

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.011

冠脉不同程度狭窄猪血浆骨保护素变化的影响研究*

张超¹ 罗惠兰¹ 魏璇^{1△} 杨强² 苏丹³ 徐美林⁴

(1 空军总医院干部病房 北京 100142; 2 空军 95261 部队 广西 柳州 545112;

3 安徽医科大学 安徽 合肥 230032; 4 延庆县人民医院 北京 102100)

摘要 目的:冠心病的发病率越来越高,成为临床上常见的心血管疾病。冠心病的发生、发展与冠状动脉病变程度直接相关。通过手术引起冠脉狭窄,探讨冠脉狭窄与骨保护素(OPG)的相关性,从而为临床冠心病的预测提供理论依据。**方法:**(1) 20 头巴马小型猪,在胸腔镜直视下手术丝线永久性结扎左前降支近端建立轻度(狭窄程度 20-49%)、中度(狭窄程度 50-69%)和重度(狭窄程度 $\geq 70\%$)狭窄的冠状动脉狭窄模型;(2) 各组小型猪分别在其手术处理前后 1 min 留取静脉血和分离血浆,测定骨保护素的含量。**结果:**(1)手术对各组小型猪血浆 OPG 的影响差异无统计学意义($P>0.05$),同时,各组之间冠脉狭窄模型猪手术后血浆 OPG 的浓度较对照组升高,但无统计学差异($P>0.05$)。**结论:**(1)手术作为一种应激性损伤,导致 OPG 升高。(2) 骨保护素与冠状动脉硬化和血管钙化有关,但与没有动脉硬化和钙化引起的冠脉狭窄无关。

关键词:猪;冠状动脉;狭窄程度;骨保护素

中图分类号:R541.4 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)21-4044-03

Study on Changes of Plasma Osteoprotegerin levels in Swines with Different Coronary Artery Stenosis*

ZHANG Chao¹, LUO Hui-lan¹, WEI Xuan^{1△}, YANG Qiang², SU Dan³, XU Mei-lin⁴

(1 Department of Cardiology, General Hospital of Air Force, PLA, Beijing, 100142, China; 2 Air Force 95261 troops, Liuzhou, Guangxi, 545112, China; 3 Anhui Medical University, Hefei, Anhui, 230032, China; 4 Hospital of Yan qing county, Beijing, 102100, China)

ABSTRACT Objective: The incidence of coronary heart disease is increasing, it is a common clinical cardiovascular disease. The incidence and development of coronary heart disease is directly related to severity of coronary lesions. Coronary artery stenosis caused by surgery to explore the relevance of coronary artery stenosis with OPG, to provide a theoretical basis for the prediction of clinical coronary heart disease. **Methods:** (1) Of 20 Bama miniature swines, the proximal left anterior descending branch (LAD) was ligated permanently by using silk suture under direct vision of the thoracoscope to establish different coronary artery stenosis models--the mild, the moderate and the severe--with stenosis degree of the LAD 20-49%, 50-69%, $\geq 70\%$ respectively. (2) 1 minute before and after the surgery in each group, venous blood was collected. Then, plasma were separated and OPG were measured. **Results:** The effects of the surgery on plasma OPG content were no significant ($P>0.05$). Meanwhile, compared with the normal control group after the surgery, plasma osteoprotegerin levels in surgery groups were raised, but no significant ($P>0.05$). **Conclusions:** (1) Surgery as a stress injury cause OPG increased; (2) OPG is relate with coronary atherosclerosis and vascular calcification, but OPG is unrelated with no arteriosclerosis and calcification of coronary stenosis.

Key words: Swine; Coronary artery; Degree of stenosis; Osteoprotegerin

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

Article ID: 1673-6273(2014)21-4044-03

前言

骨保护素(osteoprotegerin, OPG)是肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族成员之一,又称破骨细胞形成抑制因子,是重要的血管调节因子,能够保护血管内皮细胞,抑制血管钙化和动脉粥样硬化^[1]。冠心病的发病率越来越高,是非常常见的心血管疾病,而冠心病的发生、发展与冠状动脉病变程度直接相关,目前国内外已经开始研究骨保护素与冠心病的相关关系。研究显示结果,血清 OPG 浓度与动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)和血

管钙化有关,可作为心血管病的一个独立预测因子^[2]。骨保护素通过提高内皮细胞存活而防止炎症细胞因子的血管损害作用,从而影响血管钙化与粥样硬化。新近研究发现其在 AS 和血管钙化方面发挥重要作用,从而影响冠心病的发生、发展和预后。我们通过胸腔镜建立巴马小型猪不同冠脉狭窄程度模型,从而探讨骨保护素与急性冠脉狭窄是否有关,为临床预测疾病提供理论依据。因此,评价骨保护素的作用及其影响因素有助于识别发生冠心病高危病人及危重症患者病情严重程度。

* 基金项目:全军“十二五”重点课题:飞行员冠状动脉粥样硬化综合防治体系及飞行适应性评价研究(BWS11J054)

作者简介:张超(1986-),男,硕士研究生,主要研究方向:心血管, E-mail: zhangchaox123@126.com

△ 通讯作者:魏璇, E-mail: weixuangbbf@com

(收稿日期:2013-04-25 接受日期:2013-05-22)

1 材料与方法

1.1 实验动物

封闭群巴马小型猪 25 头,雄性,买自黑龙江省双鸭山市实创科技小型猪养殖场,饲养于中国医学科学院阜外心血管病医院动物中心普通级饲养室[许可证号:SYXK(京)2008-0016],体质量 20-25 Kg,月龄 10-12 月,进行随机分组,分为实验组和对照组。

1.2 动物模型的建立

1.2.1 经胸腔镜猪冠状动脉狭窄模型的建立 20 头巴马小型猪,在胸腔镜直视下手术丝线永久性结扎左前降支近端建立轻度(狭窄程度 20-49%)、中度(狭窄程度 50-69%)和重度(狭窄程度 $\geq 70\%$)狭窄的冠状动脉狭窄模型。其中,轻度狭窄组 7 头,中度狭窄组 6 头,重度狭窄组 7 头(2 头于术后死亡),另有 5 头作为正常对照组。

1.2.2 血清骨保护素检测 猪 OPG 试剂盒由上海西唐生物科

技有限公司提供并检测。本实验采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法对血浆 OPG 的含量进行检测,按试剂盒说明书操作。酶标仪型号: DENLEY DRAGON Wellscan MK 3。

1.3 统计学分析

所有结果均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。每组小型猪在手术前后数据间的比较采用独立样本 t 检验;各组之间的组间比较则采用单因素方差分析。所用统计软件为 spss17.0, $P < 0.05$ 有统计学差异, $P < 0.01$ 有显著性统计学差异。

2 结果

2.1 手术对不同冠脉狭窄小型猪血浆 OPG 的影响(见表 1)

(1) 各组内冠脉狭窄模型猪手术后血浆 OPG 的浓度较手术前升高,但无统计学差异($P > 0.05$),各组之间冠脉狭窄模型猪手术后血浆 OPG 的浓度较对照组升高,但无统计学差异($P > 0.05$)。

表 1 手术前后血浆 OPG 含量的变化(单位:ng/l)
Table 1 Changes of OPG levels in plasma after surgery (Measure:ng/l)

狭窄程度 Degree of stenosis	N	手术前 Before surgery	手术后 After surgery	t 值	P 值
正常 Normal	5	1176.81 $\pm$ 84.08	1176.81 $\pm$ 84.08		
轻度狭窄 Mild stenosis	7	1167.95 $\pm$ 65.56	1219.56 $\pm$ 57.86	-1.561	0.144
中度狭窄 Moderate stenosis	6	1178.89 $\pm$ 54.60	1232.05 $\pm$ 54.25	-1.692	0.0122
重度狭窄 Severes stenosis	5	1163.39 $\pm$ 83.81	1270.91 $\pm$ 92.74	-1.923	0.091
F value		0.058	1.472		
P value		0.981	0.254		

3 讨论

OPG 是一种可溶性糖蛋白,由 Simonet 在 1997 年发现。骨保护素具有抑制破骨细胞的作用,被称为破骨细胞抑制因子。骨保护素可由心脏、肺、肾和骨等多种器官组织生成,主要包括破骨细胞、冠状动脉平滑肌细胞和内皮细胞。骨保护素表达受多种因素影响,细胞因子、前列腺素、甲状腺激素、血小板源性生成因子、 Ca^{2+} 等都会影响骨保护素的表达^[9]。研究证实骨保护素可以在内皮细胞、冠状动脉平滑肌细胞中表达和释放,IL-1 和 TNF- α 可刺激平滑肌细胞和内皮促进骨保护素的表达,血管紧张素 II (Ang- II)、转移生长因子、成纤维生长因子(bFGF)、血小板源性生长因子(PDGF)可促进骨保护素的表达^[4-8]。

OPG 是血管内皮细胞的一种抗凋亡信号,通过抑制血管钙化和动脉粥样硬化,产生血管保护作用。研究证实,OPG 基因敲除小鼠在成熟前除了出现严重骨质疏松外,还有主动脉和肾动脉钙化,用重组 OPG 治疗可预防、逆转骨质疏松和血管钙化^[9]。Jono 等^[10]证实 OPG 可抑制异位钙化,可能对动脉粥样硬化钙化有调节作用。Min 等^[11]发现 OPG 基因缺陷小鼠除表现

骨质疏松外,还出现血管钙化。Orita 等^[12]研究发现高磷酸盐饮食和过量 1α -25 羟维生素 D3 可加重血管内皮钙化,给与骨保护素治疗后钙化明显减轻。通过上述几个研究可以得出 OPG 与血管钙化密切相关。某项研究发现,血清骨保护素水平对于左室功能减低、冠心病、动脉粥样硬化、血管钙化作为一个独立危险因素^[13,14]。Sandberg 等^[15]研究发现对 40 例不稳定型心绞痛(USAP)和 40 例稳定型心绞痛(SAP)患者进行血液检测,不稳定型心绞痛患者血清骨保护素含量增高明显,而稳定型心绞痛(SAP)患者血清骨保护素含量升高不明显。

本实验研究结果: 各组内冠脉狭窄模型猪手术后血浆 OPG 的浓度较手术前升高,但无统计学差异,各组之间冠脉狭窄模型猪手术后血浆 OPG 的浓度较对照组升高,但无统计学差异。考虑与手术为应激损伤引起骨保护素的升高,认为骨保护素与急性冠脉狭窄无关。Jono 等^[10]证实 OPG 可抑制异位钙化,可能对动脉粥样硬化钙化有调节作用。Dallas 等^[17]研究表明骨保护素与冠状动脉粥样硬化和血管钙化相关。骨保护素不但与冠心病发生密切,而且与冠心病的病变严重程度关系密切^[18]。Crisafulli 等^[19]对 522 例急性心肌梗死患者血清中的 OPG 水平

进行检测发现,OPG 水平与冠状动脉疾病严重程度呈正相关。Sandberg 等^[20]通过对 100 例胸痛患者血浆 OPG 分析,发现不稳定性心绞痛患者与稳定性心绞痛患者及正常对照组相比,血清 OPG 水平明显升高,提示 OPG 与斑块稳定性存在一定关系。Zannettino^[21]和 Shuichi^[22]等对 201 例行冠脉造影术患者检测血清中骨保护素,结果发现 OPG 水平随着冠心病的严重程度增加而增加,通过回归分析统计血清中 OPG 水平与冠心病病变程度显著相关。

综上所述,骨保护素与冠状动脉硬化和血管钙化有关,而与没有动脉硬化和钙化引起的冠脉狭窄无关,即通过手术直接造成的冠状动脉狭窄无关。今后为我们以后在建立冠状动脉狭窄的动物模型上提供了理论参考。

参考文献 (References)

- [1] Xu Mei-lin, Zhang Xiao-yan, ZHANG Chao, et al. Relationship between serum osteoprotegerin levels and severity of coronary artery lesion in patients with coronary heart diseases [J]. Chin Clinicians (Electronic Edition), 2012, 6(13): 45-48
- [2] Mesquita M, Demulder A, Damry N, et al. Plasma osteoprotegerin is an independent risk factor for mortality and an early biomarker of coronary vascular calcification in chronic kidney disease [J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(3): 339-346
- [3] Zauli G, Corallini F, Bossi F, et al. Osteoprotegerin increases leukocyte adhesion to endothelial cells both in vitro and in vivo [J]. Blood, 2007, 110: 536-543
- [4] Secchiero P, Corallini F, Pandolfi A, et al. An increased osteoprotegerin serum release characterizes the early onset of diabetes mellitus and contribute to endothelial cell dysfunction [J]. Am J Pathol, 2006, 169(11): 2236
- [5] Secchiero P, Coralina D, Rimondi E, et al. Activation of the P53 pathway down-regulates the osteoprotegerin expression and release by vascular endothelial cells [J]. Blood, 2008, 111 (6): 1287
- [6] Vik A, Mathiesen EB, Noto AT, et al. Serum osteoprotegerin is inversely associated with carotid plaque echogenicity in humans [J]. Atherosclerosis, 2007, 191(1): 128
- [7] Ben-Tal Cohen E, Hohensinner PJ, Kaun C, et al. Statins decrease TNF-alpha-induced osteoprotegerin production by endothelial cells and smooth muscle cells in vitro [J]. Biochem Pharmacol, 2007, 73 (1): 77
- [8] Guldiken B, Guldiken S, Turgut N, et al. Serum osteoprotegerin levels in patients with acute atherothrombotic stroke and lacunar infarct [J]. Thromb Res, 2007, 120(3): 511
- [9] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin deficient mice develop early on-set osteoporosis and arterial calcification [J]. Genes Dev, 1998, 12 (9): 1260-1268
- [10] Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification [J]. Biol Chem, 2000, 275 (26): 20197-20203
- [11] Min H, Morony S, Sarosi I, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis [J]. J Exp Med, 2000, 192: 463-474
- [12] Orita Y, Yamamoto H, Kohno N, et al. Role of osteoprotegerin in arterial calcification: development of new animal model [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27: 2058-2064
- [13] Kiechl S, Schett G, Wenning G, et al. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease [J]. Circulation, 2004, 109: 2175-2180
- [14] Omland T, Drazner MH, Ueland T, et al. Plasma osteoprotegerin levels in the general population: relation to indices of left ventricular structure and function [J]. Hypertension, 2007, 49: 1392-1398
- [15] Sandberg WJ, Yndestad A, Oie E, et al. Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(4): 857-863
- [16] Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification [J]. Biol Chem, 2000, 275 (26): 20197-20203
- [17] Abedin M, Omland T, Ueland T, et al. Relation of osteoprotegerin to coronary calcium and aortic plaque (from the Dallas heart study) [J]. Am J Cardiol, 2007, 99: 513-518
- [18] Anand DV, Lahiri A, Lim E, et al. The relationship between plasma osteoprotegerin levels and coronary artery calcification in uncomplicated type 2 diabetic subjects [J]. J Am Coll Cardiol. 2006, 47(9): 1850-1857
- [19] Crisafulli A, Micari A, Altavilla D, et al. Serum levels of osteoprotegerin and RANKL in patients with ST elevation acute myocardial infarction [J]. Clin Sci (Lond), 2005, 109(4): 389-395
- [20] Sandberg WJ, Yndestad A, Oie E, et al. Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26: 857-863
- [21] Zannettino AC, Holding CA, Diamond P, et al. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor [J]. J Cell Physiol, 2005, 204: 714-723
- [22] Shuichi J, Yuji I, Atsushi S, et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease [J]. Circulation, 2002, 106(10): 1192-1194