

# 外周血白细胞端粒长度与早发冠心病的相关性研究

刘龙梅 王仲朝 李保 赵克斌

作者单位:030024 太原市,山西省心血管病医院实验室(刘龙梅 王仲朝 李保)

030001 太原市,山西医科大学第一医院检验科(赵克斌)

**【摘要】** 目的 探讨早发冠心病 (premature coronary artery disease, PCAD) 与外周血白细胞端粒长度的相关性。方法 收集我院经冠状动脉造影确诊为 PCAD 的患者 30 例,同期选取与 PCAD 患者性别、年龄均匹配的健康体检者 30 例为对照组。PCAD 患者按照年龄分为 38~42 岁组、43~50 岁组和 51~55 岁组。采集受试者外周血,采用 southern blot 法检测外周血白细胞端粒长度,对检测结果进行统计学分析。结果 PCAD 组外周血白细胞端粒长度明显比对照组短,且差异有统计学意义 ( $t=2.162, P=0.039$ )。三个不同年龄段组 PCAD 患者外周血白细胞端粒长度差异有统计学意义 ( $F=4.380, P=0.020$ )。43~50 岁组和 51~55 岁组 PCAD 患者外周血白细胞端粒长度均长于 38~42 岁组,且差异均有统计学意义 ( $P=0.030, P=0.020$ ); 43~50 岁组和 51~55 岁组 PCAD 患者外周血白细胞端粒长度差异无统计学意义 ( $P=0.090$ )。结论 PCAD 患者外周血白细胞端粒长度较健康对照者明显缩短,外周血白细胞端粒长度与 PCAD 相关。

**【关键词】** 早发冠心病;端粒;Southern blot;白细胞

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2015.02.002

## The correlation research of telomere length of the peripheral white blood cells with premature coronary artery disease

LIU Long-mei, WANG Zhong-chao, LI Bao, et al. Department of Clinical Laboratory, the Cardiovascular Hospital in Shanxi Province, Taiyuan 030024, China

**【Abstract】** **Objective** To study the correlation of telomere length of the peripheral white blood cells with premature coronary artery disease (PCAD). **Methods** 30 cases PCAD patients diagnosed by coronary arteriography in our hospital were collected. At the same time, 30 cases healthy controls matching in gender and age with PCAD group were collected. PCAD patients were divided into 38~42 age group, 43~50 age group and 51~55 age group according to the age. The peripheral blood of all the subjects were collected, and the telomere length of the peripheral white blood cells were detected by southern blot. The results were analyzed statistically. **Results** The telomere length in PCAD group was shorter than that of control group, and the difference had statistical significance ( $t=2.162, P=0.039$ ). There was statistical significance in the difference of telomere length among three different PCAD groups ( $F=4.380, P=0.020$ ). The telomere length in 43~50 age group and 51~55 age group were all longer than that of 38~42 age group, and the differences all had statistical significance ( $P=0.030, P=0.020$ ). There was no statistical significance in the difference of telomere length between 43~50 age group and 51~55 age group ( $P=0.090$ ). **Conclusion** The telomere length of the peripheral white blood cells in patients with PCAD is obviously shorter than that of the normal controls. The telomere length of the peripheral white blood cells is correlated with PCAD.

**【Key words】** Premature coronary artery disease; Telomere; Southern blot; WBC

冠心病发病年龄男性 $\leq 55$ 岁,女性 $\leq 65$ 岁,称为早发冠心病 (premature coronary artery disease, PCAD)<sup>[1]</sup>。目前的临床资料大多数是以中老年人作为研究对象,而对年轻人冠心病研究资料相对较少,而 PCAD 对患者危害更大。PCAD 患者的临床症状不典型,起病非常急,主要表现为急性冠状动脉综合

征,尤其是急性心肌梗死,临床病死率极高。

冠心病本为衰老相关性疾病,但是近年来发病越来越年轻化,当日历年龄不能准确反映人体内细胞老化状态时,我们选取代表细胞老化的重要生物学指标—端粒作为研究对象。端粒被认为是真核细胞的“生命时钟”<sup>[2]</sup>,短的端粒表现出更大的生物学

年龄,其比日历年龄更能准确地反映衰老与冠心病的相关性。

由于端粒长度调节具有非组织特异性,且有研究<sup>[3]</sup>证实,人外周血白细胞端粒长度和动脉粥样硬化组织端粒长度之间具有相关性,为更方便的获得临床标本,本文研究选取人外周血白细胞端粒长度作为检测指标,以探讨端粒长度与 PCAD 发生、发展的相关性。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 选择 2013 年 1 月至 2013 年 12 月我院经冠状动脉造影确诊为冠心病的 30 例住院患者为 PCAD 组。入选标准:①经冠状动脉造影确诊为冠心病(即至少有一支血管狭窄超过 50%)。②冠心病发病年龄男性 ≤ 55 岁,女性 ≤ 65 岁。其中男性 20 例,女性 10 例,所有患者按年龄分为 38~42 岁组 8 例,43~50 岁组 10 例,51~55 岁组 12 例。同期选取我院健康体检者 30 例为对照组,由于端粒长度与年龄、性别相关,本文研究对两组性别、年龄进行配对,配对的年龄相差在 2 岁以内。对照组性别比例及各年龄段人数均与 PCAD 组相同。所有血液标本的采集和临床资料的收集均取得患者本人及家属知情同意,并经本院伦理委员会批准。

**1.2 标本采集** 采集受试者静脉血 3~5 ml 置于含有 0.5 mol/L EDTA 抗凝剂的离心管中,于 -20 °C 冷冻保存待测。

**1.3 仪器与试剂** 罗氏公司端粒长度检测试剂盒 TeloTAGGG Telomere Length Assay; Amersham 公司 HyBond N+ 带正电荷尼龙膜; TIANGEN 血液基因组 DNA 提取试剂盒。TaKaRa 公司 TP600 型梯度 PCR 仪; BIO-RAD 公司 TY2795 型电泳仪及 491 型电泳槽, GelDocXR 型凝胶成像分析系统。

## 1.4 方法

**1.4.1 血液基因组 DNA 提取及鉴定** 根据 DNA 提取试剂盒操作说明书提取样本 DNA, 选取 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值介于 1.8~2.0 之间 DNA 提取样本作为实验样品。0.8% 琼脂糖凝胶电泳后紫外线下观察 DNA 的完整性,对基因组进行酶切,37 °C 消化 2 h,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,鉴定酶切结果。酶切结果良好的样品在电泳图谱中 DNA 从上到下不出现主条带,基因组酶切结果电泳图谱见图 1。

**1.4.2 southern blot 检测** 将制备好的样品进行 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳,80 V 恒压、低温、4 h,然后转膜,杂交,洗膜,信号检测,X 线片经积分光密度扫描,采用端粒长度分析软件 (Telomeric 1.2, <http://www.gnu.org>)

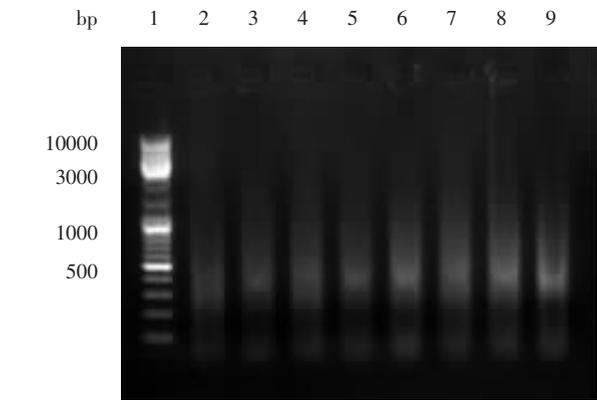


图 1 基因组酶切结果电泳图谱

注:1 号为 Marker,2~9 号分别为患者样本

计算端粒限制性片段 (terminal restrict fragment, TRF) 平均长度,其公式为

$$TRF = \frac{\sum (OD_i - background)}{\sum (OD_i - background / Li)}$$

Li 为 i 点 marker 长度,OD<sub>i</sub> 为 i 点的光密度值,background 为背景<sup>[4]</sup>。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 15.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间计量资料的比较采用配对 t 检验,多组间计量资料的比较采用方差分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PCAD 组与对照组外周血白细胞端粒长度检测结果比较** PCAD 组外周血白细胞端粒长度明显比对照组短,且差异有统计学意义 ( $t = 2.162, P = 0.039$ ),见表 1,图 2。

表 1 PCAD 组与对照组外周血白细胞端粒长度检测结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ , kb)

组别	例数	端粒长度	t 值	P 值
PCAD 组	30	4.21 ± 0.33	2.162	0.039
对照组	30	7.98 ± 0.54		

**2.2 不同年龄段 PCAD 患者外周血白细胞端粒长度检测结果比较** 三个不同年龄段组 PCAD 患者外周血白细胞端粒长度差异有统计学意义 ( $F = 4.380, P = 0.020$ )。43~50 岁组和 51~55 岁组 PCAD 患者外周血白细胞端粒长度均长于 38~42 岁组,且差异均有统计学意义 ( $P = 0.030, P = 0.020$ ); 43~50 岁组和 51~55 岁组 PCAD 患者间外周血白细胞端粒长度差异无统计学意义 ( $P = 0.090$ ),见表 2。

## 3 讨论

端粒是位于真核染色体末端的特异性 DNA 蛋白结构,结构特征为由 (G+C) 的重复序列组成,其对维持染色体稳定性、基因完整性及细胞增殖能力很

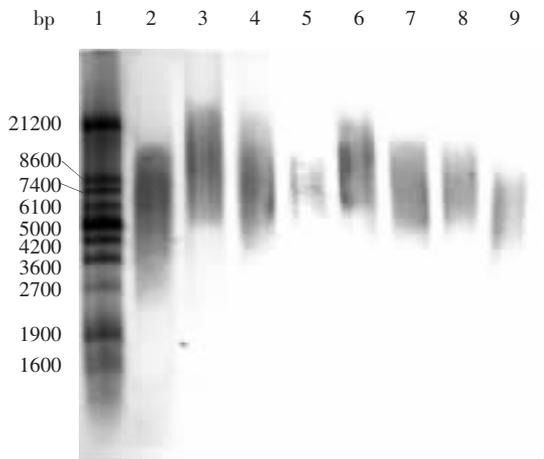


图 2 southern blot 法检测端粒长度电泳图谱

注:1 号泳道为 Marker, 其中 2、4、6、8 号分别为 PCAD 组样本, 3、5、7、9 号分别为对照组样本

表 2 不同年龄段 PCAD 患者外周血白细胞端粒长度检测结果比较( $\bar{x} \pm s$ , kb)

组别	例数	端粒长度	F 值	P 值
38~42 岁组	8	3.03±0.68		
43~50 岁组	10	5.23±0.21	4.380	0.020
51~55 岁组	12	5.39±0.11		

重要。随着细胞的分裂增殖,染色体的末端会出现复制、丢失,细胞每分裂 1 次,端粒 DNA 缩短 50~150 个碱基对,当端粒缩短到临界长度时,染色体发生融合等变化,细胞丧失增殖能力。所以端粒长度从一定意义上来说可以反映细胞的分裂能力。健康人端粒的缩短大致与年龄呈负相关,即随着年龄增长,端粒的长度是逐渐缩短的,但是在 PCAD 患者中,端粒长度缩短的速度显然大于年龄的增长速度。PCAD 的危险因素有很多,如吸烟、饮酒、血脂异常、阳性家族史等<sup>[5]</sup>,但近年来,PCAD 的发病更倾向于用遗传易感性来解释。Samani 等<sup>[6]</sup>的研究结果表明,冠心病患者加速的细胞衰老可能由端粒缩短表现出来。端粒长度的变化贯穿于心血管疾病的发生、发展过程中,并对心血管疾病的预后产生影响。缩短的端粒,作为遗传因素的介入点,对最终内皮功能失调导致动脉粥样硬化,进而对冠心病形成起了桥梁的作用。本文研究发现,PCAD 患者外周血白细胞端粒长度较对照组明显缩短,这与我们之前的关于冠心病患者端粒长度的研究<sup>[7]</sup>结果相符,也与国外大多数研究<sup>[8]</sup>结果类似。

本文研究结果显示,不同年龄段组 PCAD 患者间外周血白细胞端粒长度差异有统计学意义 ( $P <$

0.05),尤其值得关注的是,38~42 岁组 PCAD 患者的外周血白细胞端粒长度明显短于 51~55 岁组及 43~50 岁组,且差异均有统计学意义( $P$  均 $< 0.05$ )。临床资料显示,本文研究中 8 例 38~42 岁组的 PCAD 患者均为 ST 段抬高急性心肌梗死发作收入院的急诊病例。由于端粒自身的特点,富含鸟嘌呤,更容易受氧化刺激而出现加速缩短。本组如此低年龄的 PCAD 患者,是由于不良生活习惯导致的体内氧自由基堆积过多而消耗了端粒,还是因为端粒的个体差异较大,即遗传因素影响,还不得而知,尚需收集大量 45 岁以下病例进行进一步详细的临床研究。

在过去的十年中,端粒在心血管疾病中的研究已取得了很多成果,最近一项新的前瞻性研究<sup>[9]</sup>结果提示,端粒损耗与心血管疾病发生风险密切相关,并且不受年龄、性别和血管危险因素的影响,尽管如此,是否选取端粒检测作为冠心病易感人群的分子指标大规模用于临床,国内外医学界尚无定论,还需要大规模临床数据及区域性精细化数据来完善。

#### 4 参考文献

- 1 中华心血管病杂志编辑部血脂异常对策专题委员会. 血脂异常防治建议. 中华心血管病杂志, 1997, 25: 169-175.
- 2 张嵩, 王玉虎. 端粒、端粒酶及其与肿瘤关系的研究进展. 中国综合临床, 2007, 23: 285-286.
- 3 陈宇, 刘继斌, 刘鹏, 等. 人颈动脉粥样硬化斑块组织及外周血白细胞相对端粒长度的检测及相关性分析. 中国分子心脏病学杂志, 2012, 12: 27-31.
- 4 Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomere shorten during ageing of human fibroblasts. Nature, 1990, 345: 458.
- 5 王鹏, 叶忠. 早发冠心病的现状及其高危因素分析研究. 中国医药导刊, 2011, 13: 2181-2182.
- 6 Samani NJ, Boulby R, Butler R, et al. Telomere shortening in atherosclerosis. Lancet, 2001, 358: 472-473.
- 7 刘龙梅, 何雨峰, 赵克斌. 冠心病患者外周血白细胞端粒长度研究. 中国医疗前沿, 2011, 6: 71-72.
- 8 Marthews C, Gorenfle I, Scott S, et al. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. Circulation Research. 2006, 99: 156-164.
- 9 Willeit P, Willeit J, Brandstatter A, et al. Cellular aging reflected by leukocyte telomere length predicts advanced atherosclerosis and cardiovascular disease risk. Arteriosclerosis 771 thrombosis and Vascular Biology 2010, 30: 1649-1656.

(收稿日期: 2015-05-08)

(本文编辑: 杨军)