

心房颤动患者血清 TNF- α 、TGF- β 水平及其对心肌成纤维细胞趋化作用的影响

段卡丹, 谷云飞, 张守彦, 金 军, 薛书峰

(郑州大学附属洛阳市中心医院, 河南省洛阳市 471000)

[关键词] 心房颤动; 心肌成纤维细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 转化生长因子 β ; 趋化作用

[摘要] 目的 研究心房颤动与非心房颤动患者血清中转化生长因子 β (TGF- β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的动态变化及其对心肌成纤维细胞趋化运动诱导能力的差异。方法 采用酶联免疫吸附法检测心房颤动与非心房颤动患者血清中 TGF- β 、TNF- α 蛋白含量;培养新生 SD 大鼠的心肌成纤维细胞,取 3~4 代细胞采用 Transwell 装置检测不同浓度(1 μ g/L、10 μ g/L、50 μ g/L)的 TGF- β 、TNF- α 诱导成纤维细胞运动的能力差异。结果 血清中 TGF- β 、TNF- α 含量各组均有明显差异,其中持续性心房颤动组最高,非心房颤动房性心律失常组明显高于阵发性心房颤动组,对照组最低;在不同浓度(1 μ g/L、10 μ g/L、50 μ g/L) TGF- β 、TNF- α 的趋化诱导作用下,迁移至下室的细胞 50 μ g/L 组较其它浓度组明显增高,10 μ g/L 组次之,与其它各组比较均具有统计学意义。Logistic 回归分析表明,迁移至滤膜下的细胞数与血清中 TGF- β 、TNF- α 含量有相关性。结论 各组血清中 TGF- β 、TNF- α 含量不同,说明心房颤动的发生与潜在的炎症状态有关;TGF- β 、TNF- α 对心肌成纤维细胞具有趋化作用,心房颤动患者心肌成纤维细胞的趋化作用部分是由 TNF- α 、TGF- β 介导的;血清中 TNF- α 、TGF- β 水平变化间接反映了心肌损伤的存在、范围和程度。

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

Serum Levels of Tumor Necrosis Factor-alpha and Transforming Growth Factor-beta in Atrial Fibrillation and Its Chemotatic Effects on Cardiac Fubroblast

DUAN Ka-Dan, GU Yun-Fei, ZHANG Shou-Yan, JIN Jun, and XUE Shu-Feng

(Luoyang Center Hospital of Zhengzhou University, Luoyang, Henan 471000)

[KEY WORDS] Atrial Fibrillation; Cardiac Fibroblasts; Tumor Necrosis Factor-Alpha; Transforming Growth Factor-beta; Chemotatic Effects

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the different serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and transforming growth factor-beta (TGF- β) between atrial fibrillation and other control groups, and its chemotatic effects on cardiac fibroblast. **Methods** Serum concentrations of TNF- α and TGF- β were measured by enzyme-linked immune-absorbent assay (ELISA); Cardiac fibroblast were isolated from the ventricles of 1~3 days Sprague-Dawley neonatal rats and passaged three to four generation, the transwell chamber assay were used to test the different chemotatic effects of the cardiac fibroblasts with the different concentration (1 μ g/L, 10 μ g/L, 50 μ g/L) of TNF- α and TGF- β . **Results** Compared with control group, the serum of TNF- α and TGF- β in other groups were obviously increased. The group of persistent atrial fibrillation (per-Af) was the highest, the serum of TNF- α and TGF- β in non-Af atrial arrhythmia (AA) was higher than paroxysmal Af (per-Af), the control group was the least. In different concentration (1 μ g/L, 10 μ g/L, 50 μ g/L) of TNF- α and TGF- β chemotaxis induced, the number of cells that migrated through the polycarbonate membrane were different, 50 μ g/L group were significantly increased compared with other concentrations, the number of migrated cell in 10 μ g/L group was higher than 1 μ g/L group. The multiple Logistic regression analysis showed that the migrated cells in the lower surface were related to the concentration of TNF- α and TGF- β . **Conclusions** The different concentration of TNF- α and

[收稿日期] 2014-12-31

[修回日期] 2015-04-14

[作者简介] 段卡丹, 硕士, 研究方向为心房颤动及心房纤维化, E-mail 为 duankadan03@163.com。谷云飞, 硕士研究生, 主治医师, E-mail 为 yunfeigu@126.com。张守彦, 博士后, 主任医师, 擅长冠心病、先天性心脏病介入治疗以及心血管急危重症诊治和心脏患者的康复, E-mail 为 zsydoctor@163.com。

TGF- β among each group show that the occurrence of atrial fibrillation is associated with the potential inflammatory state. TNF- α and TGF- β have chemotaxis effect on cardiac fibroblast, its level is correlated with chemotactic movement. The chemotaxis of the serum with atrial fibrillation patients is partly mediated by TNF- α and TGF- β and it plays an important role in atrial fibrosis. The concentration of TNF- α and TGF- β can be used to reflect indirectly the presence, severity, extent of the myocardial damage.

心房颤动 (atrial fibrillation, AF) 是临床上最常见的一种快速型心律失常, 它的发病率随着年龄的增长而增加, 超过 65 岁的人群中发病率为 5.9%^[1]。目前心房颤动的具体发病机制尚不明确, 研究表明^[2], 心房纤维化和炎症在心房颤动的发生和维持中起着重要作用。转化生长因子 (TGF- β) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 作为多效性的炎症因子, 在心房纤维化过程中起着重要作用。传统认为成纤维细胞具有增殖、收缩和趋化运动等多种生物学特性, 通过这些生物学功能, 它参与各种组织损伤修复过程。我们前期^[3-4] 已从静态及动态方面观察到心房颤动患者血清对成纤维细胞的生长及迁移具有诱导作用, 但心房颤动患者血清中哪类物质参与诱导成纤维细胞的迁移运动尚不明确。多项研究^[5-7] 表明心房颤动患者心房组织中 TGF- β 、TNF- α 升高, 它们在心房颤动患者血清中的水平如何? 以及是否对成纤维细胞具有趋化作用目前未见研究报道。本文旨在研究心房颤动患者血清中 TNF- α 、TGF- β 水平及评价 TNF- α 、TGF- β 水平变化与趋化运动的相关性, 并验证心房颤动患者心肌成纤维细胞的趋化作用部分是由 TNF- α 、TGF- β 介导的观点。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 高糖干粉培养基、新生牛血清、胰酶-

EDTA (Gibco 公司), 胶原酶 B 型 (Roche 公司), 胰蛋白酶 1:250 (Americo 公司), Transwell 购自 Corning 公司, Gimsa 染剂购自南京建成公司, 新生 SD 大鼠 (郑州大学动物中心), TNF- α 、TGF- β 酶联免疫试剂盒及重组人 TNF- α 、TGF- β (Genzyme 公司)。

1.2 病例选择

实验对象共分为四组。其中房性心律失常患者共 69 例, 选自 2012 年 6 月至 2013 年 6 月在郑州大学附属洛阳市中心医院住院期间被诊断为房性心律失常的患者。其中非心房颤动房性心律失常组 (non-Af atrial arrhythmia, AA) 共 20 例, 包括房性期前收缩、房速、房扑; 阵发性心房颤动组 (paroxysmal Af, Paro-Af) 共 25 例, 定义为发作 7 天内, 可自行转复窦律或干预治疗转复; 持续性心房颤动组 (persistent Af, per-Af) 共 24 例, 定义为持续时间大于 7 天; 对照组为年龄、性别和相关疾病匹配的窦性心律者共 20 例。患者均经病史、体格检查、心电图、心脏彩超、动态心电图等诊断证实。近 3 个月内有心肌梗死病史、急性冠状动脉综合症、心肌病心肌炎, 近 2 个月内有手术外伤史或感染史, 肿瘤及免疫系统疾病, 肝肾功能不全患者, 近期正在服用抗炎药物或激素替代治疗患者等排除在外。各组年龄、性别、相关疾病差异无统计学意义 (表 1)。

1.3 标本采集

入选患者均晨起空腹, 静卧 30 min 后, 采肘静脉血 4 mL, 室温下充分凝固后, 3000 r/min 离心 20 min, 离心后取上清。-60°C 保存备用。

表 1. 临床资料

Table 1. Clinical data

临床资料	对照组 (n = 20)	AA (n = 20)	Paro-Af (n = 25)	Per-Af (n = 24)
年龄 (岁)	65.4 ± 5.4	69.4 ± 5.7	68.3 ± 5.6	69.2 ± 5.6
男性 (例)	11 (55.0%)	10 (50.0%)	14 (56.0%)	13 (54.2%)
吸烟 (例)	9 (45.0%)	10 (50.0%)	12 (48.0%)	11 (44.0%)
高血压 (例)	10 (50.0%)	12 (60.0%)	14 (56.0%)	13 (54.1%)
心衰 (例)	12 (60.0%)	11 (55.0%)	13 (52.0%)	11 (45.8%)
心脏瓣膜病 (例)	7 (35.0%)	8 (40.0%)	10 (40.0%)	11 (45.8%)
糖尿病 (例)	2 (10.0%)	3 (15.0%)	3 (12.0%)	3 (12.5%)
左心房直径 (cm)	3.9 ± 0.75	4.0 ± 0.58	4.5 ± 0.79	5.2 ± 0.53

1.4 成纤维细胞培养

无菌条件下开胸取出 SD 大鼠乳鼠(1~3 天)心脏,立即置入预冷的 PBS 中,洗净残血,剪成约 1 mm³ 碎片,弃去 PBS,加入 0.1% 胶原酶 B、0.25 胰酶及 PBS 混合液,于 37℃ 水浴中分次震荡消化,第一次消化 10 min,弃上清,以后每次 5 min,收集上清用等体积 20% 新生牛血清的培养基终止消化,离心(1000 r/min, 10 min)后所得的细胞用 20% 新生牛血清的培养基制成细胞悬液,种于 50 mL 培养瓶中,37℃、5% CO₂ 培养箱中差速 75 min 后,弃去上清获得成纤维细胞。取 3~4 代用于实验。

1.5 TNF- α 、TGF- β 测定

采用 ELISA 法,在本院检验科严格按照说明书由专人操作,建立标准曲线,设立空白对照、阴性对照。控制板内差异 < 10%, 板间差异 < 10%。

1.6 细胞趋化实验

采用 Transwell 法测定。Transwell 小室滤膜为孔径 8 μ m 的聚碳酸酯微孔滤膜。取第 3 或 4 代心肌成纤维细胞,0.1% BSA 饥饿过夜,消化重悬调整细胞密度为 2 \times 10⁸/L,取 0.1 mL 加入上室;下室中分别加入 0.6 mL 浓度为 1 μ g/L、10 μ g/L、50 μ g/L 的重组人 TNF- α 、TGF- β 作为化学趋化物,置于

表 2. 各组血清 TGF- β 、TNF- α 含量(μ g/L)

Table 2. The concentration of TGF- β , TNF- α in each group(μ g/L)

指 标	对照组($n=20$)	AA 组($n=20$)	Paro-Af 组($n=25$)	Per-Af 组($n=24$)
TGF- β	21.85 \pm 2.07	44.53 \pm 2.05 ^a	37.57 \pm 3.04 ^{ab}	52.05 \pm 1.26 ^{abc}
TNF- α	16.53 \pm 2.05	30.27 \pm 2.57 ^a	23.25 \pm 1.56 ^{ab}	35.47 \pm 3.28 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 AA 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 Paro-Af 组比较。

2.2 不同浓度 TGF- β 的趋化作用

1 μ g/L、10 μ g/L、50 μ g/L 的 TGF- β 使迁移至下室的细胞数分别为 50.00 \pm 10.87、65.00 \pm 10.82、95.00 \pm 8.09, 三组细胞数差异均有统计学意义($F = 68.52, P < 0.001$)。其中 50 μ g/L 的 TGF- β

37℃、5% CO₂ 培养箱中,18 h 后取出滤膜,4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 冲洗,棉签拭去上室表面内残存细胞, Gimsa 染色。显微镜下随机取 5 个视野($\times 200$)细胞数取平均值(个/HP), 各组实验均重复 3 次。

1.7 统计学处理

数据采用 SPSS13.0 进行统计学处理,分类变量用百分比表示,连续型变量用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各指标符合正态分布其组间比较采用方差分析、两两比较用 q 检验,分类变量间做 χ^2 检验,将分类变量、连续变量纳入 Logistic 回归进行多因素分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 TGF- β 和 TNF- α ELISA 检测结果

各组患者外周血清 TGF- β 、TNF- α 含量差异均有统计学意义($F = 21.05, P < 0.001$)。血清 TGF- β 、TNF- α 含量在持续性心房颤动组最高,非心房颤动房性心律失常组次之,阵发性心房颤动组高于对照组,各组比较差异有统计学意义($P < 0.05$; 表 2)。

对成纤维细胞的趋化作用最明显,随着浓度下降,迁移至下室的细胞数逐渐减少,1 μ g/L 的 TGF- β 对成纤维细胞的趋化作用最弱,各组相比差异均有显著性($P < 0.05$; 图 1)。

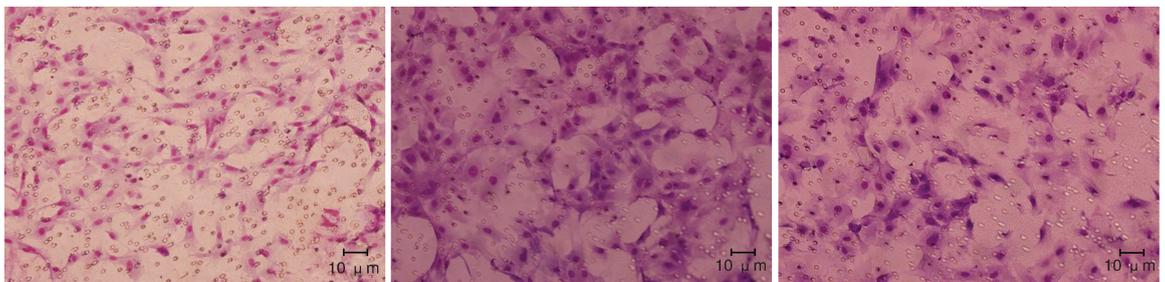


图 1. 不同浓度的 TGF- β 对心肌成纤维细胞趋化运动的影响

从左到右依次为 50 μ g/L、10 μ g/L 和 1 μ g/L 的 TGF- β 。

Figure 1. The effect of different concentration of TGF- β on myocardial fibroblasts chemotactic movement

2.3 不同浓度 TNF- α 的趋化作用

1 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 的 TNF- α 使迁移至下室的细胞数分别为 40.00 ± 9.85 、 52.00 ± 9.02 和

75.00 ± 9.22 , 三组细胞数差异均有统计学意义 ($F = 10.31, P < 0.001$), 随着 TNF- α 浓度增加, 对成纤维细胞的趋化作用逐渐增加(图 2)。

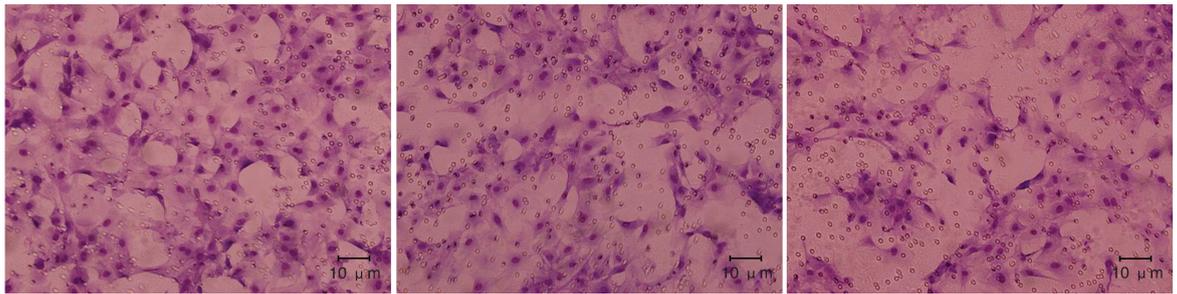


图 2. 不同浓度 TNF- α 对心肌成纤维细胞趋化运动的影响 从左到右依次为 50 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 1 $\mu\text{g/L}$ 的 TNF- α 。

Figure 2. The effect of different concentration of TNF- α on myocardial fibroblasts chemotactic movement

2.4 多元 Logistic 回归分析

用多元 Logistic 回归分析, 将分类变量(性别、高血压、心衰、瓣膜病、冠心病、糖尿病、心房颤动)和连续型变量(年龄、左心房直径、细胞数、TGF- β 、TNF- α)等级化后纳入 Logistic 模型, 迁移至下室的细胞数与 TGF- β (OR = 0.58, 95% CI: 0.256 ~ 0.126, $P < 0.05$)、TNF- α (OR = 0.280, 95% CI: 0.126 ~ 0.827, $P < 0.05$) 的含量、左心房直径 (OR = 0.585, 95% CI: 0.456 ~ 0.985, $P < 0.05$) 有相关性。

个重要指标, 随着 TNF- α 、TGF- β 的浓度不同而改变, 并与浓度呈正相关, 证实了 TNF- α 、TGF- β 能反应炎症过程中心肌损伤修复的范围和程度。因此通过监测心房颤动患者血清 TGF- β 和 TNF- α 含量有可能预测心房颤动的进展。

本研究中各组血清 TNF- α 、TGF- β 含量的不同, 说明心房颤动的发生是一个慢性、隐匿、迁延的过程, 与潜在的炎症状态有关; 各组血清中 TNF- α 、TGF- β 水平的不同间接反应心肌损伤修复的病理过程, 并与损伤修复的程度和范围密切相关。其中非心房颤动房性心律失常组 TNF- α 、TGF- β 均高于对照组, 各组比较均具有统计学意义, 提示在非心房颤动房性心律失常发生时炎症过程已经参与, 且心肌损伤修复已经存在; 阵发性心房颤动组 TNF- α 、TGF- β 含量介于非心房颤动房性心律失常组和持续性心房颤动组, 说明此阶段存在损伤修复, 但处于损伤的相对静息状态, 心肌损伤修复在一个相对稳定的水平进行, 大部分区域未达到严重纤维化的程度, 此阶段若得到积极恰当的干预, 可能会逆转或终止纤维化进程, 该实验结果与我们前期的实验结论一致, 进一步从实验层面证实了阵发性心房颤动需及时药物干预或射频消融治疗。持续性心房颤动组 TNF- α 、TGF- β 含量最高, 与其他各组相比均具有统计学意义, 预示着该阶段的心肌损伤修复处于较高水平, 纤维化程度逐渐加重, 损伤修复的空间越来越小, 心肌纤维化过程不可逆转, 此阶段转复窦性的可能性较小。

3 讨论

TGF- β 是胶原蛋白和其它细胞外基质合成和沉积的重要始动因子, 在病理或生理性过度修复过程中导致过量的细胞外基质产生而导致纤维化; TNF- α 能刺激成纤维细胞的增殖, 诱导生长因子的表达, 它们作为多效生物活性的炎性细胞因子, 参与调节细胞的增殖、黏附、迁移等过程。我们前期的实验已经证实了心房颤动患者血清对心肌成纤维细胞具有增殖和迁移作用, 但血清中何种物质导致了该现象的发生尚不清楚, TNF- α 、TGF- β 作为重要的炎性细胞因子, 国内有报道它们可诱导肝、肺成纤维细胞的迁移作用, 对心肌成纤维细胞是否能具有趋化作用尚无报道, 该课题从实验层面证实了 TNF- α 、TGF- β 对心肌成纤维细胞有趋化作用, 并且随着 TNF- α 、TGF- β 浓度的增加迁移至下室的细胞数逐渐增加, 由此推断心房颤动患者血清对心肌成纤维细胞的趋化作用部分是由 TNF- α 、TGF- β 介导产生的。迁移至下室的细胞数作为反应心肌损伤的一

自然发生的阵发性心房颤动常常进展为持续性心房颤动, 心房颤动持续的时间越长治疗越困难, 这种现象被定义为“心房颤动导致心房颤

动”^[8]。显然,及早发现那些可能进展为持续性心房颤动的高危患者并对其进行有针对性的干预尤为重要。因此本研究中纳入的房性心律失常包括房性早搏、房速、房扑等一些容易被忽视但值得关注的群体,结果同样显示该类患者已存在心肌的损伤和修复,再次提示了自然发生的非心房颤动房性心律失常可以向阵发性心房颤动发展并最终演变为持续性心房颤动的缓慢过程。

本研究提示 TNF- α 、TGF- β 参与诱导成纤维细胞的迁移,但其具体信号转导途径仍不明确。进一步阐明这些诱导因素与成纤维细胞运动和分泌功能的直接因果关系,有助于全面了解心肌纤维化的细胞和分子机制,为心房颤动心房纤维化的治疗提供新的途径。

[参考文献]

- [1] Corradi D, Callegari S, Benussi S, et al. Myocyte changes and their left atrial distribution in patients with chronic atrial fibrillation related to mitral valve disease [J]. *Human Pathol*, 2005, 36(10): 1 080-089.
- [2] Aldhoon B, Melenovský V, Peichl P, et al. New insights

into mechanisms of atrial fibrillation [J]. *Physiol Res*, 2010, 59(1): 1-12.

- [3] 肖扬,李裕舒,周飞,等. 房颤患者血清对成纤维细胞生长的诱导作用[J]. *心脏杂志*, 2010, (6): 950.
 - [4] 段卡丹,李裕舒,史晓婧. 房颤患者血清对心肌成纤维细胞趋化运动的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(4): 662-665.
 - [5] Li Y, Jian Z, Yang Z Y, et al. Increased expression of connective tissue growth factor and transforming growth factor-Beta-1 in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation [J]. *Cardiology*, 2013, 124(4): 233-240.
 - [6] Yong Li, Zhao Jian, Zong Ying Yang, et al. Increased expression of connective tissue growth factor and transforming growth factor-beta-1 in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation [J]. *Cardiology*, 2013, 124(4): 233-240.
 - [7] Deng H, Xue Y, Zhan X, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of atrial fibrillation [J]. *Chin Med J Beijing*, 2011, 124(13): 1 976.
 - [8] Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, et al. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats [J]. *Circulation*, 1995, 92: 1 954-968.
- (此文编辑 许雪梅)