

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.09.010

文章编号: 1005-8982 (2019) 09-0049-04

阿托伐他汀对脑血管疾病介入治疗围手术期患者 CD4⁺T 淋巴细胞 PTEN 表达的影响

张贺¹, 初照成²

(沈阳市第二中医医院 1. 介入科, 2. 检验科, 辽宁 沈阳 110101)

摘要: **目的** 探讨老年缺血性脑血管疾病患者介入治疗围手术期 CD4⁺T 淋巴细胞人第 10 号染色体缺失的磷酸酶张力蛋白同源基因 (PTEN) 表达的变化情况。**方法** 选取 2016 年 1 月—2017 年 12 月沈阳市第二中医医院收治的择期行介入手术治疗的 80 例老年缺血性脑血管疾病患者为研究对象, 随机分为观察组和对照组, 每组 40 例。观察组围手术期使用阿托伐他汀, 对照组不使用阿托伐他汀, 两组均于手术前后 16 ~ 24 h 抽取外周血 20 ml。采用免疫磁珠法分选出 CD4⁺T 淋巴细胞, Western blotting 检测 PTEN 蛋白的表达, 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 PTEN mRNA 表达, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测介入手术前后白细胞介素-10 (IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的情况。**结果** 观察组术后的 PTEN mRNA、PTEN 蛋白表达水平高于术前 ($P < 0.05$); 对照组手术前后的 PTEN mRNA 及蛋白的表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 观察组术后的 TNF- α 低于术前, IL-10 高于术前 ($P < 0.05$); 对照组手术前后 TNF- α 、IL-10 的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。相关性分析显示, IL-10 与 PTEN 表达呈正相关, TNF- α 与 PTEN 表达呈负相关 ($P < 0.05$)。**结论** 介入手术后缺血性脑血管疾病患者存在炎症反应, 而服用阿托伐他汀可降低这种炎症反应, 其作用机制可能与阿托伐他汀可上调 PTEN 的表达有关。

关键词: 脑疾病; 介入手术; PTEN 基因; 炎症; 老年

中图分类号: R651

文献标识码: A

Expression of PTEN in CD4⁺T lymphocyte of patients with ischemic cerebrovascular disease

He Zhang¹, Zhao-cheng Chu²

(1. Department of Intervention, 2. Department of Laboratory Medicine, The Second Hospital of Traditional Chinese Medicine of Shenyang City, Shenyang, Liaoning 110101, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of PTEN in CD4⁺T of elderly patients with ischemic cerebrovascular disease during perioperative period of interventional therapy. **Methods** A total of 80 patients with senile ischemic encephalopathy who were admitted to our hospital from January 2016 to December 2017 for interventional surgery were selected as the study subjects. They were randomly divided into observation group and control group ($n = 40$). All the patients received standard treatments while patients in observation group received additional Atorvastatin. 20 ml peripheral blood was extracted before and after the surgery. CD4⁺T lymphocytes were separated by immunomagnetic beads. PTEN expression was detected by Western blotting and fluorescence quantitative PCR. Levels of interleukin 10 (IL-10) and tumor necrosis factor α (TNF- α) were detected by ELISA prior to and post intervention. **Results** In observation group, postoperative expression of PTEN were higher than that before surgery ($P < 0.05$). No obvious difference in PTEN prior to and post interventional procedure was witnessed

收稿日期: 2018-10-08

in the control group ($P > 0.05$). In the observation group, levels of TNF- α decreased while IL-10 increased after surgery compared with those before surgery ($P < 0.05$). In the control group, there was no significant difference in TNF- α and IL-10 before and after surgery ($P > 0.05$). Correlation analysis showed that IL-10 was positively correlated with PTEN expression while TNF- α was negatively correlated with PTEN expression ($P < 0.05$).

Conclusions Interventive surgery induced inflammatory response may be down-regulated with oral intake of Atorvastatin in elderly patients with ischemic cerebrovascular disease; anti-inflammatory effect of Atorvastatin may be achieved through upregulation of PTEN.

Keywords: brain diseases; interventional surgery; PTEN gene; inflammation; aging

缺血性脑血管病是我国中老年人的常见病。目前介入治疗是一种新型的利用血管内导管的操作技术^[1],能够大大减少患者的痛苦并降低缺血性脑卒中的风险。但介入手术治疗和麻醉可诱发中枢神经系统的炎症反应而增加治疗的风险。近来研究发现,磷酸酶张力蛋白同源基因(PTEN)能够调控一些炎症细胞^[2]。但有关研究PTEN在脑血管介入治疗中的调控作用的报道较少。现以老年缺血性脑血管疾病患者为研究对象,分析其围术期CD4⁺T淋巴细胞PTEN表达的变化。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年1月—2017年12月沈阳市第二中医医院收治的择期行介入手术治疗的80例老年缺血性脑血管疾病患者。采用随机数字表法分为观察组40例和对照组40例。观察组:男性25例,女性15例;平均年龄(68.5 \pm 7.4)岁;ASA分级I、II、III级分别为4、28和8例;BMI为(23.5 \pm 2.3)kg/m²;基底动脉狭窄18例,大脑中动脉狭窄22例;合并高血压14例,糖尿病8例。对照组:男性28例,女性12例;平均年龄(69.1 \pm 6.7)岁;ASA分级I、II、III级分别为5、25和10例。BMI为(23.8 \pm 2.5)kg/m²;基底动脉狭窄16例,大脑中动脉狭窄24例;合并高血压13例,糖尿病7例。纳入标准:①符合WHO的缺血性脑血管疾病的诊断标准;②经DSA证实存在颅内动脉粥样硬化性狭窄;③均自愿参与本研究;④年龄 \geq 60岁;⑤BMI 20~28 kg/m²;⑥具备脑血管神经介入指征。排除标准:①恶性肿瘤;②合并严重外伤及感染者;③肝、肾等重要器官功能衰竭;④不能耐受阿司匹林或氯吡格雷,或对他汀类药物过敏者;⑤存在心源性栓子的潜在来源;⑥血液系统疾病;⑦静脉碘试验阳性。两组患者一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。该研究经本院医学伦理委员会批准,所有患者及家属知情并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 两组术前3d均口服氯吡格雷和阿司匹林,术前均给予局部麻醉,采用经皮Seldinger's穿刺法,股动脉穿刺入路,将8F导引导管放置患侧颈总动脉远端,采取栓塞、注药和扩张等治疗,具体操作由本院资深神经科介入医生进行。术后静脉注射尿激酶溶栓,经检查发现残余狭窄均 $<10\%$ 。观察组于术前2d口服阿托伐他汀80mg/d,术后口服40mg/d,连续服用3个月;对照组不给予阿托伐他汀治疗。

1.2.2 血液标本采集 两组均于手术前后16~24h抽取肘静脉血20ml。取其中5ml用于TNF- α 、IL-10的检测,2000r/min离心10min,取上清液采用ELISA法检测。剩余15ml采用肝素抗凝后分离细胞。

1.2.3 PTEN mRNA的检测 免疫磁珠法分选出CD4⁺T淋巴细胞,实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测PTEN mRNA表达。具体方法为:按照Trizol操作说明提取细胞总RNA,采用紫外分光光度计(上海让奇公司)检测RNA浓度及纯度。2%琼脂糖凝胶(含0.5%溴化乙锭)电泳检测RNA有无降解,调整RNA的量为1 μ g/ μ l,逆转录试剂盒(购自美国Cell Signaling Technology公司)将其逆转录成互补DNA。SYBR Green I荧光标记法检测PCR产物,PCR引物序列采用Primer express 2.0软件严格按照相关原则设计。根据试剂盒说明书设置反应体系及参数,建立20 μ l反应体系。每个样本做复孔检测,同时每次反应均设置阴性孔,PCR产物经测序检测,测定目的基因的吸光度值,取平均灰度值。结果采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法比较。

1.2.4 PTEN蛋白的检测 Western blotting检测PTEN蛋白的表达,将分选出CD4⁺T淋巴细胞加入100 μ l含PMSF的裂解液,于冰上裂解30min,摇匀。4 $^{\circ}$ C下12000r/min离心20min,取上清液,蛋白浓度采用免疫BCA法检测。上样15~20 μ l至SDS-PAGE胶电泳,半干法转膜40min。用25ml TBS洗

膜 5 min, 置于 25 ml 封闭缓冲液中 1 h, 室温摇动。1 : 2 500 稀释一抗在 4℃ 的温度下放置过夜, 脱色摇床上用 15 ml TBST 洗膜洗 3 次, 15 ml TBS 洗 1 次。采用辣根过氧化酶或碱性磷酸酶标记的二抗, 温敷育 2 h 后在双色红外激光成像系统扫描成像。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 15.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合正态分布的计量资料组间比较用独立样本 *t* 检验, 相关性分析采用 Pearson

检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者手术前后 PTEN mRNA 和蛋白表达情况的比较

观察组术后 PTEN mRNA 和蛋白与术前比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 术后高于术前。对照组术前、术后 PTEN mRNA 和蛋白的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者手术前后 PTEN mRNA 和蛋白表达情况比较 ($n=40, \bar{x} \pm s$)

组别	PTEN mRNA		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	PTEN 蛋白		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	术前	术后			术前	术后		
观察组	2.64 \pm 0.34	4.58 \pm 0.78	14.420	0.000	0.25 \pm 0.05	0.39 \pm 0.06	11.337	0.000
对照组	2.56 \pm 0.47	2.71 \pm 0.59	1.258	0.216	0.22 \pm 0.04	0.24 \pm 0.05	1.975	0.055

2.2 两组患者手术前后 TNF- α 、IL-10 的比较

观察组术后 TNF- α 、IL-10 与术前比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 观察组术后 TNF- α 低于术前, IL-10 高于术前。对照组术后 TNF- α 、IL-10 与术前比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 IL-10、TNF- α 与 PTEN 表达量的相关性分析

相关性分析显示, IL-10 与 PTEN 表达呈正相关 ($r=0.775, P=0.001$), TNF- α 与 PTEN 表达呈负相关 ($r=-0.846, P=0.000$)。

表 2 两组患者手术前后 TNF- α 、IL-10 的比较 ($n=40, \text{pg/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	IL-10		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	术前	术后			术前	术后		
观察组	7.89 \pm 0.78	4.83 \pm 0.76	17.771	0.000	7.41 \pm 0.85	11.25 \pm 1.04	18.081	0.000
对照组	7.33 \pm 0.82	7.61 \pm 0.74	1.603	0.117	7.86 \pm 0.91	7.59 \pm 0.76	1.440	0.158

3 讨论

缺血性脑血管疾病是由于脑组织缺血、缺氧而引起的疾病, 近年来发病率逐渐呈上升趋势。根据缺血部位不同, 患者出现不同的临床症状, 严重者可发展成为脑梗死, 出现肢体残疾甚至死亡, 严重影响患者生存质量。临床对缺血性脑血管疾病的治疗原则是有效疏通阻塞血管, 恢复脑组织的供血和氧供。介入治疗是治疗缺血性脑血管疾病的主要方法之一, 其微创、局部麻醉、患者术后恢复快, 能够改善患者的临床症状, 降低脑梗死发生的风险^[3]。有研究显示^[4], 脑血管介入术后可能存在一定的炎症反应, 血栓、炎症、平滑肌细胞增殖迁移是短暂性脑缺血发作介入术后血管再狭窄的 3 个重要阶段。田荣等^[5] 研究报道, 介入支架术

后颈动脉狭窄患者的 IL-6、TNF- α 、CRP 较术前有上升。炎症因子与缺血性脑血管疾病的发生有密切的关系, 一方面, 炎症因子能够释放可造成脑细胞损伤和血脑屏障破坏的蛋白水解酶、氧自由基、溶酶体酶等; 另一方面, 炎症因子还可直接或间接透过血脑屏障增加神经细胞膜的通透性, 引起脑组织缺血、缺氧甚至水肿。此外, 研究已证实, 大量炎症因子在动脉斑块形成、动脉硬化的发生、发展过程中起重要作用, 而动脉斑块形成导致的动脉狭窄是缺血性脑血管病的重要病因之一。

PTEN 是迄今发现的唯一具有蛋白脂酶和磷酸酶活性的人类肿瘤中存在表达缺失或突变的基因。既往研究^[6]发现, PTEN 可调控细胞的生长、黏连、迁移、侵袭和凋亡等正常发育过程。有研究^[7]在 LPS 介导

下敲除 *PTEN* 基因的巨噬细胞产生的 $\text{TNF-}\alpha$ 水平有所下降, 并推测 *PTEN* 可能是通过 PI3K-AKT 通路参与调控 LPS 诱导的巨噬细胞的炎症反应。另有研究^[8]发现, 在血管平滑肌细胞中抑制 *PTEN* 的表达能够促进炎症反应。本研究结果还显示, 通过阿托伐他汀干预的缺血性脑血管疾病介入手术的患者, 术后 *PTEN* mRNA 和蛋白表达量升高, 与对照组比较有差异。而对照组的 *PTEN* mRNA 和蛋白表达量手术前后未发生明显变化, 这提示阿托伐他汀的使用可能在一定程度上促进 *PTEN* 的上调。本研究结果显示, 观察组的术前、术后的 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-10 未发生明显变化, 而对照组 $\text{TNF-}\alpha$ 降低, IL-10 升高。相关性分析也显示, IL-10 与 *PTEN* 表达呈正相关, $\text{TNF-}\alpha$ 与 *PTEN* 表达呈负相关。这提示 *PTEN* 可能通过调控 $\text{CD4}^+\text{T}$ 淋巴细胞的炎症分泌促进 IL-10 的释放, 降低 $\text{TNF-}\alpha$ 的表达水平。庄献博等^[9]研究显示, 冠状动脉介入术后的 *PTEN* mRNA 和蛋白表达量下降, 认为介入手术可下调 *PTEN* 的水平来促进炎症反应发生, 造成心肌损伤。而阿托伐他汀能够在一定程度上减轻介入治疗缺血性脑血管疾病患者的炎症反应, 而其作用机制可能与 *PTEN* 的上调有关。阿托伐他汀是一种常见的心脑血管疾病的治疗药物, 除了能够调节血脂水平外, 还具有抗炎、增强免疫活性、改善血管内皮功能以及抗动脉粥样硬化的效果。阿托伐他汀能够通过纠正 Th17/Treg 失衡, 减轻缺血脑组织的炎症反应, 而本研究发现阿托伐他汀可能是通过上调 *PTEN* 的水平发挥对抗缺血性脑血管疾病患者术后炎症反应的功效。

综上所述, 介入手术后缺血性脑血管疾病患者存在炎症反应, 而服用阿托伐他汀可降低该炎症反应, 其作用机制可能与阿托伐他汀可上调 *PTEN* 的表达有关。

参 考 文 献:

- [1] 祖合热阿依·牙合甫, 党辉, 王成凤, 等. 神经介入治疗缺血性脑血管疾病的近、远期临床效果 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(7): 70-73.
- [2] 张桂玲. 临床护理路径模式在外科健康教育中的应用及效果 [J]. 中国实用医药, 2016, 11(1): 235-236.
- [3] 刘中光, 刘帆, 马玉恒, 等. 乌司他丁对缺血性脑血管病介入治疗患者血清白细胞介素-1, 白细胞介素含量及术后认知功能的影响 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2016, 37(7): 617-620.
- [4] 汪思嘉. $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+\text{Treg}$, Th1 和 Th17 细胞在脑动脉支架术后的炎症相关性分析 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2013.
- [5] 田荣, 毛更生, 李冬梅, 等. 介入支架植入术治疗颈动脉狭窄的临床研究及对炎症因子、凝血功能、神经功能的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(9): 1124-1128.
- [6] 秦光成, 谢景梅, 刘春晓, 等. *PTEN* 下调表达对反复发作性偏头痛大鼠模型行为学的影响 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2016, 22(1): 11-16.
- [7] 中国老年学学会心脑血管病专业委员会. 脂蛋白相关脂磷脂酶 A2 临床应用专家建议 [J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(10): 843-847.
- [8] 严焯, 冷狂风, 陈文丽. 依达拉奉联合银杏达莫对缺血性脑卒中患者血清白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平的影响 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(9): 1169-1171.
- [9] 庄献博, 徐光军, 王未飞, 等. 阿托伐他汀对急性脑梗死患者外周血辅助性 T 细胞 17 及调节性 T 细胞平衡的影响 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(10): 1096-1098.

(张西倩 编辑)