

风湿性心脏瓣膜病合并心房颤动患者中 DNMT3A 与 Kv1.5 蛋白的表达变化及相关性研究

随志辉^{1,2}, 石开虎^{1,2}, 吴君旭^{1,2}, 徐盛松^{1,2}, 陶 辉^{1,2}, 宣海洋^{1,2}, 曹 炜^{1,2}, 沙纪名^{1,2}, 占红英^{1,2}

摘要 目的 探讨风湿性心脏瓣膜病合并心房颤动(AF)患者 DNA 甲基转移酶 3A(DNMT3A)与超速延迟整流性钾通道蛋白(Kv1.5)表达水平变化及其相关性研究。方法 将 20 例风湿性心脏瓣膜病接受瓣膜置换手术患者于体外循环前切取的右心耳组织作为研究对象。根据 AF 的定义将标本分为 AF 组($n=10$)和窦性心律(SR)组($n=10$),分别应用免疫组化、Western blot 法检测心房肌组织中 DNMT3A 和 Kv1.5 蛋白表达水平变化。结果 免疫组化检测显示 AF 组与 SR 组相比, DNMT3A 蛋白表达增加($P<0.05$);而 Kv1.5 蛋白表达减少($P<0.05$)。同时, Western blot 检测显示 AF 组与 SR 组相比, DNMT3A 蛋白表达增加($P<0.05$),而 Kv1.5 蛋白表达减少($P<0.05$)。相关性分析显示 DNMT3A 与 Kv1.5 之间存在一定负相关性($r=-0.64$, $P<0.01$)。结论 DNMT3A 与 Kv1.5 之间存在负相关性,提示 DNMT3A 可能参与调控 Kv1.5 通道蛋白的表达。

关键词 风湿性心脏病; 心房颤动; DNA 甲基转移酶 3A; 超速延迟整流性钾通道蛋白

中图分类号 R 654.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0105-04

心房颤动是心脏心律失常中常见的一种疾病,可诱发中风和心力衰竭等。超快速延迟整流钾电流(ultrarapid delayed rectifier current, I_{Kur})是仅在心房肌发现的钾通道电流,其离子通道的分子基础是 Kv1.5 钾通道^[1],有助于研究人类心房肌细胞的动作电位复极化。Kv1.5 通道阻滞剂可以延长心房动作电位,并可能防止心房扑动或颤动而不影响心室复极化。而 DNA 甲基转移酶 3A(DNA methyltransferase 3A, DNMT3A)是一种甲基化酶,使去甲基化的 CpG 位点重新甲基化,参与 DNA 的从头甲基化。本课题组前期研究^[2]显示 DNMT3A 参与心肌重构过程。该研究通过对风湿性心脏瓣膜病合并心房颤

动(atrial fibrillation, AF)患者的右心耳 DNMT3A 蛋白表达进行对比研究,探讨 DNMT3A 与 Kv1.5 蛋白的表达变化及相关性研究,从而揭示风湿性心脏瓣膜病患者 AF 发生与维持的可能机制,为临床更好地防治 AF 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2012 年 12 月~2013 年 12 月在安徽医科大学第二附属医院因风湿性心脏瓣膜病施行心脏瓣膜置换手术的 20 例患者,排除合并高血压、糖尿病、心绞痛和慢性肾功能不全者。按有无 AF 分为 AF 组和 SR 组。AF 组 10 例,男 4 例,女 6 例,年龄区间 50~62(57.20 ± 3.49)岁;术前 NYHA 心功能分级 I 级 0 例,II 级 2 例,III 级 5 例,IV 级 3 例。SR 组 10 例,男 3 例,女 7 例,年龄 37~60(48.40 ± 6.88)岁;术前 NYHA 心功能分级 I 级 1 例,II 级 6 例,III 级 3 例。

1.2 主要试剂 SP 免疫组化试剂盒(北京中杉生物工程有限公司);兔抗 Kv1.5 多克隆抗体(美国 Millipore 公司);兔抗 DNMT3A 多克隆抗体(英国 Abcam 公司)。

1.3 方法

1.3.1 心脏彩超检查 在患者术前行心脏彩超检查。仪器:MYLAB 50 频率 3.5 MHz。记录反映心功能的参数:左室射血分数(left ventricular ejection fractions, LVEF)。记录心脏若干结构数据:左房内径(left atrial diameter, LAD)、右房内径(right atrial diameter, RAD)、左室舒张末期直径(left ventricular end-diastolic diameter, LVDD)、右室内径(right ventricular diameter, RVD)。

1.3.2 免疫组化实验 取心房肌组织,常规石蜡包埋,切片厚 5 μm ,脱蜡至水;含 3% H_2O_2 室温孵育 25 min,阻断内源性过氧化物酶;微波修复抗原;加入 1:100 稀释的一抗,置湿盒中 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;1:100 稀释生物素化山羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 25 min;DAB 显色:1 ml 蒸馏水加入试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片,室温显色,镜下控制反应时间 5 min,阳性细胞的细胞质出现棕黄色颗粒;苏木精

2014-10-15 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:1308085MH117);安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2011A175)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院心胸外科,合肥 230601

²安徽医科大学心血管病研究中心,合肥 230032

作者简介:随志辉,男,主治医师,硕士研究生;

石开虎,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: shikaihu@gmail.com

轻度复染细胞核;脱水、透明、中性树胶封片。采用 Image Proplus 6.0 图像扫描软件进行图像分析。

1.3.3 Western blot 实验 取右心耳的心房肌组织块 100 mg,加入总蛋白提取液 1 ml,匀浆、裂解、离心,即得总蛋白提取液,置于 -80°C 冰箱保存备用。蛋白电泳:采用 12% 分离胶及 5% 积层胶的 SDS-PAGE 系统;转膜:300 mA 恒流电 2 h;印迹:洗膜;一抗工作液 37°C 孵育过夜,洗膜;二抗工作液 37°C 孵育 2 h,洗膜;洗片:将 A 和 B 发光液按等体积混合滴于 PVDF 膜上,压片、曝光、定影;蛋白半定量检测:采用 Lab Works4.5 图像获取和分析系统软件测定 DNMT3A 与 Kv1.5 蛋白条带的积分光密度(integral optical density, IOD)值,以 β -actin 作为内参照,每个样品均同时检测 β -actin 蛋白条带的 IOD 值,计算 DNMT3A 与 Kv1.5 的相对表达量,实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间定量数据比较采用 t 检验,使用 Pearson 相关进行相关性分析。

2 结果

2.1 基本资料 AF 组患者平均年龄大、病程长,与 SR 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);彩色多普勒超声心动图资料显示 AF 组 LAD、RAD、LVDD 平均值明显大于 SR 组($P < 0.01$),AF 组 LVEF 则较低,见表 1。

表 1 患者心功能各项指标对比($n = 10 \bar{x} \pm s$)

项目	AF 组	SR 组	t 值
年龄	$57.2 \pm 3.49^{**}$	48.4 ± 6.88	3.606
性别(男/女)	4/6	3/7	-
病程(年)	$15.60 \pm 4.97^{**}$	9.20 ± 4.26	3.090
LVDD(mm)	$58.30 \pm 5.85^{**}$	50.50 ± 4.65	3.161
LAD(mm)	$49.70 \pm 3.65^{**}$	43.80 ± 4.49	3.222
RVD(mm)	19.50 ± 1.84	18.90 ± 2.20	0.864
RAD(mm)	$43.70 \pm 4.55^{**}$	38.40 ± 3.47	2.930
LVEF	$0.52 \pm 0.04^{**}$	0.59 ± 0.05	3.010

与 SR 组比较: $^{**} P < 0.01$

2.2 免疫组化实验结果 SR 与 AF 两组结果比较, DNMT3A 在 AF 组心肌组织中阳性表达率为 70%,明显高于 SR 组 20% ($P < 0.05$); Kv1.5 在 AF 组心肌组织中阳性表达率为 10%,明显低于 SR 组 80% ($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 Western blot 实验结果 DNMT3A 在 AF 组心肌组织中表达明显高于 SR 组($P < 0.05$); Kv1.5 在

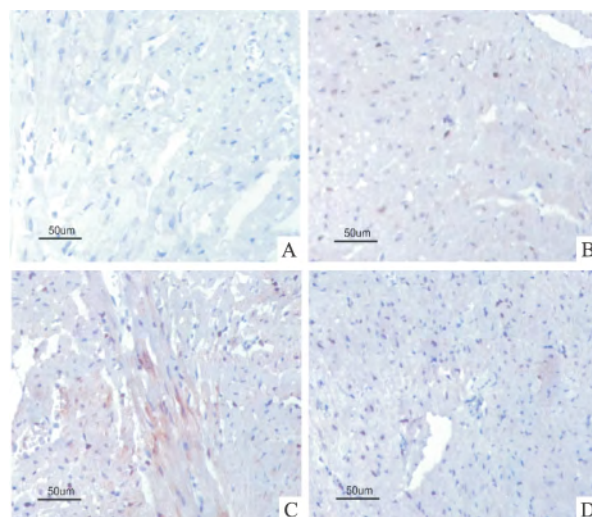


图 1 免疫组化法检测心肌组织中 DNMT3A、Kv1.5

蛋白的表达水平 $\times 200$

A: SR 组 DNMT3A 蛋白; B: AF 组 DNMT3A 蛋白; C: SR 组 Kv1.5 蛋白; D: AF 组 Kv1.5 蛋白

AF 组心肌组织中表达明显低于 SR 组($P < 0.05$)。见图 2。

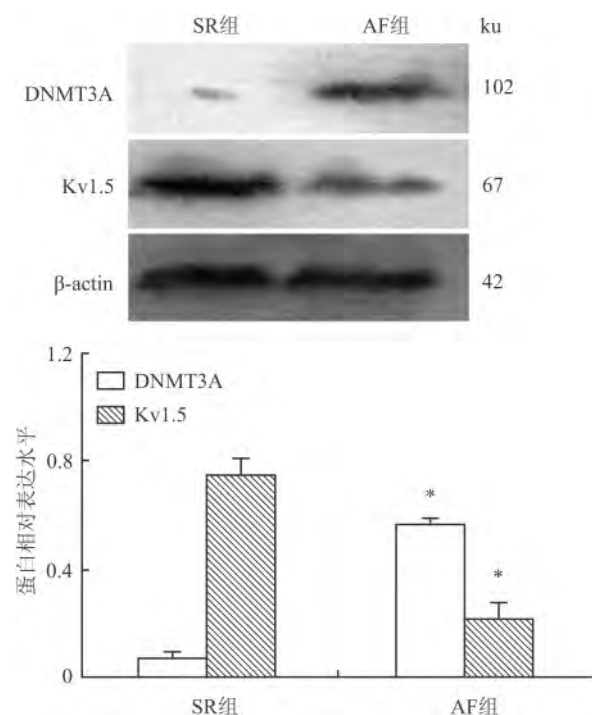


图 2 Western blot 法检测心肌组织中 DNMT3A、Kv1.5 的表达与 SR 组比较: $^{*} P < 0.05$

2.4 DNMT3A 与 Kv1.5 蛋白的相关性分析 AF 发病过程中的 DNMT3A 与离子通道蛋白 Kv1.5 可能存在相互作用, DNMT3A 蛋白水平与 Kv1.5 蛋白水平呈负相关($r = -0.56, P < 0.01$)。

3 讨论

AF 的病理基础主要表现为心房纤维化和心房扩张,常造成明显的血流动力学紊乱和血栓栓塞的发生。 $I_{k_{ui}}$ 是构成心房肌细胞复极化电流的主要成分之一,离子通道的分子基础就是 $Kv1.5$ 钾通道^[1],在心房的复极、ADP 时程中起着重要作用,促进动作电位复极。 $I_{k_{ui}}$ 激活非常快,参与心房复极的 1 相和 2 相。 $I_{k_{ui}}$ 的减弱会引起 APD 和 ERP 的延长,临床上抑制 $Kv1.5$ 钾通道就可以防止房颤发生^[3]。

本研究显示风湿性心脏瓣膜病合并 AF 患者右心耳心房肌组织中 $Kv1.5$ 蛋白表达减少。在慢性心房颤动患者心房肌中外向钾电流密度和 $Kv1.5$ 的表达减少,与相关研究^[4]结果类似。Lai et al^[5]的研究表明,包括 $Kv1.5$ 通道在内的多种钾离子通道基因表达明显降低,并伴有 APD 和 ERP 的延长。

然而,文献^[6]报道 DNA 甲基化参与心肌纤维化及房颤的病理过程。成纤维细胞可能通过增强促纤维化,致使心房纤维化而促进慢性房颤^[7]。本课题组通过分子生物学实验对大鼠心肌纤维化组织中的 DNMT3A 含量进行检测,显示模型组心肌组织中的 DNMT3A 的表达含量明显增高。本研究显示风湿性心脏瓣膜病合并 AF 患者右心耳心房肌组织中 DNMT3A 蛋白表达增加,而风湿性心脏瓣膜病合并 AF 患者右心耳心房肌组织中 $Kv1.5$ 蛋白表达明显减少。在慢性心房颤动患者心房肌中外向钾电流密度和 DNMT3A 的表达增加。

通过分析 DNMT3A 与 $Kv1.5$ 蛋白表达的相互关系,进而初步探究 DNMT3A 在房颤中的作用,房

颤的发生与发展可能与 DNA 甲基化有关,但对于 DNMT3A 究竟在 AF 中起何种作用尚不明确,有待于进一步研究。

综上所述,本实验结果表明房颤中 DNMT3A 含量升高可能参与房颤的形成,其机制可能是通过影响 $Kv1.5$ 基因甲基化水平,进而影响其基因的表达,最终导致房颤的发生发展。

参考文献

- [1] Dorian P. Antiarrhythmic drug therapy of atrial fibrillation: focus on new agents [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2003 8(1): S27-31.
- [2] 汪裕琪,石开虎,吴君旭,等. DNMT3A 和 Hyp 在 ISO 诱导大鼠心肌纤维化中的表达及相关性研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014 49(5): 606-9.
- [3] Bilodeau M T, Trotter B W. $Kv1.5$ blockers for the treatment of atrial fibrillation: approaches to optimization of potency and selectivity and translation to *in vivo* pharmacology [J]. *Curr Top Med Chem* 2009 9(5): 436-51.
- [4] Van Wagoner D R, Pond A L, McCarthy P M, et al. Outward K^+ current densities and $Kv1.5$ expression are reduced in chronic human atrial fibrillation [J]. *Circ Res* 1997 80(6): 772-81.
- [5] Lai L P, Su M J, Lin J L, et al. Changes in the mRNA levels of delayed rectifier potassium channels in human atrial fibrillation [J]. *Cardiology* 1999 92(4): 248-55.
- [6] Jiang J X, Aitken K J, Sotiropoulos C, et al. Phenotypic switching induced by damaged matrix is associated with DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) activity and nuclear localization in smooth muscle cells (SMC) [J]. *PLoS One* 2013 8(8): e69089.
- [7] Xie X, Liu Y, Gao S, et al. Possible involvement of fibrocytes in atrial fibrosis in patients with chronic atrial fibrillation [J]. *Circ J*, 2014 78(2): 338-44.

Study on the expression correlation between DNMT3A and $Kv1.5$ in the patients with rheumatic heart disease and atrial fibrillation

Sui Zhihui^{1,2}, Shi Kaihu^{1,2}, Wu Junxu^{1,2}, et al

(¹Dept of Cardiothoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Cardiovascular Disease Research Center of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression correlation between DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) and rapid delayed rectifier potassium channel ($Kv1.5$) in the patients with rheumatic heart disease and atrial fibrillation (AF). **Methods** Tissues of auricula dextra were removed from 20 patients with rheumatic heart disease undergoing cardiac surgery for correction to valvular defect. According to the definition of AF ($n=10$), 20 patients were divided into groups of AF and of sinus rhythm (SR) ($n=10$). Expressions of DNMT3A and $Kv1.5$ were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Compared with the group of SR, the expression of DNMT3A protein was significantly enhanced ($P<0.05$) whereas $Kv1.5$ decreased ($P<0.05$) in the results by immu-

^{99m}Tc -DTPA 肾动态显像联合尿 β_2 -MG 测定评估 妇科肿瘤患者化疗肾功能损伤的应用价值

胡永全^{1,2} 徐慧琴¹ 赵学峰¹ 汪 会¹ 余永强³

摘要 目的 探讨应用 ^{99m}Tc -亚锡喷替酸(^{99m}Tc -DTPA)肾动态显像测定肾小球滤过率(GFR)、高峰时间(T_b)和半排时间($C_{1/2}$)联合尿 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)含量测定,评估其在妇科肿瘤顺铂(DDP)化疗时肾功能早期损伤的诊断价值。方法 用自身对照法对98例妇科肿瘤患者在首次化疗前与化疗2周期后行 ^{99m}Tc -DTPA肾动态显像,测定GFR、 T_b 、 $C_{1/2}$,同期测定血尿素氮(BUN)、肌酐(SCr)以及血、尿 β_2 -MG含量。应用配对 t 检验对比观察。结果 98例患者化疗2周期后较化疗前GFR明显下降($P < 0.05$),而 T_b 、 $C_{1/2}$ 显著延长($P < 0.01$);尿 β_2 -MG含量明显升高($P < 0.01$),而血中BUN、SCr、 β_2 -MG变化均不明显。结论 与测定血BUN、SCr、 β_2 -MG含量比较, ^{99m}Tc -DTPA肾动态显像测定GFR、 T_b 、 $C_{1/2}$ 及尿 β_2 -MG含量,能发现含DDP化疗患者肾功能早期的损伤,对于临床合理用药、观察和保护肾功能有一定的参考价值。

关键词 ^{99m}Tc -DTPA 肾动态显像; 妇科肿瘤; 顺铂化疗; 肾功能; β_2 -微球蛋白

中图分类号 R 814.7; R 446.11; R 446.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0108-04

2014-09-23 接收

基金项目: 卫生部核医学重点实验室江苏省分子核医学重点实验室
开放课题(编号:KF201301)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹核医学科、³放射科,合肥
230022

²蚌埠医学院第一附属医院核医学科,蚌埠 233004

作者简介: 胡永全,男,主治医师,硕士研究生;

徐慧琴,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: hfxuhuiqin@163.com;

余永强,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: shenyuxi@mail.hf.ah.cn

妇科肿瘤患者术后进行化学治疗是一种非常重要的治疗手段,由于化疗对血管损伤很大,从而影响肾小球及肾小管功能。顺铂(cis-diaminodichloro-platinum, DDP)为最常用而有效的化疗药物。但限制其疗效和剂量的主要因素为肾毒性,有研究^[1]显示其肾毒性发生率为28%~36%。DDP化疗患者肾功能损伤的早期监测是近年来研究热点,如何能及时了解化疗后肾功能损伤情况对进一步的治疗有很重要的临床意义。 ^{99m}Tc -亚锡喷替酸($^{99m}\text{Technetium-diethylene triaminepentaacetic acid}$, ^{99m}Tc -DTPA)肾动态显像是通过观察肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)、高峰时间(apex time, T_b)、半排时间(half excretion time, $C_{1/2}$)等指标了解肾损伤情况,是早期评价肾损伤的灵敏方法。尿 β_2 -微球蛋白(β_2 -microglobulin, β_2 -MG)是反映肾小管功能损伤的检测指标。该研究通过对妇科肿瘤患者术后在DDP化疗前及化疗2周期后患者采用 ^{99m}Tc -DTPA肾动态显像联合尿 β_2 -MG测定,探讨其对妇科肿瘤患者化疗早期肾功能损伤的应用价值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择2011年7月~2013年9月在安徽医科大学第一附属医院核医学科行 ^{99m}Tc -DTPA肾动态显像的妇科肿瘤术后患者,且为首次化疗的患者98例,患者临床诊断均通过术后病理证实。年龄20~50(32.0 ± 10.2)岁,卵巢癌57例、子宫颈癌24例、子宫内膜癌9例、子宫肉瘤6例、卵巢颗粒细胞瘤2例。化疗前进行 ^{99m}Tc -DTPA肾动态显像测定

nohistochemistry. Meanwhile, the results from Western blot also showed increased DNMT3A ($P < 0.05$) and reduced Kv1.5 ($P < 0.05$) in the group of AF. And negative correlation between the expression of DNMT3A and Kv1.5 was shown with correlation analysis ($r = -0.64$, $P < 0.01$). **Conclusion** The negative correlation exists in the expression of DNMT3A and Kv1.5, which indicates that DNMT3A can regulate the expression of Kv1.5.

Key words rheumatic heart disease; atrial fibrillation; DNA methyltransferase; rapid delayed rectifier potassium channel