

瓣膜性房颤患者心房纤维化及过氧化物酶体增殖物
激活受体 mRNA 表达 *

张军波¹, 吕颖², 刘仲伟², 潘军强², 殷艳蓉^{3**}

(1. 西安交通大学第一附属医院 周围血管科, 陕西 西安 710061; 2. 西安交通大学第三附属医院 & 陕西省人民医院 心内科, 陕西 西安 710068; 3. 西安交通大学第一附属医院 心血管内科, 陕西 西安 710061)

[摘 要] 目的: 探讨瓣膜性房颤(AF)患者心房纤维化及心房组织局部过氧化物酶体增殖物激活受体 α ($PPAR\alpha$) mRNA 表达。方法: 选取 81 例接受人工心脏瓣膜置换术的风湿性心脏瓣膜病患者术中废弃的右心房右心耳组织分为 AF 组($n=38$)和窦性心律组($n=41$), 分别采用 HE 染色及 Masson 染色观察 2 组患者心房组织纤维化情况, 采用 Realtime-PCR 测定心房组织中 $PPAR\alpha$ mRNA 表达。结果: 染色结果显示, AF 组患者心房组织纤维化较窦性心律组加重, HE 染色可见 AF 组患者右心房组织结构明显紊乱、心肌细胞肥大、排列不匀、组织间空隙较多、细胞核浓染、大小不一、细胞间隙可见明显纤维组织增生, Masson 染色可见 AF 组心房肌细胞肥大、排列较稀疏、可见蓝色胶原纤维组织分割包绕褐色的心房肌细胞, 细胞间间隙增大, 其中蓝色胶原纤维组织较窦性心律的患者明显增多; Realtime-PCR 结果显示, AF 组患者右心房组织 $PPAR\alpha$ mRNA 表达水平较窦性心律组明显下降, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论: 瓣膜性 AF 患者的心房组织纤维化明显加重, 可能与心房组织的 $PPAR\alpha$ 表达下降有关。

[关键词] 心房颤动; 风湿性心脏病; 右心房; 心肌纤维化; 过氧化物酶体增殖物激活受体

[中图分类号] R541.2 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2019)11-1278-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.11.007

Atrial Fibrosis in Patients with Valvular Atrial Fibrillation
and Expression of Local $PPAR\alpha$ mRNA

ZHANG Junbo¹, LV Ying², LIU Zhongwei², PAN Junqiang², YIN Yanrong³

(1. Department of Peripheral Vascular Medicine, the First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China; 2. Department of Cardiovascular Medicine, the Third Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University/Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi, China; 3. Department of Cardiovascular Disease, the First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China)

[Abstract] Objective: To investigate atrial fibrosis (AF) in patients with valvular atrial fibrillation and expression of local $PPAR\alpha$ mRNA. Methods: 81 patients with rheumatic heart valve replacement were chosen, and they were divided into the discarded right atrial and right auricle tissues atrial fibrillation group (AF group, $n=38$) and sinus rhythm group ($n=41$). The atrial fibrosis of both groups was observed by HE staining and Mason staining, and the expression of $PPAR\alpha$ in the atrial tissues were measured by Real time-PCR. Results: Staining results showed that the atrial fibrosis in patients with valvular atrial fibrillation was more serious than that in patients with sinus rhythm. Meanwhile, HE staining indicated that structure of right atrial tissue of AF group with following

*[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81600646)

** 通信作者 E-mail: yronger@163.com

网络出版时间: 2019-11-21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20191120.2125.007.html>

features: disordered, poorly arranged with multiple gaps among the tissues, nucleus hyperchromia, anisocytosis, cardiomyocyte hypertrophy, intercellular space with obvious proliferation of fibrous tissue; Masson staining indicated that AF group with following features: cardiomyocyte hypertrophy, sparse arrangement, blue fibrous collagen divide and wrap the atrial myocyte, intercellular space was enlarged; of which blue fibrous collagen was significantly increased than sinus rhythm group patients; Real time-PCR showed that the expression of *PPAR α* mRNA was significantly lowered in patients with valvular atrial fibrillation than that in patients with sinus rhythm, differences was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The atrial fibrosis in patients with valvular atrial fibrillation was significantly aggravated. It is suggested that the decrease of *PPAR α* may be related to it.

[**Key words**] atrial fibrillation; rheumatic heart disease; right atrium; myocardial fibrosis; peroxisome proliferators-activated receptor

心房颤动 (atrial fibrillation, AF) 是临床最常见的心律失常之一, 约 20% 的中国成年人罹患 AF, 并随年龄增长而增加^[1]。血栓栓塞是 AF 患者最常见的并发症, 也是 AF 患者致死、致残的重要原因^[2]。心脏纤维化是 AF 最重要也最显著的病理改变, 主要表现为心脏胶原蛋白沉积、心肌排列紊乱及心脏胶原比例的改变^[3]。纤维化能破坏细胞间缝隙连接, 心房肌被分割包绕, 使得生理电信号不能顺利传导, 形成多个折返环路, 从而引发和维持 AF^[3]。有研究发现, 干预纤维化可有助于预防 AF 的复发^[4]。过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferators-activated receptors, *PPAR α*) 是核受体超家族的成员, 是脂肪酸平衡的主要调节因子, 主要在肝脏、肾脏及心脏等高代谢器官中表达^[5], 具有保护心脏的作用^[6], 参与了心脏纤维化过程^[7]。既往的研究多基于动物心脏标本, 对人群的研究较少, 本文采用 HE 及 Masson 染色观察 AF 患者心房组织纤维化情况, 采用实时荧光定量 PCR (Realtime-PCR) 法测定心房组织中 *PPAR α* mRNA 表达, 分析 AF 患者心肌中 *PPAR α* 的表达与心肌纤维化的关系, 报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料及试剂

1.1.1 一般资料 选取 2012 年 5 - 8 月在心脏外科行人工心脏瓣膜置换术的风湿性心脏瓣膜病患者 81 例, 排除合并肝功能衰竭、肾功能衰竭、甲状腺功能亢进症、高血压及各种类型的心肌病患者, 排除合并结缔组织病、风湿热活动期及肿瘤患者。81 例患者按心电图表现分为 AF 组 ($n = 38$) 及窦

性心律组 ($n = 43$, 持续窦性心律无 AF 病史患者)。

1.1.2 主要试剂 正反向引物及测序引物由上海尼桑生物公司合成, 反转录试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 Takara 公司, 其余均为国产分析纯。PTC-200DNA 扩增仪为美国 MJ 公司产品, XSP-2CA 生物显微镜和 IMP-2 型倒置相差生物显微镜均来自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 右心房组织学观察 采用 HE 及 Masson 染色法, 选取手术中废弃的右心房右心耳组织, 清洗后液氮保存; 分为 3 份, 一份用于检测 *PPAR α* mRNA 表达, 2 份用于组织学观察。(1) HE 染色, 取右心耳组织, 经固定、脱水、OCT 包埋速冻后进行冰冻切片及 HE 染色封片, 镜下观察染色情况; (2) Masson 染色, 取右心耳组织, 切片晾置甲醇固定后, 分别经苏木素染色、盐酸酒精分化、品红复染、冲洗后苯胺蓝复染、冰醋酸固定、酒精脱水、二甲苯透明后封片, 镜下观察染色情况。

1.2.2 *PPAR α* mRNA 表达 采用 Realtime-PCR, 所有用品经预防 RNA 酶污染处理后, 取右心耳组织提取总 RNA, 逆转录为 cDNA。应用 Primer premier 5.0 软件, 设计引物序列, 内参 *hGAPDH* 上游引物序列为 5'-TCATGGGTGTGA ACCATG AGA A-3'、下游引物序列为 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG T-3', *PPAR α* 上游引物序列为 5'-CGAATGTAGAATCTGCGGGG-3'、下游引物序列为 5'-CATCCCGACAGAAAGGCACT-3'。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 10 s, 56 °C 延伸 30 s, 扩增 40 个循环后收集数据, 绘制动力学曲线读取 Ct 值。将各组目的基因的 Ct 值与管家基因 *hGAPDH* 的 Ct 值相减得 ΔCt , 扩增重复 3 次, 计算

出各组 *PPARα* mRNA 的表达,进行数据分析。

1.3 统计学方法

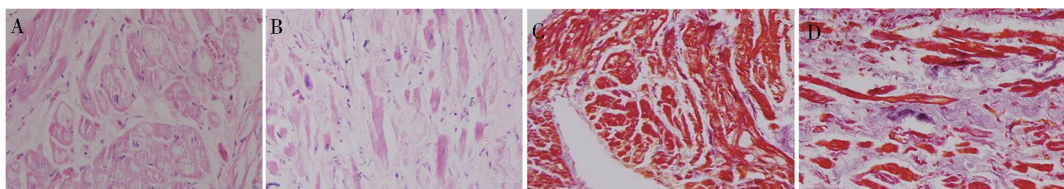
所有数据用 SPSS 13.0 统计软件分析处理,定量资料的描述采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 右心房组织学观察

染色结果显示,AF 组患者心房组织纤维化较窦性心律组加重,HE 染色可见(图 1A - B),窦性

心律组心房组织排列有序,心肌细胞间有少量纤维组织,而 AF 组的心房组织结构明显紊乱,心肌细胞肥大,排列不匀,可见组织间空隙较多,细胞核浓染,大小不一,细胞间隙可见明显纤维组织增生。Masson 染色可见(图 1C - D)胶原纤维呈蓝色,心肌细胞胞质、肌纤维和红细胞呈红色,而心肌细胞核呈蓝褐色;窦性心律组患者心房肌细胞排列均匀,肌细胞间隙可见少量蓝色胶原纤维组织,而 AF 组患者心房肌细胞肥大,排列较稀疏,可见蓝色胶原纤维组织分割包绕褐色的心房肌细胞,细胞间间隙增大,其中蓝色胶原纤维组织较窦性心律患者明显增多。



注:A、B 为 HE 染色,C、D 为 Masson 染色;A、C 为窦性心律组,B、D 为 AF 组。

图 1 两组患者右心房组织(HE、Masson 染色, ×200)

Fig. 1 Right atrial tissue of both group patients

2.2 *PPARα* mRNA 相对表达水平

2.2.1 扩增曲线和溶解曲线 *PPARα* mRNA 扩增曲线拐点明确,整体扩增曲线平行性较好,基线

较水平,无明显上扬,各管的扩增曲线平行性好,表明各反应管的扩增效率相近;溶解曲线仅出现一个有效峰值,提示产物特异性良好。见图 2。

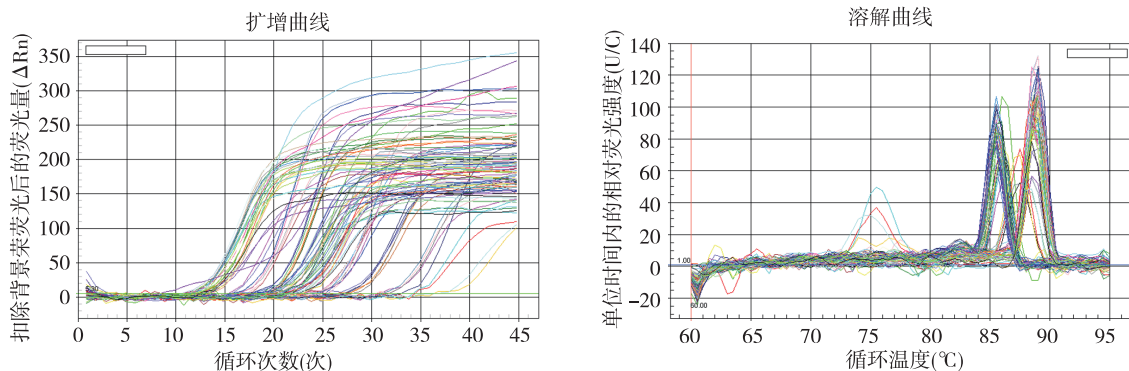


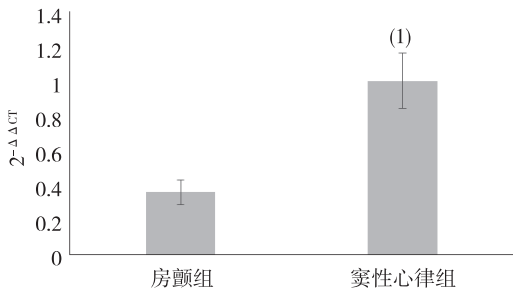
图 2 *PPARα* mRNA 扩增曲线及溶解曲线

Fig. 2 *PPARα* mRNA amplification curve and melt curve

2.2.2 *PPARα* mRNA 相对表达水平 如图 3 所示,AF 组 $2^{-\Delta\Delta CT} = 0.36 \pm 0.07$,窦性心律组 $2^{-\Delta\Delta CT} = 1.00 \pm 0.16$,AF 组 *PPARα* mRNA 相对表达水平明显低于窦性心律组,差别具有统计学意义($t = -3.61, P = 0.003$)。提示 AF 患者右心房组织 *PPARα* mRNA 的相对表达水平较窦性心律患者低。

3 讨论

引起 AF 的原因众多,老年退行性改变、长期高血压、甲状腺功能亢进等都可以引起 AF^[8]。目前将外科换瓣术后或风湿性心脏瓣膜病,尤其是二尖瓣狭窄相关的 AF 称作瓣膜性 AF^[9]。AF 患者



注：⁽¹⁾ 与 AF 组比较, $P < 0.01$ 。

图 3 两组患者 PPARα mRNA 相对表达水平

Fig. 3 Relative expression level of PPARα mRNA of both groups

的卒中的风险是无 AF 患者的 6 倍, 当二尖瓣狭窄合并 AF 时, 这个风险增加到 15 倍^[10]。

本研究结果证实瓣膜性 AF 患者右心房纤维化程度较正常对照组明显加重, 无论 HE 染色还是针对纤维组织的 Masson 染色均发现, 窦性心律组患者的右心房组织内心房肌细胞排列均匀, 细胞间隙少量蓝色胶原纤维组织, 而瓣膜性 AF 患者心房肌细胞肥大, 排列紊乱, 被大量胶原纤维组织分割包裹。已有研究证实, AF 与心肌纤维化常常伴随发生, 在孤立性 AF 患者心房活检标本中也证实, 75% 的患者存在明显的心肌纤维化^[11]。另一项长期快速起搏导致 AF 的模型研究证实, 心肌纤维化程度和 AF 密切相关^[12]。对于人群孤立性 AF 的研究, 也证实初始心房正常大小的患者在随访 20 个月里心房发生了明显的扩大^[13]。在犬 AF 模型的研究发现 AF 可以诱发并促进心房扩大进程, 同时导致心肌纤维化进行性加重^[14]。以上研究结果提示, 心肌纤维化的病理过程启动后, 随着纤维化的加重, 可以继续促进 AF, 这形成了一个恶性循环^[15]。

PPARα 能改善血脂对心肌的作用, 主要机制为 PPARα 刺激脂蛋白脂酶表达, 促进脂蛋白释放脂肪酸颗粒和随后的吸收^[16]。氧化应激诱导一些促炎性细胞因子的产生, 这可能促进与许多疾病状态相关的病理老化, 给老年小鼠服用能够激活 PPARα 的药物后, 可以恢复细胞的氧化还原平衡, 降低组织脂质过氧化作用, 持续消除激活的核转录因子 kappa B (nuclear transcription factor kappa B, NF-κB) 并抑制炎症因子如血管内皮细胞黏附分子-1、血小板内皮细胞黏附分子和细胞间黏附分子-1 的产生^[17]。研究发现, 棕榈酸甲酯可以激活小鼠 PPARα 的表达, 促进 β-氧化蛋白和基因表

达, 进而改善非酒精性脂肪肝^[18]。对大鼠肝纤维化的研究发现, PPARα 和 PPARγ 双激动剂可以通过抑制瘦素、转化生长因子 β1 和血小板衍生生长因子 BB, 从而降低金属蛋白酶组织抑制剂-1 的表达, 从而发挥抗纤维化的作用^[19]。对心脏研究发现, PPARα 激动剂非诺贝特可以预防血管紧张素灌流大鼠的心肌炎症, 在减少炎症因子的表达同时, 可以减少转化生长因子-β1 的表达、减少胶原沉积并改善纤维化^[20]; 还可以抑制腹主动脉结扎导致压力超负荷大鼠心肌胶原和内皮素-1 的表达, 改善心肌纤维化^[21]。PPARα 激活后可以通过抑制内皮素-1 改善单肾切除高血压大鼠左室的心肌纤维化, 但对于左室心肌肥厚作用不大^[22]。对于缺血性心脏病导致的心力衰竭患者行心脏移植术中取得的人体标本研究发现, 心衰的心室中纤维化加重, 而相对与正常的心脏, 衰竭心脏的 PPARα 和 PPARγ 选择性的激活, 在维持心房形态方面起了重要的作用^[23]。

综上所述, 在瓣膜性 AF 患者的心房组织中, 纤维化明显加重, 而 PPARα 的表达较窦性心律人群下降, 提示瓣膜性 AF 患者的心房组织纤维化明显加重, 可能与心房组织的 PPARα 下降有关。但还需要进一步的研究证实。

4 参考文献

- [1] GUO Y, TIAN Y, WANG H, et al. Prevalence, incidence, and lifetime risk of atrial fibrillation in China: new insights into the global burden of atrial fibrillation [J]. Chest, 2015, 147(1): 109 – 119.
- [2] AHMAD S, WILT H. Stroke prevention in atrial fibrillation and valvular heart disease [J]. Open Cardiovasc Med J, 2016, 10: 110 – 116.
- [3] MIRAGOLI M, GLUKHOV A V. Atrial fibrillation and fibrosis: beyond the cardiomyocyte centric view [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 1 – 16.
- [4] BURSTEIN B, NATTEL S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation [J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51(8): 802 – 809.
- [5] KAR D, BANDYOPADHYAY A. Targeting peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR alpha) for the prevention of mitochondrial impairment and hypertrophy in cardiomyocytes [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(1): 245 – 259.
- [6] ISMAEL S, PURUSHOTHAMAN S, HARIKRISHNAN V S, et al. Ligand specific variation in cardiac response to

- stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α in spontaneously hypertensive rat[J]. *J Molecular Cellular Biochemistry*, 2015, 406(1-2): 173-182.
- [7] DROSATOS K, POLLAK N M, POL C J, et al. Cardiac myocyte KLF5 regulates Ppara expression and cardiac function[J]. *Circ Res*, 2016, 118(2): 241-253.
- [8] KIRCHHOF P, BENUSSI S, KOTCHA D, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS[J]. *Europace*, 2016, 18(11): 1609-1678.
- [9] CALDEIRA D, DAVID C, COSTA J, et al. Non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation and valvular heart disease: systematic review and meta-analysis[J]. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, 2018, 4(2): 111-118.
- [10] LAUPACIS A, ALBERS G, DALEN J, et al. Antithrombotic therapy in atrial fibrillation[J]. *Chest*, 1995, 108(4 Suppl): 352S-359S.
- [11] OHTANI K, YUTANI C, NAGATA S, et al. High prevalence of atrial fibrosis in patients with dilated cardiomyopathy[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1995, 25(5): 1162-1169.
- [12] EVERETT T H T, WILSON E E, VERHEULE S, et al. Structural atrial remodeling alters the substrate and spatiotemporal organization of atrial fibrillation: a comparison in canine models of structural and electrical atrial remodeling[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(6): H2911-H2923.
- [13] SINNO H, DERA KHCHAN K, LIBERSAN D, et al. Atrial ischemia promotes atrial fibrillation in dogs[J]. *Circulation*, 2003, 107(14): 1930-1936.
- [14] SANDHU R K, CONEN D, TEDROW U B, et al. Pre-disposing factors associated with development of persistent compared with paroxysmal atrial fibrillation[J]. *J Am Heart Assoc*, 2014, 3(3): e000916.
- [15] SCHOTTEN U, DOBREV D, PLATONOV P G, et al. Current controversies in determining the main mechanisms of atrial fibrillation[J]. *J Intern Med*, 2016, 279(5): 428-438.
- [16] SCHOONJANS K, STAELS B, AUWERX J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression[J]. *J Lipid Res*, 1996, 37(5): 907-925.
- [17] BOUGARNE N, WEYERS B, DESMET S J, et al. Molecular actions of PPAR α in lipid metabolism and inflammation[J]. *J Endocrine Reviews*, 2018, 39(5): 760-802.
- [18] ZHANG L, LI H X, PAN W S, et al. Administration of methyl palmitate prevents non-alcoholic steatohepatitis (NASH) by induction of PPAR- α [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 99-108.
- [19] MAKLED M N, SHARAWY M H, EL-AWADY M S. The dual PPAR- α /gamma agonist saroglitazar ameliorates thioacetamide-induced liver fibrosis in rats through regulating leptin[J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2019, 392(12): 1569-1576.
- [20] YUAN J, WANG C M, ZHONG X Y, et al. Effects of PPAR α and fenofibrate on acute myocardial damage induced by isoproterenol in rats[J]. *J Chinese Journal of Pathophysiology*, 2007, 23(3): 525-528.
- [21] OGATA T, MIYAUCHI T, SAKAI S, et al. Stimulation of peroxisome-proliferator-activated receptor α (PPAR α) attenuates cardiac fibrosis and endothelin-1 production in pressure-overloaded rat hearts[J]. *J Clinical Science*, 2002, 103(s2002): 284-288.
- [22] IGLARZ M, TOUYZ R M, VIEL E C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α and receptor-gamma activators prevent cardiac fibrosis in mineralocorticoid-dependent hypertension[J]. *Hypertension*, 2003, 42(4): 737-743.
- [23] GOMEZ-GARRE D, HERRAIZ M, GONZALEZ-RUBIO M L, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α and -gamma in auricular tissue from heart failure patients[J]. *Eur J Heart Fail*, 2006, 8(2): 154-161.

(2019-09-03 收稿, 2019-10-12 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵毅