

本文引用:段长恩,秦卫玲,智明星,等.瑞舒伐他汀对风湿性心脏病伴心房颤动患者心房成纤维细胞体外增殖与凋亡的影响[J].新乡医学院学报,2020,37(6):517-521. DOI:10.7683/xyxyxb.2020.06.003.

【基础研究】

瑞舒伐他汀对风湿性心脏病伴心房颤动患者心房成纤维细胞体外增殖与凋亡的影响

段长恩¹, 秦卫玲², 智明星¹, 郭晓亮³, 周朝元¹, 韩培立¹

(1. 新乡医学院第一附属医院心血管外科, 河南 卫辉 453100; 2. 新乡医学院第三附属医院血液内科, 河南 新乡 453003; 3. 新乡医学院第一附属医院心血管内科, 河南 卫辉 453100)

摘要: **目的** 探讨瑞舒伐他汀对风湿性心脏病伴心房颤动(AF)患者心房成纤维细胞体外增殖与凋亡的影响。**方法** 选择2018年1~12月在新乡医学院第一附属医院心血管外科确诊为风湿性心脏病伴永久性AF患者50例为研究对象,获取患者左心耳组织并应用Massion染色观察其纤维化程度;分离左心耳组织中成纤维细胞,将细胞分为对照组、 10^{-5} mol·L⁻¹瑞舒伐他汀(ROS)组、 10^{-6} mol·L⁻¹ ROS组、 10^{-7} mol·L⁻¹ ROS组、 10^{-5} mol·L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol·L⁻¹焦磷酸法尼酯(FPP)组、 10^{-6} mol·L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol·L⁻¹ FPP组、 10^{-7} mol·L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol·L⁻¹ FPP组,分别加入含对应上述终浓度药物的达尔伯克改良伊格培培养基(DMEM)100 μL,共培养72 h,对照组细胞加入等量含体积分数10%胎牛血清的DMEM。采用3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐法检测各组成纤维细胞的增殖情况,Edu法测各组成纤维细胞DNA合成率,实时荧光定量聚合酶链反应法检测各组成纤维细胞中凋亡相关基因的表达。**结果** 风湿性心脏病伴AF患者左心耳组织出现明显的成纤维细胞增生并伴有部分心肌细胞的凋亡和溶解,胶原容积分数为(10.25±1.10)%。各干预组细胞的增殖能力均低于对照组($P < 0.05$), 10^{-7} mol·L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol·L⁻¹ FPP组、 10^{-6} mol·L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol·L⁻¹ FPP组、 10^{-5} mol·L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol·L⁻¹ FPP组细胞增殖能力均高于对应浓度ROS组($P < 0.05$)。各干预组细胞DNA合成率均低于对照组($P < 0.05$), 10^{-7} mol·L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol·L⁻¹ FPP组、 10^{-6} mol·L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol·L⁻¹ FPP组、 10^{-5} mol·L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol·L⁻¹ FPP组细胞DNA合成率均高于对应浓度ROS组($P < 0.05$)。各干预组细胞抗凋亡基因Bcl-2和凋亡抑制蛋白-1(IAP-1)相对表达量均低于对照组($P < 0.05$),促凋亡基因Bax和Smac相对表达量均高于对照组($P < 0.05$); 10^{-7} mol·L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol·L⁻¹ FPP组、 10^{-6} mol·L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol·L⁻¹ FPP组、 10^{-5} mol·L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol·L⁻¹ FPP组细胞抗凋亡基因Bcl-2和IAP-1的相对表达量均高于对应浓度ROS组($P < 0.05$),促凋亡基因Bax和Smac的相对表达量均低于对应浓度ROS组($P < 0.05$)。**结论** 风湿性心脏病伴AF患者的左心房组织出现明显的纤维化,ROS可以抑制体外培养成纤维细胞的增殖并促进其凋亡。

关键词: 风湿性心脏病;心房颤动;瑞舒伐他汀;增殖;凋亡

中图分类号: R541.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2020)06-0517-05

Effect of rosuvastatin on proliferation and apoptosis of atrial fibroblasts in patients with rheumatic heart disease and atrial fibrillation *in vitro*

DUAN Chang'en¹, QIN Weiling², ZHI Mingxing¹, GUO Xiaoliang³, ZHOU Chaoyuan¹, HAN Peili¹

(1. Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China; 2. Department of Hematopathy, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 3. Department of Cardiovascular Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of rosuvastatin(ROS) on the proliferation and apoptosis of atrial fibroblasts in patients with rheumatic heart disease and atrial fibrillation(AF) *in vitro*. **Methods** Fifty patients with rheumatic heart disease and permanent AF in the Department of Cardiovascular Surgery of the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University from January to December 2018 were selected as the study objects. The left auricular tissue of patients was obtained and the degree of fibrosis was observed by Massion staining. Then the fibroblasts isolated from the left auricular tissue and then were divided into control group, 10^{-5} mol·L⁻¹ ROS, 10^{-6} mol·L⁻¹ ROS group, 10^{-7} mol·L⁻¹ ROS group, 10^{-5} mol·L⁻¹

DOI:10.7683/xyxyxb.2020.06.003

收稿日期:2019-12-12

基金项目:新乡医学院第一附属医院青年基金项目(编号:QN-2017-B005)。

作者简介:段长恩(1978-),男,河南漯河人,硕士,主治医师,研究方向:心血管免疫学诊断及治疗。

ROS + 10^{-5} mol · L⁻¹ farnesyl pyrophosphate (FPP) group, 10^{-6} mol · L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol · L⁻¹ FPP group, 10^{-7} mol · L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol · L⁻¹ FPP group. The cells in above intervention groups were given 100 μL Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing the corresponding final concentration of the above drugs and co-cultured for 72 hours; the cells in control group were given the same volume of DMEM medium containing 10% fetal bovine serum. The proliferation and DNA synthesis of the fibroblasts were measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide and Edu method respectively. The expression of apoptosis related genes were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. **Results** The left auricular tissue of the patients with rheumatic heart disease and permanent AF showed the obvious proliferation of fibroblasts and some cardiac myocytes appeared apoptosis and dissolution. The collagen volume fraction was $(10.25 \pm 1.10)\%$. The proliferation ability of fibroblasts in all intervention groups was lower than that in the control group ($P < 0.05$), the proliferation ability of fibroblasts in 10^{-7} mol · L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol · L⁻¹ FPP group, 10^{-6} mol · L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol · L⁻¹ FPP group, 10^{-5} mol · L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol · L⁻¹ FPP group was higher than that in the corresponding concentration ROS group ($P < 0.05$). The DNA synthesis rate of fibroblasts in all intervention groups was lower than that in the control group ($P < 0.05$), the DNA synthesis rate of fibroblasts in 10^{-7} mol · L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol · L⁻¹ FPP group, 10^{-6} mol · L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol · L⁻¹ FPP group, 10^{-5} mol · L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol · L⁻¹ FPP group was higher than that in the corresponding concentration ROS group ($P < 0.05$). The relative expression of anti-apoptosis genes Bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein 1 (IAP-1) in fibroblasts in all intervention groups was lower than that in the control group ($P < 0.05$), the relative expression of proapoptotic genes Bax and Smac was higher than that in the control group ($P < 0.05$). The relative expression of Bcl-2 and IAP-1 in the 10^{-7} mol · L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol · L⁻¹ FPP group, 10^{-6} mol · L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol · L⁻¹ FPP group, 10^{-5} mol · L⁻¹ ROS + 10^{-5} mol · L⁻¹ FPP group was higher than that in the corresponding concentration ROS group ($P < 0.05$), the relative expression of Bax and Smac was higher than that in the corresponding concentration ROS group ($P < 0.05$). **Conclusion** There is obvious fibrosis in the left atrium tissue of patients with rheumatic heart disease and AF, and the ROS can inhibit the proliferation of fibroblasts and promote its apoptosis.

Key words: rheumatic heart disease; atrial fibrillation; rosuvastatin; proliferation; apoptosis

心房颤动 (atrial fibrillation, AF) 是一种较常见的心律失常类型,也是多种器质性心脏疾病的常见症状之一。心脏结构学和电学重构与 AF 的发生、发展密切相关,患者晚期的心房组织常出现心肌细胞凋亡及细胞外基质纤维化等改变^[1]。他汀类药物是目前临床应用最为广泛的一线降脂药物,主要通过抑制羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶活性而发挥作用,在心脑血管疾病治疗中尤为重要。近年来,越来越多的研究证实,他汀类药物不但具有抗氧化、抗炎、抗血小板功能,同时又具有抑制成纤维细胞增殖、生长及分泌合成等功能,在改善心肌纤维化病变进程中起重要作用^[2-3]。本研究主要探讨瑞舒伐他汀 (rosuvastatin, ROS) 对风湿性心脏病伴 AF 患者左心房成纤维细胞体外增殖及凋亡的影响,以期为该类药物临床治疗药物的选择提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 心脏左心耳组织的获取 选择 2018 年 01 月至 2018 年 12 月在新乡医学院第一附属医院心血管外科确诊为风湿性心脏病伴永久性 AF 患者 50 例为研究对象,入选者均符合 2019 年《欧洲心脏协会房颤指南》的诊断及手术治疗标准,且均需住院治疗并行左心耳切除手术。术中获取患者心脏左心耳组织,无菌磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline,

PBS) 反复冲洗,部分组织采用 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛溶液保存用于组织病理染色,另一部分组织液氮保存用于细胞培养。本研究经医院医学伦理委员会审核通过,并与患者及家属签订知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 ROS 购自上海阿斯利康制药有限公司 (国药准字 J20170008),高糖达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)、胎牛血清、胰蛋白酶和 II 型胶原酶购自美国 Gibco 公司,焦磷酸法尼酯 (farnesyl pyrophosphate, FPP) 购自上海玉博生物科技有限公司,5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, Edu) 细胞增殖检测试剂盒购自广州锐博生物科技股份有限公司,Masson 染色试剂盒购自北京博奥拓达科技有限公司,兔抗人波形蛋白单克隆抗体购自美国 CST 公司,3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐法 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自北京碧云天生物科技有限公司,TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; CO₂ 恒温培养箱购自美国 Thermo 公司,酶标仪购自上海闪谱科技有限公司。

1.3 左心耳组织纤维化程度检测 左心耳组织经

40 g · L⁻¹多聚甲醛充分固定、石蜡包埋及切片后,按照 Masson 染色试剂盒操作说明进行染色。每张切片在无血管区域随机选择 5 个不重复视野(×400),用 Image Proplus 6.0 软件分析胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF), CVF = 胶原组织面积/整个视野面积 × 100%。

1.4 左心耳组织成纤维细胞分离及培养 参考徐忠诚等^[4]方法利用差速贴壁法分离左心耳组织中成纤维细胞。左心耳组织用无菌 PBS 缓冲液反复冲洗并剪碎,依次加入含 0.07 g · L⁻¹胰蛋白酶和 0.04 g · L⁻¹ II 型胶原酶的消化液,37 °C 反复消化,收集组织消化悬液并加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,充分混悬后 3 000 r · min⁻¹离心 10 min,弃上清液,加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37 °C 含体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养 90 min,贴壁细胞即为成纤维细胞,经兔抗人波形蛋白单克隆抗体免疫组织化学鉴定纯度达 95% 以上。所有实验采用第 2 代心脏成纤维细胞,并经血清饥饿 12 h 使其细胞周期一致。

1.5 实验分组及各组处理措施 取对数生长期成纤维细胞接种于 96 孔细胞培养板内(5 × 10⁷ L⁻¹, 每孔 100 μL),置于 37 °C 含体积分数 5% CO₂ 培养箱继续培养,24 h 后吸弃培养基,将细胞分为对照组、10⁻⁵ mol · L⁻¹ ROS 组、10⁻⁶ mol · L⁻¹ ROS 组、10⁻⁷ mol · L⁻¹ ROS 组; 10⁻⁵ mol · L⁻¹ ROS + 10⁻⁵ mol · L⁻¹ FPP 组、10⁻⁶ mol · L⁻¹ ROS + 10⁻⁵ mol · L⁻¹ FPP 组、10⁻⁷ mol · L⁻¹ ROS + 10⁻⁵ mol · L⁻¹ FPP 组,分别加入含对应上述终浓度药物的 DMEM 100 μL,进行共培养 72 h,对照组细胞加入等量含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM。每组设 8 个复孔,取均值。

1.6 MTT 法测成纤维细胞的增殖情况 取“1.5”项中培养的各组细胞,于药物共培养结束前 4 h 时每孔加入 5 g · L⁻¹ MTT 20 μL,置于 37 °C 含体积分数 5% CO₂ 培养箱继续培养 4 h 后终止,吸弃培养基,无菌 PBS 缓冲液冲洗 3 遍,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,充分振荡混匀,酶标仪测 490 nm 波长处吸光度值。吸光度值越大,细胞增殖能力越强。

1.7 Edu 法测成纤维细胞 DNA 合成率 取“1.5”项中培养的各组细胞,严格按照 Edu 试剂盒说明书进行操作。于药物共培养结束前 2 h 每孔加入 100 μL 含 50 μmol Edu 的完全培养液,继续培养 2 h 后吸弃上清液,无菌 PBS 缓冲液反复清洗去除未结合的 Edu 分子,加入 200 μL 40 g · L⁻¹ 多聚甲醛室温固定 30 min,无菌 PBS 缓冲液反复清洗后加入 2 g · L⁻¹ 甘氨酸溶液 50 μL,脱色摇床室温孵育

5 min 后弃去上清液,加入 200 μL 渗透剂(体积分数 0.5% TritonX-100)通透,无菌 PBS 缓冲液清洗后加入 100 μL 1 × Apollo 染色反应液,室温孵育 15 min 后弃去上清液,加入 1 × Hoechst 33342 反应液,室温避光下脱色摇床孵育 30 min 后弃去上清液,无菌 PBS 缓冲液清洗后荧光倒置显微镜下拍摄, Edu 阳性细胞呈红色,计数 Edu 阳性细胞数并计算细胞 DNA 合成率。细胞 DNA 合成率 = Edu 阳性细胞/计数细胞总数 × 100%。

1.8 qRT-PCR 法检测成纤维细胞凋亡相关基因

取“1.5”项中培养 72 h 的各组细胞,无菌 PBS 缓冲液反复清洗后 TRIzol 法提取细胞总 RNA,经紫外分光光度计及琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 合格后备用。按照 qRT-PCR 试剂盒操作说明检测凋亡相关基因表达,采用 20 μL 反应体系进行扩增;扩增条件为:95 °C 预变性 40 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s;共 40 个循环,扩增结束后收集数据进行分析,基因的相对表达采用 2^{-ΔΔCt} 分析。目的基因及内参照磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物序列分别为:Bax(155 bp)上游引物序列为 5'-CCAGGATCGAGCAGGGCGAA-3',下游引物序列为 5'-CGGCGCAATCATCCTCTGC-3'; Bel-2(179 bp)上游引物序列为 5'-GGACGGGGTGAAGTGGGGAG-3',下游引物序列为 5'-CAAAGGCATCCAGCCTCCGTT-3'; 凋亡抑制蛋白-1(inhibitor of apoptosis protein, IAP-1)(151 bp)上游引物序列为 5'-GGCCTCTGGGCAGCAGTTTA-3',下游引物序列为 5'-ACCCATGCACAAAACCTACCTCCCG-3'; Smac(160 bp)上游引物序列为 5'-TTGCCAAGGCCAGGACCTCGT-3',下游引物序列为 5'-GGAGCACGAAGCGCAGCAGC-3'; GAPDH(161 bp)上游引物序列为 5'-GCCGCGC-CCCCGGTTTCTAT-3',下游引物序列为 5'-ACGACCAAATCCGTTGACTCCGAC-3'。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异性比较采用单因素方差分析,计数资料用百分率表示,采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 左心耳组织纤维化程度 结果见图 1。Masson 染色结果显示,风湿性心脏病伴 AF 患者心肌纤维被染为红色,胶原纤维被染成绿色,心肌细胞核变大且排列紊乱,细胞间质出现大量胶原纤维,形成胶原纤维间隔,部分心肌细胞溶解,胶原容积分数为(10.25 ± 1.10)%。

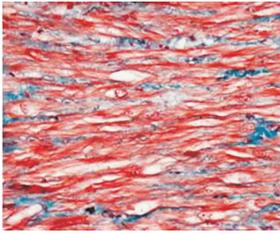


图1 风湿性心脏病伴 AF 患者左心耳组织 (Masson 染色, ×400)

Fig.1 Left atrial tissue of rheumatic fibrillation patient with AF (Masson staining, ×400)

2.2 各组成纤维细胞增殖能力 结果见表1。各干预组细胞增殖能力均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$); $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组、 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组、 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组细胞增殖能力均高于对应浓度 ROS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 各组成纤维细胞增殖能力比较

Tab.1 Comparison of proliferation of fibroblasts in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	吸光度值
空白对照组	8	0.512 ± 0.018
$10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS 组	8	0.449 ± 0.015 ^a
$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS 组	8	0.396 ± 0.013 ^a
$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS 组	8	0.387 ± 0.016 ^a
$10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组	8	0.482 ± 0.024 ^{ab}
$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组	8	0.478 ± 0.027 ^{ab}
$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组	8	0.458 ± 0.022 ^{ab}

注:与空白对照组比较^a $P < 0.05$;与对应浓度 ROS 组比较^b $P < 0.05$ 。

表3 各组成纤维细胞凋亡相关基因表达比较

Tab.3 Comparison of the expression of apoptosis related genes in fibroblasts in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax	Smac	Bcl-2	IAP-1
空白对照组	8	1.27 ± 0.12	1.20 ± 0.11	0.99 ± 0.15	0.98 ± 0.17
$10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS 组	8	1.77 ± 0.15 ^a	1.46 ± 0.17 ^a	0.80 ± 0.13 ^a	0.81 ± 0.10 ^a
$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS 组	8	1.86 ± 0.20 ^a	1.66 ± 0.15 ^a	0.71 ± 0.14 ^a	0.69 ± 0.12 ^a
$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS 组	8	1.97 ± 0.16 ^a	1.91 ± 0.14 ^a	0.63 ± 0.17 ^a	0.58 ± 0.11 ^a
$10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组	8	81.47 ± 0.21 ^{ab}	1.39 ± 0.12 ^{ab}	0.92 ± 0.14 ^{ab}	0.90 ± 0.16 ^{ab}
$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组	8	1.58 ± 0.19 ^{ab}	1.48 ± 0.22 ^{ab}	0.81 ± 0.12 ^{ab}	0.79 ± 0.15 ^{ab}
$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组	8	1.63 ± 0.16 ^{ab}	1.64 ± 0.13 ^{ab}	0.79 ± 0.16 ^{ab}	0.67 ± 0.13 ^{ab}

注:与空白对照组比较^a $P < 0.05$;与对应浓度 ROS 组比较^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

迄今为止,AF 发生的确切机制尚不十分明确,但诸多研究结果均已证实,心房成纤维细胞过度增殖在 AF 的发生、发展过程中起至关重要作用^[5-6]。心房纤维化既是导致 AF 发生的危险因素之一,也是 AF 引发组织结构重构的重要表现,二者相互促进。成纤维细胞过度增殖形成的纤维化分隔不仅会破坏心脏的正常电传导并促进异位起搏点的形成,

2.3 各组成纤维细胞 DNA 合成能力 结果见表2。各干预组细胞的 DNA 合成率均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$); $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组、 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组、 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组细胞 DNA 合成率均高于对应浓度 ROS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 各组成纤维细胞 DNA 合成能力

Tab.2 Comparison of DNA synthesis ability of fibroblasts in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	计数细胞总数	细胞 DNA 合成率/%
空白对照组	8	300	0.667 ± 0.047
$10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS 组	8	300	0.561 ± 0.033 ^a
$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS 组	8	300	0.557 ± 0.043 ^a
$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS 组	8	300	0.524 ± 0.037 ^a
$10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组	8	300	0.597 ± 0.041 ^{ab}
$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组	8	300	0.621 ± 0.051 ^{ab}
$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组	8	300	0.654 ± 0.046 ^{ab}

注:与空白对照组比较^a $P < 0.05$;与对应浓度 ROS 组比较^b $P < 0.05$ 。

2.4 各组成纤维细胞凋亡相关基因表达 结果见表3。各干预组细胞的抗凋亡基因 Bcl-2 和 IAP-1 相对表达量均低于对照组,促凋亡基因 Bax 和 Smac 的相对表达量均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$); $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组、 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组、 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS + $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FPP 组细胞抗凋亡基因 Bcl-2 和 IAP-1 的相对表达量均高于对应浓度 ROS 组,促凋亡基因 Bax 和 Smac 的相对表达量均低于对应浓度 ROS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

还可以导致心肌细胞间正常连接的破坏和细胞凋亡,进而干预生理起搏和传导^[7]。本研究结果也证实了 AF 患者左心耳组织可见大量纤维组织增生和部分正常心肌细胞坏死。

他汀类药物可通过抑制羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶活性减少甲羟戊酸的生物合成,从而降低血清总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的含量。近年来研究证实,他汀类药物具有多种调节血脂以外的药理学作用,如抗炎、抗氧化应激、缩小动脉粥样硬化

斑块、抗血小板聚集和改善内皮细胞功能等,其中以 ROS 的作用最强^[8]。SHIN 等^[9]通过右旋糖酐硫酸钠诱导建立结肠炎大鼠模型,结果证实 ROS 可以有效降低模型大鼠血清中多种炎症因子(白细胞介素-2、4、5、6、12、17)和粒细胞集落刺激因子水平,具有抗氧化应激、抗感染及抗凋亡作用。WANG 等^[10]研究发现,ROS 可以有效改善心肌梗死家兔的心房结构重塑,提高心肌梗死后各项心功能指标。GENG 等^[11]研究表明,ROS 具有抗氧化和上调血管内皮细胞保护因子表达的能力,可以有效保护低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞的损伤。本研究应用 MTT 法测定了 ROS 对风湿性心脏病伴 AF 患者心脏成纤维细胞体外增殖的影响,发现 ROS 可以有效抑制细胞体外增殖,且随着浓度的增加其抑制效果越明显,而羟甲基戊二酰辅酶 A 的激活剂 FFP 则可以拮抗此效用。此外,DNA 的合成发生在细胞分裂间期,是体现细胞增殖能力的另一重要指标,Edu 可以在 DNA 复制过程中很容易地掺入其中,并在细胞核中积累,因此,成纤维细胞的 DNA 合成量更能直接反映细胞的增殖能力^[12]。本研究应用 Edu 法证实 ROS 对风湿性心脏病伴 AF 患者心脏成纤维细胞体外增殖的影响趋势与 MTT 法基本一致。Bcl-2 家族蛋白属于重要的细胞凋亡调节因子,主要通过线粒体途径参与细胞凋亡调控,按照其在凋亡中发挥的作用可以分为细胞凋亡抑制蛋白(Bcl-2 和 Bcl-XL 等)和促凋亡蛋白(Bax 等),它们可以形成同源及异源二聚体,在心房重构和 AF 进展中起着一定作用^[13-14]。Smac 是一种重要的促凋亡蛋白,参与细胞凋亡的下游反应,其高表达可诱导肿瘤细胞凋亡,并增加肿瘤细胞对化学治疗药物的敏感性;IAP 作为一类高度保守的抗凋亡基因表达产物,目前已鉴定 8 种,IAP-1 是 IAP 家族成员之一^[15]。本研究发现,ROS 可以有效抑制抗凋亡基因 Bcl-2 和 IAP-1 的表达,促进凋亡基因 Bax 和 Smac 的表达,进而抑制成纤维细胞的生长增殖。

综上所述,ROS 可以有效抑制风湿性心脏病伴 AF 患者心脏成纤维细胞的体外增殖,诱导凋亡基因的过表达,这些可能是他汀类药物延缓心脏纤维化进程,改善风湿性心脏病伴 AF 患者病情的重要机制之一。

参考文献:

[1] APARINA O P, STUKALOVA O V, PARKHOMENKO D V, et al. Structural and functional properties of the left atrium in healthy

volunteers and patients with atrial fibrillation: data of magnetic resonance imaging[J]. *Kardiologija*, 2018, 57(9): 5-13.

- [2] ABDEEN A, ABOUBAKR M, ELGAZZAR D, et al. Rosuvastatin attenuates piroxicam-mediated gastric ulceration and hepato-renal toxicity in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 895-905.
- [3] EMELYANOVA L, SRA A, SCHMUCKE G, et al. Impact of statins on cellular respiration and de-differentiation of myofibroblasts in human failing hearts[J]. *ESC Heart Fail*, 2019, 6(5): 1027-1040.
- [4] 徐忠诚, 辛俊舟, 吴磊, 等. 病理状态对心肌细胞及心脏成纤维细胞 β_3 -肾上腺素受体表达的影响[J]. *天津医药*, 2019, 47(7): 700-704.
- [5] CHEN J Q, GUO Y S, CHEN Q, et al. TGF β_1 and HGF regulate CTGF expression in human atrial fibroblasts and are involved in atrial remodelling in patients with rheumatic heart disease[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4): 3032-3039.
- [6] GAMBINI E, PERRUCCI G L, BASSETTI B, et al. Preferential myofibroblast differentiation of cardiac mesenchymal progenitor cells in the presence of atrial fibrillation[J]. *Transl Res*, 2018, 192: 54-67.
- [7] 张培德, 李飞, 乔恩, 等. 黏着斑激酶介导信号通路在瓣膜性心房颤动心房纤维化中的研究[J]. *中国胸心外科学杂志*, 2019, 26(4): 379-384.
- [8] 黄永亮, 李恩, 汪涛. 瑞舒伐他汀对心肌梗死后大鼠心肌组织中 α -SMA、TGF- β_1 表达的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2015, 50(2): 232-236.
- [9] SHIN S K, CHO J H, KIM E J, et al. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of rosuvastatin by regulation of oxidative stress in a dextran sulfate sodium-induced colitis model[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(25): 4559-4568.
- [10] WANG W, ZHANG Y, GAO M, et al. Effect of rosuvastatin on atrial structural remodeling in rabbits with myocardial infarction[J]. *Biomed Rep*, 2015, 3(1): 78-82.
- [11] GENG J, XU H, YU X, et al. Rosuvastatin protects against oxidized low density lipoprotein induced endothelial cell injury of atherosclerosis in vitro[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(1): 432-440.
- [12] 王丙剑, 白剑, 孙静娴, 等. EDU 免疫荧光法检测整合素连接激酶(ILK)高表达对新生大鼠心肌细胞 DNA 合成的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(10): 1858-1860.
- [13] DIAO S L, XU H P, ZHANG B, et al. Associations of MMP-2, BAX, and Bcl-2 mRNA and protein expressions with development of atrial fibrillation[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 4(22): 1497-1507.
- [14] 庞若宇, 关美萍, 郑宗基, 等. 二甲双胍对糖基化终末产物诱导的成纤维细胞凋亡及相关蛋白 caspase-3、Bax 及 Bcl-2 表达的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(6): 898-902.
- [15] 崔静, 千新来, 李永真, 等. 钙磷酸蛋白 C 对乳腺癌细胞 MDA-MB-435S 凋亡的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2009, 44(4): 731-735.

(本文编辑:孟月)