文章编号:1000-5404(2011)18-1939-04

论著

急性脑梗死患者颈动脉粥样斑块稳定性与单核细胞趋化因子4、膜联蛋白A1水平的关系

冯 骏[1],肖新莉[2],刘 哲[3],秦 皓[1],刘丽华[1],张 敏[1],张 波[1],刘亚民[1] (710061 西安,西安交通大学医学院:第一附属医院神经内科脑血管病区[1],人体解剖与组织胚胎学系[2];710032 西安,西安电力中心医院外科[3])

[摘要] **目的** 探讨急性脑梗死患者颈动脉粥样斑块稳定性与单核细胞趋化因子4、膜联蛋白A1水平的关系。**方法** 选择西安交通大学医学院神经内科2008年1月至2010年12月住院的124例急性脑梗死患者,男性73例,女性51例,年龄41~88(60.8±12.9)岁,健康对照组35例,其中男性21例,女性14例,年龄42~79(59.3±12.1)岁。采用彩色多普勒超声仪测量颈动脉内中膜厚度及斑块类型,颅脑CT检查计数颅内分布区的梗死病灶。脑梗死患者分为颈动脉正常组($n=26$)、稳定型斑块组($n=38$)、不稳定型斑块组($n=60$)。用酶联免疫法测定单核细胞趋化因子4,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测膜联蛋白A1基因的mRNA表达水平,免疫组化法测膜联蛋白A1的表达,Western blot检测膜联蛋白A1蛋白质表达水平。对检查结果进行比较。**结果** ①颈动脉正常组、稳定型斑块组、不稳定型斑块组的颈内动脉分布区病灶数、颈动脉内中膜厚度差异显著($F=21.36$、24.5,$P<0.05$);②健康对照组、颈动脉正常组、稳定型斑块组和不稳定型斑块组单核细胞趋化因子4的含量比较差异显著($F=19.8$,$P<0.05$);不稳定型斑块组颈动脉粥样斑块组织膜联蛋白A1的mRNA、蛋白表达水平、蛋白表达率明显少于稳定型斑块组($t=2.19$、2.876,$\chi^2=9.23$,$P<0.05$)。**结论** 单核细胞趋化因子4、膜联蛋白A1水平与颈动脉粥样斑块不稳定性密切相关,并参与了急性脑梗死的发生。

[关键词] 颈动脉粥样斑块;单核细胞趋化因子4;膜联蛋白A1;急性脑梗死
[中图法分类号] R743.33;R392.11;R392.3 [文献标志码] A

Correlation between stability of carotid atherosclerosis and level of monocyte chemotactic factor 4 and protein annexin A1 in patients with acute cerebral infarction

Feng Jun[1], Xiao Xinli[2], Liu Zhe[3], Qin Hao[1], Liu Lihua[1], Zhang Min[1], Zhang Bo[1], Liu Yamin[1] ([1]Department of Neurology, First Affiliated Hospital; [2]Falculty of Human Anatomy and Embryology, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province; [3]Department of Surgery, Xi'an Electric Power Central Hospital, Xi'an, 710032, Shaanxi Province, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the correlation between the stability of carotid atherosclerosis and levels of monocyte chemotactic factor 4 and protein annexin A1 in patients with acute cerebral infarction. **Methods** One hundred and twenty-four patients with acute cerebral infarction (73 males and 51 females) at the age of 41 – 88 years (60.8 ± 12.9 years) admitted to Department of Neurobiology, First Affiliated Hospital, Medical College of Xi'an Jiaotong University, from January 2008 to December 2010, were enrolled in this study as an experiment group, and 35 healthy individuals (21 males and 14 females) at the age of 42 – 79 years (59.3 ± 12.1 years) served as a control group. Thickness of carotid intima-media was measured and types of plaque were detected with color Doppler ultrasound. The number of infarctions in brain was calculated by brain CT. Patients with cerebral infarction were further divided into normal carotid group ($n=26$), stable plaque group ($n=38$), and unstable plaque group ($n=60$). Monocyte chemotactic factor 4 level was measured by enzyme-linked immunosorbent assay, and expression levels of A1mRNA, protein, and AI protein were measure by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR), immunohistochemistry, and Western blotting, respectively and compared. **Results** The number of brain infarctions, the thickness of intima-media, and the level of monocyte chemotactic factor 4 were significantly higher in stable and unstable plaque groups than in normal

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2006K13-G7)
[通信作者] 刘亚民,E-mail:chongyahuang@126.com

group($F=21.36$ and 24.5, $F=19.8$, $P<0.05$). The expression levels of annexin A1 mRNA and protein were significantly higher in unstable plaque group than in stable plaque group($t=2.19$ and 2.876, $\chi^2=9.23$, $P<0.05$). **Conclusion** Monocyte chemotactic factor 4 and annexin A1 protein levels are closely related with the instability of carotid plaques and involved in the occurrence of acute cerebral infarction.

[**Key words**] carotid artery plaque; monocyte chemotactic factor 4; annexin A1 protein; acute cerebral infarction

Supported by the Tackling Project of Funds for Science and Technology Project of Shaanxi Province (2006K13-G7). Corresponding author: Liu Yamin, E-mail: chongyahuang@126.com

颈动脉粥样斑块的不稳定性是引发急性脑梗死的重要因素[1]。炎症因子的趋化性与动脉粥样硬化的形成密切相关[2-3]。单核细胞趋化因子4具有高效的趋化性,可以诱导单核细胞、嗜酸性细胞、T细胞而参与各种炎症疾病[4],膜联蛋白A1属于钙离子依赖的磷脂结合蛋白质,参与不同的细胞角色,包括控制炎症反应、膜融合性、细胞分化和增生[5],但是国内对单核细胞趋化因子4、膜联蛋白A1间接通过吞噬凋亡小体影响动脉粥样硬化的形成与颈动脉粥样斑块不稳定的相关性研究较少。本文通过测定急性脑梗死患者血浆单核细胞趋化因子4、膜联蛋白A1水平与颈动脉粥样硬化斑块特征,探讨其与急性脑梗死的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

选择本院神经内科2008年1月至2010年12月的住院患者124例,男性73例,女性51例,年龄41~88(60.8±12.9)岁。其中采用颈动脉内膜剥脱术治疗的住院病人共24例,男性13例,女性11例,年龄55~78(61.5±11.4)岁。入选标准:①符合1995年中华医学会第四届全国脑血管病学术会议修订的《各类脑血管疾病诊断要点》中脑梗死的诊断标准[6];②经头颅CT检查确诊为脑梗死;③发病后24 h内入院。排除标准:近2周曾患严重感染及心肝肾等重要脏器严重疾病者。患者自愿签署知情同意书。根据超声检查结果对脑梗死患者进行分组[7]:颈动脉正常组($n=26$),男性15例,女性11例,年龄42~78(59.3±10.5)岁;稳定型斑块组($n=38$),男性21例,女性17例,年龄41~79(61.6±13.7)岁;不稳定型斑块组($n=60$),男性37例,女性23例,年龄41~88(60.4±12.6)岁。健康对照组来自社区健康自愿者35例,男性21例,女性14例,年龄42~79(59.3±12.1)岁。4组年龄、性别、吸烟史和家族史差异不显著($F=9.18$, $\chi^2=4.16$、5.34、4.97, $P>0.05$),具有可比性。颈动脉正常组、稳定型斑块组与不稳定型斑块组的糖尿病史、高血压史差异不显著($\chi^2=3.18$、2.67, $P>0.05$)。健康对照组与其他3组在糖尿病史、高血压史差异显著($\chi^2=9.72$、11.8, $P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 颈动脉超声检查 入组病人均采用PHILIPS HDI-5000彩色多普勒超声诊断仪检查双侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。检查内容包括管径、内膜-中层厚度、多普勒血流动力学,探头为5~12 MHz高分辨率宽频线阵探头。

1.2.2 颅脑CT检查计数颅内分布区的梗死病灶 颅脑CT平扫结果以入组时检查为准,计数双侧颈内动脉在颅内分布区的梗死病灶。

1.2.3 单核细胞趋化因子4测定 入组第2天凌晨抽取空腹外周静脉血,分离血清后-20 ℃保存。采用酶联免疫法测定血清单核细胞趋化因子4(洋森公司)。

1.2.4 采用RT-PCR法测定膜联蛋白A1 mRNA在颈动脉粥样斑块中的表达 采用Trizol法分别提取所有标本的总RNA,-80 ℃保存。参照RT-PCR试剂盒对膜联蛋白A1逆转录和PCR扩增。反应在Perkin-Elmer 9600型扩增仪上进行。膜联蛋白A1 mRNA RT-PCR扩增正反向引物序列分别为5′-GCAAGAAGGTAGAGATAAAG-3′和5′-ATCTCTCTTCAGTTC-CTCTC-3′,扩增长度323 bp。膜联蛋白A1 cDNA经过30个循环反应。对PCR扩增产物采用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,并用自动凝胶成像系统拍照,对形成的图像进行分析。

1.2.5 免疫组化方法测定膜联蛋白A1在颈动脉粥样斑块中的表达 对手术切除标本采用5 mm石蜡包埋保存,实验时通过二甲苯、乙醇和蒸馏水三级处理。切片采用抗膜联蛋白A1 SABC试剂盒,一抗的稀释度为1∶200。二抗采用过氧化物酶标记,以二氨基联苯胺显色。每个标本均计算5个高倍视野的细胞,取其平均数作为计算的标准,对阳性细胞百分比>50%为表达强阳性(++);阳性细胞百分比15%~50%为表达阳性(+);阳性细胞百分比<15为表达阴性(-)。

1.2.6 Western blot测定膜联蛋白A1的表达 按照常规蛋白提取方法提取总蛋白,经10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,并通过硝酸纤维素膜转膜,用5%脱脂奶粉封闭2 h,加入1∶1 000稀释的一抗冷藏于4 ℃条件下过夜。封闭液漂洗后加入二抗(辣根过氧化物酶偶联羊抗兔抗体,1∶1 000稀释,1 h,室温),二抗采用DAB显影,用凝胶图像处理系统量化分析目标带的密度值。实验中检测β-珠蛋白表达水平作为内对照,以目的基因的条带密度与β-珠蛋白的密度比值表示蛋白的表达水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS 15.0统计软件包进行数据管理,对计量资料组间比较采用方差分析,对计数资料采用χ^2检验。

2 结果

2.1 颈动脉粥样斑块稳定性各因素比较

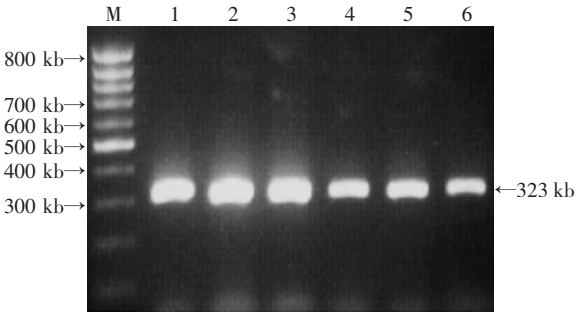
健康对照组、颈动脉正常组、稳定型斑块组、不稳定型斑块组的颈内动脉分布区病灶数、颈动脉内中膜厚度、单核细胞趋化因子4的含量差异显著($F=21.36$、24.5、19.8, $P<0.05$);其中不稳定型斑块组单核细胞趋化因子4的含量远远高于颈动脉正常组、稳定型斑块组、健康对照组。见表1。

表1 4组颈内动脉分布区病灶数、颈动脉内中膜厚度、单核细胞趋化因子4的含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	颈内动脉分布区病灶数(个)	颈动脉内中膜厚度(mm)	单核细胞趋化因子4(pg/ml)
颈动脉正常组	26	2.21±1.33	0.78±0.21	35.40±6.56
稳定型斑块组	38	2.28±1.47	0.94±0.28	47.50±9.87
不稳定型斑块组	60	3.82±2.15	1.21±0.31	68.90±12.38
健康对照组	35	0	0.77±0.18	25.30±4.62
F		21.36	24.5	19.8
P		<0.05	<0.05	<0.05

2.2 稳定型斑块组、不稳定型斑块组膜联蛋白A1表达的半定量分析

膜联蛋白A1的电泳图可见在323 kb处有白色显影条带,反应体系良好(图1)。不稳定型斑块组(0.421±0.201)颈动脉粥样斑块组织膜联蛋白A1的mRNA表达明显少于稳定型斑块组(0.652±0.234, $t=2.19$, $P<0.05$)。



M:DNA标准;1-3:稳定型斑块组;4-6:不稳定型斑块组

图1 RT-PCR法测膜联蛋白A1 mRNA在颈动脉粥样斑块中的表达

2.3 膜联蛋白A1蛋白水平的表达

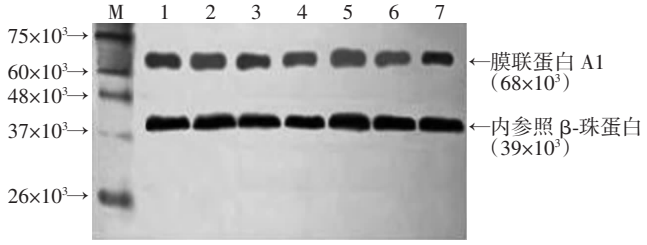
膜联蛋白A1表达产物位于细胞质,呈棕褐色染色颗粒。不稳定型斑块组颈动脉粥样斑块膜联蛋白A1的蛋白表达率明显低于稳定型斑块组($P<0.05$,表2)。

表2 2组颈动脉粥样斑块组织中膜联蛋白A1表达水平的比较[n(%)]

组别	n	膜联蛋白A1的表达水平			χ^2	P
		−	+	++		
稳定型斑块组	38	9(23.7)	14(36.8)	15(39.5)	9.23	<0.05
不稳定型斑块组	60	38(63.3)	16(26.7)	6(10.0)		

2.4 Western blot检测

有两条分别为68×10^3和39×10^3的电泳条带,分别为膜联蛋白A1和内参照β-珠蛋白条带。其中密度较高的条带为稳定型斑块组颈动脉粥样斑块组织,密度较低不稳定型斑块组(图2)。对电泳结果进行半定量分析显示:不稳定型斑块组(0.536±0.134)颈动脉粥样斑块膜联蛋白A1的表达水平明显低于稳定型斑块组(0.791±0.206, $t=2.876$, $P<0.05$)。



M:标准;1、3、5、7:不稳定型斑块组;2、4、6:稳定型斑块组

图2 Western blot检测颈动脉粥样斑块膜联蛋白A1的表达水平

3 讨论

近年研究表明,急性脑梗死与颈动脉粥样斑块破裂、继发性血栓栓塞密切相关。颈动脉粥样硬化已经被证明属于血管炎症性病变。炎症细胞黏附于受损内皮表面在动脉粥样硬化形成中有着重要意义[8]。研究表明,大量巨噬细胞和T细胞浸润是不稳定斑块很重要的特征[9],外周血中炎性因子与炎症细胞的活性关系密切,参与斑块不稳定性。本研究通过超声检查颈动脉内中膜厚度,发现不稳定型斑块组颈动脉内中膜明显增厚,验证了炎症细胞浸润促使颈动脉增生的可能性。本研究同时发现斑块不稳定超声分型法与急性脑梗死的临床表现有着一致性,验证了急性脑梗死与颈动脉粥样斑块破裂密切相关。

血管炎症性病变的网络包括血小板、细胞因子、微生物抗原和神经内分泌激素。血浆中的单核细胞趋化因子4可以激活β-肾上腺素受体和血小板活性,促进血小板颗粒的分泌,吸引众多的炎症和血管活性物质,促进细胞趋化因子的释放。激活的血小板可以上调血小板介导的趋化因子受体2的生物活性,血小板源性的分泌因子已经被证实与动脉粥样硬化有关,单核细胞趋化因子4浓度升高可以促进分泌因子的释放,激活白细胞病变,刺激趋化因子的活性,从而形成恶性循环[10]。显著增高单核细胞趋化因子4的浓度可以增加巨噬细胞/单核细胞系统白细胞介素1β的活性,引起T细胞活化,促进B细胞增殖和分泌,引起颈动脉的炎症反应和血液动力学变化[11]。本研究发现健康对照组、颈动脉正常组、稳定型斑块组和不稳定型斑块组单核细胞趋化因子4的含量比较有显著性差异,不稳定型斑块组单核细胞趋化因子4的含量远远高于其他3组,证明单核细胞趋化因子4参与了颈动脉粥样

斑块不稳定性的发生发展过程。本研究结果还显示单核细胞趋化因子4与颈动脉内中膜厚度、颈内动脉分布区病灶数成正相关,证明单核细胞趋化因子4参与了颈动脉的炎症形成和急性脑梗死的发生。

ANXA1基因位于人染色体9q12-q21.2,编码膜联蛋白A1。膜联蛋白A1属于糖皮质激素诱导蛋白,可以通过抑制磷脂酶A2,阻止花生四烯酸类物质炎性前体的形成[12]。作为内源性防御,膜联蛋白A1的表达通过刺激与颈动脉粥样斑块形成相关的炎症反应起到积极的作用。在许多试验中,它被证实能模仿肾上腺皮质激素的抗炎作用[13]。膜联蛋白A1是一种强大的吞噬蛋白质,能够抑制炎症反应,通过对凋亡后细胞的安全清除起作用。同时能够通过影响中性粒细胞和单核细胞对血管内皮细胞的黏附左右白细胞迁移,从而减少炎性细胞引起的细胞凋亡[14]。

膜联蛋白A1和它所诱导的蛋白质发挥了强有力的抗炎作用。在颈动脉粥样硬化粥样斑块中,膜联蛋白A1发挥的作用引起了研究人员的注意。Cheuk等[15]对34个颈动脉粥样硬化的患者研究发现,增强膜联蛋白A1的表达可以通过抗炎机制增强颈动脉粥样斑块的稳定性。曹云山等[16]通过在体外分离培养人外周血单核细胞,认为LDL-C可以通过降低人单核细胞膜联蛋白A1表达而影响单核细胞与内皮细胞黏附,进而启动动脉粥样硬化的发生发展。本研究对膜联蛋白A1的基因表达、蛋白表达进行了分析,结果表明颈动脉粥样斑块不稳定的研究组膜联蛋白A1 mRNA水平、蛋白水平明显低于稳定型斑块组,说明膜联蛋白A1基因组的改变及其编码蛋白质的失活与颈动脉粥样斑块的稳定性密切相关,与国外的研究结果一致[15]。

总之,单核细胞趋化因子4作为中介因子可以显著加重颈动脉斑块狭窄病人的动脉粥样硬化,参与粥样斑块的形成和不稳定性。检测单核细胞趋化因子4的浓度对于预测颈动脉粥样硬化的发生发展具有重要意义。阻断趋化因子有可能成为治疗动脉粥样硬化的有效方法,其中单核细胞趋化因子4的阻断也可能成为一个有效指标。

参考文献:

[1] 丁士芳, 张梅, 陈文强, 等. 炎性指标和颈动脉粥样斑块稳定性与急性脑梗死的关系[J]. 中华神经科杂志, 2006, 39(9): 580-582.

[2] 何正初, 梅徽. 急性脑梗死患者血清超敏C反应蛋白检测的临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(20): 2035.

[3] Aukrust P, Halvorsen B, Yndestad A, *et al*. Chemokines and cardiovascular risk[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(11): 1909-1919.

[4] Breland U M, Michelsen A E, Skjelland M, *et al*. Raised MCP-4 levels in symptomatic carotid atherosclerosis: an inflammatory link between platelet and monocyte activation[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(2): 265-273.

[5] Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(11): 1897-1908.

[6] 王雪松, 臧大维, 王文红, 等. 谷氨酰胺对昏迷卒中患者热休克蛋白70的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22(6): 381.

[7] Underhill H R, Hatsukami T S, Cai J, *et al*. A noninvasive imaging approach to assess plaque severity: the carotid atherosclerosis score[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2010, 31(6): 1068-1075.

[8] Galkina E, Harry B L, Ludwig A, *et al*. CXCR6 promotes atherosclerosis by supporting T-cell homing, interferon-gamma production, and macrophage accumulation in the aortic wall[J]. Circulation, 2007, 116(16): 1801-1811.

[9] Erbel C, Sato K, Meyer F B, *et al*. Functional profile of activated dendritic cells in unstable atherosclerotic plaque[J]. Basic Res Cardiol, 2007, 102(2): 123-132.

[10] Iwamoto T, Okamoto H, Iikuni N, *et al*. Monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 is highly expressed in cartilage from patients with rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2006, 45(4): 421-424.

[11] Martin D, Zaman A, Hacker J, *et al*. Analysis of haemodynamic factors involved in carotid atherosclerosis using computational fluid dynamics[J]. Br J Radiol, 2009, 82(Spec No 1): S33-S38.

[12] Shen D, Nooraie F, Elshimali Y, *et al*. Decreased expression of annexin A1 is correlated with breast cancer development and progression as determined by a tissue microarray analysis[J]. Hum Pathol, 2006, 37(12): 1583-1591.

[13] Luthra R, Singh R R, Luthra M G, *et al*. MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers[J]. Oncogene, 2008, 27(52): 6667-6678.

[14] Sakaguchi M, Murata H, Sonegawa H, *et al*. Truncation of annexin A1 is a regulatory lever for linking epidermal growth factor signaling with cytosolic phospholipase A2 in normal and malignant squamous epithelial cells[J]. J Biol Chem, 2007, 282(49): 35679-35686.

[15] Cheuk B L, Cheng S W. Annexin A1 expression in atherosclerotic carotid plaques and its relationship with plaque characteristics[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2011, 41(3): 364-371.

[16] 曹云山, 谢萍, 张敏, 等. 低密度脂蛋白胆固醇对人单核细胞膜联蛋白A1表达水平的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2009, 11(11): 876-878.

(**收稿**:2011-03-08;**修回**:2011-06-23)

(编辑 栾 嘉)