKL轴可能是房颤纤维化并加重心房重构的一个重要调控机制,心房发生结构重构后难以逆转,导致二尖瓣术后房颤的复发。其可能的机制为:RANK及RANKL的相互作用激活了细胞核因子 $\kappa$ B以及激活蛋白1,其共同反应元件在凝胶MMPs基因的启动子区域<sup>[9-10]</sup>。因此连同之前在心脏衰竭中的研究发现<sup>[11-12]</sup>,不难相信OPG/RANK/RANKL轴的表达及活性增加能激活这两个通路并且通过刺激MMP/TIMP系统的活性促进细胞外基质退化和纤维化结构组织在心房的沉积,最终导致了房颤的发生与发展。同时OPG能单独在单核细胞中增加MMP-9、MMP-2的活性,而MMP-2是引起心房肌纤维化的重要细胞因子<sup>[13]</sup>,并且通过与RANKL的结合抑制其快速消除并使其维持在一定的水平,因此进一步加重纤维化的程度,加速心房的重构<sup>[14]</sup>。另外,炎症在心房的重构中同样起着非常重要的作用,并且在心脏电复律后有房颤复发的倾向<sup>[15]</sup>。研



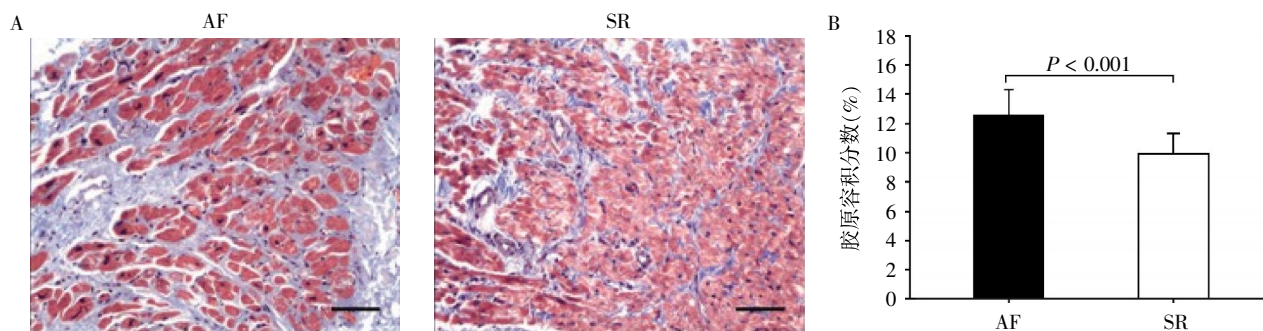
A: 免疫组化图; B~D: Western blot 表达标准图及统计柱状图; E: RANKL/OPG 比值统计图。

图 1 免疫组化和 Western blot 分析 OPG、RANK、RANKL 在右心耳组织中的表达与分布

Figure 1 Expression and localization of OPG/RANK/RANKL axis in RAAs detected by IHC and western blot

究表明 OPG 和 RANKL 能调控炎症反应,相反,炎症因子同时也能促进 OPG/RANK/RANKL 轴的活性,通过合成白明胶酶 MMP-2 和 MMP-9 引起血小

板的不稳定<sup>[16]</sup>, 所以 OPG/RANK/RANKL 轴和炎症的相互作用也能促进心房重构及房颤的发展。由此可见 OPG/RANK/RANKL 轴在房颤的心房重



A: Masson 染色图( $\times 200$ , Bar =50  $\mu\text{m}$ ); B: 两组胶原容积分数统计柱状图。

图 2 两组间心耳组织间质纤维化程度比较

Figure 2 The interstitia fibrosis in RAAs of two groups

表 2 OPG/RANK/RANKL 轴表达及 RANKL/OPG 比值与间质纤维化程度的相关性分析

Table 2 Correlations between expression of OPG/RANK/RANKL axis, RANKL/OPG ratio and degree of interstitial fibrosis in RAA

	胶原容积分数	
	相关系数	P 值
OPG	-0.090	0.302
RANKL	0.668	< 0.001
RANK	0.294	0.001
RANKL/OPG	0.745	< 0.001

构中起着重要的调控作用。

[参考文献]

[1] Cao H, Xue L, Xu X, et al. Heat shock proteins in stabilization of spontaneously restored sinus rhythm in permanent atrial fibrillation patients after mitral valve surgery [J]. Cell Stress Chaperones, 2011, 16(5): 517-528

[2] Kiechl S, Werner P, Knoflach M, et al. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system; a bone key to vascular disease [J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2006, 4(6): 801-811

[3] Ueland T, Yndestad A, Øie E, et al. Dysregulated osteoprotegerin/RANK ligand/RANK axis in clinical and experimental heart failure [J]. Circulation, 2005, 111(19): 2461-2468

[4] 张玉玲, 王丽丽, 刘秀兰. 二尖瓣置换术后房颤自动复律因素的临床研究 [J]. 实用全科医学, 2008, 6(4): 351-352

[5] 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

[6] Ando K, Mori K, Rédini F, et al. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology [J]. Curr Drug Discov Technol, 2008, 5(3): 263-268

[7] Cao H, Li Q, Li M, et al. Osteoprotegerin/RANK/RANKL axis and atrial remodeling in mitral valvular patients with atrial fibrillation [J]. Int J Cardiol, 2011, [Epub ahead of print]

[8] Chen CL, Huang SK, Lin JL, et al. Upregulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation [J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45(6): 742-753

[9] Wu KI, Schmid-Schönbein GW. Nuclear factor KappaB and matrix metalloproteinase induced receptor cleavage in the spontaneously hypertensive rat [J]. Hypertension, 2011, 57(2): 261-268

[10] Huang D, Wang Y, Yang C, et al. Angiotensin II promotes poly(ADP-ribose)ylation of c-Jun/c-Fos in cardiac fibroblasts [J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 46(1): 25-32

[11] Liu W, Feng W, Wang F, et al. Osteoprotegerin/RANK/RANKL axis in cardiac remodeling due to immunoinflammatory myocardial disease [J]. Exp Mol Pathol, 2008, 84(3): 213-217

[12] Feng W, Li W, Liu W, et al. IL-17 induces myocardial fibrosis and enhances RANKL/OPG and MMP/TIMP signaling in isoproterenol-induced heart failure [J]. Exp Mol Pathol, 2009, 87(3): 212-218

[13] 熊日新. 心房纤维化与心房颤动 [J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2009, 23(5): 450-452

[14] Moran CS, McCann M, Karan M, et al. Association of osteoprotegerin with human abdominal aortic aneurysm progression [J]. Circulation, 2005, 111(23): 3119-3125

[15] 陆志斌, 陈亦江, 吴延虎, 等. 心房组织中 5-HT<sub>4</sub> 受体亚型基因的变化与房颤发生与维持 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2009, 29(5): 678-681

[16] Sandberg WJ, Yndestad A, Øie E, et al. Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(4): 857-863