外周血蛋白激酶 C 受体蛋白表达对冠状动脉粥样硬化病变程度的影响

古学文(广东省广州市荔湾区芳村中医医院 510360)

【摘要】 目的 探讨外周血蛋白激酶 C 受体蛋白(RACK1)表达对冠状动脉粥样硬化病变程度的影响。方法 选择广州市荔湾区芳村中医医院 2012 年 3 月至 2012 年 10 月收治的 90 例冠状动脉粥样硬化患者为研究对象,对所有患者进行冠状动脉造影,根据美国心脏学会(ACC)指南中冠状动脉造影,按照 Gensini 评分系统将患者分成 A、B、C 组。其中 A 组 31 例患者 Gensini 评分为 1~10 分。B 组 30 例患者 Gensini 评分为 11~20 分。C 组 29 例患者 Gensini 评分大于 20 分。另外选择同期体检的 30 例健康者为健康对照组。4 组均采用实时聚合酶链反应(Real-time PCR)检测外周血 RACK1 mRNA 水平。结果 随着 RACK1 mRNA 的增高,Gensini 积分相应增高,各组间 RACK1 mRNA 水平比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。将 RACK1 mRNA 水平和 Gensini 积分进行等级资料相关性分析,结果显示 RACK1 mRNA 水平与 Gensini 积分呈显著正相关($r = 0.483, P < 0.01$)。结论 RACK1 水平与冠状动脉粥样硬化病变程度有正相关关系,对寻找靶位点进行针对性基因治疗具有积极的参考意义。

【关键词】 冠状动脉粥样硬化; 蛋白激酶 C 受体蛋白; 病变程度

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.20.052 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)20-2913-02

冠状动脉粥样硬化导致的心血管疾病是影响患者生活质量和危及生命安全的重要原因,也是病情进展和恶化的重要原因。关于冠心病(CHD)的发病机制,国内外已经有大量研究从器官、组织、细胞、分子和基因等不同层面加以阐述,并形成了各种学说。蛋白激酶 C 受体蛋白(RACK1)是 WD 重复蛋白家族的重要成员,是一种相对分子质量为 36 000 的支架蛋白,呈 β -螺旋桨结构状,广泛存在于哺乳动物多种组织以及外周血中,可参与调节多条细胞内信号转导通路^[1-2]。蛋白激酶 C (PKC)系统又称为磷脂酰醇信号途径,功能主要在于对基因进行控制和表达,从而实现控制细胞膜,参与机体的免疫调节。血管平滑肌细胞的增生会导致 PKC 活性增强,而 PKC 活性增强在动脉粥样硬化中有着非常重要的作用,两者之间的关系密切。而作为锚定蛋白的 RACK1,在冠状动脉粥样硬化发生过程中是否有着重要的影响,在这方面的研究却非常少。本研究拟对不同病变程度的冠状动脉粥样硬化患者 RACK1 水平进行检测,以探讨冠状动脉粥样硬化患者血液中 RACK1 的表达情况,从而分析其与冠状动脉狭窄程度之间的关系,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2012 年 3 月至 2012 年 10 月收治的 90 例冠状动脉粥样硬化患者为研究对象,对所有患者进行冠状动脉造影,根据美国心脏学会(ACC)指南中冠状动脉造影,按照 Gensini 评分系统将患者分成 A、B、C 组。其中 A 组 31 例患者 Gensini 评分为 1~10 分;男 17 例,女 13 例;平均年龄(57.6 ± 11.2)岁,病程(2.8 ± 0.5)年。B 组 30 例患者 Gensini 评分为 11~20 分;男 15 例,女 14 例;平均年龄(59.6 ± 11.9)岁,病程(3.6 ± 0.7)年。C 组 29 例患者 Gensini 评分大于 20 分;男 17 例,女 14 例;平均年龄(61.2 ± 12.1)岁,病程(4.1 ± 0.8)年。另外选择同期体检的 30 例健康者为健康对照组,其中男 18 例,女 12 例;平均年龄(58.2 ± 11.5)岁。4 组患者在年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),组间具有可比性。

1.2 纳入与排除标准 纳入标准:(1)无急慢性感染性疾病、严重肝肾疾病、肿瘤和结缔组织病等可能影响 RACK1 的因素;(2)所有研究对象均需签署知情同意书。排除标准:(1)患有严重的肝、肾疾病;(2)患有严重的急性或慢性传染性疾病及结缔组织疾病等。

1.3 Gensini 评分系统 根据冠状动脉病变的部位评定系数,冠状动脉狭窄评分 $\times$ 病变部位的系数,则可以得出病变评分^[3-4]。根据患者冠状动脉狭窄程度进行评分,25%为 1 分;50%为 2 分;75%为 4 分;90%为 8 分;99%为 16 分;100%为 32 分,得分越高,病变程度越严重。

1.4 方法 采用实时聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 RACK1 mRNA 水平。引物序列,Trizol 试剂,试剂盒,人淋巴细胞分离液和 Rotor-gene 3000 实时 PCR 仪均为华大基因公司提供。所有患者均采集静脉血 4 mL,枸橼酸钠抗凝剂抗凝,人淋巴细胞分离液分离外周血单核细胞,加入 1 mL Trizol,提取外周血总 RNA,在提取 RNA 后,利用 1%琼脂糖凝胶电泳进行验证和反转录。用 13 μ L 模板 RNA、2 μ L 模板 RNA 在恒温 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h。反转录得到 RACK1 mRNA,之后按照试剂盒说明进行实时 PCR 扩增,目的基因表达阳性的扩增曲线为 S 型,阴性标本为不规则波浪线。目的基因 mRNA 相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,其中 $\Delta Ct =$ 样本 Ct 均值 - 内参 Ct 均值, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct -$ (阴性对照样品 Ct 均值 - 样品内参 Ct 均值)。对 RACK1 mRNA 表达水平检测进行检测,检测试剂主要由美国 invitrogen 公司提供,扩增产物长度约为 138~140 bp。

1.5 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件对相关数据进行统计学处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料采用百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 等级相关 r 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

随着 RACK1 mRNA 的增高,Gensini 积分也相应增高,各组间 RACK1 mRNA 水平比较,差异有统计学意义($P <$

0.01),见表 1。将 RACK1 mRNA 水平和 Gensini 积分进行等级资料相关性分析,结果显示 RACK1 mRNA 水平与 Gensini 积分呈显著正相关($r=0.483, P<0.01$)。Gensini 积分为不连续变量,两者的相关性以 Spearman 等级显示。冠状动脉粥样硬化患者外周血 RACK1 mRNA 表达量与冠脉狭窄程度存在相关性,相关系数 $r_s=0.57(P<0.01)$ 。

表 1 4 组 RACK1 mRNA 水平和 Gensini 积分统计($\bar{x}\pm s$)

组别	n	RACK1 mRNA 水平	Gensini 积分
健康对照组	30	3.6±1.1	0
A 组	31	10.5±2.3 ^a	7.3±2.7
B 组	30	15.6±3.8 ^{ab}	15.1±3.9
C 组	29	18.7±4.7 ^{abc}	26.4±4.3

注:与健康对照组比较,^a $P<0.01$;与 A 组比较,^b $P<0.01$;与 B 组比较,^c $P<0.01$ 。

3 讨 论

目前较为流行的冠状动脉粥样硬化发病机制有平滑肌突变学说、内皮损伤学说、脂质渗入学说、炎症学说和单核-巨噬细胞作用学说等^[5-6]。除了上述的发病机制之外,普遍认为人体的其他因素也可以参与到动脉粥样硬化当中,其中包括人体内的氧化应激反应、内皮细胞功能紊乱、细胞异常增殖和凋亡、细胞基质失调等。本研究主要从 RACK1 分子基因水平研究其与冠状动脉粥样硬化的关系。

PKC 是 G 蛋白偶联受体系统中的效应物,可促进细胞的生长、分裂和代谢,也可与细胞内多种蛋白相互作用^[7]。其在非活性状态下是水溶性的,游离存在于胞质溶胶中;激活后是脂依赖性的,需要膜脂 1,2-甘油二酯(DAG)的存在,同时又是 Ca^{2+} 依赖的,需要胞质溶胶中高 Ca^{2+} 浓度。当细胞受到刺激后,PKC 以 Ca^{2+} 依赖的形式从胞浆中移位到细胞膜上,医学中以此作为 PKC 激活的标志^[8]。此外,PKC 能够与其他激酶催化产生反应,激活 Na^+-K^+ 交换系统,从而提高细胞质的 pH 值。PKC 升高可导致血管平滑肌细胞的增生和分化,炎症水平增高,免疫水平下降,心肌细胞膜功能改变,在动脉粥样硬化形成过程中发挥重要作用。

RACK1 是哺乳动物中 PKC 的重要受体,广泛分布于多种组织器官中。目前,已经发现哺乳动物中有 80 多种蛋白与 RACK1 相互作用,如酪氨酸激酶、PKC、胰岛素样生长因子 I 等^[9]。RACK1 作为一种锚定蛋白可以和细胞中的信号分子结合,参与细胞信号传导,调节着细胞的分裂、凋亡活动。本研究拟探讨与 PKC 关系密切的 RACK1 水平的增高,是否与冠状动脉粥样硬化病变程度有关。但 RACK1 水平难以直接测定,因此间接检测 RACK1 mRNA 水平。由于冠状动脉粥样硬化病变程度与动脉狭窄和病变部位有关,可采用 Gensini 积分来表示冠状动脉粥样硬化的病变程度。

本研究结果显示,冠状动脉粥样硬化患者外周血中的 RACK1 mRNA 水平明显高于健康对照组($P<0.01$),说明 RACK1 在冠状动脉粥样硬化患者外周血中表达上调。此外,冠状动脉粥样硬化患者外周血 RACK1 mRNA 表达水平与冠状动脉狭窄程度有着密切关系($r=0.483, P<0.01$)。说明

RACK1 直接参与到冠状动脉粥样硬化的发生中,但其具体发生机制却尚未明确,有可能上述关键酶活性的不断增高,从而进一步激发机体内的氧化应激反应,导致内皮细胞损伤等不良情况,最终导致了动脉粥样硬化的发生^[10-11]。

综上所述,RACK1 水平与冠状动脉粥样硬化病变程度有重要影响,对寻找靶位点进行针对性基因治疗具有积极的参考意义。此外,RACK1 是否受其他基因调节,是病变导致 RACK1 水平增高,还是不同患者本身遗传的 RACK1 水平有差异,从而导致发病率、病变程度、进度等的不同,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Wang Z, Jiang L, Huang C, et al. Comparative proteomics approach to screening of potential diagnostic and therapeutic targets for oral squamous cell carcinoma[J]. Mol Cell Proteomics, 2008, 68(7):1639-1650.
- [2] 雷玉平,管军,郭亮,等.冠状动脉粥样硬化患者外周血蛋白激酶 C 受体蛋白表达与冠状动脉狭窄的关系[J]. 中国心血管杂志, 2012, 17(4):264-267.
- [3] 刘歌. 冠心病合并室性心律失常 108 例临床分析[J]. 医学信息:中旬刊, 2011, 3(7):3275.
- [4] 朱苏航,金积昌,贾连旺. 动态心电图监测评价可达灵片治疗冠心病无症状心肌缺血的疗效[C]//第十次中国中西医结合学会心血管病学术大会暨第五次江西省中西医结合学会心血管病学术大会论文汇编, 2010:120-121.
- [5] 刘丹,郭晓玲. 冠状动脉粥样硬化性心脏病与炎症及免疫系统关系的研究[J]. 医学综述, 2008, 13(8):1138-1139.
- [6] Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease[J]. Am J Cardiol, 1983, 51(3):606.
- [7] Zakrzewicz A, Hecker M, Marsh LM, et al. Receptor for activated C-kinase 1, a novel interaction partner of type II bone morphogenetic protein receptor, regulates smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension[J]. Circulation, 2007, 115(23):2957-2968.
- [8] 刘军锋,王雪艳,贾克刚,等. 冠状动脉旁路移植术后血栓形成和再狭窄影响因素的研究现状[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2012, 14(6):660-662.
- [9] 贾薇,袁中华. 动脉粥样硬化中的 4 个 PKC 相关酶[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(7):1442-1445.
- [10] 陈文一,王红巧,张丰雪. 冠心病病人血清 IMA 与 sI-CAM-1 变化及意义[J]. 青岛大学医学院学报, 2009, 13(6):517-518.
- [11] 孙健玲,黄卫民,王崇禹,等. 冠状动脉心肌桥与冠状动脉粥样硬化关系的临床研究[J]. 中国医药导报, 2012, 3(29):57-58.