

成人冠状动脉左前降支粥样硬化 斑块中检测出肺炎衣原体

雷小勇 杨永宗 杨和平 涂玉林 刘革修 张彤

(衡阳医学院心血管病研究所, 衡阳 421001)

Detection of Chlamydia Pneumoniae in the Atherosclerotic Lesions of the Coronary Left Anterior Descending Arteries of Adult Autopsy

LEI Xiao-Yong, YANG Yong-Zong, YANG He-Ping, TU Yu-Lin, LIU Ge-Xiu and ZHANG Tong
(Institute of Cardiovascular Disease, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT

Aim Detection of the relationship of Chlamydia pneumoniae infection and coronary atherosclerosis.

Methods Using three primers that recognize conserved sequence on Chlamydia major outer membrane protein genes, Chlamydia pneumoniae was detected in 32 left anterior descending branch of adult atherosclerotic coronary arteries and 7 normal coronary arteries.

Results Fourteen of 32 left anterior descending branch of atherosclerotic coronary arteries were PCR positive, positive rate was 43.75%; 7 normal coronary arteries were PCR negative, positive rate was 0%.

Conclusion There is a significant difference of chlamydia pneumoniae infection between atherosclerotic coronary arteries and normal coronary arteries.

KEY WORDS Chlamydia pneumoniae; Coronary artery atherosclerosis

摘要 为了探索肺炎衣原体感染和冠状动脉粥样硬化之间的关系,利用肺炎衣原体主要外膜蛋白基因上的保守序列设计的3条引物,通过多聚酶链反应检测32例冠状动脉左前降支粥样硬化斑块以及7例正常冠状动脉左前降支中肺炎衣原体。结果发现,32例有粥样硬化斑块的冠状动脉左前降支中有14例多聚酶链反

应阳性,阳性率为43.75%,7例正常冠状动脉中无一例阳性,阳性率为0%。结果提示肺炎衣原体在有粥样硬化冠状动脉和正常冠状动脉中存在显著差异。

关键词 肺炎衣原体; 冠状动脉粥样硬化

肺炎衣原体是引起人类急性呼吸道疾病的一个主要病原,并常导致区域性和流行性肺炎。近几年来,一些流行病学证据^[1~4]提示肺炎衣原体与冠状动脉疾病之间有联系。为了进一步探讨这两者之间的关系,本实验用多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测了正常冠状动脉和有粥样硬化斑块的冠状动脉中肺炎衣原体感染的情况,以便深入了解肺炎衣原体在动脉粥样硬化发生和发展中的作用,为临床上预防和治疗动脉硬化性疾病开辟新的可能途径。

1 材料与方法

1.1 冠状动脉的取材

所有冠状动脉标本均取自尸检冠状动脉左前降支。32例病变冠状动脉中均肉眼可见粥样硬化斑块,死者年龄除4例为30~35岁外,其余大于50岁。7例冠状动脉肉眼和显微镜下没有发现粥样硬化斑块,此为正常对照组,该组年龄为28~35岁。

1.2 试剂和酶

dNTP、Taq 酶和琼脂糖均购自 Sigma 公司,其余试剂为国产分析纯。

1.3 引物的设计与合成

参照文献[5],引物设计见表1(Table 1),由上海生物工程公司合成。

1.4 DNA 的提取

参见文献[6],从冠状动脉标本中提取真核组织细胞染色体DNA。方法略有改变,加入20 g/L的蛋白酶

K 至终末浓度为 100 mg/L, 置 50 °C 水浴 3 h 后, 再加同样量的蛋白酶 K, 50 °C 水浴 3 h, 然后继续用酚抽提等后续步骤。

Table 1. Locations and nucleotide sequences of primers in chlamydia pneumoniae-specific 474 bp PstI restriction fragment.

Primer	location	nucleotide sequence
1	29~49	CGTTGTTTCATGAAGGCCTACT
2	238~257	GTGTCATTCGCCAAGGTTAA
3	448~468	CTGCATAACCTACGGTGTGTT

1.5 多聚酶链反应扩增

首先以 Primer 1/Primer 3 引物对进行扩增, 然后取该扩增产物以 Primer 2/Primer 3 引物对进行扩增, 两次 PCR 反应条件均为: 反应总体积为 100 μ L, 其中含 10 $\times$ PCR 缓冲液 10 μ L, 10 mmol/L 的每种 dNTP 混合液 1 μ L, 15 mmol/L MgCl₂ 10 μ L, 模板 8 μ L, Taq 酶 3.5 μ L, 铺盖 100 μ L 矿物油。94 °C 预变性 4 min 后

扩增, 参数为 94 °C 45 s $\rightarrow$ 55 °C 45 s $\rightarrow$ 72 °C 45 s, 共 30 个循环。

1.6 电泳

参照文献[6], 将 2% 琼脂糖凝胶板移至电泳槽, 加入 0.5 $\times$ TBE 在电泳槽, 加适量的溴酚兰于反应液中, 吸取管底反应液加入凝胶加样孔中, 电泳见溴酚兰迁移约 7 cm, 停止电泳, 置紫外灯下观察照相。

1.7 统计分析

统计数据用计数资料的 Fisher 精确概率法分析, $P < 0.05$ 时为统计学显著差异。

2 结果

2.1 用 Primer 1/Primer 3 引物对作 PCR 扩增的产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳发现在 32 例粥样硬化斑块的冠状动脉中, 有 14 例显示出特异性 439 bp DNA 条带(图 1, Figure 1) 其余 18 例未见特异性带, 在 7 例无粥样硬化斑块的冠状动脉中无 1 例显示特异性带。

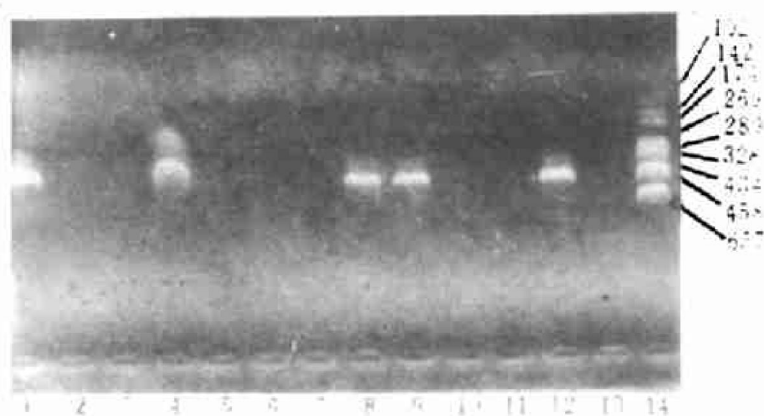


Figure 1. PCR products using Primer 1/Primer 3 (2% agarose gel). Lane 1, 4, 8, 9, 12 amplification products; 439 bp; lane 14: pGEM-7zf(+) Hae Marker.

2.2 用 Primer 2/Primer 3 引物对作第二次 PCR 扩增的产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳发现经第一次 PCR 扩增是阳性的标本, 这次扩增仍然出现特异性 230 bp DNA 条带(图 2, Figure 2) 其余 18 例未见特异性带, 在 7 例无粥样硬化斑

块的冠状动脉中无 1 例显示特异性带。检测出的肺炎衣原体在有粥样硬化斑块的冠状动脉和无粥样硬化斑块的冠状动脉中存在着显著性差异($P < 0.05$)(表 2, Table 2)。

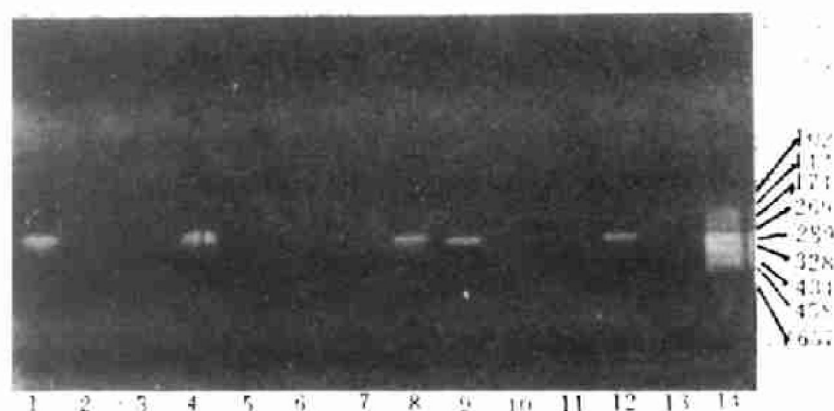


Figure 2. PCR products using Primer 2/Primer 3 (2% agarose gel). Lane 1, 4, 8, 9, 12 amplified products; 230 bp; lane 14: pGEM-7zf(+)-Hae Marker.

Table 2. Comparison of chlamydia pneumoniae positive rate between atherosclerotic coronary arteries and no atherosclerotic coronary arteries.

Groups	Total	Positive	Positive rate(%)
ACA	32 ^a	14 ^a	43.75 ^a
NACA	7	0	0

ACA: atherosclerotic coronary arteries; NACA: no atherosclerotic coronary arteries. a: $P < 0.05$, compared with NACA group.

3 讨论

冠状动脉粥样硬化是目前危害人类健康最严重的疾病之一,其发病机制尚未完全清楚。目前已知的致动脉粥样硬化性心脏病的危害因素较多,有高胆固醇血症、高血压、吸烟、糖尿病、家族遗传和疱疹病毒感染等,肺炎衣原体作为一个新认识的呼吸道病原体除了引起肺炎、支气管炎和心内膜炎等疾病以外,最近的研究显示,肺炎衣原体与冠状动脉粥样硬化的发生有联系。Shor 与 Kuo^[2,8]等相继在尸检的冠状动脉粥样硬化病灶中得到了血清学、免疫组化染色和电镜形态等肺炎衣原体存在的证据,提示肺炎衣原体在动脉粥样硬化形成的过程中起着一定的作用。

Campbell 等^[3]发现肺炎衣原体所独有而其它两种所无的 DNA 片段,是 PstI 酶切的 474

bp 核酸片段,他们根据基因库的分析,G+C 的比例和次数结构确定所用的两对引物是 HL-1-HR-1 和 HM-1-HR-1,所有被测试的肺炎衣原体分离物均能被这两对引物所扩增,分别扩增成预期的 439 和 230 bp 的片段大小。本实验利用肺炎衣原体基因上特有的这段保守系列,对 HL-1 和 HR-1 两对引物作了改进,在 HL-1 引物的 5'端增加了一个碱基 C,在 HR-1 引物 5'端增加了一个碱基 C,以增加 PCR 扩增的特异性,在同一有粥样硬化斑块上扩增相应的 439 bp 和 230 bp 的特异性带。

本实验用 PCR 扩增的结果进一步证实:肺炎衣原体感染与冠状动脉粥样硬化存在着联系,但其深层的机制还有待于进一步探讨。如能确认肺炎衣原体感染像血浆高胆固醇那样在动脉粥样硬化过程中起着病因作用的话,那么就将为动脉粥样硬化的预防和治疗开辟一条新的途径。

参考文献

- 1 Saikku P, Mattila K, Nieminen MS, et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia TWAR with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet*. 1988; 2: 983~986.
- 2 Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, et al. Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coro-

- nary heart disease in the helsinki heart study. *Ann Intern Med*, 1992, **116**: 273~278.
- 3 Thom DH, Wang SP, Grayston JT, et al. Chlamydia pneumoniae strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb*, 1991, **11**: 547~551.
 - 4 Thom DH, Grayston JT, Sisonidk DS, et al. Association of prior infection with Chlamydia pneumoniae and angiographically demonstrated coronary artery disease. *JAMA*, 1992, **268**: 68~72.
 - 5 Campbell LA, Melgosa MP, Hamilton DJ, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae by polymerase chain reaction. *J Clinical Microbiol*, 1992, **30**: 434~439.
 - 6 卢圣栋(主编). 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993.
 - 7 Shor A, Kuo CC, Patton DL. Detection of Chlamydia pneumoniae in the coronary artery atheroma plaque. *S African Med J*, 1992, **82**: 158~161.
 - 8 Kuo CC, Shor A, Campbell LA, et al. Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis*, 1993, **167**: 841~849.
- (1997-11-10 收到, 1997-12-08 修回)

第五届全国脂蛋白学术会议和第五届全国动脉粥样硬化学术会议 1998 年 5 月在杭州举行

中国分子生物学和生物化学学会脂蛋白专业委员会和中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会决定于 1998 年 5 月 18 日至 22 日在浙江杭州联合召开第五届全国脂蛋白学术会议第五届全国动脉粥样硬化学术会议。两会统一由浙江中医学院分子医学研究所负责筹备。会议主要内容有:

- 1 国内脂蛋白研究和动脉粥样硬化研究专家作专题报告;
- 2 介绍第十一届国际动脉粥样硬化会议情况;
- 3 特邀外国专家作学术报告;
- 4 驻海外的有关专家作学术报告;
- 5 分组学术交流。

学术会议期间,还将进行会员代表大会等其他活动。参加四天会议者,需交纳会务注册与资料费 580 元,另收伙食费 60 元;参加五天会议者,需交纳会务注册与资料费 680 元,另收伙食费 75 元。

会议征文早已开始,征文格式请参照《中国动脉硬化杂志》论著摘要的撰写格式,每篇摘要不超过 800 字。

会议筹备组已于 1997 年 12 月 5 日发出第二轮通知,供催稿和代表了解会议情况用,正式通知将于 3 月上旬发出。

如有不清楚事项,请与以下地址联系:

邮编:310009

浙江中医学院分子医学研究所

沃兴德教授 或 金明敏教授

E-mail:woxdfapublic.hz.zj.cn

传真:0571-7044693

电话:0571-7044693,7046721,7046914-213