

· 论 著 ·

# 风湿性心脏瓣膜病合并心房颤动患者的 DNMT3A 表达与 Hcy 水平

倪世豪<sup>1,2</sup>, 代晨<sup>1,2</sup>, 秦润禾<sup>1,2</sup>, 陶辉<sup>1,2</sup>, 石开虎<sup>1,2</sup>

1. 安徽医科大学第二附属医院心胸外科, 安徽 合肥 230601;

2. 安徽医科大学心血管病研究中心, 安徽 合肥 230601

**摘要:** **目的** 探讨风湿性心脏瓣膜病(风心病)合并心房颤动(AF)患者心肌组织中 DNA 甲基转移酶 3A (DNMT3A)的表达与血清同型半胱氨酸(Hcy)水平。**方法** 以 2016 年 9 月至 2017 年 10 月 22 例风心病接受心脏瓣膜置换手术患者作为研究对象,按照是否合并 AF 分为 AF 组( $n=11$ )和窦性心律(SR)组( $n=11$ )。分析比较两组患者心功能各项指标;分别应用 Western blot 法和免疫组化法检测患者术中切取的右心耳心肌组织中 DNMT3A 蛋白表达水平;ELISA 法检测患者血清中 Hcy 的含量。**结果** Western blot 结果显示,AF 组 DNMT3A 在心肌组织中的表达明显高于 SR 组( $P<0.01$ )。AF 组中 Hcy 含量显著高于 SR 组,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。AF 与 SR 免疫组化结果比较,AF 患者心肌重构明显, DNMT3A 在 AF 组中的阳性表达为 9 例,在 SR 组中的阳性表达为 3 例,两组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。DNMT3A 蛋白与 Hcy 在风心病合并 AF 患者体内的表达呈正相关( $r=0.573, P<0.01$ )。**结论** 心肌组织中 DNMT3A 表达与血清 Hcy 水平在风心病合并 AF 患者中均增加,可能共同参与风心病合并 AF 的发生发展。

**关键词:** 风湿性心脏瓣膜病; 心房颤动; DNA 甲基转移酶 3A; 同型半胱氨酸

**中图分类号:** R 541.2 R 541.7<sup>+</sup>5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2019)05-0593-04

## DNMT3A expression and Hcy level in patients with rheumatic valvular disease complicated with atrial fibrillation

NI Shi-hao\*, DAI Chen, QIN Run-he, TAO Hui, SHI Kai-hu

\* Department of Cardiothoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230601, China

Corresponding author: SHI Kai-hu, E-mail: aytcs@vip.163.com

**Abstract: Objective** To investigate the expression of DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) in myocardium and serum homocysteine (Hcy) levels in patients with rheumatic valvular heart disease (RHD) complicated with atrial fibrillation (AF) underwent. **Methods** Total 22 patients with rheumatic heart disease heart valve replacement surgery from September 2016 to October 2017 were taken as the research objects and were divided into AF group ( $n=11$ ) and sinus rhythm(SR) group ( $n=11$ ). The level of DNMT3A in myocardial tissue were detected by Western Blotting method and immunohistochemical method; serum Hcy level was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The indexes were analyzed and compared between two groups. **Results** Western blot showed that the expression of DNMT3A increased in AF group compared with SR group ( $P<0.01$ ); immunohistochemical results showed that the positive expression rates of DNMT3A increased significantly in AF group compared with SR group; ELISA detection showed that serum Hcy content in AF group was significantly higher than that in SR group ( $P<0.01$ ). The immunohistochemistry results showed that myocardial remodeling was obvious in AF patients. The positive expression of DNMT3A was found in 9 cases in AF group and 3 cases in SR group, and there was significant difference between two groups ( $P<0.05$ ). The correlation analysis showed that there was a positive correlation between DNMT3A and Hcy ( $r=0.573, P<0.01$ ). **Conclusion** The increase of DNMT3A expression and Hcy level in RHD patients complicated with AF may participate in the development of rheumatic heart disease with AF.

**Key words:** Rheumatic valvular heart disease; Atrial fibrillation; DNA methyltransferase 3A; Homocysteine

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81570295); Anhui Science and Technology Research program (1501041148)

风湿性心脏瓣膜病(风心病)合并心房颤动(AF)严重威胁心脏的健康。同型半胱氨酸(Hcy)是体内的一种含硫氨基酸,是甲硫氨酸在体内代谢过程中的中间产物<sup>[1-2]</sup>。文献报道证实 AF 的发生发展可能与 Hcy 水平升高相关<sup>[3]</sup>。Hcy 可通过影响 DNA 甲基化修饰和炎症反应,参与心房的重构,与 AF 的发生发展及维持、预后、复发密切相关<sup>[4]</sup>。DNA 甲基转移酶 3A (DNA methyltransferase 3A, DNMT3A) 是 DNA 甲基化的催化酶,本课题组前期研究显示, DNMT3A 在 AF 发生发展过程中起重要作用<sup>[5]</sup>。本研究通过探究 DNMT3A 和 Hcy 在风心病合并 AF 患者和窦性心律(SR)患者中的变化,进一步揭示二者的相关性以及对风心病合并 AF 发生发展的影响,进而发现并探讨风心病患者 AF 发生与维持的可能机制,为在临床上更好地防治 AF 提供相关理论参考。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 9 月至 2017 年 10 月在安徽医科大学第二附属医院因风心病行瓣膜置换手术的患者 22 例,排除合并糖尿病、心绞痛、高血压和慢性肾功能不全者。根据 AF 的定义及是否合并 AF 分为 AF 组和窦性心律(SR)组。AF 组 11 例,男性 4 例,女性 7 例,年龄 59~73(64.09±5.11)岁;术前 NYHA 分级 I 级 0 例, II 级 3 例, III 级 3 例, IV 级 5 例;SR 组 11 例,男性 5 例,女性 6 例,年龄 44~69(55.91±7.48)岁;术前 NYHA 分级 I 级 2 例, II 级 5 例, III 级 4 例。

1.2 仪器与主要试剂 Tanon EPS300 电泳机(上海天能科技,中国);分光光度仪(Implen Gmb H 公司,德国);TU-100 恒温金属浴(上海一恒科技,中国);Eppendorf 22331 Hamburg 离心机(艾本德公司,德国);山羊抗兔 IgG(武汉博士德生物工程);人 DNMT3A 抗体(Usen 公司);Western 一抗稀释液(碧云天股份);Western 二抗稀释液(碧云天股份);RIPA 裂解液(碧云天股份);Tris-HCL, pH 8.8 Tris-HCL, pH 6.8(碧云天股份);Hcy 酶循环法检测试剂盒(强生集团有限公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 心脏彩超检查 术前患者常规予以心脏彩超检查。仪器:MYLAB 50 频率 3.5 MHz。记录反映心功能的有关参数:左室射血分数(LVEF)、左房内径(LAD)、左室舒张末期直径(LVDD)、右房内径

(RAD)、右室内径(RVD)。

1.3.2 Western blot 实验 取患者离体手术中切除的右心耳心肌组织 0.1 g,加入 1 ml 总蛋白提取液,分别进行匀浆、裂解、离心,即得总蛋白提取液,将提取液置于 -80 °C 冰箱保存备用;蛋白电泳:采用 5% 积层胶和 12% 分离胶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)系统;转膜:300 mA 恒电流持续转膜 2 h;印迹:洗膜;一抗工作液,在 37 °C 恒温箱孵育过夜,洗膜;二抗工作液,37 °C 恒温箱孵育 2 h,洗膜;洗片:将 A 和 B 发光液按照相等体积混合滴于聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,进行压片、曝光、定影;蛋白半定量检测:图像获取采用 Lab Works4.5, DNMT3A (102 ku) 的积分光密度 (integral optical density, IOD) 值测定采用分析系统软件,选取  $\beta$ -actin 蛋白作为内参,每个样品均同时检测  $\beta$ -actin 蛋白条带的 IOD 值,并计算 DNMT3A 的相对表达量,相对表达量以  $IOD_{DNMT3A}/IOD_{\beta-actin}$  表示。观察 DNMT3A 在 AF 组和 SR 组中的表达,实验重复 3 次。

1.3.3 免疫组化实验 取离体心肌组织,常规石蜡包埋处理,制成厚度 5  $\mu$ m 切片,脱蜡至水;室温下用 3%  $H_2O_2$  孵育 25 min,进而阻断内源性过氧化物酶;抗原采用微波修复;加入 1:100 稀释一抗(DNMT3A),4 °C 湿盒中过夜;生物素化山羊抗兔 IgG 1:100 稀释,37 °C 恒温箱孵育 25 min;DAB 显色:试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴加入 1 ml 蒸馏水中,溶液混匀后加至切片,室温下显色,在镜下控制反应时间 5 min,显色过后阳性细胞的细胞质出现棕黄色颗粒;苏木精轻度复染细胞核;采用脱水、透明、中性的树胶封片;图像扫描软件计算阳性细胞的个数,计算阳性细胞在视野中所占的比例。图像分析采用 Image Pro plus 6.0 图像扫描软件。

1.3.4 ELISA 法检测血清中 Hcy 的表达水平变化 取所收集病例的血清,(1)加样:酶标板中各加入标准品、待测样品 100  $\mu$ l,覆膜覆盖,37 °C 温育 30 min;(2)加入试剂 A:弃去孔内液体,每孔中各加入试剂 A 100  $\mu$ l,标板加上覆膜,37 °C 温育 1 h;(3)洗涤:弃去孔内液体,350  $\mu$ l 洗涤液洗涤各孔,浸泡 1~2 min,弃去孔内液体,保持孔内干燥,如此重复 5 次;(4)加入试剂 B:每孔中各加入试剂 B 100  $\mu$ l,标板加上覆膜,37 °C 温育 30 min;(5)洗涤:重复步骤 3;(6)显色:底物溶液 90  $\mu$ l 加入各孔,覆膜覆盖标板,在 37 °C 条件下避光显色 10~15 min;(7)终止:终止溶液 50  $\mu$ l 加

入各孔终止反应,此时溶液由蓝色转为黄色。终止液的加入顺序需和底物溶液的加入顺序相同,在确保酶标板底无水滴及孔内无气 15 min 内,用酶标仪在 450 nm 波长测定各孔的吸光度值,计算 Hcy 血清含量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析。计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用成组 *t* 检验;使用 Pearson 相关进行相关性分析。 $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

2.1 基本资料 AF 组患者年龄大于 SR 组,病程长于 SR 组;LAD、RAD、LVDD 值大于 SR 组,LVEF 值低于 SR 组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 1。

2.2 Western blot 实验结果 用各组右心耳心房肌组织块提取的蛋白进行 Western blot 实验,以  $\beta$ -actin

为内参,AF 组 DNMT3A 在心肌组织中的相对表达量明显高于 SR 组( $P < 0.01$ )。见表 1、图 1。

2.3 Hcy 含量的测定 ELISA 法分析 AF 组和 SR 组血清中的 Hcy 含量,结果显示,AF 组 Hcy 含量为  $(19.72 \pm 1.21) \mu\text{mol/L}$ ,SR 组 Hcy 含量为  $(7.50 \pm 0.23) \mu\text{mol/L}$ ,AF 组中 Hcy 含量显著高于 SR 组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 2。

2.4 免疫组化实验结果 AF 与 SR 免疫组化结果比较,AF 患者心肌重构明显,见图 2。DNMT3A 在 AF 组中的阳性表达为 9 例,而在 SR 组中的阳性表达为 3 例。两组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.5 DNMT3A 和 Hcy 的相关性分析 AF 患者体内的 DNMT3A 与 Hcy 可能存在相互作用,DNMT3A 蛋白表达与 Hcy 水平在风心病合并 AF 患者体内呈正相关( $r = 0.573, P < 0.01$ )。

表 1 患者心功能各项指标对比 ( $n = 11, \bar{x} \pm s$ )

组别	年龄(岁)	病程(年)	LAD(mm)	RAD(mm)	LVDD(mm)	RVD(mm)	LVEF
AF 组	64.09 ± 5.11	13.09 ± 4.41	52.18 ± 2.71	44.27 ± 5.46	55.45 ± 8.03	22.73 ± 3.00	55.64 ± 4.43
SR 组	55.91 ± 7.48	8.18 ± 2.89	43.45 ± 9.16	36.64 ± 6.56	45.27 ± 5.27	20.45 ± 3.05	60.64 ± 3.67
<i>t</i> 值	2.997	3.085	3.030	2.967	3.515	1.762	2.882
<i>P</i> 值	0.007	0.006	0.007	0.008	0.002	0.09	0.009

表 2 两组 DNMT3A 相对表达量和血清 Hcy 水平 ( $n = 11, \bar{x} \pm s$ )

组别	DNMT3A	Hcy( $\mu\text{mol/L}$ )
SR 组	1.021 ± 0.061	7.50 ± 0.23
AF 组	1.762 ± 0.157	19.72 ± 1.21
<i>t</i> 值	14.951	32.906
<i>P</i> 值	0.000	0.000

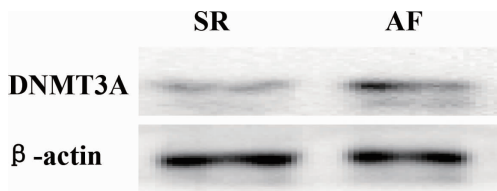


图 1 Western blot 检测 DNMT3A 的蛋白表达量

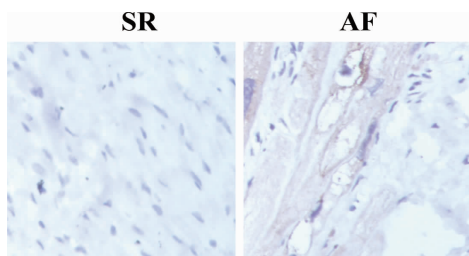


图 2 免疫组织化学法检测 DNMT3A 蛋白表达情况 (免疫组化,  $\times 400$ )

## 3 讨论

本研究根据 AF 定义将临床收集的病例分为 AF

组和 SR 组。通过对比分析可知,风心病合并 AF 患者血清中 Hcy 水平增加,同时测得在 AF 组心肌组织中 DNMT3A 表达增加,这与之前本课题组的研究结果相符<sup>[5]</sup>。相关性分析表明在 AF 组中 DNMT3A 表达和 Hcy 水平呈正相关。

目前普遍的共识是心肌纤维化导致 AF,其病理学基础就是心房重构。Tao 等<sup>[6]</sup>研究发现 DNA 甲基化在维持心脏纤维化的过程中起重要作用,表明 DNA 甲基化和 AF 的发生发展密切相关。DNA 甲基化失调可能与 AF 的发病机制有关,在 AF 中 DNMT 系列可能起重要作用,为 AF 患者提供潜在的预防和治疗策略<sup>[7]</sup>。

Hcy 是一种含硫氨基酸,其与高血压、冠脉疾病、AF、糖尿病密切相关<sup>[1-2,8-9]</sup>。有文献证明 Hcy 可能是 AF 的新风险标志<sup>[10]</sup>。Yao 等<sup>[11]</sup>的研究显示,Hcy 在 AF 患者术后复发中的血清中含量明显增加;而 Law 等<sup>[12]</sup>对相关实验的研究显示,高水平 Hcy 会改变心房细胞中超快速钾通道,其中包括向内整流钾通道和瞬时外向钾电流通道,这些离子通道的改变最终导致心房电重构,从而引起 AF 发生。本研究显示风心病合并 AF 患者 Hcy 含量增加,因此被证实是 AF 的重要影响因子。

本研究结果表明,风心病合并 AF 患者右心耳组

织 DNMT3A 相对表达量较 SR 组增加,而 Hcy 在风心病合并 AF 患者血清中的含量较 SR 组明显增加,从而进一步证实了 DNMT3A 与 Hcy 对 AF 的影响。

通过分析对比 AF 组与 SR 组中 DNMT3A 与 Hcy 的相互关系,可以得知 DNMT3A 对 AF 的作用,可能是通过 DNA 甲基化参与 AF 的发生与发展。关于 DNMT3A 及 Hcy 如何导致 AF,具体的病理机制有待进一步研究。

综上所述,心房肌组织中 DNMT3A 表达及血清中 Hcy 含量增多可能参与心肌纤维化的病理过程,其机制可能是改变 DNA 甲基化和氧化应激反应使心房肌组织发生相应的结构重构及电生理重构,最终导致 AF 的发生发展,这一结论或可为临床上对 AF 的预防及治疗提供新思路。

#### 参考文献

[1] Han LY, Wu QH, Wang CY, et al. Homocysteine, ischemic stroke, and coronary heart disease in hypertensive patients [J]. *Stroke*, 2015, 46(7):1777-1786.

[2] Nowak M, Świetochowska E, Wielkoszyński T, et al. Homocysteine, vitamin B12, and folic acid in age-related macular degeneration [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2005, 15(6):764-767.

[3] Yao Y, Yao W, Bai R, et al. Plasma homocysteine levels predict early recurrence after catheter ablation of persistent atrial fibrillation [J]. *Europace*, 2017, 19(1):66-71.

[4] 韦怡春,黄朝发,李菊香.同型半胱氨酸与心房颤动的研究进展 [J]. *中华心血管病杂志*, 2017, 45(6):550-552.

[5] 杨健康,石开虎,陶辉,等. DNMT3A 与 CTGF 在 AAC 致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*, 2017, 52(9):1302-1305.

[6] Tao H, Shi KH, Yang JJ, et al. Epigenetic mechanisms in atrial fibrillation: New insights and future directions [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2016, 26(4):306-318.

[7] Shen KJ, Tu T, Yuan ZS, et al. DNA methylation dysregulations in valvular atrial fibrillation [J]. *Clin Cardiol*, 2017, 40(9):686-691.

[8] Fromonot J, Deharo P, Bruzzese L, et al. Adenosine plasma level correlates with homocysteine and uric acid concentrations in patients with coronary artery disease [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(3):272-277.

[9] Gong T, Wang J, Yang M, et al. Serum homocysteine level and gestational diabetes mellitus: a meta-analysis [J]. *J Diabetes Investig*, 2016, 7(4):622-628.

[10] Kubota Y, Alonso A, Heckbert SR, et al. Homocysteine and incident atrial fibrillation: the atherosclerosis risk in communities study and the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. *Heart Lung Circ*, 2018 Mar 21. [Epub ahead of print]

[11] Yao Y, Yao W, Bai R, et al. Plasma homocysteine levels predict early recurrence after catheter ablation of persistent atrial fibrillation [J]. *Europace*, 2017, 19(1):66-71.

[12] Law P, Kharche S, Stott J, et al. Effects of elevated Homocysteine hormone on electrical activity in the human atrium: a simulation study [J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2009, 2009:3936-3939.

收稿日期:2018-10-28 修回日期:2018-11-04 编辑:周永彬

(上接第 592 页)

[7] Aggarwal R, Soni BK, Kumar JU, et al. MR fistulography with percutaneous instillation of aqueous jelly: a cost effective technique innovation [J]. *Indian J Radiol Imaging*, 2017, 27(2):161-166.

[8] 张学诚,张力方.经肛门内外括约肌间引流治疗高位肛周脓肿疗效观察 [J]. *海南医学*, 2016, 27(22):3746-3747.

[9] 杨军,沈文龙.内口清除肌间置管对口引流术治疗高位肛周脓肿 68 例临床观察 [J]. *结直肠肛门外科*, 2017, 23(3):390-392.

[10] 陈若愚,庄华章,李家冰,等.负压封闭引流治疗高位肛周脓肿的临床研究 [J]. *中国现代普通外科进展*, 2017, 20(6):471-473.

[11] 汪朋珍,曾燕荣.高频线阵及经直肠腔内超声在判断肛周脓肿内口和分型中的价值 [J]. *结直肠肛门外科*, 2018, 24(1):71-74.

[12] 郑磊,韩碧波,魏海东,等.术后肛周感染患者行经直肠腔内超声三维成像诊断的临床评价 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27

(8):1818-1820,1848.

[13] 林家东,王豫平,卢志娟,等.360°环阵经直肠腔内超声对肛瘘的价值 [J]. *医学影像学杂志*, 2016, 26(5):878-880,898.

[14] 葛士骧,杜联芳,马静.经直肠联合体表超声在肛周疾病的诊断价值 [J]. *中国超声医学杂志*, 2016, 32(10):937-941.

[15] Iesalnieks I, Hoene M, Bittermann T, et al. Mechanical bowel preparation (MBP) prior to elective colorectal resections in crohn's disease patients [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(4):908-915.

[16] 莫泽来,卢海兰,吕立威,等.联合应用高频浅表小器官及腔内探头对肛周脓肿的超声诊断 [J]. *中国地方病防治杂志*, 2017, 32(7):834.

收稿日期:2018-11-18 修回日期:2018-12-20 编辑:王国品