

· 论 著 ·

## 急性心肌梗死患者血浆游离线粒体 DNA 拷贝数定量分析及临床意义

周双艳, 杜建明, 杜怡清, 赵克斌, 杨泽华<sup>△</sup>

(山西医科大学第一医院医学检验科, 太原 030001)

**摘要:**目的 探究急性心肌梗死(AMI)后血浆游离线粒体 DNA 拷贝数变化及其临床意义。方法 采集 50 例健康体检者血浆标本为对照组, 50 例 AMI 患者为 AMI 组, 应用荧光定量 PCR 法测定其循环游离线粒体 DNA 拷贝数。结果 对照组血浆游离线粒体 DNA 拷贝数为  $4 \times 10^4$  ( $2.5 \times 10^4$ ,  $9.5 \times 10^4$ ) copies/mL; AMI 组血浆游离线粒体 DNA 拷贝数为  $2.2 \times 10^5$  ( $4.9 \times 10^5$ ,  $0.8 \times 10^5$ ) copies/mL, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 AMI 患者血浆游离线粒体 DNA 拷贝数升高, 血浆游离线粒体 DNA 拷贝数检测可能成为辅助诊断心肌梗死的生物学标志。

**关键词:**急性心肌梗死; 线粒体 DNA; 荧光定量 PCR

**DOI:**10.3969/j.issn.1672-9455.2017.09.024 **文章编号:**1672-9455(2017)09-1268-03

**Quantitative analysis of copy number circulation cell-free mitochondrial DNA in plasma of the patients with acute myocardial infarction and its clinical significance**

ZHOU Shuangyan, DU Jianming, DU Yiqing, ZHAO Kebin, YANG Zehua<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

**Abstract: Objective** To explore the changes in the levels of plasma circulation cell-free mitochondrial DNA (mtDNA) in patients with acute myocardial infarction (AMI) and the relationship between myocardial injury markers with its clinical significance.

**Methods** A total of 50 cases of healthy volunteers were selected as control group, and 50 cases with AMI were selected as AMI group. Cell-free mtDNA levels in plasma of the subjects were tested by real-time PCR. **Results** The expression of circulation cell-free mtDNA in the control group and AMI group were  $4 \times 10^4$  ( $2.5 \times 10^4$ ,  $9.5 \times 10^4$ ) copies/mL and  $2.2 \times 10^5$  ( $4.9 \times 10^5$ ,  $0.8 \times 10^5$ ) copies/mL, respectively. The difference was statistically significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The circulating cell-free mtDNA levels are increased in patients with AMI, circulation cell-free mtDNA levels may serve as a biomarker in the diagnosis of AMI.

**Key words:** acute myocardial infarction; mitochondrial DNA; fluorescent quantitative PCR

线粒体 DNA(mtDNA)长 16 569 bp, 编码 13 个呼吸链多肽、22 个转运 RNA(tRNA)和 2 个核糖体 RNA(rRNA), 是位于线粒体内裸露的双链环状 DNA 分子。线粒体作为细胞的能量代谢中心, 其内含有 2~10 个拷贝 mtDNA<sup>[1]</sup>, 而不同类型的细胞内线粒体的数量从几百个到几千个不等<sup>[2]</sup>, 由于线粒体功能的实现依赖于 mtDNA 基因复制、转录<sup>[3]</sup>, 因此线粒体内 mtDNA 拷贝数变化必然引起线粒体功能改变, 而细胞内 mtDNA 拷贝数变化亦可导致胞外 mtDNA 拷贝数的变化。急性心肌梗死(AMI)是世界性发病率和病死率较高的疾病之一。相关研究表明心肌缺血后心肌细胞内 mtDNA 拷贝数会降低<sup>[4]</sup>, 健康人外周循环血中含有微量的 mtDNA, 其量的改变与心血管系统疾病密切相关<sup>[5-6]</sup>。近年来大量文献报导, 释放入血的游离 mtDNA 水平与器官衰竭及死亡的发生率相关<sup>[7-9]</sup>, 亦有文献提出血浆游离 mtDNA 可作为诊断心肌梗死的生物学标志物<sup>[10]</sup>。为此笔者在前人研究的基础上, 通过检测 AMI 患者外周血游离 mtDNA 拷贝数, 旨在探讨血浆游离 mtDNA 在 AMI 诊断方面的应用价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2016 年 3—8 月收治于本院的 50 例 AMI 患者标本作为 AMI 组, AMI 诊断符合中华医学会心血管病学分会《急性心肌梗死诊断和指南》标准。选择同期来本院体检的健康志愿者标本 50 例作为对照组。所有入选对象排除近期重大手术、外伤、肿瘤、血液病、急性脑血管意外、严重的肝肾损伤及感染。所有研究对象知情且同意。

**1.2 试剂与仪器** 美国 CFX96 BIO-RAD PCR 仪; 德国 Eppendorf 离心机; 美国 BIO-RAD 电泳仪; 上海天能水平电泳槽; 上海天能凝胶成像仪; DNA Marker, 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自大连 Takara 公司; AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒购自康宁生命科学有限公司; 氨苄青霉素购自上海生工生物工程技术有限公司; mtDNA 提取试剂购自 Omega bio-tek 公司。寡核苷酸引物序列为 5'-ACTTTGCAAG-GAGAGCCAAA-3', 5'-TGGACAACCAGCTATCACCA-3'。

## 1.3 方法

**1.3.1 标本处理及 DNA 提取** 采取所有研究对象肘静脉血 2 mL, EDTA 抗凝。收集到的标本首先通过 3 000 r/min 离心 10 min。取上清液体 200  $\mu$ L, 再通过 18 000 r/min 离心 10 min。取 150  $\mu$ L, -20  $^{\circ}$ C 冻存用。Blood DNA Kit 提取游离 mtDNA。

**1.3.2 目的基因鉴定** 从血浆中提取基因组 DNA, 使用 BIO-RAD PTC-200 扩增并对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 将目的条带切胶纯化。纯化的产物连接 pMD19T 载体, 转化 JM109 感受态细胞。铺含有氨苄青霉素琼脂平板 37  $^{\circ}$ C 过夜培养, 挑选克隆, 用 PCR 法鉴定阳性克隆, 提取质粒进行基因测序。用分光光度法测定提取的质粒吸光度, 计算出质粒拷贝数浓度, 备用。

**1.3.3 标准曲线制备** 已知质粒的拷贝数浓度为  $9.68 \times 10^{10}$  copies/mL, 用灭菌去离子水 10 倍稀释作为标准品, 使用荧光定量 PCR 法制备标准曲线。PCR 反应条件为: 10  $\mu$ L 反应体

系, 95 °C 预变性 10 s, 随后 95 °C 变性 5 s, 58 °C 复性 8 s, 72 °C 延伸 10 s, 共 40 个循环。

**1.3.4 生化指标的测定** 采用全自动生化分析仪 AU5821 测定所有研究对象血清三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C); 采用 ACCESS2 免疫发光仪测定 AMI 患者及对照组肌红蛋白(MYO)、肌钙蛋白(cTnI)水平(其中 TG 采用酶法, HDL-C、LDL-C 采用直接法, cTnI 及 MYO 采用化学发光法)。

**1.4 统计学处理** 使用 SPSS16.0 统计软件分析数据, 计量

资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检验; 计数资料采用百分数表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验; 相关性采用 Spearman 相关分析; 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

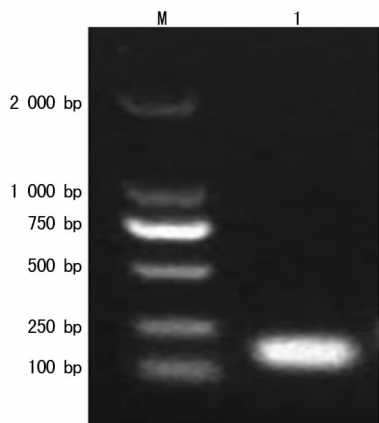
## 2 结果

**2.1 两组研究对象一般资料的比较** AMI 组与对照组研究对象一般资料研究显示, 两组研究对象的年龄、性别比例、吸烟比例上差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。而 AMI 患者体质指数(BMI)、TG、LDL-C、MYO、cTnI 均高于对照组, 而 HDL-C 低于对照组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 两组研究对象的一般临床资料比较

| 组别       | <i>n</i> | 年龄<br>(岁, $\bar{x} \pm s$ ) | 男/女<br>( <i>n</i> / <i>n</i> ) | 吸烟<br>[ <i>n</i> (%)] | BMI(kg/<br>m <sup>2</sup> , $\bar{x} \pm s$ ) | HDL-C<br>(mmol/L, $\bar{x} \pm s$ ) | LDL-C<br>(mmol/L, $\bar{x} \pm s$ ) | TG<br>(mmol/L, $\bar{x} \pm s$ ) | cTnI<br>( $\mu\text{g/L}$ , $\bar{x} \pm s$ ) | MYO<br>( $\mu\text{g/L}$ , $\bar{x} \pm s$ ) |
|----------|----------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---|--|
| AMI 组    | 50       | 52.3 ± 13.9                 | 29/21                          | 26(52.0)              | 26.4 ± 3.7                                    | 1.11 ± 0.40                         | 2.93 ± 0.77                         | 1.96 ± 0.85                      | 2.09(5.81)                                    | 141.15(293.53)                               |
| 对照组      | 50       | 51.8 ± 11.2                 | 25/25                          | 17(34.0)              | 24.1 ± 1.9                                    | 1.45 ± 0.36                         | 2.12 ± 0.65                         | 1.30 ± 0.48                      | 0(0.02)                                       | 25.55(18.82)                                 |
| <i>P</i> |          | >0.05                       | >0.05                          | >0.05                 | <0.05   | <0.05                               | <0.05                               | <0.05                            | <0.05   | <0.05  |

**2.2 目的基因扩增鉴定** 目的基因扩增产物经琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 条带显示目的基因扩增结果介于 100~250 bp 之间。将目的基因与 pMD19T 载体连接阳性克隆扩增产物的基因测序结果显示, 与 Genbank 中获取的人类线粒体基因组序列中目的基因序列一致。



注: M 为标准带, 1 为目的基因扩增片段。

图 1 目的基因 PCR 扩增产物电泳图

**2.3 建立的标准曲线** 以 PCR 法建立标准曲线, 以拷贝数的对数值为  $X$ , 以扩增循环次数( $C_q$  值)为  $Y$ , 其公式为:  $Y = -3.684X + 46.809$  ( $r^2 = 0.998$ )。

**2.4 AMI 组与对照组血浆游离 mtDNA 拷贝比较** 经正态性检验, 数据呈非正态分布, 采用中位数和四分位数间距 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ] 进行统计描述。结果显示, 对照组 mtDNA 拷贝数为  $4 \times 10^4$  ( $2.5 \times 10^4, 9.5 \times 10^4$ ) copies/mL, AMI 组 mtDNA 拷贝数为  $2.2 \times 10^5$  ( $4.9 \times 10^5, 0.8 \times 10^6$ ) copies/mL, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.5 相关性分析** 采用 Spearman 秩相关对 AMI 组患者 mtDNA 拷贝数与 MYO 进行分析, 结果显示, MYO 与 mtDNA 不存在相关性( $r = 0.115, P > 0.05$ ), cTnI 与 mtDNA 拷贝数呈正相关( $r = 0.293, P < 0.05$ )。

## 3 讨论

血浆内的线粒体 DNA 以两种形式存在, 一部分为游离型 mtDNA, 另一部分为结合型 mtDNA<sup>[11]</sup>。近年来研究表明血浆游离 mtDNA 水平变化糖尿病<sup>[12]</sup>、肥胖<sup>[13]</sup>、肿瘤<sup>[14]</sup>、生长发

育<sup>[15]</sup>、体育锻炼<sup>[16]</sup>有关。本次实验通过检测 50 例健康体检者及 50 例诊断为 AMI 患者血浆 mtDNA 拷贝数进行检测, 发现 AMI 患者血浆 mtDNA 拷贝数升高( $P < 0.05$ )。血浆增加的游离 mtDNA 拷贝数可解释为 AMI 后局部心肌细胞缺血缺氧, 心肌细胞内超微结构被破坏。线粒体作为氧化磷酸化反应中心产生大量氧自由基, 而 mtDNA 缺乏核 DNA 的组蛋白保护及 DNA 损伤修复机制, 因此相较于基因组 DNA 更易受到氧自由基损伤。损伤的 mtDNA 通过自噬途径降解, 使细胞内 mtDNA 总数量减少从而影响线粒体功能<sup>[17-19]</sup>, 线粒体功能障碍加速心肌细胞的凋亡、坏死、裂解释放线粒体 DNA, 使血浆内游离 mtDNA 水平升高。因此, 血浆内 mtDNA 拷贝数的升高提示存在细胞凋亡、坏死。

目前用于临床检测反应心肌缺血损伤的主要生物化学标志物包括 MYO、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、cTnI 等。谢亮等<sup>[10]</sup>报道, 血浆游离 mtDNA 水平与 CK-MB、LDH 呈正相关。Bliksoen 等<sup>[20]</sup>证明 AMI 引起 mtDNA 的释放, 而血浆游离 mtDNA 水平与心肌损伤的程度相关, 而这种相关性的评价是以 cTnI 峰值为评估标准。本次试验发现, 血浆游离 mtDNA 拷贝数与 MYO 量无相关性, 与 cTnI 的量呈正相关, 其中游离 mtDNA 与 MYO、cTnI 的关系与 3 者从心肌细胞内释放顺序及代谢降解的速度有关。MYO 在 AMI 后 1~2 d 恢复正常, cTnI 在 AMI 后 4~10 d 恢复正常, Zhang 等<sup>[21]</sup>在大鼠缺血性休克模型中证实循环 mtDNA 水平可持续升高 1 周左右, 表明 mtDNA 类似于 cTnI 在循环内能稳定的存在不易被降解破坏有较长的窗口期。其次, MYO、cTnI 在心肌损伤后血液中水平是动态曲线, 凋亡、坏死的细胞内释放的线粒体 DNA, 只有一部分形成了游离的 mtDNA 并且 mtDNA 存在于人类除红细胞以外的体细胞, AMI 患者不排除存在其他的隐性细胞损伤干扰游离 mtDNA 的检测。

一般生物标志物除了具有高敏感性和特异性外, 还是临床评估病情和预后的灵敏指标。Zhang 等<sup>[22]</sup>报道循环的游离的 mtDNA 能够识别中性粒细胞表面的 Toll 样受体, 引发中性粒细胞钙离子内流和丝裂原活化的蛋白激酶的磷酸化, 进一步使得中性粒细胞发生迁移和脱颗粒化引发全身无菌性炎症反应, 并且这种炎症反应抗菌药物治疗无效。

综上所述, AMI 患者血浆游离 mtDNA 水平增高, 血浆游离 mtDNA 可能成为辅助诊断 AMI 的生物学指标。

## 参考文献

- [1] Wiesner RJ, Ruegg JC, Morano I. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 183(2): 553-559.
- [2] 何静, 夏虹, 张昌明, 等. 线粒体 DNA 拷贝数检测方法的建立及在肾脏疾病诊断中的应用[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2014, 23(4): 342-348.
- [3] Hock MB, Kralli A. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function[J]. *Annu Rev Physiol*, 2009, 71: 177-203.
- [4] 曾春雨. 番茄红素保护线粒体 DNA 减轻心肌缺血/再灌注损伤的作用及机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
- [5] Andreassi MG. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage[J]. *Mutat Res*, 2003, 543(1): 67-86.
- [6] Man Yu, Yan FW, Zou QH. Cell-free circulating mitochondrial DNA in the serum: a potential noninvasive biomarker for Ewing's sarcoma[J]. *Arch Med Res*, 2012, 43(5): 389-394.
- [7] Julian MW, Shao G, Bao S, et al. Mitochondrial transcription factor A serves as a danger signal by augmenting plasmacytoid dendritic cell responses to DNA[J]. *J Immunol*, 2012, 189(1): 433-443.
- [8] Julian MW, Shao GH, Vangundy ZC, et al. Mitochondrial transcription factor A, an endogenous danger signal, promotes TNF alpha release via RAGE- and TLR9-responsive plasmacytoid dendritic cells [J]. *PloS one*, 2013, 8(8): e72354.
- [9] Yakes FM, van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(2): 514-519.
- [10] 谢亮, 刘晶, 王立军, 等. 急性心肌梗死患者血浆线粒体 DNA 水平变化及临床意义[J]. *山东医药*, 2015, 42(55): 7-9.
- [11] Chiu RW, Chan LY, Lam NY, et al. Quantitative analysis of circulation mitochondrial DNA in plasma[J]. *Molecular Diagnostics and Genetics*, 2003, 49(5): 719-726.
- [12] Malik AN, Shahni R, Iqbal MM. Increased peripheral blood mitochondrial DNA in type 2 diabetic patients with nephropathy[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2009, 86(2): e22-e24.
- [13] Kaaman M, Sparks LM, van Harmelen V, et al. Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue[J]. *Diabetologia*, 2007, 50(12): 2526-2533.
- [14] Yu M. Circulating cell-free mitochondrial DNA as a novel cancer biomarker: opportunities and challenges[J]. *Mitochondrial DNA*, 2012, 23(5): 329-332.
- [15] Morten KJ, Ashley N, Wijburg F, et al. Liver mtDNA content increases during development: a comparison of methods and the importance of age- and tissue-specific controls for the diagnosis of mtDNA depletion[J]. *Mitochondrion*, 2007, 7(6): 386-395.
- [16] Lim S, Kim SK, Park KS, et al. Effect of exercise on the mitochondrial DNA content of peripheral blood in healthy women[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2000, 82(5/6): 407-412.
- [17] Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(2): 514-519.
- [18] Shokolenko IN, Venediktova N, Bochkareva A, et al. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(8): 2539-2548.
- [19] Ding ZF, Liu SJ, Wang XW, et al. Oxidant stress in mitochondrial DNA damage, autophagy and inflammation in atherosclerosis[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1077.
- [20] Bliksoen M, Mariero LH, Ohm IK, et al. Increased circulating mitochondrial DNA after myocardial infarction[J]. *Letters to the Editor*, 2012, 158(1): 132-134.
- [21] Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase[J]. *Shock*, 2010, 34(1): 55-59.
- [22] Zhang Q, Raoof M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury[J]. *Nature*, 2010, 464(7285): 104-107.

(收稿日期: 2016-12-21 修回日期: 2017-01-19)

(上接第 1267 页)

- [6] Jain A, Rao N, Sharifi M, et al. Evaluation of the point of care Afinion AS100 analyser in a community setting[J]. *Ann Clin Biochem*, 2017, 54(3): 331-341.
- [7] Medic B, Rovcanin B, Vujovic KS, et al. Evaluation of novel biomarkers of acute kidney injury: The possibilities and limitations[J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(19): 1981-1997.
- [8] Mann JF, Rossing P, Wiecek A, et al. Diagnosis and treatment of early renal disease in patients with type 2 diabetes mellitus: what are the clinical needs? [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2015, 30(Suppl 4): 1-5.
- [9] Spanaus KS, Kollerits B, Ritz E, et al. Serum creatinine, cystatin C, and trace protein in diagnostic staging and predicting progression of primary nondiabetic chronic kidney disease[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(5): 740-749.
- [10] St John A, Tirimacco R, Badrick T, et al. Internet support for point-of-care testing in primary care [J]. *Aust Fam Physician*, 2015, 44(1/2): 10-11.

(收稿日期: 2017-01-07 修回日期: 2017-02-24)