

[文章编号] 1007-3949(2010)18-03-0223-04

· 临床研究 ·

冠状动脉粥样硬化患者外周血单个核细胞抗菌肽 α 防御素和组织蛋白酶抑制素基因的表达变化

赵汉军¹, 山下静也², 永井义幸³, 中川理⁴, 野岛 博⁵

(1. 首都医科大学附属北京安贞医院, 北京市 100029; 2. 大阪大学医学部附属医院, 日本大阪府吹田市 565-0871;

3. 临空医疗中心, 日本大阪府泉佐野市 598-8577; 4. 丰中市立病院, 日本大阪府丰中市 560-8565;

5. 大阪大学微生物病研究所, 日本大阪府吹田市 565-0871)

[关键词] 抗菌肽; 防御素; 组织蛋白酶抑制素; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨外周血单个核细胞抗菌肽 α 防御素和组织蛋白酶抑制素基因表达水平与冠状动脉粥样硬化的关系。方法 冠状动脉粥样硬化性心脏病组 61例, 为临床症状符合稳定型劳力性心绞痛, 且冠状动脉造影发现左主干直径狭窄 $\geq 50\%$, 或左前降支、左回旋支和右冠状动脉主支至少一处病变直径狭窄 $\geq 75\%$ 的患者; 对照组 53例, 为经冠状动脉造影排除冠状动脉粥样硬化性心脏病者。冠状动脉造影前获得空腹静脉血进行血常规和高敏 C 反应蛋白检测、提取总核糖核酸并合成互补脱氧核糖核酸用于实时定量 RT-PCR。结果 冠状动脉粥样硬化性心脏病组糖尿病比例 (34.4% 比 15.1%, $P = 0.03$)、合并闭塞性动脉硬化和 (或) 缺血性脑卒中病史比例 (19.7% 比 0.0%, $P = 0.0006$) 均高于对照组。冠状动脉粥样硬化性心脏病组淋巴细胞百分比低于对照组 (27.2% \pm 1.2% 比 31.7% \pm 1.5%, $P = 0.02$), 高敏 C 反应蛋白水平高于对照组 [2.0 (1.0~4.0) mg/L 比 1.0 (0.5~2.4) mg/L, $P = 0.02$]。冠状动脉粥样硬化性心脏病组组织蛋白酶抑制素表达水平 [1.21 (0.98~1.55) 比 0.97 (0.69~1.39), $P = 0.009$]、 α 防御素 1-3 表达水平 [0.85 (0.58~1.21) 比 0.61 (0.41~0.86), $P = 0.003$] 和 α 防御素 4 表达水平 [0.78 (0.52~1.43) 比 0.47 (0.32~0.74), $P = 0.001$] 均高于对照组。组织蛋白酶抑制素基因表达水平同嗜碱性粒细胞分类水平相关 ($r_s = 0.19$, $P = 0.04$)。结论 稳定型劳力性心绞痛患者外周血单个核细胞抗菌肽组织蛋白酶抑制素和 α 防御素 1-4 基因持续高表达可能与冠状动脉粥样硬化有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Expression Levels of alpha-Defensins and Cathelicidin are Upregulated in Peripheral Mononuclear Blood Cells of Patients with Coronary Atherosclerosis

ZHAO Han-Jun¹, Yanashita Shizuya², Nagai Yoshiyuki³, Nakagawa Tsutomu⁴, and Nojima Hiroshi⁵

(1. Beijing Anzhen Hospital of the Capital Medical University, Beijing 100029, China; 2. Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; 3. Department of Cardiology, Rinku General Medical Center, Rinku Orai-ku 2-23 Izumisano, Osaka 598-8577, Japan; 4. Division of Cardiology, Toyonaka Municipal Hospital, 4-14-1 Shibahara, Toyonaka, Osaka 560-8565, Japan; 5. Department of Molecular Genetics, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita City, Osaka 565-0871, Japan)

[KEY WORDS] Antimicrobial Peptides; Defensins; Cathelicidin; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate expression levels of the 5 kinds of antimicrobial peptide genes, cathelicidin (CAMP) and alpha-defensin 1-4 (DEFA1-4) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). **Methods** Sixty-one patients with coronary artery disease (CAD) who had stable effort angina pectoris and had $\geq 50\%$ diameter stenosis in left main coronary artery or at least one major coronary artery were involved in this study. Controls ($n = 53$) were those with chest pain, abnormal electronic cardiogram or abnormal echocardiography, but had a smooth coronary angiogram (CAG). Venous blood was obtained before CAG for RNA isolation and routine blood count. Ten μ g/patient of the total RNA were used for individual cDNA preparation. Expression levels of genes in individuals were evaluated by quantitative real-time RT-PCR. **Results** WBC count and subset counts were not different between CAD and control group, except that relative lymphocyte count in percentage was lower in the former than that in the later (27.2% \pm 1.2% vs 31.7% \pm 1.5%, $P = 0.02$). Level of CAMP gene expression was higher in CAD than that in the control [1.21 (0.98~1.55) vs 0.97 (0.69~1.39), $P = 0.009$]. Expression levels of DEFA 1-3 genes were elevated in CAD than that in the control

[收稿日期] 2009-09-11

[修回日期] 2009-02-03

[基金项目] 北京市自然科学基金 (7082030)、北京市优秀人才基金 (20081D0300600080) 和首都医科大学临床基础合作课题 (2007JJ42) 部分资助

[作者简介] 赵汉军, 博士, 主治医师, 主要从事冠心病临床与基础研究。通讯作者山下静也, 博士, 教授, 主要从事冠心病与血脂代谢的研究。野岛 博, 博士, 教授, 主要从事基因表达与调控研究。

[0.85(0.58~1.21) vs 0.61(0.41~0.86), $P=0.003$]. CAD group also presented higher expression level of DEFA4 gene than the control group [0.78(0.52~1.43) vs 0.47(0.32~0.74), $P=0.001$]. The differences of these gene expression levels were not due to variations of WBC subset counts as judged by correlational analysis (all $P>0.05$). CAD patients had higher hs-CRP level than the controls [2.0(1.0~4.0) mg/L vs 1.0(0.5~2.4) mg/L, $P=0.02$].

Expression levels of DEFA1-3, DEFA4, CAMP were not correlated with CRP level. **Conclusion** Expression levels of antimicrobial peptides α -defensins and cathelicidin in PBMNC may be associated with coronary artery atherosclerosis.

近年来,动脉粥样硬化(As)发病的炎症机制学说已被普遍接受。外周血液循环中的几乎所有有核细胞尤其是炎性细胞(如单核细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和浆细胞)都直接或间接参与这一过程^[1,2]。目前尚不清楚As的原始病因是炎症过程自身还是继发于其他原发因素(如高胆固醇血症等),弄清As特异的炎症性信号通路对于寻找治疗的分子靶标尤其重要^[2]。抗菌肽家族是生物体产生的一种具有抗菌活性的多肽,在宿主抵抗病原微生物感染中起重要作用,是天然免疫的重要介质。近几年的研究也提示抗菌肽中的 α -防御素(DEFA或HNP)和组织蛋白酶抑制素(CAMP)可能与冠状动脉粥样硬化病理生理过程有关^[3-8]。人类中性粒细胞产生4种 α -防御素,也被称为DEFA1-4或HNP1-4^[9]。人类CAMP也被称作LL-37或hCAP-18,人类抗菌肽CAMP家族只有此一种^[10]。本研究拟通过实时定量RT-PCR探讨外周血单个核细胞抗菌肽基因表达水平,明确其表达异常与冠状动脉粥样硬化的关系。

1 对象和方法

1.1 一般资料

连续入选临空医疗中心和丰中市立病院接受冠状动脉造影的患者。入选标准:①冠状动脉粥样硬化性心脏病(CAD)组:临床表现至少1个月以上的稳定型劳力性心绞痛(加拿大心血管病学会劳力性心绞痛分级IV~VI级),而且经冠状动脉造影发现左主干直径狭窄 $\geq 50\%$,或左前降支、左回旋支和右冠状动脉主支至少一处病变直径狭窄 $\geq 75\%$;②对照组:有胸痛症状或有异常心电图、异常超声心动图表现,但冠状动脉造影表现为冠状动脉管壁光滑、未见明显粥样硬化斑块的患者。排除标准:急性冠状动脉综合征、免疫系统疾病、慢性感染性疾病或2周内感染病史的患者。研究方案获得医院伦理委员会批准并取得患者知情同意书。冠状动脉造影前获得空腹静脉血进行血常规和高敏C反应蛋白(hs-CRP)检测,同时取10 mL静脉血用于提取RNA。

1.2 RNA提取

获取10 mL静脉血后立即混合等容积2%右旋糖酐-生理盐水溶液,室温静置30 min后回收上清,4℃、2000×g条件下离心15 min,弃上清,异硫氰酸胍法提取总RNA,乙醇沉淀形式保存于-80℃。

1.3 实时定量RT-PCR

实时定量RT-PCR仪采用ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems)。每例患者取10 μ g总RNA用于互补cDNA合成,使用High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems)。引物与探针购自Applied Biosystems。每次扩增均设有阳性对照、阴性对照和无模板对照,以管家基因GAPDH作为内参照。每例患者取20 ng cDNA作为模板,实时定量PCR反应体系20 μ L,每个样品均做3个复孔。反应条件为:95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火-延伸1 min,重复40个循环。由PCR反应曲线得到阈值循环数(CT值),被检测基因表达水平以校正比值表示(检测基因mRNA的拷贝数/GAPDH mRNA的拷贝数)。

1.4 统计学方法

统计分析采用Ystat2004软件。正态分布的变量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行t检验和相关分析。非正态分布变量采用中位数(四分位法)表示,进行Mann-Whitney U检验和Spearman's rank correlation分析。计数资料以百分数表示并行 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料

CAD组糖尿病比例高于对照组($P=0.03$),合并闭塞性动脉硬化(ASO)和/或缺血性脑卒中(CI)病史比例也高于对照组($P=0.0006$)。两组间其他基线资料如年龄、性别、吸烟、体质指数(BMI)、合并高血压或高脂血症情况等均无明显差异($P>0.05$,表1)。CAD组淋巴细胞百分比低于对照组($P=0.02$),两组间白细胞计数、中性粒细胞百分比、嗜酸性粒细胞百分比、嗜碱性粒细胞百分比、单核细胞百分比均无明显差异($P>0.05$,表2)。

表 1 对照组和 CAD 组临床资料比较

项目	对照组 (n= 53)	CAD 组 (n= 61)	P 值
年龄 (岁)	64.7 ±12.7	68.2 ±10.3	NS
男性 (例)	29(54.7%)	39(63.9%)	NS
高血压 (例)	25(47.2%)	24(39.3%)	NS
高脂血症 (例)	18(34.0%)	17(27.9%)	NS
糖尿病 (例)	8(15.1%)	21(34.4%)	0.03
ASO 和 /或 CI(例)	0(0.0%)	12(19.7%)	0.0006
吸烟 (例)	20(37.7%)	24(39.3%)	NS
BMI (kg/m ²)	23.92 ±0.43	23.31 ±0.39	NS

表 2 对照组和 CAD 组外周血白细胞计数与分类

项 目	对照组 (n= 53)	CAD 组 (n= 61)	P 值
WBC 计数 (个/L)	6.22 ±0.22	6.10 ±0.25	NS
中性粒细胞	58.6% ±1.6%	62.4% ±1.3%	NS
嗜酸性粒细胞	2.6% ±0.3%	3.0% ±0.4%	NS
嗜碱性粒细胞	0.6% ±0.1%	0.6% ±0.1%	NS
单核细胞	7.4% ±1.0%	6.7% ±0.4%	NS
淋巴细胞	31.7% ±1.5%	27.2% ±1.2%	0.02

表 4 抗菌肽基因表达水平与白细胞分类计数和 hs-CRP 水平的相关性分析

基因	中性粒细胞	嗜酸性粒细胞	嗜碱性粒细胞	单核细胞	淋巴细胞	hs-CRP
CAMP	NS	NS	0.04	NS	NS	NS
DEFA1-3	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DEFA4	NS	NS	NS	NS	NS	NS

3 讨论

DEFA 主要合成于分化成熟前的中性粒细胞并贮存于其嗜天青颗粒,但 RT-PCR 提示外周血成熟中性粒细胞中依然有其合成^[11],本研究结果表明,稳定型心绞痛患者外周血 PBMC 中抗菌肽 DEFA1-4 和 CAMP 基因处于高表达状态。DEFA1-3 氨基酸序列高度一致。其中,DEFA1 和 DEFA3 均为含有 30 个氨基酸的多肽,两者仅在 N 端有一个氨基酸不同(分别为丙氨酸和天门冬氨酸)。DEFA2 是含有 29 个氨基酸的多肽,仅在其 N 端较 DEFA1 和 DEFA3 少一个丙氨酸或天门冬氨酸,目前认为 DEFA2 是 DEFA1 或 DEFA3 基因的产物。DEFA4 是含有 34 个氨基酸的多肽,其氨基酸序列同 DEFA1 和 DEFA3 有 37.9% 的一致性^[9]。DEFA1、DEFA3 和 DEFA4 位于染色体 8pter-p23.3 区域并且彼此相邻,因此 CAD 患者其基因表达水平增强可能存在共同的调节机制。

2.2 相关性分析

CAD 组 CAMP 基因表达水平高于对照组 ($P = 0.009$), DEFA1-3、DEFA4 基因的表达水平高于对照组 ($P = 0.003$ 或 $P = 0.001$), hs-CRP 水平也高于对照组 ($P = 0.02$ 表 3)。相关分析显示, CAMP 基因表达水平与嗜碱性粒细胞计数水平相关 ($r_s = 0.19$, $P = 0.04$); CAD 组和对照组嗜碱性粒细胞计数水平无明显差异。DEFA1-3 和 DEFA4 的基因表达水平同白细胞分类计数水平均不存在相关性 ($P > 0.05$), DEFA1-3、DEFA4、CAMP 基因表达水平与 hs-CRP 水平均不存在相关性 ($P > 0.05$ 表 4)。

表 3 对照组和 CAD 组外周血单个核细胞抗菌肽基因表达水平和 hs-CRP 水平

项目	对照组 (n= 53)	CAD 组 (n= 61)	P 值
CAMP	0.97(0.69~1.39)	1.21(0.98~1.55)	0.009
DEFA1-3	0.61(0.41~0.86)	0.85(0.58~1.21)	0.003
DEFA4	0.47(0.32~0.74)	0.78(0.52~1.43)	0.001
hs-CRP(mg/L)	1.0(0.5~2.4)	2.0(1.0~4.0)	0.02

研究提示 DEFA 可以通过如下机制参与 CAD 的病理生理过程: 影响血脂代谢。DEFA 可影响脂蛋白 a 和低密度脂蛋白的代谢,促进二者在细胞内外的沉积从而增加其受到氧化等有害修饰的风险,进而参与 As 的进展^[6,12]。④促进血栓形成。DEFA 可与纤维蛋白及纤溶酶原结合从而抑制组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原介导的纤维蛋白溶解^[13]。⑤导致内皮功能障碍。DEFA 的刺激下,血管内皮氧自由基的生成显著增加,而内皮型一氧化氮合酶 mRNA 及蛋白水平明显降低,导致内皮依赖性血管扩张减弱^[5]。免疫染色显示 As 组织内 DEFA1-3 分布于内皮细胞、平滑肌细胞和细胞外基质,可能是通过渗透的方式进入血管壁并与内皮细胞、平滑肌细胞和细胞外基质结合^[14,15]。我们通过 RT-PCR 方法(未发表)在培养的人内皮细胞(脐静脉、主动脉)和主动脉平滑肌细胞不能检测到 DEFA1-4 mRNA 的表达,支持上述观点。近期观点认为 DE-

FA 被是联系炎症与 As 的重要分子, 并可能成为 As 防治的潜在靶点^[16 17]。

有别于 DEFA 在外周血细胞局限于中性粒细胞表达, CAMP 在中性粒细胞、单核细胞、肥大细胞和 T 细胞均有表达^[7]。Ciomei 等和 Edfeldt 等独立报道了 CAMP 存在于 As 斑块, 还发现 CAMP 诱导内皮细胞细胞间黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1 等 As 相关蛋白的表达, 并且可以诱导平滑肌细胞凋亡^[8 18]。研究表明 As 组织 CAMP mRNA 表达水平升高, 且限于 As 内的炎性细胞^[18]。此前 Koczulla 等^[7]报道了 CAMP 有促进血管新生的作用, 而粥样硬化斑块中新生血管可能会通过引导白细胞到达斑块内部而促进其发展^[19]。

本研究中, CAD 组 hs-CRP 水平虽然也高于对照组, 但是 DEFA 1-4 和 CAMP 基因表达水平同 hs-CRP 水平并不存在相关性, 提示二者的变化可能依赖于不同的机制。本研究的意义在于首次报道了 CAMP 和 DEFA 1-4 在稳定型心绞痛患者外周血单个核细胞表达升高, 提示外周血单个核细胞抗菌肽基因持续高表达可能与冠状动脉粥样硬化有关。

本研究的不足之处在于仅根据患者临床症状入选稳定型劳力性心绞痛患者, 不能提供患者斑块性质与 CAMP 和 DEFA 1-4 表达的关系。本研究也不能明确 CAMP 和 DEFA 1-4 在 PBMC 的高表达是 As 的致病因素还是伴随变化。对 CAMP 和 DEFA 1-4 转基因动物模型的深入研究可能有助于深入了解其在 As 发生发展中的作用, CAMP 和 DEFA 1-4 高表达与急性冠状动脉综合征以及 CAD 患者预后的关系也值得进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Nature*, 2002 **420** (6917): 868-874
- [2] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005 **13** (3): 249-253
- [3] Bamathan ES, Raghunath PN, Tamaszewski JE, et al. Immunohistochemical localization of defensin in human coronary vessels [J]. *Am J Pathol*, 1997 **50** (3): 1 009-020
- [4] Hgazi AA, Lavi E, Bdeir K, et al. Defensin stimulates the binding of lipoprotein (a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells [J]. *Blood*, 1997 **89** (12): 4 290-298
- [5] Kougias P, Chai H, Lin PH, et al. Neutrophil antimicrobial peptide alpha-defensin causes endothelial dysfunction in porcine coronary arteries [J]. *J Vasc Surg*, 2006 **43** (2): 357-363
- [6] Kougias P, Chai H, Lin PH, et al. Defensins and cathelicidins: neutrophil peptides with roles in inflammation, hyperlipidemia and atherosclerosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2005 **9** (1): 3-10
- [7] Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt G, et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 [J]. *J Clin Invest*, 2003 **111** (11): 1 665-672
- [8] Ciomei CD, Tapper H, Bjartell A, et al. Human antimicrobial peptide LL-37 is present in atherosclerotic plaques and induces death of vascular smooth muscle cells: a laboratory study [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2006 **6**: 49
- [9] Witte CG, Griffith JE, Marra MN, et al. Purification and characterization of human neutrophil peptide 4: a novel member of the defensin family [J]. *J Biol Chem*, 1989 **264** (19): 11 200-203
- [10] 杨小蓉, 金小宝, 朱家勇. 抗菌肽 LL-37 在动脉粥样硬化中的研究 [J]. *医学综述*, 2008 **14** (15): 2 330-333
- [11] Ishii T, Onda H, Tanigawa A, et al. Isolation and expression profiling of genes upregulated in the peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients [J]. *DNA Res*, 2005 **12** (6): 429-439
- [12] He C, Huang R, Du F, et al. LDL oxidation by THP-1 monocytes: implication of HNP-1, SgIII and DMT-1 [J]. *Clin Chim Acta*, 2009 **402** (1-2): 102-106
- [13] Bokarewa M, Tarkowski A. Human alpha-defensins neutralize fibrinolytic activity exerted by staphylokinase [J]. *Thromb Haemost*, 2004 **91** (5): 991-999
- [14] Bdeir K, Cane W, Canziani G, et al. Defensin promotes the binding of lipoprotein (a) to vascular matrix [J]. *Blood*, 1999 **94** (6): 2 007-019
- [15] Hgazi AA, Nassar T, Ganz T, et al. The alpha-defensins stimulate proteoglycan-dependent catabolism of low-density lipoprotein by vascular cells: a new class of inflammatory apolipoprotein and a possible contributor to atherogenesis [J]. *Blood*, 2000 **96** (4): 1 393-398
- [16] Nassar H, Lavi E, Akkawi S, et al. alpha-Defensin: link between inflammation and atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2007 **194** (2): 452-457
- [17] Quinn K, Henriques M, Parker T, et al. Human neutrophil peptides: a novel potential mediator of inflammatory cardiovascular diseases [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008 **295** (5): H 1 817-824
- [18] Edfeldt K, Agerberth B, Rottenberg ME, et al. Involvement of the antimicrobial peptide LL-37 in human atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006 **26** (7): 1 551-557
- [19] Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, et al. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003 **100** (8): 4 736-741

(此文编辑 文玉珊)