

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.08.007
文章编号: 1005-8982(2020)08-0040-05

MicroRNA-155/FOXO3a 在心脏手术后心房颤动患者心房组织中的表达及与心房纤维化的关系

冶敦清, 祁国荣, 路霖, 王黎明

(青海省心脑血管病专科医院 心外科, 青海 西宁 810000)

摘要: **目的** 探讨 microRNA-155/叉头框蛋白 O 3a (miR-155s/FOXO3a) 在心脏手术后心房颤动(以下简称房颤)患者心房组织中的表达情况, 及其与心房纤维化的关系。**方法** 选取 2018 年 2 月—2019 年 4 月青海省心脑血管病专科医院收治的风湿性心脏瓣膜病并行心脏手术治疗的 92 例患者。根据患者病史、心电图及 24 h 动态心电图检查结果分为房颤组和窦性心律组。于心脏手术中采集患者右心房组织, 采用 qRT-PCR 检测心房组织中 miR-155、FOXO3a mRNA 相对表达量; 采用免疫印迹法检测心房组织中 FOXO3a 和 p-FOXO3a 蛋白相对表达量; 采用 Masson 染色法及计算机成像分析系统计算心房组织胶原容积分数, 评价心房组织纤维化程度; 采用 Pearson 法分析心房组织 miR-155、p-FOXO3a 蛋白水平与心房纤维化程度的相关性。**结果** 房颤组左心房内径、右心房内径高于窦性心律组 ($P < 0.05$)。房颤组胶原容积分数较窦性心律组高 ($P < 0.05$)。窦性心律组 miR-155 mRNA 相对表达量低于房颤组 ($P < 0.05$), FOXO3a mRNA 相对表达量高于房颤组 ($P < 0.05$)。房颤组 p-FOXO3a 蛋白相对表达量低于窦性心律组 ($P < 0.05$)。房颤组患者心房组织 miR-155 水平与 p-FOXO3a 蛋白水平呈负相关 ($r = -0.485$, $P < 0.05$), 与胶原容积分数呈正相关 ($r = 0.490$, $P < 0.05$), 心房组织 p-FOXO3a 蛋白水平与胶原容积分数呈负相关 ($r = -0.471$, $P < 0.05$)。**结论** 心脏手术后房颤患者心房组织中 miR-155 高表达, p-FOXO3a 蛋白低表达, 均与心房纤维化有关, 共同影响房颤的发生与维持。

关键词: 心房颤动; miR-155; 叉头框蛋白 O 3a; 心房; 组织; 纤维化

中图分类号: R541.75

文献标识码: A

Expression of miR-155/FOXO3a axis in atrial tissue of patients with atrial fibrillation after cardiac surgery and its relationship with atrial fibrosis

Dun-qing Ye, Guo-rong Qi, Lin Lu, Li-ming Wang

(Department of Cardiac Surgery, Qinghai Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Hospital, Xining, Qinghai 810000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of microRNA-155/fork-head box protein O 3a (microRNA-155/FOXO 3a) axis in atrial tissue of patients with atrial fibrillation after cardiac surgery and its relationship with atrial fibrosis. **Methods** Ninety two patients with rheumatic valvular heart disease who underwent cardiac surgery in Qinghai Provincial Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Hospital from February 2018 to April 2019 were selected and divided into atrial fibrillation group (43 cases) and sinus rhythm group (49 cases) according to their medical history, electrocardiogram (ECG) and 24-hour dynamic electrocardiogram (DCG). Right

atrial tissue was collected during cardiac surgery, real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expressions of microRNA-155 and FOXO3a in atrial tissue, the expression levels of FOXO3a and p-FOXO3a in atrial tissue were detected by immunoblotting (WB), the collagen volume fraction (CVF) of atrial tissue was calculated by Masson staining and computer imaging analysis system to evaluate the degree of atrial fibrosis, and Pearson method was used to analyze the correlations of microRNA-155, p-FOXO3a protein levels and CVF in atrial tissue. **Results** Compared with sinus rhythm group, the diameters of left atrium and right atrium increased significantly, the level of microRNA-155 and CVF in atrial tissue increased significantly, and the levels of FOXO3a mRNA and p-FOXO3a protein decreased significantly (all $P < 0.05$). The levels of microRNA-155 and p-FOXO3a protein in atrial tissue were negatively correlated ($r = -0.485, P < 0.05$), while the levels of microRNA-155 in atrial tissue were positively correlated with CVF ($r = 0.490, P < 0.05$), and the level of p-FOXO3a protein in atrial tissue was negatively correlated with CVF ($r = -0.471, P < 0.05$). **Conclusions** The high expression of microRNA-155 and low expression of p-FOXO3a protein in atrial tissue of patients with atrial fibrillation after cardiac surgery are both related to atrial fibrosis, which affect the occurrence and maintenance of atrial fibrillation jointly.

Keywords: atrial fibrillation; mir-155; fork-headed box protein O 3a; heart atria; tissues; fibrosis

心房颤动(以下简称房颤)是最常见的持续性心律失常之一,可引起栓塞和卒中,且致残和致死率高^[1]。随着我国人口老龄化加剧,房颤发病率不断增加,>75岁人群高达10%^[2-3]。房颤常继发于风湿性心脏瓣膜病,有研究报道,风湿性心脏瓣膜病房颤患者存在明显心房重塑,其典型表现为心房组织纤维化^[4-5]。叉头框蛋白(FOX)家族是一类广泛参与细胞增殖、分化及转化过程的转录因子,FOXO3a是FOX家族的重要一员,在细胞信号传导、生长发育、凋亡及抗氧化应激中起重要作用,其调控方式众多,涉及信号通路亦非常复杂^[6]。有研究报道,硫化氢钠后处理可通过激活PI3K/AKT/FOXO3a/Bim信号通路,减轻心肌细胞缺氧/复氧损伤^[7]。FOXO3a活性还受到miRNA调控,有研究发现miR-155可靶向抑制FOXO3a表达,与多种肿瘤及癌症发生有关^[8-10]。另有研究发现,miR-155在慢性房颤患者右心房中表达上调,参与房颤的发生与维持^[11]。然而关于miR-155/FOXO3a在心脏手术后房颤患者心房组织中的表达及作用鲜有研究。因此本研究拟观察心脏手术后房颤患者心房组织中miR-155、FOXO3a表达水平,并探究其与心房纤维化的关系。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年2月—2019年4月青海省心脑血管病专科医院收治的风湿性心脏瓣膜病并行心脏手术治疗的患者92例。根据患者病史、心电图及24h动态心电图检查结果分为房颤组和窦性心律组,分别为43和49例。纳入标准:①心脏瓣膜病并且行心脏瓣膜

置换术;②无伴发窦性心律;③有完整心电图及术前疾病相关指标检查资料;④房颤持续时间超过半年;⑤自愿参加本研究。排除标准:①合并高血压、糖尿病等基础性疾病;②严重肝、肾功能不全或心力衰竭;③伴发恶性肿瘤;④急性感染或不耐受手术治疗。房颤组患者男性26例,女性17例;年龄33~79岁,平均 (57.64 ± 9.83) 岁。窦性心律组患者男性21例,女性28例;年龄26~78岁,平均 (54.27 ± 10.95) 岁。两组患者年龄、性别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经过医院道德伦理委员会审批通过,样品采集及资料调查均取得患者及其家属知情同意并签字确认。

1.2 试剂及仪器

Trizol试剂(货号:R0016)、蛋白抽提试剂盒(批号:P0028)及BCA蛋白定量试剂盒(货号:P0010S)购自上海碧云天有限公司,PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)(货号:RR037A)、PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(货号:6210A)购自大连宝生生物工程有限公司,引物由上海吉玛生物科技有限公司合成,兔源p-FOXO3a抗体(货号:MA5-32164)、FOXO3a抗体(货号:PA1-805)、GAPDH抗体(货号:AM4300)及二抗羊抗兔IgG(货号:15135)购自美国Invitrogen公司。紫外分光光度计购自美国Thermo公司,7500型qRT-PCR仪购自美国Bio-Rad公司,1550P型心电图机购自日本光电工业株式会社。

1.3 方法

1.3.1 样本采集 在心脏外科手术时、心脏停跳前

分别采集所有患者 0.3 ~ 0.5 cm³ 右心房组织, 除去杂质, 分 3 等份保存, 2 份置于液氮中保存备用, 1 份用 4% 甲醛固定, 石蜡切片保存备用。

1.3.2 心房组织 miR-155 及 FOXO3a mRNA 水平检测 Trizol 法提取心房组织样品总 RNA, 用紫外分光光度计检测总 RNA 浓度及纯度。逆转录得到 cDNA, 置于 -20℃ 保存备用。采用 qRT-PCR 检测 miR-155 和 FOXO3a mRNA 表达水平。采用 20 μl 反应体系: TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 ×) 10 μl, ROX Reference Dye or Dye II (50 ×) 0.4 μl, cDNA (50 ng/μl) 2 μl, 正反向引物 (10 μmol) 各 0.8 μl, ddH₂O 6.0 μl。反应条件为: 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 34 s, 共 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法对心房组织中 miR-155 及 FOXO3a mRNA 的相对表达量进行定量分析。见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
miR-155	正向: 5' -GGAGCTCTGCCTTACCATT-3'	63
	反向: 5' -ACGCTGAGACTGGATGAA-3'	
FOXO3a	正向: 5' -TCTTCAGGTCTCTCTGTTCTCTG-3'	719
	反向: 5' -GGAAGCACCAAGAAGAGAGAAG-3'	
U6	正向: 5' -ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3'	94
	反向: 5' -GGAACGCTTCACGAATTTG-3'	
β-actin	正向: 5' -GAGACCTTCAACACCCAGCC-3'	139
	反向: 5' -AATGTCACGCACGATTTCCC-3'	

1.3.3 FOXO3a 蛋白水平检测 采用蛋白抽提试剂盒提取心房组织总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓

度, 置于 -80℃ 冰霜冷冻保存备用。取 60 mg 蛋白样品, 80 mV 电压下 6% SDS-PAGE 电泳 2 h, 250 mA 下 PVDF 膜转膜 70 min。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入适量含 2% 脱脂奶粉的 PBS 稀释, 加一抗 (FOXO3a、p-FOXO3a 抗体 1 : 500; GAPDH 抗体 1 : 500) 4℃ 孵育过夜, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 20 min/次, 用适量含 2% 脱脂奶粉的 PBS 稀释辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG (1 : 5 000), 室温孵育 1.5 h, 按上述方法洗膜, 用免疫印记化学发光试剂显色, 数字化多功能图像增强化学发光系统曝片, 观察结果并进行分析。

1.3.4 心房组织纤维化程度检测 心房组织切片经 Masson 染色后于显微镜下观察, 胶原纤维呈蓝紫色, 肌肉组织呈棕红色。每张切片随机选取 8 个 400 倍视野, 采用德国 Leica 公司的多功能显微镜拍照, 自动图像分析处理系统测定胶原容积分数, 胶原容积分数 = 胶原面积 / 视野面积 × 100%。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验; 计数资料以构成比表示, 比较用 χ^2 检验, 相关性分析用 Pearson 法, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基线资料比较

两组年龄、性别、收缩压、舒张压及左室射血分数比较, 采用 χ^2/t 检验, 差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。两组左心房内径、右心房内径比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 房颤组高于窦性心律组。见表 2。

表 2 两组基线资料比较

组别	<i>n</i>	男 / 女 / 例	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	左心房内径 / (mm, $\bar{x} \pm s$)	右心房内径 / (mm, $\bar{x} \pm s$)	收缩压 / (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	舒张压 / (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	左室射血分数 / (% , $\bar{x} \pm s$)
窦性心律组	49	21/28	54.27 ± 10.95	43.51 ± 4.32	27.68 ± 3.06	114.97 ± 15.69	69.43 ± 12.40	55.67 ± 5.90
房颤组	43	26/17	57.64 ± 9.83	54.95 ± 4.52	36.82 ± 3.61	111.62 ± 14.31	70.28 ± 11.54	54.84 ± 5.43
χ^2/t 值		2.181	1.544	12.402	13.143	1.064	0.339	0.699
<i>P</i> 值		0.140	0.126	0.000	0.000	0.290	0.736	0.487

2.2 两组心房组织纤维化程度比较

经 Masson 染色后, 房颤组心肌组织可见大量蓝色胶原纤维呈条索状分割包绕红棕色心肌细胞, 胶原容积分数为 (40.35 ± 5.24)%, 窦性心律组心房组织

以红棕色心肌细胞为主, 蓝色胶原纤维较少, 胶原容积分数为 (14.83 ± 1.72)%, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 (*t* = 30.524, *P* = 0.000), 房颤组较窦性心律组高。见图 1。

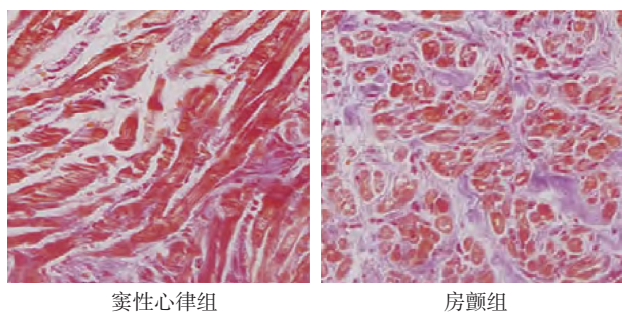


图1 心房组织病理切片 (Masson 染色 $\times 400$)

2.3 两组心房组织 miR-155、FOXO3a mRNA 相对表达量比较

两组心房组织 miR-155、FOXO3a mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 窦性心律组 miR-155 低于房颤组, FOXO3a mRNA 高于房颤组。见表 3。

表3 两组心房组织 miR-155、FOXO3a mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-155	FOXO3a mRNA
窦性心律组	49	1.13 \pm 0.12	1.06 \pm 0.18
房颤组	43	3.58 \pm 0.54	0.49 \pm 0.10
t 值		30.923	30.346
P 值		0.000	0.000

2.4 两组心房组织 FOXO3a 和 p-FOXO3a 蛋白相对表达量比较

两组心房组织 p-FOXO3a 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 房颤组低于窦性心律组。

两组心房组织 FOXO3a 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4、图 2。

表4 两组心房组织 FOXO3a 和 p-FOXO3a 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FOXO3a 蛋白	p-FOXO3a 蛋白
窦性心律组	49	0.92 \pm 0.06	1.12 \pm 0.08
房颤组	43	0.91 \pm 0.07	0.47 \pm 0.05
t 值		0.738	45.964
P 值		0.463	0.000

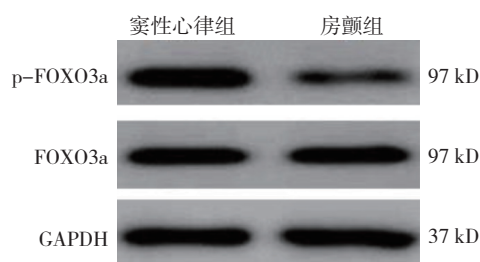


图2 心房组织 FOXO3a 和 p-FOXO3a 蛋白的表达

2.5 心房组织 miR-155、p-FOXO3a 蛋白水平与心房纤维化程度的相关性

Pearson 相关性分析结果显示, 房颤组心房组织 miR-155 与 p-FOXO3a 蛋白水平呈负相关 ($r = -0.485$, $P = 0.000$), 与胶原容积分数呈正相关 ($r = 0.490$, $P = 0.000$), 心房组织 p-FOXO3a 蛋白水平与胶原容积分数呈负相关 ($r = -0.471$, $P = 0.000$)。见图 3。

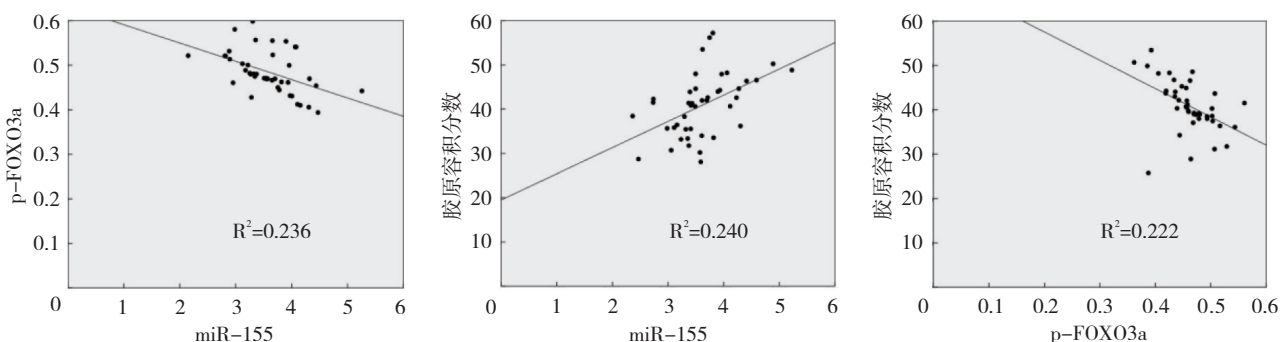


图3 房颤患者心房组织 miR-155、FOXO3a 蛋白与心房纤维化程度的相关性散点图

3 讨论

FOXO3a 是 FOXO 家族中的亚族, 广泛参与机体多种病理生理过程。FOXO3a 发生磷酸化可抑制 FOXO3a 活性及其对靶基因的调控。周波等^[7] 研究报

道, FOXO3a 可参与缺血再灌注损伤心肌损伤过程, 激活 PI3K/Akt 信号通路可使 FOXO3a 发生磷酸化, 并从细胞核转移至细胞质, 减轻心肌细胞凋亡, 同时可降低其下游蛋白表达。miR-155 是一个重要的心肌功

能调控 miRNA, 徐黎青等^[12] 研究报道, 乌司他丁可通过抑制体外循环心脏手术患者外周血单个核细胞中 miR-155 表达水平, 抑制 TNF- α 、IL-6、IL-8 等炎症因子的释放, 发挥抗炎和心肌保护作用。WANG 等^[13] 研究发现, 接受消融术后房颤患者血清 miR-155 水平较术前较低。本研究结果发现, 与窦性心律组比较, 房颤组患者心房组织中 miR-155 相对表达量较窦性心律组高, FOXO3a mRNA 及 p-FOXO3a 蛋白相对表达量较窦性心律组低, 且 miR-155 与 p-FOXO3a 蛋白呈负相关, 提示 miR-155 可能通过抑制 FOXO3a mRNA 及 p-FOXO3a 蛋白表达, 影响房颤发生。

房颤发生与维持的关键是心房重塑, 包括结构重塑和电重塑。其中心房结构重塑包括心房直径扩大、肌间质改变和肌细胞超微结构改变^[14-16]。HAN 等^[17] 研究报道, 左心房直径每增加 5 mm, 房颤发生风险增加 1.4 倍。本研究结果发现, 与窦性心律患者比较, 房颤患者左右心房内径均增大, 提示心房直径扩大可能与房颤发生密切相关, 与文献报道一致^[18]。房颤患者心房结构重塑最突出特点为心房纤维化。心房纤维化即异常胶原纤维在正常心房肌间质中沉积, 使正常心房肌间质中胶原纤维含量增加, 进而导致肌间质中不同类型的胶原蛋白比例失调、胶原纤维排列紊乱^[19]。本研究通过形态学及半定量检测胶原蛋白结果发现, 与窦性心律患者比较, 房颤患者心房组织胶原容积分数升高, 提示房颤患者心房存在不同程度纤维化病变。进一步分析发现, 心房组织 miR-155 水平与胶原容积分数呈正相关, p-FOXO3a 蛋白水平与胶原容积分数呈负相关, 提示 miR-155 可能通过抑制 p-FOXO3a 蛋白水平表达与房颤患者心房纤维化, 共同影响房颤的发生与维持。

综上所述, 心脏手术后房颤患者心房组织中 miR-155 高表达, p-FOXO3a 蛋白低表达, 均与心房纤维化程度有关, 共同影响房颤的发生与维持。但由于本研究样本量少, 后期应加大样本量深入探究。

参 考 文 献:

- [1] 潘军强, 张殿新, 孙超峰, 等. 小窝蛋白-1 与瓣膜性心房颤动患者心房纤维化的关系研究 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(3): 1155-1160.
- [2] 闫静静, 秦明照. 中国老年心房颤动患者抗凝治疗现状及分析 [J]. 中国全科医学, 2018, 21(27): 13-17.
- [3] WENG L C, PREIS S R, HULME O L, et al. Genetic predisposition, clinical risk factor burden, and lifetime risk of atrial fibrillation[J]. Circulation, 2018, 137(10): 1027-1038.
- [4] 潘军强, 张殿新, 寿锡凌, 等. 瓣膜性心房颤动患者心房结构重塑特征分析的多中心研究 [J]. 西安交通大学学报 (医学版),

2016, 37(1): 74-77.

- [5] 董泉彬, 唐燕华, 王维雪, 等. 心房颤动患者心房组织 FGF23/FGFR4 表达与心房纤维化的相关性 [J]. 中华医学杂志, 2018, 98(13): 1003-1007.
- [6] MARZI L, COMBES E, VIE N, et al. FOXO3a and the MAPK p38 are activated by cetuximab to induce cell death and inhibit cell proliferation and their expression predicts cetuximab efficacy in colorectal cancer[J]. Br J Cancer, 2016, 115(10): 1223-1233.
- [7] 周波, 钱坤, 胡明珠, 等. PI3K/Akt/FoxO3a/Bim 信号通路介导硫化氢后处理对缺氧 H9c2 心肌细胞的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(7): 971-976.
- [8] QIU C, MA J, WANG M L, et al. MicroRNA-155 deficiency in CD8+ T cells inhibits its anti-glioma immunity by regulating FoxO3a[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(6): 2486-2496.
- [9] QIAN F, HU Q, TIAN Y, et al. ING4 suppresses hepatocellular carcinoma via a NF-kappaB/miR-155/FOXO3a signaling axis[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(2): 369-385.
- [10] JI H, TIAN D, ZHANG B, et al. Overexpression of miR-155 in clear-cell renal cell carcinoma and its oncogenic effect through targeting FOXO3a[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(5): 2286-2292.
- [11] 冯桂荣, 钟国强, 蒋智渊, 等. MicroRNA-155 在慢性心房颤动心房 3 型小电导钙激活钾通道重构中的作用 [J]. 临床心血管病杂志, 2017, 33(7): 662-666.
- [12] 徐黎青, 韦江启. 乌司他丁通过诱导 miR-155 抑制体外循环心脏手术患者炎症反应的作用机制研究 [J]. 中国药房, 2017, 28(20): 2742-2745.
- [13] WANG M, SUN L, DING W, et al. Ablation alleviates atrial fibrillation by regulating the signaling pathways of endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide via miR-155-5p and miR-24-3p[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 4451-4462.
- [14] FOGLIENI C, RUSCONI R, MANTIONE M E, et al. Early left atrial tissue features in patients with chronic mitral regurgitation and sinus rhythm: alterations of not remodeled left atria[J]. Int J Cardiol, 2016, 219(13): 433-438.
- [15] 王腾, 陈玉婷, 曹红, 等. 老龄化家兔左心房重构对房性心律失常的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(2): 244-250.
- [16] 董丽君, 周贤惠, 李耀东, 等. 成年与老年心房颤动犬钙激活中性蛋白酶表达及心房结构的比较 [J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2017, 31(5): 437-442.
- [17] HAN F T, MARROUCHE N. An atrial fibrosis-based approach for atrial fibrillation ablation[J]. Future Cardiol, 2015, 11(6): 673-681.
- [18] 叶钜亨, 高虹, 李军, 等. 左心房内径、血清 UA 水平与心房颤动的关系研究 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2018, 10(4): 448-450.
- [19] ZAMAN J A, HARLING L, ASHRAFIAN H, et al. Post-operative atrial fibrillation is associated with a pre-existing structural and electrical substrate in human right atrial myocardium[J]. Int J Cardiol, 2016, 220(13): 580-588.

(李科 编辑)

本文引用格式: 冶敦清, 祁国荣, 路霖, 等. MicroRNA-155/FOXO3a 在心脏手术后心房颤动患者心房组织中的表达及与心房纤维化的关系 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(8): 40-44.