

miR-199-3p 通过靶向调控 SP1 促进成纤维细胞增殖对心房颤动心房重构的影响*

魏飞宇¹ 范洁¹ 高田¹ 王礼琳¹

[摘要] **目的:**探讨 miR-199-3p 与心房纤维化的关系及其对心房成纤维细胞增殖的影响。**方法:**连续入选 2018 年 11 月—2019 年 11 月在云南省第一人民医院心内科住院的心房颤动(AF)患者 100 例,以基线资料相匹配的非 AF 患者 50 例作为对照,利用 qRT-PCR 检测 2 组患者外周血中 miR-199-3p 的表达差异;利用受试者工作特征曲线(ROC)分析 miR-199-3p 对 AF 的诊断价值;采用 Pearson 相关分析 miR-199-3p 和左房纤维化的相关性;利用 CCK-8 测定 miR-199-3p 对成纤维细胞增殖的影响,qRT-PCR 检测细胞周期调控因子 Ki67 和 Cyclin D1 及 Collagen I 和 Collagen III 表达变化;最后利用双荧光素酶报告基因实验确定 miR-199-3p 的靶基因。**结果:**miR-199-3p 在 AF 患者外周血[(0.38±0.31):(1.25±0.89), $P<0.01$]和心房组织中[(0.48±0.03):(1.00±0.12), $P<0.01$]表达都下调,且在持续性 AF 患者中表达低于阵发性 AF[(0.42±0.20):(1.08±0.48), $P<0.01$];ROC 曲线分析 miR-199-3p 表达下降鉴别 AF 的曲线下面积(AUC)为 0.90,其敏感性为 81%,特异性为 86%,鉴别持续性 AF 的 AUC 为 0.91,其敏感性为 98%,特异性为 73%;Pearson 相关分析显示 miR-199-3p 表达水平和左房纤维化程度呈负相关($r=-0.863$, $P<0.01$);与对照组相比,沉默 miR-199-3p 表达可促进成纤维细胞增殖和纤维化,但过表达 miR-199-3p 可抑制细胞增殖和纤维化($P<0.05$);荧光素酶报告基因实验和 Western blot 证实 SP1 是 miR-199-3p 的直接靶基因。**结论:**AF 患者中 miR-199-3p 和左房纤维化呈负相关,且 miR-199-3p 通过靶向 SP1 的表达负性调控成纤维细胞增殖和纤维化,进而参与 AF 心房重构。因此,miR-199-3p 有望成为临床 AF 潜在的非侵入性诊断标志物和纤维化的预测标志物。

[关键词] 心房颤动;miR-199-3p;成纤维细胞增殖;结构重构;SP1

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2020.06.007

[中图分类号] R541.75 **[文献标志码]** A

The effect of miR-199-3p on fibroblasts proliferation to promote atrial structural remodeling by targeting SP1 in atrial fibrillation

WEI Feiyu FAN Jie GAO Tian WANG Lilin

(Department of Cardiology, Yunnan Arrhythmia Research Center, The First People's Hospital of Yunnan Province, Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming, 650032, China)

Corresponding author: WANG Lilin, E-mail: kmwanglin@163.com

Abstract Objective: To investigate the relationship between miR-199-3p and atrial fibrosis and its effect on cardiac fibroblast proliferation. **Method:** One hundred patients with atrial fibrillation hospitalized in our centre from November 2018 to November 2019 were selected consecutively, and 50 non-atrial fibrillation patients matched with baseline data were selected as the control group. qRT-PCR was used to detect the expression of miR-199-3p. The diagnostic value of miR-199-3p in atrial fibrillation was analyzed by ROC. Pearson correlation was used to analyze the correlation between miR-199-3p and left atrial fibrosis. Cell proliferation activity was determined by CCK-8, qRT-PCR was used to detect the mRNA expression level of Ki67, Cyclin D1, Collagen I and Collagen III. Finally, the target genes of miR-199-3p were determined by double luciferase reporter assay. **Result:** The expression level of miR-199-3p in peripheral blood [(0.38±0.31):(1.25±0.89), $P<0.01$] and atrial tissues [(0.48±0.03):(1.00±0.12), $P<0.01$] of patients with atrial fibrillation was down-regulated compared with control, and the expression level in persistent atrial fibrillation was lower than that in paroxysmal atrial fibrillation [(0.42±0.20):(1.08±0.48), $P<0.01$]. The miR-199-3p ROC curve analysis of AF showed that the area under the curve was 0.90 with a sensitivity of 81% and a specificity of 76%. Moreover, the miR-199-3p ROC curve analysis of persistent AF showed that the area under the curve was 0.91 with a sensitivity of 98% and a specificity of 73%. Pearson correlation analysis showed that miR-199-3p was negatively correlated with the degree of left atrial fibrosis ($r=-0.863$, $P<0.01$). Compared with the control group, silencing the expression of miR-199-3p promoted fibroblast

* 基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项面上项目(No:2019FE001(-291))

¹ 云南省第一人民医院 昆明理工大学附属医院心血管内科 云南省心律失常诊疗中心(昆明,650032)
通信作者:王礼琳, E-mail: kmwanglin@163.com

proliferation and fibrosis, but overexpression of miR-199-3p inhibited cell proliferation and fibrosis ($P < 0.05$). At last, luciferase reporter assay confirmed that SP1 was the direct target gene of miR-199-3p. **Conclusion:** miR-199-3p is negatively correlated with left atrial fibrosis, and miR-199-3p negatively regulates fibroblast proliferation and fibrosis by targeting SP1 which contributes to atrial structural remodeling in atrial fibrillation. Therefore, miR-199-3p is expected to be a potential non-invasive diagnostic biomarker for atrial fibrillation and can also be a predictive biomarker of fibrosis.

Key words atrial fibrillation; miR-199-3p; fibroblast proliferation; structural remodeling; SP1

心房颤动 (atrial fibrillation, AF) 是临床上最常见的房性心律失常,心力衰竭和脑卒中是其死亡的主要原因,AF 卒中发生率比非 AF 患者高 5~7 倍,成为严重威胁人类健康的疾病之一^[1]。目前导管射频消融已成为症状性 AF 患者的一线治疗,在阵发性 AF 患者中取得较好的效果,单次手术 10 年成功率可达到 58%,多次手术可明显降低复发率^[2]。然而对于持续性 AF 患者,其疗效仍较差^[3]。抗心律失常药物因转复率低,目前临床应用仍然受限,同时因缺乏特异性,易导致全身毒副作用和诱发恶性心律失常^[4]。但是导致持续性 AF 治疗效果差的根本原因是与其发病机制不明有关。因此,探讨 AF 发生机制对于提高 AF 的诊疗至关重要。

心房重构是 AF 发生、发展的主要病理生理学机制,也是 AF 触发和维持的病理基质^[5]。其中以心房成纤维细胞异常增殖、心肌细胞凋亡和间质纤维化为特征的心房重构是持续性 AF 的主要特征^[6]。同时心房纤维化严重程度和 AF 的病程及预后密切相关,并且改善心房纤维化可以改善 AF 的预后,降低 AF 导管射频消融后的复发率^[7]。虽然目前有报道心脏在各种不利因素刺激下引起基因及信号通路的异常表达导致成纤维细胞增殖和间质纤维化是导致 AF 心房重构的主要因素,但确切发病机制尚未阐明。因此,深入探讨 AF 心房重构的分子机制,有助于提高 AF 的诊疗。

在人类基因组中,约有 93% 的 DNA 序列可以被转录为 RNA,但仅有不到 2% 的核酸序列被用于编码蛋白质,其余的转录产物均为不编码蛋白质的非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA)^[8]。在众多类型 ncRNA 中,长度为 19~24 nt 的 miRNA 是一类进化上高度保守的非编码小分子单链,通过与靶 mRNA 的 3' UTR (untranslated region) 完全或不完全互补配对在转录后水平降解 mRNA 或抑制蛋白翻译,在心血管生理和病理过程中发挥着重要作用^[9]。已经有研究证实 miRNA 通过调控心房纤维化引起心房重构促进 AF 发生^[10],同时也可影响心房离子通道蛋白表达参与心房电重构^[11],更为重要的是,miRNA 还可作为 AF 诊断及预后的分子标志物^[12]。然而,miRNA 在 AF 中的分子机制依然有待进一步探讨,特别是关于 miRNA 如何通过

调控 AF 结构重构参与 AF 的发生发展仍有待进一步阐述。本研究首先检测 AF 患者心房组织和外周血中 miR-199-3p 表达差异,其次通过 ROC 曲线分析 miR-199-3p 对 AF 的诊断价值。最后探讨 miR-199-3p 对 AF 心房重构过程中成纤维细胞增殖和纤维化的作用及可能的分子机制,为 AF 诊断及拮抗 AF 心房病理性重构寻找新的分子靶点。

1 对象与方法

1.1 对象

入选标准:本研究包括 2 个队列人群,第一队列为连续入选 2018 年 11 月—2019 年 11 月在云南省第一人民医院心内科住院的 AF 患者,其中持续性 AF 50 例,阵发性 AF 50 例。以基线资料相匹配的非 AF 患者 50 例作为对照。有 40 例持续性 AF 患者接受导管射频消融治疗。第二队列人群为在我院心脏大血管外科接受手术的 AF 患者 6 例和窦性心律 (SR) 患者 4 例。

排除标准:①年龄 < 18 岁或 > 80 岁;②严重的潜在心血管疾病;③左房或左心耳血栓;④怀孕;⑤有口服抗凝药物禁忌证;⑥肝肾功能不全;⑦左房舒张末内径 > 50 mm;⑧左室射血分数 (LVEF) < 40%,或 NYHA II 级以上;⑨合并其他全身疾病。本研究方案经云南省第一人民医院伦理委员会批准,所有参与研究的患者均提供书面知情同意书,所有实验程序都符合《赫尔辛基宣言》。

1.2 血浆和心组织收集

采用 EDTA-K2 试管收集 10 ml 血浆,并在采集后 1 h 内进行处理,按照试剂盒操作说明书提取血浆中的 RNA,然后储存在 -80℃ 直到进一步处理。心房组织在打开右房后取适量右心耳组织,去除血和脂肪组织,立即保存于液氮中。

1.3 qRT-PCR

qRT-PCR 在 ABI 7900 实时 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems) 上进行,PCR 反应体系包括 1 μ l cDNA、1 μ l 的引物、5 μ l SYBR 和 3 μ l DEPC 水,反应条件:95℃ 1 min,95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s,60℃ 15 s,95℃ 15 min,第 2~4 步 35~40 个循环,miRNA 相对表达以 hsa-miR-16 作为内参,mRNA 相对表达以 GAPDH 为内参,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 RNA 相对表达量。

1.4 左房电压基质标测

所有入选患者完善术前准备后,术中采用局麻和芬太尼镇静,常规穿刺右侧股静脉 2 次,通过引导钢丝置入 2 根 SL1 长鞘(Swartz, SL1, 8.5F, St Jude Medical, Minnesota, USA),成功穿刺房间隔后,置入消融导管常规行双侧肺静脉电隔离,在肺静脉隔离成功后如果患者心律转为 SR,则开始左房电压基质标测,如果患者心律仍为 AF 节律,则在电复律转为窦律后开始左房电压基质标测。在三维标测系统(Carto-3, Biosense Webster)下采用 Pentary 标测导管(pentary catheter, Biosense Webster, Diamond Bar, CA)在 SR 下进行左房电压基质标测,每个患者共取 300~1000 个点。将标测电压范围设定为 0.1~0.4 mV,将低于 0.4 mV 的局部电图定义为低电压区,反映左房纤维化的程度。左房纤维化程度以左房表面低电压区面积除以左房总表面积计算。

1.5 小鼠成纤维细胞的分离

采用 Percoll 分层液(Sigma 公司)差速离心分离成纤维细胞^[13]。常规麻醉小鼠后取出心脏,去除心脏脂肪组织和血凝块,将心脏剪碎成 1 mm³ 后用 PBS 清洗转移至安培瓶中,之后,组织样本用 DMEM 培养基中包括 0.1% 胶原酶 II 和胰酶消化 10 min 后,离心后去除上清液后再次消化和离心,最后将所获得的细胞用 DMEM 悬浮。细胞纯化参照 percoll 分层液说明书,按照说明书配制不同密度 percoll 分层液,把细胞悬液加入分层液最上层,3000 r/min,离心 30 min 后可见细胞分 3 层,最上层是成纤维细胞,中间层是心肌细胞,最下层是血细胞及上皮细胞等,吸取成纤维细胞进行后续细胞培养和实验。

1.6 细胞计数盒-8 实验

采用细胞计数盒-8(CCK8)检测成纤维细胞增殖情况,将成纤维细胞以 2×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板,转染 miR-199-3p,转染 48 h 后,10 μ l 的 CCK-8 溶液加入到 90 μ l 培养液中,在 37℃、5% CO₂ 培养箱继续孵育 2 h,在 450 nm 波长酶标分析仪记录光学密度(OD)值。

1.7 Western blot

按照我们前期描述方法提取蛋白和 Western blot^[13],采用 cocktail 蛋白裂解液(蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、PMSF)提取总蛋白,BCA 法测蛋白浓度。取相同量总蛋白行 SDS-PAGE 电泳,80 V 电压 20~30 min,120 V 电压约 90 min。300 mA 湿转印 120 min,将蛋白转印到 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,根据需要加入一抗,4℃ 孵育过夜,次日根据一抗加入相应的二抗,ECL 发光液在 ChemiDoc™ XRS+ System(Bio-RAD)显影,用 Image 软件曝光加灰度值分析。

1.8 双荧光素酶报告基因检测

荧光素酶报告基因检测方法在我们前期发表的文章中有详细的描述^[14]。将包含 3'UTRs 在内的 SP1 DNA 片段插入到 EcoRI and XhoI 位置,构建 pcDNA3.0-SP1 载体。将包含靶点位置的 1.0 μ g 的荧光素酶报告载体,100 nM miR-199-3p mimics,miR-NC,0.06 μ g Renilla 荧光素酶对照载体共同转染至 HEK293 细胞中,48 h 后收集细胞,通过双荧光素酶报告基因试剂盒检测荧光素酶的活性;计算相对荧光素酶活性值。使用 Quick Change XL 位点直接突变试剂盒对人 SP1 的 miR-199-3p 结合位点的 3'UTRs 进行基因突变。

1.9 统计学处理

连续变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组之间的比较用非配对 *t* 检验或非参数 U 检验。分类变量用例数和 % 表示,组间比较采用 χ^2 检验。通过受试者工作特征(ROC)曲线确定 miR-199-3p 对 AF 的诊断价值及相应的敏感性和特异性。采用 Pearson 相关系数分析 miR-199-3p 和左房纤维化的相关性,对相对纤维化面积值进行对数变换,使其呈正态分布。采用 SPSS 16.0 和 Graphpad 7.0 软件分析和作图,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基线资料特征

本研究包括 2 个队列人群,基线人口统计学特征如表 1、2 所示。2 组人群的基线特征分布相似。

表 1 队列 1 患者的基线资料特征
Table 1 Baseline characteristics of patients in cohort 1
例(%), $\bar{x} \pm s$

参数	对照组 (50 例)	AF 组 (100 例)	P 值
男性	23(46.0)	52(52.0)	0.60
年龄/岁	61 \pm 7	66 \pm 9	0.23
高血压	28(56.0)	60(60.0)	0.73
糖尿病	13(26.0)	29(29.0)	0.85
冠状动脉疾病	11(22.0)	19(19.0)	0.67
慢性心力衰竭	3(6.0)	4(4.0)	0.69
左房舒张末内径/mm	33 \pm 5	37 \pm 4	<0.01
LVEF/%	62 \pm 5	64 \pm 5	0.29
左室舒张末内径/mm	43 \pm 8	45 \pm 9	0.23
外周血 miR-199-3p	1.25 \pm 0.89	0.38 \pm 0.31	<0.01

2.2 miR-199-3p 在 AF 患者中的表达变化

qRT-PCR 结果显示 AF 组患者外周血中 miR-199-3p 表达低于对照组[(0.38 \pm 0.31):(1.25 \pm 0.89), $P < 0.01$],见表 1;且在持续性 AF 患者外周血中表达低于阵发性 AF[(0.42 \pm 0.20):(1.08 \pm 0.48), $P < 0.01$]。进一步检测 AF 患者心房组织中 miR-199-3p 表达水平,结果显示 AF 患者心房组

织中 miR-199-3p 表达水平低于 SR 患者 $[(0.48 \pm 0.03) : (1.00 \pm 0.12), P < 0.01]$, 见表 2。

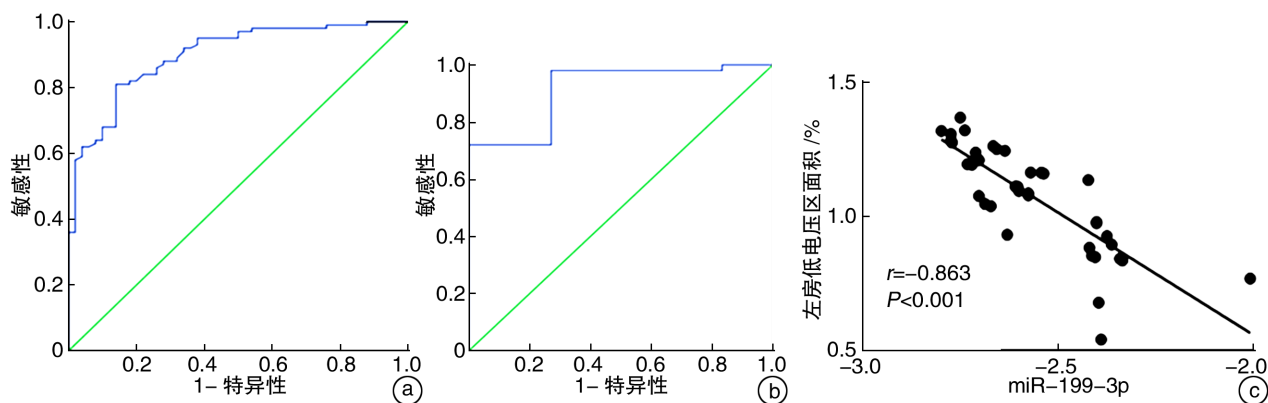
表 2 队列 2 患者的基线资料特征

Table 2 Baseline characteristics of patients in cohort 2

参数	SR 组(4 例)	AF 组(6 例)	P 值
例(%)			$\bar{x} \pm s$
男性	2(50.0)	4(67.0)	1.00
年龄/岁	51 \pm 4	53 \pm 8	0.67
风湿性心脏病	2(50.0)	5(83.0)	0.50
左房舒张末内径/mm	48 \pm 4	49 \pm 4	0.68
LVEF/%	47 \pm 3	50 \pm 4	0.30
左房舒张末内径/mm	47 \pm 3	50 \pm 4	0.30
心房 miR-199-3p	1.00 \pm 0.12	0.48 \pm 0.03	<0.01

2.3 miR-199-3p 对 AF 的诊断价值及与左房纤维化的关系

利用 ROC 曲线分析 miR-199-3p 差异表达对 AF 的诊断价值, AF 患者中 miR-199-3p 的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.90(95% CI: 0.85~0.94, $P < 0.01$), 其敏感性为 81%, 特异性为 86%(图 1a)。进一步分析外周血中下降 miR-199-3p 表达能否鉴别持续性 AF, 结果显示 AUC 为 0.91(95% CI: 0.86~0.97, $P < 0.01$), 其敏感性为 98%, 特异性为 73%(图 1b)。在通过对 40 例持续性 AF 在导管射频消融术中行左房电压基质标测左房低电压区域范围, 以反映左房纤维化程度, Pearson 相关系数分析显示 miR-199-3p 表达水平和左房纤维化程度呈负相关($r = -0.863, P < 0.01$)(图 1c)。



a: ROC 曲线分析 miR-199-3p 对 AF 的诊断价值; b: ROC 曲线分析 miR-199-3p 对持续性 AF 的诊断价值; c: Pearson 相关分析。

图 1 ROC 曲线分析 miR-199-3p 对 AF 的诊断价值及其与左房纤维化的关系

Figure 1 ROC curve analysis of the diagnostic value of miR-199-3p in atrial fibrillation and its relationship with left atrial fibrosis

2.4 miR-199-3p 对成纤维细胞增殖的影响

CCK-8 结果显示下调 miR-199-3p 表达可促进心房成纤维细胞增殖, 而过表达 miR-199-3p 表达可抑制成纤维细胞增殖。进一步检测增殖和纤维化标志物, 结果显示沉默 miR-199-3p 可促进 Ki-67、Cyclin D1、Collagen I 和 Collagen III 的表达, 而过表达 miR-199-3p 则抑制 Ki-67、Cyclin D1、Collagen I 和 Collagen III 的表达(图 2)。

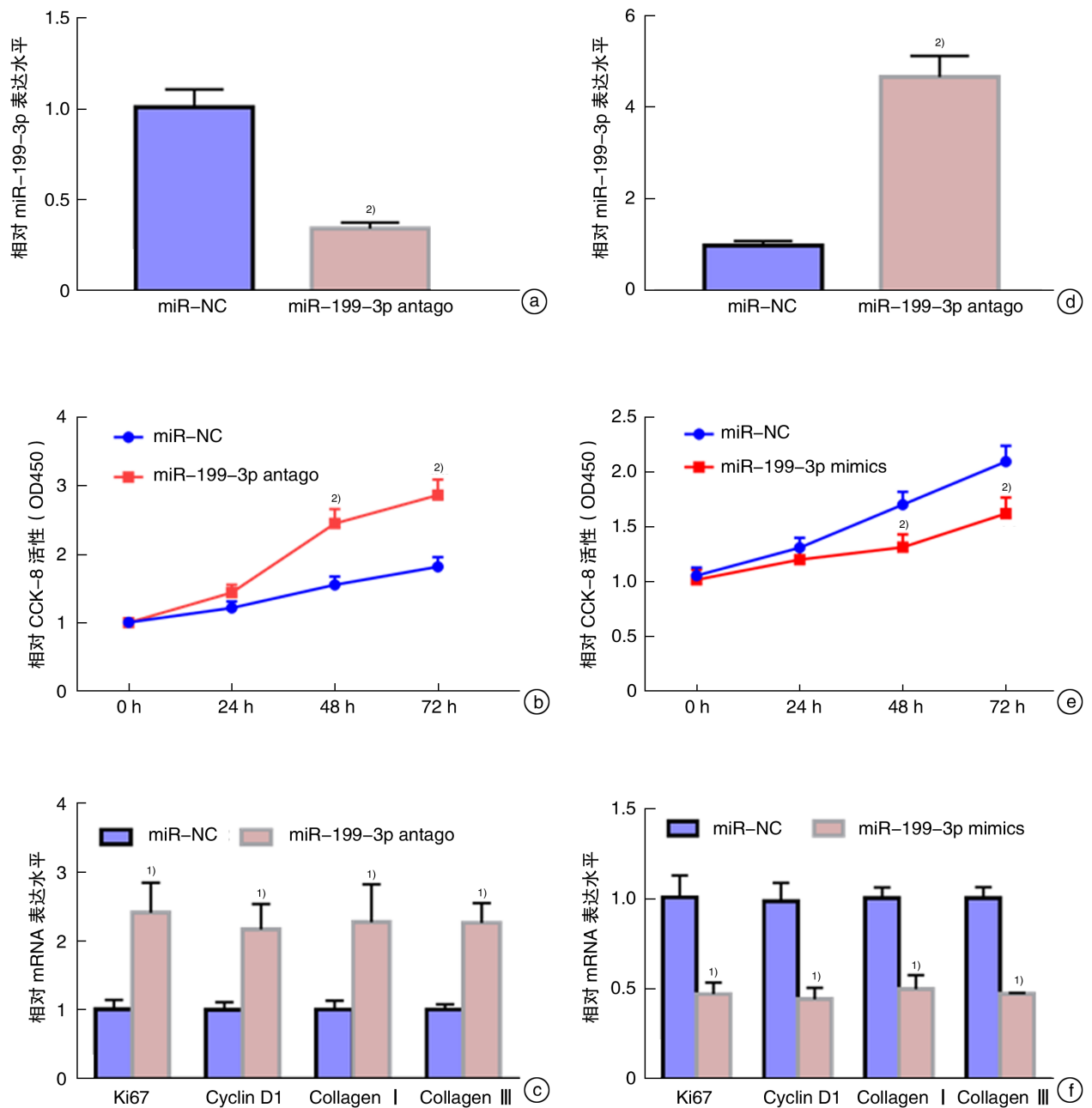
2.5 SP1 是 miR-199-3p 直接靶基因

首先通过 Targetscan 7.2 等网站预测发现 SP1 的 3'UTRs 存在 miR-199-3p 的结合位点, 进一步利用荧光素酶报告基因实验证实 miR-199-3p 与 SP1 的 3'UTRs 可直接结合。同时在成纤维细胞中沉默 miR-199-3p 可促进 SP1 的蛋白表达, 最后检测 AF 心房组织 SP1 的表达, 结果显示 AF 患者心房组织中 SP1 的表达高于 SR 患者(图 3)。

3 讨论

本研究首次发现 miR-199-3p 在 AF 患者心房组织和外周血中表达都下降, 且 miR-199-3p 在持续性 AF 中的表达水平低于阵发性 AF。其次, ROC 曲线分析发现外周血中 miR-199-3p 表达下降不仅可鉴别 AF, 还可从阵发性 AF 患者中鉴别出持续性 AF, 且 Pearson 相关系数分析显示 miR-199-3p 表达水平和左房纤维化程度呈负相关。最后功能研究显示 miR-199-3p 可通过靶向调控 SP1 负性调控成纤维细胞增殖和纤维化。因此, 外周血中的 miR-199-3p 可作为 AF 的非侵入性诊断生物标志物和纤维化预测标志物。

目前, AF 的诊断主要依赖于 12 导联心电图或动态心电图记录到绝对不规则的 R-R 间期、规则的 P 波消失代之以不规则的 AF 小 f 波^[15]。然而, 相当比例的 AF 为无症状性 AF, 多数因心力衰竭、卒

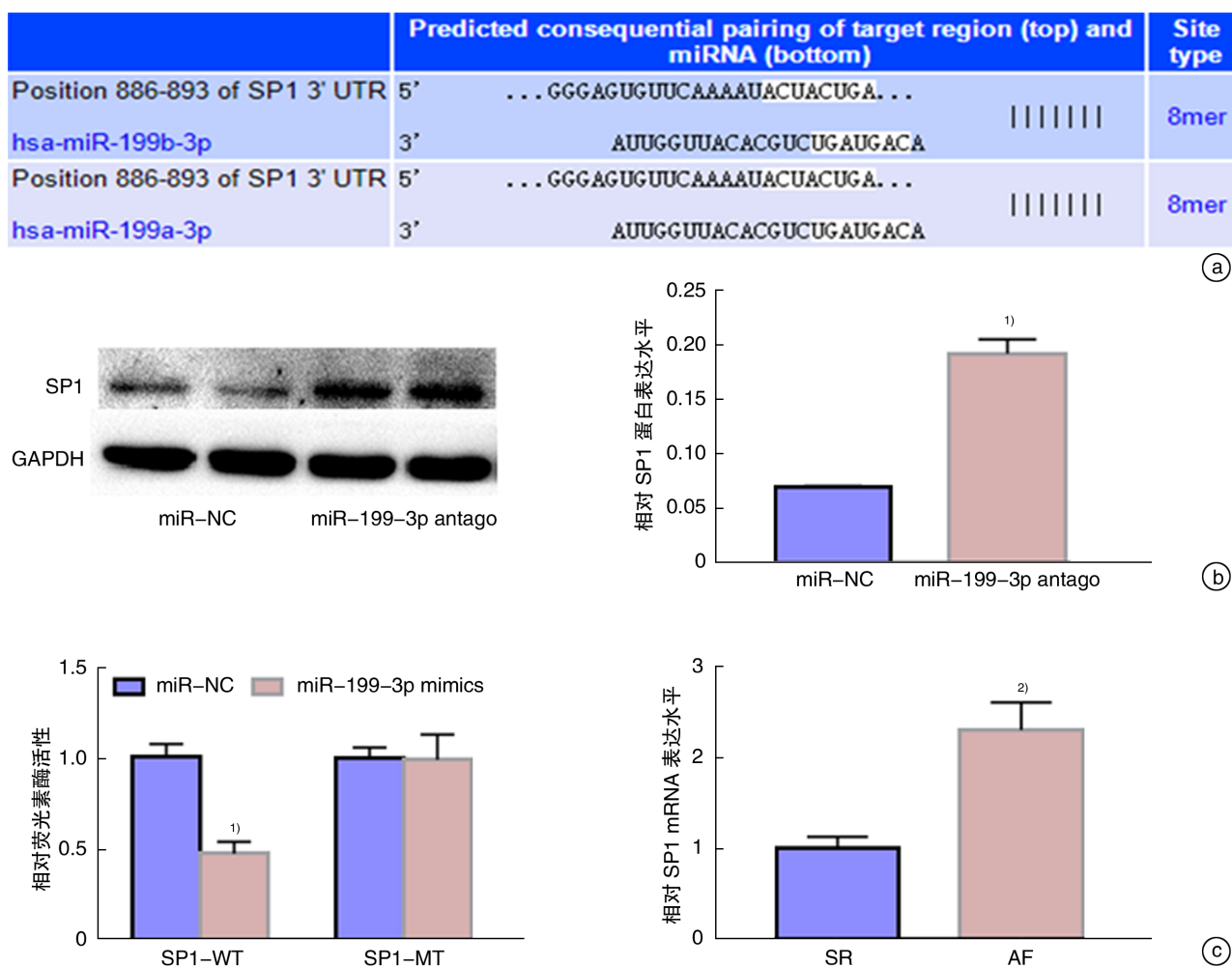


a:qRT-PCR 检测成纤维细胞瞬时转染 miR-199-3p inhibitor 后的表达水平;b:CCK-8 检测转染 miR-199-3p inhibitor 后对成纤维细胞增殖活性的影响;c:qRT-PCR 检测转染 miR-199-3p inhibitor 后细胞增殖标志物 Ki67 和细胞周期蛋白 Cyclin D1、胶原蛋白 Collagen I 和 Collagen III 表达水平;d:qRT-PCR 检测成纤维细胞瞬时转染 miR-199-3p mimics 后的表达水平;e:CCK-8 检测转染 miR-199-3p mimics 后对成纤维细胞增殖活性的影响;f:qRT-PCR 检测转染 miR-199-3p mimics 后细胞增殖标志物 Ki67 和细胞周期蛋白 Cyclin D1、胶原蛋白 Collagen I 和 Collagen III 表达水平。与 miR-NC 组比较,¹⁾ P<0.05,²⁾ P<0.01。

图 2 miR-199-3p 对成纤维细胞增殖及纤维化的影响
Figure 2 Effects of miR-199-3p on fibroblast proliferation and fibrosis

中、心肌梗死等并发症就诊后确诊为 AF,因此失去了早期治疗的机会,严重增加患者病死率和社会经济负担^[16]。因此,我们迫切需要寻找敏感性和特异性高的早期无创诊断标志物,通过早期识别无症状性 AF,可提高 AF 治疗效果和减少并发症。越来越多的证据表明,miRNAs 作为心血管疾病的关键调控因子,以及循环 miRNAs 因其在病理条件下携

带疾病特异性信息,且易于获得,可作为心血管疾病的非侵入性诊断生物标志物^[17]。同时,miRNAs 的表达水平在 AF 的不同阶段呈现动态变化,可以作为疾病诊断、预测和预后的生物标志物^[18]。因此,本研究中我们首先在 AF 患者的血浆和心房组织中筛选差异表达的 miRNA,发现 miR-199-3p 在 AF 患者心房组织和血浆中表达都下调,更为重要



a: Targetscan 软件预测 SP1 3'UTRs 存在 miR-199-3p 潜在结合位点; b: Western blot 检测沉默 miR-199-3p 表达对 SP1 蛋白表达影响; c: 荧光素酶报告基因检测 miR-199-3p 可直接与 SP1 的 3'UTRs 结合; d: AF 患者心房组织中 SP1 的 mRNA 表达水平。与 miR-NC 组比较,¹⁾ $P < 0.01$; 与 SR 组比较,²⁾ $P < 0.01$ 。

图 3 miR-199-3p 直接靶向调控 SP1 表达

Figure 3 SP1 was a directly targeted gene to miR-199-3p

的是,持续性 AF 患者血浆中 miR-199-3p 表达水平低于阵发性 AF。最后通过 ROC 曲线分析发现血浆中下降的 miR-199-3p 不仅可从正常患者中识别出 AF 患者,更可从阵发性 AF 患者中识别出持续性 AF。上述研究结果提示 miR-199-3p 可能参与 AF 发生发展,并且和 AF 的病程相关,使得 miR-199-3p 有望成为 AF 早期诊断的潜在生物学标志物。

心房纤维化是房性心律失常结构重构的重要标志,也是 AF 发生发展的重要病理基质^[5]。并且心房纤维化的严重程度与 AF 类型及预后呈正相关^[19]。既往研究显示持续性 AF 的左房基质较阵发性 AF 差,这也是导致导管射频消融在持续性 AF 患者中效果较差的原因之一^[7]。因此,寻找能够识别早期 AF 的生物标志物对早期干预和改善预后至关重要,特别是持续性 AF 左房纤维化的标志物,可以指导选择合适导管射频消融的持续性

AF 患者,有助于提高射频消融成功率。同时可以通过检测 miR-199-3p 表达发现低表达 miR-199-3p 的患者,为早期启动抗心律失常药物治疗提供个体化的治疗。更为重要的是,本研究还发现 miR-199-3p 表达和左房纤维化呈负相关,提示 miR-199-3p 可能成为未来早期诊断心房纤维化的一个敏感的生物标志物。

越来越多的证据表明心房重构在 AF 的发病过程中起着关键作用^[20]。心房电重构主要表现为动作电位和有效不应期缩短^[21],而结构重构主要表现为心房成纤维细胞异常增殖,细胞凋亡和间质纤维化^[22]。目前临床可通过抗心律失常药物和导管射频消融来改善心房电重构^[23],然而,包括血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)和血管紧张素受体阻滞剂(ARB)或他汀类等药物在缓解或逆转结构重构的作用有限^[24-25]。因此,探讨心房重构的分子机制具有重要意义,越来越多的证据表明,人类 miR-

NAAs 是 AF 心房重构的关键调控因子,而成纤维细胞增殖和纤维化是 AF 心房重构的重要标志。因此本研究探讨 miR-199-3p 对成纤维细胞增殖和纤维化的影响,结果显示 miR-199a-3p 可负性调控成纤维细胞增殖和纤维化。表明心房组织和血浆不适当下调 miR-199-3p 可通过促进心房成纤维细胞增殖和纤维化导致心房重构进而促进 AF 的发生和发展。

更为重要的是,本研究通过荧光素酶报告基因实验证实 SP1 是 miR-199-3p 的直接靶基因。早期研究显示 SP1 可直接调节心脏基因的表达参与调控心肌病理性肥大过程^[26],SP1 还参与 Ang II 诱导的心肌纤维化过程^[27]。更为重要的是,SP1 还可直接促进 TGF- β 1 转录表达,TGF- β 1 通过心房成纤维细胞增殖和细胞外基质合成促进心房重构^[10]。同时 SP1 还作为多个信号通路的靶蛋白参与细胞凋亡、炎症反应和纤维化过程,如 LncRNA-PVT1 通过 miR-128-3p/SP1 信号轴促进 TGF- β 1-Smad 表达调控 AF 心房纤维化^[28]。上述既往研究提示 SP1 可能是参与心脏重构的重要分子,而本研究显示 miR-199-3p 可通过靶向 SP1 调控成纤维细胞增殖和纤维化导致心房重构,进一步拓展了 AF 发生的分子机制。

综上所述,本研究发现 miR-199-3p 在 AF 患者心房组织和外周血中表达下降,且外周血中 miR-199-3p 表达和左房纤维化呈负相关。此外,miR-199-3p 可通过靶向调控 SP1 负性调控成纤维细胞增殖和纤维化参与 AF 心房重构。因此,miR-199-3p 有望成为临床 AF 潜在的非侵入性诊断标志物和纤维化的预测标志物。

参考文献

- [1] Odotayo A, Wong CX, Hsiao AJ, et al. Atrial fibrillation and risks of cardiovascular disease, renal disease, and death: systematic review and meta-analysis[J]. *BMJ*, 2016, 354: i4482.
- [2] Cheng WH, Lo LW, Lin YJ, et al. Ten-year ablation outcomes of patients with paroxysmal atrial fibrillation undergoing pulmonary vein isolation [J]. *Heart Rhythm*, 2019, 16(9): 1327-1333.
- [3] Tilz RR, Rillig A, Thum AM, et al. Catheter ablation of long-standing persistent atrial fibrillation: 5-year outcomes of the Hamburg Sequential Ablation Strategy[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(19): 1921-1929.
- [4] Dan GA, Dobrev D. Antiarrhythmic drugs for atrial fibrillation: Imminent impulses are emerging[J]. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2018, 21: 11-15.
- [5] Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2008, 1(1): 62-73.
- [6] Heijman J, Voigt N, Nattel S, et al. Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression[J]. *Circ Res*, 2014, 114(9): 1483-1499.
- [7] Kainuma S, Masai T, Yoshitatsu M, et al. Advanced left-atrial fibrosis is associated with unsuccessful maze operation for valvular atrial fibrillation[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2011, 40(1): 61-69.
- [8] Dangwal S, Schimmel K, Foinquinos A, et al. Noncoding RNAs in Heart Failure[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 243: 423-445.
- [9] Chen YT, Wang J, Tong KS, et al. The association of heart failure-related microRNAs with neurohormonal signaling[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(8): 2031-2040.
- [10] Shan H, Zhang Y, Lu Y, et al. Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodeling in canines[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(3): 465-472.
- [11] Luo X, Pan Z, Shan H, et al. MicroRNA-26 governs profibrillatory inward-rectifier potassium current changes in atrial fibrillation[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(5): 1939-1951.
- [12] Liu T, Zhong S, Rao F, et al. Catheter ablation restores decreased plasma miR-409-3p and miR-432 in atrial fibrillation patients[J]. *Europace*, 2016, 18(1): 92-99.
- [13] 魏飞宇, 吕丽, 张进, 等. Popdc2 在心脏肥大中的表达及其对病理性心肌肥大的影响[J]. *临床心血管病杂志*, 2018, 34(3): 311-316.
- [14] Zhang J, Wei F, Ding L, et al. MicroRNA-1976 regulates degeneration of the sinoatrial node by targeting Cav1.2 and Cav1.3 ion channels[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 134: 74-85.
- [15] January CT, Wann LS, Calkins H, et al. 2019 AHA/ACC/HRS Focused Update of the 2014 AHA/ACC/HRS Guideline for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society in Collaboration With the Society of Thoracic Surgeons[J]. *Circulation*, 2019, 140(2): e125-e151.
- [16] O'Neal WT, Salahuddin T, Broughton ST, et al. Atrial Fibrillation and Cardiovascular Outcomes in the Elderly [J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2016, 39(9): 907-913.
- [17] E S, Costa MC, Kurc S, et al. The circulating non-coding RNA landscape for biomarker research: lessons and prospects from cardiovascular diseases[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(7): 1085-1099.
- [18] Komal S, Yin JJ, Wang SH, et al. MicroRNAs: Emerging biomarkers for atrial fibrillation[J]. *J Cardiol*, 2019, 74(6): 475-482.
- [19] Platonov PG, Mitrofanova LB, Orshanskaya V et al. Structural abnormalities in atrial walls are associated with presence and persistency of atrial fibrillation but not with age[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(21): 2225-2232.
- [20] Nattel S. How does fibrosis promote atrial fibrillation persistence: in silico findings, clinical observations, and experimental data[J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 110(3): 295-297.

心脏瓣膜置换术后并发严重室性心律失常危险因素 的探讨及风险列线图模型的建立

陈波¹ 冯凤¹ 梁婧²

【摘要】 目的:探究心脏瓣膜置换术后并发严重室性心律失常的独立危险因素,同时建立预测心脏瓣膜置换术后发生严重室性心律失常风险的列线图模型。方法:回顾性分析2016年12月—2018年12月在华西医院心脏大血管外科行心脏瓣膜置换术患者275例,通过单因素及多因素 Logistic 回归分析得到心脏瓣膜置换术后并发严重室性心律失常的独立危险因素,最终应用 R 语言建立预测术后发生严重室性心律失常风险的列线图模型并对该模型进行验证。结果:由多因素 Logistic 回归分析结果可知,病程(OR=3.040,95%CI:1.249~7.403)、左室射血分数(LVEF)(OR=2.953,95%CI:1.135~3.363)、重度三尖瓣关闭不全(OR=2.171,95%CI:1.194~3.946)、主动脉断流时间(OR=2.494,95%CI:1.025~2.923)、体外循环时间(OR=1.754,95%CI:(1.010~3.046)以及术后血流动力学紊乱(OR=2.488,95%CI:1.230~5.031)为心脏瓣膜置换术后并发严重室性心律失常的独立危险因素;基于上述危险因素成功建立列线图模型。验证后发现预测值同实测值基本一致,提示预测模型预测能力良好;随后采用 Bootstrap 内部验证法对预测模型进行验证,C-index 为 0.781(95%CI:0.725~0.836),说明该列线图预测模型预测效能高。结论:病程≥10年、LVEF<40%、重度三尖瓣关闭不全、主动脉断流时间>90 min、体外循环时间>120 min 以及术后血流动力学紊乱是心脏瓣膜置换术后并发严重室性心律失常的独立危险因素,基于上述危险因素建立的列线图模型具有良好预测效能,有重要临床价值。

【关键词】 心脏瓣膜置换术;室性心律失常;危险因素;列线图模型

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2020.06.008

[中图分类号] R541.75 [文献标志码] A

Risk factors of severe ventricular arrhythmia after heart valve replacement and establishment of its risk nomogram model

CHEN Bo¹ FENG Huang¹ LIANG Jing²

(¹Department of Cardiovascular Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, 610041, China; ²Cardiac Comprehensive Ward, West China Hospital, Sichuan University)

Corresponding author: LIANG Jing, E-mail: ljqju@163.com

Abstract Objective: To investigate the independent risk factors of severe ventricular arrhythmia after heart valve replacement and to establish a nomogram model for predicting the risk of severe ventricular arrhythmia after heart valve replacement. **Method:** A retrospective analysis of 275 patients undergoing cardiac valve replacement in the Department of Cardiac Vascular Surgery from Huaxi Hospital from December 2016 to December 2018 was enrolled. Univariate and multivariate logistic regression analysis was performed to obtain independent risk factors

¹四川大学华西医院心脏大血管外科(成都,610041)

²四川大学华西医院心血管综合病房

通信作者:梁婧,E-mail:ljqju@163.com

- [21] Li G, Liu E, Liu T, et al. Atrial electrical remodeling in a canine model of sinus node dysfunction [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 146(1): 32-36.
- [22] Nattel S. Molecular and cellular mechanisms of atrial fibrosis in atrial fibrillation [J]. *JACC Clin Electrophysiol*, 2017, 3(5): 425-435.
- [23] Calvo D, Filgueiras-Rama D, Jalife J. Mechanisms and Drug Development in Atrial Fibrillation [J]. *Pharmacol Rev*, 2018, 70(3): 505-525.
- [24] Zhao Z, Niu X, Dong Z, et al. Upstream therapeutic strategies of valsartan and fluvastatin on hypertensive patients with non-permanent atrial fibrillation [J]. *Cardiovasc Ther*, 2018, 36(6): e12478.
- [25] Calò L, Martino A, Sciarra L, et al. Upstream effect for atrial fibrillation: still a dilemma? [J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2011, 34(1): 111-28.
- [26] Hu X, Li T, Zhang C, et al. GATA 4 regulates ANF expression synergistically with Sp1 in a cardiac hypertrophy model [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(9): 1865-1877.
- [27] Li R, Xiao J, Qing X, et al. Sp1 Mediates a therapeutic role of MiR-7a/b in angiotensin II-induced cardiac fibrosis via mechanism involving the TGF-beta and MAPKs pathways in cardiac fibroblasts [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0125513.
- [28] Cao F, Li Z, Ding WM, et al. LncRNA PVT1 regulates atrial fibrosis via miR-128-3p-SP1-TGF-beta1-Smad axis in atrial fibrillation [J]. *Mol Med*, 2019, 25(1): 7.