

程序性细胞死亡因子4与端粒酶在冠心病猝死心肌组织中的表达及意义

陈刚, 王阳, 吴旭庭, 王镇波, 王涛

基金项目: 广东省医学科学技术研究项目(编号:A2016100)

作者单位: 510900 广州, 南方医科大学第五附属医院心血管内科

作者简介: 陈刚(1975-), 男, 大学本科, 医学学士, 副主任医师, 研究方向: 冠心病的防治。E-mail: 369711258@qq.com

[摘要] **目的** 分析程序性细胞死亡因子4(Programmed cell death 4, PDCD4)与端粒酶在冠心病心肌组织中的表达关系, 探讨其对冠心病心肌损伤患者的临床诊疗意义。**方法** 收集冠心病心源性猝死组、冠心病非心源性猝死组及正常死亡组心肌切片标本各25例, 应用免疫组织化学方法, 对PDCD4与端粒酶进行检测, 观察并分析两者在各组中的阳性检出率及表达量的关系。**结果** (1) PDCD4与端粒酶在冠心病心源性猝死组的阳性平均检出率分别为27.36%、30.08%; 在冠心病非心源性猝死组的阳性平均检出率分别为73.58%、76.22%; 在正常死亡组的阳性平均检出率分别为89.52%、92.31%, 冠心病心源性猝死的PDCD4与端粒酶的阳性检出率明显少于其他两组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。(2) PDCD4与端粒酶的积分光密度中位数冠心病心源性猝死组分别为2 776.32、11 889.65, 冠心病非心源性猝死组分别为1 073.52、7 254.91, 正常死亡组分别为987.48、6 908.27, 冠心病心源性猝死组的PDCD4与端粒酶的积分光密度的中位数明显高于其他两组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** PDCD4与端粒酶在冠心病心源性猝死患者的心肌组织中阳性检出率较低, 中位数呈过表达, 而在冠心病非心源性猝死及正常死亡患者的心肌组织中检出率均较高, 表示PDCD4与端粒酶可能是冠心病心肌损伤中的关键标志物, 对临床诊疗冠心病心肌损伤具有一定的指导作用。

[关键词] 程序性细胞死亡因子4; 端粒酶; 冠心病猝死; 研究

[中图分类号] R 541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2018)04-0321-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2018.04.02

Expression and significance of PDCD4 and telomerase in myocardial tissues of sudden death patients with coronary heart disease CHEN Gang, WANG Yang, WU Xu-ting, et al. Department of Cardiovascular Medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510900, China

[Abstract] **Objective** To analyse the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) and telomerase in myocardial tissues of sudden death patients with coronary heart disease and to discuss its clinical significance in coronary heart disease patients with myocardial injury. **Methods** 25 sudden death patients with coronary heart disease (cardiac sudden cardiac death in coronary heart disease group), 25 non-sudden death patients with coronary heart disease (non-cardiogenic sudden death of coronary heart disease group) and 25 dead patients without coronary heart disease (normal control group) were collected. PDCD4 and telomerase were detected by immunohistochemical method and were analyzed among the three groups. **Results** (1) The positive rates of PDCD4 and telomerase in the cardiac sudden cardiac death in coronary heart disease group were 27.36% and 30.08% respectively. The positive rates of PDCD4 and telomerase in the non-cardiogenic sudden death of coronary heart disease group were 73.58% and 76.22% respectively. The positive rates of PDCD4 and telomerase in the normal control group were 89.52% and 92.31% respectively. The positive rates of PDCD4 and telomerase in the sudden cardiac death of coronary heart disease group were significantly lower than those in the other two groups ($P < 0.05$). (2) The median values of optical density of PDCD4 and telomerase in the cardiac sudden cardiac death in coronary heart disease group were 2 776.32 and 11 889.65 respectively. The median values of optical density in the non-cardiogenic sudden death of coronary heart disease group were 1 073.52 and 7 254.91 respectively. The median values of optical density in the normal control group were 987.48 and 6 908.27 respectively. The median values of optical density of PDCD4 and telomerase

in the sudden cardiac death of coronary heart disease group were significantly higher than those in the other two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The positive rates of PDCD4 and telomerase are lower in the cardiac muscle tissues of the patients with CHD cardiac sudden death whose median values are overexpressed, but higher in non-cardiogenic sudden death patients with coronary heart disease and in the dead patients without coronary heart disease. These indicate that PDCD4 and telomerase may be the key markers of myocardial injury in coronary heart disease, and have a certain guiding role in the clinical diagnosis and treatment of coronary heart disease.

[**Key words**] Programmed cell death 4(PDCD4); Telomerase; Cardiac sudden death; Study

冠心病猝死是一种常见的心血管疾病,可分为心源性猝死与非心源性猝死。冠心病猝死患者的心肌功能是否损伤是临床诊疗的有效途径^[1]。但是冠心病猝死又具有突发性、不可预测性的发病特质,给临床诊疗及预防造成了很大困难。目前国内外普遍报道的可作为冠心病心肌损伤检查的关键标志物主要是各种肌蛋白,如心肌肌钙蛋白、肌红蛋白等^[2]。不过也有报道称心肌损伤与心肌局部炎症有着密切的关系,尤其与炎症引起的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)有关, TNF- α 水平升高会导致冠脉栓塞心肌功能损伤。而程序性细胞死亡因子4(programmed cell death 4, PDCD4)参与了 TNF- α 的调控,因此 PDCD4 很可能是引起冠脉栓塞心肌功能损伤的一种标志物。另外,端粒酶是一种广泛存在于心肌中的蛋白,它能以自身携带的 RNA 为模板,不断合成新的端粒 DNA 序列添加到染色体末端,弥补端粒丢失。端粒酶活性发生改变,细胞则会进入程序性死亡,因此端粒酶与 PDCD4 存在着一种直接关联^[3,4]。本文就是基于这样一种理论推测,应用免疫组织化学方法来分析 PDCD4 与端粒酶在冠心病心肌组织中的表达关系,探讨 PDCD4 与端粒酶对临床冠心病心肌损伤诊疗中的价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2015-06 ~ 2017-05 本院冠心病死亡患者,结合尸检及生前病例等检测结果,按照死亡原因分为三类,其中属于冠心病心源性猝死患者 25 例,男 14 例,女 11 例,年龄 27 ~ 66 (47.3 ± 3.6) 岁,患者均为急性发病后 1 d 左右死亡,全身检查无其他致命伤害;属于冠心病非心源性猝死患者 25 例,男 13 例,女 12 例,年龄 29 ~ 59 (45.6 ± 2.8) 岁,患者死亡后对心肌进行大体与 HE 染色体检查,均见有病变。部分死于物理性伤害,部分死于其他系统疾病如消化类、呼吸类及神经类疾病。另外正常死亡组 25 例,男 12 例,女 13 例,年龄 24 ~ 61 (46.6 ± 3.9) 岁,死因多为物理性伤害,无心血管类疾病史。

1.2 试剂与方法 (1) 主要试剂: PDCD4 抗体类型由天津赛尔生物技术有限公司提供,端粒酶抗体类

型由上海卡努生物科技有限公司提供。显色剂与免疫组织化学试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。图像分析由日本 Olympus AU680 全自动生化分析仪完成。(2) 标本采集与切片制定: 冠心病心源性猝死组与冠心病非心源性猝死组均取患者冠脉最狭窄区附近的心肌组织,正常死亡组则取患者左心室区域心肌组织。标本采集时间均在死亡后 24 ~ 48 h 内。标本采集后以甲醇液固定并使之脱水,然后切成 5 μm 厚的石蜡切片。中温(50 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$) 烘烤 30 min 后固定,制成病理切片。(3) 免疫组织化学法: 将准备好的病理切片按照二甲苯溶液 15 min \times 3、无水乙醇 5 min \times 2、95% 乙醇 5 min \times 2、蒸馏水清洗 3 次的过程进行脱蜡水化。然后将切片浸入配制好的抗原修复溶液中,高压高温修复 2 min 后自然冷却至室温。然后置于 3% H_2O_2 溶液中浸泡 15 min,再用蒸馏水清洗 3 次后放入 PBS 缓冲液中 5 min。取出切片后置于湿盒内,甩干后加一抗约 30 μl ,储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰柜中过夜。然后 PBS 缓冲液清洗 5 min \times 4,并甩干置于湿盒中,加入二抗,恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,再以 PBS 缓冲液清洗 5 min \times 3 次并甩干。湿盒中加入 DAB 显色剂约 80 μl ,显色约 3 ~ 5 min,当观察部位出现黄褐色时停止显色,以自来水清洗 3 次。以苏木精复染 5 min 后自来水清洗。然后依次放入 95% 乙醇、无水乙醇、二甲苯溶液中各 5 min 后,滴入中性树胶封片晾干。

1.3 评价标准 观察抗原所在部分的显色,统计每个切片随机的 5 个观察视野的细胞阳性率,并测量各切片的平均积分光密度(积分光密度的中位数)。

1.4 统计学方法 应用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或中位数 (M) 表示,采用方差分析或者 wilcoxon 非参数检验,计数资料以百分率表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组间的 PDCD4 与端粒酶阳性检出率比较 冠心病心源性猝死组 PDCD4 与端粒酶的阳性检出率明显低于其他两组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

见表 1。

表 1 三组间的 PDCD4 与端粒酶阳性检出率比较 [$n(\%)$]

组别	例数	PDCD4	端粒酶
冠心病心源性猝死组	25	27.36*	30.08*
冠心病非心源性猝死组	25	73.58	76.22
正常死亡组	25	89.52	92.31
χ^2	-	87.742	80.790
P	-	0.000	0.000

注:与冠心病非心源性猝死组比较,* $P < 0.05$

2.2 三组间 PDCD4 与端粒酶的积分光密度中位数比较 冠心病心源性猝死的 PDCD4 与端粒酶的积分光密度的中位数明显高于其他两组,两两对比 wilcoxon 非参数检验,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 三组间 PDCD4 与端粒酶的积分光密度中位数比较

组别	例数	PDCD4 积分光密度	端粒酶积分光密度
冠心病心源性猝死组	25	2776.32#	11889.65#
冠心病非心源性猝死组	25	1073.52	7254.91
正常死亡组	25	987.48	6908.27
H	-	21.337	18.567
P	-	0.000	0.000

注:与冠心病非心源性猝死组比较,# $P < 0.05$

3 讨论

3.1 PDCD4 作为近年来新发现及应用的抑癌基因,已经被报道在多种疾病诊疗中具有重要的作用^[5]。它是一种通过转录来抑制癌细胞的基因,而且是少见的直接在蛋白翻译阶段参与调控的抑癌基因。因此 PDCD4 会受上游如转化生长因子- β 、小 RNA 等的影响。不过受不同因素的影响,PDCD4 在不同疾病中的表达不一。比如转化生长因子- β 参与 PDCD4 的调控,在肝癌患者的 Huh7 细胞中会增加 PDCD4 的表达,表示细胞正在凋亡^[6]。在乳腺癌、肠癌、胃癌、食管癌等癌症细胞中,PDCD4 被证实为 microRNA-21 的有效靶点。许庆文^[7] 等对胃癌细胞 MGC-803 进行不同分组的转染分析发现,转染 microRNA-21 组别的 PDCD4 表达明显降低,而转染 microRNA-21 抑制剂组别的 PDCD4 表达则明显增强。由此可见,当增强 microRNA-21 的表达时,会抑制 PDCD4 的表达,从而抑制细胞凋亡。另外,PDCD4 也会对下游的一些蛋白组织如碳酸酐酶 II、尿激酶受体、金属蛋白酶 II 组织抑制剂等翻译产生影响。Saxena^[8] 等在 2013 年发现由于 PDCD4 参与了 cap 的调控,使得肾

细胞中的碳酸酐酶 II 发生蛋白表达异常。虽然这种调控作用发生在翻译阶段,但是异常表达后的碳酸酐酶 II 产生了抑制癌症的效果。Wang^[9] 等对结直肠癌组织进行分析表示,尿激酶受到 PDCD4 的影响,从而引起癌细胞发生转移,因此他认为尿激酶与 PDCD4 的表达关系呈负相关。然而 Nieves^[10] 等在乳腺癌细胞中并未找到 PDCD4 与尿激酶有关联,反而发现了 PDCD4 参与了金属蛋白酶 II 组织抑制剂的调控,从而引导癌细胞转移。由此可见,不同疾病中 PDCD4 的作用靶点不一样,因此笔者认为 PDCD4 不仅受多种因素影响,而且会参与多种疾病的不同细胞翻译。

3.2 由于癌症患者 20% ~ 30% 会与炎症相关,而且癌症在患病及治疗期间,一直会伴有炎症的发生。而近年来诸多文献也表示,PDCD4 也是一种与各种炎症有关的基因^[11,12]。结合上述 PDCD4 与癌症的关系,可以推测,PDCD4 与炎症有着某种联系。而且在 2012 ~ 2014 年间,多项研究^[13~15] 已经报道 PDCD4 能参与如干扰素应答基因、A-myb 以及 NF- κ B 基因转录等炎症相关的调控。另外,从一些报道来看,PDCD4 参与了 TNF- α 的调控^[16]。而对于冠心病来说,心肌局部炎症引起的 TNF- α 会导致冠脉堵塞心肌损伤。而作为广泛存在于心肌组织中的端粒酶,可以通过自身 RNA 不断复制合成端粒酶 DNA 弥补端粒丢失,因此其活性被改变,细胞则会进入程序性死亡,所以端粒酶与 PDCD4 又存在调控关系。因此,笔者认为 PDCD4、端粒酶与冠心病堵塞心肌损伤存在关联。从本文研究的表 1 中可知,冠心病心源性猝死组相对于冠心病非心源性猝死组与正常死亡组来说,心肌组织中 PDCD4 与端粒酶的阳性率明显较少,对比差异具有统计学意义($P < 0.05$),而从表 2 中可知,冠心病心源性猝死组的 PDCD4 与端粒酶均呈过表达,另外两组则呈现低表达。可见 PDCD4 与端粒酶的表达呈正相关,而且两者参与了冠心病心源性猝死的调控。因此笔者认为,对于冠心病心肌损伤患者来说,PDCD4 与端粒酶可能由于炎症的发生而参与了调控。

综上所述,PDCD4 与端粒酶可能是冠心病心肌损伤中的关键标志物,对临床诊疗冠心病心肌损伤及法医鉴定上具有一定的指导作用。

参考文献

- 1 刘莉,左玉松,刘德全,等. 冠心病微小心肌损伤患者 200 例冠状动脉造影特点研究[J]. 山西医药杂志,2014,43(13):1542-1543.

2 付英姿,安刚,吕红君,等.肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶、肌红蛋白检测对急性冠脉综合征的诊断价值[J].中国老年学杂志,2015,35(15):4221-4223.

3 方明,张荣新.Pcd4在食道癌中的研究进展[J].中华全科医学,2012,10(5):777-779.

4 钱东,丁小凤,程菁菁,等.靶向端粒端粒酶的抗肿瘤治疗研究进展[J].中国肿瘤临床,2016,43(15):679-682.

5 曹春明,孙震晓.抑癌基因Pcd4的表达调控及产物泛素化研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2010,37(4):353-357.

6 Matsushashi S, Hamajima H, Xia J, et al. Control of a tumor suppressor PDCD4: Degradation mechanisms of the protein in hepatocellular carcinoma cells[J]. Cell Signal, 2014, 26(3):603-610.

7 许庆文,周才进,鲁珏,等. MicroRNA-21 靶向 PDCD4 对胃癌细胞增殖及凋亡的影响[J].实用肿瘤杂志,2013,28(6):592-596.

8 Saxena A, Shoeb M, Ramana KV, et al. Aldose reductase inhibition suppresses colon cancer cell viability by modulating microRNA-21 mediated PDCD4 expression[J]. Eur J Cancer, 2013, 49(15):3311-3319.

9 Wang Q, Sun ZX, Allgayer H, et al. Downregulation of E-cadherin is an essential event in activating beta-catenin/Tef-dependent transcription and expression of its target genes in PDCD4 knockdown cells[J]. Oncogene, 2010, 29(1):128.

10 Nieves-Alicea R, Colburn NH, Simeone AM, et al. Programmed Cell

Death 4 inhibits breast cancer cell invasion by increasing Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 expression[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 114(2):203-209.

11 姜艳,杨大群,王聪洋,等.抑癌基因PDCD4与肿瘤关系的研究进展[J].现代肿瘤医学,2015,23(22):3363-3366.

12 MWMVD Bosch, E Palssonmcdermott, DS Johnson, et al. LPS Induces the Degradation of Programmed Cell Death Protein 4 (PDCD4) to Release Twist2, Activating c-Maf Transcription to Promote Interleukin-10 Production[J]. J Biol Chem, 2014, 289(33):22980-22990.

13 Kroczyńska B, Sharma B, Eklund EA, et al. Regulatory effects of programmed cell death 4 (PDCD4) protein in interferon (IFN)-stimulated gene expression and generation of type I IFN responses[J]. Molecular & Cellular Biology, 2012, 32(14):2809-2822.

14 Biyanee A, Klemptner KH. Inhibition of the translation of A-myc mRNA by tumor suppressor protein PDCD4[J]. Cancer Res, 2013, (73):3190.

15 Hwang SK, Baker AR, et al. Tumor suppressor PDCD4 inhibits NF- κ B dependent transcription in human glioblastoma cells by direct interaction with p65[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(7):1469-1480.

16 张泽信,侯立朝.程序性细胞死亡因子4在肿瘤及炎症中的交叉作用研究进展[J].陕西医学杂志,2014,43(7):918-919.

[收稿日期 2017-12-06][本文编辑 刘京虹]

课题研究·论著

多频振动治疗仪在危重症患者急性胃肠损伤早期康复治疗中的应用效果观察

朱良峰, 吕立文, 沈印, 朱瑞凯, 石磊, 祝三山

基金项目: 广西卫计委科研课题(编号:Z20170356)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院急诊科

作者简介: 朱良峰(1986-),男,医学硕士,主治医师,研究方向:急救医学与重症医学。E-mail:oneflypig@163.com

通讯作者: 吕立文(1972-),女,医学博士,主任医师,研究方向:急救医学与重症医学。E-mail:464050065@qq.com

[摘要] 目的 探讨多频振动治疗仪在危重症患者急性胃肠损伤(AGI)早期康复治疗中的应用效果。

方法 选取2016-09~2017-09入住该院重症医学科的70例危重症患者作为研究对象,采用随机数字法分为观察组和对照组各35例。对照组给予常规治疗,观察组在对照组基础上加用多频振动治疗仪治疗。比较两组治疗前后AGI分级、肠鸣音分级、腹腔内压力、降钙素原、C-反应蛋白、ICU住院时间、ICU住院费用及住院期间病死率情况。

结果 两组治疗后3d AGI分级比较差异无统计学意义($P > 0.05$),观察组治疗后7d、28d AGI分级均优于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);两组治疗后3d肠鸣音分级比较差异无统计学意义($P > 0.05$),观察组治疗后7d、28d肠鸣音分级均优于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);两组治疗后腹腔内压力、降钙素原及C-反应蛋白均较治疗前降低($P < 0.05$),且观察组降低幅度均大于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);观察组ICU住院时间短于对照组,但ICU住院费用高于对照组,差异有统计学意义($P <$