

TRPA1 在冠心病患者外周血单核细胞中的表达及其与冠状动脉病变程度的相关性研究*

杨震¹ 谢洪祥¹ 吴奇¹ 李璐¹ 代燕¹ 邓仕华² 韩蓉² 周鹏¹

【摘要】 目的:通过检测瞬时受体电位离子通道 A1(Transient receptor potential channel A1,TRPA1)蛋白及 mRNA 在冠心病患者外周血单核细胞中的表达,分析 TRPA1 mRNA 转录水平与 Gensini 积分的相关性。**方法:**根据冠状动脉(冠脉)造影结果将入院患者分为冠心病组(39 例)和非冠心病组(36 例),分离提取鉴定患者外周血单核细胞,通过 Western blotting、RT-PCR 分别检测两组患者单核细胞 TRPA1 的蛋白及 mRNA 表达水平。根据患者是否合并高血压、糖尿病,将冠心病患者分为高血压组与非高血压组、糖尿病组与非糖尿病组,分别比较两组间 TRPA1 mRNA 转录水平。分析冠心病患者单核细胞 TRPA1 mRNA 转录水平与冠脉病变 Gensini 积分的相关性。**结果:**①成功分离提取患者外周血单核细胞,经流式细胞术鉴定,单核细胞纯度在 86.1%。②Western Blot 显示,冠心病组患者单核细胞 TRPA1 蛋白表达水平高于非冠心病组(1.524 ± 0.426 vs 0.590 ± 0.275 , $P < 0.01$)。③RT-PCR 显示,冠心病组 TRPA1 mRNA 转录水平高于非冠心病组(9.121 ± 1.828 vs 3.923 ± 2.535 , $P < 0.01$),高血压组 TRPA1 mRNA 转录水平高于非高血压组(9.812 ± 1.180 vs 8.740 ± 1.586 , $P < 0.05$),糖尿病组 TRPA1 mRNA 转录水平高于非糖尿病组(9.685 ± 0.932 vs 8.982 ± 0.756 , $P < 0.05$)。④冠心病患者 TRPA1 mRNA 转录水平与 Gensini 积分呈正相关($r = 0.964$, $P < 0.01$)。**结论:**冠心病患者单核细胞 TRPA1 表达水平增高,TRPA1 mRNA 转录水平可作为评价冠脉病变程度的新指标。

【关键词】 冠状动脉粥样硬化;TRPA1;单核细胞;冠脉狭窄;Gensini 积分

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2018.11.009

[中图分类号] R541.4 [文献标志码] A

The expression of TRPA1 in peripheral blood monocytes in patients with coronary heart disease and the relationship associated with the severity of coronary artery stenosis

YANG Zhen¹ XIE Hongxiang¹ WU Qi¹ LI Lu¹ DAI Yan¹
DENG Shihua² HAN Rong² ZHOU Peng¹

(¹Department of Cardiovascular,²Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu, 610500, China)

Corresponding author: ZHOU Peng, E-mail: ap216g@163.com

Abstract Objective: To analyze the correlation between Transient receptor potential channel A1 (TRPA1) mRNA transcription level and Gensini score by detecting the expression of TRPA1 protein and mRNA in peripheral blood monocytes in patients with coronary heart disease (CHD). **Method:** According to the results of coronary angiography, the admission patients were divided into CHD group ($n = 39$) and non-CHD group ($n = 36$). Peripheral blood monocytes were isolated and identified, and the expression levels of TRPA1 in monocytes were detected by Western blotting and RT-PCR respectively. According to whether combined with hypertension and diabetes, the CHD patients were divided into hypertension group and non-hypertension group, diabetes group and non-diabetic group, and the TRPA1 mRNA transcriptional levels between the two groups was compared respectively. The correlation between the transcription of TRPA1 mRNA in monocytes and the Gensini score in coronary lesions was analyzed. **Result:** ① Peripheral blood monocytes were successfully isolated and extracted. The purity of monocytes was 86.1% after flow cytometry. ② Western Blotting showed that the expression of TRPA1 protein in monocytes in CHD group was higher than that in non-CHD group (1.524 ± 0.426 vs. 0.590 ± 0.275 , $P < 0.01$). ③ RT-PCR showed that the transcription level of TRPA1 mRNA in CHD group was higher than that in non-CHD group (9.121 ± 1.828 vs. 3.923 ± 2.535 , $P < 0.01$), and TRPA1 mRNA in hypertension group was higher than that in non-hypertension group (9.812 ± 1.180 vs 8.740 ± 1.586 , $P < 0.05$), the transcription level of TRPA1 mRNA in diabetic group was higher than that in non-diabetic group (9.685 ± 0.932 vs. 8.982 ± 0.756 , $P < 0.05$). ④ There was a positive correlation between TRPA1 mRNA transcription level and Gensini score in patients with CHD ($r =$

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81641058);北京力生心血管健康基金会领航基金(No:LHJJ20157620)

¹成都医学院第一附属医院心内科(成都,610500)

²成都医学院第一附属医院检验科

通信作者:周鹏, E-mail: ap216g@163.com

0.964, $P < 0.01$). **Conclusion:** The expression level of TRPA1 in monocytes is increased in patients with CHD, and the level of TRPA1 mRNA transcription can be used as a new indicator to evaluate the severity of coronary artery stenosis.

Key words coronary atherosclerosis; TRPA1; monocytes; coronary artery stenosis; Gensini score

冠心病是一类严重威胁人类健康的心血管病, 据统计, 我国目前有冠心病患者约 1 100 万, 15 岁以上人群冠心病患病率为 10.2%, 60 岁以上人群患病率为 27.8%, 2015 年我国城市居民冠心病病死率为 110.67/10 万, 农村居民冠心病病死率为 110.91/10 万^[1]。随着血运重建治疗的推广与发展, 冠心病病死率仍居高不下。而抗血小板药物、调脂药物等均不能逆转粥样病变。既往研究证实 TRPA1 是氧化应激的感受器, 在炎症反应始动环节起重要作用, 且与 TRPV1 共表达, 阻止粥样斑块的形成。单核细胞作为伴随氧化应激、炎症反应的粥样硬化过程重要的靶细胞, TRPA1 是否在单核细胞中表达参与粥样硬化值得进一步研究^[2]。本研究通过检测冠心病患者单核细胞 TRPA1 在蛋白及转录水平的差异, 分析 TRPA1 mRNA 转录水平与 Gensini 积分的相关性, 旨在为粥样硬化的防治研究提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 对象

前瞻性纳入成都医学院第一附属医院心血管内科 2016-11—2017-05 拟诊冠心病患者, 在征得患者同意后, 根据冠状动脉(冠脉)造影结果将其分为冠心病组(39 例)和非冠心病组(36 例)。冠心病诊断标准: 冠脉造影提示至少有 1 支主要血管管腔直径狭窄 $\geq 50\%$ 。排除标准: 既往行经皮冠脉介入术(PCI)或者冠脉旁路移植术(CABG); 合并有心肌炎、严重先天性心脏病及心瓣膜病; 肝炎; 合并感染、免疫性疾病或恶性肿瘤。

冠心病组和非冠心病组患者性别、年龄、吸烟、高血压、糖尿病、BMI、尿酸、血肌酐、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、总胆固醇(TC)等基线资料无统计学差异。详见表 1。

根据是否合并有糖尿病, 将冠心病患者分为糖尿病组与非糖尿病组; 根据是否合并有高血压, 将冠心病患者分为高血压组与非高血压组。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器与试剂 台式低速离心机(德国, Sigma 公司), 超净工作平台(中国, 苏州净化设备有限公司), CO₂ 培养箱(美国, Bio-Rad 公司), 流式细胞仪(美国, Becton Dickinson 公司), 紫外分光光度仪(美国, Beckman 公司), 凝胶图像分析系统(美国, Bio-Rad 公司), PCR 仪(美国, Bio-Rad 公司), 荧光定量 PCR 仪(美国, Bio-Rad 公司), 抗人 CD14 单克隆抗体(中国, 天津三箭生物技术股份有限公

司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒(中国, Solarbio 公司), 总 RNA 提取试剂盒(中国, Solarbio 公司), cDNA 合成试剂盒(美国, Bio-Rad 公司), SYBR 荧光定量试剂盒(美国, Bio-Rad 公司)。

表 1 冠心病组和非冠心病组基线资料比较

项目	Table 1 General clinical data		$\bar{x} \pm s$ P 值
	冠心病组 (39 例)	非冠心病组 (36 例)	
年龄/岁	70.41 ± 7.93	67.36 ± 10.22	0.151
男性/例(%)	18(46.2)	18(50.0)	0.739
吸烟/例(%)	12(30.8)	10(27.8)	0.776
高血压/例(%)	27(69.2)	19(52.8)	0.144
糖尿病/例(%)	16(41.0)	9(25.0)	0.141
BMI	23.49 ± 3.28	23.80 ± 3.28	0.684
尿酸/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	369.1 ± 94.9	348.6 ± 96.8	0.359
血肌酐/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	76.45 ± 31.15	71.16 ± 27.24	0.438
TG/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.80 ± 0.97	1.56 ± 0.91	0.274
TC/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	4.54 ± 1.51	4.08 ± 1.13	0.142
LDL-C/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.72 ± 1.37	2.35 ± 0.98	0.186

1.2.2 人外周血单核细胞分离、提取及鉴定 将稀释后血液缓慢加入事先装有人淋巴细胞分离液上, 室温离心 $2500 \times g$, 20 min, 吸取第 2 层环状乳白色淋巴细胞层, 洗涤离心后用 RPMI 1640 完全培养基重悬所得细胞, 并于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h, 弃培养基, 得到贴壁的外周血单核细胞。弃去培养液, 加入 37°C 预热的 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 待细胞形态开始变化时加入 2~3 ml 10% 胎牛血清培养液终止胰蛋白酶消化, 洗涤并 PBS 重悬, 吸取 100 μl 体积的细胞悬液分别于两 EP 管中送做流式细胞鉴定, 并标记实验组与对照组; 于避光条件下吸取 5 μl FITC-CD14 加入实验组单核细胞悬液中, 充分混匀, 对照组不作处理, 两组均于 4°C 避光孵 20 min; 孵育后实验组用 PBS 充分冲洗 2~3 次 ($1500 \times g$, 5 min), 弃上清, 加入 100 μl PBS 缓冲液维持 4°C 上机检测; 流式细胞仪检测采用 SSC、FSC 设门测定单核细胞中 CD14 阳性表达百分比。

1.2.3 Western blotting 法检测单核细胞 TRPA1 基因在蛋白水平的表达 用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解、提取冠心病组与非冠心病组单核细胞总蛋白, 以 BCA 法测定单核细胞蛋白浓度。取 50 μg 蛋白样品加入蛋白上样缓冲液, 95°C

5 min后行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。湿转,5%脱脂奶粉封闭 2 h,4℃一抗(TRPA1 抗体滴度为 1:1000)孵育过夜,洗膜 3 次,每次 10 min,过氧化物酶标记二抗(抗体滴度 1:1000)室温孵育 2 h,化学发光,凝胶图像分析系统显影曝光。以 GAPDH 为内参照,行 Image Lab 检测 TRPA1 蛋白相对表达水平。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测单核细胞 TRPA1 基因 mRNA 表达 按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明提取单核细胞总 RNA,按逆转录热循环程序合成 cDNA,反应产物行 PCR 扩增,热反应为 40 个循环,TRPA1 引物序列:上游为 5'-ATTGCGTG-CACCACAAATAA-3',下游为 5'-ATGCAGCTT-GGTGAATAGGG-3';GAPDH 引物序列:上游为 5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3',下游为 5'-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3'。以 TRPA1 与 GAPDH 拷贝数的比值作为其相对表达量。

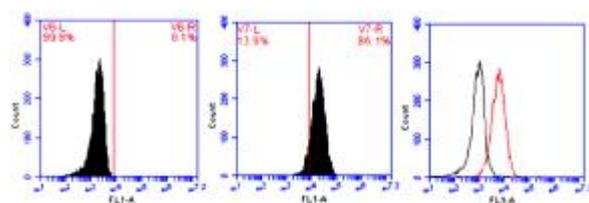
1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS 24.0 软件进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,冠心病组与非冠心病组 RT-PCR 和 Western Blot 实验数据比较采用两独立样本 *t* 检验,计数资料采用频数及百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。应用 Spearman 相关性检验分析相关性。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血单核细胞的提取

采用密度梯度离心法分离外周血单核细胞,经流式细胞术鉴定,单核细胞纯度在 86.1%。见图 1。



左:空白对照组(PBS);中:实验组(FITC-CD14);右:对照组、实验组。

图 1 单核细胞流式细胞术鉴定图

Figure 1 Peripheral blood monocytes identified by flow cytometry

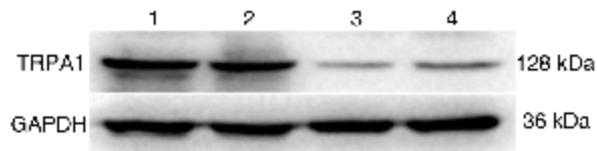
2.2 单核细胞 TRPA1 蛋白的表达

Western blotting 检测冠心病组与非冠心病组单核细胞 TRPA1 蛋白表达,冠心病组患者单核细胞 TRPA1 在蛋白水平上表达高于非冠心病组(1.524 ± 0.426 : 0.590 ± 0.275, $P < 0.001$)。见图 2。

2.3 单核细胞 TRPA1 mRNA 的表达

顺利提取单核细胞总 RNA(图 3),RT-PCR 检

测单核细胞 TRPA1 mRNA 转录水平,冠心病组患者 TRPA1 mRNA 表达明显高于非冠心病组(9.121 ± 1.828 : 3.923 ± 2.535, $P < 0.05$)。



1、2 泳道为冠心病组患者;3、4 泳道为非冠心病组患者。

图 2 冠心病组与非冠心病组患者单核细胞 TRPA1 蛋白表达

Figure 1 The expression of TRPA1 protein

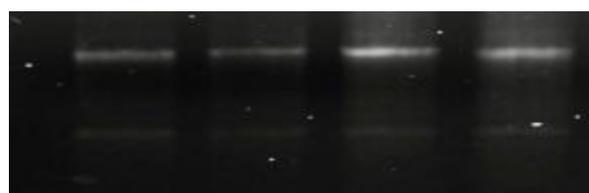


图 3 单核细胞 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Figure 3 RNA of peripheral blood monocytes by agarose gel electrophoresis

2.4 冠心病亚组单核细胞 TRPA1 mRNA 的表达 糖尿病组患者单核细胞 TRPA1 mRNA 表达明显高于非糖尿病组,高血压组患者单核细胞 TRPA1 mRNA 表达明显高于非高血压组,差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各冠心病亚组单核细胞 TRPA1 mRNA 表达的比较

Table 1 Expressions of TRPA1 mRNA in coronary heart disease subgroups

冠心病亚组	例数	TRPA1/GAPDH mRNA 表达 $\bar{x} \pm s$
非糖尿病组	23	8.982 ± 0.756
糖尿病组	16	9.685 ± 0.932 ¹⁾
非高血压组	12	8.740 ± 1.586
高血压组	27	9.812 ± 1.180 ²⁾

与非糖尿病组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与非高血压组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

2.5 相关性分析

就冠心病患者外周血单核细胞 TRPA1/GAPDH mRNA 表达水平与冠脉病变 Gensini 积分^[3-4](表 2)作 Spearman 相关性分析,结果显示,两者呈显著正相关($r = 0.964$, $P < 0.01$)。

3 讨论

冠心病是一种严重危害人类健康的心血管病,2015 年全球冠心病死亡约 892 万人,在西方发达国家,冠心病死亡可占总死亡人数的三分之一。在我

表 2 冠脉病变 Gensini 积分系统
 Table 2 The Gensini score system

病变部位	评分	狭窄程度/%	评分
左主干	5	1~25	1
左前降支或回旋支近段	2.5	26~50	2
左前降支中段	1.5	51~75	4
左前降支远段	1.0	76~90	8
左回旋支中、远段	1.0	91~99	16
右冠状动脉、第 1 对角支	1.0	100	32
小分支	0.5	—	—

每处病变积分=病变部位评分×狭窄程度评分,患者积分为所有病变积分总和。

国,冠心病病死率虽较西方发达国家略低,但随着全国胸痛中心的构建及冠脉介入治疗的推广,冠心病病死率仍居高不下。

冠心病主要的病理基础是冠脉粥样硬化,目前对于粥样硬化的发病机制尚不明确,很多学说从不同角度尝试阐释这一过程,多数学者认为其是动脉对内膜、内膜损伤做出的炎症-纤维增生性反应^[5-8]。据此,粥样硬化始动因素是内皮细胞的损伤,而在粥样硬化整个疾病进展过程中始终伴随着炎症、氧化应激,这是粥样硬化的核心机制^[9-11]。

TRPA1 是瞬时受体电位离子通道(TRP)蛋白超家族 A 亚家族唯一成员,是一种存在于细胞膜上的重要非选择性阳离子通道锚蛋白^[12]。Bautista 等^[13]研究发现,TRPA1 与 TRPV1 通过异源性寡聚化作用形成新的离子通道来感知炎性递质的刺激,并认为缓激肽通过与其偶联的 G 蛋白激活 PLC/PKC 信号途径,导致 Ca²⁺ 从胞内钙库释放从而敏化 TRPV1,后者的开放又进一步引起胞外及胞内钙库 Ca²⁺ 进入胞质,胞质内 Ca²⁺ 浓度的增高最终激活 TRPV1 通道是 TRPA1 与 TRPV1 异聚化通道感知刺激的作用。研究发现激活 TRPV1 可减少细胞对氧化低密度脂蛋白的摄取,减少平滑肌细胞的泡沫化,最终阻止动脉粥样硬化斑块的形成^[14-15]。且 TRPA1 是氧化应激感受器,在炎症反应始动环节起重要作用^[16]。既往研究发现,TRPA1 不仅在感觉神经细胞中表达,而且在单核细胞等非神经元中亦有表达,那么在单核细胞参与的粥样硬化进程及炎症、氧化应激反应中,TRPA1 是否起着十分重要的作用目前尚未明确。

通过本研究可知,冠心病组患者单核细胞 TRPA1 分别在蛋白水平及 mRNA 转录水平上高于非冠心病组患者,在合并粥样硬化危险因素高血压和(或)糖尿病时,单核细胞 TRPA1 mRNA 表达增高,原因可能是危险因素加重了粥样硬化炎症、氧化应激水平,促进单核细胞参与整个病理生理过程。单核细胞 TRPA1 mRNA 表达水平与冠脉病变 Gensini 积分呈显著正相关,且相关系数大,说明

检测单核细胞 TRPA1 mRNA 表达可作为一项预测冠脉病变程度的新手段。

本研究有一定局限性,只是初步探索了 TRPA1 在冠心病患者中的表达情况及其与冠脉病变程度的相关性。但本研究亦为下一步实验提供了思路,如是否可通过基因敲除或者 TRPA1 受体拮抗剂抑制 TRPA1 表达,进一步来阻止粥样硬化进展?

参考文献

- [1] 中国心血管病报告编写组.《中国心血管病报告 2016》概要[J].中国循环杂志,2017,32(6):.
- [2] Yang X, Li Y, Li Y, et al. Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis; Mechanisms and Therapies[J]. Front Physiol, 2017, 8: 600.
- [3] Gensini G G. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease[J]. American Journal of Cardiology, 1983, 51(3): 606.
- [4] 盖敏涛, 刘芬, 谢翔, 等. 新疆汉族、维吾尔族血小板参数与冠状动脉狭窄程度的相关性研究[J]. 临床心血管病杂志, 2018(1): 30-34.
- [5] Hansson G. Atherosclerosis--an immune disease; The Anitschkov Lecture 2007[J]. Atherosclerosis, 2009, 202(1): 2-10.
- [6] Hansson G K, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. [J]. Nature Reviews Immunology, 2006, 6(7): 508.
- [7] Ooi C Y, Sutcliffe M P, Davenport A P, et al. Changes in biomechanical properties of the coronary artery wall contribute to maintained contractile responses to endothelin-1 in atherosclerosis. [J]. Life Sciences, 2014, 118(2): 424-429.
- [8] Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Journal of Atherosclerosis & Thrombosis, 2003, 10(2): 63-71.
- [9] Li H, Horke S, F? rstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2014, 237(1): 208-19.
- [10] Kurabayashi M. Atherosclerosis and Oxidative Stress [J]. Japanese Journal of Apheresis, 2008, 27(3): 22-26.
- [11] 廖玉华, 杨勇. 炎症与动脉粥样硬化的新探索[J]. 临床心血管病杂志, 2014, 30(6): 461-463.
- [12] Story GM, Peier AM, Reeve AJ, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures[J]. Cell, 2003, 112(6): 819-829.
- [13] Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents [J]. Cell, 2006, 124(6): 1269-1282.
- [14] Wang P, Liu D, Zhu Z. Transient receptor potential vanilloid type-1 channel in cardiometabolic protection [J]. J Korean Soc Hypert, 2011, 17(2): 37-47.
- [15] 杨绍兵, 梁思敏, 曾祥飞, 等. 激活 TRPV1 在高同型半胱氨酸促内皮细胞凋亡中的作用[J]. 临床心血管病杂志, 2017, 33(6): 587-591.
- [16] Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, et al. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂ [J]. Nat Chem Biol, 2011, 7(10): 701-711.

(收稿日期:2018-04-22; 修回日期:2018-08-22)