

[文章编号] 1007-3949(2004)12-05-0581-04

•临床研究•

# 冠心病患者外周血白细胞血红素氧合酶 1 的表达与冠状动脉病变程度有关

陈宋明, 李玉光, 王东明, 卢成志

(汕头大学医学院附属第一医院心内科, 广东省汕头市 515041)

[关键词] 内科学; 血红素氧合酶 1 表达; 方法, 免疫组织化学; 白细胞; 冠状动脉病变程度

[摘要] 为观察血红素氧合酶 1 与冠心病患者冠状动脉病变的关系, 将经冠状动脉造影最少有一支血管狭窄  $\geq 50\%$  的冠心病患者 136 例纳入该研究, 并选择冠状动脉造影正常的 40 例患者作为对照组。按照病变处斑块的形态分为 iv 型病变组 53 例、㊶型病变组 70 例和 ㊷型病变组 13 例。利用免疫组织化学方法对冠心病患者外周血单个核细胞中血红素氧合酶 1 的表达进行定位分析, 并通过计算机图像分析系统分析血红素氧合酶 1 表达的程度及强度。通过 Western blot 病变组血红素氧合酶 1 表达明显高于冠状动脉正常组 ( $P < 0.01$ ); iv 型病变、㊶型病变和 ㊷型病变组的血红素氧合酶 1 表达水平存在明显差异 ( $P < 0.01$ ), 且随着病变程度加重, 血红素氧合酶 1 表达水平升高。推测血红素氧合酶 1 表达水平与冠心病严重程度有关。

[中图分类号] R541.3

[文献标识码] A

## Heme Oxygenase-1 Expression in Circulating White Blood Cells from the Patients with Coronary Heart Disease Associated with angiographic morphology of coronary lesions

CHEN Song-Ming, LI Yu-Guang, WANG Dong-Ming, and LU Cheng-Zhi

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Medical College, Shantou University, Shantou, Guangdong 515041, China)

[KEY WORDS] Heme Oxygenase-1; Expression; Coronary Angiographic Morphology

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the Association between heme oxygenase-1 (HO-1) and angiographic morphology of coronary lesions in patients with coronary heart disease (CHD). **Methods** One hundred and thirty-six patients with coronary heart disease who underwent coronary angiography were selected in this study, and 40 patients with normal coronary artery were selected as control. According to angiographic morphology of coronary lesions, these patients were split into type I (smooth borders) group ( $n=53$ ), type ㊶ (irregular borders) group (70) and type ㊷ (long and irregular lesions) group ( $n=13$ ). The levels of HO-1 protein expression in monocyte and lymphocyte coming from patients with CHD were tested by immunohistochemistry and western blot. Computer picture analyzing system were also used to measure the levels of HO-1 protein expression. **Results** HO-1 protein is located in cell plasma; levels of HO-1 protein expression in patients with coronary heart disease were significantly higher than those of the controls ( $P < 0.01$ ); levels of HO-1 protein expression were the highest in type ㊷ group, then type ㊶ group, and at last the type I group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** There is a higher expression of HO-1 in patients with CHD, the levels of HO-1 protein are associated with angiographic morphology of coronary lesions, suspecting that HO-1 is associated with severity of coronary heart disease.

血红素氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 将血红素分解成为一氧化碳、胆红素和铁。胆红素是机体内清除过氧化脂质和超氧自由基的重要生理抗氧化物质, 能抗缺血/再灌注损伤, 胆红素的含量与冠心病的发病率呈负相关<sup>[1,2]</sup>。作为心血管常见疾病, 冠心病患者 HO-1 的表达水平与冠状动脉病变的关系国内外鲜有报道。本文通过检测冠心病患者外周

血单个核细胞 HO-1 的表达与冠状动脉病变形态的关系, 为进一步探索通过如何调节 HO-1 的表达应用于临床提供理论依据。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

将本院 2002 年 6 月至 2003 年 12 月经冠状动脉造影确诊 (冠状动脉造影显示左主干、左前降支、左回旋支、右冠状动脉 4 支血管中至少 1 支直径狭窄程度  $\geq 50\%$ ) 的冠心病病人列入研究对象, 共有 136 例, 其中男性 112 例, 女性 24 例, 年龄 40~78 岁 ( $62.5 \pm 10.5$  岁)。同时记录患者的高血压、糖尿病、高

[收稿日期] 2004-04-04 [修回日期] 2004-09-06

[基金项目] 广东省医学科学研究基金 (A2004414) 资助

[作者简介] 陈宋明, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向为心血管临床研究, 联系电话 13502988598, E-mail 为 csm1002@126.com。李玉光, 博士后, 主任医师, 教授, 博士研究生导师。王东明, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 专长心电图生理研究和心导管技术。

血脂、心肌梗死病史。选择冠状动脉造影正常的 40 例患者为对照组, 年龄 42~68 岁 ( $61.5 \pm 9.7$  岁)。所有研究对象检查前 4 周无感染外伤史。

## 1.2 冠状动脉造影与病变分型

采用飞利浦 H5000 型 X 线数码造影机, 利用 Jukin's 法行冠状动脉造影, 每例患者均经多体位照射刻录 VCD, 造影结果由两位有经验的医生分析完成。参照文献[3], 按斑块的形态分为 3 型: 表面光滑且基底部宽的病变为 iv 型; 表面不光滑(凹凸不平、火山口样、龛影)或表面虽光滑, 但基底部窄的病变为 ㊟型; 长段不规则狭窄病变为 ㊤型。结果发现, iv 型病变 53 例, ㊟型病变 70 例, ㊤型病变 13 例。

## 1.3 外周血单个核细胞的分离

参照文献[4]。取研究对象空腹外周抗凝血 10 mL, 用 Hank's 液稀释一倍后加于 10 mL 单个核细胞分离液上(天津中国科学院生物医学工程研究所), 2 kr/min 离心 20 min, 吸取单个核细胞层, 用 Hank's 液冲洗 3 次(1.2 kr/min), 取沉淀物涂片 3 张(载玻片用 APES 预处理以防脱片), 凉干后冷丙酮固定, 4℃保存以备做免疫组织化学。剩余沉淀物用 DMEM 冻存液-80℃保存, 以备做 Western blot。

## 1.3 血红素氧合酶 1 的免疫组织化学测定

利用免疫组织化学二步法检测 HO-1 的表达。用 0.3%  $H_2O_2$  一丙酮液, 37℃孵育 30 min 后 PBS 液洗, 滴加 10% 正常山羊血清封闭, 37℃孵育 30 min 后 PBS 液洗, 按 1:400 稀释度滴加一抗(兔多克隆抗 HO-1, 美国 ALEXIS 公司)4℃过夜, PBS 液洗。滴加生物素标记的羊抗兔二抗(1:200 羊抗兔 IgG, 武汉博士德公司), 37℃孵育 30 min PBS 液洗, 再加 3, 3'-二氨基苯联胺(DAB)染色, 苏木素复染、封片。细胞浆呈现褐色或褐色颗粒为阳性细胞。阴性对照以 PBS 液代替一抗, 其余步骤相同。利用 HPIAS-1000 图像分析软件, 对 HO-1 表达水平进行定量分析, 以平均每个细胞中阳性物质的面积表示表达的程度, 以本底平均灰度与阳性物质平均灰度之差(平均灰度差)的绝对值表示 HO-1 表达的强度。

## 1.4 Western blot 印迹

应用单去污剂裂解单个核细胞 20 min 后, 12 kr/min 离心取上清液, 利用 BCA(bicinchoninic acid)法测定蛋白含量, 以上样缓冲液稀释后沸水中煮沸 5 min, 蛋白上样量为 50  $\mu$ g, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 再进行蛋白质的电转移, 5% 脱脂奶粉 4℃封闭过夜。将膜泡于含 HO-1 一抗的新鲜配制的 5% 脱脂奶粉溶液中(一抗稀释度 1:400), 室温下孵育 2 h, TBST 液洗膜 2 次, TBS 洗一次, 将膜覆盖在 5% 脱脂

奶粉稀释的二抗上(鼠抗兔, 北京中山试剂公司, 二抗稀释度 1:500), 室温下反应 2 h。TBST 和 TBS 洗膜后进行发光(发光试剂, 北京中山试剂公司), X 光片经显影定影后凉干待检。

将 Western blot 结果扫描进计算机, 再用 Sigmapro 自动图象分析软件对 HO-1 光带进行分析, 以光带的灰度峰值代表 HO-1 的表达量。

平均面积: 平均每个细胞中阳性物质的面积; 平均灰度差: 背景平均灰度与阳性物质平均灰度之差的绝对值。

## 1.6 统计学分析

所有数据利用 SPSS10.0 统计软件分析, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异用单因素方差分析, 再用  $q$  检验进行两两比较, 实验组与对照组之间比较用  $t$  检验。  $P \leq 0.05$  为差别具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 三组冠状动脉病变一般情况及冠心病危险因素的比较

三组冠状动脉病变一般情况及冠心病危险因素见表 1(Table 1)。可见三组间高血压、糖尿病、高血脂、心肌梗死史病例构成及性别构成差异比较无统计学意义( $P > 0.05$ ), 三组年龄也无差异( $P > 0.05$ )。

表 1. 冠状动脉病变组一般情况及冠心病危险因素的比较 ( $n=136$ )

Table 1. Comparison of general condition and risk factors in type I, type ㊟ and type ㊤group

参 数	iv 型病变组	㊟型病变组	㊤型病变组
例数	53	70	13
年龄(岁)	$61.5 \pm 8.9$	$63.1 \pm 9.5$	$62.3 \pm 8.4$
性别(女/男)	10/44	14/56	3/10
高血压(例)	26	35	7
糖尿病(例)	11	14	3
高血脂(例)	19	26	5
心肌梗死史(例)	1	2	2

### 2.2 免疫组织化学检测结果

免疫组织化学检测及图象分析结果见图 1 和表 2(Figure 1 and Table 2)。可见冠状动脉正常组外周血单个核细胞胞浆几乎没有 HO-1 表达, 冠心病患者却有较强的 HO-1 表达(与对照组比较  $P < 0.01$ ), ㊤病变组的 HO-1 表达水平明显高于 ㊟型病变组,

⊕型病变组又高于 iv型病变组( $P < 0.01$ )。

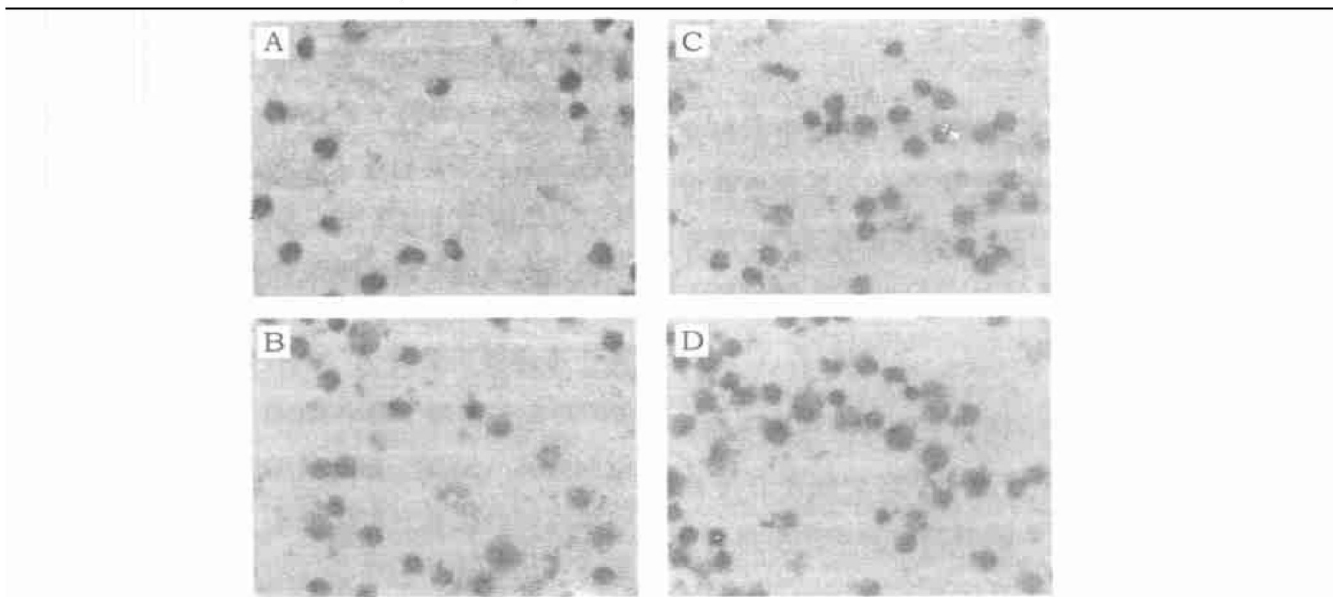


图 1. 各组血红素氧合酶 1 免疫组织化学染色结果(1:400) A 为对照组, B 为 iv 型病变组, C 为 ⊕ 型病变组, D 为 ⊗ 型病变组。

Figure 1. Mmunohistochemistry results of HO-1 in type iv, type ⊕, type ⊗ group and control group

表 2. 不同冠状动脉斑块血红素氧合酶 1 的表达( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. HO-1 expression level in the four groups

分 组	例数	平均面积	平均灰度差	蛋白带灰度峰值
对照组	40	12.7 ± 2.5	25.7 ± 9.5	10.5 ± 1.4
iv 型病变组	53	36.8 ± 6.7 <sup>a</sup>	53.4 ± 12.6 <sup>a</sup>	30.6 ± 2.1 <sup>a</sup>
⊕ 型病变组	70	48.8 ± 5.8 <sup>ab</sup>	71.8 ± 10.5 <sup>ab</sup>	42.3 ± 2.5 <sup>ab</sup>
⊗ 型病变组	13	62.3 ± 7.8 <sup>acd</sup>	93.8 ± 12.4 <sup>acd</sup>	77.6 ± 8.9 <sup>acd</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , c:  $P < 0.01$ , 与 iv 型病变组比较; d:  $P < 0.01$ , 与 ⊕ 型病变组比较。

### 2.3 蛋白印迹结果

电泳结果蛋白印迹电泳及图象分析结果见图 2 和表 2 (Figure 2 and Table 2)。可见对照组 HO-1 蛋白带显影不明显, 冠心病各组 HO-1 蛋白带显影清楚, 以 ⊗ 型病变组最明显, ⊕ 型病变组次之, iv 型病变组较弱。

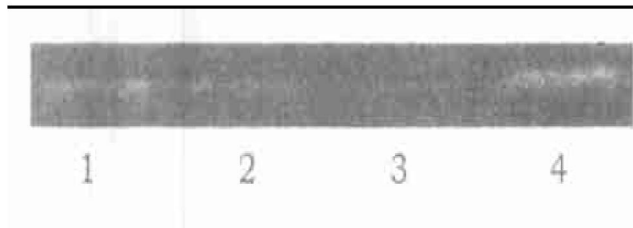


图 2. 各组血红素氧合酶 1 蛋白印迹电泳结果. 1 为 ⊕ 型病变组, 2 为 iv 型病变组, 3 为对照组, 4 为 ⊗ 型病变组。

Figure 2. Results of western blot in the four groups

### 3 讨论

实验结果发现, 冠状动脉病变组 HO-1 表达明显高于冠状动脉正常组; 而冠状动脉病变组内部也

存在差异: ⊗ 型病变组 HO-1 表达明显高于 ⊕ 型病变组及单支病变组, ⊕ 型病变组 HO-1 表达又高于 iv 型病变组。不管是通过免疫组织化学方法检测, 还是通过较为灵敏的 Western blot, 都得出同样的结论。

血红素氧合酶(HO)有 HO-1、HO-2 和 HO-3 三种同功酶, 其中 HO-1 为可诱导型, 分子质量 32 kDa, 在氧化应激状态下表达明显增加, 而 HO-2 和 HO-3 在细胞内含量相对稳定。HO-1 存在于血液单核细胞胞浆微粒体, 也分布于网状内皮细胞含量丰富的组织如肝脏和脾脏, 其他组织细胞在氧化应激状态下也有不同程度的表达。因此, 本实验通过检测外周血单个核细胞 HO-1 的表达来了解冠心病患者 HO-1 的表达情况。近几年国内外研究表明, HO-1 对心血管系统起重要的保护作用<sup>[5]</sup>: 催化产生内源性一氧化碳, 直接扩张血管; 通过抗氧化作用, 保护血管内皮细胞及心肌细胞; 通过调节细胞生长减少内皮细胞凋亡, 保护内皮系统的稳定性, 同时促进血管平滑肌凋亡, 减轻血管损伤后的不良重构; 直接抑制心肌细胞肥大, 降低左室/体重比例。

目前, 对 HO-1 的心血管保护作用的研究主要集中在基础研究。喻陆等<sup>[6]</sup>发现, 血红素氧合酶-1mRNA 在动脉粥样硬化的发展过程中表达有逐渐增高的趋势, 且血红素氧合酶-1 蛋白的表达, 也有逐渐增高的趋势。徐少平等<sup>[7]</sup>的实验提示动脉粥样硬化家兔主动脉血红素加氧酶/一氧化碳系统活性显著受损, 血红素-L-赖氨酸盐通过恢复主动脉一氧

化碳生成量而在一定程度上抑制动脉粥样硬化进展。Li Volti 等<sup>[8]</sup>把 HO-1 基因转染到毛细血管内皮细胞中,再把这些内皮细胞种植在培养基中,可观察到类毛细血管生长,提示 HO-1 在血管形成中起重要作用。这在冠心病晚期治疗上具有重要意义。

血红素氧合酶 1(HO-1)的心血管保护作用的临床研究却很少,尽管有实验说明胆红素的含量与冠心病的发病率呈负相关,其含量正常或偏高冠心病的发病率低,反之其发病率增高<sup>[1,2]</sup>,但仍不能直接说明 HO-1 与冠心病的联系,冠心病与 HO-1 的直接联系如何,仍不清楚。本文以冠状动脉造影为依据,直接观察冠心病患者 HO-1 的表达情况,发现冠状动脉病变组 HO-1 表达明显高于冠状动脉正常组,提示疾病情况下保护因子 HO-1 表达增加。同时我们通过冠状动脉病变造影结果的形态学分析也观察到,HO-1 的表达水平随着冠状动脉病变的加重而升高,提示 HO-1 表达水平与冠心病的严重程度有关,这可能是严重疾病对 HO-1 的强诱导作用。由于冠状动脉造影所见的  $\oplus$ 型、 $\ominus$ 型病变(即表面不规则病变)常代表斑块破裂及/或表面血栓形成<sup>[9]</sup>,提示 HO-1 表达升高可能是未来急性冠状动脉事件发生的预测因子。HO-1 表达增加可能是机体对疾病损害的一种自身保护反应。对于应急状态下 HO-1 表达不能增加(如 HO-1 基因缺如或因某种原因不能表达),则可能出现严重后果。1999 年 Yachie 等<sup>[10]</sup>报道世界第一例 HO-1 基因缺如的病人,就是因为缺乏对疾病的适应性反应,导致多器官功能损害,早年夭折。至于 HO-1 表达水平与疾病的预后关系如

何,则有待于进一步研究。

由于血管平滑肌的过度增生是冠状动脉粥样硬化发展及经皮冠状动脉内球囊成型术(PTCA)术后再狭窄的主要病理基础,促进冠状动脉血管壁 HO-1 的表达将为冠心病的治疗提供广阔的前景。如何通过促进 HO-1 基因表达,或使用 HO-1 诱导剂预防治疗冠心病,值得进一步的临床研究。

#### [参考文献]

- [1] Mayer M. Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clin Chem*, 2000, **46** (11): 1723-727
- [2] Santiago E, Mora L, Bautista M, Montesinos JJ, Martinez I, Ramos G, et al. Granulocyte colony stimulating factor induce neutrophil to secrete macrophage colony stimulating factor. *Cytokine*, 2001, **15** (6): 299-304
- [3] 刘海波, 陈在嘉, 高润霖, 姚康宝, 陈纪林, 杨跃进, 等. 冠状动脉造影斑块形态与冠状动脉循环中血浆及血清血栓素 B2 及 6-酮-前列环素 1 $\alpha$  的关系. *中华心血管病杂志*, 1996, **24** (1): 115-118
- [4] 莫碧文, 张珍祥, 王昌明, 曾艳, 曾锦荣, 白晶. 哮喘患者外周血单核细胞血红素氧合酶 1 表达水平的研究. *中国应用生理学杂志*, 2002, **18** (4): 365-369
- [5] William Durante. Heme oxygenase-1 in growth control and its clinical application to vascular disease. *J Cell Physiol*, 2003, **195** (3): 373-382
- [6] 喻陆, 何作云. 实验性兔动脉粥样硬化发病过程中内源性一氧化碳及其合成酶基因表达的改变. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (2): 120-124
- [7] 徐少平, 李鲁光, 程友琴, 唐朝枢, 沙鸥, 余燕秋. 血红素加氧酶-一氧化碳系统对家兔动脉粥样硬化发病的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (2): 114-116
- [8] Li Volti G, Wang J, Traganos F, Kappas A, Abraham N. Differential effect of heme oxygenase-1 in endothelial and smooth muscle cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **296** (5): 1077-082
- [9] 刘海波, 高润霖, 陈在嘉, 姚康宝, 陈纪林, 杨跃进, 等. 不稳定型心绞痛患者冠状动脉造影形态学特点及其意义. *中国循环杂志*, 1996, **11** (1): 3-5
- [10] Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*, 1999, **103** (1): 129-135

(此文编辑 胡必利)

#### •消息•

## 本刊的影响因子和总被引频次又增大了!

月初从国家科技部中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)获悉,在《中国科技论文统计源期刊》中,本刊2003年的影响因子为0.712,总被引频次为453。与2002年相比,影响因子增大1.05倍(2002年为0.348),总被引频次增大1.36倍(2002年为192)。这两项指标增大,说明本刊的学术影响力扩大,已越来越受到学术界的注意。