

高血压病气虚血瘀证患者血清凋亡 相关蛋白含量测定及意义※

● 胡小勤* 黄大利 蒙玉梅 吴培 王强▲

摘 要 目的:探讨高血压病气虚血瘀证与细胞凋亡的关系,为高血压病气虚血瘀证的实质研究提供实验依据。方法:制备高血压病气虚血瘀证患者血清,用酶联免疫法(ELISA)检测患者血清中凋亡相关蛋白 Caspase-3、P53、Fas、FasL 的含量。结果:与健康组相比,高血压病气虚血瘀证组血清中的 Caspase-3、P53、Fas、FasL 表达量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);高血压病非气虚血瘀证组与健康组相比,Caspase-3、Fas、FasL 表达量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。高血压病气虚血瘀证组与高血压病非气虚血瘀证组比较,Caspase-3、P53、FasL 含量明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结论:高血压病气虚血瘀证患者存在细胞凋亡,其机制可能与 Caspase-3、P53、Fas、FasL 表达量升高有关;与气虚血瘀证密切相关的蛋白主要为 Caspase-3、P53、FasL。

关键词 高血压病;气虚血瘀证;凋亡蛋白;酶联免疫

高血压病是临床常见的一种疾病^[1],气虚血瘀证是高血压病的常见证型^[2],也是血瘀证的常见亚型^[3]。高血压病^[4]以及气虚血瘀证^[5]都与细胞凋亡密切相关。笔者在以往的体外实验中发现,高血压病气虚血瘀证患者血清可以诱导血管内皮细胞凋亡^[6],但是高血压病气虚血瘀证患者体内细胞凋亡的情况尚不清楚。

细胞凋亡(apoptosis)是指多细胞生物为调控机体发育,维护内环境稳定,由基因控制的细胞主动死亡过程^[7]。Caspases 家族的激活是凋亡进行的必须途径。其中,Caspase-3 是整个凋亡级联反应的一个关键调节点^[8]。P53 基因对凋亡有诱导作用^[9]。Fas 与其配体 FasL 结合可诱导 Fas 表达细胞发生凋亡,是细胞凋亡最主要的途径之一^[10]。

因此,为了进一步阐明高血压病气虚血瘀证与细胞凋亡的关系,本文检测了高血压病气虚血瘀证患者血清凋亡相关蛋白 Caspase-3、P53、Fas、FasL 的含量,并分析其临床意义。

1 材料

1.1 试剂 ELisa 试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品。

1.2 仪器 台式低温离心机为 Thermo 公司产品;全波长酶标仪为 Biotek 公司产品;微量移液器为 Eppendorf 公司产品。

2 方法

2.1 患者及健康体检者的选择 选择高血压病气虚血瘀证、高血压病非气虚血瘀证患者各 40 例,为 2016 年 7 月至 2017 年 1 月期间广西中医药大学第二附属医院心血管内科高血压病确诊者。高血压病诊断按照 2013ASH/ISH 高血压管理指南的诊断标准。气虚血瘀证,按照我国 1986 年修订的气虚证诊断标准(全国中西医结合虚证及老年病防治学术会议制订的《中医虚证辨证参考标准》)及 2011 年修订的血瘀证诊断标准(中国中西医结合学会活血化瘀专业委员会制定

※基金项目 国家自然科学基金地区科学基金项(No. 81360517);广西自然科学基金面上项目(No. 2015GXNSFAA139143)

*作者简介 胡小勤,男,医学博士,教授。主要从事血瘀证基础与临床研究。

▲通讯作者 王强,男,医学硕士,教授。主要从事中西医结合防治心血管病研究。E-mail: wq7212@163.com。

• 作者单位 广西中医药大学(广西 南宁 530001)

的《血瘀证中西医结合诊疗共识》)。健康对照组选择健康体检者 20 例,三组在性别和年龄方面差异无统计学意义($P > 0.05$);高血压病气虚血瘀证、高血压病非气虚血瘀证患者的血压无统计学差异($P > 0.05$),具有可比性。

2.2 人血清收集 空腹取血后,置入不抗凝无菌带帽干燥试管,自凝后,4℃,2000r·min⁻¹离心 15min,取上清液置无菌 EP 管,混匀,灭活,过滤除菌,冻存于-80℃,备用。用于实验的血清分别为各组患者及健康体检者的混合血清。

2.3 分组 分 3 组,分别是高血压病气虚血瘀证组、高血压病非气虚血瘀证组、健康组。

2.4 ELISA 检测各组血清蛋白含量 按 ELISA 试剂盒说明进行检测。

2.5 统计学方法 统计分析采用 SPSS 24.0 软件,计量指标以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为检验水准。

3 结果

3.1 各蛋白标准曲线图 见图 1~4。

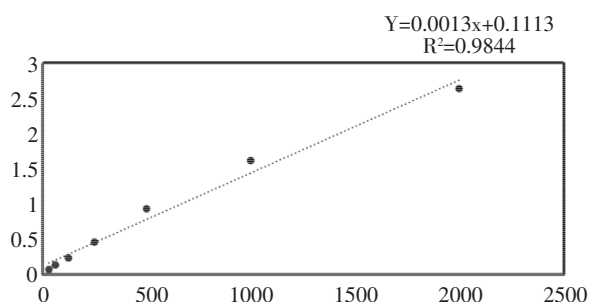


图 1 Caspase-3 标准曲线

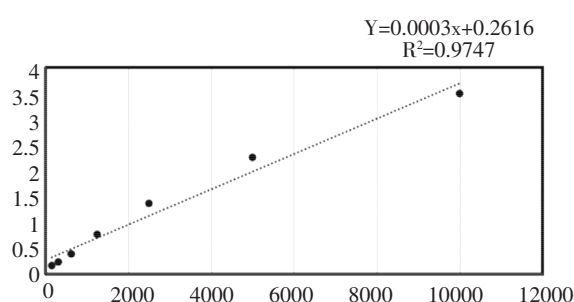


图 2 P53 标准曲线

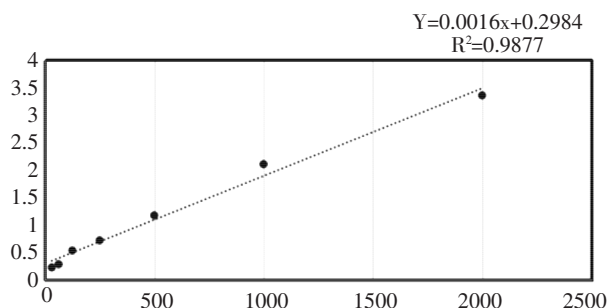


图 3 Fas 标准曲线

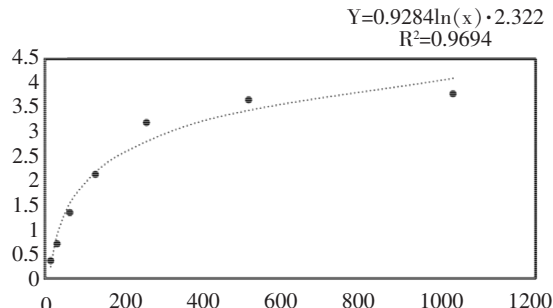


图 4 FasL 标准曲线

3.2 血清中各蛋白含量

3.2.1 各组血清中 Caspase-3、P53 含量 关于 Caspase-3,高血压病气虚血瘀证组、高血压病非气虚血瘀证组与健康组比较,含量均明显升高,差异具有统计学意义, $P < 0.01$;高血压病气虚血瘀证组与高血压病非气虚血瘀证组比较,含量明显升高,差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 。

关于 P53,高血压病气虚血瘀证组与健康组比较,含量明显升高,差异具有统计学意义, $P < 0.01$;高血压病非气虚血瘀证组与健康组比较,含量无明显变化;高血压病气虚血瘀证组与高血压病非气虚血瘀证组比较,含量明显升高,差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 。见表 1。

表 1 血清中 Caspase-3、P53 含量($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	Caspase-3 (pg/ml)	P53 (ng/ml)
高血压病气虚血瘀证组	3.2991 ± 0.0163 **△△	0.4189 ± 0.0034 **△△
高血压病非气虚血瘀证组	2.8981 ± 0.1186 **	0.3708 ± 0.0022
健康组	1.8204 ± 0.1942	0.3609 ± 0.0322

注:与健康组相比,** $P < 0.01$;与高血压病非气虚血瘀证组相比,△△ $P < 0.01$ 。

3.2.2 各组血清中 Fas、FasL 含量 关于 Fas,高血压病气虚血瘀证组与健康组比较,含量明显升高,差异具有统计学意义, $P < 0.01$;高血压病非气虚血瘀证组与健康组比较,含量显著升高,差异有统计学意义, $P < 0.01$;高血压病气虚血瘀证组与高血压病非气虚

血瘀证组比较,含量升高,但无统计学差异, $P > 0.05$ 。

关于 FasL,高血压病气虚血瘀证组与健康组比较,含量明显升高,差异具有统计学意义, $P < 0.01$;高血压病非气虚血瘀证组与健康组比较,含量显著升高,差异有统计学意义, $P < 0.01$;高血压病气虚血瘀证组与高血压病非气虚血瘀证组比较,含量明显升高,差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 。见表 2。

表 2 血清中 Fas、FasL 含量($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	Fas(pg/ml)	FasL(pg/ml)
高血压病气虚血瘀证组	3.6185 \pm 0.2094 **	2.2520 \pm 0.1112 ** $\Delta\Delta$
高血压病非气虚血瘀证组	3.4622 \pm 0.2997 **	1.4525 \pm 0.1907 **
健康组	1.9844 \pm 0.1631	0.7301 \pm 0.1705

注:与健康组相比,** $P < 0.01$;与高血压病非气虚血瘀证相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

4 讨论

经典的细胞凋亡途径有两条,分别为细胞外途径(或称细胞表面死亡受体途径)和细胞内途径(或称线粒体途径)^[11]。

研究表明:细胞凋亡是一系列高度调控的半胱氨酸蛋白酶 caspase 级联反应(cascade)事件的结果,caspase-3 被证实处于该级联反应的下游,是凋亡的关键执行者^[12]。

P53 蛋白具有确切的促进细胞凋亡的功能。通过 Bax/Bcl-2、Fas/Apo1、IGF-BP3 等蛋白,P53 可完成对细胞凋亡的调控作用。P53 可以上调 Bax 的表达水平,以及下调 Bcl-2 的表达,通过线粒体途径共同完成促进细胞凋亡作用。P53 还可通过死亡信号受体蛋白途径诱导凋亡,如 TNF 受体和 Fas 蛋白^[13]。

Fas/FasL 系统在细胞凋亡信号的转导过程中尤为重要。Fas 是 TNF 受体家族 I 型跨膜蛋白及 FasL 的受体,相对分子质量 45kD;FasL 是 TNF 家族 II 型跨膜蛋白,相对分子质量 40kD,Fas 与其配体 FasL 或 Fas 抗体结合可诱导 Fas 表达细胞发生凋亡,是细胞凋亡最主要的途径之一^[14]。

实验结果表明:与健康组相比,高血压病气虚血瘀证组、高血压病非气虚血瘀证组血清中的 Caspase-3、P53、Fas、FasL 表达量升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。另外,与高血压病非气虚血瘀证组相比,高血压病气虚血瘀证组 Caspase-3、P53、FasL 表达量升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与以往的关于上述蛋白在细胞凋亡的作用的研究结果一致^[15-17]。

本实验结果说明:高血压病气虚血瘀证患者存在细胞凋亡,其机制可能与 Caspase-3、P53、Fas、FasL 表达量升高有关。其中,与气虚血瘀证密切相关的蛋白主要为 Caspase-3、P53、FasL。具体的凋亡途径,初步判断与 Fas/FasL 途径有关,至于与其他受体及线粒体途径是否相关,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Stokes MB, Zviti R, Lin F, D'Agati VD. An unusual cause of hypertension with hematuria and proteinuria: Questions [J]. Pediatric nephrology (Berlin, Germany), 2016, 31(12): 2263-2264.
- [2] 何淑寅,符德玉,祖亮华. 高血压病中医证型与 B 型脑钠肽及卒中风险的相关性初探[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1): 281-284.
- [3] 胡文娟,赵凤达,张秉韬,等. 不同血瘀证亚型血小板活化及炎症反应改变的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(11): 931-934.
- [4] 李琼,冯来会,刘伯语. 高血压脑出血患者 TNF- α 表达与血肿周围组织细胞凋亡的关系[J]. 江苏医药, 2014, 40(14): 1665-1667.
- [5] 吴培,胡小勤. 气虚血瘀证与细胞凋亡相关性研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(2): 439-441.
- [6] 胡小勤,曾学文,王强,等. 高血压病气虚血瘀证患者血清诱导体外培养的人脐静脉血管内皮细胞凋亡的研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(5): 1279-1280.
- [7] Wang Y, Chen B, Longtine MS, Nelson DM. Punicalagin promotes autophagy to protect primary human syncytiotrophoblasts from apoptosis [J]. Reproduction (Cambridge, England), 2016, 151(2): 97-104.
- [8] 冯骁,田聆,黄倩. Caspase-3 基因表达调控研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(9): 936-942.
- [9] Chen YK, Huse SS, Lin LM. Expression of inhibitor of apoptosis family proteins in human oral squamous cell carcinogenesis [J]. Head & neck, 2011, 33(7): 985-998.
- [10] 朱庆均,肖丽,杨军,等. 基于 Fas/FasL 途径的金匱肾气丸对肾阳虚模型睾丸细胞凋亡的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(2): 272-276.
- [11] Huang F, Huang M, Zhang H, Zhang C, Zhang D, Zhou G. Changes in apoptotic factors and caspase activation pathways during the postmortem aging of beef muscle [J]. Food chemistry, 2016, 190: 110-114.
- [12] 刘晓翌,刘建军. Caspase 与细胞凋亡 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2004, 23(6): 742-745.
- [13] 封晓昆,王贻士,王安娜,等. p53 及其凋亡刺激蛋白对结肠癌细胞自噬和凋亡影响机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(10): 752-757.
- [14] 叶霖,皮慧,王友莲. 薏苡汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清和滑膜 Fas/FasL 系统的影响[J]. 山西医药杂志, 2017, 46(5): 503-506.
- [15] 李昀,张军航,安军,等. PLCE1 调控 p53 诱导食管癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(1): 82-86.
- [16] Guo X, Chi S, Cong X, Li H, Jiang Z, Cao R, Tian W. Baicalin protects sertoli cells from heat stress-induced apoptosis via activation of the Fas/FasL pathway and Hsp72 expression [J]. Reproductive toxicology (Elmsford, N. Y.), 2015, 57: 196-203.
- [17] 李亚,毛静,董玉琼,等. 补肺健脾方对慢性阻塞性肺疾病大鼠骨骼肌 Fas/FasL/Caspase-3 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1238-1241.

(收稿日期:2017-12-05)
(本文编辑:金冠羽)