

cyclophilin A 基因多态性及其促炎活性在冠心病中的作用

童文娟¹,唐振旺²,孙少卫³

(1. 南华大学附属第一医院妇产科,湖南 衡阳 421001;2. 南华大学附属第一医院心内科;
3. 南华大学生命科学研究中心)

摘要: **目的** 探讨 cyclophilin A 基因多态性与冠心病的相关性及 cyclophilin A 的促炎活性在冠心病中的作用。**方法** 抽取冠心病患者 200 例,正常体检者 200 例作为对照组。采用硫化修饰引物结合 Pfu 聚合酶荧光定量 PCR 的方法检测各组 cyclophilin A 1 460 位点的等位基因及基因型频率。酶联免疫吸附法测定各组血浆 cyclophilin A、IL-6、TNF- α 和 IL-10 的水平。**结果** cyclophilin A 1 460 位点上有 3 种基因型,即 AT、AA 和 TT 型。冠心病组 AA 基因型频率显著高于对照组,且冠心病组 A 等位基因频率高于对照组。冠心病组血浆 cyclophilin A 水平明显高于正常对照组,炎症因子 IL-6 和 TNF- α 水平也高于对照组,抗炎因子 IL-10 低于对照组。冠心病患者经 PCI 手术后血浆 cyclophilin A 水平及血浆 TNF- α 和 IL-6 水平均逐渐降低,而 IL-10 则逐渐回升。**结论** cyclophilin A 1 460 位点 A 等位基因可能是冠心病发病的危险因素;cyclophilin A 血浆水平可间接反映机体的炎症状态,用于冠心病的病情监测。

关键词: cyclophilin A; 基因多态性; 经皮冠状动脉介入治疗术; 冠心病

中图分类号: R541.4 **文献标识码:** A

Association of Cyclophilin A Polymorphism and Pro-inflammation With Coronary Heart Disease

TONG Wenjuan, TANG Zhenwang, SUN Shaowei

(Department of Gynecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the association between the single nucleotide polymorphisms of cyclophilin A and coronary heart disease (CHD), and to clarify the action mechanism of cyclophilin A in the occurrence of CHD. **Methods** 214 CHD patients and 100 healthy subjects were enrolled. The polymorphism and genotype of cyclophilin A were detected by Pfu DNA polymerase and 3'-phosphorothioate modified allele-specific primers. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect cyclophilin A, IL-6, TNF- α and IL-10 in the serum of CHD patients. **Results** There were three genotypes on 1 460 site of cyclophilin A: AT, AA and TT. The frequency of AA type in CHD was higher than control, and the A allele was significantly different between CHD and control. The concentrations of plasma cyclophilin A, IL-6 and TNF- α were significantly higher in CHD patients than those in controls, but the level of anti-inflammatory cytokine IL-10 was lower than the control group. After PCI treatment, the concentrations of plasma cyclophilin A, IL-6 and TNF- α in CHD patients decreased, and the level of IL-10 increased. **Conclusions** The A allele on site 1 460 of cyclophilin A may confer an independent risk factor of CHD. Levels of cyclophilin A can reflect the body's inflammatory state for monitoring CHD.

Key words: cyclophilin A; single nucleotide polymorphism; percutaneous coronary intervention; coronary heart disease

冠心病(Coronary heart disease,CHD)是当前严重威胁人类生命健康的主要心血管疾病。过去几十年里,对冠心病危险因素和发病机制的研究已经取得了一定的进展,发现了一些有效的冠心病防治手段,但是冠心病依然位列各类死因的首位^[1]。因此需要对那些未知的危险因素进行干预和控制,特别是遗传发病机制还有待于深入研究。

之前的观点认为冠心病是一种血脂沉积疾病,但目前认为冠心病同时也是一种慢性炎症疾病^[2-3]。经皮冠状动脉介入治疗术(Percutaneous coronary intervention,PCI)是目前治疗冠心病的最有效手段之一,但术后较高的再狭窄率及其他心血管事件影响了其疗效。研究表明,术后炎症是这些不良反应的根源。Cyclophilin A 是近年来广受关注的一个促炎因子^[4-5]。心血管方面的研究表明 cyclophilin A 与动脉粥样硬化的发生发展密切相关^[6]。本文观察 cyclophilin A 多态性与冠心病的相关性,及其介导的炎症反应在冠心病发病中的作用机制。

表 1 冠心病组与对照组基本情况比较

组别	n	男性	年龄(岁)	FBG(mmol/L)	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	TC(mmol/L)	LDL(mmol/L)	HDL(mmol/L)	TG(mmol/L)
对照组	200	60	60.14±7.07	4.79±3.3	127.3±17.9	80.3±9.8	4.05±0.89	2.44±0.79	1.23±0.33	1.53±0.81
冠心病组	200	130	60.52±8.12	5.96±2.9 ^a	129.85±20.8	80.11±11.2	4.59±1.14	2.90±0.82 ^a	1.26±0.59	1.99±0.91 ^a

FBG:空腹血糖;SBP:收缩压;DBP:舒张压;TC:总胆固醇;LDL:低密度脂蛋白;HDL:高密度脂蛋白;TG:甘油三酯;与对照组比较,a:P<0.05

1.2 方法

1.2.1 一般情况调查 对所有入选者的调查包括人口统计学和一般情况、心血管疾病的个人史(包括现病史和既往史)及家族史、吸烟与饮酒史。测量血压、血糖和血脂,本研究中高血压定义为收缩压≥140 mm Hg 和/或舒张压≥90 mm Hg 和/或正在服用降血压药物。糖尿病定义为既往诊断过糖尿病和空腹血糖≥7.0 mmol/L。高胆固醇血症定义为总胆固醇水平≥6.22 mmol/L 或正在服用降脂药物。其中 200 例冠心病者中,45 例患者要求 PCI 手术。

1.2.2 脂蛋白水平测定 所有受试者采集空腹静脉血用于血清总胆固醇(Total cholesterol,TC)、低密度脂蛋白(Low density lipoprotein,LDL)、高密度脂蛋白(High density lipoprotein,HDL)和甘油三酯(Triglycerides,TG)测定。血标本经现场处理后冻存于-80℃直至测定。以酶法测定血清 TC 和 TG 水平,以均相法测定 LDL 和 HDL 水平。

1.2.3 DNA 聚合酶(DNA polymerase) 本实验所

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究的样本和资料来自南华大学附属第一医院心血管内科。冠心病患者 200 例,为本院 2008 年 1 月~2010 年 10 月期间住院的冠心病患者,无冠心病对照者 200 例(经病史询问、体检及造影等检查未提示有冠心病),有严重的心、肝、肾疾病、周围血管疾病或周围血管栓塞疾病者均未入选。所有受试者均来自我国南方各地区(湖南、湖北、江西、广西、云南等地区),所有参加者均为中国汉族人,无亲缘关系,并签署知情同意书。两组人群按照年龄、性别进行匹配(表 1)。冠心病组 and 对照组所选病例样本的年龄与性别比例均非常接近,传统冠心病危险因素高血糖在两组间比较差异有显著性(P<0.05),但是血压并未发现明显差异。冠心病组 TG、LDL 较对照组明显升高(P<0.05),而 TC 与 HDL 水平在冠心病组与对照组之间差异无显著性(表 1)。

用 DNA 聚合酶为 Taq 酶和 Pfu 酶,均购于 Sangon 公司,其中 Pfu 酶为含有 3'→5'外切酶活性的高保真 DNA 聚合酶。

1.2.4 模板 DNA 制备 冠心病组(病例组)和对照组均为清晨空腹抽取肘静脉血 5 mL,EDTA-K2 抗凝,采用血细胞 DNA 快速提取法提取基因组 DNA。核酸分析仪测定 DNA 浓度,-80℃保存备用。

1.2.5 引物设计 根据 Genbank 的数据资料,进行引物设计,一个多态性位点设计两条正向引物和一条反向引物,且引物的 3'末端为多态性位点且硫化修饰。引物由 Sangon 公司合成,序列如下:cyclophilin A 基因 1 640 A/T 位点的正向引物为 5'-AAAAATTAGCTGGGCATGGA-3' 和 5'-AAAAATTAGCTGGGCATGGT-3',反向引物为 5'-TTTCACCATGTTGTCCAGGC-3'。

1.2.6 聚合酶链反应(Polymerase chain reaction,PCR) 聚合酶链反应反应体系:10×Buffer 含 KCl 2.5 μL,dNTP 2 μL(10 mmol/L),MgCl₂ 1.5 μL(25 mmol/L),上、下游引物各 0.25 μL(10 pmol/L),

DNA 聚合酶 0.2 μL (5 U/μL), DNA 模板 3 μL (100 ng/μL), 加双蒸水至 25 μL, 将反应体系放入热循环仪中进行。反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min, 然后按 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 重复 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.7 酶联免疫吸附实验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 酶联免疫吸附实验用于测定对照组和冠心病组行 PCI 术前后血中 cyclophilin A、IL-6、IL-10 和 TNF-α 的水平。取已制备好的血清, 按 ELISA 试剂盒说明书操作, 即刻测量标本 A450 值, 根据说明书绘制标准曲线, 并根据标准曲线查找其对应的浓度范围, 每组样品点 3 孔。

1.3 统计学处理

采用 SPSS12 软件, 计量资料两组间比较经正态

性检验为正态性分布者采用 *t* 检验, 计数资料的两组间比较采用 χ^2 检验。显著性水平为双侧 $P < 0.05$ 。

2 结 果

2.1 冠心病组与对照组中基因型与等位基因的频数分布

PCR 扩增结果经直接测序证实存在 AT、AA 和 TT 三种基因型。其中 AT 型在冠心病组和对照组均可检出, 其在两组间的分布差异无显著性。AA 型仅在冠心病组中检出, 而 TT 型仅在对照组中检出, 这两种基因型在两组间的分布差异非常明显 (图 1)。冠心病组 A 等位基因频率高于对照组, 而 T 等位基因频率低于对照组, 差异有显著性 (表 2)。

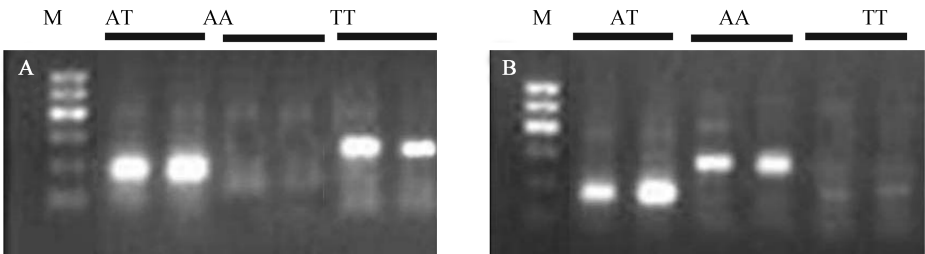


图 1 硫化修饰引物结合 Pfu 聚合酶对 cyclophilin A 基因 1 640 位点扩增产物电泳图 A: 对照组 DNA 模板扩增结果; B: 冠心病组 DNA 模板扩增结果; M: 标准分子量 (marker); AT: AT 基因型; AA: AA 基因型; TT: TT 基因型

表 2 cyclophilin A 基因 1 640 位点多态性基因型频率和等位基因频率在冠心病组与对照组中的分布

组别	<i>n</i>	基因型 AT	基因型 AA	基因型 TT	基因型 AA 所占百分比	等位基因 A	等位基因 T	等位基因 A 所占百分比
冠心病组	200	172	28	0	14% ^a	228	172	57% ^b
对照组	200	180	0	20	0%	180	270	45%

与对照组比较, a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$

2.2 血中 cyclophilin A 水平与炎症因子表达的相关性

ELISA 结果显示, 冠心病组血浆 cyclophilin A 水平明显高于对照组, 炎症因子 IL-6 和 TNF-α 水平也高于对照组, 而抗炎因子 IL-10 低于对照组 (表 3)。200 例冠心病患者中 45 例行 PCI 手术, 术后血中 cyclophilin A 水平逐渐降低, 检测发现 TNF-α 和 IL-6 也随之减少, 而 IL-10 则逐渐回升, 差异均有显著性 (表 4)。

3 讨 论

冠心病的病理学基础是冠状动脉粥样硬化, 是脂质沉积于动脉壁局部并形成粥样斑块的病理生理

过程。目前认为冠心病的发生不仅与脂质紊乱相关, 炎症作为一种重要的发病机制也参与了冠心病的发生和粥样斑块的稳定, 其以致动脉粥样硬化因素刺激的单核细胞浸润和血管平滑肌细胞向内膜迁移为特征, 动脉内膜是最早累及的部位, 当斑块形成并突入管腔时, 由于富含脂质或管壁应力的增大, 斑块可发生破裂形成血栓, 导致冠心病的发生^[7-8]。

cyclophilin A 是近年来广受关注的一种细胞因子, 其最初是作为免疫抑制药物环孢素 A 的细胞内受体被发现的^[9-10], cyclophilin A 广泛分布于原核细胞和真核细胞胞浆^[11]。多种炎症细胞均可分泌 cyclophilin A, 其以囊状形式分泌出来后能促进炎症反

表 3 两组病例血浆中炎症相关因子的表达差异 (n = 200)

组别	cyclophilin A (ng/mL)	IL-6 (ng/mL)	TNF-α (ng/mL)	IL-10 (ng/mL)
对照组	3.18 ± 0.31	17.35 ± 1.74	14.99 ± 2.37	58.49 ± 6.12
冠心病组	6.37 ± 0.46 ^a	31.12 ± 1.48 ^a	36.17 ± 2.36 ^a	33.69 ± 4.77 ^a

与对照组比较,a:P < 0.05

表 4 冠心病患者 PCI 术前及术后不同时期血浆中炎症相关因子的表达改变 (n = 45)

	cyclophilin A (ng/mL)	IL-6 (ng/mL)	TNF-α (ng/mL)	IL-10 (ng/mL)
PCI 术前	6.42 ± 0.37	13.28 ± 1.66	36.5 ± 2.40	65.09 ± 7.30
PCI 术后				
1 小时	6.69 ± 0.41	15.53 ± 2.67	42.3 ± 3.28	64.86 ± 11.27
1 周	4.85 ± 0.26 ^a	11.96 ± 8.17	31.2 ± 2.46 ^a	219.30 ± 10.32 ^a
1 月	4.17 ± 0.31 ^a	8.29 ± 1.78 ^a	23.1 ± 1.87 ^a	63.96 ± 8.35

与 PCI 术前比较,a:P < 0.05

应、诱导平滑肌增殖和内皮细胞的程序化死亡。以往认为 cyclophilin A 只存在于细胞内,后来的研究表明炎症刺激可导致 cyclophilin A 释放^[12-13],释放的 cyclophilin A 本身也具促炎活性^[14]。

有关 cyclophilin A 基因多态性与冠心病的研究报道较少,本研究通过对冠心病患者 cyclophilin A 基因型测定,探讨 cyclophilin A 基因的几种常见基因型与冠心病的关系。结果显示,与 1 640 位常见基因型 AT 相比,少见基因型 AA 纯合子携带者的冠心病危险性增高,而基因型 TT 纯合子可能是冠心病的保护性因素,说明 cyclophilin A 基因 1 640 位点等位基因与冠心病显著相关。对于冠心病这种多基因相关性疾病,其同时还受环境因素影响,很难单用 cyclophilin A 基因的多态性作为其易感因素。本研究说明了 cyclophilin A 基因多态性与冠心病之间存在着相关性,这对于冠心病遗传机制的探讨具有一定参考价值,然而要明确指出两者之间的关系,还需要更多的临床、分子研究,才能更好的阐明冠心病的发病机制。

鉴于以上的研究结果,进一步研究 cyclophilin A 的促炎作用及其对冠心病的影响。cyclophilin A 作为炎症和免疫调节的关键细胞因子参与了冠状动脉粥样硬化的早期血管炎症反应及内皮细胞损伤^[15],说明 cyclophilin A 有可能作为评价动脉粥样硬化炎症和斑块活动的有效指标,用于预测 PCI 术后并发症和远期再狭窄。尽管没有直接证据表明 cyclophilin A 参与单核细胞募集和诱导血管平滑肌细胞迁移,但是研究提示冠心病患者血中 cyclophilin A 的表达与分泌可能有助于炎症因子的表达,加速冠状

动脉粥样硬化进展。本文检测到冠心病患者血中 cyclophilin A 水平明显高于正常对照组,同时血中炎症因子 TNF-α 和 IL-6 也高于正常组,而抗炎因子 IL-10 则低于正常组。冠心病患者行 PCI 手术后检测发现患者血中 cyclophilin A 水平逐渐下降,TNF-α 和 IL-6 也随之减少,IL-10 则逐渐回升。由此可见,血浆 cyclophilin A 水平不仅可以作为系统炎症反应的结果,而且可反映动脉粥样硬化炎症反应的动态过程及一系列炎性细胞、细胞因子之间的相互关系。因此 cyclophilin A 有可能用作 PCI 术后并发症的独立预测指标。

冠心病是一种多基因和多环境因素的疾病,具体哪些因素在其中发挥着重要作用仍未完全清楚。研究中观察了 cyclophilin A 的基因多态性与冠心病的相关性,及 cyclophilin A 水平与血浆中炎症因子浓度的关系,为阐明冠心病的遗传发病机制提供了参考,提出 cyclophilin A 可能作为促炎因子参与了冠心病的发生发展,因而其能较好的反映机体炎症状态。

参考文献:

[1] Rosamond W,Flegal K,Friday G,et al. Heart Disease and Stroke Statistics——2007 Update: A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee [J]. Circulation, 2007, 115 (5) : e69-171.

[2] Mohammad M,James TW. Inflammatory markers in coronary heart disease[J]. Br Med Bull, 2011, 100(1) : 23-28.

[3] Tahara N, Kai H, Nakaura H, et al. The prevalence of inflammation in carotid atherosclerosis: analysis with fluoro-

- deoxyglucose positron emission tomography[J]. Eur Heart J, 2007, 28(18): 2243-2248.
- [4] Wang L, Wang C, Jia J, et al. Contribution of cyclophilin A to the regulation of inflammatory processes in rheumatoid arthritis[J]. J Clin Immunol, 2010, 30(1): 24-33.
- [5] Seizer P, Klingel K, Sauter M, et al. Cyclophilin A affects inflammation, virus elimination and myocardial fibrosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 53(1): 6-14.
- [6] Nigro P, Satoh K, Mohan A, et al. Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. J Exp Med, 2011, 208(1): 53-66.
- [7] Van LJ, Grol R, Campbell S, et al. Cardiovascular risk management in patients with coronary heart disease in primary care: variation across countries and practices. an observational study based on quality indicators[J]. BMC Fam Pract, 2012, 13(1): 96-103.
- [8] 马小峰, 李招兵, 刘扬, 等. 冠心病患者血清 NGAL 和 MMP-9 的表达及临床意义[J]. 中南医学科学杂志, 2011, 39(2): 210-212.
- [9] Saini M, Potash MJ. Novel Activities of Cyclophilin A and Cyclosporin A during HIV-1 Infection of Primary Lymphocytes and Macrophages[J]. J Immunol, 2006, 177(1): 443-449.
- [10] Peng H, Vijayakumar S, Schiene C, et al. Secreted Cyclophilin A, a Peptidylprolyl cis-trans Isomerase, Mediates Matrix Assembly of Hensin, a Protein Implicated in Epithelial Differentiation[J]. J Biol Chem, 2009, 284(10): 6465-6475.
- [11] 曹春芽, 黄红林. 亲环素 A 在心血管系统中的作用[J]. 中南医学科学杂志, 2006, 34(5): 650-653.
- [12] Satoh K, Nigro P, Matoba T, et al. Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms[J]. Nat Med, 2009, 15(6): 649-656.
- [13] Satoh K, Shimokawa H, Berk B. Cyclophilin A: promising new target in cardiovascular therapy[J]. Circ J, 2010, 74(11): 2249-2256.
- [14] Kim H, Kim W, Jeon S, et al. Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages[J]. Clin Immunol, 2005, 116(3): 217-224.
- [15] Jin ZG, Lungu AO, Xie L, et al. Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(7): 1186-1191.

(此文编辑: 蒋湘莲)

医学小常识

为什么高血压悄悄袭击年轻人

无明显症状的高血压在医学上称为无症状性高血压或适应性高血压。此疾病常常悄悄袭击年轻人,一旦到医院确诊时,常已发展为高血压心脏病、心力衰竭、高血压性肾病、肾功能不全等。

为什么高血压悄悄袭击年轻人呢? 其主要特点,一是患者平时身体强壮,很少去医院看病,不知道自己患有高血压;二是此类患者多为年轻人,尤其是年轻白领,平时工作忙,压力大,熬夜多,生活不规律,偶有不适也总与劳累联系起来;三是这种高血压通常呈阶梯式缓慢上升,由轻度到中度再到重度逐渐升高。由于患者对这种缓慢升高的血压已经适应,即使血压已很高,也无任何症状和不适,仍日复一日在激烈竞争中拼搏,不知道自己身上已隐藏着危及生命的定时炸弹。随着年龄的增加,心脑血管逐渐发生硬化,脆性增加,弹性减弱,在进行高强度的活动或情绪激动时,血压会迅速上升导致严重的心脑血管意外甚至猝死。因此无症状高血压是一种很凶险的疾病。

(来源:健康报 解放军总医院第一附属医院 徐国辰)