

冠状动脉介入治疗对冠心病患者 Caspase-3,9 水平的影响 *

顾峥嵘¹ 刘俊明^{2△} 黄文军² 窦清惠² 谢伟² 高霞²

(1 石河子大学医学院 新疆 石河子 832000 ;

2 新疆生产建设兵团医院(石河子大学医学院第二附属医院) 新疆 乌鲁木齐 830002)

摘要 目的:通过对冠心病患者经皮冠状动脉介入治疗(PCI)前后血清 Caspase-3,9 水平变化的观察,探讨冠状动脉介入治疗对冠心病患者血清 Caspase-3,9 水平的影响。**方法:**冠状动脉介入组(PCI 组)30 例和单纯造影组(CAG 组)29 例,在术前 0.5h,术后 3h,术后 6h,术后 12h,术后 24h,术后 48h 分别测定血清 Caspase-3,9 水平。**结果:**CAG 组术前与术后的血清 Caspase-3,9 水平差异均无统计学意义。PCI 组术后 3h、6h 的 Caspase-3 水平较术前 0.5h 均有降低趋势,差异均有统计学意义($P<0.05$)。PCI 组术后 48h 的 Caspase-9 水平与术后 3h、6h 相比均有升高趋势,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**PCI 术后狭窄或闭塞的冠状动脉血管重新恢复血供,血清中 Caspase-3,9 水平在 PCI 术后先降低后又逐渐升高,提示再灌注后可出现细胞的凋亡程度加重,血清中 Caspase-3,9 的水平可作为心肌再灌注损伤后细胞凋亡程度的评估指标并可作为诊断临床症状不典型的再灌注损伤的一个指标。PCI 术可有效改善心肌血供,减少因术前缺血缺氧造成的细胞凋亡,但 PCI 术后再灌注损伤可进一步加重细胞凋亡。

关键词 经皮冠状动脉介入治疗 冠状动脉造影术 缺血-再灌注损伤 凋亡 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶

中图分类号 R541.4 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)08-1556-04

Influence of Percutaneous Coronary Intervention on Caspase-3,9 Levels of Coronary Heart Disease*

GU Zheng-rong¹, LIU Jun-ming^{2△}, HUANG Wen-jun², DOU Qing-hui², XIE Wei², GAO Xia²

(1 Shihezi University of Medicine, Shihezi 832000, China;

2 General Hospital Of Xinjiang Production And Construction Corps (The Second affiliated hospital of Shihezi University School of Medicine), Urumqi 830002, China)

ABSTRACT Objective: To observe influence of percutaneous coronary intervention (PCI) on Caspase-3,9 levels of the coronary heart disease. **Methods:** Thirty patients who underwent PCI, and thirty patients who underwent coronary angiography (CAG) were enrolled in this study. Serum Caspase-3,9 levels before 0.5h and 3h, 6h, 12h, 24h, 48h after PCI were assayed in all patients. **Results:** There were no significant differences in serum Caspase-3,9 levels between before and after CAG. Caspase-3 levels at 3h, 6h after PCI were lower than before 0.5h. Statistical differences were observed between them. After PCI, Caspase-9 level at 48h was higher than at 3h, 6h. The differences between them were statistical significance. **Conclusion:** Stenotic or obstructive coronary arteries were recanalization after PCI. Caspase-3,9 levels in serum decreased earlier after PCI, then they increased gradually. These means reperfusion aggravated apoptosis after PCI. Serum Caspase-3,9 may be a marker of evaluate apoptosis degree in myocardial reperfusion injury and diagnose untypical reperfusion injury in clinic. Blood supply of aeterna coronaria would be improved after PCI. Apoptosis of myocardial and hypoxia was decreased as well. But apoptosis might become graved because of reperfusion injury.

Key Words: Percutaneous coronary intervention; Coronary angiography; Ischemical reperfusion injury; Apoptosis; Caspase

Chinese Library Classification(CLC):R541.4 **Document code:**A

Article ID:1673-6273(2011)08-1556-04

前言

目前,PCI 已成为治疗冠心病的有效手段之一,它可使缺血的心肌得到有效的血液再灌注,减少心肌损伤,改善心脏功能,但通过临床研究及动物实验均发现再灌注后心肌会出现新的损伤,即缺血-再灌注损伤(Ischemical reperfusion injury, IRI)。有研究认为,凋亡是心肌缺血-再灌注细胞死亡的一种主要形

式^[1-4],而天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspase)是细胞凋亡过程中的重要因子,其中 Caspase-3,9 在线粒体依赖的细胞凋亡途径中起关键作用。本研究通过对 PCI 及 CAG 患者血清中 Caspase-3,9 水平的变化研究冠状动脉介入治疗对细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

* 基金项目 新疆生产建设兵团科学技术局兵团科技计划(2010GG51)

作者简介:顾峥嵘(1978-)女,硕士研究生,医师,研究方向:冠心病临床与基础研究。电话:18935910371, E-mail: yishi1003@sina.com。

△通讯作者:刘俊明,男,硕士生导师,主任医师,新疆生产建设兵团医院(石河子大学医学院第二附属医院)副院长,心内科主任,电话:13609937579 E-mail: LiuJunming59@163.com。

(收稿日期:2010-11-09 接受日期:2010-12-04)

1.1 研究对象及分组

选取选择 2009 年 12 月至 2010 年 8 月期间在新疆生产建设兵团医院心血管内科住院疑似或已诊断为冠心病的患者。经冠状动脉造影检查(CAG)诊断为冠心病并行 PCI 术者为 PCI 组 30 例,因胸闷、胸痛、心电图提示有心肌缺血而行冠状动脉造影(CAG)者为 CAG 组 29 例。所有患者排除肿瘤、自身免疫性疾病、心衰、神经元退行性疾病(阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、多发性硬化症等)、HIV 病毒感染等引起细胞凋亡的疾病及肝肾功能不全、严重贫血、电解质的失衡、活动性出血、未控制的高血压、洋地黄中毒、以前有造影剂过敏但事先未用糖皮质激素治疗、中风的活动期、肺水肿等不能行冠状动脉造影的患者。

1.2 CAG 及 PCI

根据冠状动脉造影(CAG)检查结果,冠状动脉血管的狭窄程度 $\geq 70\%$,同时行冠状动脉球囊扩张术和(或)支架植入术(二者统称 PCI)的患者纳入 PCI 组,狭窄程度 $<70\%$,单纯行冠状动脉造影手术的患者(包括冠状动脉正常、狭窄 $<50\%$ 的冠状动脉硬化(AS)及狭窄 $\geq 50\%$ 的冠状动脉病变患者)纳入 CAG 组。

1.3 标本的采集和处理

两组患者在术前 0.5h、术后 3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 共 6 个时间点用标准真空采血管分别抽取患者外周静脉血 4ml,迅速离心后分离血清, -70°C 保存待测。

1.4 Caspase-3,9 活性的检测

所有血清标本均使用 R&D Systems 生产的 Caspase-3,9 检测试剂盒,采用酶联免疫吸附(ELISA)法,并详细按说明书步骤进行检测。

1.5 统计学分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示,用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,组间比较用秩和检验,重复测量资料用一般线性模型,以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料

CAG 组 29 例,平均年龄 62.31 ± 10.04 岁,男女比例 20:9,其中 17 例合并高血压,8 例合并糖尿病。PCI 组 30 例,平均年龄 59.70 ± 8.36 岁,男女比例 24:6,其中 19 例合并高血压,5 例合并糖尿病。两组之间差异无统计学意义。

2.2 Caspase-3,9 水平测定

如表 1 所示,对 6 个时间点 CAG 组与 PCI 组的 Caspase-3,9 水平分别进行组间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。CAG 组中术前与术后各时间点的 Caspase-3,9 水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。PCI 组中术后 3 h、6 h 的 Caspase-3 水平较术前 0.5 h 均有降低趋势,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而 PCI 组的 Caspase-9 水平在术后虽有同样的降低趋势,但其差异无统计学意义($P > 0.05$),但术后 48 h 的 Caspase-9 水平与术后 3 h、6 h 相比均有升高趋势,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 血清 Caspase-3,9 的水平
Table 1 Serum Caspase-3,9 levels

Group	Caspase-3(ng/ml)	Caspase-9(ng/ml)
CAG group		
Preoperative 0.5h	36.27 $\pm$ 53.31	13.76 $\pm$ 23.60
Postoperative 3h	36.74 $\pm$ 52.83	17.84 $\pm$ 35.73
Postoperative 6h	37.27 $\pm$ 62.77	16.43 $\pm$ 37.26
Postoperative 12h	37.79 $\pm$ 64.01	20.11 $\pm$ 51.35
Postoperative 24h	38.72 $\pm$ 56.90	16.39 $\pm$ 30.69
Postoperative 48h	44.63 $\pm$ 63.11	21.07 $\pm$ 51.19
PCI group		
Preoperative 0.5h	56.82 $\pm$ 91.30	23.92 $\pm$ 48.64
Postoperative 3h	51.48 $\pm$ 90.70	19.90 $\pm$ 42.34
Postoperative 6h	51.65 $\pm$ 84.55	22.64 $\pm$ 50.34
Postoperative 12h	63.67 $\pm$ 95.91	31.95 $\pm$ 69.89
Postoperative 24h	65.16 $\pm$ 105.94	31.73 $\pm$ 66.60
Postoperative 48h	49.11 $\pm$ 70.90	24.54 $\pm$ 49.09

2.3 冠状动脉病变与 Caspase-3,9 的关系

CAG 组中所有患者均为择期手术,其中 16 人冠脉正常,13 人为冠状动脉病变组($50\% \leq$ 冠状动脉狭窄程度 $<70\%$)。PCI 组均为冠状动脉病变患者,其中 18 人为心绞痛患者($70\% \leq$ 冠状动脉狭窄程度 $<$ 完全闭塞),12 人为急性心肌梗死患者

(冠状动脉完全闭塞)。如表 2 所示,CAG 组中冠状动脉正常、冠状动脉病变两个亚组在术前及术后 6 个时间点之间的 Caspase-3,9 水平差异均无统计学意义($P > 0.05$),PCI 组的两个亚组中, $70\% \leq$ 冠状动脉狭窄程度 $<$ 完全闭塞亚组在术前及术后 6 个时间点之间的 Caspase-3,9 水平差异均无统计学意义

($P>0.05$)，冠状动脉完全闭塞亚组术后 6 h 比术前 0.5 h 的 术后 6 h 的 Caspase-9 水平升高，差异有统计学意义($P<0.05$)。Caspase-3 水平降低，差异有统计学意义($P<0.05$)，术后 48 h 比

表 2 冠状动脉病变与 Caspase-3,9 的关系
Table 2 Relationship of coronary artery process and Caspase-3,9 levels

Factors	CAG group(n=29)		PCI group(n=30)	
	Normal (n=16)	50%≤ D<70%(n=13)	70%≤ D<obstruction (n=18)	D= obstruction (n=12)
Caspase-3(ng/ml)				
Preoperative 0.5h	44.90±67.32	25.65±27.26	55.13±93.37	59.35±92.14
Postoperative 3h	43.88±66.87	27.96±27.77	51.65±86.75	51.23±100.29
Postoperative 6h	49.70±81.40	21.96±21.27	53.48±90.64	48.91±78.33
Postoperative 12h	49.77±83.47	23.05±20.66	53.33±78.62	79.18±119.41
Postoperative 24h	44.13±66.88	32.06±43.31	50.02±85.88	87.86±131.36
Postoperative 48h	53.15±79.47	34.16±34.04	42.18±54.00	59.51±92.47
Caspase-9(ng/ml)				
Preoperative 0.5h	16.16±29.87	10.81±12.93	27.60±60.60	18.39±22.45
Postoperative 3h	22.46±47.20	12.16±11.45	22.59±52.20	15.86±22.03
Postoperative 6h	22.33±49.17	9.162±10.67	27.02±63.66	16.08±18.40
Postoperative 12h	27.26±68.26	11.31±13.29	26.27±64.72	40.48± 79.19
Postoperative 24h	19.32±39.01	12.78±16.40	26.41±64.48	39.69±71.78
Postoperative 48h	27.41±67.91	13.25±15.20	27.10±61.35	20.71±22.58

Note: D=diameter stenosis of coronary artery

3 讨论

目前 PCI 术的广泛开展使冠心病病人缺血的心肌得到有效再灌注，但大量的动物实验及临床观察均显示，再灌注使缺血心肌细胞得到良好修复的同时进一步加重了单纯心肌缺血造成的损伤，出现再灌注后缺血心肌的舒缩功能降低、心律失常、心肌顿抑、心肌能量代谢障碍、超微结构的变化等现象。临床上 PCI 术后部分患者也出现了严重的血流动力学改变，如血压骤降、心律失常、心功能不全甚至发生猝死等，人们将其原因归咎于 IRI。IRI 的发生机制复杂，且与心肌细胞凋亡关系密切，主要通过能量代谢障碍、氧应激和钙超载等导致细胞凋亡。有学者认为，凋亡是心肌缺血 - 再灌注细胞死亡的一种主要形式^[4]，故细胞凋亡的研究对临床上心肌 IRI 的防治有着重要意义。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(称为 Caspase)家族是凋亡过程中的关键元件，其激活与超表达可通过与众多蛋白因子的相互作用调控细胞凋亡^[5]。从 1972 年 Caspase 被 Kerr JF 等^[6]发现至今在哺乳动物中已有 14 种，目前研究发现，Caspase 可通过三条途径介导细胞凋亡：线粒体依赖途径、FasL 和 TNF 等死亡受体介导的 Caspase 激活途径、内质网应激途径。其中在线粒体依赖的细胞凋亡途径中，当各种凋亡诱导因素作用于线粒体，使其跨膜电位发生改变，膜通透性增大，继而启动细胞凋亡因子如细胞色素 C(cytochrome c, Cyt. C)、凋亡蛋白酶激活因子 (apoptotic protease activating factor, Apaf) 和凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 等从线粒体内释放出来。Cyt. C 与

Apaf 相互作用可激活 Caspase-9，进一步激活下游的 Caspase-3，而 AIF 可快速激活核酸内切酶，并增强 Caspase-3 的水解活性，从而引发 caspase 的级联反应，最终导致细胞凋亡。缺血 - 再灌注时细胞凋亡的级联反应始于线粒体损伤和 Caspase-9 的激活（主要在内皮细胞）或死亡受体与配体结合和 Caspase-8 的激活（仅在心肌细胞，且在再灌注中增加）。有文献报道^[7]再灌注时不仅心肌细胞受损，也伴有冠状动脉内皮细胞的形态、结构、功能的严重受损，且再灌注时内皮细胞功能异常的时间早于实质细胞，内皮功能受损可破坏血液 - 组织间的物质交换屏障，引起一系列的炎症及免疫反应，进一步加重实质细胞损伤。故同时干预冠状动脉内皮细胞及心肌细胞的凋亡能更有效地防止 IRI。目前国内外学者通过动物模型及临床观察研究探讨 IRI 及细胞凋亡的机制已取得了可喜的成果，这对从多途径干预细胞的凋亡防治 IRI 提供了大量的宝贵资料，但目前文献中对于凋亡细胞及相关因子的检测多为直接获取实质细胞进行检测，此方法在临床观察中有一定的局限性。有国外学者 Stefan Blankenberg^[8]用酶联免疫吸附 (ELISA) 法进行了血浆 Caspase-1 与心血管危险因素的相关性研究，这为临床上对于细胞凋亡的研究提供了新的思路。也有文献报道通过动物模型观察细胞质及血清中 AIF 及 Caspase-9 的变化，从而探讨 IRI 后线粒体凋亡途径的机制^[9]，但临床上尚未见对血清中 Caspase-3,9 变化的报道。

在本研究中，对术前 CAG 组与 PCI 组的 Caspase-3,9 水平分别进行组间比较虽无统计学意义，但 PCI 组术前 Caspase-3,9

的水平均比 CAG 组高,考虑可能由于 PCI 组患者冠状动脉的病变程度普遍比 CAG 组重,故造成缺氧诱导细胞凋亡的程度较重的缘故。CAG 组术后与术前 Caspase-3,9 水平比较无统计学意义,PCI 组中术后 3h、6h 的 Caspase-3 水平较术前 0.5h 均有降低趋势,差异均有统计学意义,提示 PCI 术后使缺血的心肌血供得到改善,从而使缺血缺氧造成的细胞损伤在术后短时间内得到修复,故细胞凋亡程度较术前减轻。PCI 组术后 48h 的 Caspase-9 水平与术后 3h、6h 相比均有升高趋势,差异均有统计学意义,提示 PCI 术后部分患者在心肌细胞得到重新修复的同时又加速了那些不可挽救的心肌细胞发生凋亡。对 CAG 组及 PCI 组患者分层比较的结果显示,冠状动脉完全闭塞亚组的患者在 PCI 术后短时间内出现 Caspase-3 水平的降低,术后 6h 与术前 0.5h 相比有统计学意义,术后 48h 比术后 6h 的 Caspase-9 水平有升高趋势,差别有统计学意义,CAG 组两个亚组(冠状动脉正常、50%≤冠状动脉狭窄程度<70%)及 PCI 组中另一亚组(70%≤冠状动脉狭窄程度<完全闭塞)术前及术后的 Caspase-3,9 水平差异无统计学意义。上述结果进一步证实了冠状动脉完全闭塞的患者在 PCI 术后容易发生缺血再灌注损伤,由于冠状动脉完全闭塞造成缺血缺氧,使 Caspase 的表达活性升高,PCI 术使得缺血缺氧的心肌发生再灌注,故术后由于血供的恢复使部分损伤的细胞得以及时修复,Caspase 的活性较术前降低,随后由于再灌注损伤使 Caspase 的活性逐渐升高。其细胞凋亡的变化特征与曹亚南^[4]等模拟小鼠缺血-再灌注诱导心肌细胞凋亡模型的研究结果一致,但本研究由于病例数较少的缘故,对于冠状动脉不同病变程度与 Caspase-3,9 的关系目前难以得出确切的结论。

综上所述,PCI 术在有效改善冠心病缺血心肌的血液再灌注,保护心脏功能方面起着重要作用,但术后由于血液再灌注可能出现细胞凋亡程度的进一步加重,本研究通过对 PCI 术前不同时间点 Caspase-3,9 水平的观察可对心肌再灌注损伤引起细胞凋亡程度进行评估,并有助于临床症状不典型的再灌注损伤的诊断,从而为干预细胞凋亡,减少 IRI,保护心脏功能提供一定的参考数据。

参考文献(References)

[1] Kovacevic M, Simic O, Jonjic N, et al. Apoptosis and cardiopulmona-

ry bypass[J]. J Card Surg, 2007, 22(2):129-134

- [2] Kaga S, Zhan L, Altaf E, et al. Glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and surviving expression in rat ischemic preconditioned myocardium [J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2006, 40(1):138-147
- [3] Daosukho C, Ittarat W, Lin SM, et al. Induction of manganese superoxide dismutase mediates cardioprotective effect of tamoxifen [J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2005, 39 (5): 792-803
- [4] 曹亚南, 刘安恒, 张卫卫, 等. 模拟缺血/再灌注诱导小鼠心肌细胞凋亡模型的构建及其生化特征[J]. 心脏杂志, 2008, 20(3):259-263
CAO Ya-nan, LIU An-heng, ZHANG Wei-wei, et al. Establishment and biochemical characters of mouse cardiomyocytes apoptosis induced by simulated ischemia/reperfusion[J]. Chinese Heart Journal, 2008, 20(3):259-263
- [5] Park SM, Peter ME. MicroRNAs and death receptors [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2008, 19(3-4):303-311
- [6] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(4):239-257
- [7] 刘全, 程莉, 杨洋. 冠状动脉内皮细胞在缺血再灌注损伤时的变化和曲美他嗪的保护作用[J]. 中华老年医学杂志, 2006, 25(1):71-73
LIU Quan, CHENG Li, YANG Yang. Changes of coronary artery endotheliocyte in ischemical reperfusion injury and protective actions of Trimetazidine[J]. Chinese Journal of Geriatrics, 2006, 25(1):71-73
- [8] Blankenberg S, Godefroy T, Poirier O, et al. Haplotypes of the caspase-1 gene, plasma caspase-1 levels, and cardiovascular risk [J]. Circ Res, 2006 Jul 7, 99(1):102-108
- [9] 程斌, 王鑫, 等. 兔脊髓缺血再灌注损伤后线粒体凋亡途径的变化及灯盏细辛预处理的干预作用 [J]. 中西医结合学报, 2009, 7(9): 842-847
CHENG Bin, WANG Xin, et al. Changes of mitochondrial apoptosis in spinal cord ischemia-reperfusion injury and the effects of Herba Erigerontis Breviscapis Injection preconditioning intervention in rabbits [J]. Journal of Chinese Integrative Medicine, 2009, 7(9):842-847

(上接第 1548 页)

- [19] 陈上云, 郭坚, 劳干诚, 等. 甲亢性心脏病伴其他器质性心脏病的诊断探讨[J]. 中国实用内科杂志, 2003, 23 (10) :599-600
Chen SY, Guo J, Lao GC, et al. The diagnosis of hyperthyroid heart disease with other organic heart disease [J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2003, 23 (10) :599-600

- [20] 胡新荣, 侯新风, 刘东亮. 甲状腺机能亢进性心脏病误诊 16 例分析[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2007, 10(11) : 1 332- 1 333
Hu XR, Hou XF, Liu DL. The misdiagnosis of hyperthyroid heart disease in 16 cases [J]. Chinese Journal of Coal Industry Medicine, 2007, 10(11) : 1 332- 1333