

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.017

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.017

## 风湿性二尖瓣狭窄患者心肌 LKB1/AMPK 通路 与心房颤动的相关性

杨彩英<sup>1</sup>, 张晓军<sup>2</sup>, 申春红<sup>1</sup>, 张春丽<sup>1</sup>, 刘春玲<sup>3</sup>

(1. 唐山市玉田县医院中医病房, 河北 唐山 064100; 2. 唐山市玉田县医院普外科, 河北 唐山 064100;  
3. 唐山市人民医院病理科, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** 目的: 探讨风湿性心脏病二尖瓣狭窄患者肝激酶B1/丝裂原活化蛋白激酶(liver kinase B1/AMP-activated protein kinase, LKB1/AMPK)通路 与伴发心房颤动(atrial fibrillation, AF)的关系。方法: 选择2011年12月至2016年12月行换瓣手术治疗的风心病二尖瓣狭窄患者40例, 根据病史和术前心电图记录分为房颤组(AF组,  $n=20$ )和窦性心律(sinus rhythm, SR)组(SR组,  $n=20$ ), 术前抽取空腹静脉血检测生化指标, 术中留取左心耳组织。ELISA法测定血清超敏C反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)及硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)的水平。实时定量PCR(quantitative real-time PCR, RT-PCR)法检测左心耳组织中LKB1和AMPK的mRNA水平。采用Pearson相关分析检测LKB1与各指标的相关性。结果: 与SR组相比, AF组患者左心耳组织中LKB1及AMPK的mRNA水平明显减低(均 $P<0.05$ ); 血清中hs-CRP及TRX水平显著高于SR组(均 $P<0.05$ )。Pearson相关分析提示LKB1与AMPK呈正相关( $r=0.373$ ,  $P<0.05$ ), 与hs-CRP, TRX呈负相关( $r=-0.546$ ,  $-0.417$ , 均 $P<0.05$ ) 结论: LKB1/AMPK通路可通过炎症及氧化应激机制触发和维持AF。

**[关键词]** 风湿性心脏病二尖瓣狭窄; 心房颤动; 肝激酶B1; 丝裂原活化蛋白激酶; 炎症; 氧化应激

## Correlation between LKB1/AMPK pathway and atrial fibrillation in patients with mitral stenosis of rheumatic heart disease

YANG Caiying<sup>1</sup>, ZHANG Xiaojun<sup>2</sup>, SHEN Chunhong<sup>1</sup>, ZHANG Chunli<sup>1</sup>, LIU Chunling<sup>3</sup>

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Yutian County Hospital, Tangshan Hebei 064100; 2. Department of General Surgery, Yutian County Hospital, Tangshan Hebei 064100; 3. Department of Pathology, Tangshan People's Hospital, Tangshan Hebei 063000, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the correlation between the liver kinaseB1/AMP-activated protein kinase pathway (LKB1/AMPK pathway) and atrial fibrillation (AF) in patients with mitral stenosis of rheumatic heart disease (RHD). **Methods:** A total of 40 patients with RHD who underwent valve replacement surgery were enrolled, including 20 with persistent AF and 20 with sinus rhythm (SR). Peripheral venous blood samples were taken before surgery and cardiac muscle tissue were taken from the right atrial appendages during surgery. ELISA was

收稿日期 (Date of reception): 2018-03-23

通信作者 (Corresponding author): 刘春玲, Email: lcl.1983.hi@163.com

used to exam the level of hypersensitive C-reactive protein (hs-CRP) and thioredoxin (RTX) in peripheral venous blood. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to analyze the expressions of LKB1 and AMPK in the 40 patients. The correlation between AMPK, hs-CRP, RTX and LKB1 were analysed. **Results:** Compared with SR group, mRNA levels of LKB1 and AMPK were elevated in cardiac tissues from AF patients ( $P<0.05$ ). The level of hs-CRP and RTX were also elevated in AF patients. Pearson correlation analysis showed that LKB1 was positively correlated with AMPK ( $r=0.373$ ,  $P<0.05$ ), and negatively correlation with hs-CRP, TRX ( $r=-0.546$ ,  $-0.417$ , all  $P<0.05$ ). **Conclusion:** LKB1/MAPK pathway may play an important role in the initiation and progression of AF through inflammation and oxidative stress.

**Keywords** mitral stenosis of rheumatic heart disease; atrial fibrillation; liver kinase B1; AMP-activated protein kinase; inflammation; oxidative stress

心房颤动(atrial fibrillation, AF)是风湿性二尖瓣狭窄最常见的心律失常,可引起心衰加重、脑卒中及周围血管栓塞等严重并发症,具有极高的致残率、致死率及复发住院率<sup>[1]</sup>。目前临床上对AF的触发、维持机制尚缺乏了解,一般的药物治疗对AF疗效甚微,往往还会导致新的心律失常发生。因此,寻找心律失常的发病机制对增加抗心律失常药物有效性、安全性具有重要意义<sup>[2-3]</sup>。Ozcan等<sup>[4]</sup>在转基因鼠的AF模型中发现:肝激酶B1/丝裂原活化蛋白激酶(liver kinase B1/AMP-activated protein kinase, LKB1/AMPK)通路在AF的发生、发展中具有重要作用。但目前尚无LKB1/AMPK通路在AF人群中的相关报道。本研究通过分析风心病二尖瓣狭窄患者心肌中LKB1及AMPK mRNA的表达情况,分析其与AF发生的相关性,探讨其可能的作用机制,为开发新的抗AF药物提供理论依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

选择2011年12月至2016年12月在唐山市人民医院行换瓣手术治疗的风心病二尖瓣狭窄患者40例,其中男21例,女19例,年龄( $48.32\pm 9.62$ )岁。依据病史和术前心电图记录分为2组:房颤组(AF组,AF持续6个月以上)20例,窦性心律(sinus rhythm, SR)组20例。排除标准:各种感染性疾病、免疫系统疾病、严重肝肾功能不全;肿瘤;原发性高血压;糖尿病;急性冠脉综合征发病3个月内;患者入院后均调整心功能,按纽约心脏协会(New York Heart Association, NYHA)心功能分级为I~II级。术前抽取患者空腹血检测生化指标包括白细胞(white blood cell, WBC)计数、中性

粒细胞(neutrophils, NE)计数、空腹血糖(fasting blood-glucose, FBG)、三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白-胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)。ELISA法检测心肌中超敏C反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)及硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)水平。本研究经唐山市人民医院医学伦理委员会审核批准,患者均签署知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 主要试剂与仪器

TRIzol, PCR反转录试剂盒购自日本TaKaRa公司;PCR引物序列均由上海英潍捷基贸易有限公司合成;DEPC水、异丙醇等试剂由唐山市人民医院中心实验室提供;PCR仪购自美国Perkin-Elmer公司。ELISA试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司。

#### 1.2.2 RNA样品的制备

使用TRIzol试剂提取左心耳组织中RNA,按照厂商提供的操作说明进行,所用的试剂、枪头需提前进行去除RNA酶处理。提取组织RNA具体操作步骤如下:1)称量约50 mg左心耳组织标本置于盛有液氮研钵中研磨成细末状,加入1 mL预冷的TRIzol试剂,使核酸蛋白复合体充分解离。2)加入200  $\mu$ L氯仿,剧烈震荡15 s后室温静置2~3 min。4  $^{\circ}$ C下12 000 r/min离心15 min,轻轻吸取上层水相,并转移至新的去RNA酶处理过的1.5 mL EP管中。加入500  $\mu$ L异丙醇。室温静置10 min后于4  $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心10 min,倒掉管中液体,加入1 mL 75%乙醇溶液,颠倒混匀后于4  $^{\circ}$ C 7 500 r/min离心5 min,倒掉液体,共洗涤2次。3)待沉淀物干燥后,加入DEPC处理的去离子水20  $\mu$ L,吹吸混

匀。4)使用ND-1000分光光度计测定提取RNA在260 nm和280 nm的吸光度值(A值),  $A_{260}/A_{280}$ 比值在1.8~2.0之间为纯的RNA, 记录RNA的浓度和纯度。将RNA溶液保存于-80 °C备用。

### 1.2.3 实时定量 PCR

按照SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR反转录试剂盒说明将RNA反转为cDNA, 按SYBR Premix Ex Taq™II (Tli RNaseH Plus)试剂盒说明书进行配液及反应: 20 μL反应体系中SYBR Premix Ex Taq™ II 10 μL, 上下游引物分别为0.8 μL, ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL, cDNA 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 6 μL。检测LKB1的引物序列为5'-CTGGGGTCACCCTCTACAA-3'和5'-ACTCAAGCATCCCTTTCAGC-3'; 检测AMPK的引物序列为5'-ACCAGCTTGCAGTGTTGGTGAA-3'和5'-CAGTGCATCCAATGGACATC-3'。以GADPH为内参, GADPH的引物序列为5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3'和5'-GCTCCTGGAAGATGGTGATG-3'。PCR反应条件为: 95 °C预变性30 s, 然后95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40个循环。每个标本中mRNA含量是指其与同标本中GAPDH的相对量, 由公式 $2^{-\Delta Ct}$ 计算获得。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS17.0统计软件进行数据分析, 所有计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两样本均数比较采用t检验, 相关分析采用Pearson相关分析。P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般临床资料比较

与SR组相比, AF组心率较快, 差异有统计学意义(P<0.05); 2组间性别、年龄、吸烟饮酒史、收缩压及舒张压差异均无统计学意义(均P>0.05)。2组间FBG, TC, TG, LDL-C, WBC及NE差异均无统计学意义(均P>0.05, 表1)。

### 2.2 血清中 hs-CRP 及 TRX 水平比较

与SR组相比, AF组中hs-CRP及TRX水平显著高于SR组, 差异有统计学意义(均P<0.05, 表2)。

### 2.3 心肌组织中 LKB1 及 AMPK mRNA 表达水平

AF组中LKB1及AMPK mRNA的表达水平均低于SR组, 差异有统计学意义(均P<0.05, 表3)。

表1 两组临床基本资料比较(n=20)

Table 1 Comparison of the basic clinical data between the 2 groups (n=20)

临床基本资料	AF组	SR组	P
性别(男/女)	10/10	11/9	0.69
年龄/岁	48.06 ± 9.75	46.09 ± 11.03	0.56
吸烟史/[例(%)]	8 (40)	4 (20)	0.22
饮酒史/[例(%)]	3 (15)	1 (5)	0.28
收缩压/mmHg	118.65 ± 10.98	121.07 ± 14.21	0.45
舒张压/mmHg	73.27 ± 8.84	71.82 ± 10.23	0.83
心率/min <sup>-1</sup>	96.89 ± 22.18	73.65 ± 10.83	0.02
FBG/(mmol·L <sup>-1</sup> )	4.71 ± 0.98	4.50 ± 1.29	0.53
TG/(mmol·L <sup>-1</sup> )	5.82 ± 0.69	5.68 ± 0.83	0.81
TC/(mmol·L <sup>-1</sup> )	1.41 ± 0.22	1.35 ± 0.30	0.27
LDL-C/(mmol·L <sup>-1</sup> )	2.94 ± 0.74	2.82 ± 0.67	0.73
WBC/×10 <sup>9</sup>	6.32 ± 1.42	6.05 ± 1.37	0.32
N/×10 <sup>9</sup>	3.98 ± 1.22	4.04 ± 1.47	0.19

1 mmHg=0.133 kPa.

表2 两组hs-CRP与TRX水平的比较( $n=20$ ,  $\bar{x}\pm s$ )Table 2 Comparison of the levels of hs-CRP and TRX between the 2 groups ( $n=20$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	hs-CRP/(mg·L <sup>-1</sup> )	TRX/(ng·L <sup>-1</sup> )
AF组	4.58 ± 1.87	85.5 ± 12.72
SR组	1.42 ± 0.91	60.9 ± 10.78
P	0.008	0.023

表3 心肌组织中LKB1及AMPK的mRNA表达( $n=20$ ,  $\bar{x}\pm s$ )Table 3 mRNA expression of LKB1 and AMPK in myocardial tissues ( $n=20$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	LKB1	AMPK
AF组	0.074 ± 0.008	0.019 ± 0.005
SR组	0.105 ± 0.006	0.077 ± 0.011
P	0.023	0.004

## 2.4 相关分析结果

Pearson相关分析结果显示: LKB1与AMPK呈正相关( $r=0.373$ ,  $P<0.05$ ); LKB1与hs-CRP及TRX呈负相关( $r=-0.546$ ,  $-0.417$ , 均 $P<0.05$ )。

## 3 讨论

AF是临床上最为常见的一种心律失常, 随着人口老龄化, 其患病率也逐年增加, 但其发生机制目前尚不明确。近年来研究<sup>[1]</sup>显示炎症和氧化应激在AF的发生、发展中起重要作用。

CRP是肝脏合成的一种急性时相反应蛋白, 可反映炎症发生的程度<sup>[5]</sup>, 而hs-CRP在反应局部炎症程度方面较CRP具有更高的敏感性和精确性, 被认为是炎症标志物之一, 目前已有多篇临床研究<sup>[6-7]</sup>提示AF患者的炎症指标高于非AF患者。Acevedo等<sup>[8]</sup>研究发现: 能转律的阵发性AF患者CRP水平明显低于不能转律者, 且1年中恢复为SR者的CRP水平低于仍未转律为SR者, 提示炎症可能在AF的发生和维持中发挥重要作用。在本研究中, AF组患者血液中hs-CRP水平明显高于SR组, 与上述研究结果相一致, 进一步证实了炎症在风心病二尖瓣狭窄患者AF发生中的重要作用。

TRX是人体内重要的氧化还原调节蛋白, 具有抗氧化、抗凋亡、调节蛋白质的亚硝基化、调节基因表达及类趋化因子、细胞因子活性、直接

清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等自由基等多种作用, 已成为氧化应激的一个重要指标, 提示TRX与AF的发生密切相关<sup>[9-10]</sup>。本研究结果亦显示AF组血清中TRX明显升高, 提示AF患者存在氧化应激。

AMPK可通过调节下游通路使能量利用率增加、降低能量消耗来维持细胞的能量平衡, 促进氧化代谢过程, 是细胞能量平衡的重要感受器<sup>[11]</sup>。LKB1是AMPK的重要的上游激酶, 可磷酸化AMPK 172位苏氨酸进而激活AMPK, 其表达缺失会限制AMPK的激活<sup>[12]</sup>。既往研究<sup>[13]</sup>发现: 持续性AF患者AMPK磷酸化水平降低, 提示AMPK172位磷酸化可能是AF发生的重要机制。本研究结果显示: LKB1及AMPK在AF组中的mRNA表达水平明显低于SR组, 且进一步的相关性分析显示LKB1与AMPK水平呈正相关, 与上述结论相符, 提示AMPK磷酸化降低在AF发生中可发挥重要作用, 推测LKB1/AMPK通路下调表达可诱发AF的发生。此外, LKB1表达水平还与血清中hs-CRP及TRX呈负相关, 提示LKB1/AMPK通路可能通过影响炎症及氧化应激过程进而触发和维持AF的发生、发展。

众所周知, 线粒体或AMPK调控的心肌能量代谢过程在心肌结构重构和电重构中至关重要, 而心肌的结构重构及电重构正是AF的发生和维持的基础机制, 因此心肌细胞能量代谢过程在AF的触发和维持方面也具有重要作用<sup>[4]</sup>。推测下调LKB1/AMPK通路诱发AF的可能机制为: LKB1/AMPK通路表达减低可造成细胞损伤, 产生血管炎性改变, 而炎症炎症可造成心肌的缺血缺氧, 细胞内Ca<sup>2+</sup>超载, 进而产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)及自由基, 线粒体是ROS的主要产生场所, 也是ROS损伤的主要靶器官。线粒体功能受损, 导致ROS和自由基大量生成, 又造成了线粒体DNA的损伤, 使呼吸链功能不全, 进一步加重ROS和自由基的产生, 形成了氧化应激的恶性循环, 最终造成心房肌电生理及细胞结构的改变, 进而促进AF的发生和维持<sup>[14]</sup>。

本研究也存在一定的局限性: 本研究只分析了LKB1/AMPK通路与AF的相关性, 并不能排除其他细胞能量代谢通路基因对AF发生的影响; 此外, 由于目前实验手段的限制, 得到的结论只能间接证实LKB1/AMPK信号通路与AF发生发展存在关联, 尚需新的研究手段及研究策略证实该通路与AF相关的直接证据。

综上所述, 本研究通过分析AF患者中LKB1/AMPK通路的表达及血浆中hs-CRP和TRX的表达水

平, 推测 LKB1/AMPK 通路可能通过炎症及氧化应激机制成为 AF 发生和发展中的一个关键靶点, 因而开发针对该靶点的药物可能会对 AF 的治疗产生重要影响。

## 参考文献

- Andrade J, Khairy P, Dobrev D, et al. The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms[J]. *Circ Res*, 2014, 114(9): 1453-1468.
- Heijman J, Voigt N, Nattel S, et al. Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression[J]. *Circ Res*, 2014, 114(9): 1483-1499.
- Dobrev D, Carlsson L, Nattel S. Novel molecular targets for atrial fibrillation therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(4): 275-291.
- Ozcan C, Battaglia E, Young R, et al. LKB1 knockout mouse develops spontaneous atrial fibrillation and provides mechanistic insights into human disease process[J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(3): e001733.
- 梁培培, 俞凤, 张泓. 探索血降钙素原和 C 反应蛋白对心搏骤停后综合征患者早期病情评估及预后的价值[J]. *安徽医药*, 2015, 19(2): 284-287.  
LIANG Peipei, YU Feng, ZHANG Hong. To explore condition evaluation and prediction value of blood procalcitonin and C-reactive protein in post-Cardiac arrest syndrome patients[J]. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 2015, 19(2): 284-287.
- 张锐, 葛建军. 四种炎症因子与冠心病的关系研究[J]. *安徽医药*, 2014, 18(4): 695-697.  
ZHANG Rui, GE Jianjun. Research between coronary heart disease and four inflammatory cytokines[J]. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 2014, 18(4): 695-697.
- Jalife J, Kaur K. Atrial remodeling, fibrosis and atrial fibrillation[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2015, 25(6): 475-484.
- Acevedo M, Corbalán R, Braun S, et al. C-reactive protein and atrial fibrillation: "evidence for the presence of inflammation in the perpetuation of the arrhythmia"[J]. *Int J Cardiol*, 2006, 108(3): 326-331.
- 王喆, 吴永贵, 张超群, 等. 白芍总苷对糖尿病大鼠肾组织 Txnip, Trx 与 ASK1 表达的调节作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(7): 916-921.  
WANG Zhe, WU Yonggui, ZHANG Chaoqun, et al. Effect of total glucosides of paeony on the expression of Txnip, Trx and ASK1 in the kidney from diabetic rats[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2015, 50(7): 916-921.
- Wang K, Zhang J, Wang X, et al. Thioredoxin reductase was nitrated in the aging heart after myocardial ischemia/reperfusion[J]. *Rejuvenation Res*, 2013, 16(5): 377-385.
- Harada M, Tadevosyan A, Qi X, et al. Atrial fibrillation activates AMP-dependent protein kinase and its regulation of cellular calcium handling: potential role in metabolic adaptation and prevention of progression[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 66(1): 47-58.
- 梁小燕, 王丕龙, 陶小红. LKB1 通过 AMPK 信号通路抑制 HeLa 细胞增殖的机制研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(1): 45-48.  
LIANG Xiaoyan, WANG Pilong, TAO Xiaohong. Inhibition of HeLa cell proliferation by LKB1 through AMPK signaling pathway[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2013, 38(1): 45-48.
- Harada M, Nattel SN, Nattel S. AMP-activated protein kinase: potential role in cardiac electrophysiology and arrhythmias[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2012, 5(4): 860-867.
- Li J, Solus J, Chen Q, et al. Role of inflammation and oxidative stress in atrial fibrillation[J]. *Heart Rhythm*, 2010, 7(4): 438-444.

本文引用: 杨彩英, 张晓军, 申春红, 张春丽, 刘春玲. 风湿性二尖瓣狭窄患者心肌 LKB1/AMPK 通路 与心房颤动的相关性[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(7): 1475-1479. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.017

**Cite this article as:** YANG Caiying, ZHANG Xiaojun, SHEN Chunhong, ZHANG Chunli, LIU Chunling. Correlation between LKB1/AMPK pathway and atrial fibrillation in patients with mitral stenosis of rheumatic heart disease[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(7): 1475-1479. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.017