

风湿性二尖瓣狭窄伴心房颤动患者血红素 氧合酶-1 的表达*

任贝贝¹ 郭俊杰² 王雪春² 李永红²

[摘要] 目的:观察血红素氧合酶(HO)-1与风湿性二尖瓣狭窄伴心房颤动(房颤)患者心肌重构的关系,探讨HO-1在房颤心肌重构中的作用及机制。方法:选取风湿性心瓣膜病行换瓣手术患者60例,将其分为窦性心律组(21例)及房颤组(39例),术前常规行心电图、超声心动图、X线等相关检查。外科换瓣手术时取右心耳组织约200mg,通过组织学检查、逆转录聚合酶链反应和Western blot技术分别检测心肌纤维化程度、HO-1及丝裂原活化蛋白激酶p38的表达水平。结果:①HE染色及Masson染色显示,房颤组心肌纤维化程度较窦性心律组显著;②与窦性心律组相比,房颤组HO-1 mRNA及蛋白表达均明显上调,p38蛋白表达明显升高(均 $P < 0.05$)。结论:风湿性心脏病房颤患者心房重构过程中,HO-1和p38的表达均显著升高;HO-1表达增高可能与p38通路的激活有关。

[关键词] 心房颤动;血红素氧合酶-1;丝裂原活化蛋白激酶 p38

[中图分类号] R541.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1439(2013)03-0176-03

Expression of heme oxygenase-1 in atrial fibrillation patients with rheumatic mitral stenosis

REN Beibei¹ GUO Junjie² WANG Xuechun² LI Yonghong²

(¹Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266003, China; ²Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University)

Corresponding author: LI Yonghong, E-mail: liyonghong-66@163.com

Abstract Objective: To study the relationship between HO-1 and fibrosis of atrial fibrillation (Af) in rheumatic mitral stenosis patients, and investigate the effect of HO-1 in fibrosis of Af. **Method:** Patients with rheumatic heart disease who needed valve replacements were divided into sinus rhythm group ($n = 21$) and Af group ($n = 39$). Routine examinations, such as electrocardiogram, echocardiogram and X-ray were taken before the operations. During the operation, 200 mg right atrial tissue was cut down to test the expression of HO-1, the level of p38 and the process of intimal fibrosis by RT-PCR technique, Western blot, HE stain and Masson stain, respectively. **Result:** ①HE stain and Masson stain showed more myocardial fibrosis in Af group. ②Compared with sinus rhythm group, the mRNA expression of HO-1 and p38 were obviously upregulated in Af group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of HO-1 and p38 are both elevated in Af patients with rheumatic heart disease. The effect of HO-1 in Af may be related to the activation of p38 passageway.

Key words atrial fibrillation; heme oxygenase-1; mitogen-activated protein kinases p38

心房颤动(房颤)是临床上常见的心律失常,心房电重构、收缩重构和结构重构是房颤细胞电生理的主要表现,三者相互作用,构成了房颤发生和持续的病理生理基础^[1]。研究表明,氧化应激与房颤的电生理重构有关,慢性房颤患者的心房肌存在氧化损伤,导致了心房收缩功能障碍^[2]。血红素氧合酶(HO)-1及其产物具有抗氧化、抗细胞凋亡、抗感染、衰减炎症应答等作用,并参与适应和防御氧化应激等反应,是一种多效性的细胞保护效应分子,是机体内源性抗损伤机制之一。有研究证明,连续性激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)将引起HO-1靶基因活性的提高,并参与HO-1下游的激活。

p38是MAPK家族的重要成员,是各种细胞外刺激信号引起细胞增殖分化的细胞内信息传递的共同通路或交汇点,是将信号从表面受体传导至细胞核的关键,参与细胞增殖与分化等多种作用^[3]。本文旨在研究风湿性心瓣膜病伴房颤患者右心耳组织中的HO-1及MAPK P38表达,探讨HO-1的作用机制,为改善心房肌重构提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 对象

选取我院心外科2011-06-2011-12风湿性心瓣膜病行换瓣手术患者60例,其中单纯二尖瓣狭窄8例,二尖瓣双病变29例,联合瓣膜损害23例。排除高血压病、甲状腺功能亢进、心肌梗死和扩张型心肌病等患者。术前常规行心电图、心脏超声、X线等相关辅助检查。按发生房颤与否分为房颤组与窦性心律组:房颤组39例,男17例,女22例,年龄

* 基金项目:青岛市科学技术局资助项目(No:02-2-kj-yn-25)

¹ 青岛大学医学院(山东青岛,266003)

² 青岛大学医学院附属医院心内科

通信作者:李永红, E-mail: liyonghong-66@163.com

(51.92±10.42)岁,均具有6个月以上的慢性房颤;窦性心律组21例,男9例,女12例,年龄(51.00±14.71)岁。房颤组与窦性心律组性别、年龄、左心室射血分数(LVEF)[(60.15±6.90):(64.38±9.79)]和心功能(NYHA分级)[(3.13±0.47):(2.90±0.30)]差异无统计学意义,但房颤组左心房内径较窦性心律组明显增大。

1.2 方法

1.2.1 组织学检查 无菌条件下取右心耳组织约200 mg,其中100 mg组织-80℃冻存,其余置入10%甲醛中固定,制作石蜡包块,行常规HE及Masson染色切片,在光镜下观察心肌细胞纤维化情况。

1.2.2 Western blot 检测 Western blot检测心肌组织HO-1(美国SANTA CRUZ公司)和p38(美国SANTA CRUZ公司)的蛋白表达水平。蛋白提取液提取右心耳组织50 mg的蛋白,变性煮沸5 min后以每孔15 μl上样,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及电转膜后,分别加入稀释的HO-1抗体(1:200)、p38抗体(1:200)和GAPDH抗体(1:400)进行一抗反应,然后加入稀释后的山羊抗小鼠IgG(1:7000)行二抗反应及显色。数字凝胶成像系统拍照并分析目的蛋白的表达情况,以蛋白带的灰度峰值代表HO-1和p38蛋白表达量。

1.2.3 RT-PCR 检测 总RNA的提取:取30 mg冻存的心肌组织,加入Trizol试剂(美国,Invitrogen公司)1 ml,再经氯仿与异丙醇提取总RNA。采用紫外分光光度计测定波长260、280吸光度(A)值,并计算 A_{260}/A_{280} ,所有样本的 A_{260}/A_{280} 均在1.7~2.6。逆转录聚合酶链反应(RT-PCR):按逆试剂盒(日本,TAKARA公司)要求的标准进行,反应条件为:65℃ 5 min,4℃ 5 min。HO-1和内参照GAPDH引物如下:HO-1上游引物:5'-CAGTGC-CACCAAGTTCAA-3',下游引物:5'-TAAGGAC-CCATCGGAGAA-3',扩增片段长度为299 bp;GAPDH上游引物:5'-TCAITGGGTGTGAACCATGAGAA-3',下游引物:5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3',扩增片段长度为146 bp。PCR条件为98℃ 10 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,共38个循环,最后72℃延伸5 min。反应产物

在15 g/L的琼脂糖凝胶上电泳,结果用凝胶成像分析仪进行分析。将每份标本的目的基因扩增条带与内参照扩增条带的平均A值作为目的基因mRNA含量的相对值。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间分析运用t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 和 Masson 染色结果

HE染色显示:窦性心律组患者心房肌细胞核大而清晰,边界清楚,心肌纤维排列整齐,有明显胞核,包绕的间质组织较少,规则的纤维网充填整个心肌细胞,间质内存在中等数量的、形状规则的成纤维细胞;房颤组患者心房肌细胞肥大,数目减少,细胞核大小不等,心肌纤维排列紊乱,可见断裂的肌纤维;结缔组织大量增生,心肌细胞间隔增宽。Masson染色显示:窦性心律组患者心肌间隙较窄,胶原占据少,分布均匀,少量分布于心肌纤维之间,相邻细胞的胶原纤维网结构完好;房颤组患者心肌细胞排列紊乱,核呈灰蓝色,胶原纤维排列紊乱,分布不均匀,大量填充于肌纤维之间,相互连接成网状。房颤组胶原纤维面积占整个视野面积的百分比较窦性心律组显著升高[(24.80±5.30%):(19.58±5.07%), $P < 0.05$]。相关染色结果见图1。

2.2 HO-1 的 mRNA 水平

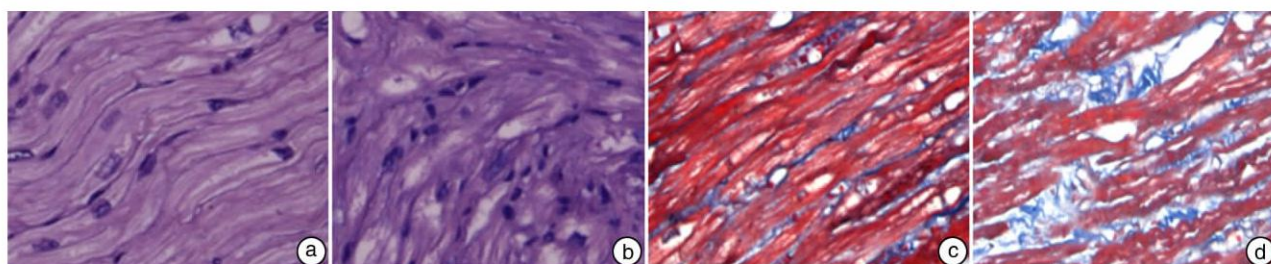
与窦性心律组相比,房颤组中HO-1 mRNA的表达明显升高[(0.722±0.174):(0.517±0.130), $P < 0.01$]。图像结果见图2。

2.3 HO-1 和 p38 蛋白表达水平

与窦性心律组相比,房颤组HO-1[(14.06±4.93):(17.68±5.77)]和p38[(13.30±3.90):(16.54±5.49)]蛋白表达均明显增高(均 $P < 0.05$),见图3。

3 讨论

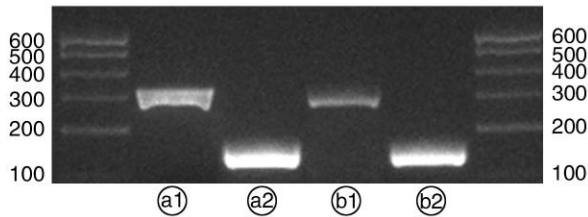
房颤是一种临床上常见的心律失常,是以无序的心房激动伴随其后发生的心房机械功能退化为特征的室上性快速性心律失常。目前普遍认为,瓣膜病并发房颤者,心房重构是诱发房颤的重要原



a: 窦性心律组 HE 染色; b: 房颤组 HE 染色; c: 窦性心律组 Masson 染色; d: 房颤组 Masson 染色。

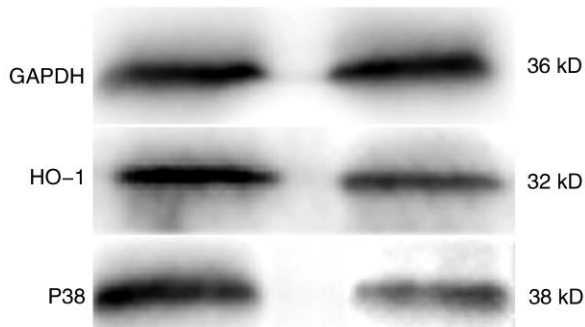
图1 心肌 HE 与 Masson 染色(×200)

Figure 1 HE and Masson staining of myocardial (×200)



a1:房颤组 HO-1 扩增图像;a2:房颤组 GAPDH 扩增图像;b1:窦性心律组 HO-1 扩增图像;b2:窦性心律组 GAPDH 扩增图像。

图2 HO-1 PCR 扩增图像
Figure 2 PCR image of HO-1



左列为房颤组,右列为窦性心律组。

图3 HO-1 与 p38 蛋白表达
Figure 3 Expression of HO-1 and p38 protein

因^[4]。本研究观察到风湿性心脏瓣膜病房颤患者心房细胞存在肥大、水肿、纤维化及肌纤维溶解等结构变化。房颤发生心肌重构的机制尚不清楚,氧化应激可能是其重要原因^[2]。近年研究发现,炎症、心肌重构及房颤之间相互影响,相互作用^[5]。HO作为一种关键生物分子,广泛存在于各组织,在心、肺、肾、肝脏、脾脏等血细胞代谢活跃的器官中表达较多,参与适应和防御氧化应激等细胞应激反应。迄今为止发现的HO有3种由不同基因所编码的同工酶:HO-1、HO-2与HO-3,其中HO-1为诱导型,HO-2与HO-3为结构型。HO-1在氧化应激状态下表达明显增加,后两种表达相对稳定。

HO-1对心血管系统有重要的保护作用:维持系统稳定性、减轻损伤后的不良重构及保护血管内皮细胞等^[6]。Depre等^[7]指出,HO-1具有抑制心肌肥大的作用,能减轻内皮素及血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)所致的心血管重构。目前,对HO-1心血管保护作用的研究主要集中在基础研究,临床研究相对较少。本实验通过观察和比较窦性心律组与房颤组心肌纤维化程度和心肌组织中HO-1及p38 mRNA与蛋白的表达,探讨HO-1和房颤患者心肌重构的关系。我们发现,房颤组患者HO-1表达明显高于窦性心律组,提示严重疾病对HO-1可能有强诱导作用,HO-1表达增加是机体对疾病损害的一种自身保护反应。我们推测HO-1是心肌的一

种保护酶,在对抗心肌重构中发挥抗氧化、抗细胞凋亡、抗感染及衰减炎症应答等重要作用。由于平滑肌纤维化随心肌重构而加重,考虑HO-1的表达增加与心肌细胞纤维化后细胞发生应激反应有关。

此外,MAPK介导的信号转导途径是细胞内多种细胞增殖信息传递的共同通路,p38是MAPK家族的重要细胞外信号调节激酶,是介导细胞发生、分化、分裂及增殖功能的重要信号分子,在细胞重构中起重要作用^[3]。相关研究证实,MAPK参与高血压病血管重构以及心室成纤维细胞增殖等反应^[8]。本研究发现,房颤组患者p38表达明显增高,考虑MAPK也参与了房颤心房细胞的重构。Asaduzzaman等^[9]发现,连续性激活p38通路将引起HO-1靶基因活性提高,MAPK也参与了HO-1下游的激活。在本研究中,房颤组患者HO-1及p38均增高,提示HO-1发挥作用可能与p38通路激活有关。

HO-1广泛分布于多种组织,并且产生细胞保护的机制也多种多样,具有极大的研究价值,是当前国内外研究的新热点之一,并将成为心血管疾病治疗的新靶点。

参考文献

- [1] CORRADI D, CALLEGARI S, MAESTRI R, et al. Heme oxygenase-1 expression in the left atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation related to mitral valve disease: its regional relationship with structural remodeling[J]. *Hum Pathol*,2008,39:1162-1171.
- [2] BUKOWSKA A, SCHILD L, KEILHOFF G, et al. Mitochondrial dysfunction and redox signaling in atrial tachyarrhythmia[J]. *Exp Biol Med*,2008,233:558-574.
- [3] XU W, GUO T, ZHANG Y, et al. The inhibitory effect of dexamethasone on platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration through up-regulating PGC-1 α expression[J]. *Exp Cell Res*,2011,317:1083-1092.
- [4] 刘浩,曾德银,伍伟峰.心房颤动患者左房形态解剖学的CT成像特点研究[J].*临床心血管病杂志*,2010,26(4):291-294.
- [5] 任立权,彭定凤.心房颤动患者高敏C反应蛋白的变化及心房重构的关系[J].*临床心血管病杂志*,2011,27(3):175-177.
- [6] DURANTE W. Heme oxygenase-1 in growth control and its clinical application to vascular disease[J]. *J Cellul Physiol*,2003,195:373-382.
- [7] DEPREE C, WANG L, SUI X, et al. HI 1 kinase prevents myocardial infarction by preemptive preconditioning of the heart[J]. *Circ Res*,2006,98:280-288.
- [8] 冯惠平,冯惠清,尹博英,等.丝裂原活化蛋白激酶在醛固酮诱导心室成纤维细胞增殖中的作用[J].*临床心血管病杂志*,2009,25(6):456-459.
- [9] ASADUZZAMAN M, WANG Y, THORLACIUS H. Critical role of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in septic lung injury[J]. *Crit Care Med*,2008,36:482-488.

(收稿日期:2012-10-22)