

双催化三联体PET水解酶的制备及其酶活性分析

苏秋东^{1*},姚西宁^{2*},邱丰¹,王锋¹,张爽¹,徐柯¹,毕胜利¹,王衍海¹

(¹中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所,国家卫生健康委医学病毒和病毒病重点实验室,北京 102206;²北京贝尔生物工程股份有限公司,北京 102612)

摘要 目的 制备双催化三联体聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)水解酶(PETase),并评价其对PET的生物降解效果。方法 基于PETase晶体结构分析,通过点突变方式(T88H/L117D)引入突变位点,并利用原核表达和层析纯化技术制备双催化三联体PETase重组蛋白,相对定量产物对苯二甲酸单羟乙基酯(MHET)和对苯二甲酸(TPA)来观察其对PET底物的酶解反应。结果 野生型和突变型PETase均以包涵体形式在大肠埃希菌中高效表达,约占菌体总蛋白20%。经尿素变性处理后,通过亲和层析纯化,目的蛋白主要存在于300 mmol/L咪唑洗脱液中,其浓度和纯度分别为1.824 mg/mL和83.11%(野生型)、1.833 mg/mL和84.32%(突变型)。进一步的离子交换层析纯化显示,目的蛋白主要存在于200 mmol/L NaCl洗脱液中,其浓度和纯度分别为2.776 mg/mL和96.86%(野生型)、1.967 mg/mL和95.13%(突变型)。透析复性后,野生型和突变型PETase的浓度分别为0.484 mg/mL和0.991 mg/mL。酶活性检测显示,与野生型PETase相比,突变型的MHET的产率为(237.67±17.00)%,TPA的产率为(197.33±12.01)%。结论 经过原核表达和层析纯化技术获取了T88H/L117D双催化三联体PETase,其具有增强的PET降解能力,为PET的生物降解提供新的思路。

关键词 聚对苯二甲酸乙二醇酯;水解酶;催化三联体;点突变;重组蛋白;生物降解

中图分类号 Q 814.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)03-0546-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.03.022

聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)是一种由对苯二甲酸酯(terephthalate, TPA)和乙二醇(ethylene glycol, EG)通过酯键连接而成的高分子量聚合物,因其优异的耐用性等物理特性被广泛使用^[1-3]。然而,PET的化学惰性使其难以自然降解,这使得其高效处理成为亟待解决的问题。生物降解作为一种控制塑料污染的有效方法,而酶催化降解则为解决塑料环境问题带来了新的希望^[1]。传统PET降解酶,如角质酶等,通常需要在较高温度下才能发挥最大生物活性,且其降解活性较低,限制了其在工业应用中的价值^[1]。2016年,Burgin et al^[4]从细菌 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 中分离出一种新型PET水解酶(PETase),该酶可在30 °C下特异高效降解PET,但其热稳定性较差,且酶解活性仍有待提高。

PETase能直接作用于固态PET,释放对苯二甲

酸双羟乙基酯[bis(2-hydroxyethyl) terephthalate, BHET]和对苯二甲酸单羟乙基酯[mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET]^[4-5]。其活性中心主要由7个氨基酸组成^[4],其中Ser160-His237-Asp206构成了催化三联体结构,而Tyr87和Met161则组成了氧阴离子穴^[4]。酶解效率受底物结合能力、热稳定性和产物抑制等多种因素的影响。针对这些因素,众多突变体应运而生^[3,6-8]。本研究通过分析PETase晶体结构,利用点突变技术、原核表达和层析纯化技术制备双催化三联体PETase重组蛋白,并观察其对PET和BHET底物的酶解反应。

1 材料与方法

1.1 材料 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。表达载体pET-43.1a由本实验室保存。整合型亲和层析介质Chelating Sepharose Fast Flow和二乙氨乙基(ethylenediaminetetraacetic acid, DEAE)Streamline阴离子交换介质购自美国GE公司。限制性内切酶Nde I和Xho I以及T4 DNA连接酶均购自美国NEB公司。垂直电泳系统,凝胶成像系统以及Image Lab分析软件均购自美国Bio-rad公司。

2025-11-29 接收

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2023YFC2605300)

作者简介:苏秋东,男,副研究员;

王衍海,男,研究员,通信作者, E-mail: wangyh@ivdc.chinacdc.cn

*对本文具有同等贡献

1.2 表达质粒的构建 野生型 PETase (UniProt A0A0K8P6T7) 的 Gln28-Ser290 片段经密码子优化后,在 5' 端添加 Nde I 酶切位点,在 3' 端添加 Xho I 酶切位点。该基因片段由生工生物工程(上海)股份有限公司全基因合成,并插入 pMD-19T 载体中。突变型 PETase 的构建如图 1 所示,将野生型 PETase 的第 88 位苏氨酸(T)突变为组氨酸(H),第 117 位亮氨酸(L)突变为天冬氨酸(D)。编码突变型 PETase 的基因片段同样经过密码子优化后,并在 5' 端添加 Nde I 酶切位点,在 3' 端添加 Xho I 酶切位点。该突变基因片段也由生工生物工程(上海)股份有限公司全基因合成,并插入到 pMD-19T 载体中。随后,使用 Nde I 和 Xho I 分别处理含有野生型和突变型 PETase 基因的 pMD-19T 质粒以及表达载体 pET-43.1a。通过凝胶回收带有黏性末端的片段和 pET-43.1a 载体后,利用 T4 DNA 连接酶连接后转化到 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中。最终通过测序及双酶切鉴定确认重组质粒的正确性。

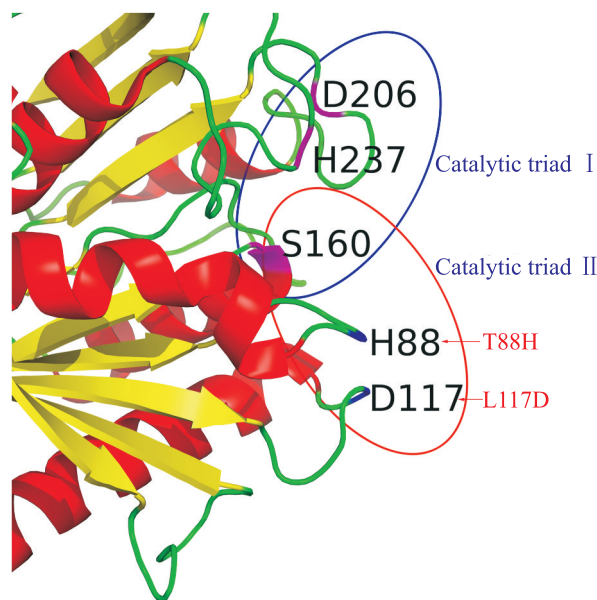


图 1 突变型 PETase 突变位点示意图

Fig. 1 Schematic diagram of mutated sites in mutant PETase

1.3 野生型和突变型 PETase 的制备

1.3.1 野生型和突变型 PETase 的表达 将野生型和突变型 PETase 表达质粒转化至 BL21(DE3) 感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素(Amp)的固体 LB 培养基,37 °C 培养过夜。次日挑取单克隆接种于 1.5 mL 液体 LB 培养基(10 g/L 蛋白胨,5 g/L 酵母提取液,10 g/L NaCl,50 μg/mL Amp,pH 7.0)中,37 °C、220 r/min 振荡培养 4 h。当菌液 $A_{600\text{nm}} \approx 0.8$ 时,加入终浓度

1 mmol/L 的 IPTG,继续培养 2 h 后取样,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)以评估蛋白的表达水平。根据初筛结果,选取表达水平最高的菌株以 1:1 000 比例接种于 2 L LB 培养液(50 μg/mL Amp)中进行大量表达。当菌液 $A_{600\text{nm}}$ 约为 0.8 时,加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG,将温度调整为 28 °C,继续培养 5 h。离心收集菌体(4 000 r/min,10 min,4 °C),用 Buffer I (20 mmol/L Tris-HCl,0.5% Triton X-100,pH 8.0)重悬菌体沉淀。超声处理菌体重悬液(工作功率 250 W,工作时间 25 s,间歇时间 25 s,30 个循环)后,离心(12 000 r/min,10 min,4 °C)分离上清液和沉淀,进行 SDS-PAGE 观察目的蛋白的表达情况及分布情况。

1.3.2 野生型和突变型 PETase 的纯化 弃去上清液后,用 Buffer II [50 mmol/L Tris-HCl,10 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid,EDTA),100 mmol/L NaCl,0.5% Triton X-100,pH 8.0]洗涤包涵体。随后,用含 2 mol/L 尿素的 Buffer II 再洗涤一次。最后,用 Buffer III (50 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl,8 mol/L 尿素,pH 8.0)对包涵体进行蛋白变性处理。离心(12 000 r/min,10 min,4 °C)收集上清液,即获得变性蛋白溶液。将此上清液行镍离子亲和层析,依次以含 0、30、60、300 mmol/L 咪唑的 Buffer III 进行梯度洗脱,并收集各洗脱峰。随后选择浓度高纯度好的洗脱液在 Buffer IV (50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0)中透析。随后,将透析液行 DEAE 阴离子交换层析,依次以含 0、100、200、400 mmol/L NaCl 的 Buffer IV 进行梯度洗脱。各梯度洗脱液均进行 SDS-PAGE 以观察目的蛋白的分布和含量,用 Image Lab 软件对蛋白条带进行分析。

1.3.3 野生型和突变型 PETase 的复性 纯化后的目的蛋白洗脱液中加入终浓度为 100 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)、0.4 mol/L L-精氨酸、5 mmol/L 还原型谷胱甘肽(reduced glutathione,GSH)、1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione disulfide,GSSG)的复性缓冲液后装入透析袋。透析袋外缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L DTT、500 mmol/L NaCl、0.4 mol/L L-精氨酸、5 mmol/L GSH、1 mmol/L GSSG、pH 8.0,并按照 6→4→3→2→1→0 mol/L 梯度递减尿素浓度;每级梯度于 4 °C 温和搅拌 3 h,严格避光。尿素完全去除后,将样本转入 Buffer V (20 mmol/L Tris-HCl,150 mmol/L NaCl,pH 8.0)中继续

透析2次。最后将蛋白统一浓缩至1 mg/mL,加入终体积50%预冷甘油,-20 °C保存备用。

1.4 PET降解检测 称取36 mg PET膜(1.5 cm × 1.0 cm),置于含有50 μg/mL纯化酶(野生型或突变型PETase)的缓冲液VI(50 mmol/L glycine-NaOH, pH 9.4)中,30~60 °C梯度(每隔5 °C为一组)低速振荡孵育48 h。56 °C热处理10 min以终止反应。冷却后,4 °C、10 000 r/min离心10 min,上清液经0.22 μm滤膜过滤,立即用于反相高效液相色谱(reversed-phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)分析。色谱条件:分析柱为Welch Ultimate XB-C18 column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相A:20 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 2.5),流动相B:甲醇;梯度洗脱0~25 min,B由25%线性升至95%;流速0.8 mL/min;柱温30 °C;检测波长240 nm。按峰面积外标法定量BHET、MHET和TPA。每个样品均设3次独立重复。

1.5 统计学处理 蛋白浓度采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定,结果以mg/mL表示;纯度通过Image Lab软件对SDS-PAGE图形进行灰度分析,计算目的蛋白占泳道中总蛋白的百分比。酶活性以野生型PETase酶产物量中位数为100%,突变型相对产率以百分数标化,并以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)呈现。统计分析及图形绘制使用GraphPad Prism 9.5软件;两组间比较采用双尾 t 检验;多组比较采用单因素方差分析(F 检验)。 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 野生型和突变型PETase表达细胞株成功构

建 根据PETase氨基酸序列和大肠埃希菌密码子偏好性,确定野生型和突变型PETase编码基因序列,两个基因片段长度均为879 bp。凝胶回收带有互补黏性末端的目的片段(879 bp;图2A,泳道1)和pET-43.1a载体(5 488 bp;图2A,泳道2),经连接酶将两者进行连接构建表达质粒。提取质粒进行双酶切鉴定,可见5 500 bp(载体)和900 bp(插入片段)两条清晰条带(图2B,泳道3)。表达质粒转化入BL21(DE3)后,次日挑取单克隆接种于2 mL LB培养基中(50 mg/L Amp)进行少量表达。SDS-PAGE在约31 ku处出现明显条带(图2C),与预期一致。重组质粒送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。比对结果显示(图3),两种质粒的核苷酸序列与设计完全一致;与野生型相比,突变型在对应位点出现T88H(ACC→CAC)和L117D(CTG→GAT)两处定点突变。结果显示,野生型及突变型PETase表达菌株构建成功。

2.2 可溶性野生型和突变型PETase的制备 经过大肠埃希菌表达后,野生型和突变型PETase均以包涵体形式存在(图4A、4B)。包涵体经过两次洗涤后,用8 mol/L尿素进行溶解变性。镍离子亲和层析结果显示,两种蛋白均能很好结合层析介质,并于300 mmol/L咪唑条件下被特异性洗脱:野生型PETase浓度为1.824 mg/mL,纯度为83.11%(图4C,泳道8);突变型PETase浓度为1.833 mg/mL,纯度为84.32%(图4D,泳道11)。阴离子交换层析结果显示,二者均主要在200 mmol/L NaCl洗脱峰中富集:野生型PETase浓度为2.776 mg/mL,纯度为96.86%(图4C,泳道7);突变型PETase浓度为1.967 mg/mL,纯度为95.13%(图4D,泳道10)。透析复性后,

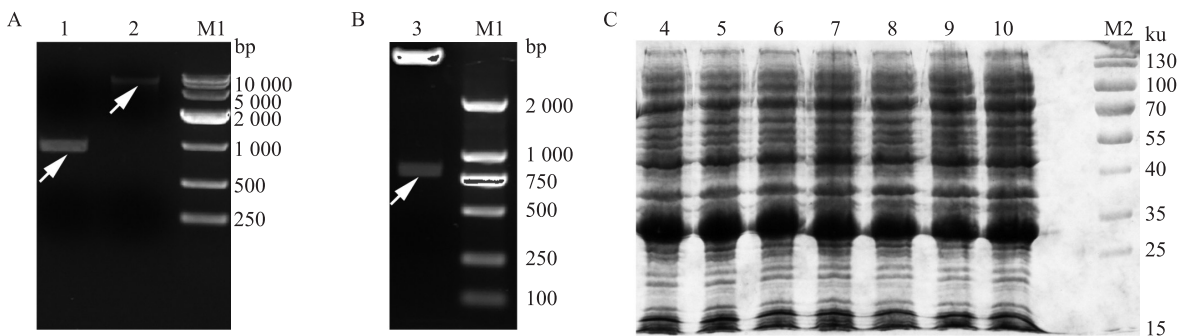


图2 野生型/突变型PETase表达细胞株的构建

Fig. 2 Construction of wild-type/mutant PETase expression strains

A, B: Construction and identification of wild-type and mutant PETase expression plasmids; 1: Recovered pET-43.1a vector after double restriction endonuclease digestion; 2: Recovered target fragment after double restriction endonuclease digestion; 3: Expression plasmids digested with double restriction endonuclease digestion; C: Small-scale expression results of mutant (lanes 4-7) and wild-type (lanes 8-10) PETase; M1: DNA Marker; M2: Protein Marker.

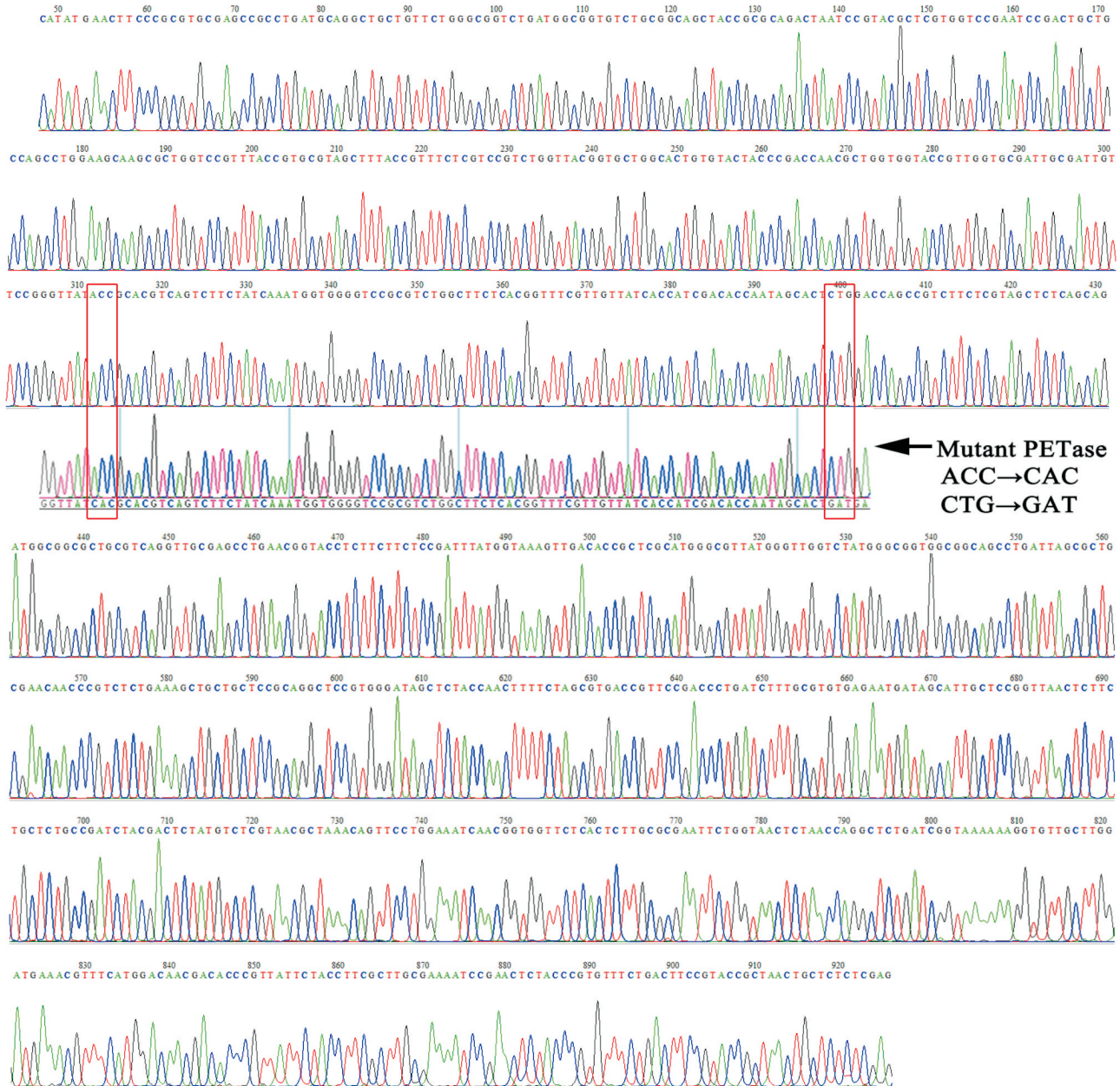


图3 野生型/突变型PETase表达质粒测序验证

Fig. 3 Sequencing verification of wild-type and mutant PETase expression plasmids

突变型和野生型PETase终浓度分别为0.484 mg/mL (图4E,泳道12)和0.991 mg/mL(图4E,泳道13)。

2.3 突变型PETase对MHET和TPA产率的提升作用 突变型PETase催化生成MHET和TPA的产率中值设定为100%(图5A),MHET与TPA产率均随温度变化差异有统计学意义(MHET: $F=233.43$, $P<0.001$;TPA: $F=267.31$, $P<0.001$)。齐性子集分析显示,二者均在45℃时产率最高(MHET:101.67%;TPA:100.67%),其次为40℃与50℃,60℃时最低(MHET:8.00%;TPA:10.33%)。结果表明该酶最适温度为45℃。各温度下MHET与

TPA产率之间差异无统计学意义($t=0.09$, $P=0.928$)。与野生型相比,突变型PETase的MHET产率为(237.67 ± 17.00)%,TPA产率为(197.33 ± 12.01)%,且两者产量均显著高于野生型(MHET: $t=-12.72$, $P<0.001$;TPA: $t=-10.41$, $P<0.001$),表明其催化效率显著提升(图5B)。

3 讨论

PET是目前应用最广且是环境中主要的塑料污染物。PETase介导的PET解聚是由丝氨酸-组氨酸-天冬氨酸(SHD)催化三联体介导的一种二步酰

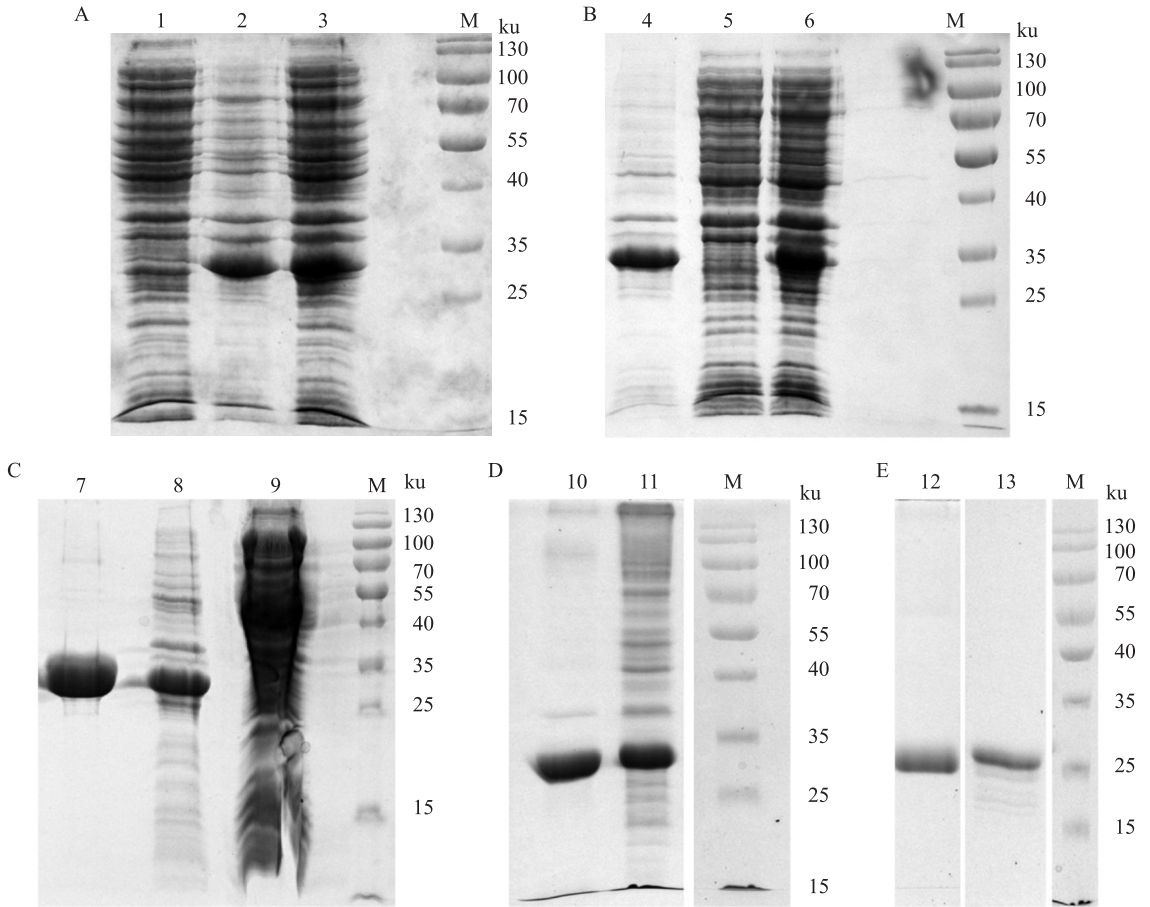


图4 野生型和突变型PETase的制备

Fig. 4 Preparation of wild-type and mutant PETase

A: Large-scale expression of wild-type PETase (after ultrasonication); B: Large-scale expression of mutant PETase (after ultrasonication); C: Chromatographic purification of wild-type PETase; D: Chromatographic purification of mutant PETase; E: Dialysis and refolding; 1: Supernatant; 2: Pellet; 3: Whole-cell lysate; 4: Pellet; 5: Supernatant; 6: Whole-cell lysate; 7: Eluate from DEAE chromatography using 200 mmol/L NaCl; 8: Eluate from affinity chromatography using 300 mmol/L imidazole; 9: Flow-through from affinity chromatography; 10: Eluate from DEAE chromatography using 200 mmol/L NaCl; 11: Eluate from affinity chromatography using 300 mmol/L imidazole; 12: Mutant PETase; 13: Wild-type PETase; M: Protein Marker.

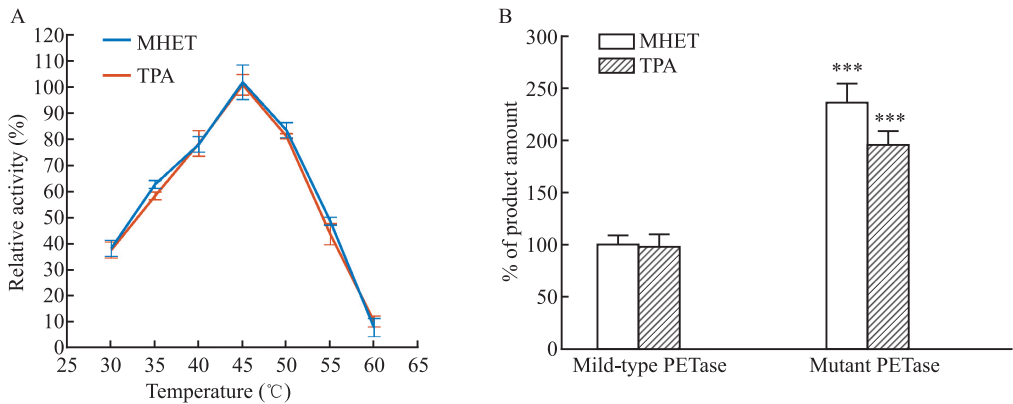


图5 突变型PETase酶活性分析

Fig. 5 Analysis of enzymatic activity of mutant PETase

A: Analysis of the optimal working temperature for mutant PETase; B: Comparative activity analysis of wild-type and mutant PETase; *** $P < 0.001$ vs Mild-type PETase group.

化和脱酰机制^[4]。本研究主要针对酶的活性中心进行点突变改造,以制备具有双活性中心的PETase基因工程重组蛋白酶。

PETase的工程改造主要集中在3个方向:一是扩宽酶的底物结合口袋;二是增强酶的稳定性;三是减少酶的产物抑制。而本研究从酶的活性中心入手,建构了具有双催化三联体的PETase。Ser160对PET羧基碳进行亲核攻击,在双催化三联体构建中仍作为中心被共用。根据PETase的晶体结构,T88与H237、L117与D206遥相对应。因此,双催化三联体基于T88H和L117D两个点突变。预测PET进入活性中心后,两个催化三联体分列在PET分子的两侧,基本呈镜像分布。Sevilla et al^[9]研究表明,酶活性中心3个点突变均增强了对PET的降解活性,尤其是S238Y突变型,酶活性增加了3.3倍,而R89A和L117F的相对活性为2.1倍。本研究引入T88H和L117D双突变后,显示突变型PETase的主要产物MHET的产率得到了提高(图4),推测双催化三联体的存在提高了酶的催化活性,从而增强了酶处理底物的能力。此外,研究还表明,与野生型PETase相比,突变型PETase催化产生次要产物TPA的能力也有所提升,这与N233A/R280A突变体的结果类似^[3]。

大肠埃希菌表达系统因其遗传背景清晰、构建简单、技术成熟稳定、表达效率高、周期短、成本低等优点而被广泛应用^[10-12]。本研究构建中,目的蛋白的表达量约占菌体总蛋白的20%。虽然包涵体的存在形式给蛋白的复性带来了挑战,但也使得纯化过程变得更加容易。包涵体蛋白的复性一直是原核表达系统蛋白制备的难点问题。本研究中,利用氧化型和还原型谷胱甘肽来营造蛋白复性的氧化-还原环境,成功获取了可溶并具有酶活性的PETase。尽管野生型和突变型PETase之间仅有两个氨基酸的差异,但在纯化过程中,两者的中间产物浓度和大小略有不同。推测其三维结构的差异导致了它们在纯化过程中的表现以及在电泳条件下的展示存在差异,可进一步分析其三维结构的差异及其相关影响。

参考文献

[1] 经楠楠,刘文红,李强,等. PET塑料降解及其降解酶改造方法的研究进展[J]. 石油化工高等学校学报, 2024, 37(1): 16-24. doi:10.12422/j.issn.1006-396X.2024.01.003.

[1] Jing N N, Liu W H, Li Q, et al. Research progress of PET

plastic degradation and modification methods of degrading enzymes [J]. J Petrochem Univ, 2024, 37 (1) : 16-24. doi: 10.12422/j.issn.1006-396X.2024.01.003.

[2] Barclay A, Acharya K R. Engineering plastic eating enzymes using structural biology [J]. Biomolecules, 2023, 13(9) : 1407. doi:10.3390/biom13091407.

[3] 陈纯琪,韩旭,刘卫东,等. 基于结构改造来源于大阪伊德氏杆菌201-F6的PET水解酶[J]. 生物工程学报, 2021, 37(9) : 3268-75. doi:10.13345/j.cjb.200632.

[3] Chen C Q, Han X, Liu W D, et al. Structure-based engineering of PET hydrolase from *Ideonella sakaiensis* [J]. Chin J Biotechnol, 2021, 37 (9) : 3268-75. doi:10.13345/j.cjb.200632.

[4] Burgin T, Pollard B C, Knott B C, et al. The reaction mechanism of the *Ideonella sakaiensis* PETase enzyme [J]. Commun Chem, 2024, 7(1) : 65. doi:10.1038/s42004-024-01154-x.

[5] Waltmann C, Mills C E, Wang J, et al. Functional enzyme-polymer complexes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(13) : e2119509119. doi:10.1073/pnas.2119509119.

[6] Son H F, Joo S, Seo H, et al. Structural bioinformatics-based protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis* [J]. Enzyme Microb Technol, 2020, 141 : 109656. doi:10.1016/j.enzmictec.2020.109656.

[7] Zurier H S, Goddard J M. A high-throughput expression and screening platform for applications-driven PETase engineering [J]. Biotechnol Bioeng, 2023, 120(4) : 1000-14. doi:10.1002/bit.28319.

[8] Liu F, Wang T, Yang W, et al. Current advances in the structural biology and molecular engineering of PETase [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 11 : 1263996. doi: 10.3389/fbioe.2023.1263996.

[9] Sevilla M E, Garcia M D, Perez-Castillo Y, et al. Degradation of PET bottles by an engineered *Ideonella sakaiensis* PETase [J]. Polymers, 2023, 15(7) : 1779. doi:10.3390/polym15071779.

[10] Murakami M, Murakami A M, Yonekura M, et al. A simple, dual direct expression plasmid system in prokaryotic and mammalian cells [J]. PNAS Nexus, 2023, 2(5) : pgad139. doi: 10.1093/pnasnexus/pgad139.

[11] 田甜,张星娟,杨明夏. 人源性RPL22基因的原核表达与纯化及功能分析[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(10) : 1785-93. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.013.

[11] Tian T, Zhang X J, Yang M X. Prokaryotic expression, purification and functional analysis of human RPL22 gene [J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(10) : 1785-93. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.013.

[12] 张雨琪,丁明珠,吴金凤,等. 雄激素受体基因各功能域片段的原核表达与功能鉴定[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(2) : 219-24. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.008.

[12] Zhang Y Q, Ding M Z, Wu J F, et al. Prokaryotic expression and functional identification of androgen receptor functional domains [J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58 (2) : 219-24. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.008.

◇ 临床医学研究 ◇

非瓣膜性持续性房颤患者合并左心室肥厚的危险因素模型预测及预后分析

刘方,郑培养,王惠敏,李丹妮,梁馨,赵韧

(安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022)

摘要 **目的** 构建非瓣膜性持续性心房颤动(PeAF)患者合并左心室肥厚(LVH)列线图的预测模型,随访并进行预后分析。**方法** 纳入初次诊断且接受住院治疗的非瓣膜性PeAF患者949例(其中合并LVH为403例),并随机分为训练集(665例)和验证集(284例),通过二元Logistic回归筛选PeAF合并LVH的独立危险因素、构建列线图预测模型,并通过受试者工作特征(ROC)曲线、校准曲线和决策曲线评估模型的预测性能。**结果** 最终筛选出女性、高血压(HTN)、糖尿病(DM)、红细胞分布宽度-SD值(RDW-SD)、身体质量指数(BMI)、左心房内径(LAD)、左心室射血分数(LVEF)共7项独立危险因素,并将其纳入预测模型,训练集中的ROC曲线下面积(AUC)为0.862(95%CI:0.834~0.890),验证集中的AUC为0.870(95%CI:0.829~0.911),显示出良好的预测效能。**结论** PeAF患者合并LVH的独立危险因素包括女性、HTN、DM、RDW-SD、BMI、LAD、LVEF,基于此所构建的预测模型有助于早期识别PeAF发生LVH的高危人群。同时,通过Cox回归分析发现房颤合并LVH患者可能从导管消融治疗中获益。

关键词 持续性心房颤动;左心室肥厚;危险因素;列线图;主要心血管不良事件;复发;Cox回归分析

中图分类号 R 541.75

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)03-0552-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.03.023

左心室肥厚(left ventricular hypertrophy, LVH)是一种继发于左心室壁厚增加、左心室腔扩大,或两者同时发生的左心室质量增加的病症。临床研究^[1]指出,LVH通常与心脏性猝死的高风险相关,并且是心血管死亡的预测因子。左心室作为左心房的延续,两者互相影响,在持续性心房颤动(persistent atrial fibrillation, PeAF)疾病发展进程中,心房和心室共同经历了从电重构到结构重构的过程^[2-3],LVH可能为其主要及早期改变之一。PeAF合并LVH患者的病因及预后尚未完全明确。目前研究推测,这种病理改变可能与房颤(atrial fibrillation, AF)本身的直接影响(如心房重构、心室负荷增加和心输出量降低等)直接相关,同时也可能受到AF共病如HTN、DM、肾功能不全等协同作用的推动。在这些因素共同作用下,进一步加重了心肌的重构和功能障碍^[4]。因此,深入研究AF与共病之间

影响的交互机制,对于明确病因、优化治疗策略具有重要意义。

本研究旨在探讨PeAF患者合并LVH的危险因素及预后,通过结合临床经验和统计分析,筛选最具预测价值的变量,并构建相应的预测模型,以期将列线图结果与个体化治疗相结合,为不同风险水平的患者提供具体的干预措施。

1 材料与方法

1.1 病例资料 本研究纳入2022年1月—2023年10月在该医院首次诊断非瓣膜性PeAF且年龄≥18岁的住院患者949例(根据是否合并LVH,分为LVH组403例,非LVH组546例;男性628例,女性321例;年龄范围为23~89岁,年龄中位数为67岁)。将其随机按照7:3的比例纳入训练集($n=665$)和验证集($n=284$)。纳入标准为:符合2023年心房颤动诊断和治疗中国指南^[5]中PeAF诊断标准的患者。排除标准为:① 心肌病患者;② 甲状腺功能异常患者;③ 恶性肿瘤个人史;④ 中重度慢性阻塞性肺病患者;⑤ 安装心脏起搏器/电除颤设备患者;⑥ 数据缺失严重及失访的患者。本研究经安徽医科大学第一附属医院

2025-12-14 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82371949)

作者简介:刘方,男,硕士研究生;

赵韧,女,教授,主任医师,博士生导师,通信作者,E-mail:zhaoren@ahmu.edu.cn

伦理委员会审批(伦理号:PJ 2024-13-76)。

1.2 数据收集

1.2.1 一般临床信息 通过东华医为电子病历系统收集患者的一般资料,包括:性别、年龄、身体质量指数(body mass index, BMI)、既往史[高血压(hypertension, HTN)、糖尿病(DM)、脑梗死(cerebral infarction, CI)、冠心病(coronary heart disease, CHD)、慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)]、用药史[β 受体阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)/血管紧张素 II 受体拮抗剂(angiotensin II receptor blocker, ARB)/血管紧张素受体-脑啡肽酶抑制剂(angiotensin receptor-neprilysin inhibitor, ARNI)/钠-葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂(sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, SGLT-2)]。

1.2.2 实验室指标 收集患者入院后首次完成的血液检验数据,包括:脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、血常规、血生化,共3大类。其中部分指标经计算后可得出:中性粒细胞-淋巴细胞计数比(neutrophil to lymphocyte ratio, NLR)、单核细胞-高密度脂蛋白胆固醇比(monocyte to high density lipoprotein cholesterol ratio, MHR)、尿酸肌酐比(uric acid to creatinine ratio, UACR)。

1.2.3 经胸超声心动图(transsthoracic echocardiography, TTE)、食管超声心动图(transesophageal echocardiography, TEE)和心电图检查 经TTE与TEE检查由高年资心脏超声科医师使用飞利浦EPIQ 7C超声诊断系统完成。TTE检查通过采集胸骨旁左心室长轴切面以及心尖三切面连续3个心动周期动态图像,测量左心房内径(left atrial diameter, LAD)、左心室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、室间隔厚度(interventricular septum thickness, IVST)、左心室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness, LVPWT)、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室壁相对厚度(relative wall thickness, RWT, $RWT=2 \times LVPWT/LVEDD$)。AF患者心电图(electrocardiogram, ECG)中f波振幅测量方法如下:自QRS波群后2~3个f波开始测量,以连续测量10~20个f波为一组,测量从f波峰顶到谷底的垂直距离所代表的AF波电压,随机选择3组f波振幅并求均值,根据f波的粗细可分为粗波型AF(f波振幅 >0.1 mV)、细波型AF(f波振幅 ≤ 0.1 mV)。

1.3 LVH的诊断 LVH的TTE诊断标准为:左心室质量指数(left ventricular mass index, LVMI);男性 >115 g/m²,女性 >95 g/m²,或左室壁厚度(left ventricular wall thickness, LVWT) ≥ 12 mm。LVMI计算公式:LVMI(g/m²)=左心室质量(left ventricular mass, LVM)/体表面积(body surface area, BSA);LVM(g)= $1.04 \times [(LVEDD+IVST+LVPWT)^3-LVEDD^3] \times 0.8+0.6$ (单位均为cm);BSA(m²)= $0.007184 \times$ 身高(cm)^{0.725} \times 体质量(kg)^{0.425}[6]。

1.4 纳入患者治疗措施 PeAF患者入院后,根据病情需要及患者意愿,分别接受药物治疗或导管射频消融术(radiofrequency catheter ablation, RFCA)加药物治疗。所有手术患者均完成环双肺静脉隔离术,此外,基于患者心房基质水平进行额外消融(如上腔静脉隔离、二尖瓣峡部线、左心房顶部线和三尖瓣峡部线等)。完成线性消融的患者应用不同的起搏策略来确认阻滞线的双向阻滞情况。消融术后进行30 min的监测,再次验证是否阻滞;若验证肺静脉隔离及线性消融阻滞后房颤仍然持续存在,则用直流电复律恢复患者的窦性心律。导管消融术后复发定义为:RFCA术3个月后发生持续时间 ≥ 30 s的房颤、房扑、房速。

1.5 终点事件定义与随访 研究终点为主要不良心血管事件(major adverse cardiovascular event, MACE)(包括心力衰竭、脑卒中、急性心肌梗死、严重室性心律失常、死亡)、房颤导管消融术后复发。

该研究由专门人员负责随访工作,研究者对患者出院1个月、3个月、6个月及12个月时通知其门诊随访,进行心电图及动态心电图检查。随访期间,若患者发生心血管症状,可通过随访电话联系随访人员获得就诊建议,并建档记录患者资料。随访时间为1年。

1.6 统计学处理 应用SPSS 26.0软件和R软件(R 4.4.2)进行数据处理。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述,偏态分布的计量资料采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 进行描述,组间比较分别采用独立样本 t 检验、Mann-Whitney U 秩和检验;计数资料采用率、例或百分比进行描述,组间比较采用 χ^2 检验。采用单因素及多因素二元Logistic回归分析筛选出独立危险因素,并应用R软件构建列线图预测模型,使用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线下面积(area under curve, AUC)、校准曲线、决策曲线(decision curve analysis, DCA)对模型

的区分度、校准度、临床获益性进行验证。最后采用Cox比例风险回归模型探讨PeAF患者预后。检验过程均应用双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床基线特征分析 本研究共纳入1 166例符合标准的患者,其中949例完成出院后随访并获得明确复发或MACE信息,其余217例患者在出院后3个月内失访,无法判断是否发生复发或MACE,未纳入后续生存分析。最终,研究以这949例完成随访的患者为分析对象,将其按7:3随机分为验证集(665例)及训练集(284例),表1总结了患者的临

床基线资料。训练集及验证集患者在性别、年龄、DM、HTN、冠心病、慢性心力衰竭、脑梗死、BMI、BNP、NLR、红细胞计数(red blood cell, RBC)、血红蛋白(hemoglobin, HGB)、红细胞比容(hematocrit, HCT)、RDW-CV、RDW-SD、总胆红素(total bilirubin, TBil)、直接胆红素(direct bilirubin, DBil)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、UACR、eGFR、空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)、三酰甘油(triglyceride, TG)、MHR、LP(a)、LAD、LVEF、心电图f波型、左心耳血栓(left atrial appendage thrombus, LAAT)、 β 受体阻滞剂、ACEI/ARB/ARNI、醛固酮受体阻滞剂、LVH上差异均无统计学意义($P > 0.05$)。两组患者在SGLT-2受体阻滞剂上差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 临床资料分析 [$n(\%)$, $M(P_{25}, P_{75})$]

Tab. 1 Analysis of clinical data [$n(\%)$, $M(P_{25}, P_{75})$]

Factors	Groups		Z/t/ χ^2 value	P value
	Training set (n=665)	Validation set (n=284)		
Gender			0.03	0.933
Male	439 (66.0)	189 (66.5)		
Female	226 (34.0)	95 (33.5)		
Age (years)	67.0 (59.0, 73.0)	67.0 (57.8, 72.0)	-0.83	0.405
History of DM			2.88	0.107
No	523 (78.6)	209 (73.6)		
Yes	142 (21.4)	75 (26.4)		
History of HTN			0.01	1.000
No	290 (43.6)	124 (43.7)		
Yes	375 (56.4)	160 (56.3)		
History of CI			0.73	0.447
No	537 (80.8)	236 (83.1)		
Yes	128 (19.2)	48 (16.9)		
History of CHD			0.09	0.834
No	551 (82.9)	233 (82.0)		
Yes	114 (17.1)	51 (18.0)		
History of CHF			0.77	0.421
No	380 (57.1)	171 (60.2)		
Yes	285 (42.9)	113 (39.8)		
BMI (kg/m ²)	24.9 (22.7, 27.5)	25.0 (22.7, 27.3)	-0.75	0.454
BNP (pg/mL)	401 (628)	393 (616)	-0.03	0.855
NLR	2.00 (1.53, 2.77)	2.09 (1.64, 2.81)	-1.13	0.259
RBC ($\times 10^{12}/L$)	4.49 (4.11, 4.86)	4.56 (4.14, 4.92)	-0.84	0.399
HGB (g/L)	138 (126, 149)	140 (127, 151)	-0.61	0.543
HCT (%)	41.7 (38.3, 44.7)	42.1 (38.3, 45.3)	-0.91	0.360
RDW-CV (%)	13.2 (12.5, 13.7)	13.2 (12.7, 13.9)	-1.22	0.223
RDW-SD (fL)	44.5 (42.3, 47.3)	44.8 (42.3, 47.4)	-0.36	0.719
TBil ($\mu\text{mol}/L$)	16.8 (13.0, 21.4)	15.9 (12.3, 21.4)	-1.43	0.154
DBil ($\mu\text{mol}/L$)	3.24 (2.43, 4.21)	3.10 (2.20, 4.19)	-1.13	0.258
BUN (mmol/L)	6.03 (5.04, 7.30)	6.12 (4.97, 7.74)	-0.93	0.352
UACR	4.80 (4.01, 5.74)	5.03 (4.14, 5.78)	-1.77	0.077

表 1 (续)

Tab.1 (Continued)

Factors	Groups		$Z/t/\chi^2$ value	P value
	Training set (n=665)	Validation set(n=284)		
eGFR [mL/(min·1.73 m ²)]	91.0 (78.0,100.0)	92.0 (77.0,100.0)	-0.26	0.791
FPG (mmol/L)	5.27 (4.81,6.03)	5.29 (4.78,6.26)	-0.82	0.414
TG (mmol/L)	1.20 (0.94,1.73)	1.26 (0.95,1.74)	-0.52	0.605
MHR	0.34 (0.27,0.45)	0.35 (0.26,0.45)	-0.07	0.947
LP (a) (mg/L)	116 (58.0,233.0)	114 (57.1,236.0)	-0.49	0.623
LAD (cm)	4.65 (4.32,5.01)	4.60 (4.28,5.01)	-0.92	0.356
LVEF (%)	57.0 (53.0,60.0)	57.0 (54.0,61.0)	-0.52	0.601
Electrocardiogram f-wave pattern			0.01	0.978
Coarse wave pattern	281 (42.3)	121 (42.6)		
Fine wave pattern	384 (57.7)	163 (57.4)		
LAAT			2.51	0.151
No	619 (93.1)	272 (95.8)		
Yes	46 (6.92)	12 (4.23)		
Clinical medication history				
β receptor blocker			0.27	0.669
No	536 (80.6)	233 (82.0)		
Yes	129 (19.4)	51 (18.0)		
ACEI/ARB/ARNI			1.50	0.249
No	426 (64.1)	170 (59.9)		
Yes	239 (35.9)	114 (40.1)		
Aldosterone receptor blocker			0.63	0.484
No	555 (83.5)	231 (81.3)		
Yes	110 (16.5)	53 (18.7)		
SGLT-2 inhibitor			4.78	0.039
No	609 (91.6)	247 (87.0)		
Yes	56 (8.42)	37 (13.0)		
LVH			0.65	0.464
No	377 (56.7)	169 (59.5)		
Yes	288 (43.3)	115 (40.5)		

2.2 训练集人群的单因素和多因素 Logistic 回归分析 训练集人群中单因素 Logistic 回归分析和共线性检验分析结果显示,性别($P<0.001$)、年龄($P<0.001$)、HTN($P<0.001$)、DM($P<0.001$)、BMI($P=0.03$)、BNP($P<0.001$)、红细胞计数($P<0.001$)、HGB($P<0.001$)、红细胞比容($P<0.001$)、RDW-CV($P<0.001$)、RDW-SD($P<0.001$)、总胆红素($P=0.005$)、直接胆红素($P=0.001$)、BUN($P<0.001$)、eGFR($P<0.001$)、LAD($P<0.001$)、LVEF($P<0.001$)、心电图f波型($P=0.06$)与PeAF患者合并LVH有相关性(表2),且无明显共线性(容忍度Tol均 >0.1 、方差膨胀因子VIF均 <10)。将以上变量纳入多因素 Logistic 回归分析,以是否合并LVH(合并=1,未合并=0)为因变量,结果显示,性别、HTN、

DM、LAD、LVEF、BMI、RDW-SD是PeAF患者合并LVH的独立危险因素(表2)。

2.3 列线图构建 基于训练集多因素二元 Logistic 回归分析筛选出的7项独立危险因素构建列线图预测模型。见图1。

2.4 列线图模型的验证与预测精度评价 为评估预测模型的性能,分别绘制了训练集与验证集的ROC曲线(图2A、2B),其AUC值分别为0.862(95%CI: 0.834~0.890)、0.870(95%CI: 0.829~0.911),提示预测模型具有较好的区分度。绘制校准曲线(图3A、3B),训练集和验证集的校准曲线的Hosmer-Lemeshow检验 χ^2 值分别为6.287($P=0.615$)和4.856($P=0.773$),差异无统计学意义,表明列线图模型的预测概率曲线与理想曲线之间均

表2 训练集单因素和多因素 Logistic 回归分析 [$M(P_{25}, P_{75})$]
Tab. 2 Univariate and multivariate Logistic regression analysis of training set [$M(P_{25}, P_{75})$]

Factors	Univariate Logistic regression analysis		Univariate Logistic regression analysis	
	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value
Gender				
Male				
Female	3.67 (2.78, 4.88)	<0.001	3.30 (1.07, 7.80)	<0.001
Age (years)	1.03 (1.02, 1.04)	<0.001		
History of DM	4.60 (3.32, 6.42)	<0.001	4.72 (2.94, 6.42)	<0.001
History of HTN	2.23 (1.71, 2.92)	<0.001	1.78 (1.71, 2.92)	0.008
History of CI	1.10 (0.79, 1.53)	0.582		
History of CHD	1.91 (1.37, 2.69)	<0.001		
History of CHF	3.54 (2.70, 4.65)	<0.001		
BMI (kg/m ²)	0.96 (0.93, 1.00)	0.030	0.92 (0.87, 0.97)	0.002
BNP (pg/mL)	1.00 (1.00, 1.00)	<0.001		
NLR	1.02 (0.95, 1.09)	0.566		
RBC (×10 ¹² /L)	0.65 (0.52, 0.81)	<0.001		
HGB (g/L)	0.98 (0.97, 0.99)	<0.001		
HCT (%)	0.95 (0.93, 0.98)	<0.001		
RDW-CV (%)	1.46 (1.30, 1.65)	<0.001		
RDW-SD (fL)	1.08 (1.05, 1.12)	<0.001	1.01 (1.05, 1.10)	0.029
TBil (μmol/L)	1.02 (1.01, 1.04)	0.005		
DBil (μmol/L)	1.14 (1.06, 1.23)	0.001		
BUN (mmol/L)	1.13 (1.07, 1.20)	<0.001		
UACR	0.99 (0.90, 1.08)	0.747		
eGFR [mL/(min·1.73 m ²)]	0.98 (0.98, 0.99)	<0.001		
FPG (mmol/L)	0.98 (0.91, 1.05)	0.516		
TG (mmol/L)	0.91 (0.77, 1.08)	0.263		
MHR	1.01 (0.82, 1.26)	0.900		
LP (a) (mg/L)	1.00 (1.00, 1.00)	0.249		
LAD (cm)	3.52 (2.66, 4.66)	<0.001	3.75 (2.38, 5.90)	<0.001
LVEF (%)	0.89 (0.87, 0.90)	<0.001	0.89 (0.86, 0.92)	<0.001
AF of fine wave pattern	1.44 (1.11, 1.88)	0.006		
LAAT	1.60 (0.94, 2.75)	0.085		
β receptor blocker	1.20 (0.86, 1.66)	0.274		
ACEI/ARB/ARNI	1.06 (0.81, 1.38)	0.674		
Aldosterone receptor blocker	1.09 (0.77, 1.53)	0.628		
SGLT-2 inhibitor	1.50 (0.98, 2.32)	0.063		

具有较好的一致性。DCA 曲线(图4A、4B)显示,无论是在训练集还是验证集中,列线图都能够较好地预测 PeAF 合并 LVH 的风险,具有较好的净收益。

2.5 预后分析

2.5.1 Cox 回归分析影响 RFCA 术后复发的危险因素 纳入研究患者单因素 Cox 回归分析和共线性检验分析结果显示,年龄、LAD、细波型 AF、RDW-CV、RDW-SD、HGB、HCT、血肌酐 (serum creatinine, CRE)、尿酸 (uric acid, UA) 等多个变量差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且无明显共线性 (容忍度 Tol 均 > 0.1 、方差膨胀因子 VIF 均 < 10)。进一步多因素 Cox

回归分析并控制其他混杂因素后,显示 LAD 增大和细波型 AF 为 RFAC 术后复发的独立危险因素(表3)。

2.5.2 Cox 回归分析发生 MACE 事件的危险因素

纳入研究患者单因素 Cox 回归分析和共线性检验分析结果显示,年龄、BNP、LAD、细波型 AF、LVEF、LVH、RFCA 差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且无明显共线性 (容忍度 Tol 均 > 0.1 、方差膨胀因子 VIF 均 < 10)。进一步多因素 Cox 回归分析并控制其他混杂因素后,年龄增长、LAD 增大、细波型 AF、LVEF 降低、LVH 是 MACE 事件的独立危险因素,而 RFCA 是

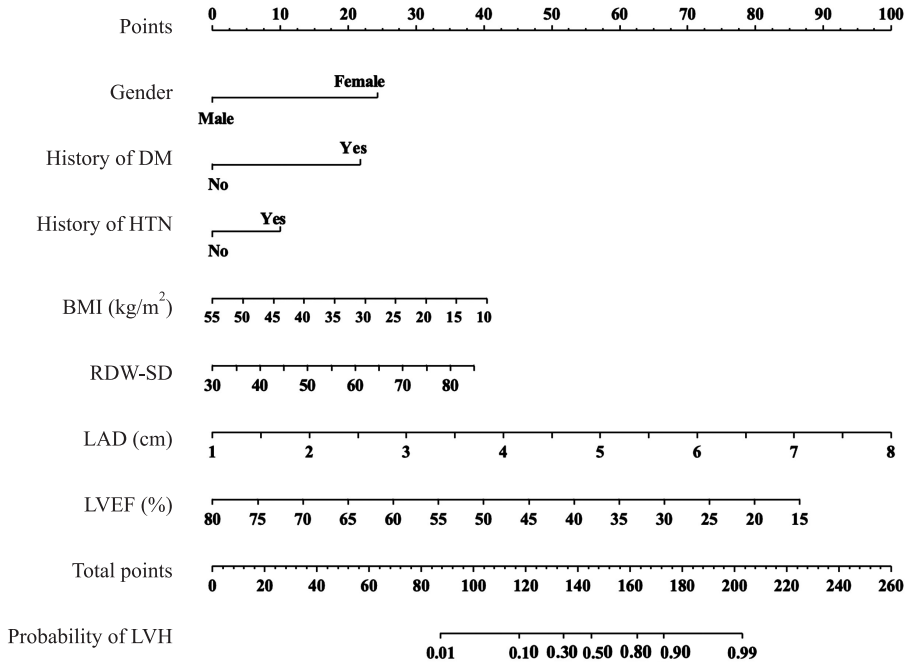


图1 非瓣膜性PeAF患者合并LVH风险列线图

Fig. 1 Nomogram for the risk of LVH in patients with non-valvular PeAF

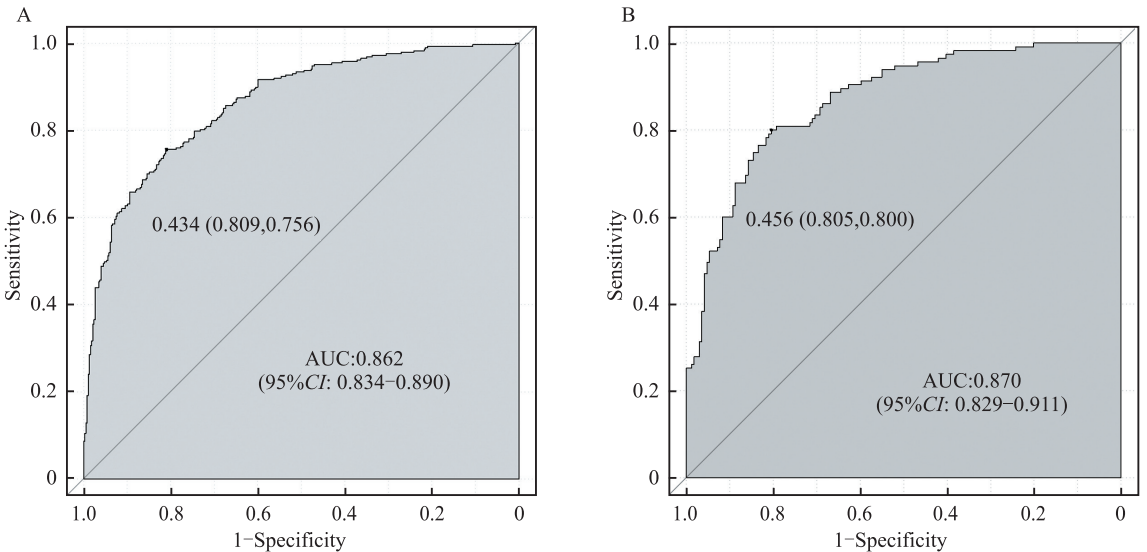


图2 训练集(A)和验证集(B)时间依赖性ROC曲线

Fig. 2 Time-dependent ROC curves of training set (A) and validation set (B)

MACE事件的保护性因素(表4)。

3 讨论

AF是临床上最常见的快速型心律失常之一,已逐渐成为中国乃至世界范围内严重的健康问题,容易导致缺血性卒中、外周动脉栓塞、心力衰竭、认知功能障碍、病死率增高等并发症,严重影响患者生存质量^[5]。PeAF患者发生LVH可能是由于PeAF导致了心室的长期负荷增加、心室收缩与舒张功能的

异常以及心肌纤维化的进行性改变。而PeAF的患者合并LVH是导致患者高病死率和治疗效果差的一种严重的病态。因此,早期识别并有效管理PeAF患者新发LVH的危险因素具有重要意义。在本研究中,多因素Logistic回归分析结果表明,女性、HTN、DM、LAD、LVEF、BMI、RDW-SD是PeAF合并LVH的重要危险因素。非瓣膜性PeAF患者合并LVH的MACE事件发生率更高,RFCA可能降低MACE事件发生率。

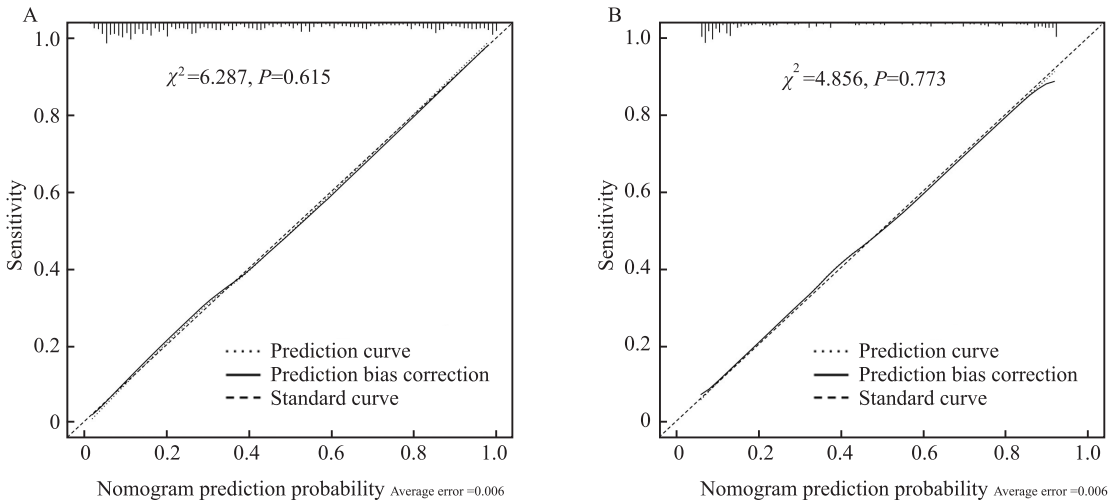


图3 训练集(A)与验证集(B)校准曲线

Fig. 3 Calibration curves of training set (A) and validation set (B)

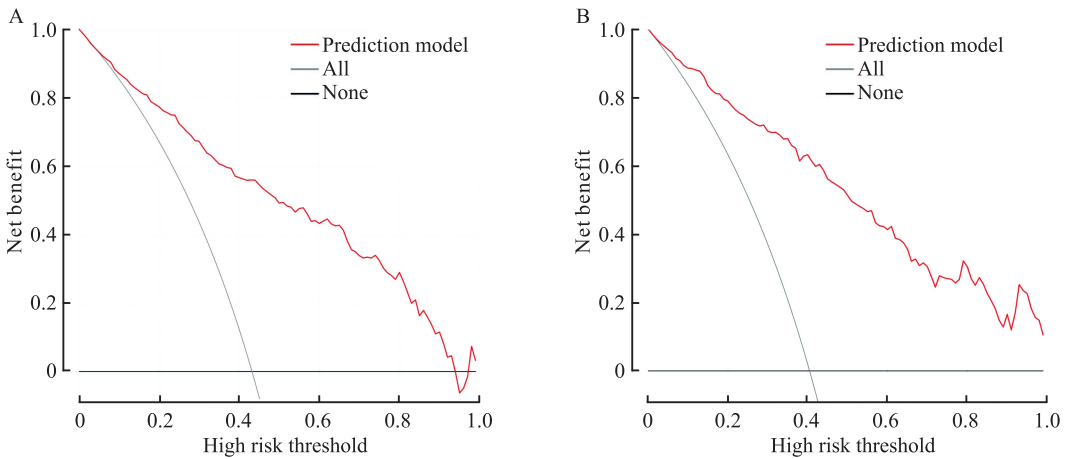


图4 训练集(A)与验证集决策曲线(B)

Fig. 4 Decision curves of training set (A) and validation set (B)

性别对LVH的影响可能与性激素的差异有关。既往研究^[7]表明,男性与女性在心室重构的表现上存在显著差异,这与本研究的结果一致。此外,HTN和DM是已知的LVH重要危险因素,高血压通过长期的压力负荷促进心肌肥厚^[8],而糖尿病则可能通过代谢紊乱和炎症反应影响心肌结构和功能^[9]。

LAD和LVEF作为心脏结构和功能的直接指标,其异常变化可能反映左心室压力或容量负荷增加,从而促进LVH的发生。本研究进一步证实了这两项指标在预测LVH中的重要性。BMI与LVH的关联提示肥胖状态可能通过体循环阻力增加和代谢异常参与LVH的形成。Woodiwiss et al^[10]的研究表明,肥胖促进左心室向心而不是离心几何重塑。本研究中LVH组有55%的超重和肥胖患者,但却有80%的患者发生的是离心性肥厚,这与上述研究相符。而RDW-SD用于评估红细胞大小的变异程度,

有研究表明,RDW-SD还与心血管疾病的发生发展密切相关。Kilicaslan et al^[11]的一项研究显示,RDW是未经诊治的原发性高血压患者LVH的独立危险因素。本研究表明RDW-SD是PeAF患者合并LVH的独立危险因素,其机制可能与RASS激活、氧化应激及慢性炎症有关^[12]。

本研究通过对纳入患者随访观察显示,PeAF合并LVH的患者无论是在RFCA组还是非RFCA组中,MACE事件发生率均高于非LVH组;经RFCA治疗的PeAF患者中,合并LVH的复发率高于非LVH组;在LVH组中,经RFCA治疗的患者MACE事件的发生率低于药物治疗组。一项回顾性研究^[13]表明,心电图诊断LVH是PaAF患者RFCA术后复发的一个强有力的预测因子;一项大型的荟萃分析^[14]也表明,LVH是心房颤动患者不良后果风险增加的一个标志。综上所述,PeAF合并LVH导致一系列不

表3 Cox回归分析影响RFCA术后复发的危险因素
Tab.3 Cox regression analysis of the risk factors influencing the recurrence after RFCA surgery

Variables	Univariate			Multivariate		
	Z value	P value	HR (95%CI)	Z value	P value	HR (95%CI)
Age	2.85	0.004	1.02 (1.01-1.04)	0.21	0.831	1.00 (0.98-1.03)
RBC	-3.48	<0.001	0.68 (0.54-0.84)	-0.22	0.824	0.93 (0.49-1.76)
HGB	-3.72	<0.001	0.99 (0.98-0.99)	-0.03	0.980	1.00 (0.98-1.02)
HCT	-3.66	<0.001	0.96 (0.94-0.98)	-1.44	0.149	0.98 (0.95-1.01)
RDW-CV	2.36	0.018	1.12 (1.02-1.23)	0.24	0.808	1.03 (0.82-1.29)
RDW-SD	2.71	0.007	1.04 (1.01-1.06)	0.53	0.597	1.02 (0.96-1.08)
CRE	-2.10	0.036	0.99 (0.98-0.99)	-0.58	0.561	1.00 (0.99-1.01)
UA	-2.29	0.022	0.99 (0.99-0.99)	-1.16	0.247	1.00 (1.00-1.00)
LAD	5.59	<0.001	2.10 (1.62-2.72)	4.19	<0.001	2.14 (1.50-3.05)
Gender						
Female			1.00 (Reference)			1.00 (Reference)
Male	-2.57	0.010	0.70 (0.53-0.92)	-0.71	0.475	0.84 (0.52-1.36)
LVH						
No			1.00 (Reference)			1.00 (Reference)
Yes	2.66	0.008	1.43 (1.10-1.87)	-0.05	0.958	0.99 (0.65-1.51)
f-wave pattern						
Coarse wave pattern			1.00 (Reference)			1.00 (Reference)
Fine wave pattern	6.34	<0.001	2.66 (1.97-3.60)	5.09	<0.001	2.44 (1.73-3.44)

表4 Cox回归分析发生MACE事件的危险因素
Tab.4 Cox regression analysis of risk factors for the occurrence of MACE events

Factors	Univariate			Multivariate		
	Z value	P value	HR (95%CI)	Z value	P value	HR (95%CI)
Age	4.14	<0.001	1.03 (1.02-1.05)	2.97	0.003	1.03 (1.01-1.04)
BNP	3.70	<0.001	1.01 (1.01-1.01)	1.11	0.266	1.00 (1.00-1.00)
LAD	5.49	<0.001	1.08 (1.05-1.11)	4.06	<0.001	1.07 (1.03-1.10)
LVEF	-5.56	<0.001	0.96 (0.95-0.98)	-3.28	0.001	0.97 (0.96-0.99)
LVH						
No			1.00 (Reference)			1.00 (Reference)
Yes	4.65	<0.001	1.87 (1.44-2.44)	2.06	0.040	1.40 (1.02-1.92)
f-wave pattern						
Coarse wave pattern			1.00 (Reference)			1.00 (Reference)
Fine wave pattern	4.51	<0.001	1.95 (1.46-2.61)	3.27	0.001	1.72 (1.24-2.39)
RFCA						
No			1.00 (Reference)			1.00 (Reference)
Yes	-5.68	<0.001	0.45 (0.34-0.59)	-2.67	0.008	0.64 (0.46-0.89)

良临床事件风险更高,如进一步加重心功能不全、增加血栓栓塞的风险、使药物及手术治疗效果更差、增加病死率等。因此,筛选高危人群是必要的,并给予相应的治疗,如控制血糖血压、减肥、RFCA治疗、抑制纤维化及氧化应激等新型药物的应用等,对改善AF有积极作用^[15]。

参考文献

[1] Kawel-Boehm N, Kronmal R, Eng J, et al. Left ventricular mass

at MRI and long-term risk of cardiovascular events: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) [J]. Radiology, 2019, 293(1): 107-14. doi:10.1148/radiol.2019182871.
 [2] Shaihov-Teper O, Ram E, Ballan N, et al. Extracellular vesicles from epicardial fat facilitate atrial fibrillation [J]. Circulation, 2021, 143(25): 2475-93. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052009.
 [3] Nalliah C J, Bell J R, Raaijmakers A J A, et al. Epicardial adipose tissue accumulation confers atrial conduction abnormality [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(10): 1197-211. doi:10.

- 1016/j. jacc. 2020. 07. 017.
- [4] 朱 延, 徐 健. 心房颤动导致心肌重构的机制研究进展 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(2): 312-5. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.032.
- [4] Zhu Y, Xu J. Research progress on the mechanism of myocardial remodeling caused by atrial fibrillation [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2020, 55(2): 312-5. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.032.
- [5] 中华医学会心血管病学分会, 中国生物医学工程学会心律分会. 心房颤动诊断和治疗中国指南 [J]. 中华心血管病杂志, 2023, 51(6): 572-618. doi:10.3760/cma.j.cn112148-20230416-00221.
- [5] Chinese Society of Cardiology, China Society of Biomedical Engineering, Arrhythmia Branch. China guidelines for the diagnosis and treatment of atrial fibrillation [J]. *Chin J Cardiol*, 2023, 51(6): 572-618. doi:10.3760/cma.j.cn112148-20230416-00221.
- [6] 崔晓通, 周京敏, 徐亚妹, 等. 左心室肥厚诊断与治疗(复旦中山规范) [J]. 上海医学, 2024, 47(2): 65-73. doi:10.19842/j.cnki.issn.0253-9934.2024.02.001.
- [6] Cui X T, Zhou J M, Xu Y M, et al. Specifications for the diagnosis and treatment of left ventricular hypertrophy at Zhongshan Hospital of Fudan University [J]. *Shanghai Med J*, 2024, 47(2): 65-73. doi:10.19842/j.cnki.issn.0253-9934.2024.02.001.
- [7] Szadkowska I, Guligowska A, Jegier A, et al. Serum testosterone level correlates with left ventricular hypertrophy in older women [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 1079043. doi:10.3389/fendo.2022.1079043.
- [8] Mavrogeni S, Piaditis G, Bacopoulou F, et al. Cardiac remodeling in hypertension: clinical impact on brain, heart, and kidney function [J]. *Horm Metab*, 2022, 54(5): 273-9. doi:10.1055/a-1793-6134.
- [9] Yan W F, Gao Y, Zhang Y, et al. Impact of type 2 diabetes mellitus on left ventricular diastolic function in patients with essential hypertension: evaluation by volume-time curve of cardiac magnetic resonance [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2021, 20(1): 73. doi:10.1186/s12933-021-01262-1.
- [10] Woodiwiss A J, Libhaber C D, Majane O H, et al. Obesity promotes left ventricular concentric rather than eccentric geometric remodeling and hypertrophy independent of blood pressure [J]. *Am J Hypertens*, 2008, 21(10): 1144-51. doi:10.1038/ajh.2008.252.
- [11] Kilicaslan B, Dursun H, Aydin M, et al. The relationship between red-cell distribution width and abnormal left ventricle geometric patterns in patients with untreated essential hypertension [J]. *Hypertens Res*, 2014, 37(6): 560-4. doi:10.1038/hr.2014.39.
- [12] 郑红梅, 张 强, 杨丽红, 等. 原发性高血压患者红细胞分布宽度与左心室肥厚的相关性 [J]. 中华高血压杂志, 2021, 29(3): 245-50. doi:10.16439/j.issn.1673-7245.2021.03.008.
- [12] Zheng H M, Zhang Q, Yang L H, et al. Relationship between red blood cell distribution width and left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension [J]. *Chin J Hypertens*, 2021, 29(3): 245-50. doi:10.16439/j.issn.1673-7245.2021.03.008.
- [13] Li S N, Wang L, Dong J Z, et al. Electrocardiographic left ventricular hypertrophy predicts recurrence of atrial arrhythmias after catheter ablation of paroxysmal atrial fibrillation [J]. *Clin Cardiol*, 2018, 41(6): 797-802. doi:10.1002/clc.22957.
- [14] Xiang H, Xue Y, Chen Z, et al. The association between left ventricular hypertrophy and the occurrence and prognosis of atrial fibrillation: a meta-analysis [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 639993. doi:10.3389/fcvm.2021.639993.
- [15] McCauley M D, Iacobellis G, Li N, et al. Targeting the substrate for atrial fibrillation: JACC review topic of the week [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2024, 83(20): 2015-27. doi:10.1016/j.jacc.2024.02.050.

Analysis of risk factors in patients with nonvalvular persistent atrial fibrillation complicated with ventricular hypertrophy and construction and validation of prediction model

Liu Fang, Zheng Peiyang, Wang Huimin, Li Danni, Liang Ao, Zhao Ren

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To construct a nomogram prediction model for non-valvular persistent atrial fibrillation (PeAF) patients with left ventricular hypertrophy (LVH), followed by prognostic analysis through follow-up.

Methods This study retrospectively enrolled 949 patients with newly diagnosed and hospitalized non-valvular PeAF. Among them, 403 patients presented with LVH. The cohort was randomly stratified into a training set ($n=665$) and a validation set ($n=284$). Univariate and multivariate Logistic regression analyses were employed to identify independent risk factors for PeAF complicated by LVH. A nomogram prediction model was subsequently constructed and evaluated for discriminative ability, calibration, and clinical utility using receiver operating character-

istic (ROC) curve analysis, calibration plots, and decision curve analysis (DCA). **Results** Seven independent risk factors were ultimately identified and included in the prediction model: female sex, hypertension, diabetes, red blood cell distribution width-SD (RDW-SD), body mass index (BMI), left atrial diameter (LAD), and left ventricular ejection fraction (LVEF). The area under the ROC curve (AUC) in the training set was 0.862 (95% *CI*: 0.834–0.890), and in the validation set, it was 0.870 (95% *CI*: 0.829–0.911), demonstrating excellent predictive performance. **Conclusion** Independent risk factors for LVH in PeAF patients include female, hypertension, diabetes, RDW-SD, BMI, LAD, and LVEF. The prediction model built based on this can help early identification of PeAF patients with high risk of LVH. At the same time, the incidence of major adverse cardiovascular events (MACE) is higher in PeAF patients with LVH. Patients with atrial fibrillation combined with LVH may benefit from catheter ablation.

Key words persistent atrial fibrillation; left ventricular hypertrophy; risk factor; nomogram; major adverse cardiovascular events; recrudescence; Cox regression analysis

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82371949)

Corresponding author Zhao Ren, E-mail: zhaoren@ahmu.edu.cn

(上接第 551 页)

Preparation and hydrolytic activity analysis of dual-catalytic-triad PETase

Su Qiudong¹, Yao Xining², Qiu Feng¹, Wang Feng¹, Zhang Shuang¹, Xu Ke¹, Bi Shengli¹, Wang Yanhai¹

(¹ *NHC Key Laboratory of Medical Virology and Viral Diseases, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 102206*; ² *Beijing Beier Bioengineering Co. Ltd., Beijing 102612*)

Abstract **Objective** To prepare a recombinant PETase with a dual-catalytic-triad and to evaluate its efficiency in the biodegradation of polyethylene terephthalate (PET). **Methods** Based on the crystal structure of wild-type PETase, point mutations (T88H/L117D) were introduced *via* site-directed mutagenesis. The recombinant protein was prepared using prokaryotic expression and chromatography purification techniques. The enzymatic hydrolysis of the mutant PETase was assessed by relatively quantifying the products mono (2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET) and terephthalic acid (TPA). **Results** Both wild-type and mutant PETases accumulated as inclusion bodies, accounting for approximately 20% of the total bacterial protein. After solubilization in urea, the proteins were eluted at 300 mmol/L imidazole during affinity chromatography purification, with concentrations of 1.824 and 1.833 mg/mL and purities of 83.11% and 84.32%, respectively. Subsequent anion-exchange chromatography yielded highly pure enzymes in the 200 mmol/L NaCl fraction: 2.776 mg/mL (96.86% purity) for the wild type and 1.967 mg/mL (95.13% purity) for the mutant. Following refolding, the final concentrations were 0.484 mg/mL for the wild type and 0.991 mg/mL for the mutant. Hydrolysis assays revealed that the mutant released MHET and TPA at (237.67±17.00)% and (197.33±12.01)% of the wild-type levels, respectively. **Conclusion** The T88H/L117D dual-catalytic-triad PETase is successfully prepared and it significantly enhanced PET-degrading activity, thus, it's a promising biocatalyst for PET bioremediation.

Key words polyethylene terephthalate; hydrolase; dual catalytic triad; site-directed mutagenesis; recombinant protein; biodegradation

Fund program National Key Research and Development Program of China (No. 2023YFC2605300)

Corresponding author Wang Yanhai, E-mail: wangyh@ivdc.chinacdc.cn