

[文章编号] 1007-3949(2010)18-05-0401-04

· 临床研究 ·

急性冠状动脉综合征患者单核细胞过氧化体增殖物激活型受体 δ 的表达与转化生长因子 $\beta 1$ 和白细胞介素 1β 的相关性

杨大春, 马双陶, 杨永健, 谭艳, 李德, 唐兵, 张鑫

(成都军区总医院心血管内科, 四川省成都市 610083)

[关键词] 冠状动脉疾病; 单核细胞; 基因表达; 黏附分子

[摘要] 目的 探讨急性冠状动脉综合征患者单核细胞中过氧化体增殖物激活型受体 δ 的表达水平与血清转化生长因子 $\beta 1$ 和白细胞介素 1β 水平的相关性。方法 纳入 55 例急性冠状动脉综合征患者和 47 例健康对照者, 分离其周围血单核细胞, 应用逆转录聚合酶链反应法检测过氧化体增殖物激活型受体 δ mRNA 的表达; 应用酶联免疫吸附试验检测血清转化生长因子 $\beta 1$ 和白细胞介素 1β 的水平。结果 急性冠状动脉综合征患者血单核细胞中过氧化体增殖物激活型受体 δ mRNA 的表达水平显著低于健康对照组 (0.13 ± 0.09 比 0.34 ± 0.08 , $P < 0.01$); 血清白细胞介素 1β 水平高于健康对照组 (142.7 ± 39.3 ng/L 比 81.5 ± 23.9 ng/L, $P < 0.01$), 而转化生长因子 $\beta 1$ 低于健康对照组 (11.4 ± 6.6 μ g/L 比 26.3 ± 10.5 μ g/L, $P < 0.01$); 过氧化体增殖物激活型受体 δ mRNA 表达水平与白细胞介素 1β 呈负相关 ($r = -0.437$, $P < 0.05$), 与转化生长因子 $\beta 1$ 呈正相关 ($r = 0.598$, $P < 0.05$)。结论 过氧化体增殖物激活型受体 δ 可能在急性冠状动脉综合征的发病中具有重要作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Correlation Among the Level of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors δ Expression in Peripheral Blood Monocyte and Serum Levels of Transforming Growth Factor- $\beta 1$ and Interleukin- 1β in Patients with Acute Coronary Syndrome

YANG Da-Chun, MA Shuang-Tao, YANG Yong-Jian, TAN Yan, LI De, TANG Bing and ZHANG Xin
(Department of Cardiology, PLA Chengdu Military Area Command General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China)

[KEY WORDS] Coronary Artery Disease; Monocytes; Gene Expression; Adhesion Molecule

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the correlation among the level of peroxisome proliferator-activated receptors δ (PPAR δ) expression in peripheral blood monocytes, serum levels of transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and interleukin- 1β (IL- 1β) in patients with acute coronary syndrome (ACS). **Methods** Peripheral blood monocytes were collected from 55 patients with ACS and 47 healthy controls. The PPAR δ mRNA expression was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), while the serum level of TGF- $\beta 1$ and IL- 1β were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The PPAR δ mRNA expression level (0.13 ± 0.09) was markedly reduced in peripheral blood monocytes from patients with ACS compared with healthy controls (0.34 ± 0.08 , $P < 0.01$). The serum IL- 1β level (142.7 ± 39.3 ng/L) was significant higher while the TGF- $\beta 1$ level (11.4 ± 6.6 μ g/L) was obvious lower in patients with ACS than controls (81.5 ± 23.9 ng/L, 26.3 ± 10.5 μ g/L) (both $P < 0.01$). Furthermore, the PPAR δ mRNA expression level was negatively correlated to IL- 1β level ($r = -0.437$, $P < 0.05$) and positively related to TGF- $\beta 1$ level ($r = 0.598$, $P < 0.05$). **Conclusion** The PPAR δ might play a critical role in the pathogenesis of ACS.

过氧化体增殖物激活型受体 (peroxisome proliferator activated receptors, PPAR) 是核受体超家族中的一类配体依赖的核转录因子, 包括 PPAR α 、 δ 和 γ 三种亚型。PPAR δ 不仅在细胞生长、分化及组织损伤、修复过程中起重要作用, 还参与脂质代谢、转

运及胰岛素信号调节作用^[1]。大量的实验表明 PPAR δ 与脂质代谢有关, 可纠正胰岛素抵抗和高胰岛素血症。最近还发现 PPAR δ 可调节血管炎性反应, 从而影响动脉粥样硬化的发病过程^[2]。但是, PPAR δ 通过何种机制影响动脉粥样硬化的发生、发展尚不十分清楚。本研究通过观察 PPAR δ 在急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 患者周围血单核细胞的表达及其与血清转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 及白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β) 的关系, 探讨 PPAR δ

[收稿日期] 2009-12-08 [修回日期] 2010-04-06

[作者简介] 杨大春, 博士, 主治医师, 主要从事冠心病、高血压基础与临床研究, E-mail为 yangdc71@126.com。马双陶, 硕士, 医师, 主要从事冠心病的基础与临床研究, E-mail为 shuangtao_m@yahoo.cn。杨永健, 博士, 主任医师, 主要从事动脉粥样硬化、心力衰竭心肌重构机制与防治研究, E-mail为 yangyongjian38@yahoo.com。

在动脉粥样硬化发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2008年9月~2009年9月在我院心血管内科住院的ACS患者55例,发病至入院在12h以内;其中急性心肌梗死30例,不稳定型心绞痛患者25例;男性39例,女性16例,年龄 59.3 ± 10.7 岁。47例正常对照为同期门诊健康体检者,男性34例,女性13例,年龄 58.7 ± 10.1 岁。所有患者于入院时采取肘静脉血分离单核细胞及血清,测定血清心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I cTnI)、肌酸激酶同工酶MB(creatine kinase MB, CK-MB)、肌红蛋白。空腹12h后于次日采血测血脂、血糖等。冠心病患者均符合1979年ISFC/WHO缺血性心脏病的命名和诊断标准^[3]。除外合并以下疾病者:感染、肿瘤及全身免疫性疾病、严重肝肾疾病、严重高血压而血压未控制正常者、糖尿病、使用非固醇类消炎镇痛药及免疫抑制药者。

1.2 主要材料

淋巴细胞分离液购自美国Sigma公司, TR Izol TM 试剂盒(Invitrogen公司)、逆转录试剂盒(Invitrogen公司)、PCR marker(北京天根生化科技有限公司)、TGF- β 1试剂盒(Bionew trans Phamaceutical Biotechnology公司)、IL-1 β ELISA 试剂盒(上海森雄科技实业有限公司)。PCR扩增引物由上海博亚生物技术公司合成,引物序列为GAPDH上游5'-GAA GGT CGG AGT CAA CGG -3',下游5'-GCT CAG TGT AGC CCA GGA T -3'(PCR产物824 bp); PPAR δ 上游5'-TGA GTT CGC CAA GAG C -3',下游5'-GCC AAG ATC ACA GGG AC -3'(PCR产物418 bp)。MMULITE 1000型化学发光分析仪及配套试剂(美国DPC公司)。

1.3 外周血单核细胞分离

采用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离周围血单核细胞。取肘静脉血5 mL加入肝素抗凝管, Hanks液1:1稀释混匀。将混匀后的血标本沿试管壁缓慢加入含1.5 mL淋巴细胞分离液的EP管内,室温,2500 r/min离心15 min。细胞分为上中下3层,在上层与中层分界处有一戒指状白色细胞环为单核细胞层,将其吸出用于提取细胞RNA。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测过氧化体增殖物激活型受体 δ 的表达

收集单核细胞,应用Trizol试剂盒提取细胞总

RNA,核酸蛋白定量仪测定RNA含量,逆转录合成cDNA第1链,PPAR δ 及GAPDH的PCR反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性5 min,94 $^{\circ}$ C变性45 s,58 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸40 s,重复35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸5 min。产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统对条带扫描,软件分析,分别计算PPAR δ 与GAPDH吸光度的比值。

1.5 血脂、血糖的测定

血糖测定采用己糖激酶法,血脂采用酶法测定,按试剂说明应用全自动生化分析仪测定。

1.6 转化生长因子 β 1、白细胞介素1 β 、心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶MB及肌红蛋白的检测

TGF- β 1及IL-1 β 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法测定,cTnI、CK-MB及肌红蛋白的检测采用化学发光法。严格按照试剂盒说明书操作。

1.7 统计学处理

应用SPSS11.5统计学软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用t检验,相关性采用直线相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基线资料

ACS组和正常对照组间年龄、性别、体质指数、血压、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDLC)、血糖差异无显著性;ACS组肌红蛋白、CK-MB及cTnI明显高于正常对照组($P < 0.01$,表1)。

表1 各组患者临床一般情况

指标	正常对照组 (n=47)	ACS组 (n=55)
年龄(岁)	58.7 \pm 10.1	59.3 \pm 10.7
男女(例)	34/13	39/16
体质指数(kg/m ²)	23.37 \pm 1.54	23.79 \pm 1.83
收缩压(mmHg)	132 \pm 27	134 \pm 25
舒张压(mmHg)	79 \pm 17	81 \pm 25
TG(mmol/L)	1.63 \pm 0.38	1.73 \pm 0.47
TC(mmol/L)	4.92 \pm 0.98	5.48 \pm 1.12
LDLC(mmol/L)	2.94 \pm 0.90	3.49 \pm 0.98
HDLC(mmol/L)	1.23 \pm 0.35	1.20 \pm 0.31
血糖(mmol/L)	5.01 \pm 0.96	5.45 \pm 1.12
肌红蛋白(μ g/L)	31.57 \pm 13.37	279.54 \pm 106.52 ^a
cTnI(μ g/L)	0.11 \pm 0.09	21.74 \pm 18.31 ^a
CK-MB(μ g/L)	3.76 \pm 1.95	30.36 \pm 26.84 ^a

a为 $P < 0.01$,与正常对照组比较。

2.2 血清转化生长因子 β 1 和白细胞介素 1β 水平

ACS患者血清 TGF- β 1 明显低于正常对照组, IL- 1β 水平明显高于正常对照组 ($P < 0.01$, 表 2)。

表 2 血清转化生长因子 β 1 和白细胞介素 1β 水平

分 组	n	TGF- β 1 (μ g/L)	IL- 1β (ng/L)
正常对照组	47	26.3 \pm 10.5	81.5 \pm 23.9
ACS组	55	11.4 \pm 4.6 ^a	142.7 \pm 39.3 ^a

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 周围血单核细胞中过氧化体增殖物激活型受体 δ 的表达

PPAR δ mRNA 在周围血单核细胞中有表达, ACS患者 PPAR δ mRNA 的表达明显低于正常对照组 (0.13 ± 0.09 比 0.34 ± 0.08 , $P < 0.01$; 图 1)。

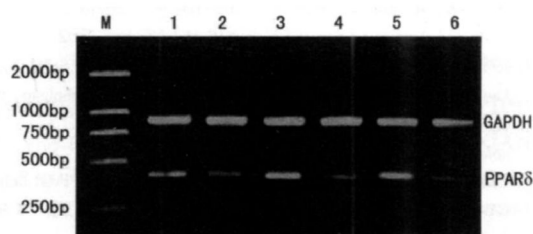


图 1 正常对照者及急性冠状动脉综合征患者周围血单核细胞过氧化体增殖物激活型受体 δ mRNA 的表达 M 为 Marker, 1、3 和 5 为正常对照组, 2、4 和 6 为 ACS 组。

2.4 周围血单核细胞过氧化体增殖物激活型受体 δ mRNA 表达与血清转化生长因子 β 1、白细胞介素 1β 的相关性

分别对 ACS 患者外周血单核细胞 PPAR δ mRNA 表达水平与血清 TGF- β 1 及 IL- 1β 进行相关性分析, 发现外周血单核细胞 PPAR δ mRNA 表达水平与血清 TGF- β 1 水平成正相关 ($r = 0.598$, $P < 0.05$), 与血清 IL- 1β 水平成负相关 ($r = -0.437$, $P < 0.05$; 图 2)。

3 讨论

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种血管壁的炎症性疾病^[4]。目前认为 ACS 发生的主要机制是由于冠状动脉斑块的不稳定、破裂、出血和血栓形成, 炎症介质分泌增加, 抗炎因子分泌降低, 导致急性血流减少或中断^[5,6]。

IL- 1β 是一种炎症性细胞因子, 具有多种致 As 发生的生物学效应, 它主要由活化的巨噬细胞产生。研究表明 IL- 1β 能调节血管功能, 如促进血管平滑

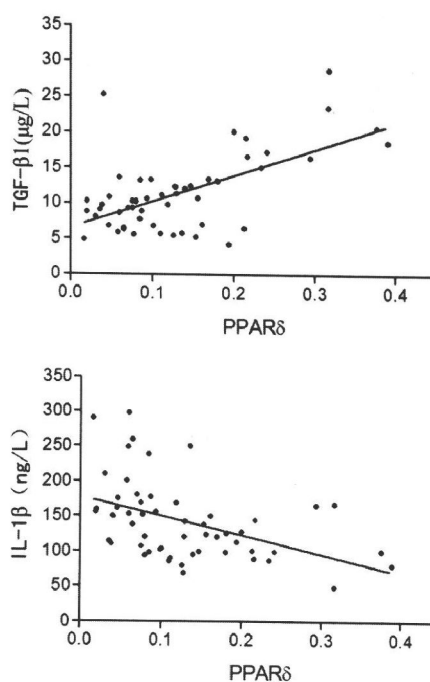


图 2 急性冠状动脉综合征患者周围血单核细胞过氧化体增殖物激活型受体 δ mRNA 的表达与血清转化生长因子 β 1 和白细胞介素 1β 的相关性 ($n = 55$)

肌细胞增殖, 调节低密度脂蛋白 (LDL) 代谢, 诱导基质金属蛋白合成, 增加血管通透性, 抑制血管收缩以及增加促凝活性, 参与球囊扩张术后血管内皮的损伤愈合过程^[7]。本研究结果显示 IL- 1β 在 ACS 患者血清中含量高于正常对照组, 表明 IL- 1β 在 As 发病中具有重要作用。

在动脉粥样硬化过程中, 不仅有炎症介质的异常表达, 同时, 体内具有拮抗炎症作用的细胞因子, 在 As 斑块局部抗炎因子存在异常表达。TGF- β 1 是具有潜在抗炎作用的细胞因子, 它可以抑制多种细胞反应及细胞凋亡, 而这些细胞反应对 As 斑块的发展、破裂及血栓形成起重要作用^[8]。TGF- β 1 由实质细胞产生, 能促进各类型组织损伤的修复, 促进血管生成, 调节细胞生长和分化, 调节免疫细胞的生成、分化并调节其功能, 抑制白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1) 的合成和释放, 抑制泡沫细胞的形成从而发挥直接或间接抗炎作用^[8-10]。本研究显示, ACS 患者血清中 TGF- β 1 水平明显低于正常对照组, 提示在不稳定性斑块的发生、发展过程中, 抗炎因子的拮抗作用减弱可能也是其机制之一。表明由于致炎作用 - 抗炎作用失衡, 可能是不稳定性斑块形成的重要原因。

在与动脉粥样硬化相关的脂质代谢研究中, 有研究发现 PPAR δ 的激动剂 GW 501516 能够提高胆

固醇逆向转运体 ATP 结合盒转运体 (ACBA1), 促进胆固醇逆向转运, 升高循环中的高密度脂蛋白 (HDL)水平^[11], 减少具有致 A s 的小而密的 LDL 的作用^[12]。Graham 等^[13]发现 PPAR δ 特异性激动剂 GW 610742 可使动脉粥样硬化斑块损伤面积减少达 50%, 使主动脉的炎性分子如单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) 表达下调, 血浆中炎性因子如 MCP-1、IL-12 和 TNF- α 的水平降低。本研究发现, ACS 患者周围血单核细胞 PPAR δ mRNA 表达明显低于正常对照组, 且其表达量与炎症介质 IL-1 β 成反比, 与 TGF- β 1 成正比。提示 PPAR δ 可能通过抑制 IL-1 β 的表达, 促进 TGF- β 1 的表达, 调节抗炎因子与炎症介质之间的比例, 从而发挥抑制动脉粥样不稳定性斑块形成的作用。表明 PPAR δ 在 ACS 的发病中可能具有重要作用。

PPAR δ 通过何种机制调控炎症介质与抗炎因子的表达及维持其正常比例, 目前尚不清楚, 有待研究。由于本研究样本量较少, 尚需进一步积累大样本资料进行深入研究。

[参考文献]

[1] Robinson E, Grieve DJ. Significance of peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system in health and disease [J]. *Phar-*

- macol Ther* 2009 **122** (3): 246-263
- [2] Stienstra R, Duval C, Muller M, et al. PPAR δ obesity and inflammation [J]. *PPAR Res* 2007 **2007**: 95974
- [3] Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the joint international society and federation of cardiology/world health organization task force on standardization of clinical nomenclature [J]. *Circulation* 1979 **59** (3): 607-609
- [4] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med* 1999 **340** (2): 115-126
- [5] 李翠芝, 彭朝权, 邹丽媛, 等. 血清可溶性 CD40L 在冠心病患者中的价值 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009 **17** (2): 145-149
- [6] 张绍洁, 吴黎明. 冠心病患者外周血单个核细胞基质金属蛋白酶 9 / 组织型金属蛋白酶抑制剂 1 及磷酸化 c-Jun 蛋白表达改变与冠状动脉病变特征的相关性 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009 **17** (3): 209-212
- [7] 赵庆斌, 刘艳, 祝家庆, 等. 急性冠状动脉综合征患者血清白介素 1, 6, 10 的变化 [J]. *第四军医大学学报*, 2003 **24** (15): 1400-401
- [8] Grainger DJ. TGF-beta and atherosclerosis in man [J]. *Cardiovasc Res* 2007 **74** (2): 213-222
- [9] Gacka M, Adamiec R. Role of TGF-beta in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Pol Arch Med Wewn* 2002 **108** (4): 987-991
- [10] McCaffrey TA. TGF-beta signaling in atherosclerosis and restenosis [J]. *Front Biosci (Schol Ed)* 2009 **1**: 236-245
- [11] H \ddot{u} chikawa K, Michalk L, Wahli W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives [J]. *Cell Mol Life Sci* 2002 **59** (5): 790-798
- [12] Lee CH, Olson P, Evans RM. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors [J]. *Endocrinology* 2003 **144** (6): 2201-207
- [13] Graham TL, Mookherjee C, Suckling KE, et al. The PPAR delta agonist GW 0742X reduces atherosclerosis in LDLR (-/-) mice [J]. *Atherosclerosis* 2005 **181** (1): 29-37

(此文编辑 许雪梅)