

# 时钟基因 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$ 在心房颤动患者中的表达及临床意义\*

徐乐<sup>1,2</sup> 谭猛<sup>2</sup> 郭倩<sup>1</sup> 戴晓燕<sup>2</sup> 鲍正宇<sup>3</sup> 杨轶<sup>1</sup> 袁晓晨<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:研究时钟基因 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  在心房颤动(atrial fibrillation, AF)患者中的表达并探索其基于炎症调控途径参与 AF 发生发展的可能机制及相关临床价值。方法:选取 2022 年 4—10 月在扬州大学附属医院及江苏省苏北人民医院住院诊断为 AF 的患者 88 例,其中阵发性心房颤动(paroxysmal atrial fibrillation, PaAF)组 37 例,持续性心房颤动(persistent atrial fibrillation, PeAF)组 51 例,另选择同期体检中心体检的健康者 43 例作为对照组。采用 qRT-PCR 法检测外周血时钟基因 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  mRNA 的表达,采用 ELISA 法检测血浆中炎症小体 NLRP3 蛋白的表达。比较 3 组患者的一般资料和实验室生化指标,采用 Spearman 进行相关性分析,有序多分类 logistic 回归分析 AF 的影响因素,受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评估 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$ 、NLRP3、左房直径(left atrial diameter, LAD)4 个指标对 AF 的辅助诊断效能。结果:REV-ERB $\alpha$  在 PaAF 组和 PeAF 组外周血中水平明显低于对照组( $P < 0.01$ ),在 PaAF 组与 PeAF 组之间无显著差异;ROR $\alpha$  在 PeAF 组的水平明显低于对照组和 PaAF 组( $P < 0.01$ ),在 PaAF 组与对照组之间无显著差异;NLRP3 和 LAD 随着 AF 的发展明显升高( $P < 0.01$ );REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  与 NLRP3 及 LAD 在 AF 患者中呈负相关,NLRP3 与 LAD 呈正相关;有序多分类 logistic 回归分析 REV-ERB $\alpha$ 、NLRP3、LAD 为 AF 发生发展的影响因素,ROC 曲线分析结果示 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$ 、NLRP3、LAD 对 AF 的发生均具有一定的预测价值。结论:在 AF 患者外周血中 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  表达降低,NLRP3 表达增高,REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  可能通过炎症及心房重构机制参与 AF 的发生发展并对 AF 的发生具有预测价值。

**[关键词]** 心房颤动;昼夜节律;REV-ERB $\alpha$ ;ROR $\alpha$ ;NLRP3;左房直径

**DOI:**10.13201/j.issn.1001-1439.2023.04.011

**[中图分类号]** R541.6 **[文献标志码]** A

## Expression and clinical significance of clock genes REV-ERB $\alpha$ and ROR $\alpha$ in patients with atrial fibrillation

XU Le<sup>1,2</sup> TAN Meng<sup>2</sup> GUO Qian<sup>1</sup> DAI Xiaoyan<sup>2</sup> BAO Zhengyu<sup>3</sup>  
YANG Yi<sup>1</sup> YUAN Xiaochen<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225000, China; <sup>2</sup>Medical School of Yangzhou University; <sup>3</sup>Department of Cardiology, Jiangsu Province Subei People's Hospital)

Corresponding author: YUAN Xiaochen, E-mail: 13665288033@163.com

**Abstract Objective:** To investigate the expression of clock genes REV-ERB $\alpha$  and ROR $\alpha$  in patients with atrial fibrillation(AF), and to explore the possible mechanism and related clinical value of their involvement in the occurrence and development of AF based on inflammatory regulatory pathways. **Methods:** A total of 88 patients diagnosed with AF hospitalized in the Affiliated Hospital of Yangzhou University and Jiangsu Subei People's Hospital from April 2022 to October 2022 were selected, 37 patients in the paroxysmal atrial fibrillation (PaAF) group and 51 cases in persistent atrial fibrillation (PeAF) group. In addition, 43 healthy subjects were selected as the control group from the physical examination center during the same period. The mRNA expression of REV-ERB $\alpha$  and ROR $\alpha$  was detected by qRT-PCR. The expression of NLRP3 protein in plasma was detected by ELISA. The general information and laboratory test indexes of the three groups were compared, Spearman was used for correlation analysis. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the auxiliary diagnostic efficacy of REV-ERB $\alpha$ , ROR $\alpha$ , NLRP3 and left atrial diameter (LAD) in AF. **Results:** The level of REV-ERB $\alpha$  in PaAF

\*基金项目:国家自然科学基金项目(No:82170317);扬州市科技计划重点研发项目(No:YZ2022079)

<sup>1</sup>扬州大学附属医院心血管内科(江苏扬州,225000)

<sup>2</sup>扬州大学医学院

<sup>3</sup>江苏省苏北人民医院心血管内科

通信作者:袁晓晨,E-mail:13665288033@163.com

and PeAF groups was significantly lower than that of control group ( $P < 0.01$ ), but there was no significant difference between PaAF and PeAF groups. The level of ROR $\alpha$  in PeAF group was significantly lower than that in control group and PaAF group ( $P < 0.01$ ), but there was no significant difference between PeAF group and control group. NLRP3 and LAD increased significantly with the development of AF ( $P < 0.01$ ). REV-ERB $\alpha$  and ROR $\alpha$  were negatively correlated with NLRP3 and LAD in AF patients, while NLRP3 was positively correlated with LAD. Multivariate Logistic regression analysis showed that REV-ERB $\alpha$ , NLRP3 and LAD were the influencing factors for the occurrence and development of AF. ROC curve analysis results showed that REV-ERB $\alpha$ , ROR $\alpha$ , NLRP3 and LAD had certain predictive value for the occurrence of AF. **Conclusion:** In the peripheral blood of patients with atrial fibrillation, the expression of REV-ERB $\alpha$  and ROR $\alpha$  is decreased, while the expression of NLRP3 is increased. REV-ERB $\alpha$  and ROR $\alpha$  may be involved in the occurrence and development of AF through inflammation and atrial remodeling mechanism, and have predictive value for the occurrence of AF.

**Key words** atrial fibrillation; circadian rhythm; REV-ERB $\alpha$ ; ROR $\alpha$ ; NLRP3; left atrial diameter

心房颤动(atrial fibrillation, AF)是一种常见、复杂的快速性心律失常,长时间的 AF 不仅会导致心功能不全、动脉血栓形成及脑卒中,严重影响患者的生活质量,给家庭和社会带来巨大经济负担,严重的甚至会导致死亡<sup>[1]</sup>。AF 的发生具有一定的昼夜节律性<sup>[2]</sup>。研究发现昼夜节律的分子机制受到昼夜节律基因的调控,心血管系统中存在时钟基因,其编码的蛋白可调控相关钟控基因的表达,在调节自噬、细胞凋亡、炎症、氧化代谢等心血管疾病发病机制相关方面发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>。生物钟核受体 REV-ERB $\alpha$  和 ROR $\alpha$  是人体生物钟系统的重要组成部分,二者在维持机体生物节律中发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。研究表明 NLRP3 炎症小体的激活是诱发 AF 产生的关键因素,REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  可以抑制 NLRP3 的激活<sup>[6]</sup>,但其作用尚未在 AF 中报道。本次研究选取 AF 患者外周血,采用 qRT-PCR 法检测外周血时钟基因 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  mRNA 的表达,ELISA 法检测血浆中炎症小体 NLRP3 蛋白的表达,分析生物钟基因在 AF 中的表达,探索其基于炎症调控参与了 AF 的发生与发展的可能机制及相关临床价值。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

选取 2022 年 4—10 月在扬州大学附属医院及江苏省苏北人民医院住院诊断为 AF 的患者 88 例,参照《2020 ESC/EACTS 心房颤动诊断与管理指南》<sup>[7]</sup>分为阵发性心房颤动(paroxysmal atrial fibrillation, PaAF)组和持续性心房颤动(persistent atrial fibrillation, PeAF)组。PaAF 组患者 37 例,男 17 例,女 20 例,平均年龄(68.60 $\pm$ 12.38)岁;PeAF 组患者 51 例,男 29 例,女 22 例,平均年龄(72.32 $\pm$ 7.46)岁;另选取同期体检中心健康体检者作为对照组 43 例,男 23 例,女 20 例,平均年龄(63 $\pm$ 10.37)岁。纳入标准:①年龄 18~85 岁。②签署知情同意书等相关文书。排除标准:①合并其他心律失常、起搏器植入、心包炎、心肌病、严重心脏瓣膜疾病、先天性心脏病;②合并甲状腺功能异常、血液系统疾病、风湿免疫性疾病、急性炎症感染者;③严重肝肾功能损害及

其他脏器功能衰竭;④合并精神疾病、急性脑血管病、外周血管疾病、继发性高血压及恶性肿瘤者;⑤心脏彩超缺乏或临床资料严重不全者;⑥拒绝签署知情同意书等相关文书者。本研究已获得扬州大学附属医院伦理委员会批准(No:2022-YKLA-28-007)。

### 1.2 主要试剂和设备

TRizol、qRT-PCR 定量试剂盒、cDNA 反转录试剂盒、伯乐公司 PCR 荧光定量仪、美国 Signalway Antibody LLC 公司 ELISA 试剂盒和伯乐公司酶标仪。

### 1.3 方法

**1.3.1 外周血样本采集与保存** 清晨 6:00 左右采集受试者新鲜静脉血 5 mL,取 250  $\mu$ L 全血及时按照 TRizol 说明书提取外周血总 RNA,其余血液放入离心机 3500 rpm,10 min 后分离血浆,与 RNA 一同保存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱。

**1.3.2 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  mRNA 及 NLRP3 的检测** ①REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  mRNA 检测:取出 RNA 解冻,测浓度及吸光度,根据试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,条件:37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s。所用基因引物序列,见表 1。使用 PCR 仪进行扩增,反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 次循环,65 $^{\circ}$ C 5 s,95 $^{\circ}$ C 5 s 终止反应。扩增结果采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法分析。②NLRP3 蛋白的检测:采用 ELISA 法检测患者血浆中炎症小体 NLRP3 水平,试剂盒购自美国 Signalway Antibody LLC 公司,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.4 统计学处理

应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,用 Graphpad Prism 9.5 作图。计数资料用例(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。符合正态分布的计量资料以  $\bar{X} \pm S$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 Bonferroni 法校正检验;不符合正态分布的计量资料以  $M(P_{25}, P_{75})$  表示,多组间比较用 Kruskal-Wallis  $H$  检验。相关性采用 Spearman 相关分析;影响因素采用有序多分类 logistic 回归分析;诊断预测采用受试者工作特征

(receiver operating characteristic, ROC) 曲线进行评估。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况比较

3 组患者性别、体重指数(BMI)、吸烟、饮酒、高血压、糖尿病、空腹血糖、血脂、丙氨酸、天冬氨酸、尿酸比较均差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 年龄、冠心病、慢性心力衰竭、左房直径(LAD)方面比较均差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组比较, PaAF 组的冠心病比例和 LAD 较大( $P < 0.05$ ), PeAF 组的年龄、冠心病比例、心力衰竭比例和 LAD 较大( $P < 0.05$ ); 在 AF 各亚组中, PeAF 组较 PaAF 组慢性心力衰竭比例、LAD 较大( $P < 0.05$ ), 见表 2。

### 2.2 外周血中 REV-ERB $\alpha$ 和 ROR $\alpha$ mRNA 水平表达

对照组比较, AF 组的 REV-ERB $\alpha$  和 ROR $\alpha$  表达降低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 3 组比较

时, 与对照组比较, PaAF 组的 REV-ERB $\alpha$  表达降低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), PeAF 组的 REV-ERB $\alpha$  和 ROR $\alpha$  表达降低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 与 PaAF 组比较, PeAF 组的 ROR $\alpha$  表达降低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 2、图 1。

### 2.3 外周血中 NLRP3 蛋白表达水平

与对照组比较, AF 组的 NLRP3 升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 3 组比较时, 与对照组比较, PeAF 组的 NLRP3 升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 与 PaAF 组比较, PeAF 组的 NLRP3 升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 2、图 2。

### 2.4 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$ 和 NLRP3 表达水平与 LAD 的相关性分析

Spearman 相关分析显示, REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  mRNA 表达水平与 LAD 大小呈负相关; NLRP3 表达水平与 LAD 大小呈正相关。见图 3。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

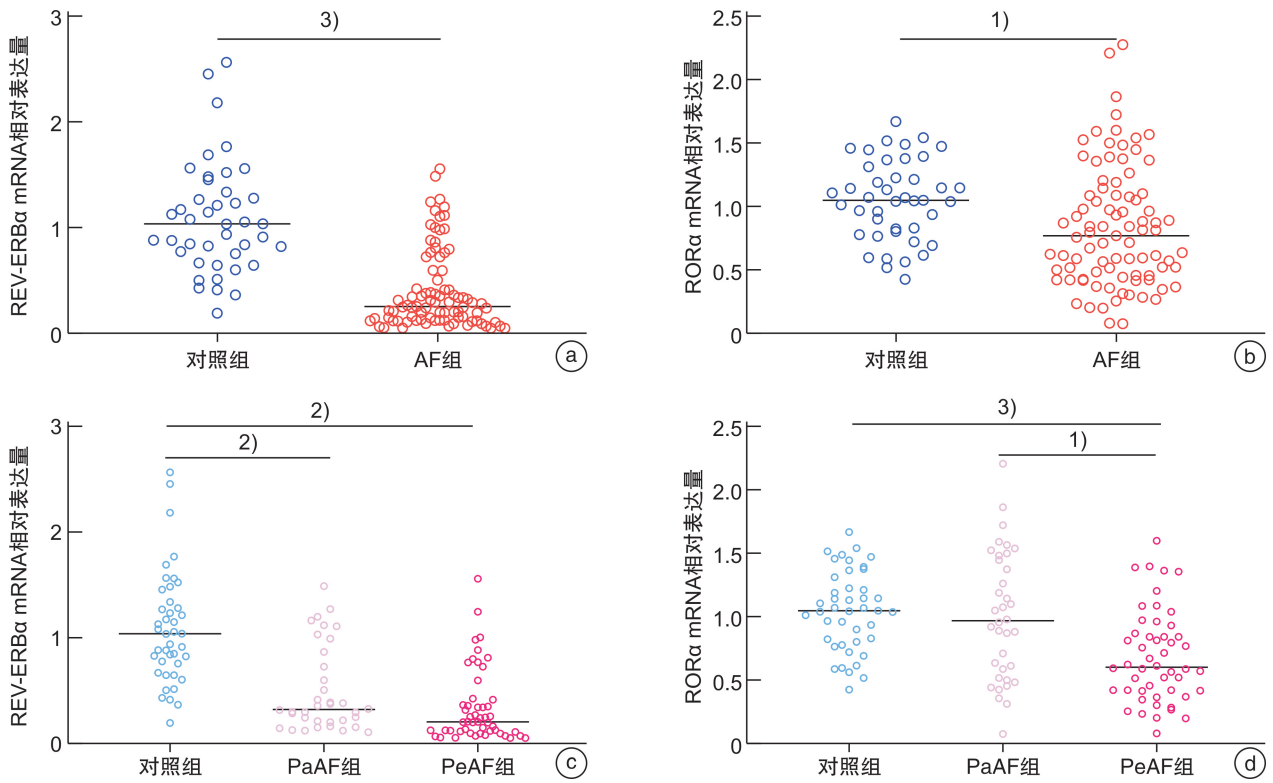
基因	上游(5'-3' 序列)	下游(5'-3' 序列)
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
REV-ERB $\alpha$	GCAAGGGCTTTTTCCGTCG	GCGGACGATGGAGCAATTCT
ROR $\alpha$	ACTCCTGTCCTCGTCAGAAGA	CATCCCTACGGCAAGGCATTT

表 2 3 组患者一般资料和实验室检查指标比较

Table 2 General data and laborator yexamination indexes 例(%),  $\bar{X} \pm S, M(P_{25}, P_{75})$

项目	对照组(43 例)	PaAF 组(37 例)	PeAF 组(51 例)	$F/\chi^2/H$	$P$ 值
年龄/岁	63.00 $\pm$ 10.37	68.60 $\pm$ 12.38 <sup>1)</sup>	72.32 $\pm$ 7.46 <sup>1)</sup>	10.093	<0.001
性别(男/女)	23/20	17/20	29/22	1.042	0.594
BMI/(kg $\cdot$ m <sup>-2</sup> )	24.99 $\pm$ 3.34	25.10 $\pm$ 3.25	24.46 $\pm$ 3.40	0.491	0.555
吸烟	6(14.0)	7(18.9)	9(17.6)	0.394	0.821
饮酒	6(14.0)	5(13.5)	8(15.7)	0.077	0.962
高血压病	23(53.5)	21(56.8)	36(70.6)	3.273	0.195
糖尿病	8(18.6)	9(24.3)	9(17.6)	0.663	0.781
冠心病	16(37.2)	20(54.1) <sup>1)</sup>	33(64.7) <sup>1)</sup>	7.115	0.029
慢性心力衰竭	2(4.7)	11(29.7) <sup>1)</sup>	32(62.7) <sup>1)2)</sup>	36.523	<0.001
LAD/mm	33.21 $\pm$ 3.75	36.50 $\pm$ 4.50 <sup>1)</sup>	43.90 $\pm$ 5.99 <sup>1)2)</sup>	41.914	<0.001
空腹血糖/(mmol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	5.20(4.79, 5.86)	5.25(4.76, 6.48)	4.8(4.31, 5.57)	3.456	0.178
尿酸/(\mu mol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	354.22 $\pm$ 83.83	356.70 $\pm$ 121.65	399.53 $\pm$ 130.36	3.238	0.980
丙氨酸/(U $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	23.00(18.00, 30.00)	21.00(17.00, 30.00)	22.00(16.95, 33.00)	0.686	0.709
天冬氨酸/(U $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	27.16 $\pm$ 6.20	27.06 $\pm$ 8.86	30.32 $\pm$ 9.90	3.655	0.161
TC/(mmol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	3.57 $\pm$ 0.68	3.95 $\pm$ 0.82	3.77 $\pm$ 0.92	2.183	0.117
TG/(mmol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	1.47(1.12, 1.91)	1.64(1.33, 3.09)	1.54(1.14, 2.35)	4.031	0.133
LDL/(mmol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	1.74 $\pm$ 0.63	2.09 $\pm$ 0.64	2.08 $\pm$ 0.76	3.595	0.050
HDL/(mmol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	1.07 $\pm$ 0.21	1.14 $\pm$ 0.29	1.05 $\pm$ 0.24	1.506	0.226
REV-ERB $\alpha$	1.04(0.75, 1.45)	0.32(0.20, 0.93) <sup>1)</sup>	0.20(0.11, 0.41) <sup>1)</sup>	51.756	<0.001
ROR $\alpha$	1.05 $\pm$ 0.32	1.01 $\pm$ 0.51	0.72 $\pm$ 0.42 <sup>1)2)</sup>	19.809	<0.001
NLRP3/(ng $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )	0.51(0.33, 0.75)	0.62(0.34, 0.93)	1.07(0.55, 1.44) <sup>1)2)</sup>	20.134	<0.001

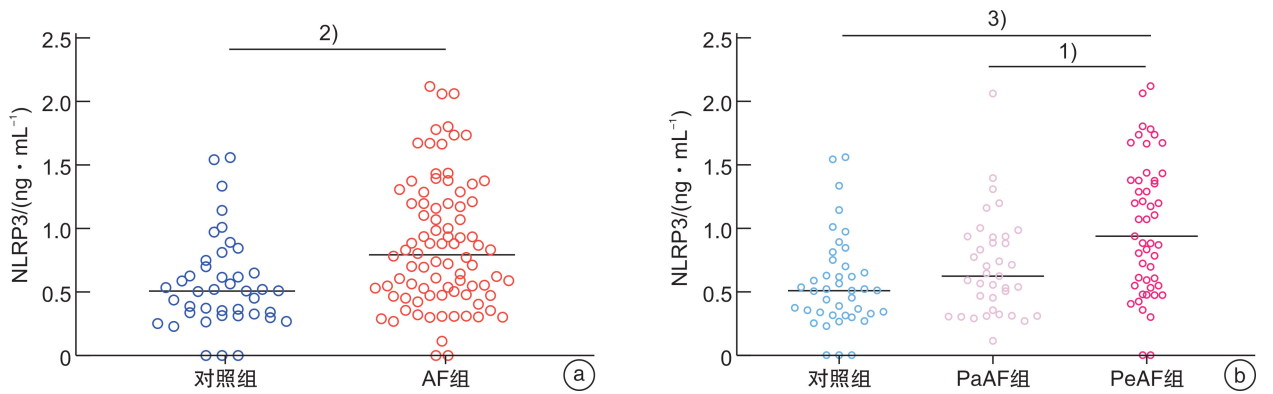
与对照组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 PaAF 组比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。



注: <sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>2)</sup>  $P < 0.001$ ; <sup>3)</sup>  $P < 0.0001$ 。

图1 各组 REV-ERB $\alpha$  和 ROR $\alpha$  mRNA 表达

Figure 1 Expression of REV-ERB $\alpha$  and ROR $\alpha$  mRNA



注: <sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>2)</sup>  $P < 0.001$ ; <sup>3)</sup>  $P < 0.0001$ 。

图2 各组血浆中 NLRP3 蛋白表达

Figure 2 Expression of NLRP3 protein

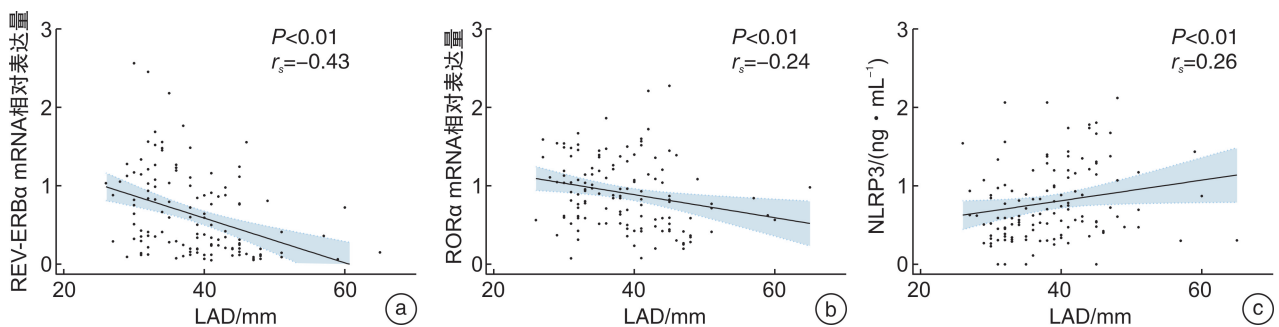


图3 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  和 NLRP3 表达水平与 LAD 的相关性分析

Figure 3 Correlation between REV-ERB $\alpha$ , ROR $\alpha$ , NLRP3 expressions and LAD

## 2.5 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$ 和 NLRP3 表达水平的相关性分析

Spearman 相关分析显示, REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  mRNA 表达水平与 NLRP3 蛋白表达水平呈负相关。见图 4。

## 2.6 AF 影响因素的有序多分类 logistic 回归分析

以 AF 分类为因变量, 以年龄、冠心病、慢性心力衰竭、LAD、REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  mRNA 水平和 NLRP3 蛋白水平为自变量进行有序多分类 logistic

回归分析, 变量赋值见表 3, 分析结果见表 4。结果表明, 慢性心力衰竭、LAD、REV-ERB $\alpha$ mRNA 水平和 NLRP3 蛋白水平是 AF 疾病发生发展的独立危险因素。

模型诊断: 平行线检验的结果( $\chi^2=4.175, P=0.759$ )说明比例优势假设存在; Deviance 拟合优度检验显示模型拟合好( $\chi^2=159.024, P=1.000$ ); 模型拟合优度检验显示, 本模型优于只有常数项的模型( $\chi^2=107.114, P<0.001$ )。

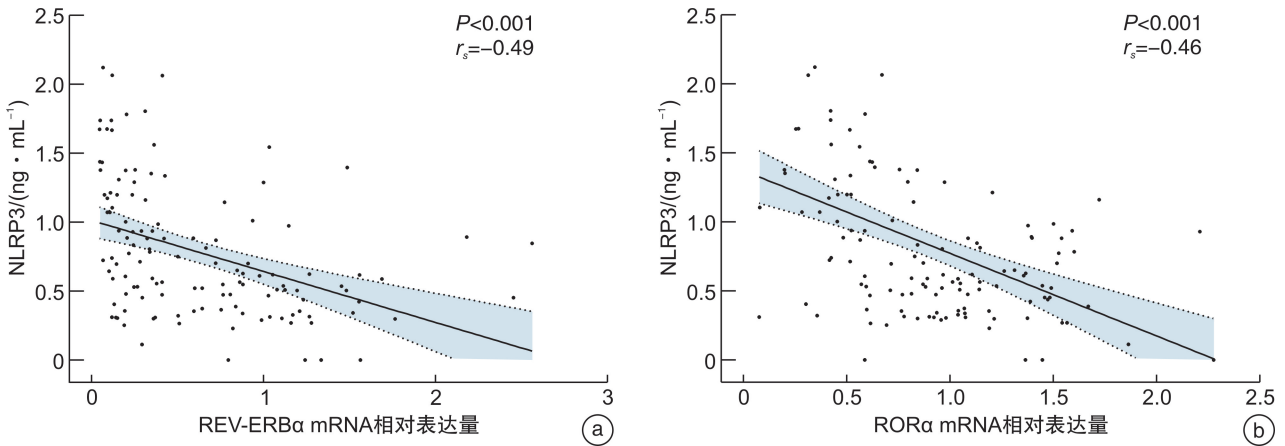


图 4 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  和 NLRP3 表达水平相关性分析

Figure 4 Correlation between REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  and NLRP3 expressions

## 2.7 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$ 、NLRP3、LAD 4 个指标诊断 AF 的 ROC 曲线分析

ROC 曲线分析将 AF 作为状态变量, 将 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$ 、NLRP3、LAD 作为检验变量, 进行 ROC 曲线分析, 结果显示, REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$ 、NLRP3、LAD 对 AF 都具有一定的预测价值, 见表 5、图 5。

表 3 有序多分类 logistic 回归的变量赋值

Table 3 Variable assignment

因素	赋值
AF	对照=0、PaAF=1、PeAF=2
冠心病	无=0、有=1
心力衰竭	无=0、有=1

表 4 AF 影响因素的有序多分类 logistic 回归分析

Table 4 Influencing factors of atrial fibrillation analyzed by logistic regression model

因素	B	SE	Wald	P 值	95%CI	
					下限	上限
年龄	0.043	0.022	3.686	0.055	-0.001	0.086
冠心病	0.311	0.462	0.453	0.501	-0.594	1.215
慢性心力衰竭	-1.162	0.532	4.780	0.029	-2.204	-0.120
REV-ERB $\alpha$	-2.176	0.573	14.426	<0.001	-3.298	-1.053
ROR $\alpha$	-0.346	0.532	0.424	0.515	-1.389	0.696
NLRP3	0.123	0.059	4.355	0.037	0.007	0.238
LAD	0.159	0.044	12.995	<0.001	0.072	0.245

表 5 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$ 、NLRP3、LAD 对 AF 的预测价值

Table 5 Predictive value of REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$ 、NLRP3 and leftatrial diameter for atrial fibrillation

项目	AUC(95%CI)	cut off 值	灵敏度	特异度	P 值
REV-ERB $\alpha$	0.8722(0.8124~0.9320)	0.6650	0.7126	0.9524	<0.0001
ROR $\alpha$	0.6709(0.5800~0.7619)	0.3203	0.4598	0.8605	0.0016
NLRP3	0.6751(0.5774~0.7728)	0.3140	0.5698	0.7442	0.0012
LAD	0.8290(0.7582~0.8998)	0.5740	0.8068	0.7674	<0.0001



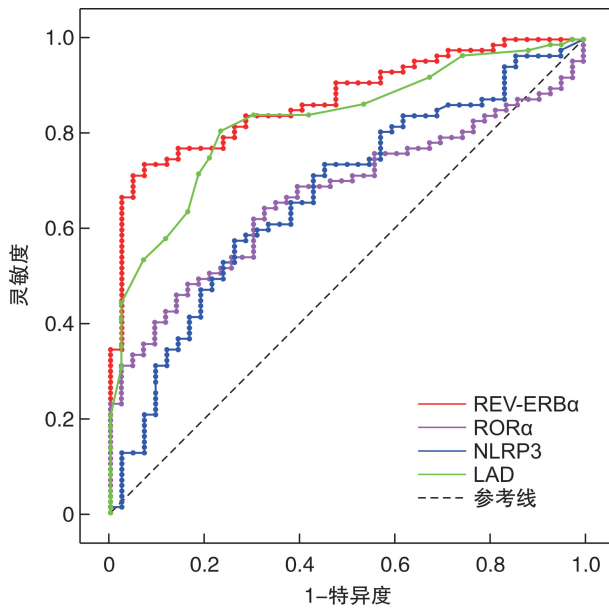


图5 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$ 、NLRP3、LAD 诊断 AF 的 ROC 曲线

Figure 5 ROC curve of REV-ERB $\alpha$ , ROR $\alpha$ , NLRP3 and LAD for atrial fibrillation

### 3 讨论

研究发现 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  的表达或功能异常可影响如肿瘤、心血管疾病、免疫炎症性疾病和代谢性疾病等诸多病理过程,而这些疾病的发生发展与昼夜节律密切相关<sup>[8-9]</sup>。Zhao 等<sup>[10]</sup>研究发现在心肌梗死和再灌注损伤模型中,心脏中 REV-ERB $\alpha$  的表达降低,在心肌梗死的绵羊中,使心脏 REV-ERB $\alpha$  过表达或药理学激活可限制梗死面积,改善了心脏功能,减少心肌细胞死亡和心脏炎症。Ding 等<sup>[11]</sup>的研究发现 ROR $\alpha$  可介导褪黑激素发挥血管保护作用,防止脆弱的斑块不稳定和斑块内巨噬细胞极化。Chen 等<sup>[12]</sup>研究发现,与 PaAF 患者比较,PeAF 患者外周血白细胞中昼夜节律基因 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  等表达均显著降低,与对照组比较,PaAF 组 ROR $\alpha$  表达差异无统计学意义,而 REV-ERB $\alpha$  的表达显著降低,且 LAD 与昼夜节律基因表达呈明显的负相关。本次研究在 Chen 等<sup>[12]</sup>的基础上,选择非起搏器植入的 AF 患者并扩大样本量,发现与对照组比较 AF 组的 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  等表达均显著降低;3 组比较时,与对照组比较,PaAF 组的 REV-ERB $\alpha$  降低,PeAF 组的 REV-ERB $\alpha$  和 ROR $\alpha$  降低;和 PaAF 组比较,PeAF 组的 ROR $\alpha$  降低,此结果与 Chen 等<sup>[12]</sup>的结论不同,我们推测这种结果可能是由于样本量增加及实验选取的外周血成分和入组患者在饮食、地域等方面略有不同所致。本研究中采用 Spearman 相关分析示 REV-ERB $\alpha$  和 ROR $\alpha$  基因表达与 LAD 呈明显的负相关,与 Chen 等<sup>[12]</sup>的结

果一致;有序多分类 logistic 回归分析显示,REV-ERB $\alpha$  是 AF 发生发展的独立危险因素;ROC 曲线分析表明 REV-ERB $\alpha$  和 ROR $\alpha$  对 AF 具有一定的预测价值。提示 REV-ERB $\alpha$  和 ROR $\alpha$  基因表达的改变与 AF 的发生发展密切相关。

研究发现在心房中,NLRP3 炎症小体通过 caspase-1 激活 IL-1 $\beta$  和 IL-18 前体,释放 IL-1 $\beta$ 、IL-18,从而促进心房结构重构和 AF 的发生发展<sup>[13]</sup>。Yao 等<sup>[14]</sup>的结果表明与对照组相比,在 PaAF 患者中,人右心房组织中 NLRP3 水平没有变化,但 caspase-1 被激活,与 NLRP3 活性增加一致;相反,PeAF 患者的 NLRP3、ASC 和活性 caspase-1 水平均升高。本次研究中,采用 ELISA 法检测 AF 患者外周血浆中 NLRP3 炎症小体,结果显示与对照组比较,AF 组的 NLRP3 水平升高;3 组比较时,PeAF 组的 NLRP3 蛋白水平均高于对照组和 PaAF 组,而 PaAF 和对照组差异无统计学意义,分析可能是 AF 早期发病过程慢性炎症作用对发病过程影响较低。在 AF 发展的过程中,各种原因导致的负荷增加,可使左房压力升高,心房逐渐扩大,以代偿过高的前后负荷<sup>[15]</sup>。研究发现左房大小不仅与 AF 持续时间相关,而且是 AF 的独立危险因素,也是治疗后 AF 复发的预测指标<sup>[16]</sup>。在本研究中,我们采用 Spearman 相关分析 NLRP3 小体与 LAD 之间的相关性,结果 NLRP3 表达水平与 LAD 呈正相关,表明心房增大可能是 NLRP3 炎症小体活性增加的结果;采用有序多分类 logistic 回归分析显示,NLRP3 炎症小体是 AF 发生发展的独立危险因素;ROC 曲线分析表明 NLRP3 对 AF 具有一定的预测价值。提示炎症小体 NLRP3 与 AF 的发生发展密切关系。

研究发现 REV-ERB $\alpha$  不仅可以调控 NLRP3 炎症小体的节律振荡,还可以调控 NLRP3 的激活。Pourcet 等<sup>[17]</sup>在体内腹膜小鼠巨噬细胞中发现 NLRP3 炎症小体成分的 mRNA 在 REV-ERB $\alpha$  的控制下每天呈节律振荡,NLRP3 的活性期峰值对应于 REV-ERB $\alpha$  mRNA 表达的最低谷,在体外血清休克同步的原代小鼠骨髓源和人单核细胞源巨噬细胞中也观察到类似的节律,而在 REV-ERB $\alpha$  消融后,NLRP3 mRNA 的节律振荡消失。Kou 等<sup>[18]</sup>在神经系统的体外实验证明 REV-ERB $\alpha$  可以通过 NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体途径调节小胶质细胞的活化和极化,而类似的结果在肝炎<sup>[17]</sup>、肠炎<sup>[19]</sup>、血管斑块<sup>[20]</sup>等方面的实验中都有所证实。García 等<sup>[21]</sup>的研究表明 ROR $\alpha$  的天然配体褪黑素在脓毒性小鼠中通过降低了 NF- $\kappa$ B 依赖性的促炎反应,恢复了氧化还原平衡和线粒体稳态,从而抑制了 NLRP3 炎症小体。以上的研究提示 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  可能成为 NLRP3 介导的炎症性疾病

治疗的潜在靶点。本研究检测 AF 患者外周血 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  和 NLRP3 的表达, Spearman 相关分析显示, REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  mRNA 表达水平均与 NLRP3 蛋白表达水平呈负相关, 提示在 AF 患者中 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  可能调控 NLRP3 炎症小体的表达。

综上所述, 本研究发现在 AF 患者外周血中 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  表达降低, NLRP3 表达增高, REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  水平与 NLRP3 水平及 LAD 均呈负相关, 提示 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  可能通过调控炎症及心房重构机制参与 AF 的发生发展并对 AF 的发生具有预测价值。本研究的不足之处为样本量较少, 导致入选患者可能存在偏倚, 使结果的代表性受到影响, 且研究为横断面研究, 尚不能确认 REV-ERB $\alpha$ 、ROR $\alpha$  和 NLRP3 在 AF 之中的因果关系, 将来须扩大研究群体, 进行纵向研究, 开展药物干预实验并随访记录, 对昼夜节律机制和 AF 炎症发病机制的相关性做进一步研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 冯光玲, 鄧强, 李欣欣. 心房颤动发病机制的基础研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(6): 2255-2263.
- [2] Kim J, Wang W, Norby FL, et al. Diurnal circadian variations in paroxysmal atrial fibrillation: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study [J]. J Electrocardiol, 2020, 63: 98-103.
- [3] Man K, Loudon A, Chawla A. Immunity around the clock[J]. Science, 2016, 354(6315): 999-1003.
- [4] Rabinovich-Nikitin I, Rasouli M, Reitz CJ, et al. Mitochondrial autophagy and cell survival is regulated by the circadian Clock gene in cardiac myocytes during ischemic stress[J]. Autophagy, 2021, 17(11): 3794-3812.
- [5] 苏洁, 成扶雨, 卜军. 生物钟核受体 ROR $\alpha$  和 REV-ERB $\alpha$  在血管病理生理中的作用[J]. 药学进展, 2020, 44(12): 906-916.
- [6] Pourcet B, Duez H. Circadian Control of Inflammation Pathways: Implications for Circadian Medicine [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1630.
- [7] Hindricks G, Potpara T, Dagres N, et al. Corrigendum to: 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery(EACTS); The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology(ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association(EHRA) of the ESC [J]. Eur Heart J, 2021, 42(40): 4194.
- [8] Ikeda R, Tsuchiya Y, Koike N, et al. REV-ERB $\alpha$  and REV-ERB $\beta$  function as key factors regulating Mammalian Circadian Output[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 10171.
- [9] Lu D, Zhao M, Chen M, et al. Circadian Clock-Controlled Drug Metabolism: Implications for Chronotherapeutics[J]. Drug Metab Dispos, 2020, 48(5): 395-406.
- [10] Zhao Y, Lu X, Wan F, et al. Disruption of Circadian Rhythms by Shift Work Exacerbates Reperfusion Injury in Myocardial Infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2022, 79(21): 2097-2115.
- [11] Ding S, Lin N, Sheng X, et al. Melatonin stabilizes rupture-prone vulnerable plaques via regulating macrophage polarization in a nuclear circadian receptor ROR $\alpha$ -dependent manner[J]. J Pineal Res, 2019, 67(2): e12581.
- [12] Chen YL, Chuang JH, Wang HT, et al. Altered Expression of Circadian Clock Genes in Patients with Atrial Fibrillation Is Associated with Atrial High-Rate Episodes and Left Atrial Remodeling[J]. Diagnostics(Basel), 2021, 11(1): 90.
- [13] 王逸萌, 王巍, 田艳丰. NLRP3 炎症小体与心房颤动关系的研究进展[J]. 中华心血管病杂志, 2021, 49(12): 1276-1280.
- [14] Yao C, Veleva T, Scott L Jr, et al. Enhanced Cardiomyocyte NLRP3 Inflammasome Signaling Promotes Atrial Fibrillation [J]. Circulation, 2018, 138(20): 2227-2242.
- [15] 杨敏, 肖模超. 心房颤动患者左心房形态结构及功能与血栓形成关系的研究进展[J]. 临床心血管病杂志, 2023, 39(2): 103-107.
- [16] Vaziri SM, Larson MG, Benjamin EJ, et al. Echocardiographic predictors of nonrheumatic atrial fibrillation. The Framingham Heart Study [J]. Circulation, 1994, 89(2): 724-730.
- [17] Pourcet B, Zecchin M, Ferri L, et al. Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1 Regulates Circadian Activity of NLRP3 Inflammasome to Reduce the Severity of Fulminant Hepatitis in Mice [J]. Gastroenterology, 2018, 154(5): 1449-1464. e20.
- [18] Kou L, Chi X, Sun Y, et al. The circadian clock protein Rev-erba provides neuroprotection and attenuates neuroinflammation against Parkinson's disease via the microglial NLRP3 inflammasome [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 133.
- [19] Wang S, Lin Y, Yuan X, et al. REV-ERB $\alpha$  integrates colon clock with experimental colitis through regulation of NF- $\kappa$ B/NLRP3 axis [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4246.
- [20] Wu Z, Liao F, Luo G, et al. NR1D1 Deletion Induces Rupture-Prone Vulnerable Plaques by Regulating Macrophage Pyroptosis via the NF- $\kappa$ B/NLRP3 Inflammasome Pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 5217572.
- [21] Garcia JA, Volt H, Venegas C, et al. Disruption of the NF- $\kappa$ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor- $\alpha$  and blocks the septic response in mice [J]. FASEB J, 2015, 29(9): 3863-3875.