

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

中文計劃題目：心房顫動病程機轉中組織與細胞基質蛋白相關基因及其調控因子的探討(1/2)

英文計劃題目：Studying the tissue and cellular matrix related genes and their regulatory factors in disease mechanism of the early stage atrial fibrillation (1/2)

計畫編號：NSC 92-2314-B-009-001-B32

執行期限：92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

主持人：林志生

執行機關及單位名稱：國立交通大學 生物科技系

一、中文摘要

本計畫目標為建立並利用低密度之心房顫動 (atrial fibrillation; AFib) 基因晶片探討 AFib 早期的病程機轉。AFib 基因晶片上置放的核酸探針分為兩類，第一類為先前研究報導與 AFib 病程有關之基因，如 ion channels 與 gap junction proteins，第二類為藉由高密度之 cDNA microarray (9,182 個探針) 所分出於 AFib 心房組織中顯著高或低表現之基因群。我們已建立的 AFib 基因晶片包含 90 個不同基因的探針，其可用於偵測我們所建立的 AFib 豬不同心房組織中各基因表現的差異性，並探討各基因表現差異之相關性及其在 AFib 早期病程中扮演的角色。在 AFib 心房組織病理切片中，我們觀察到顯著性的心肌細胞分解 (myolysis) 與細胞基質異常累積等病變，此可由基因晶片偵測顯示一些與細胞或組織纖維化有關的基因在 AFib 心房組織中異常表現的結果相互印證。這些異常表現的基因包括細胞結構、細胞基質及細胞基質調節因子的譯碼基因。我們的研究結果顯示，在 AFib 形成的早期，一些心房結構性重組 (remodeling) 病變即已發生，而其細胞基質代謝相關基因表現調節的失序應於心房節律加速期間就已發生。

關鍵詞：心房顫動、基因晶片、細胞基質

Abstract

The aim of this study is to explore pathophysiologic process of atrial fibrillation (AFib) at early stage by low-density AFib gene chip that was establishing in our laboratory. There were 90 nucleotide probes arranged in

the AFib gene chip. Criteria of the probes selected for printing on the chip are (1) the genes related to AFib disease reported by previous studies, such as the genes encoding ionic channels and gap junction proteins and (2) the significantly up- or down-regulating genes in the AFib, these genes were screened by a high-density cDNA microarray (9,182 probes). The AFib gene chip was using to study expressed genes concerning with pathophysiologic process of AFib using the porcine atrial tissues with AFib at early stage.

In the AFib atria, significant myolysis and marked accumulation of cellular matrix were observed. These pathological features were confirmed by the result of AFib gene chip determination. We found that several genes encoding structure proteins, cellular matrix and regulatory factors of the matrix are abnormally expressed in the atria with AFib compared with those in the sham control (i.e., sinus rhythm). In conclusion, the structure remodeling of atria occurs at the early stage of AFib process. Therefore, the genes related to cellular matrix metabolism are disorderly regulated during the atria suffered rapid pacing.

Keywords: atrial fibrillation, gene chip, cellular matrix

二、緣由與目的

AFib 是臨床上最常見的心律不整疾病，其發生率隨年齡而增高，為老年人盛行的心臟疾病。由於醫療科技的進步使社會高齡化，AFib 將是日愈常見的課題。然而對於此疾病的臨床治療，例如電擊整流

(cardioversion) 抗心律不整藥物、電燒或裝置心律調節器等，都尚未有最佳的治療成果，對於病患生活品質並無明顯提升，因此 AFib 病程機轉是當前心血管疾病的重點研究之一。

AFib 依其病變特徵，可區分為電性、收縮間期及結構性重組等三類 (Allessie et al, 2002)。電性重組主要的特徵是心房的 effective refractory period 與 action potential duration 縮短，此病徵與 ion channel proteins 的表現有關 (Brundel et al, 2001)。另外，心肌細胞間的 gap junction proteins 的表現異常也與 AFib 的形成有關 (van der Velden et al, 2000)。結構性重組病變對於持續性 AFib 的形成扮演重要的角色。目前研究顯示，由 AFib 所引起的結構性重組包括心肌細胞增大，肌原纖維節數顯著性的減少，細胞核周圍肝醣累積，粒線體、內質網膜及染色質結構型態的改變及細胞顯現出去分化 (de-differentiation) 型態，例如 β -myosin heavy chain、 α -smooth muscle actin 等胎兒期特徵蛋白在 AFib 組織中會重新表現 (Ausma et al, 2001; Thijssen et al, 2002)。已知 AFib 心房組織的結構性重組病變包括組織中細胞間基質蛋白 (extracellular matrix proteins; ECMs) 組成的顯著改變與心房組織的纖維化 (Li et al, 2000; Kostin et al, 2002)，然而這些病變在 AFib 早期病程中的演變與其分子機轉目前並不清楚。

本研究的主要目的為建構一低密度之 AFib 專用基因晶片，此晶片可用於偵測我們所建立的 AFib 豬心房各部位組織中一些特定基因表現的差異性，並比較這些表現基因間的相關性，以探討在 AFib 早期病程中結構性重組病變的分子機轉。

三、研究成果與討論

在持續進行 AFib 豬研究過程中，我們陸續收集豬心房各部位組織樣品，其中包括 10 頭正常、6 頭 sham control 及 28 頭持續性 AFib 豬隻之心房組織。這些組織包括左、右心房不同區域的 free wall 及 appendage 部分，我們將之稱為 AFib 豬心房組織庫，其包含 80 保存之心房組織。H&E 與 Messon trichrome 染色

之病理切片、OTC 包埋及石臘包埋之心房組織，血液樣品等。圖 1 所示為 sham control 及 AFib 豬隻心房組織經 Messon trichrom 染色之結果，其顯示 AFib 心房組織可見肌原纖維束變薄與斷裂、纖維化區域增大及淋巴球浸潤等病變，此與人類 AFib 的病變極為相似 (Lin et al, 2003)，此可能為豬的心臟血管系統、結構及心臟電生理系統與人類相當相似，因此這些豬隻適於被運用來進行持續性 AFib 病理機轉研究與臨床試驗。

我們已建構的 AFib 基因晶片上放置的核酸探針共 90 個，其包含已知功能的基因序列，未知功能的 EST 序列及 housekeeping 基因。晶片上探針分布設計如圖 2 所示，每一微陣列均置入 positive control、blank 及 negative control，其用以監測每一次實驗之品質，例如雜交反應效果、背景值強度及非專一性雜交等。在 AFib 基因晶片上之核酸探針可分為兩類，第一類為先前研究報導與 AFib 病程有關之基因，如 ionic channel 與 gap junction proteins，第二類為藉由本研究先期以高密度之 cDNA microarray (9,182 個探針) 所分示出於 AFib 心房組織中顯著高或低表現之基因群。

圖 3 為 AFib 基因晶片用於競爭性 (competitive) 雜交反應後之螢光訊號影像結果，左右為同一晶片上兩重覆微陣列實驗。圖中 blank 及 negative control 的位置顯示出相對於背景質並無螢光強度的差異，在同時於晶片上的探針有 85% 以上可被偵測到螢光訊號，而相同點兩重覆點之變異性 (variation) 平均為 5%，由此可知，我們已建立低密度 AFib 基因晶片之晶片製作流程及雜交反應的標準步驟，並將能應用於偵測 AFib 組織庫中各部位心房組織之基因表現。

分別取自 AFib 與 sinus rhythm (為 sham control) 之心房組織，經晶片實驗之標準流程處理，包括 RNA 萃取、cDNA 標定 (Cy5: AFib 與 Cy3: sham control)、競爭性 DNA 雜交反應後，將晶片進行雷射螢光掃描取得晶片上各探針的螢光強度值與影像。經影像分析後，晶片上各探針所顯示的紅、綠螢光強度 (Cy5 及 Cy3) 扣除背景值，再經數值分析整理，可繪成各基因相對表現值之分佈圖

(圖 4)。利用我們所建立的 AFib 基因晶片偵測 AFib 心房組織之基因表現,在被分析的基因中,超過二分之一顯示出表現量具有顯著差異(即 Cy5/Cy3 或 Cy3/Cy5 > 2),而表現量顯著差異的基因群中,約 70%為在 AFib 組織中表現量較高的基因,而這些異常表現的基因包括細胞結構、細胞基質及細胞基質調節因子的譯碼基因。這些基因表現的測定結果,可用於印證 AFib 組織纖維化病程,且我們結果顯示,在 AFib 形成的早期,一些心房結構性重組病變即已發生,而其細胞基質代謝相關基因表現調節的失序應於心房節律加速期間就已發生。

於 AFib 心房的心肌細胞中,一些胎兒期特徵蛋白會被重新表現(Ausma et al, 2001; Thijssen et al, 2002),而在我們 AFib 基因晶片分析結果中也顯示 poly(rC) binding protein 2 (PCBP2) 的表現量顯著提高,PCBP2 為胚胎期之心肌細胞會顯著表現的基因(Chan et al, 2003),其為一種 RNA 結合蛋白,能與 mRNA 結合而調節其穩定或直接影響其轉譯過程(Makeyev and Liebhaber, 2002),但 PCBP2 在 AFib 中所扮演的角色須進一步研究。我們也發現 MARPs (muscle ankyrin repeat proteins) 的成員之一 CARP 在 AFib 組織中顯著高表現,由於 MARPs 參與了肌肉壓力反應途徑(muscle stress response pathways)(Miller et al; 2003),因此推測 CARP 的高表現量可能在 AFib 所誘發之心肌肥厚(hypertrophy)病徵中扮演重要的角色。

鈣離子的超載(calcium overload)被認為是導致 AFib 心房組織電性重組病變的重要因素之一(Ausma et al, 2000),因此與調控鈣離子相關之基因也就相對重要。L-type calcium channel 在我們的研究中並未顯現出差異性的表現,這結果與先前的研究認為 L-type calcium channel 表現量下降有所不同(Brundel et al, 1999),但與 Schotten 等人(2003)所發表的結果相似。另外,在 AFib 左、右心房組織中,calmodulin 都顯出較高的基因表現量,這也許是 AFib 心肌細胞內鈣離子異常,需要更多 calmodulin 來調控鈣離子的平衡。

豬隻個體上的差異或誘發 AFib 時期長

短之不同會造成的基因表現的結果。因此,我們將繼續以 AFib 基因晶片,研究不同的 AFib 誘發時期、不同區域之心房組織,其各基因表現量之變化,並探討可能之相互關係。此外,在我們結果中也發現許多未知功能之 EST 序列在 AFib 病變心房組織中,表現量顯著提高,這些未知基因具有的生物性功能在 AFib 中所扮演的角色,是相當值得更深入的研究。

(四)、參考文獻：

- Allessie MA, Ausma J, Schotten U. 2002. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 54:230-46.
- Ausma J, Dispersyn GD, Duimel H, et al. 2000. Changes in calcium distribution in goat atria during atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 32:355-64.
- Ausma J, Litjens N, Lenders MH, et al. 2001. Time course of atrial fibrillation-induced cellular structural remodeling in atria of the goat. *J Mol Cell Cardiol* 33:2083-94.
- Brundel BJ, van Gelder IC, Henning RH, et al. 1999. Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 42:443-54.
- Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, et al. 2001. Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Circulation* 103:684-90.
- Chan SY, Chan AK, Cheung BP, et al. 2003. Identification of genes expressed during myocardial development. *Chin Med J* 116:1329-32.
- Kostin S, Klein G, Szalay Z, et al. 2002. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res* 54:361-79.
- Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. 2000.

Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res* 46:214-24.

Lin JL, Lai LP, Lin CS, et al. 2003. Electrophysiological mapping and histological examinations of the swine atrium with sustained (≥ 24 h) atrial fibrillation: a suitable animal model for studying human atrial fibrillation. *Cardiology* 99:78-84.

Makeyev AV, Liebhaber SA. 2002. The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA* 8:265-78.

Miller MK, Bang ML, Witt CC, et al. 2003. The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankr2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol* 333:951-64.

Schotten U, Haase H, Frechen D, et al. 2003. The L-type Ca^{2+} -channel subunits $\alpha 1\text{C}$ and $\beta 2$ are not downregulated in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 35:437-43.

Thijssen VL, van der Velden HM, van Ankeren EP, et al. 2002. Analysis of altered gene expression during sustained atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res* 54:427-37.

van der Velden HM, Ausma J, Rook MB, et al. 2000. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res* 46:476-86.

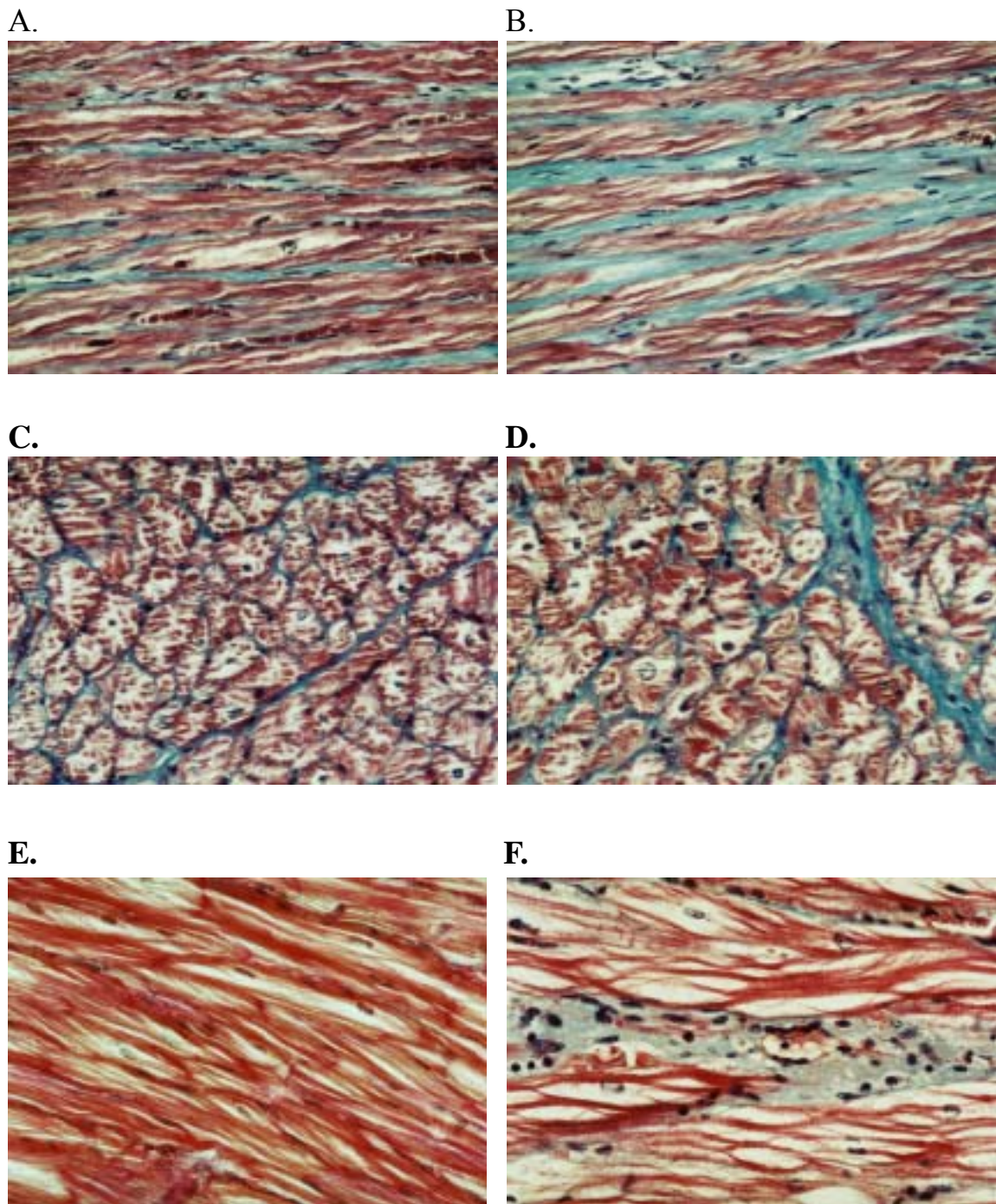


圖 1、 Masson's trichrome stain 組織切片，左邊 (A, C, E) 為 sham control 豬心房組織，右邊 (B, D, F) 為 AFib 豬心房組織。在 AFib 心房組織中可見肌原纖維 (myofibrils) 束變薄與斷裂 (B) 細胞間纖維化區域增大 (D) 及淋巴球浸潤的現象 (F) (放大倍率：A, B, C, D: 200X; E, F: 400X)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GAPDH-2	Blank	pUC19	Tubulin	Blank	Tropnin-T	AGRT1	CALM	LYN	CALM2-1	CAP2	ARF4
B	EST1	EST2	EST3	EST4	EST5	EST6	EST7	EST8	CALM2-2	IGFBP5	PTGER4	TNFSF10
C	EST9	EST10	EST11	EST12	EST13	EST14	EST15	EST16	EDN1	ADRB2	ACE-1	ACE-2
D	CACNA1C	CACNA1S-1	CACNA1S-2	KCNK3	CJB3	GJA1	HSPA8	PRDX1-2	CCND1	STAT3	BTEB1	TSC22
E	MMP11	ADAM10	ADAM15	FN1	CKMT2	UCHL1	LPL	CYR61	CAPNS1	ZNF177	MITF-1	MITF-2
F	CDH2	CHST10	CLDN1	SPON1	YWHAZ	HBG2	SEPP1	PRDX1-1	FHL1	GTF2E2	BAZ2B	TCEB1
G	CRTAP	PLS3	SPTBN	ACTR1A	SERPINB2	PCBP2	CAV1	M11S1	CYFIP2	U5-116KD	CSRP1	RPL35
H	ACTG1	ACTN1	MYL2	CARP	MMP2	CAST	AHR	HUMGT 198A	C5orf13	GAPDH-2	Blank	pUC19



圖 2、AFib 基因晶片上核酸探針分置圖。包含已知功能基因序列、未知功能之 EST 序列、housekeeping 基因、blank 及 control DNA 序列。

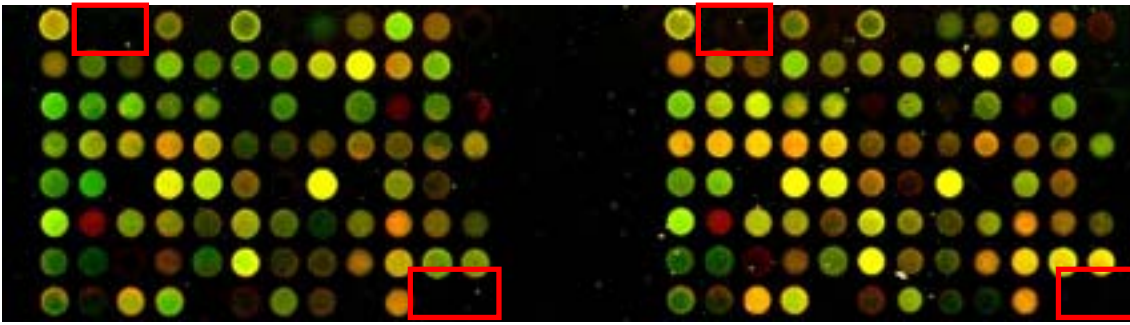


圖 3、AFib 基因晶片經競爭性 DNA 雜交反應後螢光掃描影像圖。圖中紅框部分分別為 blank 及 negative control 之核酸探針位置。

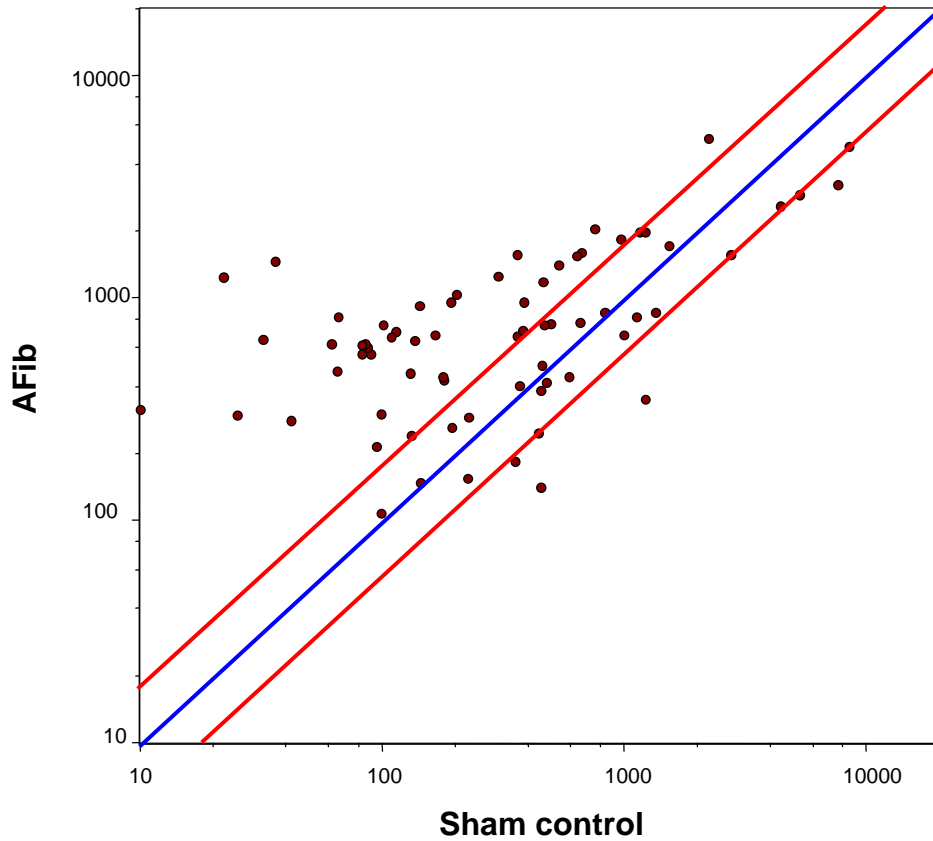


圖 4、AFib 基因晶片經競爭性 DNA 雜交反應後各核酸探針上 Cy3 與 Cy5 螢光強度及其比值分佈圖。X, Y 軸為對數刻度之座標軸, X 軸為 Cy3 螢光強度, Y 軸為 Cy5 螢光強度, 紅線代表 intensity ratio (Cy3/Cy5 or Cy5/Cy3) 為 2。