

联合检测冠心病患者 2 项磷脂酶表达的临床价值*

刘 津¹, 应国光², 田 刚³, 林祥灿⁴, 李海平¹, 王连环⁴ (1. 海洋石油总医院检验科, 天津 300452; 2. 天津医科大学肿瘤医院研究所, 天津 300060; 3. 天津公安医院检验科, 天津 300040; 4. 海洋石油总医院心内科, 天津 300452)

【摘要】 目的 探讨冠心病患者联合检测血清 II A 分泌型磷脂酶 A2 (II A-sPLA2) 及脂蛋白相关磷脂酶 A2 (LP-PLA2) 对于其诊疗的意义。**方法** 对健康对照者 50 例, 急性心肌梗死 (AMI) 患者 13 例, 稳定型心绞痛 (UAP) 患者 17 例和不稳定型心绞痛 (SAP) 患者 70 例的生化指标及 II A-sPLA2 和 LP-PLA2 基因水平通过逆转录聚合酶链反应进行检测, 统计分析各组之间的差异。**结果** 冠心病组 sPLA2-II 或 LP-PLA2 表达明显比健康对照组高, 两组 II A-sPLA2/ β -actin 或 LP-PLA2/ β -actin 比值差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。II A-sPLA2/ β -actin 或 LP-PLA2/ β -actin 表达水平 AMI 组最高, 其次是 SAP 组, 最后是 UAP 组, 3 组相互比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** II A-sPLA2 及 LP-PLA2 指标的检测建议推广到临床实验室作为冠心病患者重要监测指标之一。

【关键词】 冠心病; 动脉粥样硬化; II A 分泌型磷脂酶 A2; 脂蛋白相关磷脂酶 A2; 逆转录聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.13.031 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)13-1816-02

炎症已经被公认是动脉粥样硬化发展过程中的核心因素。传统的炎症标志物, 如白细胞介素、肿瘤坏死因子、细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1、纤维蛋白原、C-反应蛋白 (CRP) 等在促进动脉粥样硬化斑块形成中的作用逐渐被众多试验所证实^[1-2]。血清 II A 分泌型磷脂酶 A2 (II A-sPLA2) 及脂蛋白相关磷脂酶 A2 (LP-PLA2) 是重要的花生四烯酸代谢通路中炎症因子。越来越多的研究表明, 心血管疾病时血清 II A-sPLA2 及 LP-PLA2 水平会升高, 是动脉粥样硬化的危险因素和发生冠状动脉事件的预测因子^[3], 为冠心病的诊断增添了一种新手段, 并成为治疗冠心病新的潜在目标靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 11~12 月在海洋石油总医院体检中心健康体检无糖尿病、心血管疾病及内分泌代谢疾病者 50 例作为健康对照组, 其中男 25 例, 年龄 29~81 岁; 女 25 例, 年龄 27~59 岁。所有受检者经病史询问排除既往肝、肾、血液系统及其他引起凝血及纤溶功能改变的疾病。选取 2012 年 2 月至 2013 年 3 月在海洋石油总医院门诊、住院治疗的冠心病患者 100 例作为病例组, 其中男 54 例, 年龄 43~83 岁; 女 46 例, 年龄 57~91 岁。依据临床诊断将 100 例病例组患者分成 3 组, 其中急性心肌梗死 (AMI) 组 13 例, 稳定型心绞痛 (UAP) 组 17 例, 不稳定型心绞痛 (SAP) 组 70 例。

1.2 仪器与试剂 Hitachi 7600-010 全自动生化分析仪; Id-kodak 凝胶成像系统 (美国 Kodak 公司); PE-480 型热循环仪 (美国 Perkin Elmer Cetus 公司); 凝胶电泳仪 (北京市六一仪器厂); 紫外透射分析仪 (美国 UVP 公司); DNA 提取试剂盒 (Sigma 公司); II A-sPLA2 和 LP-PLA2 引物 (上海生工生物公司); 基因提取试剂盒和聚合酶链反应 (PCR) 试剂盒 (大连宝生物公司)。

1.3 研究方法 (1) 记录研究对象的基本信息。(2) 采用血清酶终点法检测研究对象空腹血清总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白-胆固醇 (LDL-C) 等指标。(3) PCR: ① RNA 提取。向患者血液中加

入 1 mL Trizol, 用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀; 室温放置 5 min, 加入 200 μ L 氯仿, 剧烈振荡 15 s; 室温放置 3 min, 4 $^{\circ}$ C 离心, 12 000 r/min 离心 15 min; 取上清液至新的 EP 管中, 加入 500 μ L 异丙醇, 混匀, 室温静置 10 min; 4 $^{\circ}$ C 离心, 12 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液, 加入 75% 乙醇 (DEPC 水配制) 1 mL 洗 RNA 沉淀, 轻轻混匀; 4 $^{\circ}$ C 离心, 7 500 r/min 离心 5 min 后弃上清液, 室温干燥 5 min; 用 DEPC H₂O 60 μ L 溶解 RNA 沉淀, 紫外分光光度计测浓度, 用于逆转录或 -80 $^{\circ}$ C 保存^[4]。其他按照试剂说明书操作。② cDNA 合成。管 1, 随机引物 2 μ L, RNA 4 μ L, DEPC H₂O 9 μ L, 70 $^{\circ}$ C, 5 min, 4 $^{\circ}$ C; 管 2, 5 $\times$ Buffer 8 μ L, MMLV 1 μ L, Rnasin 0.5 μ L, dNTP 1.25 μ L, 加 H₂O 14.25 μ L; 将管 2 加入管 1 中, 共 40 μ L 体系 37 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C。③ PCR。5 $\times$ Buffer 5 μ L, Mg²⁺ 0.25 μ L, dNTP 0.75 μ L, TaqMen 0.25 μ L, Primer1 和 Primer2 各 0.5 μ L, dH₂O 15.75 μ L, ample 2 μ L 95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s 读板 50 个循环 4 $^{\circ}$ C。II A-sPLA2 引物序列, 上游 5'-GGC CGG GAC CTG ACT GAC TAC-3', 下游 5'-GCC GCC AGA CAG CAC TGT GTT-3'; LP-PLA2 引物序列, 上游 5'-CCA GCA GAG GAG CTA GGC-3', 下游 5'-GAA ATT CAG CAC TGG GTG G-3'。PCR 条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 60 s 读板 45 个循环 4 $^{\circ}$ C。④ PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳。取 PCR 产物 5.0 μ L 加于凝胶孔内, 4 V/cm 电泳 30 min, 置紫外分析仪下拍照记录结果, 用激光密度扫描仪记录 II A-sPLA2 和 β -actin 产物电泳带的密度并进行分析。用 AlphaImager2200 软件分析 PCR 产物带, 测得产物带 A 值。用 A 值 II A-sPLA2 或 LP-PLA2 产物带/A 值 β -actin 产物带值表示其相对水平。

1.4 统计学方法 数据处理用 SPSS10.0 软件。两样本均数比较采用 *t* 检验, 多个样本均数比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床研究对象生化指标检测结果 见表 1。由表 1 可

* 基金项目: 天津市滨海新区卫生局卫生科技一般扶持项目 (2011BHKY023)。

见,冠心病患者中 AMI 组、SAP 组和 UAP 组 TG 水平明显比健康对照组高,差异有统计学意义($t=4.897\sim 6.754, P<0.01$),HDL-C 水平明显比健康对照组低,差异有统计学意义($t=4.062\sim 4.684, P<0.05$),随着冠心病患者病变程度加剧,HDL-C 水平有降低的趋势,即 AMI 组比 SAP 组和 UAP 组患者 HDL-C 水平均低,3 组相比差异有统计学意义($t=3.013\sim 3.987, P<0.05$)。

表 1 各组生化指标比较 (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)					
组别	n	TC	TG	HDL-C	LDL-C
SAP 组	70	4.52 $\pm$ 1.21	1.95 $\pm$ 1.87**	1.12 $\pm$ 0.39* Δ	2.46 $\pm$ 1.05
UAP 组	17	4.39 $\pm$ 0.77	1.64 $\pm$ 0.98**	1.22 $\pm$ 0.21* Δ	2.48 $\pm$ 0.83
AMI 组	13	4.72 $\pm$ 0.65	2.02 $\pm$ 0.69**	1.05 $\pm$ 0.16*	2.29 $\pm$ 0.54
健康对照组	50	4.97 $\pm$ 0.66	1.04 $\pm$ 0.52	1.43 $\pm$ 0.34	3.05 $\pm$ 0.54
F		0.389	7.463	5.687	2.045

注:与健康对照组比较,** $P<0.01$,* $P<0.05$;与 AMI 组比较, $\Delta P<0.05$ 。

2.2 冠心病组和健康对照组 II A-sPLA2 或 LP-PLA2(β -actin 作为内参照)表达比较 PCR 产物电泳后置紫外分析仪下拍照(图 1)。由图 1 可见,冠心病组 II A-sPLA2 或 LP-PLA2 表达明显比健康对照组高,两组 II A-sPLA2/ β -actin 或 LP-PLA2/ β -actin 比值差异均有统计学意义($P<0.01$)。

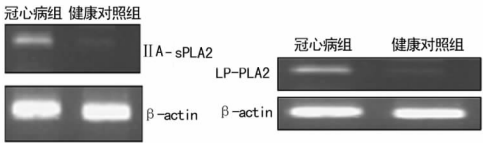


图 1 两组 II A-sPLA2 或 LP-PLA2 (β -actin 作为内参照)表达比较

2.3 冠心病各病变组 II A-sPLA2/ β -actin 或 LP-PLA2/ β -actin 表达比较 AMI 组、SAP 组和 UAP 组 II A-sPLA2/ β -actin 或 LP-PLA2/ β -actin 表达水平有降低趋势。即随着冠心病病变严重程度加剧,II A-sPLA2/ β -actin 或 LP-PLA2/ β -actin 表达水平不断升高,AMI 组最高,其次是 SAP 组,最后是 UAP 组,3 组相互比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

II A-sPLA2 和 LP-PLA2 是近年来引起广泛关注的一种与动脉粥样硬化性心、脑血管疾病密切相关的磷脂酶 A2 超家族成员之一^[5]。越来越多的研究表明,这种炎症因子与冠心病卒中事件的发生关系密切,测定血浆中含量或活性可作为心、脑血管疾病风险的独立预测因素,对降低高危心、脑血管疾病患者的发病率具有重要意义,并成为治疗心、脑血管疾病新的潜在目标靶点^[6]。大量研究结果表明,II A-sPLA2 和 LP-PLA2 与心血管疾病相关,其水平升高是发生心血管疾病的一项重要危险因素,并且在心血管疾病患者中 II A-sPLA2 和 LP-PLA2 可以独立于其他危险因素而预测临床冠状动脉事件的发生^[7]。

Webb 等^[8]研究发现,II A-sPLA2 可以独立于脂蛋白代谢而促进动脉粥样硬化病变的形成。sPLA2 在 SAP 患者中可以独立于其他危险因素,如 CRP 等预测冠状动脉事件的发生。有学者研究发现 PLA2 活性增高与糖尿病动脉粥样硬化形成有关,合理应用 PLA2 的抑制剂对预防和延缓糖尿病合并动脉粥样硬化的发生和发展具有积极的临床意义。有报道 LP-

PLA2 活性随着冠状动脉病变支数和 Gensini 积分的增加而升高,由此说明血浆 LP-PLA2 活性能反映冠状动脉粥样硬化病变的严重程度^[9]。

本研究结果表明,II A-sPLA2 及 LP-PLA2 的表达量与冠心病的病变程度呈现一致表型。即冠心病最严重的亚型 AMI 组其表达量明显比 SAP 组和 UAP 组偏高。表明 2 项指标各自具有促进冠状动脉粥样硬化的作用。其作用机制尚未完全明确,其活性在体内外、种族之间、性别间等是否存在区别尚少有足够研究成果,本研究也未进行详细分析。本研究数据证明,降低体内 II A-sPLA2 及 LP-PLA2 含量将可能是治疗冠状动脉粥样硬化和预防心血管疾病的新趋势。II A-sPLA2 及 LP-PLA2 的检测建议在临床实验室作为冠心病患者重要监测指标之一。

参考文献

[1] Hendersonnr J,Chi EY,Bollinger JG,et al. Importance of group X-secretedphospholipase A2 in allergen-induced airway in ammation and remodeling ina mouse asthma model[J]. J Exp Med,2007,204(99):865-877.

[2] 李珊珊,贾玫,殷悦. 脂蛋白相关性磷脂酶 A2 的活性与冠心病风险预测的相关性研究[J]. 中国实验诊断学,2012,16(2):272-276.

[3] Bostrom MA,Boyanovsky BB,Jordan CT,et al. Group v secretory phospholipase A2 promotes atherosclerosis:evidence from genetically altered mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2007,27(3):600-606.

[4] Tian G,Wang X,Zhang F,et al. Downregulation of cPLA2 γ expression inhibits EGF-induced chemotaxis of human breast Cancer cells through Akt pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun,2011,409(3):506-512.

[5] Markakis KP,Koropouli MK,Grammenou-Savvoglou S,et al. Implication of lipoprotein associated phospholipase A2 activity in oxLDL uptake by macrophages[J]. J Lipid Res,2010,51(8):2191-2201.

[6] Shridas P,Bailey WM,Gizard F,et al. Group X secretory phospholipase A2 negatively regulates ABCA1 and ABCG1 expression and cholesterol efflux in macrophages[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2010,30(10):2014-2021.

[7] Anuurad E,Ozturk Z,Enkhmaa B,et al. Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 with coronary artery disease in African-Americans and Caucasians[J]. J Clin Endocrinol Metab,2010,95(5):2376-2383.

[8] Webb NR,Bostrom MA,Szilvassy SJ,et al. Macrophage-expressed group IIA secretory phospholipase A2 increases atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2003,23(2):263-268.

[9] 邓文宏,王卫星,张昌威,等. 新型分泌型磷脂酶 A2 抑制剂对急性出血坏死性胰腺炎大鼠模型的量效关系[J]. 武汉大学学报:医学版,2009,30(4):498-501.