

房颤患者心房组织转化生长因子 β 和骨膜蛋白的表达与心房纤维化及消融后再发的关系

谢峻, 王涟, 赵金璇, 吴韩, 魏中海, 徐标
(南京大学医学院附属鼓楼医院心内科, 江苏省南京市 210008)

[关键词] 骨膜蛋白; 转化生长因子 β ; 心房颤动; 心房纤维化

[摘要] **目的** 检测转化生长因子 β (TGF- β)及骨膜蛋白在不同类型心房颤动(简称房颤)患者右心房组织中的表达水平,探讨其与心房纤维化水平及手术消融术后房颤再发的关系。**方法** 60例接受外科手术的瓣膜病患者以及10名心脏移植供体捐赠者纳入本研究。其中33名瓣膜病合并房颤患者接受手术消融治疗,并随访1年。60例瓣膜病患者被分为三组:窦性心律组20例,阵发性房颤组15例,持续性房颤组25例。10名心脏移植供体捐赠者为对照组。免疫印迹法用于评估心房组织 TGF- β 和骨膜蛋白的表达,免疫组织化学染色用于评估心房纤维化水平。**结果** 持续性房颤组 TGF- β 和骨膜蛋白的蛋白表达水平显著高于窦性心律组和对照组($P < 0.01$);房颤患者骨膜蛋白的表达与左心房内径、肺动脉收缩压呈明显正相关($r = 0.53, P < 0.01$ 和 $r = 0.27, P < 0.05$),与射血分数呈明显负相关($r = -0.44, P < 0.01$);右心房组织中检测出的羟脯氨酸含量与胶原容积分数一致,在对照组、窦性心律组、阵发性房颤组、持续性房颤组中呈现明显的上升趋势($P < 0.05$),并与 TGF- β 和骨膜蛋白的表达显著相关($P < 0.01$);消融术后复发组 TGF- β 的表达量明显高于未复发组($P = 0.023$)。**结论** 房颤患者右心房组织中 TGF- β 和骨膜蛋白表达量的上调与其心房纤维化的程度及术后复发密切相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Expression of Atrial TGF- β and Periostin and Its Association with Atrial Fibrillation and Recurrence of Atrial Fibrillation After Surgery Ablation

XIE Jun, WANG Lian, ZHAO Jin-Xuan, WU Han, WEI Zhong-Hai, and XU Biao

(Department of Cardiology, Nanjing Drum Tower Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

[KEY WORDS] Periostin; Transforming Growth Factor- β ; Atrial Fibrillation; Atrial Fibrillation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression levels of transforming growth factor- β (TGF- β) and periostin in right atrial appendage (RAA) in patients with different types of atrial fibrillation (AF) and its association with atrial fibrosis levels and the recurrence of AF after surgery ablation. **Methods** A total of 60 patients with valvular heart diseases (VHD) undergoing valve replacement surgery and 10 healthy heart donors were enrolled in this study. Among these patients with valvular heart diseases, 33 patients combined with atrial fibrillation underwent radiofrequency ablation during surgery operation and were followed up for one year. The 60 patients were divided into three groups: sinus rhythm group (SR, $n = 20$), paroxysmal atrial fibrillation group (PaAF, $n = 15$) and persistent atrial fibrillation group (PeAF, $n = 25$). 10 healthy heart donors were selected as control group ($n = 10$). The protein levels of atrial TGF- β and periostin were measured by Western blot. The degree of atrial fibrosis were evaluated by immunohistochemistry technique. **Results** The expression of TGF- β as well as periostin was significantly higher in the PeAF group compared to the SR group

[收稿日期] 2015-09-07

[修回日期] 2015-11-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81270281和81200148);江苏省医疗卫生专项基金项目(BL2012014);江苏省六大人才高峰项目(2013-WSN-008);南京市杰出青年项目(JQX13006)

[作者简介] 谢峻,博士,主治医师,研究方向为冠心病、瓣膜病和心力衰竭的临床及介入治疗,E-mail为 darcy_pann@hotmail.com。王涟,博士,副主任医师,研究方向为冠心病、瓣膜病和心力衰竭的临床及介入治疗,E-mail为 wangliangly@163.com,为共同第一作者。通讯作者徐标,教授,主任医师,博士研究生导师,研究方向为冠心病的临床和介入治疗,E-mail为 xubiao@medmail.com.cn。

and control group (both $P < 0.01$). Periostin level in patients with atrial fibrillation was positively correlated with left atrial diameter (LAD) and pulmonary artery systolic pressure (PASP) ($r = 0.53$, $P < 0.01$ and $r = 0.27$, $P < 0.05$ respectively) and was negatively correlated with ejection fraction (EF) ($r = -0.44$, $P < 0.01$). Collagen volume fraction (CVF) and hydroxyproline (Hyp) content in RAAs were both ascended significantly and gradually in the control, SR, PaAF and PeAF groups ($P < 0.05$), and was significantly correlated with the expression of TGF- β and periostin ($P < 0.01$). The expression of TGF- β was significantly higher in recurrence group than that in nonrecurrence group after surgery ablation ($P = 0.023$). **Conclusion** Upregulated expression of TGF- β and periostin in RAAs is closely correlated with the degree of atrial fibrosis and recurrence after surgery ablation in patients with AF.

心房颤动(简称房颤)是临床上最常见的心律失常,具有高发病率与致死率,会使缺血性脑卒中的发生风险增加5倍^[1]。心房纤维化是房颤心脏重构的重要标志,被认为可以导致心房冲动传导的不连续,进而增加房颤的易感性及持续性^[2-4]。近期,研究表明心房纤维化程度还可作为房颤再发的预测因子^[5-6]。骨膜蛋白(periostin)作为一种基质细胞蛋白,已被证实可在组织纤维化过程中发挥重要作用^[7-9]。转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β),一种致纤维化生长因子,被认为是心房颤动心肌纤维化过程中的主要调节因子^[10-13]。一些研究发现 TGF- β 会诱导骨膜蛋白的产生^[7,14],而骨膜蛋白本身又能促进 TGF- β 的活化及纤维化^[15-16]。本研究检测了 TGF- β /骨膜蛋白在接受外科手术的瓣膜病患者右心耳中的表达水平,以及相应的心房纤维化程度及房颤消融术后预后,旨在探究 TGF- β /骨膜蛋白与房颤患者右心耳纤维化的关系,明确其在消融术后房颤再发中的作用。

1 对象和方法

1.1 病例选择

来自南京大学医学院附属鼓楼医院的60例瓣膜性心脏病接受瓣膜置换术的患者入组此项研究,男性31例,女性29例,分为三组:窦性心律(sinus rhythm, SR)组20例,阵发性房颤(paroxysmal atrial fibrillation, PaAF)组15例(房颤发作持续时间 < 7 天),持续性房颤(persistent atrial fibrillation, PeAF)组25例(房颤发作持续时间 > 7 天)。所有患者术前常规行二维心脏彩超检查。患有甲状腺功能亢进、病窦综合征、肾脏疾病的患者不纳入此项研究。10名健康的心脏移植供体捐赠者作为对照组。60名瓣膜病患者均接受瓣膜置换术,共40例合并房颤,其中33例接受改良迷宫手术,术后恢复窦性^[17]。所有接受手术消融的房颤患者均被随访12个月。随访的时间节点为术后第1个月末、术后第

3个月末,之后每1~3个月随访1次。24 h动态心电图被用来判断房颤是否再发。

1.2 心脏超声检查

所有患者卧于检查床,采用 Philip IE-33、Philip Sonos5500、Philip Sonos 4500 超声诊断仪,经胸超声心动图(trans thoracic echocardiography, TTE) S5、S4探头,频率2~7 MHz。图像和数据资料用录像和磁光盘保存。经胸超声心动图采用多个平面扫描显示心脏房室腔大小、室壁厚度和运动、瓣膜形态和启闭、了解心功能状况。

1.3 样本采集与保存

所有患者于体外循环建立之前取右心耳组织,一部分组织放入4%甲醛溶液中固定,行免疫组织化学和 Masson 染色检测,其余组织置于液氮并于 -80°C 下保存,用于 Western blot 检测和其它分析。人体组织的收集和分析严格遵循赫尔辛基宣言。所有涉及人体组织的操作均经过南京大学医学院附属鼓楼医院伦理委员会批准。所有参与此项研究的患者均已签署知情同意书。

1.4 右心耳组织蛋白表达水平检测

1.4.1 Western blot 检测 TGF- β 、骨膜蛋白、I 型胶原及 III 型胶原的表达水平 用 PBS 冲洗组织后匀浆于 1:100 配制的含有蛋白抑制剂(Sigma 公司)的 RIPA 裂解缓冲液中。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。当蛋白质混合物在 SDS-PAGE 上分离后,将蛋白转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜室温封闭于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中 1 h,分别加入 TGF- β 抗体(工作浓度 1:200, Santa Cruz 公司)、骨膜蛋白抗体(工作浓度 1:500, Santa Cruz 公司)、I 型胶原抗体(工作浓度 1:400, Abcam 公司)、III 型胶原抗体(工作浓度 1:500, Abcam 公司)孵育过夜。抗 GAPDH 单抗(1:5000, Bioword 公司)作为内参。用 TBST 冲洗后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10000, Bioword 公司),加入增强型化学发光试剂(enhanced chemiluminescence's reagents, ECL)(Millipore 公司)后,胶片曝光获得图像。用 Bio Rad

仪器 Quantity One 软件扫描并定量分析条带。所有蛋白定量均经过 GAPDH 内参校正,并以健康人群组为阴性对照进行标化。Western blot 检测 I 型胶原及 III 型胶原含量,每组选用 3 个不同的组织标本。

1.4.2 免疫组织化学法观察 TGF- β 和骨膜蛋白的表达水平

将石蜡包埋的组织制成 4 μm 厚切片, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 封闭于含 1% 胎牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的 PBS 缓冲液中 30 min。每张切片分别滴加 TGF- β 抗体 (工作浓度 1:100, Santa Cruz 公司)、骨膜蛋白抗体 (工作浓度 1:100, Santa Cruz 公司), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 冲洗 3 次后, 滴加二抗室温静置 20 min, 用水润洗, 苏木精复染, 中性树胶封片。

1.5 心房纤维化程度的检测

1.5.1 Masson 染色及纤维化定量分析 将组织置于含 4% 多聚甲醛的 PBS 缓冲液中固定 24 h 后, 进行酒精脱水并包埋于石蜡中, 制成 4 μm 厚切片进行 Masson 染色以突出胶原纤维。每张切片在显微镜下随机选取 5 个高倍视野, 采用 Image Pro Plus 分析软件测定胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF)。

1.5.2 右心耳组织羟脯氨酸含量的检测 羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp) 水平的检测采用 Hyp 检

测试剂盒 (由南京建成生物工程研究所提供), 按试剂盒操作说明进行检测。

1.6 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较用 t 检验 (正态分布) 或 Mann-Whitney 检验 (非正态分布)。多组之间的比较用单向方差分析法 (正态分布) 或 Kruskal-Wallis 检验 (非正态分布)。分类变量的比较采用 χ^2 分析。相关性分析采用 Pearson, Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特征

除左心房内径 (left atrial diameter, LAD) 及肺动脉收缩压 (pulmonary artery systolic pressure, PASP) 外, 三组间其余超声心动图参数没有显著差异。阵发性房颤组和持续性房颤组 LAD 明显大于窦性心律组 ($P < 0.01$), 且持续性房颤组 LAD 明显大于阵发性房颤组 ($P < 0.05$)。持续性房颤组 PASP 最大, 其次为阵发性房颤组, 再次为窦性心律组, 且持续性房颤组与窦性心律组之间存在统计学差异 ($P < 0.01$)。各组间临床基本信息、二尖瓣病变的原因、手术类型以及术前用药等均无显著差异 (表 1)。

表 1. 研究人群的临床特征

Table 1. Clinical characteristics of the study population

| 临床参数 | 窦性心律组 ($n=20$) | 阵发性房颤组 ($n=15$) | 持续性房颤组 ($n=25$) | P 值 |
|--------------------------------|------------------|----------------------------|------------------------------|--------|
| 基本信息 | | | | |
| 男/女 (例) | 11/9 | 7/8 | 13/12 | 0.887 |
| 年龄 (岁) | 51.7 \pm 10.0 | 50.9 \pm 11.7 | 53.3 \pm 8.6 | 0.735 |
| BMI (kg/m^2) | 22.4 \pm 2.6 | 22.8 \pm 3.0 | 22.8 \pm 3.3 | 0.905 |
| NYHA 分级 (I/II/III/IV) (例) | 2/6/11/1 | 1/5/9/0 | 1/7/13/4 | 0.545 |
| 超声心动图参数 | | | | |
| LVEDD (cm) | 5.4 \pm 0.7 | 5.6 \pm 0.9 | 5.7 \pm 1.1 | 0.583 |
| LVESD (cm) | 3.9 \pm 0.6 | 4.2 \pm 0.7 | 4.3 \pm 1.0 | 0.162 |
| EF | 55.1% \pm 3.8% | 52.6% \pm 5.3% | 52.2% \pm 5.2% | 0.129 |
| LAD (cm) | 4.4 \pm 0.5 | 5.3 \pm 0.9 ^a | 6.0 \pm 0.9 ^{ab} | <0.001 |
| PASP (mmHg) | 27.8 \pm 9.0 | 40.4 \pm 17.8 | 47.2 \pm 18.4 ^a | 0.001 |
| 左心房血栓 (例) | 0 | 1 | 3 | 0.157 |
| 二尖瓣病变类型 (例) | | | | |
| PMS/PMR/MS + MR | 6/6/8 | 6/4/5 | 9/4/12 | 0.766 |
| 伴有 TAP | 5 | 3 | 6 | 0.936 |
| 二尖瓣病变原因 (例) | | | | |
| 退行性/风湿性 | 8/12 | 5/10 | 6/19 | 0.509 |
| 术前用药 (例) | | | | |
| 洋地黄 | 12 | 10 | 21 | 0.170 |
| ACEI/ARB | 8 | 7 | 8 | 0.641 |
| β -阻滞剂 | 4 | 5 | 10 | 0.340 |
| CCB | 10 | 10 | 13 | 0.572 |
| 地高辛 | 5 | 6 | 13 | 0.177 |

a 为 $P < 0.01$, 与窦性心律组比较; b 为 $P < 0.05$, 与阵发性房颤组比较。

2.2 房颤患者 TGF- β 和骨膜蛋白的表达

Western blot 结果显示,与对照组相比,TGF- β 和骨膜蛋白的表达在阵发性房颤组和持续性房颤组心房组织中显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);持续性房颤组 TGF- β 和骨膜蛋白的表达水平显著高于窦性心律组($P < 0.01$);阵发性房颤组 TGF- β 和骨膜蛋白的

表达也高于窦性心律组,但 TGF- β 的表达没有达到统计学差异($P = 0.288$);持续性房颤组 TGF- β 和骨膜蛋白的表达呈现高于阵发性房颤组的趋势(图 1A 和 1B)。免疫组织化学染色结果与 Western blot 结果一致,阵发性房颤组和持续性房颤组 TGF- β 和骨膜蛋白的表达高于对照组(图 1C)。

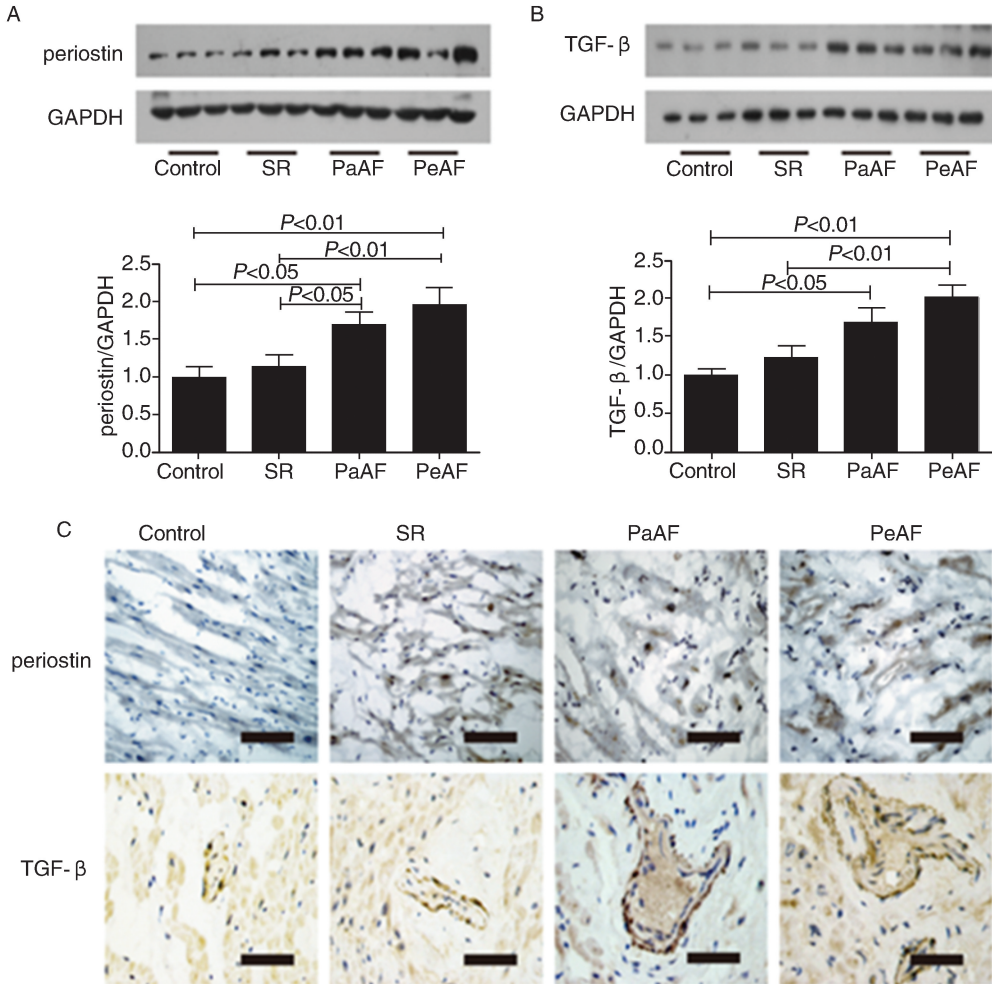


图 1. 骨膜蛋白和 TGF- β 在右心耳组织中的表达 Bar = 50 μm 。

Figure 1. Expression of periostin and TGF- β in RAA

2.3 TGF- β 和骨膜蛋白的表达与临床参数间的关系

持续性房颤组骨膜蛋白的表达显著高于阵发性房颤组($P = 0.033$)、窦性心律组($P = 0.006$)及对照组($P = 0.009$;图 2A)。骨膜蛋白的表达水平与 TGF- β 的表达水平有很强的相关性($r = 0.44$, $P < 0.01$;图 2B),骨膜蛋白的表达水平与 LAD($r = 0.53$, $P < 0.01$;图 2C)和 PASP($r = 0.27$, $P < 0.05$;图 2E)呈正相关,与射血分数(ejection fraction, EF)呈负相关($r = -0.44$, $P < 0.001$;图 2D)。

2.4 房颤患者右心耳纤维化水平

Western blot 结果显示, I 型胶原、III 型胶原及 I 型胶原/III 型胶原比值在对照组、窦性心律组、阵发性房颤组、持续性房颤组呈现明显递增趋势(图 3A-3D),除对照组与窦性心律组间 I 型胶原($P = 0.174$)和 III 型胶原($P = 0.921$)及阵发性房颤组、持续性房颤组间 III 型胶原($P = 0.110$)含量外,其余组间均达到统计学差异($P < 0.05$)。Masson 染色发现间质纤维化的百分率在持续性房颤组最高,在阵发性房颤组、窦性心律组及对照组中依次递降,各组之间均存在显著差异(图 3E 和 3F)。根据右心耳

组织中检测出的 Hyp 含量测算出的胶原沉积量,与 CVF 一致,在对照组、窦性心律组、阵发性房颤组、

持续性房颤组中呈现明显的上升趋势,且各组间均达到统计学差异($P < 0.05$;图 3G)。

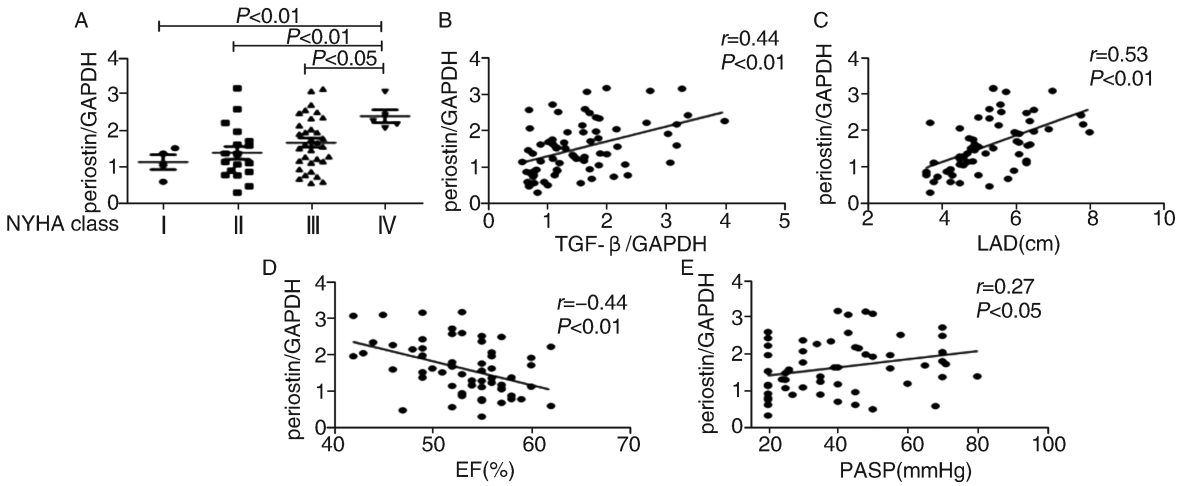


图 2. TGF- β 和骨膜蛋白的表达与临床参数之间的关系

Figure 2. Correlation between TGF- β /periostin and clinical parameters

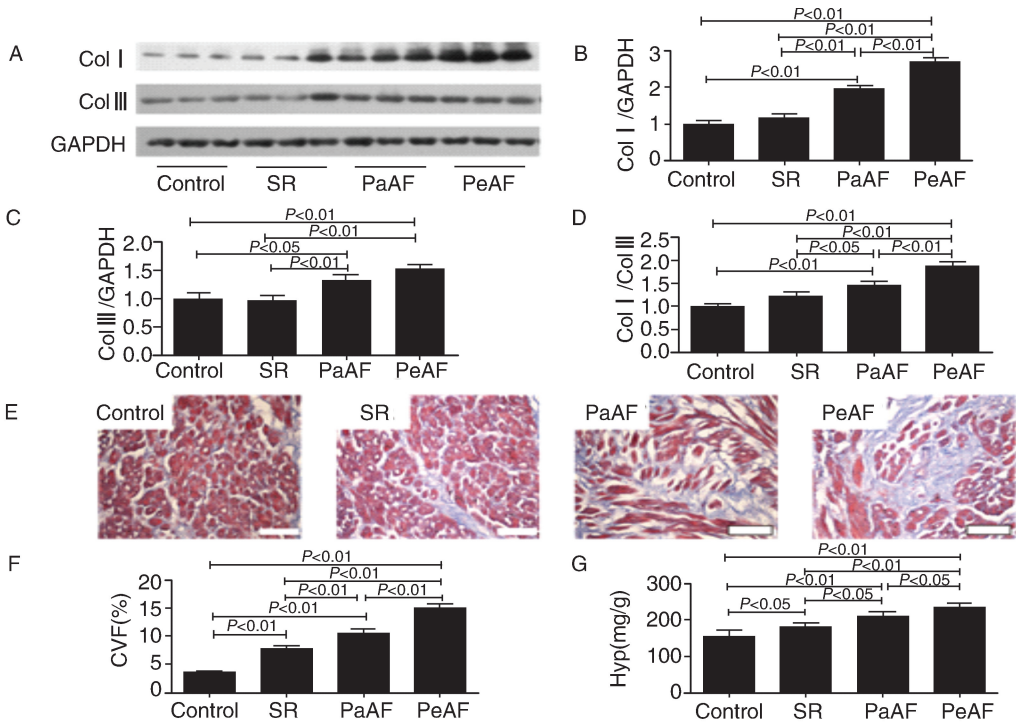


图 3. 房颤患者心房纤维化水平 Bar = 100 μ m。

Figure 3. Atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation

2.5 TGF- β 和骨膜蛋白的表达与纤维化标志物之间的相关性

相关性分析分析了 TGF- β 和骨膜蛋白的表达与纤维化标志物(包括 I 型胶原、III 型胶原、I 型胶原/III 型胶原比值、Hyp 含量、CVF)之间的关系,结果证实除 III 型胶原($P = 0.06$)外,骨膜蛋白的表达

与其它纤维化标志物紧密相关,而 TGF- β 与上述所有的纤维化标志物水平均呈正相关(表 2)。

2.6 射频消融术后房颤复发组与非复发组临床参数比较

考虑到心房纤维化与房颤复发之间的密切联系,通过测定右心耳组织中 TGF- β 和骨膜蛋白的表

达量,分析其与瓣膜性房颤患者射频消融术治疗不成功之间是否存在关联。在 40 名房颤患者中,有 33 名患者在行外科手术的同时行射频消融术,将其分为两组:成功恢复窦性心律并维持 12 个月的为未复发组($n=23$),没有维持窦性心律 12 个月的为复发组($n=10$)。复发组 LAD 明显大于未复发组($P=0.034$),两组间的其它临床参数没有显著差异。高龄、高 BMI、左心室舒张期末内径及左心室收缩期末内径大的患者复发倾向较大。复发组 TGF- β 蛋白水平显著高于未复发组($P=0.023$)。然而,尽管骨膜蛋白水平在复发组中呈现较高趋势,但两组间没有统计学差异($P=0.295$;表 3)。

表 2. 右心耳组织中 TGF- β 和骨膜蛋白的表达与纤维化标志物之间的相关性($n=70$)

Table 2. Correlations between expression of TGF- β /periostin in RAAs and fibrosis markers($n=70$)

| 指 标 | I 型胶原 | III 型胶原 | I 型胶原/III 型胶原 | Hyp | CVF |
|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| TGF- β | 0.499 ^a | 0.306 ^a | 0.419 ^a | 0.354 ^a | 0.513 ^a |
| 骨膜蛋白 | 0.422 ^a | 0.226 | 0.358 ^a | 0.465 ^a | 0.478 ^a |

a 为 $P < 0.01$ 。

表 3. 随访 12 个月患者的临床信息

Table 3. Parameters of patients followed up for 12 months

| 临床参数 | 未复发组 | 复发组 | P 值 |
|-----------------------------|------------------|------------------|-------|
| 基本信息 | | | |
| 男/女(例) | 12/11 | 5/5 | 1.000 |
| 年龄(岁) | 50.7 \pm 8.9 | 56.5 \pm 6.5 | 0.072 |
| BMI(kg/m ²) | 22.5 \pm 2.8 | 24.8 \pm 3.7 | 0.06 |
| NYHA 分级 (I/II/III/IV)(例) | 2/8/12/1 | 0/1/7/2 | 0.203 |
| 超声心动图参数 | | | |
| LVEDD(cm) | 5.4 \pm 0.9 | 6.0 \pm 1.0 | 0.125 |
| LVESD(cm) | 4.0 \pm 0.9 | 4.5 \pm 0.9 | 0.188 |
| EF | 53.1% \pm 4.6% | 50.7% \pm 5.8% | 0.214 |
| LAD(cm) | 5.6 \pm 0.6 | 6.6 \pm 1.2 | 0.034 |
| PASP(mmHg) | 44.0 \pm 18.7 | 45.1 \pm 15.0 | 0.871 |
| 术前用药(例) | | | |
| 洋地黄 | 22 | 10 | 1.000 |
| ACEI/ARB | 9 | 2 | 0.430 |
| β 受体阻滞剂 | 3 | 1 | 1.000 |
| CCB | 8 | 2 | 0.682 |
| TGF- β | 1.6 \pm 0.5 | 2.4 \pm 0.8 | 0.023 |
| 骨膜蛋白 | 1.7 \pm 0.7 | 1.9 \pm 0.7 | 0.295 |

3 讨 论

本研究中,我们检测了房颤患者右心耳组织中 TGF- β 和骨膜蛋白的表达量及纤维化水平。结果发现,在房颤患者右心耳组织中骨膜蛋白表达的上调与 TGF- β 表达水平的升高相关;TGF- β 、骨膜蛋白的表达与房颤患者右心耳组织纤维化指数相关;较大

的 LAD 及 TGF- β 的表达增高与射频消融术后 12 个月内的房颤复发相关。以上这些结果均提示 TGF- β /骨膜蛋白信号通路参与了房颤心房纤维化过程。

心房间质纤维化,作为心律失常性结构重塑的重要标志,在房颤的发生和维持中具有重要意义。在过去的 10 年里,有关心房纤维化与房颤维持间关系的研究不断深入^[2]。心房纤维化使得相邻心肌束发生电分离,导致电传导异常,从而促进房颤的维持^[18-19]。反之,房颤又会诱导心房结构重构,表现为心房纤维化,通过动物模型进行超速心房起搏可诱发房颤,促进心房纤维化^[4,20]。本研究中,尽管没有发现明确的因果关系,Masson 染色的结果仍提示心房纤维化的水平从对照组、窦性心律组、阵发性房颤组到持续性房颤组呈现递增趋势,这一发现也支持了 Cao 等^[21]的研究。心房组织纤维化主要表现为细胞外基质蛋白如 I 型胶原和 III 型胶原的过度沉积^[22]。I 型胶原/III 型胶原比值的增加可影响心肌僵硬并诱导心房纤维化^[21,23]。因此,本研究检测了 I 型胶原、III 型胶原及计算了 I 型胶原/III 型胶原比值。与同类研究结果一致^[21],房颤组中 I 型胶原、III 型胶原及其比值增加,提示房颤中心房纤维化程度增高。我们进一步检测了右心耳组织中胶原蛋白特征氨基酸——Hyp 的含量。Hyp 含量的变化与 CVF 及胶原含量的变化相一致,进一步证实了房颤中心房纤维化水平升高。

骨膜蛋白,又称成骨细胞特异因子 2,在各种器官的炎症反应、组织重塑、血管生成中的作用不断被发现^[7,24-27]。一些证据表明,骨膜蛋白在心衰患者的心室中呈高表达^[8,27-29],骨膜蛋白的过表达导致了心功能丧失^[28]。与在心室中的表达相似,我们首次发现骨膜蛋白在心力衰竭(NYHA 分级高)患者的右心耳组织中表达量增加,且与心脏射血分数呈负相关。同时,本研究也证实了骨膜蛋白的表达水平与 LAD 和 PASP 呈正相关关系。鉴于心力衰竭和增大的 LAD 往往提示组织重构的发生,上述结果提示骨膜蛋白很有可能是房颤心房重构中的一个重要调节因子。一些研究指出骨膜蛋白在多种疾病的纤维化进程中发挥作用^[7,9,14,30]。本研究发现,相较于对照组与窦性心律组,房颤组中骨膜蛋白的表达明显上调,且骨膜蛋白的表达与纤维化标志物的含量存在强相关性,提示骨膜蛋白可能参与调节心房纤维化并促进心房结构的重构,然而其中的潜在分子机制尚未明确。

TGF- β 是一种致纤维因子,已被证实是在心房纤维化中发挥重要作用,被认为是影响房颤中心房重

构的关键因素^[31]。与同类研究一致^[10],本研究结果显示房颤患者右心耳中 TGF- β 的表达增加,且 TGF- β 的表达与纤维化水平显著相关。近年来,有关 TGF- β 与骨膜蛋白相互作用的研究证据不断积累。Li 等^[32]发现血管紧张素 II 能增加心脏成纤维细胞中骨膜蛋白的表达量,而抑制 TGF- β 后,升高的骨膜蛋白表达水平又降至正常。在肾小球系膜细胞、肾上皮细胞及含人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 的骨髓基质细胞中加入 TGF- β 会导致骨膜蛋白的表达增加^[7,14,33]。上述研究表明,TGF- β 在多种组织或细胞中诱导骨膜蛋白的表达,且这一过程往往伴随着纤维化程度的增加^[7,9,14]。然而也有一些研究指出骨膜蛋白也可以反过来诱导 TGF- β 的合成并激活其信号传导^[15-16]。尽管 TGF- β 与骨膜蛋白之间的因果关系尚未在体外实验中验证,房颤患者右心耳组织中 TGF- β 的蛋白水平与骨膜蛋白的表达呈显著相关。综上所述,TGF- β 和骨膜蛋白均与纤维化标志物显著相关,提示 TGF- β /骨膜蛋白参与了房颤的心房纤维化过程。

对于患有瓣膜性房颤的患者,多在瓣膜置换术的同时予以手术消融治疗房颤。尽管房颤的外科治疗不断进步,消融术后仍存在房颤复发的可能。因此,寻找消融术后房颤复发的预测因子是非常有意义的。近年来,相关研究关注的焦点集中在心房纤维化及 LAD 在预测房颤复发中的意义^[34-36]。最近,这一研究取得突破进展,许多临床研究揭示,通过延迟增强核磁共振评价心房纤维化可以预测肺静脉隔离或导管消融术后房颤的复发^[5-6]。因此,我们分析了一些临床指标及 TGF- β 和骨膜蛋白的表达量以寻找与房颤复发相关的预测因子。在这些临床指标中,只有 LAD 在复发组中显著高于未复发组。这一结果也与前期观察研究相吻合,提示 LAD 可以作为一个强有力的独立的评估导管消融术后房颤复发可能的预测因子^[35,37]。与 LAD 一样,血浆中 TGF- β 含量以及右心耳中 TGF- β 的蛋白水平也被认为对导管消融术或手术治疗后房颤的复发具有预测意义^[37-39]。而目前尚未有研究报道可通过检测房颤患者右心耳组织中 TGF- β 的蛋白水平预测手术治疗的成功率。在本研究中,房颤复发组中 TGF- β 表达的上调是可以预见的。骨膜蛋白,另一种房颤心房纤维化中所涉及的分子,它的表达量在复发组和未复发组间没有差异。尽管这一结果与预期不相符合,进一步的研究仍是十分必要的,以排除由于样本量过小导致两组间没有差异。

综上所述,本研究通过检测 TGF- β 及骨膜蛋白在房颤患者右心耳组织中的表达水平,首次证实了房颤患者右心耳组织中 TGF- β 和骨膜蛋白表达的上调与心房纤维化密切相关且 TGF- β 对于消融术后房颤的复发具有预测意义。对于 TGF- β /骨膜蛋白参与房颤心房纤维化的分子机制及骨膜蛋白与房颤复发的相关性还需进一步研究探索。

[参考文献]

- [1] Syed TM, Halperin JL. Left atrial appendage closure for stroke prevention in atrial fibrillation: State of the art and current challenges [J]. *Nat Clin Prac Cardiovasc Med*, 2007, 4 (8): 428-435.
- [2] Jun X, Guanggen C, Fardad E, et al. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation [J]. *Circulation*, 2004, 109 (3): 363-368.
- [3] Knackstedt C, Gramley F, Schimpf T, et al. Association of echocardiographic atrial size and atrial fibrosis in a sequential model of congestive heart failure and atrial fibrillation [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2008, 17 (5): 318-324.
- [4] Nakatani Y, Nishida K, Sakabe M, et al. Tranilast prevents atrial remodeling and development of atrial fibrillation in a canine model of atrial tachycardia and left ventricular dysfunction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61 (5): 582-588.
- [5] Marrouche NF, Wilber D, Hindricks G, et al. Association of atrial tissue fibrosis identified by delayed enhancement MRI and atrial fibrillation catheter ablation: The DECAAF study [J]. *JAMA*, 2014, 311 (5): 498-506.
- [6] Neilan TG, Mongeon FP, Shah RV, et al. Myocardial extracellular volume expansion and the risk of recurrent atrial fibrillation after pulmonary vein isolation [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2014, 7 (1): 1-11.
- [7] Mael-Ainin M, Abed A, Conway SJ, et al. Inhibition of periostin expression protects against the development of renal inflammation and fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25 (8): 1 724-736.
- [8] Liu W, Zi M, Tsui H, et al. A novel immunomodulator, FTY-720 reverses existing cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by targeting NFAT (nuclear factor of activated T-cells) signaling and periostin [J]. *Circ Heart Fail*, 2013, 6 (4): 833-844.
- [9] Lorts A, Schwaneckamp JA, Baudino TA, et al. Deletion of periostin reduces muscular dystrophy and fibrosis in mice by modulating the transforming growth factor-beta pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109 (27): 10 978-983.
- [10] Xiao H, Lei H, Qin S, et al. TGF-beta1 expression and atrial myocardium fibrosis increase in atrial fibrillation secondary to rheumatic heart disease [J]. *Clin Cardiol*, 2010, 33 (3): 149-156.
- [11] Gramley F, Lorenzen J, Koellensperger E, et al. Atrial fibrosis and atrial fibrillation: The role of the TGF-beta1 signaling pathway [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 143 (3): 405-413.
- [12] Rahmutula D, Marcus GM, Wilson EE, et al. Molecular basis of selective atrial fibrosis due to overexpression of transforming growth factor-beta1 [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99 (4): 769-779.

- [13] 张驰原, 胡恒境, 吴智鸿, 等. 房颤相关差异性表达蛋白质研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35 (9): 1 706-711.
- [14] Sen K, Lindenmeyer MT, Gaspert A, et al. Periostin is induced in glomerular injury and expressed de novo in interstitial renal fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2011, 179 (4): 1 756-767.
- [15] Sidhu SS, Yuan S, Innes AL, et al. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107 (32): 14 170-175.
- [16] Butcher JT, Norris RA, Hoffman S, et al. Periostin promotes atrio-ventricular mesenchyme matrix invasion and remodeling mediated by integrin signaling through Rho/PI 3-kinase [J]. *Dev Biol*, 2007, 302 (1): 256-266.
- [17] Saint LL, Damiano RJ Jr. Surgical treatment of atrial fibrillation [J]. *Mo Med*, 2012, 109 (4): 281-287.
- [18] Yue L, Xie J, Nattel S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89 (4): 744-753.
- [19] 蒋春英, 凌琳, 方春梅, 等. 不同类型心房颤动患者右心房肌缝隙连接蛋白40的分布及表达变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (6): 508-513.
- [20] Dawson K, Wakili R, Ordog B, et al. MicroRNA29: A mechanistic contributor and potential biomarker in atrial fibrillation [J]. *Circulation*, 2013, 127 (14): 1 466-475.
- [21] 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*, 2013, 166 (3): 702-708.
- [22] Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: Involvement in cardiac hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2002, 91 (12): 1 103-113.
- [23] Grammer JB, Bohm J, Dufour A, et al. Atrial fibrosis in heart surgery patients decreased collagen III/I ratio in postoperative atrial fibrillation [J]. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100 (3): 288-294.
- [24] Kim SS, Jackson-Boeters L, Darling MR, et al. Nifedipine induces periostin expression in gingival fibroblasts through TGF-beta [J]. *J Dent Res*, 2013, 92 (11): 1 022-028.
- [25] Yamashita O, Yoshimura K, Nagasawa A, et al. Periostin links mechanical strain to inflammation in abdominal aortic aneurysm [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (11): e79753.
- [26] Takanami I, Abiko T, Koizumi S. Expression of periostin in patients with non-small cell lung cancer: Correlation with angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. *Int J Biol Markers*, 2008, 23 (3): 182-186.
- [27] Sheng Z, Wu H, Xia W, et al. Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts [J]. *J Cardiol*, 2014, 63 (5): 373-378.
- [28] Naruto K, Ryuichi M, Noriko N, et al. Periostin as a novel factor responsible for ventricular dilation [J]. *Circulation*, 2004, 110 (13): 1 806-813.
- [29] Stansfield WE, Andersen NM. Periostin is a novel factor in cardiac remodeling after experimental and clinical unloading of the failing heart [J]. *Ann Thorac Surg*, 2009, 88 (6): 1 916-921.
- [30] Pohjola V, Rysä J, Näpänkangas J, et al. Left ventricular periostin gene expression is associated with fibrogenesis in experimental renal insufficiency [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27 (1): 115-122.
- [31] Corradi D. Atrial fibrillation from the pathologist's perspective [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2014, 23 (2): 71-84.
- [32] Li L, Fan D, Wang C, et al. Angiotensin II increases periostin expression via Ras/p38 MAPK/CREB and ERK1/2/TGF-β1 pathways in cardiac fibroblasts [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91 (1): 80-89.
- [33] Oku E, Kanaji T, Takata Y, et al. Periostin and bone marrow fibrosis [J]. *Int J Hematol*, 2008, 88 (1): 57-63.
- [34] Akkaya M, Higuchi K, Koopmann M, et al. Relationship between left atrial tissue structural remodelling detected using late gadolinium enhancement mri and left ventricular hypertrophy in patients with atrial fibrillation [J]. *Europace*, 2013, 15 (12): 1 725-732.
- [35] den Uijl DW, Delgado V, Bertini M, et al. Impact of left atrial fibrosis and left atrial size on the outcome of catheter ablation for atrial fibrillation [J]. *Heart*, 2011, 97 (22): 1 847-851.
- [36] Saito T, Tamura K, Uchida D, et al. Histopathological features of the resected left atrial appendage as predictors of recurrence after surgery for atrial fibrillation in valvular heart disease [J]. *Circ J*, 2007, 71 (1): 70-78.
- [37] Wu CH, Hu YF, Chou CY, et al. Transforming growth factor-β1 level and outcome after catheter ablation for nonparoxysmal atrial fibrillation [J]. *Heart Rhythm*, 2013, 10 (1): 10-15.
- [38] Wang W, Liu L, Li Y, et al. Does the expression of transforming growth factor β-1: Affect the outcome of the radiofrequency modified maze procedure in patients with rheumatic atrial fibrillation [J]? *Tex Heart Inst J*, 2012, 39 (1): 17-23.
- [39] On YK, Jeon ES, Lee SY, et al. Plasma transforming growth factor beta1 as a biochemical marker to predict the persistence of atrial fibrillation after the surgical maze procedure [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 137 (6): 1 515-520.

(此文编辑 文玉珊)