

三尖瓣关闭不全患者右心房心肌 AT-1、AT-2 及基质金属蛋白酶的表达[△]

武长礼^{1,2}, 黄焕雷¹, 吴岳恒¹, 陆平兰¹, 肖学钧^{1,2}

(1.广东省心血管病研究所心外科 广东省人民医院 广东省医学科学院, 广州 510080; 2.汕头大学医学院, 广东汕头 515041)

摘要: **目的** 检测慢性三尖瓣关闭不全 (tricuspid incompetence, TR) 患者右心房心肌组织中血管紧张素受体 (angiotensin receptor, AT)-1、AT-2 及基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)1、MMP2、MMP9 的表达, 探讨 TR 患者右心房重构的分子生物学特征。**方法** 选择左心瓣膜病变合并 TR 患者 60 例, 术前按照心脏超声心动图显示 TR 面积的大小将患者分为 3 组: A 组为轻至中度 TR 组 ($1\text{ cm}^2 < \text{TR} \leq 10\text{ cm}^2$); B 组为重度 TR 组 ($\text{TR} > 10\text{ cm}^2$); C 组为对照组 ($\text{TR} \leq 1\text{ cm}^2$)。取患者右心房心肌组织标本, 置于液氮中保存, western-blot 检测 AT-1、AT-2 和 MMP1 表达, 酶谱法检测 MMP2、MMP9 活性。**结果** 随着 TR 面积增加, 肺动脉高压、三尖瓣瓣环收缩期内径及舒张期内径显著增大, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 C 组相比, A、B 两组 AT-1 及 MMP1 表达明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 随着 TR 程度增加, AT-1、MMP1 的表达发生了改变, 提示其参与了 TR 患者右心房重构。

关键词: 三尖瓣关闭不全; 右心房重构; 基质金属蛋白酶; 蛋白免疫印迹; 凝胶酶谱法

中图分类号: R542.5*3 文献标志码: A 文章编号: 1007-9688(2013)01-0040-05

Expression of angiotensin receptor 1,2 and matrix metalloproteinases in right atrial tissue of patients with tricuspid regurgitation

WU Chang-li^{1,2}, HUANG Huan-lei¹, WU Yue-heng¹, LU Ping-lan¹, XIAO Xue-jun^{1,2}

(1.Department of Cardiovascular Surgery, Guangdong Cardiovascular Institute, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2.Medical College of Shantou University, Shantou, Guangdong 515041, China)

Abstract: Objectives To examine the expressions of angiotensin receptor(AT) 1,2 and matrix metalloproteinase (MMP) 1,2,9 in right atrial tissue of patients with chronic tricuspid regurgitation (TR), and explore the molecular characterization of right atrial remodeling in patients with chronic TR. **Methods** Right atrial tissue were obtained from 60 patients with left heart valve disease associated TR in open heart surgery. The patients were divided into three groups according to TR area measured in preoperative echocardiography: group A was mild-to-moderate TR group ($1\text{ cm}^2 < \text{TR area} \leq 10\text{ cm}^2$); group B was severe TR group ($\text{TR area} > 10\text{ cm}^2$) and group C was control group ($\text{TR area} \leq 1\text{ cm}^2$). For each sample, AT-1, AT-2 and MMP1 protein levels were measured by western blot, and MMP2, MMP9 protein were displayed by zymography techniques. **Results** With TR area increasing, pulmonary hypertension and tricuspid ring diameter in both systolic and diastolic phases significantly increased ($P < 0.05$). Compared with group C, expressions of AT-1 and MMP1 in group A and group B were significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusions** With TR area growing, expressions of AT-1, MMP1 change, which indicates that they are involved in atrium structure remodeling of patients with TR.

Key words: tricuspid regurgitation; right atrium remodeling; matrix metalloproteinases; western-blot; zymography

[△]基金项目: 广东省自然科学基金(项目编号: S2011010005493)。

作者简介: 武长礼(1986-), 男, 汕头大学医学院在读硕士研究生, 研究方向为心血管外科临床与基础研究。

通信作者: 肖学钧, E-mail: xiaoxuejun@tom.com

三尖瓣关闭不全(tricuspid regurgitation, TR)是风湿性左心瓣膜病变的一种常见合并性病变,大多数为功能性,少数为器质性。TR 引起右心房及右心室扩大,导致右心房结构重构。心房结构重构包括心房扩大和心肌间质纤维化(心肌细胞肥大、凋亡、细胞变性、心肌纤维化、肌溶解等)^[1]。目前 TR 引起右心房重构的分子生物学特征尚不清楚,国内对右心房重构研究的报道也较少。有研究表明,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)参与心房颤动(房颤)患者左心室重构^[2,3]。本研究通过检测 TR 患者右心房心肌组织中肾素血管紧张素受体(angiotensin receptor, AT)-1、AT-2 和 MMP1、MMP2、MMP9 表达的变化,探讨 TR 患者右心房结构重构的分子生物学特征,为临床上 TR 患者的治疗提供参考依据。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取 2011 年 6 月到 2012 年 5 月在广东省人民医院进行左心瓣膜置换或整形术合并 TR 的患者 53 例(合并或未合并房颤)作为实验组。术前所有的患者均签署有关该试验的知情同意书,并获得伦理委员会的许可。实验组患者按照术前超声心动图估测 TR 面积进行分组:A 组 29 例为轻至中度 TR($1\text{ cm}^2 < \text{TR} \leq 10\text{ cm}^2$),男 12 例,女 17 例,年龄(49.93 ± 9.97)岁;B 组 24 例为重度 TR($\text{TR} > 10\text{ cm}^2$),男 11 例,女 13 例,年龄(50.21 ± 9.70)岁。另外,选取同期行心内直视手术的无或极微量 TR($\text{TR} \leq 1\text{ cm}^2$)的患者 7 例为对照组(C 组),男 5 例,女 2 例,年龄(36.00 ± 14.43)岁。A、B 两组性别、年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);但 C 组男性比例高于 A、B 组,年龄小于 A、B 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。按照患者术前是否有房颤,将患者分为房颤组和窦性组:房颤组 28 例,男 9 例,女 19 例,年龄(50.61 ± 10.67)岁;窦性组 32 例,男 19 例,女 13 例,年龄(46.50 ± 11.49)岁。房颤组和窦性组性别、年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 一般资料采集 采集研究对象的一般资料,包括性别、年龄、身高、体质量、心功能状态(NYNA 分级)以及是否合并房颤、糖尿病。患者术前行心脏超声心动图检查,获取相应的右心指标,

包括右心房内径、右心室射血分数等。患者建立体外循环,灌注心肌停搏液,心脏停搏后,沿右心房纵切口留取右心房心肌标本约 150 mg,立即置 -70°C 的液氮中保存备用。

1.2.2 AT-1、AT-2 和 MMP1 蛋白免疫印迹检测方法 (1)收集蛋白样品:取右心房组织约 100 mg 置于匀浆器中部球形部位,加 500 μL RIPA 裂解液(含 PMSF 和 Cocktail)于匀浆器中,进行匀浆(此过程一直在冰上操作)。用移液器将裂解液移至 1.5 mL 离心管中,冰上裂解 30 min,然后在 4°C 下 14 000 r/min 离心 10 min,取上清分装于 1.5 mL 离心管中并置于 -80°C 保存。取部分上清,加入上样缓冲液,煮沸 10 min。缓慢恢复至 $18^\circ\text{C} \sim 22^\circ\text{C}$ 后,稍离心,放于 -20°C 保存,用二喹啉甲酸(BCA)法测量蛋白浓度。(2)加样及电泳:经上述处理后,取相同体积的组织裂解液,加入已制备好的 4%~12% 2,2-双二羟甲基苯胺(Bis-Tris)凝胶中进行电泳(PowerPac Universal, USA)。(3)转膜:电泳结束后将凝胶中的蛋白质转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。(4)一抗孵育:加入一抗[AT-1(abcm, USA 1:600), AT-2(abcm, USA 1:800), MMP1(Calbiochem, San Diego, USA 1:1200)],孵育过夜。(5)二抗孵育:加入碱性磷酸酶标记的二抗。(6)定影、显影:用计算机图像软件,测定目的电泳条带吸光度值 X,用 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH)的吸光度值 A 作为内参照,计算各目的电泳条带相对表达含量 X/A 进行半定量分析。

1.2.3 MMP2、MMP9 的凝胶酶谱法检测方法

(1)取约 50 mg 右心房心肌组织加入适量的缓冲液中进行组织匀浆,组织离心(4°C , 1 200 r/min, 10 min)取上层清液。(2)取上述等体积的组织裂解液加入 10% 凝胶中进行电泳(PowerPac Universal, USA),电泳结束后取出凝胶洗涤,与含有 MMP 底物蛋白的缓冲液 37°C 孵育 12 h,然后用考马斯亮蓝染色,酒精固定,采用定量图像分析系统(Alpha Innotech, USA)根据透亮条带的大小、位置测定 MMP2、MMP9 的活性。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验;计数资料以率表示,采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A、B、C 组临床资料比较

A、B、C 组原发病类型、手术类型、心功能分级及合并疾病比较,详见表 1。3 组 TR 面积、收缩期三尖瓣环内径和舒张期三尖瓣内径、右心房内径、肺动脉收缩压、左心室射血分数、右心室射血分数比较,详见表 2。

2.2 房颤组与窦性组临床资料比较

房颤组左心房内径、右心房内径和 TR 面积较窦性组增大,差异有统计学意义($P<0.05$);两组身高、体质量、左心室收缩末内径、左心室舒张末内径以及左心室射血分数比较,差异无统计学意义($P>0.05$),详见表 3。两组合并高血压和糖尿病患者比例比较,差异无统计学意义[17.9%(5/28) vs. 31.2%(10/32), $P>0.05$; 28.6%(8/28) vs. 18.7%(6/32), $P>0.05$]。

2.3 3 组 AT-1 的 Western-blott 结果比较

B 组 AT-1 的表达比 A、C 组明显增加,A 组 AT-1 的表达比 C 组高,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

2.4 3 组右心房心肌中 AT-2 的 Western-blott 结果比较

AT-2 在 A、B、C 组右心房心肌的表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2。

2.5 3 组右心房心肌中 MMP1 的 Western-blott 结果比较

MMP1 在 A、B 组右心房心肌中的表达明显高于 C 组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 3。

2.6 3 组右心房心肌中 MMP2 和 MMP9 的凝胶酶谱测定结果比较

凝胶酶谱法显示溶解的 MMP-9 (92 kDa), MMP-2 (72 kDa)条带在 A、B、C3 组右心房心肌中

表 1 3 组原发病类型、手术类型、心功能分级及合并疾病比较 [n (%)]

项 目	A 组	B 组	C 组	P 值
n	29	24	7	
原发病类型				
二尖瓣病变	15(51.7)	10(41.5)	5	
主动脉瓣病变	1(3.4)	2(8.3)	1	
主动脉瓣+二尖瓣病变	14(48.3)	8(33.3)	1	
左心瓣膜术时重度 TR 行三尖瓣成形术/置换术	0	4(16.7)		
冠心病行冠状动脉旁路移植术	1(3.4)	2(8.3)		
心功能				
I 级	6(20.7)	0	5(71.4)	
II 级	10(34.5)	4(16.7)	1(14.3)	
III 级	7(24.1)	13(54.2)	1(14.3)	
IV 级	6(20.7)	7(29.2)	0	
合并疾病				
房颤	13(44.8)	13(54.2)	2(28.6)	0.540
原发性高血压	6(20.7)	7(29.2)	2(28.6)	0.899
糖尿病	5(17.2)	7(29.2)	2(28.6)	0.562

均有表达,见图 4。

2.7 房颤组与窦性组 AT-1、AT-2、MMP1 表达结果比较

房颤组心肌中 AT-1、MMP1 的表达比窦性组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),但两组心肌中 AT-2 的表达比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),见图 5。

3 讨论

血管紧张素 II (angiotonin II, Ang II)受体有 AT-1、AT-2、AT-3、AT-4 四个亚型,其中 Ang II 在心血管系统疾病中的效应主要是由 AT-1 和 AT-2 受体介导的。Ang II 作用于心肌细胞膜上的特异性 AT-1 受体,激活膜上的 G 蛋白信号传导通路,使胞浆游离 Ca^{2+} 浓度增高,加强心肌兴奋-收缩耦

表 2 3 组临床资料(计量资料)比较

项 目	A 组	B 组	C 组	P 值
n	29	24	7	
TR 面积/cm ²	4.74±2.47	15.93±6.72	0.22±0.29	<0.01
右心房内径/mm	54.61±8.31	72.43±18.17	47.57±6.00	<0.01
右心室射血分数/%	54.00±8.27	46.80±13.17	52.33±5.51	0.51
收缩期三尖瓣环内径/mm	23.48±5.13	29.18±5.22	14.93±2.69	0.01
舒张期三尖瓣环内径/mm	33.43±6.66	37.27±6.86	20.93±1.01	0.04
左心室射血分数/%	63.68±6.71	63.20±7.39	69.33±7.58	0.17
肺动脉收缩压/mm Hg	42.82±12.95	62.20±22.98	30.00±15.43	<0.01

注:1 mm Hg=0.133 kPa

表 3 房颤组与窦性组临床资料比较[$\bar{x}\pm s$]

项目	房颤组	窦性组	P 值
n	28	32	
身高/cm	160.20±5.63	158.67±8.73	0.476
体质量/kg	57.00±7.74	57.00±12.85	1.000
左心房内径/mm	56.89±16.21	44.75±9.12	0.010
左心室舒张末内径/mm	46.42±8.41	49.64±8.27	0.366
左心室收缩末内径/mm	30.00±5.54	31.09±8.58	0.719
右心房内径/mm	65.96±17.17	55.03±13.59	0.017
左心室射血分数/%	61.93±7.00	65.27±8.22	0.113
TR面积/cm ²	10.74±8.52	5.96±5.46	0.014

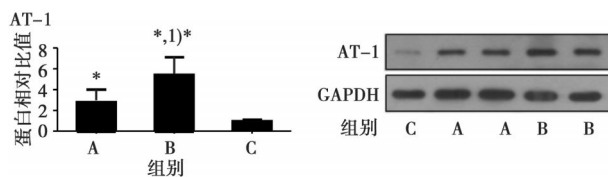


图 1 3 组 AT-1 的 Western-blot 结果比较

注:与 C 组比较, *P<0.05; 与 A 组比较, ¹⁾P<0.05

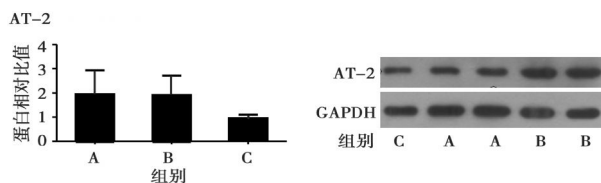


图 2 3 组右心房心肌 AT-2 的 Western-blot 结果比较

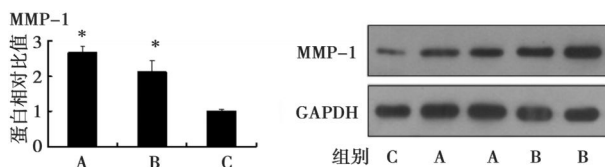


图 3 3 组右心房心肌 MMP1 的 Western-blot 结果比较

注:与 C 组比较, *P<0.05



图 4 3 组右心房心肌 MMP2 和 MMP9 的凝胶酶谱测定结果比较

(92 kDa 为 MMP-9 条带, 72 kDa 为 MMP-2 条带)

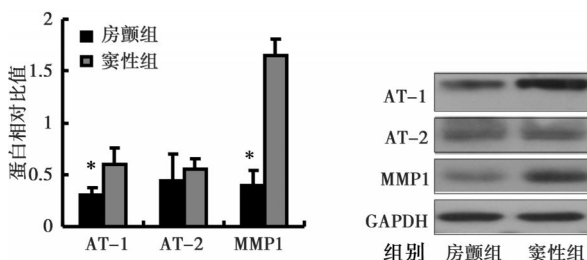


图 5 房颤组及窦性组心肌 AT-1、AT-2、MMP1 的 Western-blot 结果比较

注:与窦性组比较, *P<0.05

联,心肌收缩力增强;另外,Ang II 与 AT-1 受体结合能促进心肌细胞肥大,成纤维细胞及细胞外基质合成增加,使胶原沉积增加,导致心肌肥厚,顺应性降低,心室功能受损,心肌细胞纤维化增加。AT-2 拮抗上述 AT-1 效应,其主要效应为抑制纤维细胞增殖、抑制心肌肥厚及心肌纤维化,保护心功能。

本研究结果显示,随着 TR 程度的加重,AT-1 在心肌中表达逐渐增高。在重度 TR 组患者的右心房心肌组织中,AT-1 的表达显著高于对照组和轻至中度 TR 组。AT-2 在 3 组患者中都有表达,但在 3 组中表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$);然而 TR 组(A 组和 B 组)较 C 组的 AT-2 表达有上升趋势,可能由于本研究患者例数较少,未能达到统计学上有意义的差别。TR 时,右心房压力增加,右心房受压而引起心肌缺血,可反射性引起交感神经兴奋,刺激交感神经末梢释放儿茶酚胺类物质,激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统,Ang II 也随之激活,与之相应的 AT-1、AT-2 受体也激活。AT-1 受体被 Ang II 激活后,细胞膜上 G 蛋白信号传导通路激活,并升高胞浆 Ca^{2+} 离子浓度,介导纤维母细胞及心肌细胞的增殖以及促进细胞外基质的增生,而 AT-2 的激活效应则是对抗 AT-1 的上述效应。本研究结果提示,在 TR 时,Ang II 主要是由受体 AT-1 受体介导的途径参与右心房重构的病理生理过程的,而 AT-2 的表达上升趋势可以减弱肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活,是拮抗 AT-1 的调节所致。

本研究的结果表明,房颤组 AT-1 表达较窦性心律组患者明显降低,而 AT-2 在两组间表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。可能的机制是 AT-1 表达下降能作为一种保护机制,阻止或延缓肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活所致心肌纤维纤维化。Boldt 等^[4]研究发现伴和不伴二尖瓣疾病的房颤患者左心房的 AT-1 表达均较窦性心律组增高,而 AT-2 表达无明显差异,AT-2 并不参与心房结构重构。Goette 等^[5]研究房颤患者的右心重构时发现,与窦性心律患者相比,AT-2 表达上调而 AT-1 表达下调。

MMPs 是一个内源性的 Zn^{2+} 依赖性酶家族系列。MMP1 是胶原酶的一种,主要降解 I、II、III、IV、V、IX、X 型胶原、明胶和蛋白多糖;MMP2 和 MMP9 又称明胶酶,主要降解 IV、IV、VII、X、XI 型胶原、弹性蛋白和纤维连接蛋白。MMPs 及其抑制

物(TIMPs)之间的相互作用及其动态平衡在维持心脏正常的结构和功能方面起着重要的作用^[6]。

本研究结果显示,MMP1在实验组中的表达显著高于对照组。当TR时,心肌组织中MMP1表达及活性增高,正常的胶原蛋白被降解并被缺乏连接结构的纤维性间质组织所替代,降低心房壁的顺应性,对机械牵张的抵抗力下降,此时右心房代偿性增大。随着TR程度加重,MMP1减少,细胞外胶原纤维聚集,导致心肌纤维化,右心房失代偿,最终导致右心扩大。本研究还发现房颤组患者MMP1较窦性心律组表达低。房颤时,MMP1表达降低,MMPs及其抑制物的平衡打破,I型、III型胶原累积,导致心房纤维化。Anné等^[7]在研究MMPs在房颤患者的心肌中表达的结果显示,MMP1与心房纤维化的程度成负相关,且与心房内径成反比。Brilla等^[8]在培养大鼠心脏成纤维细胞时发现,Ang II表达水平升高能减少MMP1的表达,Ang II和MMP1之间有旁路存在。但是目前尚不明确Ang II与MMP1之间的旁路是如何实现和调节的。MMP2和MMP9能够降解弹性蛋白及纤维连接蛋白,被成纤维组织代替,最终导致心肌纤维化。本研究结果显示MMP2、MMP9在TR组和对照组患者的右心房心肌中都有表达,但是凝胶条带透亮度极低,难以用计算机灰度系统分析测量其表达量及活性。Nakano等^[9]研究MMPs在房颤患者心肌重构中的作用时,发现房颤组与对照组的MMP2和MMP9在蛋白表达水平的活性和潜在的形式比较,差异无统计学意义($P>0.05$),而在mRNA水平两组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。Xu等^[10]在研究细胞外基质与房颤的关系实验研究中发现,在终末心脏病心肌组中MMP2表达上调,而MMP9无明显变化。MMP2和MMP9的表达与许多心脏疾病相关,如冠心病、心脏瓣膜术后再狭窄及心肌病等。在本研究中,MMP2、MMP9在mRNA水平的表达是否有差异尚须进一步实验证实。

综上所述,AT-1和MMP1参与TR患者的右心房重构。在临床上,有可能通过心肌组织AT-1

及MMP1的生物活性来评估TR的程度,通过调节AT-1、MMP1来逆转心房重构可能会成为临床上预防和治疗TR的一种手段。

参考文献:

- [1] NEUBERGER H R, SCHOTTEN U, BLAAUW Y, et al. Chronic atrial dilation, electrical remodeling, and atrial fibrillation in the goat[J]. J Am Coll Cardiol, 2006,47(3): 644-653.
- [2] WANG W, ZHANG H T, YANG X L. Effect of matrix metalloproteinase and their inhibitors on atrial myocardial structural remodeling[J]. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2012. [Epub ahead of print].
- [3] KUMAGAI K, NAKASHIMA H, URATA H, et al. Effects of angiotensin II type 1 receptor antagonist on electrical and structural remodeling in atrial fibrillation[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(12): 2197-2204.
- [4] BOLDT A, WETZEL U, WEIGL J, et al. Expression of angiotensin II receptors in human left and right atrial tissue in atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 42(10): 1785-1792.
- [5] GOETTE A, ARNDT M, ROCKEN C, et al. Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans[J]. Circulation, 2000, 101(23): 2678-2681.
- [6] TANAKA A, MATSUDA H. IgE crosslinkage of Fcepsilon receptor I induces both production and activation of matrix metalloproteinase-9 in mast cells[J]. Cell Immunol, 2004, 228(1): 66-75.
- [7] ANNÉ W, WILLEMS R, ROSKAMS T, et al. Matrix metalloproteinases and atrial remodeling in patients with mitral valve disease and atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res, 2005, 67(4): 655-666.
- [8] BRILLA C G, ZHOU G, MATSUBARA L, et al. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone[J]. J Mol Cell Cardiol, 1994, 26(7): 809-820.
- [9] NAKANO Y, NIIDA S, DOTE K, et al. Matrix metalloproteinase-9 contributes to human atrial remodeling during atrial fibrillation[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 43(5): 818-825.
- [10] XU J, CUI G, ESMAILIAN F, et al. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation[J]. Circulation, 2004, 109(3): 363-368.

(收稿日期:2012-12-20)