

本文引文格式:庄珍珍,陶一勤,胡海峰,等.组蛋白去乙酰化酶4和I型胶原在瓣膜性心房颤动患者中的表达变化及其临床意义[J].右江民族医学院学报,2022,44(5):703-707.

【论著与临床报道】

组蛋白去乙酰化酶4和I型胶原在瓣膜性心房颤动患者中的表达变化及其临床意义

庄珍珍,陶一勤,胡海峰,肖大树

(安徽医科大学附属巢湖医院,安徽 合肥 238000)

摘要:目的 探究组蛋白去乙酰化酶4(HDAC4)和I型胶原(Col1A1)在瓣膜性心房颤动患者中的表达水平变化及其临床意义。方法 按需求收集2020年10月—2022年4月安徽医科大学附属巢湖医院心胸外科瓣膜置换术和先天性心脏病开胸修补术患者信息和右心房组织标本,依据患者病史、心脏彩超、常规心电图及24h动态心电图分为瓣膜性心房颤动组(AF组)和先天性心脏病合并窦性心律组(SR组),每组30例,观察对比HDAC4与Col1A1在两组患者中的表达水平。应用Masson及HE染色观察心肌组织胶原和病理的变化;免疫印迹实验法(Western blot)及实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测心肌组织HDAC4和Col1A1的蛋白与mRNA表达变化;免疫组化法检测心肌组织HDAC4和Col1A1的蛋白表达量。结果 较SR组,AF组心肌组织胶原主要分布于心肌间质,胶原沉积升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);较SR组,AF组HDAC4和Col1A1蛋白与mRNA表达量升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 HDAC4与Col1A1在瓣膜性心房颤动心肌组织中表达升高,这提示HDAC4与Col1A1可能促进瓣膜性心房颤动的发展。

关键词:心房颤动;组蛋白去乙酰化酶4;心肌重构;I型胶原

中图分类号:R541.75 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2022)05-0703-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.05.015

Expression changes of histone deacetylase 4 and type I collagen in patients with valvular atrial fibrillation and their clinical significance

Zhuang Zhenzhen, Tao Yiqin, Hu Haifeng, Xiao Dashu

(Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Hefei 238000, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression changes of histone deacetylase 4 (HDAC4) and type I collagen (Col1A1) in patients with valvular atrial fibrillation (AF) and their clinical significance. **Methods**

This study collected the right atrial tissue samples and the information of patients undergoing valve replacement and thoracotomy repair for congenital heart disease in the Department of Cardiothoracic Surgery, Chaohu Hospital of Anhui Medical University from October 2020 to April 2022. Patients were divided into valvular atrial fibrillation group (AF group) and congenital heart disease with sinus rhythm group (SR group) according to their medical history, color Doppler ultrasound, routine electrocardiogram and 24-hour dynamic electrocardiogram, with thirty patients in each group. The expression levels of HDAC4 and Col1A1 in the two groups were observed and compared. Masson and HE staining were used to observe the changes of collagen and pathology in

第一作者简介:庄珍珍(1995—),女,在读硕士研究生,住院医师,研究方向:心胸外科,E-mail:1589860810@qq.com

通讯作者简介:陶一勤(1963—),男,本科,主任医师,研究方向:心胸外科,E-mail:18905651936@189.cn

myocardial tissues. Western blot and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) were used to detect the changes of protein and mRNA expressions of HDAC4 and Col1A1 in myocardial tissues. The protein expressions of HDAC4 and Col1A1 in myocardial tissues were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with those of the SR group, collagen was mainly distributed in myocardial interstitium, and collagen deposition increased in the AF group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with those of the SR group, the protein and mRNA expressions of HDAC4 and Col1A1 in the AF group increased, with the difference being statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of HDAC4 and Col1A1 increase in myocardial tissue of valvular atrial fibrillation, suggesting that HDAC4 and Col1A1 may promote the occurrence and development of valvular atrial fibrillation.

Key words: atrial fibrillation; histone deacetylase 4; myocardial remodeling; type I collagen

心房颤动(atrial fibrillation, AF)在临床工作中较为常见,多好发于中老年人群,是危害较为严重且极具复杂性的一种心律失常,它不仅可引起栓塞、中风、心力衰竭,甚至还可能导致死亡,有报道称近些年我国房颤患者发病率与致死率均呈升高趋势^[1-2]。反复多次发作的心房颤动会过度激活心房组织肾素-血管紧张素系统,这会引发心肌组织重构,进而导致心房电活动异常。按病因可将心房颤动分为瓣膜性心房颤动及非瓣膜性心房颤动两类,血栓发生率前者明显高于后者,即瓣膜性心房颤动患者危险级别较高^[3]。瓣膜性心房颤动是最常见的基础性心脏病变,其中典型的病理学改变是心肌重构,但引起瓣膜性心房颤动的分子机制尚不完全清楚^[4-5]。组蛋白去乙酰化酶(HDACs)是一类通过从组蛋白的 ϵ -N-乙酰赖氨酸氨基酸中脱乙酰基从而使 DNA 紧密包裹的酶,HDACs 在维持生物体内组蛋白乙酰化常染色质和异染色质的稳态中发挥着极其关键的作用^[6]。组蛋白去乙酰化酶 4(HDAC4)是一种 II a 类组蛋白去乙酰化酶,与心肌组织重构及心肌纤维化等密切相关^[7]。但是,关于 HDAC4 对瓣膜性心房颤动有何影响鲜见报道,其相关调控机制也有待进一步探究。本研究以瓣膜性心房颤动患者作为研究对象,探究 HDAC4 与 I 型胶原(Col1A1)在瓣膜性心房颤动患者中的表达水平变化及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 一般资料 自 2020 年 10 月—2022 年 4 月采集安徽医科大学附属巢湖医院心胸外科行瓣膜置换术(心脏瓣膜病)和开胸修补术(先天性心脏病)患者的临床信息和右心房组织标本,依据患者病史、心脏彩超、常规心电图及 24 h 动态心电图分为瓣膜性心房颤动组(AF 组),先心病开胸修补术并呈窦性心律组(SR 组),收集 AF 组 30 例,SR 组 30 例,观察对比 HDAC4 与 Col1A1 在两组患者中的表达水平。病例采集纳入标准:接受相关检查已经确诊的心脏瓣膜病且具有明确手术指征的患者。病例采集排除标准:冠状动脉血

管狭窄程度 70% 以上者;扩张型心肌病者;甲状腺功能亢进或降低者;年龄超过 65 岁;高血压级别 3 级以上者;有明显的呼吸道感染症状;全身结缔组织疾病患者;慢性肺源性心脏病者。该研究通过医院伦理委员会审批。

1.1.2 主要试剂 英国 Abcam 公司的 HDAC4 和 Collagen I 抗体;武汉 Boster 公司的 β -actin 抗体;北京中杉金桥生物技术有限公司的二抗辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG;美国 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂;上海生工生物工程股份有限公司的 HDAC4、Col1A1、 β -actin 引物;日本 TaKaRa 公司的 One Step TB Green[®] Prime Script[™] PLUS RT-PCR Kit。

1.1.3 主要仪器 美国 ABI 公司的 Applied Biosystems Gene Amp Step One[™] Real-Time qPCR System;中国海尔公司的超净工作台;德国 Eppendorf 公司的 PCR 扩增仪;美国 Biorad 公司的 Western blotting 相关仪器设备;美国 Sigma 公司的高速低温离心机。

1.2 方法

1.2.1 标本取材及处理 在外科手术中取符合入组要求患者的右心房组织标本($0.3 \sim 0.5 \text{ cm}^3$),将标本去除杂质并分成 3 份,将第 1 份置入 4% 甲醛溶液进行固定,以备石蜡切片及免疫组织化学染色;将第 2 份送 EP 管以备胶原蛋白含量检测和 mRNA 分离;将第 3 份送液氮瓶中 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存以备蛋白提取、Western blot 法等检测。

1.2.2 HE 染色 石蜡切片脱蜡至水、细胞核采取苏木素染色、细胞质采取伊红染色、脱水封片,在显微镜下镜检,图像采集与分析。

1.2.3 Masson 染色 石蜡切片脱水;苏木紫染液与三氯化铁溶液混合液染色 10 min 后自来水冲洗;盐酸乙醇溶液分化 1 min 后自来水冲洗;氨水 1 min 后自来水清洗;丽春红染色 10 min,乙酸溶液 1 min;乙酸溶液 1 min;苯胺蓝染色 2 min,乙酸溶液 1 min;95%

乙醇、无水乙醇脱水,二甲苯处理,最后树胶封片。

1.2.4 目标 cDNA 获取、qRT-PCR 检测心肌 HDAC4 和 Col1A1 mRNA 表达 按照 TRIzol 说明书,TRIzol 试剂裂解组织分离总 RNA,总 RNA 的浓度以及纯度采用分光光度计测定分析,将 A260/A280 在 1.6~2.0 的总 RNA 进行逆转录获得目标 cDNA,以目标 cDNA 进行 qRT-PCR 检测;找相应引物序列,交由生工生物工程股份有限公司合成目标引物。HDAC4 引物序列如下:上游引物:5'-ACATCA-GAGACCAATGCCA-3',下游引物:5'-CTTCTCA-CACT TTGCGCCT-3';Col1A1 引物序列如下:上游引物:5'-GCTCCTCTTAGGGGCCACT-3',下游引物:5'-CCACGTCTCACCATTGGGG-3'; β -actin 引物序列如下:上游引物:5'-TGGAATCCTGTGGCATC-CATGAAAC-3',下游引物:5'-ACGCAGCTCAGTA ACAGTCCG-3'。反应条件:50 °C 2 min;95 °C 10 min;95 °C 20 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,40 循环;条件 95 °C、15 s,60 °C、1 min,95 °C、15 s 为溶解曲线阶段,以 β -actin 作为内参照物,相对表达水平应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.2.5 Western blot 检测 HDAC4、Col1A1 蛋白表达 提取组织蛋白,吸出裂解液放入 1.5 mL EP 管中,4 °C,12 000 r/min,离心 30 min,吸取上层蛋白清液,进行定量、变性。蛋白电泳,配置 8% 的分离胶和 5% 浓缩胶进行蛋白分离。转膜,按照蛋白 marker 指示切出所需胶带,并转移至 PVDF 膜上,恒流 200 mA,转膜时间按照 1 kd/min;TBST 洗膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,洗膜 3 次,4 °C 孵育一抗,过夜,洗膜,孵育二抗 1 h,洗膜,ECL 法显影,测定灰度值,分析蛋白表达量。

1.2.6 免疫组织化学法检测 HDAC4、Col1A1 蛋白表达 将组织进行石蜡切片脱蜡至水,按说明书步骤进行操作:置入煮沸的修复液中进行抗原修复,3% 双氧水阻断非特异性达到内源性酶的消除,二抗血清封闭,一抗 4 °C 孵育过夜,孵育二抗实现血清封闭与抗体孵育,DAB 显色,苏木素复染,脱水透明,中性树胶封片、镜检,观察并分析结果。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 25.0 软件进行数据处理与分析,计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较采用 t 检验。数据分析至少 3 次。

2 结果

2.1 两组临床资料比较 AF 组年龄均值偏大、病程偏长,差异具有统计学意义($P < 0.05$);超声心动图显示:AF 组较 SR 组 LVEDD 水平偏大,差异具有统计学意义($P < 0.01$);两组均值在 LAD、RVD、LVEF 上无明显差异;AF 组较 SR 组 RAD 水平偏小,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组患者心功能指标比较

分组	AF 组 ($n = 30$)	SR 组 ($n = 30$)	t / χ^2	P
性别(男/女)	15/15	18/12	0.606	0.436
年龄/岁	45.60 \pm 9.74 ^b	35.03 \pm 5.31	5.216	0.000
病程/年	10.00 \pm 3.81 ^b	6.73 \pm 2.28	3.780	0.000
LVEDD/mm	53.83 \pm 5.58 ^b	49.73 \pm 5.04	2.984	0.004
LAD/mm	48.50 \pm 3.37	47.23 \pm 4.59	1.218	0.228
RVD/mm	18.67 \pm 1.61	18.73 \pm 2.05	-0.140	0.889
RAD/mm	44.37 \pm 3.86 ^a	46.27 \pm 3.14	-2.090	0.041
LVEF	0.54 \pm 0.06 ^a	0.56 \pm 0.04	-1.897	0.063

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;②左心室舒张末期内径(LVEDD),左心室内径(LAD),右心室内径(RVD),右心房舒张直径(RAD),左心室射血分数(LVEF);③AF 组与 SR 组比较,a: $P < 0.05$,AF 组与 SR 组比较,b: $P < 0.01$ 。

2.2 HE 染色检测心肌组织的病理改变 HE 染色对比提示,SR 组正常;AF 组排列紊乱,心肌组织间质增多,炎性细胞浸润其中,见图 1。

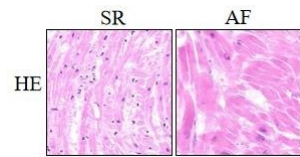


图 1 HE 染色—两组心肌组织病理改变($\times 200$)

2.3 Masson 染色检测心肌胶原纤维物质沉积 从 Masson 染色最终结果提示,SR 组心肌被染成红色、细胞核被染成蓝色、胶原纤维物质沉积明显较少,而 AF 组胶原纤维物质沉积明显增多,心肌 Masson 染色如下,见图 2。CVF 分析结果显示:AF 组 CVF(18.03 \pm 2.62)与 SR 组(12.67 \pm 3.14)相比较,示前者心肌组织胶原容积分数增高,差异具有统计学意义($t = 7.183, P < 0.001$)。

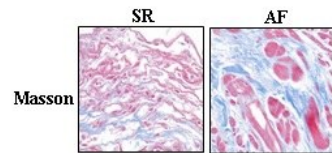
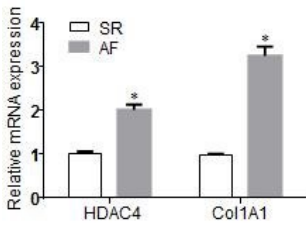


图 2 Masson 染色检测心肌胶原纤维物质沉积($\times 200$)

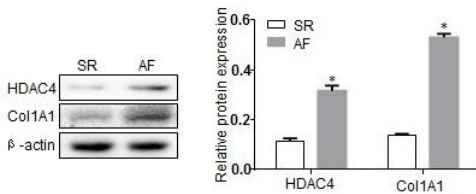
2.4 qRT-PCR 检测心肌组织中 HDAC4 和 Col1A1 mRNA 表达 qRT-PCR 检测结果提示,SR 组心肌组织中 HDAC4 和 Col1A1 mRNA 较少,而 AF 组心肌组织中 HDAC4 和 Col1A1 mRNA 明显增高。AF 组心肌组织 HDAC4 和 Col1A1 mRNA 明显高于 SR 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。



注:与 SR 相比,* $P < 0.05$ 。

图 3 qRT-PCR 检测心肌组织中 HDAC4 和 Col1A1 mRNA 表达

2.5 Western blot 检测心肌组织中 HDAC4 和 Col1A1 蛋白的表达 Western blot 检测结果提示,SR 组心肌组织中 HDAC4 和 Col1A1 蛋白较少,AF 组心肌组织中 HDAC4 和 Col1A1 蛋白增高。AF 组较 SR 组心肌组织 HDAC4 和 Col1A1 蛋白明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。



注:与 SR 相比,* $P < 0.05$ 。

图 4 Western blot 检测心肌组织中 HDAC4 和 Col1A1 蛋白的表达

2.6 免疫组化法检测心肌组织中 HDAC4 和 Col1A1 蛋白的表达 免疫组化法检测结果提示,SR 组心肌组织中 HDAC4 和 Col1A1 蛋白阳性染色较少,AF 组心肌组织中 HDAC4 和 Col1A1 蛋白染色阳性明显增高,见图 5。

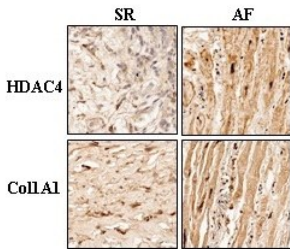


图 5 免疫组化法检测心肌组织中 HDAC4 和 Col1A1 蛋白的表达($\times 200$)

3 讨论

AF 常好发生于具有器质性心脏病的患者,尤以瓣膜性心房颤动最为多见。瓣膜性心房颤动发生率及死亡率较高^[8]。心肌重构是导致瓣膜性心房颤动的重要因素,是一种常见的、致命的病理状态,它包括心肌细胞的肥大生长、纤维化和炎症发生发展^[9]。研究提

示,心肌纤维化是导致心肌重构的关键因素,心肌纤维化不仅是因为心肌间质出现大量细胞外基质,如胶原等沉积,它本身更会促进纤维化的发生与进展^[10-11]。因此,探究对心肌重构纤维化的分子机制,有助于改善瓣膜性心房颤动的发生发展,为瓣膜性心房颤动的预防和治疗提供一定参考价值。本实验通过检测 HDAC4 和 Col1A1 在瓣膜性心房颤动患者中的表达水平,发现瓣膜性心房颤动患者心肌组织间质、炎症细胞浸润、心肌胶原纤维物质沉积、HDAC4 和 Col1A1 mRNA 以及蛋白含量均偏高。实验检测结果表明:HDAC4 在心肌重构组织中表达明显升高,同时 Col1A1 mRNA 以及蛋白的表达水平明显增高。

HDACs 是一类功能强大的蛋白分子,是调控基因的重要组成部分,具有清除染色体组蛋白核内赖氨酸残基乙酰基的功能,根据其序列与酵母中产生的同源物的相似性,被分为 4 类,HDAC4 为 II 类 HDACs^[12]。HDACs 在心血管疾病发病中起着重要作用。研究显示^[13],在小鼠肺纤维化模型中,组蛋白乙酰化可能对纤维连接蛋白基因的表达起到调控的作用,HDAC4 在肺纤维化的早期应激反应中表达增高。在肝纤维化的发展过程中,HDAC4 通过调节 mir-206 和促进肝纤维化直接参与肝星状细胞的活化和增殖^[14]。本研究显示 HDAC4 在瓣膜性心房颤动心肌组织中表达升高,与其他疾病研究结果类似,然而,具体调控机制尚不清楚,有待深入研究。

HDACs 有望成为纤维化程度的提示指标并且可为纤维化的防治提供思路。有研究显示,HDAC6 在纤维化的肺组织中高表达,应用 HDAC6 抑制剂可明显降低肺组织的纤维化程度^[15]。结合以往研究结果提示 HDAC4 含量可以作为瓣膜性心房颤动患者心肌纤维化程度的反映指标,未来可通过研究并应用 HDAC4 抑制剂预防心肌组织纤维化或减轻心肌组织纤维化程度。而且,有关学者研究已经证实 HDAC5 参与介导组蛋白 H3K27 乙酰化失衡导致心肌重构,但 HDAC4 是否也是通过介导组蛋白 H3K27 乙酰化失衡引起心肌重构尚且不甚明了,这也有待通过下一步深入研究来探索证实^[16]。大量成纤维细胞及大量细胞外基质聚集的一个过程即叫做纤维化,它同时伴有细胞周围炎症的浸润及组织结构的损伤。研究显示,一直存在的成纤维细胞会分泌包括 Col1A1 蛋白在内的各种细胞支架蛋白,蛋白的过度沉积促成纤维化的发生发展^[17]。而且,有研究提示 I 型胶原 mRNA 及其产生的蛋白量可提示纤维化的程度^[18]。本次研究中发现瓣膜性心房颤动患者心肌组织中 Col1A1 表达较为旺盛,这也反映出在瓣膜性心房颤动患者心肌重构中 Col1A1 发挥着重要作用。

本研究属于单中心研究,病例数相对较少,可能存在选择性偏倚而导致结果具有一定误差,因此本研究具有一定局限性,后续可通过多中心大样本研究来获得更为有意义的结果。

综上所述,从 HDAC4 和 Col1A1 mRNA 以及蛋白的表达水平能够看出,HDAC4 参与瓣膜性心房颤动的发生发展,表明 HDAC4 可以作为潜在抑制瓣膜性心房颤动的调控因子。因此,通过干扰 HDAC4 的表达水平,可能对心脏重构发挥干预的效果。

参考文献:

- [1] 程晓振,陈兴娟,胡影,等. 甲状腺功能减退与心房颤动相关性的 Meta 分析[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2021, 13(11):1289-1294.
- [2] 周利慧,彭琴,王媛,等. 中国居民 1993—2017 年房颤发病及死亡趋势年龄—时期—队列模型分析[J]. 中国公共卫生, 2021, 37(11):1672-1676.
- [3] 周巍,杨本强. 瓣膜性心房颤动影像学发展现状及临床价值[J]. 临床军医杂志, 2021, 49(2):232-235.
- [4] YANG W B, WU Z J, YANG K, et al. BMI1 promotes cardiac fibrosis in ischemia-induced heart failure via the PTEN-PI3K/Akt-mTOR signaling pathway [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 316(1):H61-H69.
- [5] ZHANG J H, TAO R, CAMPBELL K F, et al. Functional cardiac fibroblasts derived from human pluripotent stem cells via second heart field progenitors[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):2238.
- [6] ZHANG Q, WANG S B, CHEN J H, et al. Histone deacetylases (HDACs) guided novel therapies for t-cell lymphomas[J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(3):424-442.
- [7] LUO L Q, MARTIN S C, PARKINGTON J, et al. HDAC4 controls muscle homeostasis through deacetylation of myosin heavy chain, PGC-1 α , and Hsc70[J]. *Cell Rep*, 2019, 29(3):749-763. e12.
- [8] 张富山,黄建领,张伟峰,等. 左房前后径和血浆 NT-proBNP 在 COX-MAZEIV 手术同期心脏瓣膜手术治疗持续性瓣膜性心房颤动前后的变化研究[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2021, 13(12):1518-1520.
- [9] 张石在,王毅,马瑞莲,等. 黄芪多糖抑制 TGF- β 1 和 Nox-4/Akt/m TOR 信号通路保护心肌重构的作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(24):3108-3114.
- [10] ZHANG H, TIAN L, SHEN M C, et al. Generation of quiescent cardiac fibroblasts from human induced pluripotent stem cells for in vitro modeling of cardiac fibrosis [J]. *Circ Res*, 2019, 125(5):552-566.
- [11] LIANG J N, ZOU X, FANG X H, et al. The Smad3-miR-29b/miR-29c axis mediates the protective effect of macrophage migration inhibitory factor against cardiac fibrosis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(9):2441-2450.
- [12] LI M W, ZHENG Y, YUAN H H, et al. Effects of dynamic changes in histone acetylation and deacetylase activity on pulmonary fibrosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 52:272-280.
- [13] 李明玮,张永锋,霍静. 博来霉素诱导的小鼠肺纤维化组织中组蛋白 3 和组蛋白 4 乙酰化变化[J]. 山西医科大学学报, 2020, 51(8):782-788.
- [14] HAN X R, HAO C Z, LI L Y, et al. HDAC4 stimulates MRTF-A expression and drives fibrogenesis in hepatic stellate cells by targeting miR-206[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29):47586-47594.
- [15] 丁治云,梁作辉,方会娟,等. 瘢痕组织 MECP2、HDAC6 的表达及其临床意义[J]. 实验与检验医学, 2021, 39(4):959-961.
- [16] 罗孝美,彭昌,吴书琪,等. 组蛋白脱乙酰酶 2 介导的组蛋白乙酰化失衡在压力过载性心肌重构中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2022, (04):584-591.
- [17] 席苑,张海静,高云航,等. 汉防己甲素对 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞中 Col-I 及 FN 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(12):94-99.
- [18] 窦玉玉,陆青兰,罗菲,等. 小鼠矽肺纤维化造模成功时间点的比较研究[J]. 右江民族医学院学报, 2022, 44(1):1-5.

收稿日期:2022-04-14;修回日期:2022-06-06