

· 临床研究 ·

充血性心力衰竭患者外周血中内皮素受体基因的表达及意义

龚少愚,周春刚,高 枫,陆 曙,朱红俊

(南京中医药大学无锡附属医院/无锡市中医医院心内科,江苏无锡 214001)

摘要:目的 研究内皮素受体基因(ETA、ETB)在充血性心力衰竭(简称心衰)患者外周血中的表达,探讨其临床意义,并建立外周血 ETA、ETB 基因的逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测方法。方法 在 48 例心衰患者和 25 例健康对照组中分别采用放射法测定血浆内皮素(ET-1)水平,应用 RT-PCR 技术检测外周血中 ET 受体基因表达水平。结果 48 例心衰患者中,心功能 II 级组(13 例)的血浆 ET-1 水平及 ETA、ETB 基因表达与健康对照组比较,两组差异无统计学意义($P>0.05$)。心功能 III 级+IV 级组(35 例)的血浆 ET-1 水平与健康对照组比较,两组差异具有统计学意义($F=8.014, P<0.01$)。心功能 III 级+IV 级组的 ETA、ETB 基因表达与健康对照组比较,两组差异具有统计学意义($F=8.317, P<0.01; F=6.235, P<0.05$)。结论 心衰(心功能 III 级+IV 级)患者 ETA、ETB 的基因表达水平明显高于健康对照组,提示内皮素受体基因可能与心衰的发生、发展密切相关。

关键词:心力衰竭;受体,内皮素 A;基因表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.28.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)28-2825-02

Expression and significance of endothelin receptor of peripheral blood in patients with congestive heart failure

Gong Shaoyu, Zhou Chungang, Gao Feng, Lu Shu, Zhu Hongjun

(Department of Cariology, Wuxi Affiliated Hospital with Nanjing Chinese Traditional Medical Hospital, Wuxi, Jiangsu 214001, China)

Abstract: Objective To study the expression and significance of endothelin receptor gene in patients with congestive heart failure (CHF), and to develop the method to measure gene endothelin receptor A(ETA) and endothelin receptor B(ETB) by retrovirus polymerase chain reaction(RT-PCR) in peripheral blood. Methods 48 CHF patients were enrolled, and 25 healthy volunteers were selected as the control group. Plasma endothelin (ET-1) was assessed by radioimmunoassay, and the expression of gene endothelin receptor was measured by RT-PCR. Results There was no statistically significant difference in ET-1, ETA and ETB expression between NYHA class II (13 case) and the control group. Alternatively, compared with the control group, the indices of ET-1, ETA and ETB in NYHA class III and NYHA class IV patients(35 case) were significantly increased. Conclusion There is closely relationship between endothelin receptor gene and the occurrence and development of congestive heart failure.

Key words: heart failure; receptor, endothelin A; gene expression

近年来的研究表明,内皮素(ET-1)是迄今发现的最强烈的收缩血管物质,内皮素系统在心力衰竭(简称心衰)的发病过程中起着重要作用^[1]。升高的血浆 ET-1 浓度不但和心衰时的症状和血流动力学的严重程度呈正相关^[2],而且影响患者的预后,能引起心肌肥厚和心肌细胞损伤^[3]。ET 和 ET 受体的生物学意义及表达调控机制日益引起人们的重视。本院利用已构建的外周血 ETA、ETB 基因的逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测方法,对 48 例心衰患者和 25 例健康对照组的外周血中内皮素受体基因(ETA、ETB)的表达进行了检测,从而探讨其临床意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 心衰患者 48 例,均为本院心内科 2009 年 2 月至 2010 年 2 月的住院患者,男 25 例,女 23 例,年龄 49~82 岁,平均(72.2±8.3)岁;其中冠心病 28 例,高血压性心脏病 15 例,扩张型心肌病 5 例;均经超声心动图证实为充血性心力衰竭,EF 值小于 50%。依据 NYHA 心功能分级,II 级 13 例,III 级 18 例,IV 级 17 例。选择 25 例健康体检无心功能不全证据的成年人作为对照组,其中男 14 例,女 11 例,年龄 48~76 岁,平均(68.2±7.6)岁,两组在年龄、性别上差异无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 ET-1 的测定 两组均于入院后第 1 天清晨采空腹静脉血 2 mL(30 μL EDTA 加 20 μL 抑肽酶),立即离心,分离血

清,-80℃冰箱保存,集中采用放射免疫方法测定,试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供。

1.2.2 全血总 RNA 抽提 清晨采空腹静脉血 3 mL,经 EDTA·Na₂ 抗凝,采用 3S 柱离心式血液总 RNA 抽提试剂盒(K3620 上海博彩生物科技有限公司),RNA 浓度测定采用 BIO-RAD 核酸蛋白测量仪(SmartSpec Plus Spectrophotometer),RNA 提取物-80℃保存。

1.2.3 外周血 ETA、ETB 基因表达的检测方法 外周血 ETA、ETB mRNA 表达水平通过实时荧光定量 PCR 技术进行相对定量检测。ETA 受体基因引物序列,GenBank:NM-001957 正向 5'-GCT TCC TGG TTA CCA CTC ATC AA-3',反向 5'-TAG TCT GCT GTG GGC AAT AGT TG-3'。ETB 受体基因引物序列,GenBank:NM-001101 正向,5'-GCC AAG GAC CCA TCG AGA T-3',反向 5'-GAA GTG TGG AGT TCC CGA TGA T-3'。管家基因 GAPDH 作为内参基因,GAPDH 基因引物序列,GenBank:NM-002046.3,正向 5'-ACA GTC AGC CGC ATC TTC TT-3',反向 5'-ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC-3'。

实时荧光定量 PCR 采用两步法,全血总 RNA 合成 cDNA 使用 TAKARA 反转录反应试剂盒(DRR037S 大连宝生物工程有限公司)。实时荧光定量 PCR 采用 SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II 试剂盒(DRR083S 大连宝生物工程有限公司),PCR 仪采用 LightCycler480 扩增仪。实时荧光定量 PCR

表 1 心衰患者和健康对照组血浆 ET-1 水平、ETA、ETB 基因表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ET-1(ng/L)	ETA	ETB
健康对照组	25	67.34±14.36	1.08±0.32	1.00±0.28
心功能 II 级组	13	82.24±12.48*	1.09±0.25*	0.92±0.30*
心功能 III 级+IV 级组	35	126.25±16.51**	2.06±0.49**	1.67±0.47***

*: $P > 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.05$, 与健康对照组比较。

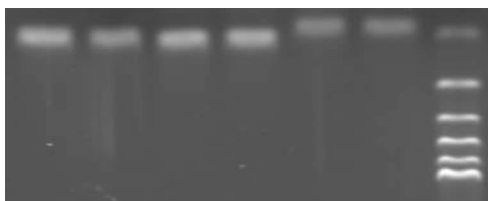
反应体系为 20 μ L, 包括 2 \times SYBR Premix Ex Taq, 1~100 ng cDNA, 50 pmol/ μ L 引物。两步法 PCR 循环条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s 一个循环, 变性 95 $^{\circ}$ C 5 s, 退火/延伸 60 $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环。溶解曲线分析采用 LightCycler Relative Quantification (Version 1.5) 软件, 用于产物的特异性分析, 2% 琼脂糖凝胶电泳亦用于扩增产物的大小及特异性鉴定。

相对定量分析采用 $\Delta\Delta$ CT 法进行相对定量。 $\Delta\Delta$ CT 法是通过 LightCycler Relative Quantification (Version 1.5) 软件, 假定目的基因和内参基因扩增效率相同时, 扩增效率默认为 2, 标准化比值计算公式为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

1.3 统计学处理 计数资料用 χ^2 检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较用方差分析, 同组治疗前后均数用配对 t 检验。各检测指标间进行相关性分析。所有数据采用 SPSS13.0 统计软件包处理。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扩增产物电泳及溶解曲线分析 ETA、ETB 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的 RT-qPCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果显示扩增产物均为单一条带, 无引物二聚体形成, 大小分别为 84、99、94 bp, 见图 1。扩增产物溶解曲线分析, 产物具有单一明显而尖锐的峰图, 说明产物特异无非特异性产物生成, 见图 2。



Marker	ETA	ETA	ETB	ETB	GAPDH	GAPDH
	84bp	84bp	99bp	99bp	94 bp	94bp
	对照组	心衰组	对照组	心衰组	对照组	心衰组

图 1 目的基因和内参基因 2% 琼脂糖凝胶电泳图

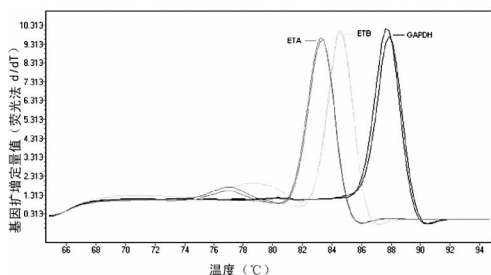


图 2 目的基因和内参基因溶解曲线峰图

2.2 心衰患者和健康对照组血浆 ET-1 水平、ETA、ETB 基因表达的比较 结果表明, 心功能 II 级组的水浆 ET-1 水平及 ETA、ETB 基因表达与健康对照组比较, 两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。心功能 III 级+IV 级组的水浆 ET-1 水平与健康对照组比较, 两组差异具有统计学意义 ($F = 8.014, P < 0.01$)。

心功能 III 级+IV 级组的 ETA 基因表达与健康对照组比较, 差异具有统计学意义 ($F = 8.317, P < 0.01$); 心功能 III 级+IV 级组的 ETB 基因表达与健康对照组比较, 两组差异具有统计学意义 ($F = 6.235, P < 0.05$)。此外, 不同病因引起的心力衰竭之间水浆 ET-1 水平、ETA、ETB 基因表达等无显著性差异, 可能与病例数较少有关, 见表 1。

3 讨论

ET 是由血管内皮细胞分泌的一种血管收缩肽, 缺氧、机械性应力、神经内分泌激素(如去甲肾上腺素、血管紧张素 II)、细胞因子(转化生长因子- β 和白介素 1 β)等^[4]可以刺激血管内皮细胞释放 ET-1。大量试验表明在心衰过程中 ET-1 的水平显著升高, 它们的升高与心搏出量的减少、肺动脉高压、肺血管阻力的增高以及心脏的重构、肥厚和纤维化都有关^[1-5]。心衰患者中, 随着心功能的恶化, 内皮依赖性舒张功能呈减退趋势^[6]。ET 的生物学效应就是由内皮特异受体介导的^[7]。ET 的受体有 ETA 和 ETB 两种亚型^[8]。ETA 受体存在于血管平滑肌细胞和心肌细胞中, 调节血管收缩和细胞增生^[9]。ETB 受体存在于内皮细胞和血管平滑肌细胞, 通常调节血管舒张; 但在某些病理情况下, 亦可引起血管收缩^[10-11]。心衰时 ETB 还参与心肌纤维化的进展和循环中 ET-1 的清除^[12]。发生心衰时内皮素受体介导的信号转导系统被显著激活, 表现为 ET 受体的密度上调、ET-1 结合位点增加、水浆 ET-1 水平随着心衰程度的加重而进行性升高^[13-14]。

在心衰患者中, 肺循环是 ET-1 的主要来源和清除部位, 故肺血管阻力与循环 ET-1 水平直接相关^[11]。本文结果显示, 心衰患者水浆 ET-1 浓度明显升高, 与 NYHA 心功能分级呈正相关。Lepailler-endouf 等^[15]也发现, 心衰患者失代偿期水浆 ET-1 分别是代偿期及对照组的 4.2 倍及 6.9 倍, 本研究结果与其相似。本文结果还显示, 心衰患者水浆 ET 受体基因表达与 NYHA 心功能分级和血液动力学有很大关系, 心功能 III~IV 级组患者 ETA、ETB 的基因表达水平明显高于心功能 II 级组及健康对照组, 即心功能愈差, ET 受体基因表达升高愈显著。本研究中可看出, 心衰患者水浆 ET 升高, 外周血单个核细胞 ETA、ETB 表达上调, 说明 ET 系统在心衰的促发及恶化方面起一定的作用。

参考文献:

- [1] Cowburn PJ, Cleland JGF. Endothelin antagonists for chronic heart failure: do they have a role[J]. Eur Heart J, 2001, 22(19): 1772-1784.
- [2] Kiowski W, Sutsch G, Oechslin E, et al. Hemodynamic effects of bosentan in patients with chronic heart failure[J]. Heart Fail Rev, 2001, 6(4): 325-334.
- [3] 张天泰. 内皮素系统在慢性心力衰竭中作用的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 2002, 29(4): 213-217.
- [4] 李天奇. 内皮素与心衰[J]. 心血管病学(下转第 2829 页)

定 IUD 在腹腔的情况^[9]。可见,单靠 X 线透视或 B 超检查来进行取器操作,有明显的局限性。临床上困难 IUD 主要与各种原因引起的 IUD 偏离宫腔正常位置及宫颈狭窄有关。对于 B 超提示在宫内的困难 IUD,仅凭手术医师的临床经验和感觉来盲目地反复钩取,可造成子宫穿孔、肠穿孔、继发感染、宫腔粘连等严重并发症。目前,联合腹部 B 超监视下行宫腔镜取器是处理难取宫内节育器的最佳方法^[10-11],优于常规的取器方法,但是仍然存在不足。宫腔镜可直接观察 IUD 在宫腔内的形态和嵌入深度,但不能辨别 IUD 与子宫肌层的关系,IUD 嵌入子宫肌层较深或移入子宫外时,则需开腹或腹腔镜手术取器^[12-13]。对于子宫外的困难 IUD,腹腔镜手术较开腹手术创伤小,还可缩短手术时间、缩短术后肛门排气时间及术后住院日,减少术中出血量及术后感染概率,而且术野清晰,可调范围大,寻找迷路 IUD 也更具优势^[14-15]。

综上所述,对于困难 IUD 的“3+6”技术操作模式的应用,术前确定 IUD 的位置非常关键,特别强调在应用该技术操作模式前须将 X 线平片、B 超检查、临床症状及取器病史进行综合分析,对困难 IUD 有一个准确定位,根据 IUD 与子宫的关系,优先选择最佳的术式进行取器操作,以使取器方法更确切,副损伤更小,取器成功率更高。可见,对于困难 IUD 的取出运用“3+6”技术操作模式是一种安全、有效、微创的方法,对基层医疗机构有较好的指导作用,值得临床推广应用。

参考文献:

- [1] 胡晓玲. 宫内节育器取出困难原因分析及临床处理[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2010,31(1):102-105.
- [2] 戴蓉,隆玉华,程薇. 尼尔雌醇用于绝经后妇女取宫内节育器 50 例观察分析[J]. 中国医学文摘:计划生育妇产科学,2008,27(5):336-337.
- [3] 汪爱兵,丁小兰,王森. 宫腔镜联合 B 超诊治 IUD 取出困

难 312 例分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2004,20(7):432.

- [4] 林晓燕,王永来,陈颖. 宫腔镜在宫内节育器取出困难中的临床应用[J]. 实用妇产科杂志,2007,23(10):625-626.
- [5] 李永文,刘齐东,喻萍. 西部某地农村妇女宫内节育器的取出原因及难易程度分析[J]. 西部医学,2009,21(10):1763-1764.
- [6] 姚晓英,黄紫蓉. 围绝经期和绝经后 IUD 取出时机和注意事项[J]. 实用妇产科杂志,2008,24(11):647-648.
- [7] 吴学浙. 绝经后取 IUD 常见困难及处理[J]. 实用妇产科杂志,2008,24(11):648-649.
- [8] 胡顺琴,孙彤. 三维超声在诊断宫内节育器位置异常中的价值[J]. 生殖与避孕,2009,29(5):340-342.
- [9] 肖雪琼,陈淑金. 异位宫内节育器取出探讨[J]. 海南医学,2010,21(9):85-86.
- [10] 王海云,殷明红,王玮. 宫内节育器取出 5 613 例临床分析[J]. 生殖与避孕,2009,29(10):696-698.
- [11] 董军响. 宫腔镜联合 B 超取出 IUD 97 例临床分析[J]. 中国医药导报,2010,7(4):66-67.
- [12] 平花,王英. 宫腔镜联合腹部 B 超处理难取宫内节育器的临床分析[J]. 中国医学创新,2010,7(1):10-11.
- [13] 沈山,高李英. 宫腔镜在宫内节育器常规取出失败后的应用[J]. 中国计划生育和妇产科,2010,2(5):55-57.
- [14] 刘素芬,谢晔玲. 宫腔镜及腹腔镜手术取出迷路宫内节育器 3 例[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志:电子版,2010,6(4):254.
- [15] 喻海芬,熊毅刚. 腹腔镜诊治计划生育手术并发症 32 例分析[J]. 中国计划生育和妇产科,2009,1(6):56-57.

(收稿日期:2011-04-09 修回日期:2011-05-10)

(上接第 2826 页)

- 进展,2005,26(1):17-20.
- [5] 龚生兰,施仲伟,于金德. 充血性心力衰竭[M]. 上海:上海科学技术出版社,2004:44.
- [6] 彭艳,覃数,刘剑,等. 血脂康对慢性心力衰竭患者血清 TNF2A 和血管内皮功能的影响[J]. 重庆医学,2009,38(14):1771-1772.
- [7] Naruse M, Naruse K, Demura H. Recent advances in endothelin research on cardiovascular and endocrine systems [J]. *Endocr J*,1994,41(5):491-507.
- [8] Yamamoto S, Matsumoto N, Kanazawa M, et al. Different contributions of endothelin-A and endothelin-B receptors in postischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow in rat hearts[J]. *Circulation*,2005,111(3):302-309.
- [9] Ohlstein E, Douglas S. Endothelin-I modulates vascular smooth muscle structure and vasodilation: implications in cardiovascular pathology[J]. *Drug Dev Res*,1993,29(2):108-128.
- [10] Levin ER. Endothelins[J]. *N Eng J Med*,1995,333(6):

356-363.

- [11] Benigni A, Renuzzi G. Endothelin antagonists[J]. *Lancet*,1999,353(9):133-138.
- [12] Dupuis J, Stewart DJ, Cemacek P, et al. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1[J]. *Circulation*,1996,94(7):1578-1584.
- [13] Wei CM, Lennan A, Rodeheffer RJ, et al. Endothelin in human congestive heart failure[J]. *Circulation*,1994,89(4):1580-1586.
- [14] Mulder P, Richard V, Derumeaux C, et al. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure. Effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling[J]. *Circulation*,1997,96(6):1976-1982.
- [15] Lepailleur-enouf D, Egidy G, Philippe M, et al. Pulmonary endothelinergic system in experimental congestive heart failure[J]. *Cardiovas Res*,2001,49(2):330-339.

(收稿日期:2011-04-10 修回日期:2011-05-19)