

高脂血症患者血浆血管紧张素 Ang II 水平与其血小板 1 型受体表达的相关性

李永红¹, 葛志明³, 王其新², 冯进波⁴, 蔡尚郎¹, 安毅¹, 董果雄¹, 张运³

(青岛大学医学院附属医院 1. 心内科, 2. 急诊内科, 山东省青岛市 266003; 山东大学齐鲁医院 3. 心内科,

4. 教育部和卫生部心血管重构和功能研究重点实验室, 山东省济南市 250012)

[关键词] 内科学; 高脂血症; 逆转录聚合酶链反应和免疫印迹; 动脉粥样硬化; 血小板; 血管紧张素 Ang II ; 血管紧张素 Ang I 型受体

[摘要] 目的 通过观察高胆固醇血症患者血管紧张素 Ang II 与其 1 型受体表达的变化, 探讨肾素-血管紧张素系统在动脉粥样硬化发生中的作用。方法 在本院健康查体中心随机选取健康对照 40 例(对照组)和高胆固醇血症患者 60 例(高脂组), 分别自肘静脉取血, 分离血清、血浆并提取血小板。放射免疫法检测血浆的血管紧张素 Ang II 水平, 逆转录聚合酶链反应和 Western blot 方法分别检测血小板 1 型受体表达的 mRNA 和蛋白质表达水平。结果 高脂组血浆血管紧张素 Ang II 水平较对照组明显升高(92.13 ± 25.27 比 50.85 ± 21.12 , $P < 0.01$), 血小板的 1 型受体 mRNA 和蛋白质表达较对照组明显升高(0.93 ± 0.22 比 0.25 ± 0.06 , $P < 0.01$; 1.35 ± 0.32 比 0.42 ± 0.10 , $P < 0.01$); 高脂组血管紧张素 Ang II 与 1 型受体表达的相关分析显示, 1 型受体表达与血浆的血管紧张素 Ang II 呈显著正相关($r = 0.369$, $P < 0.01$)。结论 高胆固醇血症患者血小板 1 型受体的表达增高与血浆血管紧张素 Ang II 浓度增加有关。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

The Correlation Between Plasma Angiotensin Ang II and Angiotensin Ang I Type 1 Receptor on Platelets in Patients with Hyperlipidemia

LI Yong-Hong, GE Zhi-Ming, WANG Qi-Xin, FEN Jin-Bo, CAI Shang-Lang, An Yi, DONG Guo-xiong, and ZHANG Yun

(Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China)

[KEY WORDS] Patients with Hyperlipidemia; RT-PCR and Western Blot; Platelet; Atherosclerosis; Angiotensin Ang II ; Angiotensin Ang I Type 1 Receptor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of renin angiotensin system (RAS) in atherosclerosis by observing the change of angiotensin Ang I type 1 (AT_1) receptor expression and the effects of statin on it. **Methods** Sixty patients with hypercholesterolemia and forty healthy persons were investigated as hyperlipidemia group (Hyperlipidemias) and control group (Controls) respectively. Blood samples of ulnar vein were extracted from Controls and Hyperlipidemias. Blood serum, plasma and platelet were extracted and stored at a refrigerator of -80°C . The level of plasma angiotensin Ang II was detected by the method of radioimmunity. While the expression of AT_1 mRNA and protein on platelet were assessed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot respectively. **Results** The plasma angiotensin Ang II of Hyperlipidemias was higher than that of Controls (92.13 ± 25.27 vs 50.85 ± 21.12 , $P < 0.01$). The expression of AT_1 mRNA and protein on platelets were higher in Hyperlipidemia than those of Controls (0.93 ± 0.22 vs 0.25 ± 0.06 , $P < 0.01$ and 1.35 ± 0.32 vs 0.42 ± 0.10 , $P < 0.01$). The expression of AT_1 protein was directly correlated with the plasma angiotensin Ang II ($r = 0.369$, $P < 0.01$). **Conclusions** The increase of AT_1 mRNA and protein on platelets is related with plasma angiotensin Ang II in patients with hypercholesterolemia.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是冠心病的

主要原因,其发生发展过程中存在一系列的致病危险因素,如高脂血症、高血压、糖尿病等。大量研究证实肾素-血管紧张素系统(renin angiotensin system, RAS)参与了As的发生过程^[1]。血管紧张素 Ang II (angiotensin Ang II)是RAS的主要活性成分,不仅具有收缩血管、促进细胞增殖的作用,而且能通过诱导炎症反应及细胞凋亡,促进氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)摄取、产生氧自由基和影响纤溶功能等多方面参与As的病理过程,Ang Ang II 的这些生物学作用多是通过其 1 型受体

[收稿日期] 2006-08-22 [修回日期] 2006-11-30

[基金项目] 山东省医疗卫生系统杰出学科带头人(1020工程)项目; 山东省科技研究项目(2000BB1CJA3); 山东省自然科学基金(Y2003C04, 2003HW069); 青岛市科学技术局资助(02-2-kj-yr-25)

[作者简介] 李永红, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事动脉粥样硬化的基础与临床研究, 联系电话为 13356869316, E-mail 为 liyonghong-66@163.com。葛志明, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病及心功能衰竭的研究, 联系电话为 0531-86803916, E-mail 为 gezhiming@sdu.edu.cn。王其新, 学士, 主任医师, 主要从事内外科急危重症的研究, 联系电话为 0532-82911202, E-mail 为 wangqx@qdmh.qd.sd.cn。

(angiotensin I_1 receptor, AT_1) 实现的, 但关于高胆固醇血症患者血小板 AT_1 mRNA 和蛋白质表达的变化, 国内尚未见有报道, 本课题对此进行了探讨。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组

选取 2005 年 5 月至 10 月在本院健康查体中心查体的男性高胆固醇血症患者 60 例(高脂组), 平均年龄 56.5 ± 12.7 岁。入选标准为总胆固醇(total cholesterol, TC) > 6.24 mmol/L (2.4 g/L), 同时临床上排除继发性高胆固醇血症(包括甲状腺、肝胆、肾疾患、糖尿病等), 而且入选前 3 个月内无急性心肌梗死、高血压、心绞痛和脑血管意外, 至少 1 月内未用过调脂药、抗血小板药、钙拮抗剂、硝酸脂类及影响 RAS 的药物。正常对照组 40 例(对照组), 平均年龄 58.7 ± 15.6 岁, 均为健康查体者, 2 周内未服用任何药物。两组病人均自肘静脉取血进行检测。所有病人均对实验的过程知晓同意。

1.2 血脂检测

全自动生化仪检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)水平。

1.3 血浆 Ang I 的检测

放射免疫分析法(试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所)检测血浆 Ang I 水平。

1.4 血小板提取

EDTA 抗凝血 500 r/min 离心 10 min, 取上层富含血小板血浆 4°C , 2 kr/min 离心 10 min, 生理盐水洗 2 次, 沉淀即血小板。

1.5 逆转录聚合酶链反应

RNA 提取: 血小板沉淀, 加入 Trizol 试剂(美国, Invitrogen 公司) 1 mL, 再经氯仿、异丙醇提取总 RNA。紫外分光光度计测定 RNA 的 A_{260}/A_{280} , 确定其纯度。所有实验样品的 A_{260}/A_{280} 均大于 1.7。④ RT-PCR: 逆转录反应(RT)根据逆转录试剂盒(美国, Promega 公司)要求的标准进行。反应条件为: $42^\circ\text{C} \times 1 \text{ h}$, $95^\circ\text{C} \times 5 \text{ min}$ 。聚合酶链反应(PCR)中 AT_1 和内参照 β -actin 引物根据其 GeneBank 中的基因序列由 Primer primer 5 软件自行设计。 AT_1 的引物序列为上游引物: 5'-CCA GCG TCA GTT TCA ACC-3', 下游引物 5'-TAG GGC CTT CCA AAT AAG AGT A-3', 扩增片段长度为 350 bp。 β -actin 的引物序列为上游引物: 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3', 下

游引物 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3', 扩增片段长度为 317 bp。扩增条件为 95°C 预变性 5 min, 进入 PCR 循环, 94°C 变性 45 s \rightarrow 55°C 退火 45 s \rightarrow 72°C 延伸 60 s, 共 35 个循环, 72°C 再延伸 7 min。④电泳: 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 稳压 120 V, 时间 15 min 左右, 凝胶成像分析仪观察并拍照, 同时输入计算机并存储。结果分析: 利用图像分析软件进行分析。将每份标本的 AT_1 与内参照 β -actin 扩增条带的平均光密度比作为 AT_1 mRNA 含量的相对值。

1.6 Western blot 检测

蛋白提取液提取的血小板膜蛋白, 煮沸 5 min 后上样; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及电转膜后, 分别加入稀释的 AT_1 抗体(1: 200)和 Actin 抗体(1: 500)进行一抗反应, 然后再行二抗反应(1: 1250 稀释)及 DAB 显色。数字凝胶成像分析系统对 Western blot 的电泳条带进行分析。将目的蛋白与内参照 β -actin 电泳条带的平均光密度比作为其蛋白含量的相对值。

1.7 统计学分析

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 软件分析, 计量资料采用方差分析, 变量间的相关关系采用 Microsoft Excel 进行直线相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂水平

高脂组的 TC、TG 和 LDLC 水平较对照组明显升高($P < 0.01$), 高脂组的 HDL 水平明显低于对照组($P < 0.05$, 表 1)。

表 1. 血清的脂质水平 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

项 目	对照组 ($n = 40$)	高脂组 ($n = 60$)
TC	3.78 ± 1.05	7.28 ± 1.52^b
TG	0.85 ± 0.27	1.61 ± 0.35^b
LDLC	1.68 ± 0.41	3.99 ± 0.65^b
HDL	2.82 ± 0.53	1.67 ± 0.33^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 血浆血管紧张素 I 水平的变化

对照组和高脂组分别为 50.85 ± 12.15 mg/L 和 92.13 ± 22.27 mg/L。与对照组相比, 高脂组血浆 Ang I 水平明显增高($P < 0.01$, 表 2)。

表 2. 血浆血管紧张素 Ang II 及血小板 AT_1 mRNA 及蛋白质的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Ang II (mg/L)	AT_1 mRNA	AT_1 蛋白质
对照组 ($n=40$)	50.85 \pm 12.15	0.25 \pm 0.06	0.42 \pm 0.10
高脂组 ($n=60$)	92.13 \pm 22.27 ^a	0.93 \pm 0.22 ^a	1.35 \pm 0.32 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

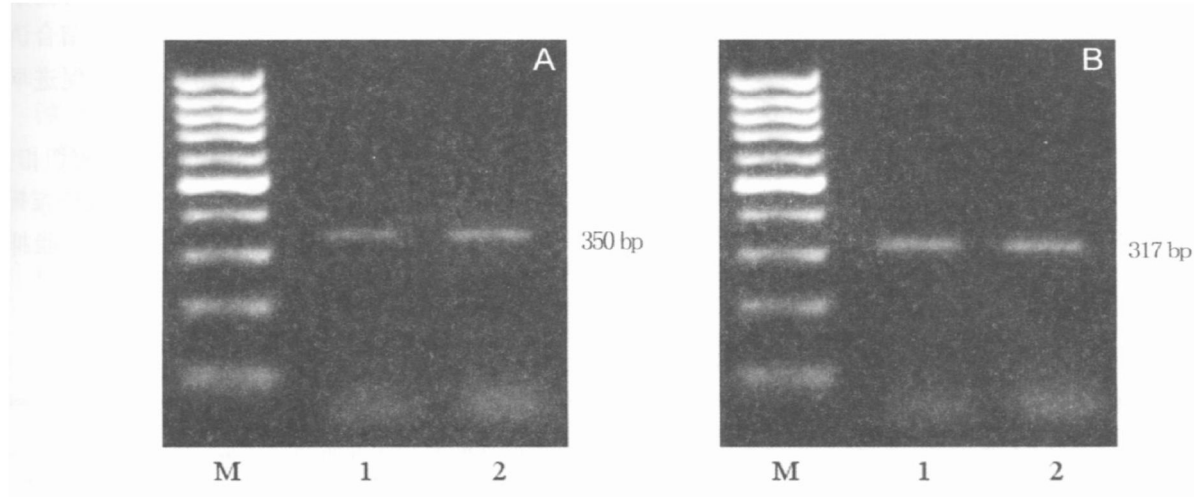


图 1. 血小板 AT_1 和 β -actin 的 mRNA 表达水平 M 为 Marker, 自下至上分别为 100、200、300、400、500、600、700、800、900 bp 和 1 000 bp; 1 为对照组, 2 为高脂组。

2.4 血管紧张素 Ang II 型受体蛋白的表达

AT_1 的蛋白分子量为 50 kDa。对照组血小板 AT_1 蛋白表达较低, 为 0.42 \pm 0.10; 高脂组 AT_1 表达

2.3 血管紧张素 Ang II 型受体 mRNA 的表达

PCR 扩增的 AT_1 片段长度与预期相符, 为 350 bp。对照组的血小板 AT_1 mRNA 表达较低, 为 0.25 \pm 0.06; 高脂组的 AT_1 表达水平为 0.93 \pm 0.22, 较对照组明显升高 ($P < 0.01$, 表 3 及图 1)。

水平为 1.35 \pm 0.32, 较对照组明显升高 ($P < 0.01$, 表 3 及图 2)。

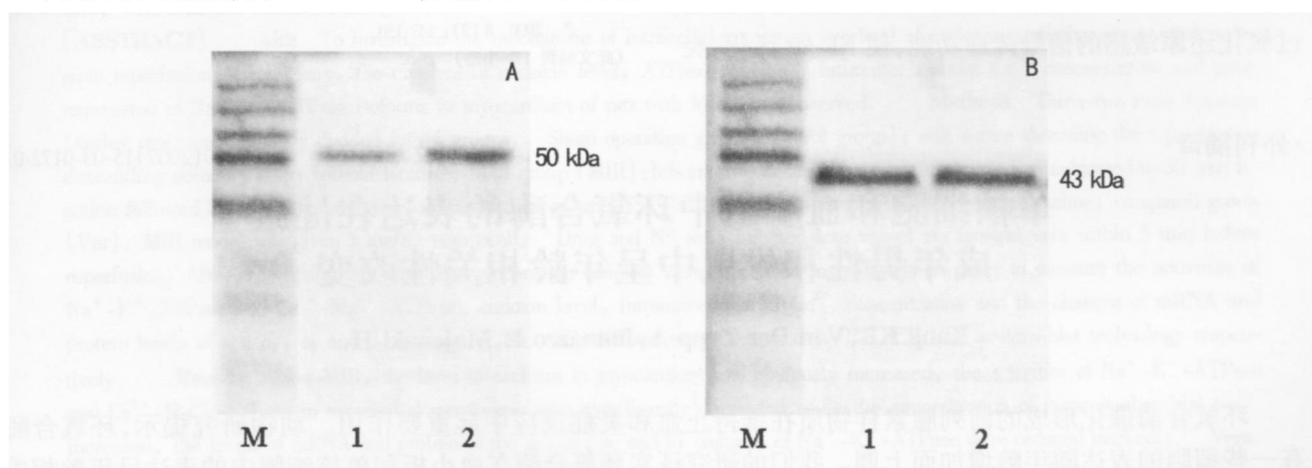


图 2. 血小板 AT_1 和 β -actin 的蛋白表达水平 M 为蛋白 Marker, 自上至下分别为 175、83、62、47.5、32.5、25、16.5 和 6.5 kDa; 1 为对照组, 2 为高脂组。

2.5 相关性分析

直线相关分析结果显示, 高脂组的 AT_1 蛋白表达与血浆 Ang II 浓度呈显著正相关 ($r = 0.369$, $P < 0.01$)。

3 讨论

大量的临床流行病学资料都一致证明, 血清胆固醇浓度升高是 As 性心、脑血管疾病的重要危险因素, RAS 参与了 As 的发生过程^[1]。Ang II 是 RAS 的

主要活性成分, Ang Ⅱ受体主要有 AT₁ 和 AT₂ 两个亚型。几乎所有 Ang Ⅱ对成年组织的效应均由 AT₁ 介导, AT₂ 的功能目前尚未完全阐明, 可能主要与组织重构和生长发育有关。

血小板的主要功能是止血和血栓形成, 高脂血症时由于内皮细胞损伤而激活血小板, 其释放的一些介质直接参与了 As 的形成和发展。循环中的血小板虽然没有细胞核, 但是含有来源于巨核细胞的少量残余 mRNA, 而且部分能被翻译为蛋白质^[2]。血液中不仅含有丰富的血小板, 而且取材方便, 但目前国内有关血小板 mRNA 表达的研究较少, 仅见个别报道。本研究通过 RT-PCR 和 Western blot 技术检测了血小板 AT₁ 的表达, 放射免疫法检测了血浆的 Ang Ⅱ水平, 结果显示高胆固醇血症患者 Ang Ⅱ产生增加, 血小板 AT₁ 表达上调, 而且 AT₁ 的表达与血浆的 Ang Ⅱ水平呈显著正相关。提示血小板的 mRNA 表达水平不仅与机体的生理与病理状态有关, 而且高胆固醇血症时其 AT₁ 的蛋白表达上调与 Ang Ⅱ的水平有关。

研究表明 Ang Ⅱ和 AT₁ 表达增加具有促 As 的作用^[3], 其可能的机制为: 促进炎症反应: 大量产生的 Ang Ⅱ具有促粘附分子和炎症介质释放的作用, 其与 AT₁ 受体结合后, 激活内皮细胞膜上的尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸/还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP/NADPH) 氧化酶, 引起 O₂ 的释放, O₂ 可以攻击生物膜产生脂质自由基, 自由基通过氧化还原敏感的信号传递功能, 使 NF-κB 活化, 炎

症反应过程增强^[4]。④诱导血小板聚集^[5]: Ang Ⅱ与 AT₁ 结合后, 不仅激活鸟苷酸结合调节蛋白(G 蛋白), 促进三磷酸肌醇(IP3) 和二酰基甘油(DG) 产生, 此外, 还可刺激磷脂酶 A₂(PLA₂) 及磷脂酶 D₂(PLD₂), 导致花生四烯酸及其产物的释放, TXB₂ 含量增高, 诱导血小板聚集, 从而导致血栓形成, 进而促进 As 的发生。⑤影响纤溶系统: RAS 与纤溶系统在 As 中具有协同作用, Ang Ⅱ通过与 AT₁ 结合诱导纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1) 表达^[6], 促进早期 As 的发生。

总之, 本研究显示 RAS 与 As 的形成密切相关, Ang Ⅱ及血小板 AT₁ 受体可能在 As 的形成中发挥重要作用。因而通过下调 AT₁ 表达的方法, 能抑制 Ang Ⅱ的作用, 从而阻止 As 的进展。

[参考文献]

- [1] Grote K, Drexler H, Schieffer B. Renin-angiotensin system and atherosclerosis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, **19** (4): 770-773.
- [2] McRedmond JP, Park SD, Reilly DF, Coppinger JA, Maguire PB, Shields DC, et al. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, **3** (2): 133-144.
- [3] Wassmann S, Czech T, van Eickels M. Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice [J]. *Circulation*, 2004, **110** (19): 3 062-067.
- [4] Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin Ⅱ and vascular inflammation [J]. *Med Sci Monit*, 2005, **11** (6): RA194-205.
- [5] Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin Ⅱ signaling [J]. *Br J Med Biol Res*, 2002, **35** (9): 1 001-015.
- [6] 唐朝枢, 王晓红, 彭旭, 丁文惠, 田洪森. 氯沙坦和依那普利对左旋硝基精氨酸诱导的高血压大鼠纤溶功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (2): 147-150.

(此文编辑 李小玲)