

冠心病患者外周血白细胞脂蛋白脂酶 mRNA 的表达

张晓刚, 陈运贞

(重庆医科大学附属第一医院心内科, 重庆 400016)

[主题词] 冠状动脉疾病; 动脉粥样硬化; 脂蛋白脂酶; 白细胞; 患者

[摘要] 为探讨冠心病患者外周血白细胞脂蛋白脂酶 mRNA 表达与冠状动脉病变程度的关系及意义。用冠状动脉造影后半定量分析获得冠状动脉病变程度, 外周血白细胞脂蛋白脂酶 mRNA 表达用逆转录聚合酶链反应测定。结果发现, 冠心病患者各组及正常对照组外周血白细胞中均能检测到特异的脂蛋白脂酶 mRNA 逆转录聚合酶链反应产物, 各组间脂蛋白脂酶 mRNA 逆转录聚合酶链反应产物测定值差异无显著性 ($P > 0.05$); 冠心病患者中, 血甘油三酯水平高者, 与甘油三酯水平正常者比较, 脂蛋白脂酶 mRNA 逆转录聚合酶链反应产物测定值差异无显著性 ($P > 0.05$); 冠心病患者用肝素前后各组脂蛋白脂酶 mRNA 逆转录聚合酶链反应产物测定值差异无显著性 ($P > 0.05$); 用肝素后只有血甘油三酯水平低于用肝素前 ($P < 0.05$)。结果提示外周血白细胞脂蛋白脂酶 mRNA 表达与冠状动脉病变程度无关; 肝素无刺激外周血白细胞脂蛋白脂酶 mRNA 表达的作用。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Circulating Human Lipoprotein Lipase mRNA in Patients with Coronary Atherosclerotic Disease

ZHANG Xiaogang, and CHEN Yur Zhen

(Department of Cardiology, the First Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016; China)

MeSH Coronary Disease; Atherosclerosis; Lipoprotein Lipase; Leukocytes; Patients

ABSTRACT **Aim** To investigate the relation between the expression of lipoprotein lipase mRNA and the different clinical class or severity of coronary atherosclerosis. **Methods** A total of 34 patients with coronary atherosclerosis and 10 healthy subjects underwent coronary angiography. There were 12 patients with a light coronary atherosclerosis (diameter stenosis $< 40\%$) (Group 1), 11 patients with moderate coronary atherosclerosis (diameter stenosis 40%-80% in only one coronary artery) (Group 2), 11 patients with severe coronary atherosclerosis (diameter stenosis $> 80\%$ in one or more coronary artery) (Group 3), 10 healthy subjects with normal coronary angiography (Group 5). Group 4 included 11 patients were on heparin. Circulating human lipoprotein lipase mRNA was detected by RT-PCR in all patients and healthy subjects. **Results** There was no statistic difference in any groups. There was no statistic difference between 21 patients with high serum triglyceride level and 13 patients with normal serum triglyceride level, between Group 3 and Group 4 ($P > 0.05$). But the serum triglyceride level in Group 3 was higher than in Group 4 ($P < 0.05$). **Conclusion** The similar expression of circulating human lipoprotein lipase mRNA is in healthy and patients with coronary atherosclerotic disease, who have different serum lipid level and severity of coronary stenosis. The expression of lipoprotein lipase mRNA is not stimulated by heparin.

血甘油三酯升高是冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary atherosclerotic heart disease, CAD) 的独立危险因素, 脂蛋白脂酶 (lipoprotein lipase, LPL) 是血浆中甘油三酯分解代谢的关键酶; 动脉壁内单核-巨噬

细胞膜上 LPL 在泡沫细胞转化过程中起着重要促进作用^[1-3]。LPL 基因转录调控、LPL 分布、LPL 生物活性等变化, 对动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生发展密切相关。冠心病患者外周血白细胞中 LPL mRNA 表达强度与冠状动脉病变程度的关系及意义是本实验的目的。

[作者简介] 张晓刚 男, 1957 年 10 月出生, 四川人, 副主任医师, 副教授。联系电话 023-688815121 (宅), 023-69012263 (办); E-mail: a68703520@online.cq.cn。陈运贞, 女, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 中华医学会重庆市分会常务理事, 重庆市心血管专业委员会主任委员。

1 资料和方法

1.1 研究对象与分组

冠心病诊断以世界卫生组织 1979 年规定“缺血性心脏病的命名法及诊断标准”为依据。冠心病患者为 1999 年 12 月至 2001 年 6 月住院病人,共 34 例,男 21 例,女 13 例,年龄 68.2 ± 8.3 岁。冠状动脉造影所示血管狭窄(%)为:1- 狭窄段血管最小直径 \div 临近正常血管直径 $\times 100\%$ 。血管狭窄 $< 40\%$ 者为 1 组,计 12 例;以单支血管病变为主,血管狭窄程度为 $40\% \sim 80\%$ 者为 2 组,计 11 例;有 1 支以上血管病变,血管狭窄程度有 $> 80\%$ 的节段者为 3 组,计 11 例;3 组病人用肝素治疗后采集标本者为 4 组,计 11 例。肝素使用方法为,首先静脉注射达到肝素化,以后每天用低分子肝素钠 0.4 mL 皮下注射一次,2 天后采集标本。非冠心病自愿者为正常对照组,计 10 例,年龄 62.2 ± 9.1 岁,冠状动脉造影未发现血管病变。

1.2 外周血白细胞特异脂蛋白脂酶 mRNA 逆转录聚合酶链反应产物测定

各组于素食后采空腹静脉血检测外周血白细胞特异的 LPL mRNA 逆转录聚合酶链反应产物。

1.2.1 白细胞分离 取 EDTA 抗凝静脉血 5 mL,用淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)分离白细胞,室温下 $1\ 600 \times g$ 离心 30 min,淋巴细胞分离液与抗凝血比例为 2:1。白细胞层用无钙镁磷酸缓冲液洗 3 次备用。

1.2.2 总 RNA 分离 8×10^6 白细胞加入 TRIZOL (上海生物工程公司产品) 1 mL,反复吹打细胞, $15 \sim 30^\circ\text{C}$ 放置 5~10 min。加入 0.2 mL 氯仿,用力震摇 15 s, $15 \sim 30^\circ\text{C}$ 放置 2~3 min,离心 $12\ 000 \times g$, 4°C , 15 min。取上层水相加入等量异丙醇(约 0.5 mL),颠倒混匀, -20°C 放置 2 h。离心 $12\ 000 \times g$, 4°C , 10 min。弃上清用 75% 乙醇(DEPC 水稀释无水乙醇) 1 mL 溶解沉淀,离心 $7\ 000 \times g$, 4°C , 5 min。弃上清,沉淀即为总 RNA,干燥。在 55°C 用无 RNA 酶双蒸水 20 μL 溶解 RNA 10 min。取 1 μL 稀释液用分光光度计测定 RNA 纯度和含量。每份标本 OD_{260/280} 比值大于 1.5,同时计算 RNA 含量,按 OD₂₆₀=1 的 RNA 溶液每毫升含 40 μg RNA 计算。将所提取的 RNA 在 160 V、2% 琼脂糖凝胶电泳 10 min,紫外光下可见 28S、18S 和 5S 三条带。RNA 保存于 -80°C 备用。

1.2.3 RNA 逆转录合成 cDNA RNA 5 μg 中加入寡聚核苷酸引物 oligo(dT) 18 0.5 μg ,用无核酸酶双蒸水调节体积到 12 μL , 70°C 水浴 5 min,加入 $5 \times$ 逆转录缓冲液 4 μL ,核酸酶抑制剂 20 u, 10 mmol/L dNTP 混合液 2 μL , 37°C 孵育 5 min 后加入 M-MuLV 逆转录酶 100 u,总体积为 20 μL ,加入液体石蜡 5

μL , 37°C 孵育 1 h,最后在 70°C 水浴 10 min 终止反应。cDNA 储存于 -20°C 。

1.2.4 聚合酶链反应扩增 LPL 基因片段 上下游引物各 1 μL (含寡核苷酸 200 ng), 2.5 μL dNTP(10 mmol/L), 2.5 μL MgCl₂ 液(50 mmol/L), $10 \times$ PCR 缓冲液 2.5 μL , 0.5 μL Taq DNA 聚合酶(5 Mu/L)(以上试剂购于上海生物工程公司),加入 cDNA 2.5 μL 为模板,用双蒸水补足反应体积至 25 μL 。用 PCR 仪(Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 9600)进行目的基因片段扩增。 94°C 5 min 解聚, 94°C 1 min, 55°C 45 s, 72°C 1 min,共 35 个循环。 72°C 7 min 使 DNA 延伸。 4°C 保存。所用 LPL 特异引物序列是, LPL-1 为 5'-GAG ATT TCT CTG TAT GGC AC-3',位于外显子 7 中; LPL-2 为 5'-CTG CAA ATG AGA CAC TTT CTC-3',位于外显子 9 中。所扩增片段长度为 275 bp,含一个完整的外显子 8。为了说明所分离 RNA 的完整性,同时扩增了 β -actin 838 bp 的 DNA 片段做内参照。人 β -actin 基因引物序列是: 5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG-3' (上游引物); 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3' (下游引物)。反应体系中试剂和 cDNA 模板用量与 LPL 基因扩增相同,使用反应条件为 94°C 4 min 一个循环, 94°C 1 min, 55°C 2 min, 72°C 3 min,共 30 个循环, 72°C 10 min 一个循环。终止反应后放 4°C 保存。对照实验用无 RNA 酶的双蒸水代替 RNA 和/或 cDNA 模板进行逆转录和/或 PCR 实验。敏感性实验将外周血白细胞从 8×10^1 至 8×10^7 个细胞进行稀释后实验,选择 8×10^6 个细胞作为标准实验,其干扰小,敏感性好。

1.2.5 聚合酶链反应产物电泳 聚合酶链反应(PCR)产物在含 EB(溴乙锭)2% 的琼脂糖/TBE 胶上 70 V 电压下电泳 50 min,在凝胶成像仪下观察分析,Pharmacia LKB 紫外光密度扫描系统比较各标本光密度值,以相对定量 PCR 产物。

1.3 血脂检测

各组于素食后采空腹静脉血,血总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)测定均用氧化酶法,试剂盒购于科华公司(日立 7020 专用包装)。高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)用磷钨酸-镁法,为日本第一化学株式会社试剂盒。用日立 7170A 全自动生物化学分析仪进行自动检测。低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)由 Friedwald 公式计算: $\text{LDLC} = \text{TC} - \text{HDLC} - \text{TG}/2.2$

1.4 统计学处理

用软件 SAS 系统处理所获数据, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用 t 检验。

2 结果

冠心病患者各组及正常对照组外周血白细胞中均能检测到特异的 LPL mRNA 逆转录—聚合酶链反应产物(图 1 和图 2, Figure 1 and 2), 且各组间 LPL mRNA 逆转录—聚合酶链反应产物测定值差异无显著性($P > 0.05$); 冠心病患者中, 血甘油三酯水平高

于正常者 21 例(TG 为 3.29 ± 0.84 mmol/L) 与血甘油三酯在正常范围内的患者 13 例(TG 为 1.26 ± 0.72 mmol/L) 之间 LPL mRNA 逆转录—聚合酶链反应产物测定值差异无显著性($P > 0.05$); 3 组多支血管病变患者与用肝素后即 4 组比较, 外周血白细胞特异的 LPL mRNA 逆转录—聚合酶链反应产物测定值差异无显著性($P > 0.05$), 然而 4 组血甘油三酯水平低于 3 组, 差异有显著性($P < 0.05$)。各组血脂检测结果如表 1(Table 1) 所示。

表 1. 各组血脂测定结果($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 1. Serum lipid level of subjects with coronary atherosclerosis and normal

Groups	n	TC	TG	HDL	LDL
Control	10	4.25 ± 0.71	1.28 ± 0.85	1.31 ± 0.18	2.56 ± 0.57
Group 1	12	5.29 ± 0.54^a	4.38 ± 0.87^a	1.06 ± 0.20^a	2.62 ± 0.61
Group 2	11	4.52 ± 0.82	1.94 ± 0.91	1.28 ± 0.29	2.52 ± 0.73
Group 3	11	5.08 ± 0.73	2.38 ± 0.86	1.19 ± 0.40	2.89 ± 0.49
Group 4	11	4.86 ± 0.82	1.34 ± 0.82^b	1.16 ± 0.12	2.62 ± 0.38

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with Group 3. Group 1: subjects with a light coronary atherosclerosis (diameter stenosis 40%); Group 2: subjects with moderate coronary atherosclerosis (diameter stenosis 40% ~ 80% in only one coronary artery); Group 3: subjects with severe coronary atherosclerosis (diameter stenosis 80% in one or more coronary artery); Group 4: subjects included patients on heparin.

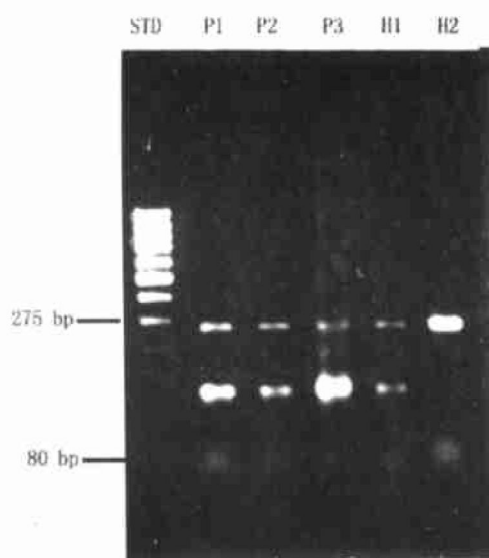


图 1. 外周血白细胞脂蛋白脂酶 mRNA 逆转录—聚合酶链反应产物

Figure 1. RT-PCR products of lipoprotein lipase mRNA in peripheral blood. NC: negative control; STD: 100 bp DNA Ladder; Pn: patients; Hn: healthy volunteers

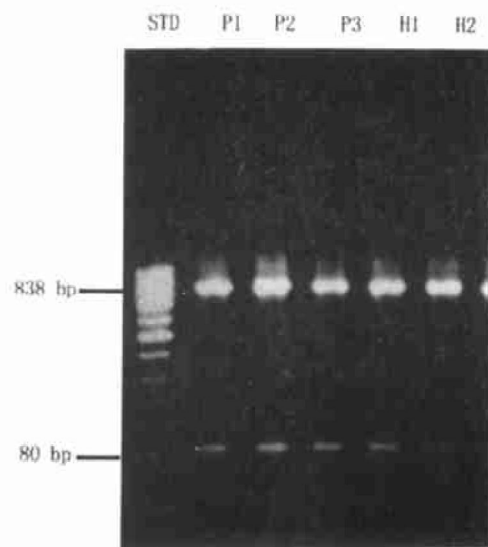


图 2. 外周血白细胞 β -actin mRNA 逆转录—聚合酶链反应产物

Figure 2. RT-PCR products of β -actin mRNA in peripheral blood. NC: negative control; STD: 100 bp DNA Ladder; Pn: patients; Hn: healthy volunteers

3 讨论

动脉粥样硬化病灶内存在大量富含脂质的泡沫细胞,泡沫细胞主要来自血中的单核细胞。单核细胞进入血管内膜后转变为巨噬细胞。极低密度脂蛋白(very LDL, vLDL)和LDL不断进入细胞,大量脂质沉积于细胞内形成泡沫细胞。在这一过程中,细胞膜上LPL与各种脂蛋白发生了结合而不能对其水解,将脂蛋白“锚定”于细胞表面,促进脂蛋白进入细胞内^[1]。Mattsson等^[4]发现血管壁内巨噬细胞和泡沫细胞LPL mRNA表达上调。血管腔内单核细胞合成的LPL一部分释放于细胞外水解甘油三酯;一部分与细胞膜上的硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulphate proteoglycans, HSPG)结合,在脂蛋白与细胞膜上的脂蛋白受体间起“桥梁”作用。本实验检测了冠状动脉粥样硬化病变程度不同患者外周血白细胞LPL mRNA表达强度,发现各组病人与健康人对照无差异,结果提示外周血白细胞LPL mRNA表达与冠状动脉粥样硬化病变程度无相关性。目前尚未见同类报道。

34例冠心病患者中,有21例血TG水平高于正常值,13例患者TG水平在正常值范围内,这两组病人外周血白细胞LPL mRNA表达水平相似。提示LPL基因缺陷的人,外周血白细胞LPL mRNA表达水平与TG水平无关。

细胞膜上的LPL结合于HSPG,肝素与LPL的亲合力是HSPG与LPL亲和力的40倍,肝素可将LPL从细胞膜HSPG的结合位点争夺出来^[5],静脉注射肝素后血浆中LPL活性明显增加,对TG的降解作用增强。本实验中用肝素治疗后的冠心病患者血TG水平明显低于用肝素前,与报道相似。用肝素治疗前后外周血白细胞LPL mRNA表达水平无差异,提示血TG水平与LPL分布有关,与LPL基因表达的关系相对较小。也说明肝素无刺激LPL mRNA表达的作用。目前报道LPL mRNA表达可受多种因素

影响,如高浓度葡萄糖^[6]和胰岛素^[7]诱导细胞LPL mRNA表达水平上调;肿瘤坏死因子 α 可使细胞LPL mRNA表达水平降低^[8]等。

脂蛋白脂酶(LPL)基因是冠心病相关基因,本实验在不同病情冠心病患者外周血白细胞中未观察到LPL基因表达的差异性,可能与实验本身有关,如病例数少、所用RT-PCR方法为半定量,也可能LPL基因表达的差异性在不同的细胞有不同,这有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Babaev VR, Fazio S, Gleaves LA, et al. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo [J]. *J Clin Invest*, 1999, **103** (12): 1 697-705
- [2] Mead JR, Cryer A, Ramji DP. Lipoprotein lipase, a key role in atherosclerosis [J]. *FEBS Lett*, 1999, **462** (1-2): 1-6
- [3] Skoczynska A. Lipoprotein lipase (LPL) in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 1998, **52** (4): 347-365
- [4] Mattsson L, Johansson H, Ottosson M, et al. Expression of lipoprotein lipase mRNA and secretion in macrophage isolated from human atherosclerotic aorta [J]. *J Clin Invest*, 1993, **92**: 1 759-765
- [5] Sendak RA, Melford K, Kao A, et al. Identification of the epitope of a monoclonal antibody that inhibits heparin binding of lipoprotein lipase: new evidence for a carboxyl-terminal heparin-binding domain [J]. *J Lipid Res*, 1998, **39** (3): 633-646
- [6] Sartippour MR, Lambert A, Laframboise M, et al. Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production [J]. *Diabetes*, 1998, **47** (3): 431-438
- [7] Ramos P, Martin-Hidalgo A, Herrera E. Insulin induced up regulation of lipoprotein lipase messenger ribonucleic acid and activity in mammary gland [J]. *Endocrinology*, 1999, **140** (3): 1 089-093
- [8] Tengkur-Muhammad TS, Cryer A, Ramji DP. Synergism between interferon gamma and tumour necrosis factor alpha in the regulation of lipoprotein lipase in the macrophage J774. 2 cell line [J]. *Cytokine*, 1998, **10** (1): 38-48

(此文2001-02-10收到,2001-09-20修回)

(此文编辑 胡必利)