

• 临床研究 •

慢性阻塞性肺疾病患者外周血 Rho 激酶水平测定的临床意义

曾建红¹, 曾 军²

(1. 广东省广州市第一人民医院鹤洞分院 510380; 2. 广东省广州市第一人民医院呼吸内科 510380)

摘要:目的 探讨慢性阻塞性肺疾病(COPD)伴发肺动脉高压(PAH)患者血液 Rho 激酶 1(ROCK1)水平测定的临床意义。方法 选择 2010 年 1 月至 2011 年 1 月该院收治的 COPD 患者 40 例,根据病情分为两组,COPD 伴发 PAH 患者 20 例为 A 组,不伴 PAH 的 COPD 患者 20 例为 B 组;选取该院同期体检中心健康体检者 20 例为对照组,比较 3 组患者血清 ROCK1、外周血单核细胞 ROCK1 表达水平和肺动脉平均压的变化,以及各种指标之间的相关性。结果 A、B 组血清 ROCK1 水平、外周血单核细胞 ROCK1 水平及肺动脉平均压均高于对照组($P<0.05$),且 A 组的上述指标均高于 B 组($P<0.05$);Pearson 相关性分析显示:受试者血清 ROCK1 水平与肺动脉平均压呈正相关($r=0.654, P<0.05$),外周血单核细胞 ROCK1 水平与肺动脉平均压亦呈正相关($r=0.664, P<0.05$),血清 ROCK1 水平与外周血单核细胞 ROCK1 水平呈正相关($r=0.864, P<0.01$)。结论 ROCK1 信号通路的激活参与了 COPD 过程中 PAH 的形成和发展。

关键词:肺疾病,慢性阻塞性;高血压,肺性;Rho 相关酶类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.21.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)21-2168-02

The clinical effect of Rho-kinase in blood in patients with chronic obstructive pulmonary disease

Zeng Jianhong¹, Zeng Jun²

(1. Department of Hedong Branch, the First People's Hospital of Guangzhou Province, Guangdong, Guangzhou 510380, China; 2. Department of Respiratory Medicine, the First People's Hospital of Guangzhou Province, Guangdong, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Objective To observe the clinical effects of Rho-kinase1(ROCK1) in serum and peripheral blood monocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease(COPD) related pulmonary arterial hypertension(PAH). **Methods** A total of 40 patients with COPD were enrolled in this study and randomly divided into COPD associated PAH group(group A) and COPD group (group B). 20 healthy people were used as a control group($P<0.05$). The expression of ROCK1 in serum and in peripheral blood monocytes, and the mean pulmonary artery pressure were detected. The correlation of various index was investigated by Pearson correlation analysis. **Results** The expression of ROCK1 in serum and in peripheral blood monocytes, and the mean pulmonary artery pressure in group A and B were higher than control group($P<0.05$). These indexes in group A were higher than group B. The level of ROCK1 in serum was positively related with pulmonary arterial systolic pressure($r=0.654, P<0.05$). The level of ROCK1 in peripheral blood monocytes was positively related with pulmonary arterial systolic pressure($r=0.664, P<0.05$). The serum level of ROCK1 was positively related with that in peripheral blood monocytes($r=0.864, P<0.01$). **Conclusion** The high-level expression of ROCK1 play a key role in the development of PAH in COPD patients.

Key words: pulmonary disease, chronic obstructive; hypertension, pulmonary; rho-associated kinases

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一组慢性气道阻塞性疾病的统称,疾病发展后期的肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)常会导致肺源性心脏病(肺心病)的发生,大约 80%~90%的肺心病是由 COPD 疾病发展而来^[1]。目前,COPD 的人群发病率约为 1.7%,因此,延缓慢性炎症所导致的 PAH 的形成,是 COPD 疾病终末阶段肺心病防治的一个有效途径^[2-3]。Rho 激酶(Rho associated coiled coil forming protein kinase, ROCK),又称 Rho 关联含卷曲螺旋蛋白激酶,是小 G 蛋白 Rho 的下游效应激酶。有研究显示 Rho 激酶的活化与血管平滑肌的增生和血管的重构有着密切的关系,参与了动脉粥样硬化、高血压、肺心病等多种疾病的发生发展过程^[4-5]。现将本研究 COPD 合并 PAH 患者血清以及单核细胞 ROCK 水平的临床意义报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010 年 1 月至 2011 年 1 月本院收治的 COPD 患者 40 例,根据病情分为两组,COPD 伴 PAH 患者 20 例为 A 组,男 14 例,女 6 例;年龄 45~76 岁,平均(57.2±

14.3)岁。不伴 PAH 的 COPD 患者 20 例为 B 组,男 12 例,女 8 例;年龄 42~75 岁,平均(54.8±12.7)岁;选取本院同期体检中心健康体检者 20 例为对照组,男 13 例,女 7 例;年龄 41~74 岁,平均(54.2±11.8)岁。所有受试者均签署知情同意书并获得本院伦理委员会批准。3 组患者在性别、年龄、体质量等方面比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 入选和排除标准 参照 1997 年全国第 2 次肺心病专业会议制定的标准,患者吸入支气管舒张药后第 1 秒用力呼气容积/用力呼气肺活量(FEV1/FVC)<70%及 FEV1<80%定义为 COPD;参照 2009 年欧洲心脏病学会 PAH 诊断指南,将肺动脉平均压大于或等于 25 mm Hg,伴有气促、下肢水肿等临床表现定义为 PAH。排除标准:有心血管疾病,支气管扩张,肝、肾等脏器疾病,近期使用过他汀类药物者。

1.3 肺动脉平均压测定 肺动脉平均压=0.61×[4×(三尖瓣反流速度)+右房压]+2。

1.4 血清 Rho 激酶 1(ROCK1)水平的测定 采集所有受试者过夜空腹 12 h 静脉血,3 000 r/min,离心 15 min,分离上清液。ROCK1 检测 ELISA 试剂盒购自美国 D&G 公司,严格按

着试剂盒说明书操作,酶标仪 450 nm 波长处测定各孔的光密度值(optical density,OD)。以标准品浓度为横坐标,所对应的 OD 值为纵坐标,绘制标准曲线,然后对照标准曲线根据血清样品的 OD 值计算 ROCK1 的表达水平。

1.5 单核细胞 ROCK1 表达水平的流式细胞仪检测 采集所有受试者过夜空腹 12 h 静脉血 20 mL,参照黄芬等^[6]的方法分离单核细胞,血液中加入 PBS 缓冲液和淋巴细胞分离液,1 000×g,离心 10 min,细胞分层,吸取所需的单核细胞,PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,500 μL PBS 重悬细胞,按照抗体说明书加入 10 μL FITC-ROCK1 或者同型对照(美国 R&D 公司)室温孵育 30 min,流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)IL1 通道检测 10 000 个单核细胞,计算 ROCK1 的表达水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验和单因素方差分析,Pearson 相关性分析检测各指标的相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

3 组受试者血清 ROCK1 水平、外周血单核细胞 ROCK1 水平及肺动脉平均压变化见表 1,3 组受试者外周血单核细胞 ROCK1 水平的流式细胞仪检测见图 1。Pearson 相关性分析显示:受试者血清 ROCK1 水平与肺动脉平均压呈正相关($r = 0.654, P < 0.05$),外周血单核细胞 ROCK1 水平与肺动脉平均压亦呈正相关($r = 0.664, P < 0.05$),血清 ROCK1 水平与外周血单核细胞 ROCK1 水平呈正相关($r = 0.864, P < 0.01$)。

表 1 3 组受试者血清者 ROCK1 水平、外周血单核细胞 ROCK1 水平及肺动脉平均压变化($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	肺动脉平均压 (mm Hg)	血清 ROCK1 表达水平(pmol/L)	单核细胞 ROCK1 表达水平(%)
A 组	51.37±11.64*▲	36.72±7.18*▲	31.21±8.83*▲
B 组	25.14±4.28*	23.55±4.97*	10.56±3.72*
对照组	20.14±3.45	13.10±2.67	3.61±2.44

*: $P < 0.05$,与对照组比较;▲: $P < 0.05$,与 B 组比较。

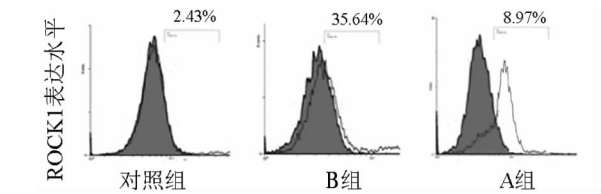


图 1 3 组患者单核细胞 ROCK1 表达的流式细胞仪检测

3 讨 论

COPD 在老年人群中患病人数多,疾病会反复发作,最终会导致 PAH 的产生,严重影响了患者的生活质量^[7]。ROCK 分为 N 末端催化结构域、卷曲螺旋结构域、C 端 PH 结构域 3 部分,N 末端具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性,可以磷酸化下游的靶蛋白产生一系列的生物学效应。Rho 激酶有 ROCK1 和 ROCK2 2 个亚基,ROCK1 和 ROCK2 氨基酸序列有 65% 的同源性,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化活性区同源性高达 92%,两个亚基有一定的组织分布特异性,研究显示 ROCK1 对血管平滑肌细胞的促增殖作用较明显^[8-10]。本研究显示,血清和单核细胞中 ROCK1 的表达水平在对照组、A 组和 B 组 3 组之间比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),说明 Rho 激酶的高表达参与了 COPD 患者 PAH 的形成和发展。

ROCK 信号通路可以通过多种方式参与 PAH 的形成,例如 ROCK 通过 Erk 信号通路抑制骨形态发生蛋白所引起的 p-Smad1 核迁移,促进肺动脉平滑肌细胞增殖;诱导活性氧产生损伤血管平滑肌收缩性并诱发血管结构重构,另外血小板源性生长因子、5-羟色胺、血管紧张素 II 等血管活性物质也主要是通过 ROCK 信号通路来促进血管平滑肌细胞的增生和肥大^[10-11]。本研究显示,血清和单核细胞 ROCK1 的表达水平与肺动脉平均压呈正相关,证明了 ROCK 在 PAH 中的作用,提示 ROCK 可以成为降低肺动脉压的一个新的治疗靶点。有研究显示,ROCK 的抑制剂法舒地尔可以显著降低肺动脉压力,而且在吸氧气或口服钙离子通道阻滞剂等常规治疗无效的患者,法舒地尔也可以起到降低肺动脉压力的作用^[12-13]。COPD 病理基础就是小气道的慢性炎症,慢性炎症必然会有间质慢性炎症细胞浸润,本研究 COPD 患者外周血单核细胞 ROCK 表达升高,在伴发 PAH 患者中显著升高,说明了单核细胞参与了 COPD 疾病 PAH 的形成和发展,相关性分析血清 ROCK1 水平与外周血单核细胞 ROCK1 表达水平呈显著正相关($r = 0.864, P < 0.01$),说明血液中的 ROCK 可能主要是慢性炎症刺激单核细胞所分泌。

综上所述,ROCK 信号通路的激活参与了 COPD 疾病 PAH 的形成和发展,ROCK 是降低 PAH 的一个潜在治疗靶点。

参考文献:

[1] Falk JA, Kadiev S, Criner GJ, et al. Cardiac disease in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Proc Am Thorac Soc, 2008, 5(4): 543-548.

[2] Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: Gold executive summary[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(6): 532-555.

[3] Agarwal R, Aggarwal AN, Gupta D, et al. Inhaled corticosteroids vs placebo for preventing COPD exacerbations: a systematic review and metaregression of randomized controlled trials[J]. Chest, 2010, 137(2): 318-325.

[4] Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, et al. Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans[J]. Hypertension, 2001, 38(6): 1307-1310.

[5] Nossaman BD, Kadowitz PJ. The role of the RhoA/ rho-kinase pathway in pulmonary hypertension[J]. Curr Drug Discov Technol, 2009, 6(1): 59-71.

[6] 黄芬,熊晓昉,游莎,等. 内脂素经核因子 κ B 途径诱导人单核细胞基质金属蛋白酶-2 和 9 表达的实验研究[J]. 中华心血管病杂志, 2010, 38(5): 455-459.

[7] Rame JE. Pulmonary hypertension complicating congenital heart disease[J]. Curr Cardiol Rep, 2009, 11(4): 314-320.

[8] Nossaman BD, Nossaman VE, Murthy SN, et al. Role of the RhoA/Rho-kinase pathway in the regulation of pulmonary vasoconstrictor function[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88(1): 1-8.

[9] Mcmurtry IF, Abe K, Ota H, et al. Rho kinase-mediated vasoconstriction in pulmonary hypertension[J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 661(4): 299-308.

[10] Nunes KP, Rigsby CS, Webb RC. RhoA/Rho-kinase and vascular diseases; what is the Link? [J]. (下转第 2171 页)

消失;部分缓解(partial response,PR)为乳腺肿瘤缩小面积大于或等于 50%;稳定(stable disease,SD)为肿瘤缩小面积小于 50%或肿瘤增大面积小于或等于 25%;进展(progressive disease,PD)为肿瘤增大面积大于 25%或出现新病灶。总有效率=(CR 例数+PR 例数)/总例数。

1.2.4 组织学评价标准 根据 Miller-Payne 分级系统方法^[5],Ⅰ级浸润:肿瘤组织的数量无变化;Ⅱ级浸润:肿瘤组织数量减少比例小于 30%;Ⅲ级浸润:肿瘤组织数量减少比例为 30%~90%;Ⅳ级浸润:肿瘤组织数量减少比例大于 90%;Ⅴ级浸润:所有切片均无浸润性肿瘤组织残留,可以有残存的导管内癌成分。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计量资料组间比较采用 *t* 检验,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 雌激素、孕激素受体表达的分布 雌激素和孕激素均为阴性患者(阴性组)56 例,占 51.38%;雌激素、孕激素单一阳性或双阳性患者(简称阳性组)53 例,占 48.62%,其中雌激素阳性 22 例、孕激素阳性 9 例,双阳 22 例。

2.2 两组临床疗效评价结果 阴性组中 CR 7 例,PR 43 例,SD 6 例,PD 0 例,总有效率为 89.29%;阳性组中 CR 3 例,PR 36 例,SD 14 例,PD 0 例,总有效率为 73.58%。两组临床疗效比较,阴性组明显优于阳性组(*P*<0.05)。

2.3 两组患者组织学评价结果 两组患者组织学评价结果,见表 2。

表 2 两组患者组织学评价结果[n(%)]							
组别	<i>n</i>	Ⅰ~Ⅱ级浸润	Ⅲ级浸润	Ⅳ级浸润	Ⅴ级浸润	χ^2	<i>P</i>
阴性组	56	10(17.86)	28(50.00)	13(23.21)	5(8.93)	9.574	0.023
阳性组	53	22(41.51)	24(45.28)	5(9.43)	2(3.78)		

3 讨 论

新辅助化疗指对非转移性肿瘤,在局部治疗前进行的全身性的、系统性的细胞毒性药物治疗。新辅助化疗可降低肿瘤分期,提高可手术率、保乳手术率,消灭微转移灶及通过疗效的评价来测试肿瘤对化疗的敏感性^[6-7]。目前,新辅助化疗已成为可手术的局部晚期乳腺癌的常规治疗手段之一,如何找到预测新辅助化疗效果的指标就成为临床关注的重点。

本研究显示,阴性组患者的临床疗效明显优于阳性组(*P*<0.05)。刘森等^[8]研究发现乳腺癌激素受体双阴的患者可能较受体单阳或双阳的患者对化疗的敏感性更高。化疗后肿瘤的组织学改变,阴性组明显优于阳性组(*P*<0.05),说明从肿瘤组织学的角度看,新辅助化疗对雌激素、孕激素受体双阴性患者的疗效较单阳或双阳患者更为显著。Colleoni 等^[9]研究发现用含紫杉类及蒽环类的新辅助化疗方案治疗 399 例雌激素、孕激素受体阴性的患者更易获得病理上的完全缓解;

Ogston 等^[3]研究认为雌激素受体阴性的患者对新辅助化疗有更好的病理反应。因此,乳腺肿瘤组织雌激素、孕激素受体表达可作为预测乳腺癌新辅助化疗疗效的指标,使化疗成为个体化治疗,患者从化疗中获益。

参考文献:

[1] Kaufmann M,von Minckwitz G,Smith R,et al. International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations[J]. J Clin Oncol, 2003, 21 (13): 2600-2608.

[2] Chollet P, Amat S, Cure H, et al. Prognostic significance of a complete pathological response after induction chemotherapy in operable breast cancer[J]. Br J Cancer, 2002, 86(7):1041-1046.

[3] Ogston KN, Miller ID, Schofield AC, et al. Can patients' likelihood of benefiting from primary chemotherapy for breast cancer be predicted before commencement of treatment[J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 86(1):181-189.

[4] Miller AB, Hoogstraten B, Straquet M. Reporting results of Cancer treatment[J]. Cancer, 1981, 147(6):207-214.

[5] Ogston KN, Miller I, Payne S, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancer to primary chemotherapy: prognostic significance and survival [J]. Breast, 2003, 12(6):320-327.

[6] Mamounas EP, Fisher B. Preoperative (neoadjuvant) chemotherapy in patients with breast cancer[J]. Semin Oncol, 2001, 28(4):389-399.

[7] Van der Hage JA, Van de Velde CJ, Julien JP, et al. Pre-operative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902 [J]. J Clin Oncol, 2001, 19(22):4224-4237.

[8] 刘森, 佟富中, 张嘉庆, 等. 乳腺癌激素受体的表达与新辅助化疗疗效的相关性[J]. 中国妇产科临床杂志, 2005, 6(4):278-280.

[9] Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(19):6622-6628.

[10] 周波, 谢菲, 杨德启. 乳腺癌分子亚型预测新辅助化疗疗效的研究[J]. 中国肿瘤临床, 2009, 36(4):199-206.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-03-06)

(上接第 2169 页)

Cell Mol Life Sci, 2010, 67(22):3823-3836.

[11] Resta TC, Broughton BR, Jernigan NL. Reactive Oxygen species and RhoA signaling in vascular smooth muscle: role in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 661(5):355-373.

[12] Chung HH, Dai ZK, Wu BN, et al. The xanthine derivative KMUP-1 inhibits models of pulmonary artery hyper-

tension via increased NO and cGMP-dependent inhibition of RhoA/Rho kinase[J]. Br J Pharmacol, 2010, 160(4): 971-986.

[13] Ali OF, Growcott EJ, Butrous GS, et al. Pleiotropic effects of statins in distal human pulmonary artery smooth muscle cells [J]. Respir Res, 2011, 12(1):137.

(收稿日期:2012-01-12 修回日期:2012-04-23)