

急性心肌梗死患者外周血单个核细胞 P66Shc mRNA 的表达及其与氧化应激的关系

陈亮¹, 徐标¹, 黄为¹, 钟静², 李声娜¹

(1. 南京医科大学鼓楼临床学院心血管内科, 2. 南京大学附属鼓楼医院心血管内科, 江苏省南京市 210008)

[关键词] 急性心肌梗死; P66Shc; 氧化应激

[摘要] **目的** 探讨急性心肌梗死患者外周血单个核细胞 P66Shc mRNA 的表达及其与氧化应激的关系。**方法** 选择经冠状动脉造影检查及治疗的患者 67 例, 根据临床表现和冠状动脉造影结果分成健康对照组 23 例, 稳定型心绞痛组 23 例, 急性心肌梗死组 21 例。通过检测血中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平, 对机体氧化应激状态进行全面分析, 在此基础上运用 RT-qPCR 比较三组外周血单个核细胞中 P66Shc mRNA 的表达, 并对 P66Shc mRNA 的表达与 MDA 及 SOD 进行相关性分析。**结果** 急性心肌梗死组 MDA 明显高于稳定型心绞痛组和健康对照组($P < 0.05$), 而 SOD 明显低于稳定型心绞痛组和健康对照组($P < 0.01$); 急性心肌梗死组 P66Shc mRNA 的表达明显高于稳定型心绞痛组及健康对照组($P < 0.01$), 而在稳定型心绞痛组与健康对照组之间无明显差别($P > 0.05$), 且 P66Shc mRNA 的表达量与 MDA 水平呈正相关($r = 0.49, P = 0.024$), 与 SOD 水平相关性不明显。**结论** 急性心肌梗死时 P66Shc mRNA 表达增高, P66Shc 可能介导了斑块由稳定到不稳定性转化的机制。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Expression of P66Shc mRNA on Peripheral Blood Monocytes in Patients with Acute Myocardial Infarction and Its Relationship with Oxidative Stress

CHEN Liang, XU Biao, HUANG Wei, ZHONG Jing, and LI Sheng-Na

(1. Department of Cardiovascular, Drum Tower Clinical Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 2. Department of Cardiovascular, Drum Tower Hospital Affiliated to Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

[KEY WORDS] Acute Myocardial Infarction; P66Shc; Oxidative Stress

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of P66Shc mRNA on peripheral blood monocytes (PBMs) in patients with acute myocardial infarction (AMI) and its relationship with oxidative stress. **Methods** According to clinical manifestations and results of coronary angiography, 67 patients were recruited to this study. They were divided into three groups: normal control group ($n = 23$), stable angina pectoris (SAP) group ($n = 23$) and AMI group ($n = 21$). The levels of serum superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) activity were examined to analyze the state of oxidative stress state in all subjects. PBMs were isolated and the expression of P66Shc mRNA was determined by quantitative Real-time PCR. **Results** The levels of MDA and P66Shc mRNA were greatly increased and SOD were significantly decreased in AMI group in comparison with SAP and normal control group. There were no significant differences between SAP group and normal control group on the levels of serum SOD, MDA and P66Shc mRNA ($P > 0.05$). The expression of P66Shc was in positive correlation with the level of MDA ($r = 0.49, P = 0.024$), but not with the level of SOD in AMI group. **Conclusion** P66Shc mRNA levels were increased in AMI patients, which may be involved in the mechanism of transition from a stable to an unstable lesion.

氧化应激是指机体活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生过度或机体抗氧化能力降低, 氧化系

[收稿日期] 2013-08-07

[作者简介] 陈亮, 硕士研究生, 主要从事冠状动脉粥样硬化的基础与临床研究, E-mail 为 chenliangwonder@126.com。黄为, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病的基础和临床研究, E-mail 为 huangweisd@126.com。通讯作者徐标, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事心肌梗死和心力衰竭的基础和临床研究, E-mail 为 xubiao@medmail.com。

统和抗氧化系统平衡紊乱,从而导致潜在性损伤的病理过程^[1]。ROS在调节炎症反应过程中起了重要作用,ROS可以使低密度脂蛋白氧化,形成氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL),而ox-LDL被巨噬细胞吞噬后可以形成脂质沉积,导致动脉粥样硬化^[2]。P66Shc是调控细胞氧化应激和生命周期的关键蛋白,在线粒体ROS代谢和细胞凋亡中起重要的调控作用^[3]。近年来,研究指出P66Shc基因敲除的小鼠不仅能预防血管内皮功能障碍如动脉粥样硬化,而且能降低全身和组织的氧化应激水平^[4],然而P66Shc在心血管疾病中研究较少,尤其在临床研究中。本研究将通过检测丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平,了解急性心肌梗死氧化应激状态,并通过RT-qPCR检测外周血单个核细胞中P66Shc mRNA的表达,旨在研究和探讨急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)患者外周血单个核细胞中P66Shc mRNA的变化与氧化应激的关系。

1 对象和方法

1.1 病例选择

选自2012年12月至2013年6月在鼓楼医院住院并进行冠状动脉造影(coronary angiography, CAG)检查的患者共67例,男42例,女25例,抽取空腹静脉血行常规生物化学指标检查,在CAG术中抽取外周动脉血检测MDA和SOD水平,并运用RT-qPCR检测外周血单个核细胞中P66Shc mRNA的表达。根据临床表现和CAG结果,将患者分为健康对照组、稳定型心绞痛(stable angina pectoris, SAP)组和AMI组。健康对照组23例,CAG检查示冠状动脉未见明显阻塞性改变;SAP组23例,劳累性心绞痛2个月内发作无明显变化,CAG检查示前降支、回旋支、右冠状动脉至少有一支血管狭窄 $\geq 75\%$;AMI组21例,ST段抬高型心肌梗死15例(典型的胸痛且有两个导联ST段抬高 ≥ 0.1 mV)与非ST段抬高型心肌梗死6例(典型的胸痛且肌钙蛋白T水平超过正常值的四倍)。有糖尿病、肝肾功能不全、感染、肿瘤、自身免疫疾病或结缔组织疾病的患者排除在外。

1.2 外周血单个核细胞的分离

运用梯度离心法分离外周血单个核细胞,将稀释的血液沿管壁加入装有Ficoll液离心管中,室温下2000 r/min离心20 min,轻轻吸出乳白色的外周血单个核细胞,用PBS洗涤两次,最后加入1 mL Tr-

izol重悬,储存于 -80°C 冰箱等待提取总RNA用。

1.3 RT-qPCR检测P66Shc mRNA的表达

按通用型RNA提取试剂盒说明书提取细胞总RNA,逆转录成cDNA,再取2 μL cDNA进行PCR扩增,由GAPDH作内参。引物序列:P66Shc正义链5'-AAG TAC AAT CCA CTC CGG AATGA-3',反义链5'-GG GCC CCA GGG ATG AAG-3';GAPDH正义链5'-ATG ACA TCA AGA AGG TGG TG-3',反义链5'-CAT ACC AGG AAA ATG AGC TTG-3',反应在7500 Fast Real-time PCR System仪器下进行。

1.4 血清MDA测定

血清中MDA可与硫代巴比妥酸(TBA)缩合,形成红色产物,在532 nm处有最大吸收峰,此法称TBA法。具体操作按试剂盒说明书进行,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.5 血清SOD测定

超氧阴离子自由基氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下呈现紫红色。当被测样品中含有SOD时,则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用,使形成的亚硝酸盐减少,通过比色法可以测定被测样品具有SOD活力。具体操作按试剂盒说明书进行,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.6 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布的资料多组间比较采用单因素方差分析,不符合正态分布的资料多组间比较采用非参数检验,计数资料采用 χ^2 检验,相关分析采用Pearson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

各组在患者年龄分布、高血压比例、甘油三酯水平等方面比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。血糖在AMI组与健康对照组比较差异有显著性($P < 0.05$;表1)。

2.2 P66Shc mRNA的表达

由扩增曲线可知各样本基因的Ct值,由融解曲线可见反应产物呈一个单一的熔点曲线峰,表明扩增产物的特异性高(图1和2)。P66Shc mRNA在健康对照组、SAP组及AMI组的相对表达量分别为 1.69 ± 0.93 、 1.96 ± 1.79 及 4.79 ± 3.31 ,AMI组P66Shc mRNA的表达较SAP组和健康对照组显著增高($P < 0.01$),但SAP组P66Shc mRNA的表达与健康对照组之间无明显差异(图3)。

表 1. 三组患者一般资料比较

Table 1. Comparison of general data in the three groups

项目	健康对照组 (n=23)	SAP 组 (n=23)	AMI 组 (n=21)
男/女(例)	12/11	15/8	15/6
年龄(岁)	62.2 ± 6.4	65.3 ± 3.2	68.3 ± 4.3
体重指数(kg/m ²)	24.1 ± 3.6	23.7 ± 3.5	24.9 ± 3.2
血糖(mmol/L)	5.0 ± 0.3	5.5 ± 0.2	6.7 ± 0.5 ^a
总胆固醇(mmol/L)	3.7 ± 1.1	3.8 ± 1.3	3.9 ± 1.3
甘油三酯(mmol/L)	1.2 ± 0.5	1.5 ± 0.9	1.4 ± 0.5
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.0 ± 0.8	2.3 ± 0.7	2.2 ± 0.8
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.2
肌酐(μmol/L)	72.4 ± 13.6	69.7 ± 12.1	74.8 ± 17.2
高血压(例)	7(30%)	9(39%)	10(48%)
高脂血症(例)	2(9%)	3(13%)	4(19%)

a 为 $P < 0.05$, 与健康对照组比较。

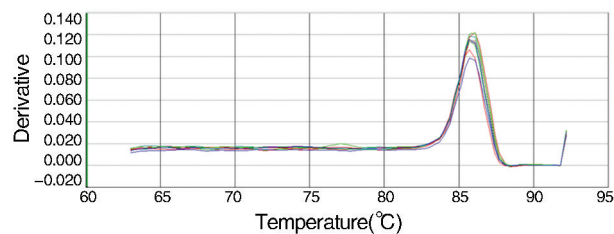


图 1. Real-time PCR 产物的融解曲线

Figure 1. Melting curves of Real-time PCR products

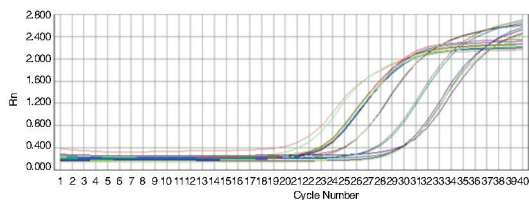


图 2. Real-time PCR 产物的扩增曲线

Figure 2. Amplification curves of Real-time PCR products

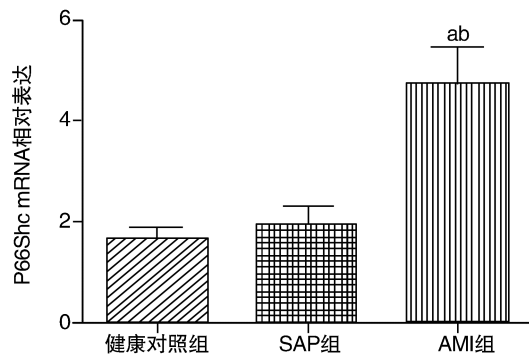


图 3. 三组 P66Shc mRNA 的相对表达 a 为 $P < 0.01$, 与健康对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 SAP 组比较。

Figure 3. Relative expressions of P66Shc mRNA in the three groups

2.3 MDA 和 SOD 的水平变化

AMI 组 MDA 水平较健康对照组和 SAP 组增高 ($P < 0.05$), SOD 水平较健康对照组和 SAP 组降低 ($P < 0.05$), 但 SAP 组 MDA、SOD 水平与健康对照组之间差异无统计学意义(表 2)。

表 2. 三组血清中 MDA 和 SOD 水平

Table 2. Levels of MDA and SOD in the three groups

指标	健康对照组 (n=23)	SAP 组 (n=23)	AMI 组 (n=21)
MDA(nmol/L)	5.58 ± 1.51	6.34 ± 1.76	7.77 ± 2.57 ^{ab}
SOD(ku/L)	89.70 ± 7.59	84.30 ± 7.76	66.99 ± 8.41 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与健康对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 SAP 组比较。

2.4 AMI 组 P66Shc mRNA 的表达与 MDA、SOD 的相关性

Pearson 相关分析显示, AMI 组 P66Shc mRNA 的表达与 MDA 水平呈正相关 ($r = 0.49, P = 0.024$; 图 4), 而与 SOD 水平相关性不明显。

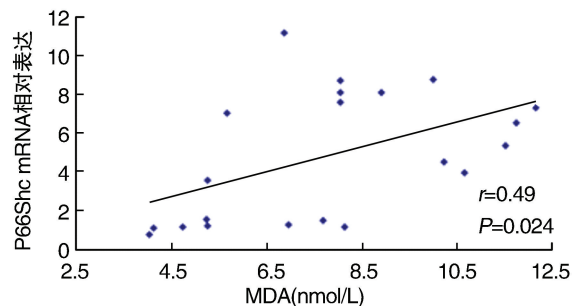


图 4. AMI 组 P66Shc mRNA 与 MDA 的相关性

Figure 4. The correlations analysis between P66Shc mRNA and MDA in AMI group

3 讨论

P66Shc 是调控细胞氧化应激的关键蛋白, 一方面通过氧化细胞色素 C 降低线粒体电子传递链从而产生大量 ROS; 另一方面通过激活 Rac1 促进胞质 NADPH 氧化酶的活化, 导致细胞 ROS 过量产生, 最终引起细胞氧化损伤^[5]。研究显示 P66Shc 缺失可保护血管紧张素 II 诱导的心肌细胞损伤^[6]; P66Shc 缺陷的糖尿病小鼠由于心肌干细胞增殖从而有效减轻了糖尿病对心脏的损伤, 而野生型糖尿病小鼠则表现为心肌干细胞凋亡和心肌坏死最终导致心肌病变^[7]。Noda 等^[8]发现冠心病患者外周血单个核细胞中 P66Shc mRNA 的表达量较正常对照组增

高,而 Franzeck 等^[9]研究显示急性冠状动脉综合征患者外周血单个核细胞中 P66Shc mRNA 表达升高,而 SAP 患者 P66Shc mRNA 表达水平则没有增加,因此 P66Shc mRNA 在 SAP 患者中究竟是否升高,以及 P66Shc mRNA 在急性冠状动脉综合征患者中升高的意义值得关注。我们的研究结果与 Franzeck 等的研究结果类似,AMI 患者 P66Shc mRNA 表达水平增加,而 SAP 患者和健康对照者没有变化,且 P66Shc mRNA 表达水平与 MDA 呈正相关,提示 P66Shc 可能参与冠心病的急性心血管事件。Pagnin 等^[10]研究发现糖尿病患者外周血单个核细胞中 P66Shc mRNA 的表达量较非糖尿病患者高,且 P66Shc mRNA 的表达量与氧化应激指标 8-异前列腺呈正相关,而在 Noda 等的研究中,未将糖尿病作为一个排除标准,且冠心病组糖尿病人数是健康对照组的 2 倍,这可能是该研究中 SAP 患者外周血单个核细胞中 P66Shc mRNA 的表达量较正常对照组增高的原因。本研究未纳入糖尿病患者,但 AMI 组血糖较其它两组高,可能与心肌梗死引起的氧化应激而至血糖短暂的升高有关。

氧化应激在斑块形成与破裂中扮演着重要角色^[11],而斑块是否破裂,细胞凋亡又起着重要作用。曾经冠状动脉粥样硬化斑块中细胞的死亡被认为是坏死性的,但近来研究显示斑块中不同类型的细胞凋亡均会导致斑块不稳定,甚至斑块破裂^[12]。在发生斑块破裂的部位可以观察到巨噬细胞和泡沫细胞的凋亡数量增加^[13],同样平滑肌细胞的凋亡也是导致斑块不稳定的主要因素之一,因此动脉粥样硬化斑块中关键细胞的凋亡与增殖的平衡是决定斑块稳定与否的重要因素。最近研究显示 P66Shc 与细胞凋亡相关^[14]。在小鼠胚胎成纤维细胞 P53 依赖的细胞凋亡中 P66Shc 起到了重要作用,其高表达会导致同种细胞的凋亡率增加;给予 P66Shc 基因敲除的小鼠高脂饮食后,内皮细胞凋亡的发生率明显降低。

由于 P66Shc 是细胞氧化应激的关键调控蛋白,我们推测 P66Shc 可能不仅仅是冠心病患者不良心血管事件的生化标记物,而且可能通过氧化应激和凋亡等机制介导了斑块由稳定到不稳定的转化。利用基因技术干扰 AMI 患者外周血单个核细胞中 P66Shc mRNA 的表达,有助于进一步阐明 P66Shc

参与冠心病的发病机制,从而为临床治疗冠心病提供新的靶点。

[参考文献]

- [1] 张 暄, 孙延荣, 潘 杰. ROS 对不同基因型小鼠腹腔巨噬细胞泡沫化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (3): 254.
- [2] 易 斌, 张 浩, 黄志军. 晚期糖基化终产物和同型半胱氨酸对内皮细胞的协同损伤作用[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18 (11): 1 552-556.
- [3] Trinei M, Migliaccio E, Bernardi P, et al. P66Shc, mitochondria, and the generation of reactive oxygen species[J]. *Methods Enzymol*, 2013, 528: 99-110.
- [4] Francia P, Cosentino F, Schiavoni M, et al. P66 (Shc) protein, oxidative stress, and cardiovascular complications of diabetes: the missing link[J]. *J Mol Med*, 2009, 87 (9): 885-891.
- [5] Kim CS, Kim YR, Naqvi A, et al. Homocysteine promotes human endothelial cell dysfunction via site-specific epigenetic regulation of p66shc[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 92 (3): 466-475.
- [6] Guo J, Gertsberg Z, Ozgen N, et al. P66Shc links alpha1-adrenergic receptors to a reactive oxygen species-dependent AKT-FOXO3A phosphorylation pathway in cardiomyocytes[J]. *Circ Res*, 2009, 104 (5): 660-669.
- [7] Rota M, LeCapitaine N, Hosoda T, et al. Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene[J]. *Circ Res*, 2006, 99 (1): 42-52.
- [8] Noda Y, Yamagishi S, Matsui T, et al. The p66shc gene expression in peripheral blood monocytes is increased in patients with coronary artery disease[J]. *Clin Cardiol*, 2010, 33 (9): 548-552.
- [9] Franzeck FC, Hof D, Spescha RD, et al. Expression of the aging gene p66Shc is increased in peripheral blood monocytes of patients with acute coronary syndrome but not with stable coronary artery disease[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 220 (1): 282-286.
- [10] Pagnin E, Fadini G, de Toni R, et al. Diabetes induces p66shc gene expression in human peripheral blood mononuclear cells: relationship to oxidative stress[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90 (2): 1 130-136.
- [11] 杨 盛, 张菲斐, 韩战营, 等. 冠心病患者血清对氧磷 1 活性与糖化血红蛋白水平及冠状动脉病变的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (4): 351-355.
- [12] Zaccagnini G, Martelli F, Fasanaro P, et al. P66ShcA modulates tissue response to hindlimb ischemia[J]. *Circulation*, 109 (23): 2 917-923.
- [13] Halvorsen B, Otterdal K, Dahl TB, et al. Atherosclerotic plaque stability—what determines the fate of a plaque[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2008, 51 (3): 183-194.
- [14] Galimov ER. The role of P66Shc in oxidative stress and apoptosis [J]. *Acta Naturae*, 2010, 2 (4): 44-51.

(此文编辑 文玉珊)