

• 论著 • 基础研究 •

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



张培德, 李飞, 乔恩, 王巍

中国医学科学院阜外医院 国家心血管病中心(北京 100037)

【摘要】 目的 探索 FAK 在瓣膜性心房颤动(房颤)患者纤维化心房中的变化, 并对其介导的下游信号通路进行探究。方法 共有 45 例二尖瓣疾病患者纳入本次研究, 根据有无房颤分为瓣膜房颤组(VAF, AF>6 个月, 25 例)和窦性心律组(SR, 20 例)。术中获取心耳组织, 分别进行组织学病理检测和蛋白免疫印迹。观察心房纤维化程度以及 FAK 及其下游通路在纤维化心肌中的变化。结果 本研究揭示了瓣膜性房颤心房纤维化程度较高, 细胞排列紊乱。通过探究 FAK 及下游通路的变化, 发现房颤组成纤维细胞分化标志蛋白 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达明显升高, FAK 及下游 AKT/S6K 通路蛋白表达均发生上调, 而另一条信号通路 ERK1/2 信号通路未见明显变化。结论 瓣膜性房颤心房纤维化是心房结构重塑的一个重要标志, 胶原纤维的过度产生使心房肌细胞的连续性受到破坏, 导致传导异常, 为房颤发生发展提供了基质环境。粘着斑激酶及下游 AKT/S6K 信号通路在纤维化心肌中表达增加, 可能参与心房纤维化进程之中, 为其机制研究提供依据。

【关键词】 瓣膜性房颤; 心房纤维化; 黏着斑激酶; 信号通路

Focal adhesion kinase mediated signaling on atrial fibrosis in patients with valvular atrial fibrillation

ZHANG Peide, LI Fei, QIAO En, WANG Wei

Fuwai Hospital, China academy of medicine science, National Center for Cardiovascular Disease, Beijing, 100037, P.R.China

Corresponding author: WANG Wei, Email: drweiwang0728@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the changes of focal adhesion kinase(FAK) in the fibrotic atrium of patients with valvular atrial fibrillation and explore its downstream signaling pathways. **Methods** A total of 45 patients with mitral valve disease were included in this study and were divided into valvular atrial fibrillation (VAF, AF>6 months, 25 patients) and sinus rhythm group (SR, 20 patients) based on having atrial fibrillation or not. The atrial appendage tissue was obtained during the operation, histopathological examination and Western blotting were performed. The degree of atrial fibrosis and changes in FAK and its downstream pathways in fibrotic myocardium were observed. **Results** This study revealed a higher degree of atrial fibrosis in valvular atrial fibrillation and disordered cell arrangement. Expression of fibroblast differentiation marker alpha smooth muscle actin (α -SMA) was significantly increased in atrial fibrillation, and the expression of FAK and downstream AKT/S6K pathway proteins was up-regulated, while the other signal was observed, there was no significant change in ERK1/2 signaling pathway. **Conclusion** Atrial fibrosis in valvular atrial fibrillation is an important feature of atrial structural remodeling. We found overproduction of collagen fibers disrupted the continuity of atrial myocytes, leading to abnormal conduction and providing a matrix environment for the development of atrial fibrillation. The expression of focal adhesion kinase and downstream AKT/S6K signaling pathway in fibrotic myocardium may be involved in the process of atrial fibrosis, providing a basis for the study of its mechanism.

【Key words】 Valvular atrial fibrillation; atrial fibrosis; focal adhesion kinase; signaling pathway

心房颤动(AF)是临床实践中最常见的心律失

常, 是造成发病率和死亡率的一个重要原因, 随着人口老龄化, 预计在未来几年会有更多的房颤患者^[1]。据统计, 瓣膜性房颤约占全部房颤患者的 30%, 其继发于二尖瓣病变, 不仅会损害心脏功能, 而且

DOI: 10.7507/1007-4848.201807058

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81600254)

通信作者: 王巍, Email: drweiwang0728@hotmail.com

会增加血栓栓塞的风险^[2]。瓣膜性房颤持续时间较长,往往伴随着心房结构重构,如心房扩大及纤维化,这些变化是引起心律失常的重要因素,两者相互关联^[3]。心房肌中胶原纤维的过度产生使心房肌细胞的连续性受到破坏,导致传导异常,为心房异位起搏提供了基质环境,从而引发房颤。房颤的发生发展过程反过来又能加剧胶原纤维异常升高和聚集,加重心房纤维化。目前对于心室纤维化和心室结构重塑的研究已较为透彻和深入^[4],然而对于心房纤维化的发生机制尚不明确,需要深入探索。

粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是一个分子量为 125 kDa 的非受体酪氨酸蛋白激酶,主要结合于整合素受体的相关位点并被激活。它的主要作用是调节细胞间和细胞与细胞外基质间的粘附,保持细胞间正常的结构和功能。除此之外,FAK 在许多生物学过程中也起着重要调节作用,如细胞迁移、细胞增殖和生存^[5]。既往研究已经发现 FAK 能够通过转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) 调节成纤维细胞的分化过程, TGF $\beta 1$ 已被证实无论在体外还是体内均可以诱导纤维母细胞向成纤维细胞方向分化,从而上调 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),其被认为是一种成纤维细胞的表型标志物^[6]。一些研究表明,雷帕霉素靶蛋白/核糖体 S6 蛋白激酶(mTOR/S6K)复合体以及细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)信号通路是通过 FAK 介导的下游信号通路,这些信号通路参与许多疾病的纤维化过程,有些甚至起到关键作用,如肝纤维化、肺纤维化等等,是细胞分化信号传导通路的重要组成部分^[7]。

由此我们推测,FAK 及其下游信号可能参与瓣膜性房颤患者心房纤维化过程中的某些步骤,在分子水平上可能与纤维化形成有某种潜在的联系。因此,本研究旨在探讨瓣膜性房颤纤维化改变和 FAK 及其下游信号通路(主要是 AKT/S6K 信号通路以及 ERK1/2 信号通路)在瓣膜性房颤患者心房肌纤维化中的变化。

1 资料与方法

1.1 患者选择与标本处理

共有 45 例二尖瓣狭窄为主的患者入选,绝大多数伴有二尖瓣及三尖瓣返流,入选时间为 2016 年 7 月至 2017 年 4 月。根据有无房颤被分为两组,一组为被 ECG 确诊的非家族性瓣膜性房颤(CAF, AF ≥ 6 个月, $n=25$),有心悸等症状的患者,另一组为同期收集无房颤发生的窦性心律二尖瓣

疾病患者(SR, $n=20$)。窦性心律患者通过直接询问病史得知他们从未有过房颤症状,并且在整个术前回顾性分析 12 导联心电图,排除房颤发生。两组患者发病均大于三年,无显著性差异。本研究患者入选的排除标准为甲状腺功能亢进、慢性心力衰竭、病态窦房结综合征、家族性孤立性房颤、慢性肺源性心脏病、心肌病、肾脏疾病和二次接受心脏手术患者。患者术前心功能使用纽约心功能分级(NYHA)评定。所有入组本次研究的患者都签署了知情同意,所有涉及人体组织应用的过程都经过阜外医院伦理委员会的严格审查,并审核通过。

患者的组织标本均在阜外医院获得。患者的心耳组织于手术体外循环转机后和(或)射频消融前获得,切得的心耳用于组织病理学检查和蛋白提取。

1.2 病理分析和纤维化定量

置于 10% 福尔马林溶液中的心耳组织行 H&E 染色和 Masson 染色,加入 α -SMA 和 Y397-FAK 行免疫组织化学染色;在每例患者样品的 Masson 染色切片中随机选取 4 张作为纤维化定量标本,每张切片置于 Olympus BX51 光学显微镜下,随机选取观察 5 个不同视野,在此染色切片中,心肌细胞显示呈红色,胶原纤维显示呈蓝色。心肌内膜(心肌细胞之间纤维化)间的胶原纤维算为纤维化区域,心肌束膜间的胶原纤维由于本身就存在而不包括在纤维化区域内。在 40 \times 物镜、10 \times 拍摄镜(放大倍数为 400 倍)下用 QIMAGING MicroPublisher 5.0 R7V 照相系统对视野中合适的图像进行采集。用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统对心房肌组织中的胶原纤维进行定量分析。纤维化面积分数=胶原纤维面积/视野总面积 $\times 100\%$ 。

1.3 组织蛋白提取和蛋白免疫印迹

按标准方法配制 SDS-PAGE 凝胶,以 30 μg /孔上样组织蛋白,杂交一抗为多克隆兔抗 Y397-FAK (1:200),多克隆兔抗 α -SMA (1:400),单克隆兔抗 FAK (1:1000) (abcam, 美国);单克隆兔抗 Y397-FAK (1:1000),多克隆兔抗 FAK (1:1000),单克隆兔抗 S473-AKT (1:2000),单克隆兔抗 AKT (1:1000),单克隆兔抗 T389-p70S6K (1:1000),单克隆兔抗 p70S6K (1:1000),单克隆兔抗 P44/42-ERK1/2 (1:1000),单克隆兔抗 ERK1/2 (1:1000) (Cell signaling, 美国);单克隆鼠 GAPDH (1:5000),进行电转,洗膜后加显色液,摄像并通过 Quantity One 软件包半定量分析目的蛋白条带,结果以信号强度与面积的乘积

(INT×mm²)表示。

1.4 统计学分析

t 检验用于两个组间连续变量的比较, 方差分析用于三组或三组以上变量间的比较。连续变量资料的值表示为均数±标准差($\bar{x}\pm s$)。卡方检验用于两组分类变量间的比较。使用 SPSS17.0 进行统计分析。当 $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者临床特点

表 1 总结了患者的临床特征, 本研究招募的患者中, 房颤组的射血分数和左心室舒张末期内径稍低, 肺动脉压力稍高, 但两组间心脏功能并没有显著差异。由于长期持久的房颤, 这组患者左心房内径明显扩大($P<0.01$)。此外, 在洋地黄和血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)的使用上房颤组和窦性心律组差异也有明显统计学意义($P<0.01$)。

2.2 病理检测分析

H&E 染色显示在房颤组患者心耳组织中心房肌排列紊乱, 细胞肥大(图 1a), 窦性心律患者相对整齐(图 1b)。由于纳入的患者均患有二尖瓣疾病, 故两组都显现出来显著的间质改变, 但是房颤组纤维化程度更为显著并出现了心房肌细胞溶解现象, 心房肌细胞被纤维间质分为多枝, 形成纤维间隔, 细胞核也变得不均一(图 1c)。房颤组纤维化分数($7.61\%\pm 0.47\%$)明显高于窦性心律组($3.55\%\pm 0.31\%$), 提示心房颤动与心房纤维化的某

表 1 患者临床资料(例/ $\bar{x}\pm s$)

临床资料	房颤组 (<i>n</i> =25)	窦性心律组 (<i>n</i> =20)	<i>P</i> 值
性别(男/女)	7/18	10/10	0.130
年龄(年)	54.0±2.0	48.0±3.0	0.100
射血分数(%)	59.3±0.9	62.1±1.2	0.080
左房直径(mm)	53.7±1.9	45.5±1.8	0.004
左室舒张末期直径(mm)	48.3±1.4	47.4±1.9	0.690
心胸比	0.57±0.01	0.54±0.01	0.140
肺动脉压力(mm Hg)	38.2±2.9	30.4±2.7	0.060
用药情况(例)			
利尿剂	8	3	0.330
B受体阻滞剂	9	3	0.110
洋地黄类	11	1	<0.010
血管紧张素转化酶抑制剂	19	1	<0.010
钙拮抗剂	2	2	1.000

种潜在联系(图 e)。

免疫组织化学染色可以对组织细胞及细胞外基质中 α -SMA 和 FAK 的表达量和表达位置进行确定。在房颤组中, 丰富的 α -SMA 表达在心房肌细胞内和胞外间质, 毛细血管周围也有表达增加(图 2a 箭头所示), 在窦性心律患者的心房样品中, 只在间质和少量心房肌细胞能看到稀少的 α -SMA 分布(图 2b), 磷酸化 Y397-FAK 只限于表达在心肌细胞中, 并且表达量较少(图 2d)。在房颤组中, 丰富的 α -SMA 表达在心房肌细胞内和胞外间质, 毛细血管周围也有表达增加(图 2a 箭头所示), 磷酸化 Y397-FAK 表达增强, 并从心房肌细胞内扩展到胞外间质(图 2c), 这与该组患者心房较高纤维化程度的结果一致。

2.3 组织蛋白免疫印迹分析

二尖瓣疾病患者的心房组织中利用 Western blotting 研究瓣膜性房颤患者和窦性心律患者中 FAK 及其调节的两个下游通路 AKT/S6K 以及 ERK1/2 的变化。与窦性心律组蛋白免疫印迹结果相比, 房颤组中的 α -SMA 表达升高, 进一步证实了该组较高程度的纤维化。磷酸化 Y397-FAK 表达显著并伴有磷酸化 S473-AKT 和磷酸化 T389-p70S6K 的表达, 但是磷酸化 ERK1/2 的变化不显著(图 3)。

3 讨论

瓣膜性房颤指继发于瓣膜性二尖瓣心脏病或人工瓣置换术后出现的房颤^[2], 这种房颤血栓栓塞发生率高, 持续时间长, 对于这类房颤的药物治疗和射频消融术效果往往不佳^[8], 这种心房结构重构为房颤的维持和发展提供基质。心房纤维化源于细胞外基质胶原纤维的大量沉积, 纤维母细胞不断分化为成纤维细胞, 继而产生大量的胶原蛋白, 逐步取代退化的心肌细胞。间质的不断扩展使得心肌细胞间的连续性受到破坏而发生电信号冲动的传播障碍^[9]。在本研究中, 我们发现二尖瓣疾病伴房颤患者有着显著的心房纤维化和心房肌细胞的退行性变化(图 1)。心房纤维化涉及多个因素, 如肾素-血管紧张素系统, TGF β 1, 氧化应激和炎症^[10], 但是其具体机制还尚不明确。很显然, 心房纤维化作为器质性心脏病的一个病理终点影响心房组织的正常传导, 为房颤的发生与发展提供环境, 反过来, 心房持续颤动破坏心房肌结构和功能, 促进心房纤维化的形成, 两者相互影响, 互为因果, 形成恶性循环。纤维化过程发生于组织水平、细胞

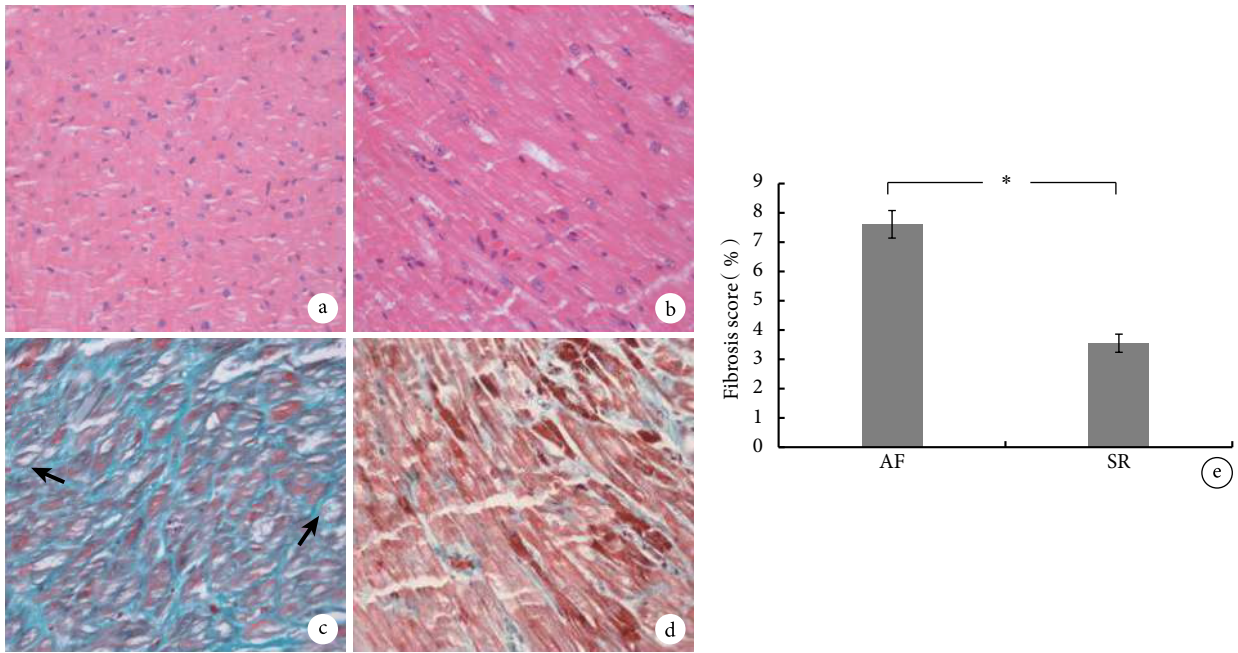


图1 房颤组 (a, c) 和窦性心律组 (b, d) 的 H&E 和 Masson 染色 ×400
 箭头表示心房肌细胞溶解。两组间在纤维化程度上差异明显 (e)。柱状图值表示均数±标准误。*: P<0.05

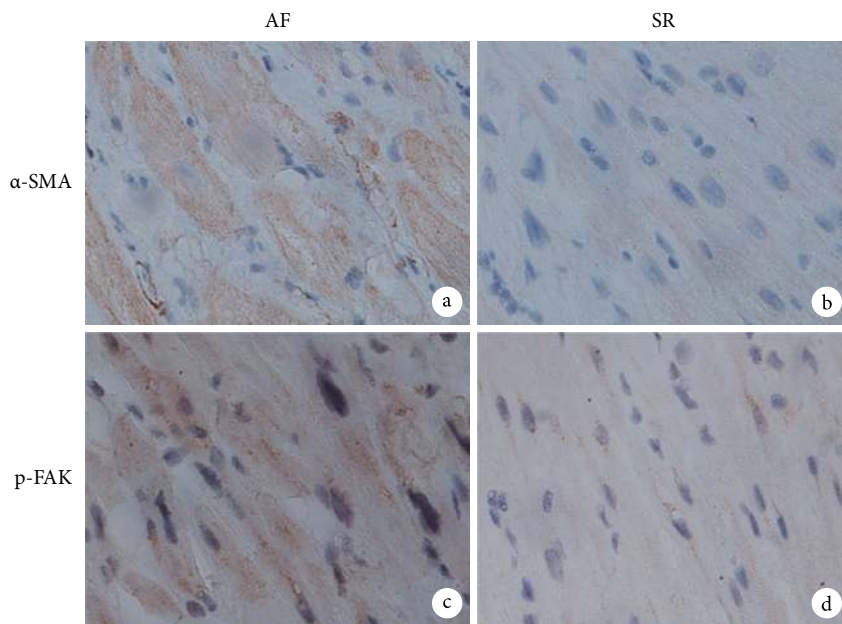


图2 α-SMA 和 Y397-FAK 在房颤组 (a, c) 和窦性心律组 (b, d) 的免疫组织化学染色 (×400)
 AF: 房颤组; SR: 窦性心律组。箭头指示棕色为过表达的蛋白分子

水平,乃至分子水平。

在本研究中,我们选作 FAK 介导的下游通路 AKT/S6K 以及 ERK1/2 作为研究通路。黏着斑激酶中的酪氨酸残基 397 可以和其分子内的一种被称做 FERM 激酶结构域的亚结构相互作用,一旦这个酪氨酸残基 397 被 FERM 结构域激活,此位点就会招募 Src 家族的激酶^[11],从而激活 AKT 发挥细胞调节作用^[12]。此外,ERK1/2 信号通路是丝裂原活化蛋白

激酶 (MAPK) 信号通路的其中一个亚族,它在细胞生存、增殖、分化和运动等方面起关键作用^[13],膜结合小 G 蛋白 Ras 与 FAK 磷酸化的酪氨酸 925 位点结合能激活 MAP 激酶 Raf-1,它能激活 MAPK 激酶 MEK1/2,继而激活 ERK1/2 使其磷酸化^[14]。

近年来研究已经表明,FAK 在心血管系统中发挥非常重要的作用。有文献报道,在心梗小鼠模型中,特异性抑制 FAK 能够有效抑制小鼠心肌纤维

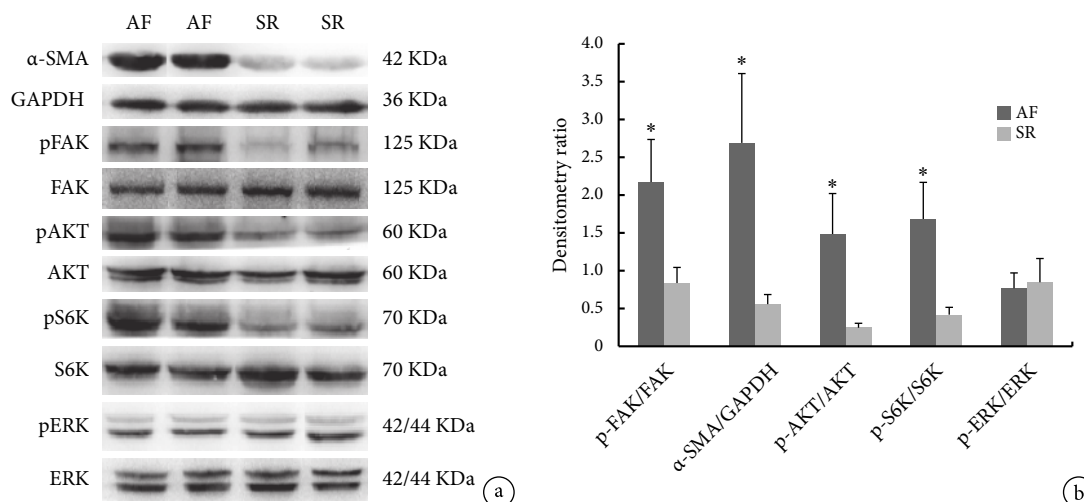


图 3

a: 心耳组织 WB 图, α -SMA, FAK, AKT, S6K 和 ERK1/2 的代表性条带; b: 纵坐标示房颤组与窦性心律组上述蛋白 WB 条带光密度比, 柱状图值表示均数 \pm 标准误。*: $P < 0.05$

化以及心脏结构重构, 减少纤维化应答, 并且能保留部分心脏功能, 延缓心功能失代偿^[15-16]。本研究发现 FAK 在瓣膜性房颤患者心房纤维化中发生了改变, FAK 磷酸化表达量在纤维化心房肌中表达增多, 提示其可能参与纤维化过程。FAK 下游的 AKT/S6K 信号转导通路至关重要, 因为它涉及许多重要细胞活动的上游调节, 并包含许多细胞活动重要的组件, 我们发现磷酸化 AKT 和 p70S6K 在纤维化心房肌中的蛋白表达尤为显著 (图 3), 可能提示 FAK 介导的 AKT/S6K 信号通路的确与心房纤维化相关, 与成纤维细胞分化过程联系紧密。FAK 介导的另一条信号通路 ERK1/2 并没有显著的变化 (图 3), 这个结论与既往报道中关于 TGF- β 1 能激活 ERK1/2 而促进成纤维细胞分化的结论不一致^[17-18], 故推断在成纤维细胞分化过程中有可能存在组织特异性或是参与了其他调节途径。但是否与上述推测相符合, 还需要进一步的研究。

本实验虽然观察到瓣膜性房颤患者心房肌纤维化病理改变和 FAK 介导的 AKT/S6K 信号通路的变化, 但未证实在动物实验中抑制该蛋白能否阻止成纤维细胞分化或延缓心房纤维化的进展, 仍需进一步研究。未来希望通过敲出 FAK 基因或特异性心房表达 FAK, 从而检测 FAK 及其下游分子对心房纤维化及房颤的影响。

综上所述, 本研究发现瓣膜性房颤患者都存在较程度的心房肌纤维化, 这种因结构重构而发生的异位起搏和异位传导就很难被逆转, 黏着斑激酶可能通过介导其下游的 AKT/S6K 信号通路参与成纤维细胞分化过程, 应被认为是心房纤维化过程中

的一个关键分子。这些结果可能为研究瓣膜性颤结构重构的机制提供新的见解和研究路径, 也为心房颤动的预防和治疗提供了一个理想的干预靶位。

参考文献

- 1 Friberg L, Rosenqvist M. Cardiovascular hospitalization as a surrogate endpoint for mortality in studies of atrial fibrillation: report from the Stockholm Cohort Study of Atrial Fibrillation. *Europace*, 2011, 13(5): 626-633.
- 2 Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, et al. 2016 ESC Guidelines for the Management of Atrial Fibrillation Developed in Collaboration With EACTS. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2017, 70(1): 50.
- 3 Boldt A, Wetzel U, Lauschke J, et al. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart*, 2004, 90(4): 400-405.
- 4 Burstein B, Libby E, Calderone A, Nattel S. Differential behaviors of atrial versus ventricular fibroblasts: a potential role for platelet-derived growth factor in atrial-ventricular remodeling differences. *Circulation*, 2008, 117(13): 1630-1641.
- 5 Franchini KG. Focal adhesion kinase -- the basis of local hypertrophic signaling domains. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(2): 485-492.
- 6 Thannickal VJ, Lee DY, White ES, et al. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem*, 2003, 278(14): 12384-12389.
- 7 Lagares D, Kapoor M. Targeting focal adhesion kinase in fibrotic diseases. *BioDrugs*, 2013, 27(1): 15-23.
- 8 Jais P, Cauchemez B, Macle L, et al. Catheter ablation versus antiarrhythmic drugs for atrial fibrillation: the A4 study. *Circulation*, 2008, 118(24): 2498-2505.
- 9 Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(8): 802-809.

- 10 Makati KJ, Alsheikh-Ali AA, Garlitski AC, *et al.* Advances in mechanisms of atrial fibrillation: structural remodeling, high-frequency fractionated electrograms, and reentrant AF drivers. *J Interv Card Electrophysiol*, 2008, 23(1): 45-49.
- 11 Arold ST. How focal adhesion kinase achieves regulation by linking ligand binding, localization and action. *Curr Opin Struct Biol*, 2011, 21(6): 808-813.
- 12 Akagi T, Murata K, Shishido T, *et al.* v-Crk activates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway by utilizing focal adhesion kinase and H-Ras. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(20): 7015-7023.
- 13 Turner NA. Therapeutic regulation of cardiac fibroblast function: targeting stress-activated protein kinase pathways. *Future Cardiol*, 2011, 7(5): 673-691.
- 14 Sbroglio M, Bertero A, Velasco S, *et al.* ERK1/2 activation in heart is controlled by melusin, focal adhesion kinase and the scaffold protein IQGAP1. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 20): 3515-3524.
- 15 Fan GP, Wang W, Zhao H, *et al.* Pharmacological Inhibition of Focal Adhesion Kinase Attenuates Cardiac Fibrosis in Mice Cardiac Fibroblast and Post-Myocardial-Infarction Models. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(2): 515-526.
- 16 Zhang J, Fan G, Zhao H, *et al.* Targeted inhibition of focal adhesion kinase attenuates cardiac fibrosis and preserves heart function in adverse cardiac remodeling. *Sci Rep*, 2017, 7: 43146.
- 17 Liu S, Xu SW, Kennedy L, *et al.* FAK is required for TGFbeta-induced JNK phosphorylation in fibroblasts: implications for acquisition of a matrix-remodeling phenotype. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(6): 2169-2178.
- 18 Ding Q, Gladson CL, Wu H, *et al.* Focal adhesion kinase (FAK)-related non-kinase inhibits myofibroblast differentiation through differential MAPK activation in a FAK-dependent manner. *J Biol Chem*, 2008, 283(40): 26839-6849.

收稿日期: 2018-07-25 修回日期: 2018-09-21

本文编辑: 刘雪梅