

# 端粒与心力衰竭心肌纤维化的相关性研究

魏玲<sup>1</sup> 付莉<sup>1</sup> 杨晓华<sup>1</sup> 高红<sup>1</sup> 李丽娟<sup>1</sup> 刘茜<sup>1</sup> 马玲<sup>1</sup> 贾政<sup>1</sup>  
陈韦强<sup>1</sup> 甘世保<sup>1</sup> 史战国<sup>1</sup> 熊云兰<sup>1</sup> 朱姿英<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的:探讨端粒与心力衰竭(心衰)发病的关系,以及端粒在心脏重构、心肌纤维化中的作用。方法:将住院患者分为心衰组 60 例,心功能正常组 60 例。采用实时荧光定量(RT-PCR)方法检测外周血白细胞中端粒长度;应用 ELISA 方法检测上述 60 例患者血液标本血清中 P I CP, P III NP 的浓度,并与端粒长度、心功能分级及年龄等因素进行相关性分析;部分患者行心肌组织的 HE 染色。结果:①心衰组外周血白细胞端粒长度明显缩短;端粒长度与心功能分级呈负相关;②心衰组患者血清 P I CP, P III NP 含量明显增加,与心功能分级呈正相关;③心衰患者端粒长度与血清中 P III NP 呈独立的、显著的负相关;④病理切片 HE 染色提示,心衰患者病理切片中可见大片状胶原纤维沉积,心功能正常组少量胶原纤维沉积。结论:端粒的长度与心衰的发生发展,及心肌纤维化机制密切相关。

**【关键词】** 心力衰竭;端粒;心脏结构重构;心肌纤维化

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2014.07.023

**【中图分类号】** R541.6 **【文献标志码】** A

## Correlation between telomeres and myocardial fibrosis in heart failure

WEI Ling FU Li YANG Xiaohua GAO Hong LI Lijuan LIU Qian  
MA Ling JIA Zheng CHEN Weiqiang GAN Shibao  
SHI Zhanguo XIONG Yunlan ZHU Ziyin

(Department of Cardiology, Kunming General Hospital of Chengdu Military Area PLA, Kunming, 650032, China)

Corresponding author: WEI Ling, E-mail: weiling43@163.com.cn

**Abstract Objective:** This study is to investigate the relationship between telomeres and heart failure and the role of telomeres in heart remodeling and myocardial fibrosis to further definite the role of aging in the onset and progress of heart failure. **Method:** A total of 120 patients were divided into two groups, heart failure group and normal cardiac function group, each with 60 participants. We used real time fluorescence quantitative (FQ-PCR) to detect telomere length of the peripheral white blood cells and ELISA to test the serum concentration of P I CP, P III NP. Myocardial fibrosis was detected by HE dyeing. **Result:** ①In HF group, the telomere length of peripheral blood leukocyte significantly shortened; And telomere length was demonstrated to be negative correlated with cardiac function classification. ②The concentration of serum P I CP, P III NP in the HF group increased significantly; The content and age were positively related to cardiac function classification. ③Peripheral blood leukocyte telomere length in the HF group were independent, significantly negative correlated to serum P III NP. ④By performing pathological HE dyeing of the two groups, it was demonstrated that there was a large patch of collagen deposition in the heart failure patients while a few collagen deposition in the normal heart function group. **Conclusion:** The length of telomere is greatly correlated with myocardial fibrosis and the progression of HF.

**Key words** heart failure; telomere; heart structure reconstruction; myocardial fibrosis

近年来研究表明,心脏重构是心力衰竭(心衰)的重要发病机制,心肌纤维化是心脏重构的重要病理生理改变。在普通人群中,心衰的总患病率为 2%~3%,而在 70~80 岁的老年人群中,则高达 10%~20%<sup>[1]</sup>。端粒<sup>[2-3]</sup>是染色体末端的 DNA 重复序列,对染色体的末端有保护作用,是细胞衰老及细胞凋亡的一种重要机制,有研究表明端粒的缩短与心衰的发病有关。本课题运用病理学和分子

生物学的方法研究端粒的长度与心衰心脏重构心肌纤维化的相关性,探讨端粒在心衰发生发展中的作用。

### 1 对象与方法

#### 1.1 对象及分组

本实验收集了 2010-07-2013-02 期间住解放军昆明总医院的心衰患者 60 例,包括高血压病、冠心病、风湿性心脏病、先天性心脏病,扩张型心肌病等。其中男 32 例,女 28 例,年龄 28~69(57.54±13.6)岁;根据纽约心脏病协会(NYHA)心功能分级,分为 I~IV,各心衰级别的人数分别为:II 级 22

<sup>1</sup>成都军区昆明总医院心内科(昆明,650032)  
通信作者:魏玲, E-mail: weiling43@163.com.cn

例,Ⅲ级 23 例,Ⅳ级 15 例;心功能正常组 60 例,其中男 31 例,女 29 例,年龄 30~66(56.32±9.7)岁。两组均排除肺间质纤维化、肝纤维化、代谢性骨病、急性心肌梗死及慢性肝肾不全等。两组间年龄、性别、体质指数、凝血常规、血生化、血脂血糖、肝肾功能等差异无统计学意义。

### 1.2 实时荧光定量检测端粒的长度

所有入选病例,均于清晨空腹静卧采肘部静脉血 2 ml,按试剂盒说明提取总 DNA,根据美国国立生物技术信息中心(NCBI)genbank 中公布的人的端粒序列和 36B4 序列,由上海生工生物工程技术有限公司按照 Primer premier 5.0 引物设计软件设计特异性高的引物序列见表 1。

表 1 端粒和 36B4 的引物序列

Table 1 Primer sequences of telomeres and 36B4

基因	引物序列	退火温度	产物长度
端粒	5'-ggCTTgCCTTACCCT-TACCCTTACCCTTACCC TTACCCT-3'	64℃	84 bp
	5'-CggTTTgTTTgggTTTgggTTTgggTTTgggTTTgggTT-3'		
36B4	5'-CAgCAAgTgggAAg-gTgTTAATCC'	64℃	75 bp
	5'-CCCATCTATCAT-CAACgggTACAA -3'		

RT-PCR 反应体系 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 12.5 μl;DNA 1 μl;端粒或 36B4 Primer 上游 0.5 μl;端粒或 36B4 Primer 下游 0.5 μl;灭菌双蒸水 10.5 μl;总体积 25 μl。设置 RT-PCR 的标准曲线。所有反应在 ABI PrismR7300 型实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)上进行,每个标准品及样本检测均重复 2 次,取其平均 Ct 值。每次反应均设空白对照,以灭菌去离子水代替 cDNA。RT-PCR 反应条件见表 2。

表 2 RT-PCR 反应条件

Table 2 RT-PCR reaction conditions

	Step1	变性	退火	延伸	循环数	
端粒	95℃	10 min	95℃ 15 s	64℃ 60 s	72℃ 45 s	40
36B4	95℃	10 mins	95℃ 15 s	64℃ 60 s	72℃ 45 s	40

端粒长度表达结果测定:利用公式相对表达量=(待测样品目的基因初始浓度/待测样品内参基因初始浓度)/(对照样品目的基因初始浓度/对照样品内参基因初始浓度),计算待测组目的基因相对于对照组的表达差异倍数。为减小样本误差,以 36B4 作为内对照,对所得待测基因的 Ct 值进行校

正方法如下: $\Delta Ct = Ct(\text{端粒}) - Ct(36B4)$ 。用下列公式计算所有心衰组的端粒长度的相对表达量,心功能正常组作为基准,心衰组端粒长度的表达量均表达成基准的 N 倍,即  $N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

### 1.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)

检测血清 I 型前胶原羧基端肽(P I CP)、Ⅲ型前胶原氨基端肽(P III NP)的含量。

### 1.4 心肌纤维化程度的检测

用苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining),简称 HE 染色法,电镜下细胞核被苏木精染成鲜明的蓝色,软骨基质、钙盐颗粒呈深蓝色,粘液呈灰蓝色;细胞质被伊红染成深浅不同的粉红色至桃红色。

### 1.5 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,非正态分布资料经自然对数转换后进行分析,各组间比较采用独立样本 *t* 检验。呈正态分布两变量相关性采用 pearson 相关分析,等级资料相关性用 spearsman 相关分析,多因素分析采用偏相关及多重线性回归分析。使用 SPSS17.0 统计软件包进行,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组超声心动图资料比较

两组超声心动图资料比较见表 3。

表 3 两组超声心动图参数比较

Table 3 Echocardiographic parameters  $\bar{x} \pm s$

组别	左室内径 /mm	室间隔 /mm	EF/%	E/A
心功能正常组 (60 例)	47.50± 3.28	10.31± 2.67	54.08± 10.41	1.21± 0.19
心衰组 (60 例)	49.20± 3.97	11.62± 1.95	49.14± 22.9 <sup>1)</sup>	0.91± 0.19 <sup>1)</sup>

与心功能正常组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

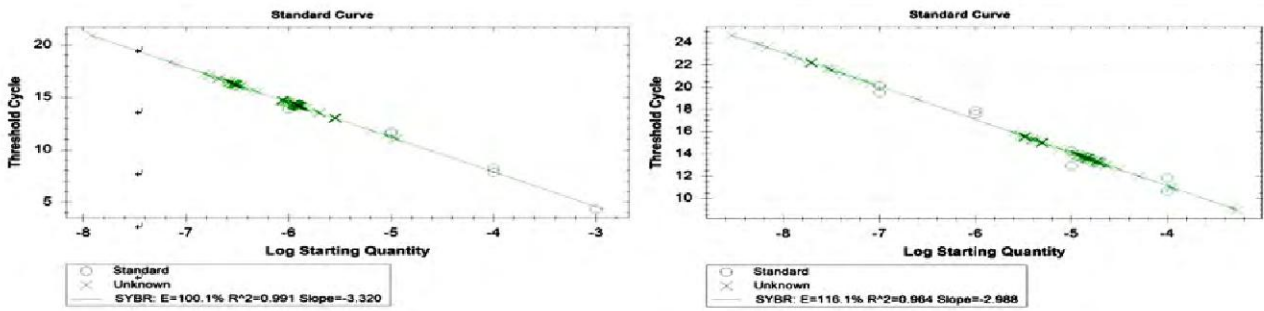
### 2.2 实时荧光定量检测端粒的长度

心功能正常组端粒长度(2.91±1.65),心衰组(0.42±0.367),差异有统计学意义,  $P < 0.01$ 。

端粒长度和内参 36B4 荧光定量 PCR 的标准曲线、扩增曲线和熔解曲线见图 1~3。

### 2.3 各组血清胶原含量与心功能的关系

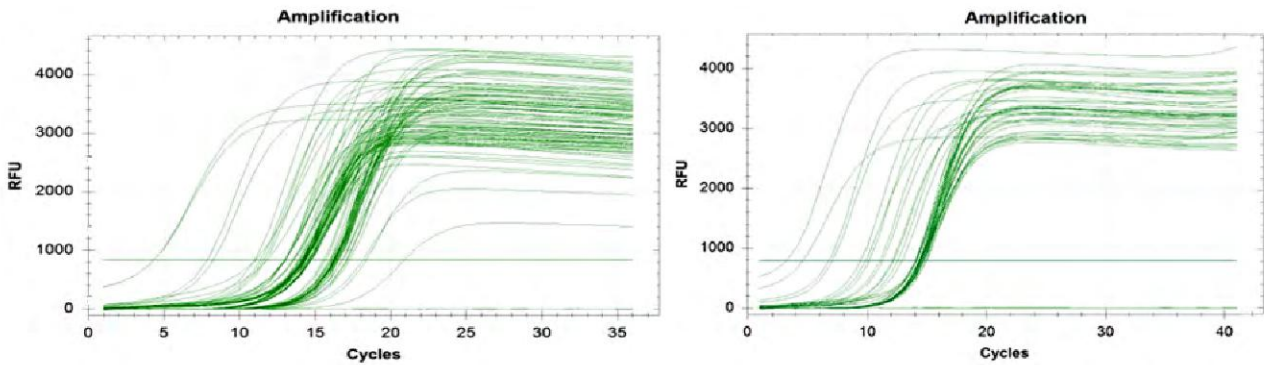
心衰组血清 PICP 浓度较心功能正常组增高[(0.49±0.40):(0.31±0.13),  $P < 0.05$ ],心衰组血清 P III NP 浓度较心功能正常组增高[(0.38±0.31):(0.13±0.09),  $P < 0.01$ ]。行 spearsman 相关分析提示,心功能分级与 PICP( $r = 0.42$ )及 P III NP( $r = 0.45$ )均呈正相关,有统计学差异,  $P < 0.05$ 。提示随着心功能的恶化,心肌纤维化加重。



左为端粒,右为内参 36B4。

图 1 端粒长度和内参 36B4 荧光定量 PCR 的标准曲线

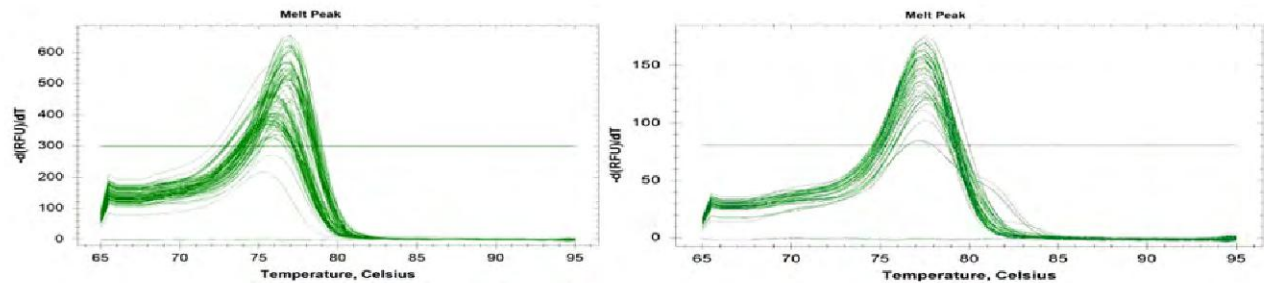
Figure 1 The standard curve



左为端粒,右为内参 36B4。

图 2 端粒长度和内参 36B4 荧光定量 PCR 的扩增曲线

Figure 2 The amplification curve



左为端粒,右为内参 36B4。

图 3 端粒长度和内参 36B4 荧光定量 PCR 的溶解曲线

Figure 3 The melting curve

#### 2.4 端粒长度与各因素的相关性分析

心衰组端粒长度与年龄、PICP、PⅢNP 呈显著负相关,  $P < 0.01$ ; 与心功能分级呈负相关, 有统计学差异,  $P < 0.05$ 。与 EF 值、E/A 比值呈弱负相关,  $P > 0.05$ 。控制年龄因素后端粒长度与 PICP 无显著相关性,  $P > 0.05$ , 但端粒长度与 PⅢNP 仍呈负相关; 且心功能分级与端粒长度的相关性更为明显。见表 4。

进一步以端粒作为因变量, 以 PICP、PⅢNP、年龄、心功能分级、EF 及 E/A 比值作为自变量进行多重线性回归分析, 结果 PⅢNP 及年龄为端粒

的独立相关因素 ( $R^2$  为 0.89, 校正后  $R^2$  为 0.793,  $P < 0.05$ ), 回归方程为:  $Y = 1.463 - 1.157X_1 - 0.006X_2$ , 对方程检验  $F = 40.165$ ,  $P < 0.001$ , 有统计学差异 (见表 5)。

#### 2.5 两组间心肌纤维化的程度比较

心肌病理切片 HE 染色提示, 心功能正常组心肌间质中仅见极少量胶原纤维; 心衰组可见心肌间质中胶原沉积增多, 心肌肌束周围可见明显胶原纤维包绕, 胶原沉积面积较心功能正常组明显增大。

表4 心衰组端粒长度与各因素相关性分析

Table 4 Correlation analysis

相关因素	<i>r</i>	偏相关系数 (控制年龄后)	<i>P</i>	<i>P</i> (控制年龄后)
年龄	-0.66		0.001	
E/A	-0.001	-0.235	0.97	
EF	0.045	-0.201	0.85	
P I CP	-0.685	-0.338	0.001	0.113
P III NP	-0.821	-0.778	0.001	0.00
心功能分级	-0.425	-0.409	0.048	0.040

表5 心衰组多重线性回归分析

Table 5 Multiple linear regression analysis

变量	偏回归系数 B	标准偏回 归系数	<i>P</i>
常数项	1.465	—	0.000
X1 (P III NP)	-1.158	-0.64	0.000
X2(年龄)	-0.007	-0.406	0.000

### 3 讨论

慢性心衰是许多原发性或继发性心血管疾病发展到一定阶段的共同表现。其发病率不断上升,死亡率居高不下,已成为严重危害人类尤其是中老年人健康的常见病、多发病<sup>[4-5]</sup>。人类对心衰病理机制的认识经历了300多年的历史。心脏重构是近年来较公认的心衰的病理机制,心肌纤维化是心肌损伤及心室重构的终末病理过程<sup>[6-7]</sup>,是心脏重构的重要病理基础。根据有无心肌细胞的坏死和疤痕出现,心肌纤维化又分反应性纤维化和修复性纤维化。近年来,有大量研究可以证实心肌纤维化与心衰的发生密切相关。国内研究发现,随着心衰时间的延长,心肌出现了明显的纤维化,且随心衰程度的加重而加重<sup>[8]</sup>;同时也有学者发现心衰患者血清胶原水平较正常对照组明显升高,其含量与心衰严重程度有关。本课题检测目前公认的胶原合成的间接标志血清 PICP 和 P III NP 含量<sup>[9]</sup>,结果表明,心衰组血清 PICP 及 P III NP 高于非心衰组,血清 PICP 及 P III NP 浓度与心衰程度呈正相关,即心衰程度越重,血清心肌胶原含量越多;同组病例经 HE 染色结果表明,心衰组胶原沉积的面积较心功能正常组明显增加。提示心衰患者存在心肌纤维化及心肌胶原的增加,且 PICP 及 P III NP 的浓度与心衰关系密切,并随心衰程度的加重而增加。提示心肌纤维化是心衰发生发展的重要病理生理机制。

端粒是真核细胞内染色体末端的 DNA 重复片段,由富含 G 的核酸重复序列和许多蛋白质组成。随着细胞持续分裂,端粒缓慢缩短。因此端粒的长度决定着细胞的寿命,故而被称作生命的时钟。近年来,越来越多的相关研究发现,端粒的长

度与许多年龄相关性疾病如原发性高血压、冠状动脉粥样硬化、心衰等心血管疾病的发生发展密切相关。2003年 Camthon 在《柳叶刀》上发表报告称端粒也许可以预测人类生存期限,端粒的缩短可通过促进多种衰老相关疾病的发生而影响寿命,端粒长度短于平均值的老人比端粒长于平均值者寿命短4~5年,死于心脏病的概率比端粒长者高3倍<sup>[10]</sup>。Oh 等<sup>[11]</sup>报道在人类心衰组织中检测到端粒缩短、TRF2 表达缺失。同时发现端粒系统的下调与心衰的发病高度相关。Leri 等<sup>[12]</sup>去除小鼠心肌细胞的端粒酶后,心肌细胞的端粒明显缩短,同时心脏的血流动力学和心脏解剖学均发生异常。Collenon<sup>[13]</sup>等用 RT-PCR 方法测定 85 岁以上受试老人的外周血中单核细胞平均端粒长度,发现端粒长度和射血分数密切相关。本研究结果与上述报道类似,发现心衰组端粒长度较非心衰组显著缩短,并与心功能分级呈显著负相关,在控制年龄因素后,心衰分级与端粒长度的相关性更加明显。说明端粒缩短与心衰的发病密切相关,而且端粒缩短可能是心衰发生发展的独立危险因素。

进一步相关性研究表明,心衰组端粒长度与 PICP、P III NP 及年龄均呈显著负相关,控制年龄因素后端粒长度与 P III NP 仍呈显著负相关,但与 PICP 不相关。心功能正常组端粒长度仍然与年龄也呈显著负相关,但与 PICP、P III NP 无相关性。以上结果说明端粒长度不仅与心衰的发病密切相关,而且与年龄及心肌纤维化密切相关,尤其与 III 型胶原呈独立的相关性。提示端粒缩短不仅是心衰发生发展的独立危险因素,而且可能通过影响心肌胶原合成及心肌纤维化心脏重构在心衰的发生发展中起重要作用。但端粒导致心肌纤维化的确切路径还不太明确。可能是由于端粒缩短促进了心肌细胞凋亡的发生,心肌细胞的减少触发了修复性纤维化增加所致<sup>[6-7]</sup>。也可能是端粒的缩短启动了胶原合成的上游基因。

### 参考文献

- [1] DICKSTEIN K, COHEN-SOLAL A, FILIPPATOS G, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)[J]. Eur J Heart Fail, 2008, 10: 933-989.
- [2] FYHRQUIST F, SAIJONMAA O, STRANDBERG T, et al. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease [J]. Nat Rev Cardiol, 2013, 10: 274-283.

• 研究报告 •

# 华法林与阿司匹林对慢性重度心力衰竭合并持续性房颤患者临床疗效的比较

张洪君<sup>1</sup> 谢年谨<sup>2</sup>

[关键词] 华法林;阿司匹林;心力衰竭;心房颤动  
doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2014.07.024  
[中图分类号] R541.6 [文献标志码] A

## Comparison between the effects of Warfar and aspirin in chronic severe heart failure patients with persistent atrial fibrillation

ZHANG Hongjun<sup>1</sup> XIE Nianjin<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiology, The Baoan District Shiyan People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, 518108, China; <sup>2</sup>Department of Cardiology, People's Hospital in Guangdong Province)

Corresponding author: ZHANG Hongjun, E-mail: szzhanghongjun@163.com

**Summary** In this study we explored whether warfarin is superior to aspirin for clinical efficacy in chronic severe heart failure patients with persistent atrial fibrillation. The result showed that incidence of cardioversion of atrial fibrillation and maintainance of sinus rhythem in warfarin group were significantly higher than aspirin group. Compared with aspirin, the incidence of primary end point and embolism were significantly reduced by warfarin. So the clinical efficacy of warfarin is better than aspirin in chronic severe heart failure patients with persistent atrial fibrillation.

**Key words** warfarin; aspirin; heart failure; atrial fibrillation

<sup>1</sup>宝安区石岩人民医院心内科(广东深圳,518108)

<sup>2</sup>广东省人民医院心内科

通信作者:张洪君, E-mail: szzhanghongjun@163.com

[3] WONG L S, HUZEN J, DE BOER R A, et al. Telomere length of circulating leukocyte subpopulations and buccal cells in patients with ischemic heart failure and their off spring[J]. PLoS One, 2011, 6:e23118.

[4] KATAOKA H. Clinical characteristics of lower-extremity edema in stage A cardiovascular disease status defined by the ACC/AHA 2001 Chronic Heart Failure Guidelines [J]. Clin Cardiol, 2013, 36:555-559.

[5] PACKER M, ANTONOPOULOS G V, BERLIN J A, et al. Comparative effect of Carvedilol and metoprolol on left ventricular ejection fraction in heart failure: results of a meta-analysis [J]. Am Heart J, 2001, 141:899-907.

[6] LE C H, MULLIGAN C M, ROUTH M A, et al. Delta-6-desaturase links polyunsaturated fatty acid metabolism with phospholipid remodeling and disease progression in heart failure [J]. Circ Heart Fail, 2014, 7:172-183.

[7] DAI D F, JOHNSON S C, VILLARIN J J, et al. Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression induced heart failure[J]. Circ Res, 2011, 108:837-846.

[8] 刘国红,孙尧. 结缔组织生长因子与慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的关系[J]. 华北煤炭医学院学报, 2009, 11(3):297-299.

[9] DIEZ J, LAVIADES C, MAYOR G, et al. Increased serum concentrations of procollagen peptides in essential hypertension relation to cardiac alterations [J]. Circulation, 1995, 91:1450-1456.

[10] OH H, WANG S C, PRAHASH A, et al. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure [J]. Proc Nat Acad Sei USA, 2003, 100:5378-5383.

[11] LEM A, FRANCO S, ZACHEO A, et al. Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation [J]. EMBO J, 2003, 22:131-139.

[12] SERRANOD A L, ANDRES V. Telomeres and cardiovascular disease: does size matter [J]. Circ Res, 2004, 94: 575-584.

[13] COLLERTON J, MARTIN-RUIZ C, KENNY A, et al. Telomere length is associated with left ventricular function in the oldest old: the Newcastle 85+ study [J]. Heart, 2007, 28:172-176.

(收稿日期:2014-01-29)