

论 著

PTE 患者整合素相关 mRNA 差异性表达的意义

解 元, 龚 朱, 王乐民

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(课题编号:30871080)

作者单位: 200065 上海, 同济大学附属同济医院心内科

作者简介: 解 元(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肺循环系统疾病。E-mail: sudika-luka@163.com

通讯作者: 王乐民(1954-), 男, 博士学位, 主任医师, 博士生导师, 教授, 研究方向: 肺循环系统疾病, 心脏疾病康复。

E-mail: wanglemin2003@163.com

【摘要】 目的 检测肺血栓栓塞症(PTE)患者整合素相关 mRNA 表达水平, 分析其差异表达的意义。**方法** 随机选取 20 例 PTE 患者为 PTE 组; 另选 20 例年龄、性别与之匹配的非 PTE 患者为对照组。提取外周血单个核细胞总 RNA, 应用人类全基因组表达谱芯片比较两组整合素相关 mRNA 表达的差异, 并进行 FQ-PCR 验证芯片的可靠性。差异基因筛选标准为 $P < 0.05$ 。**结果** 检测出白细胞相关整合素基因 mRNA 14 条, PTE 组 mRNA 表达部分高于对照组, 主要为 $\beta 1$ 及 $\beta 2$ 组, 差异具有统计学显著意义($P < 0.05$); 血小板相关整合素基因 mRNA 11 条, PTE 组表达上调的整合素占分布于血小板的所有整合素的 60%, 主要为 $\beta 1$ 及 $\beta 3$ 组, 有统计学显著意义($P < 0.05$); 其他整合素相关基因 mRNA 11 条中, 亦有部分表达显著上调或下调($P < 0.05$), 它们的主要配体均为纤维连接蛋白。**结论** PTE 中分布于白细胞以及血小板的大部分整合素表达异常上调, 纤维连接蛋白相关整合素表达亦有显著改变, PTE 可能与两者介导的炎症反应、血小板聚集相关。

【关键词】 肺血栓栓塞症; 基因芯片; 整合素; mRNA**【中图分类号】** R 543.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2009)12-1227-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.12.01

The significance of the differential expression of surface receptors mRNA of integrins in pulmonary thromboembolism patients XIE Yuan, GONG Zhu, WANG Le-min. Department of Cardiology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China

【Abstract】 Objective To detect surface receptors mRNA expression of integrins in pulmonary thromboembolism, to analyze the significance of its differential expression. **Methods** Twenty patients with PTE were enrolled in our study and the other twenty patients without PTE were allocated as controls. Total RNA was abstracted from isolated mononuclear cells in peripheral blood samples of twenty patients and controls. Significant differential mRNA expression of integrins receptors were analyzed by means of mRNA expression microarray. **Results** Fourteen pieces of mRNA fragments associated with leucocyte were screened and part of the genes were up-regulated in PTE group compared with control group ($P < 0.05$). The up-regulated mRNA fragments associated with leucocyte were mainly groups $\beta 1$ and $\beta 2$. Eleven pieces of mRNA fragments associated with platelet were screened and 60% of the genes were up-regulated in PTE group compared with control group ($P < 0.05$). The up-regulated mRNA fragments associated with platelet were mainly groups $\beta 1$ and $\beta 3$. Eleven pieces of other mRNA fragments were screened and part of the genes were up-regulated or down-regulated, of which ligands were mainly fibronectin. **Conclusion** A great part of integrins associated with leucocyte and platelet were up-regulated in PTE, and the integrins whose main ligand being fibronectin were also significantly different between PTE group and control group. Inflammation and platelet aggregation which was induced by them may be one important pathological mechanism of PTE.

【Key words】 Pulmonary thromboembolism; Gene chip; Integrins; mRNA

静脉血栓栓塞症(venous thromboembolism, VTE)主要包括肺血栓栓塞症(pulmonary thrombo-

embolism, PTE)和深静脉血栓形成(deep venous thrombosis, DVT)。PTE 指来自静脉系统或右心的

血栓阻塞肺动脉或其分支,引起以肺循环和呼吸功能障碍为主要临床和病理生理特征的疾病。VTE是由多种因素共同作用而导致的一类极其复杂的疾病,近几年的研究表明,在静脉血栓形成过程中,内皮、血小板和白细胞之间的黏附等起着核心作用^[1]。整合素(integrins)是细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAMs)的一大家族,广泛存在于细胞表面,介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的相互作用,参与细胞内外信息传递,是介导细胞粘附的分子基础。整合素在体内分布广泛,一种整合素可分布于多种细胞,同一种细胞也往往有多种整合素的表达,但某些整合素的表达有显著的细胞类型特异性。本实验采用人类全基因组表达谱芯片检测整合素相关基因 mRNA 在 PTE 中的表达,探讨整合素在 PTE 中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象 随机选取 2007 年同济大学附属同济医院收治的 20 例 PTE 患者为 PTE 组,男 11 例,女 9 例,年龄 44~89(70±14)岁,诊断标准参考《肺动脉血栓栓塞症诊断与治疗的建议》^[2]。对照组 20 例,为同期入院患者,男 11 例,女 9 例,年龄 44~91 岁,平均年龄(72±14)岁,对照组均排除动静脉血栓、先天性出血功能异常、服用激素或免疫抑制剂等,两组性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经本院医学伦理委员会批准,均征得患者的知情同意。

1.2 检测方法

1.2.1 血液总 RNA 的抽提及纯化 抽取外周新鲜静脉血 5 ml,存入含有 EDTA 抗凝管中,裂解红细胞,采用 Trizol 法抽提外周血单个核细胞总 RNA,并进行紫外分光光度计、琼脂糖凝胶电泳及 Lab-on-chip 检测以鉴定总 RNA 质量,经鉴定合格的总 RNA 进一步纯化用于芯片杂交。

1.2.2 基因芯片及检测 本实验所用的基因芯片购自美国 Agilent 公司,为人类全基因组 oligo 芯片,型号为 G4112F。行 RNA 定量,反转录合成双链 cDNA 并进行重化,随后进行体外转录合成带有生物标记(CY3)的 cRNA。使用 Cy3 NHS ester 荧光标记的 cRNA 与探针芯片进行杂交,洗涤,并用 Agilent 扫描仪扫描芯片杂交图像。

1.2.3 FQ-PCR 反检测 从芯片检测结果中随机抽取三条基因(CCL3L3、ZNF683、LBA1)及管家基因 GAPDH 进行 FQ-PCR 以验证基因芯片的可靠性。

1.3 统计学方法 使用 GeneSpring GX 数据分析

软件对基因芯片原始荧光信号进行背景、标准化参数设定及稳健多芯片平均标准化分析处理,尽量减少芯片及实验操作员等系统误差,得到标准化基因信号强度。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,将 PTE 组与对照组标准化基因信号强度进行两类样本比较随机方差参数 t 检验,差异基因筛选标准为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 总 RNA 鉴定 将提取的总 RNA 经琼脂糖电泳鉴定,可清晰看到 RNA 28S 和 18S 两条带,其亮度比值约为 2:1,并隐约可见 5S 条带,表明 RNA 完整,没有降解,符合试验要求;通过紫外分光光度计检测样品 RNA 的 OD260、OD280 值,两者比值为 1.83~2.1。部分样本全血总 RNA 进行了 Agilent 2100 Bioanalyzer 质控检测,证实已经提取到高纯度的总 RNA。

2.2 FQ-PCR 检测结果 证实 CCL3L3、ZNF683、LBA1 的 FQ-PCR 检测结果和芯片检测结果基本一致,证明基因芯片结果是准确可靠的。

2.3 白细胞相关整合素基因芯片检测结果 筛选出白细胞相关整合素基因 mRNA14 条(ITGA1、ITGA4、ITGA5、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB1、ITGB1BP1、ITGB1BP2、ITGB1BP3、ITGB2、ITGB7)。在这 14 条 PTE 组白细胞相关整合素基因 mRNA 中,有 5 条(ITGA5、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB1)表达较对照组上调($P<0.05$),2 条(ITGB1BP3、ITGB7)表达较对照组下调($P<0.05$),其中 ITGA5、ITGAM、ITGAX 表达显著上调($P<0.01$)。见图 1。

2.4 血小板相关整合素基因芯片检测结果 筛选出血小板相关整合素基因 mRNA11 条(ITGA2、ITGA2B、ITGA5、ITGA6、ITGAV、ITGB1、ITGB1BP1、ITGB1BP2、ITGB1BP3、ITGB3、ITGB3BP),其中 ITGB1、ITGB1BP1、ITGB1BP2、ITGB1BP3 同时是白细胞相关整合素基因 mRNA。在这 11 条 PTE 组血小板相关整合素基因 mRNA 中,有 5 条(ITGA2B、ITGA5、ITGAV、ITGB1、ITGB3)表达较对照组上调($P<0.05$),1 条(ITGB1BP3)表达较对照组下调($P<0.05$),其中 ITGA2B、ITGA5、ITGAV、ITGB3 表达显著上调($P<0.01$)。见图 2。

2.5 其他整合素相关基因芯片检测结果 筛选出其他整合素相关基因 mRNA11 条(ITGA3、ITGA7、ITGA8、ITGA9、ITGA10、ITGA11、ITGB4、ITGB4BP、ITGB5、ITGB6、ITGB8),其中有 3 条(ITGA7、ITGA11、ITGB5)表达较对照组上调($P<0.05$),3 条

(ITGA8、ITGB6、ITGB8) 表达较对照组下调 ($P < 0.05$), 其中 ITGA7 表达显著上调 ($P < 0.01$), IT-

GA8、ITGB6、ITGB8 表达显著下调 ($P < 0.01$)。见图 3。

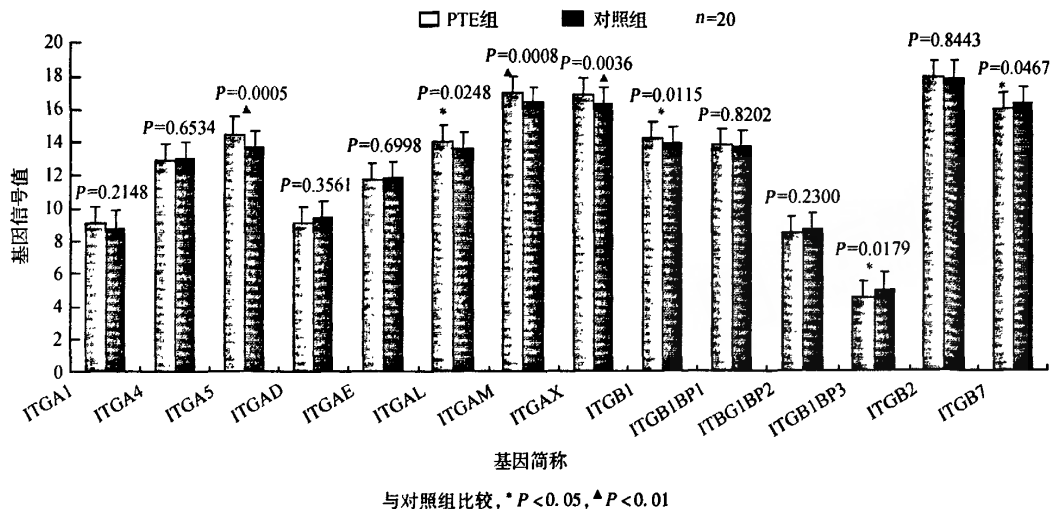


图 1 白细胞相关整合素基因 mRNA 差异性表达

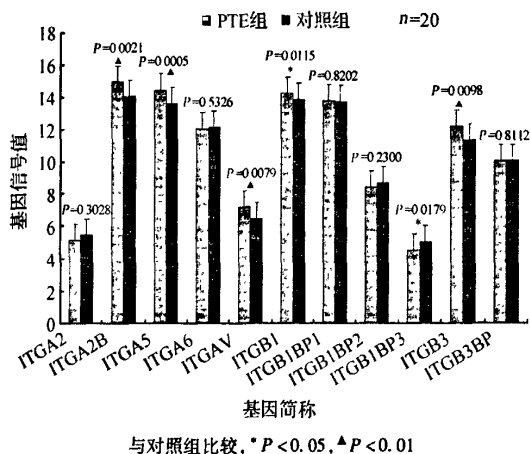


图 2 血小板相关整合素基因 mRNA 差异性表达

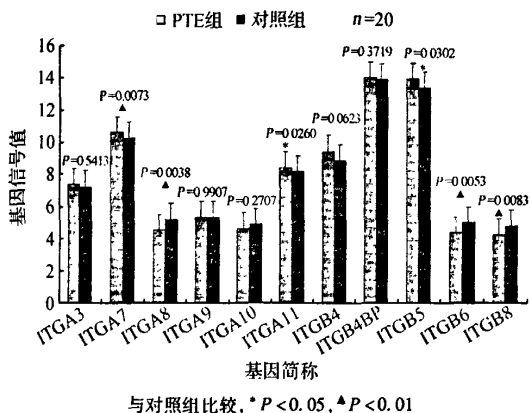


图 3 其他整合素基因 mRNA 差异性表达

3 讨论

传统理论上认为血栓形成只是一种血管或血液疾病,炎症与血栓形成是两个互相独立的病理过程,但近年来随着研究的深入,学者们发现在静脉血栓形成过程中必会发生炎症细胞浸润,在血栓部位除了红细胞、血小板的大量聚集外,还可以见到大量白细胞聚集,血小板的聚集和炎症反应贯穿了血栓形成的全过程^[3-5]。本文根据整合素在机体的主要分布情况,将整合素相关基因 mRNA 分为白细胞相关、血小板相关以及其他整合素三类分别加以分析。

3.1 白细胞相关整合素基因 mRNA (1) 近年有学者研究发现,在血栓形成的起始阶段,主要是白细胞向内皮的粘附和迁移。白细胞粘附内皮,引起内皮细胞屏障的破坏,暴露充满胶原的基底膜引起血栓形成以及血栓的增殖,随后白细胞跨内皮迁移,进一步导致血管壁的损伤,加重血栓的程度,这主要表现在动脉血栓形成过程中,而关于其在静脉血栓形成过程中的报道较少^[6]。有报道整合素家族中的 $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4)、 $\beta 2$ 组在白细胞与内皮细胞的粘附中、后期以及白细胞向内皮的迁移过程中,均有重要作用。在本研究中的 14 条白细胞相关整合素基因 mRNA 中,有 35.71% (5 条) 表达较对照组上调,其中 21.43% (3 条) 表达显著上调,另有 14.29% (2 条) 表达下调,共 50% 较对照组出现表达差异。在表达上调的 5 条 mRNA 中,ITGAL、ITGAM、ITGAX 的转录产物 (αL 、 αM 、 αX 亚单位) 均可同 $\beta 2$ 亚单位

共同组成 $\beta 2$ 组整合素,特异性的分布于白细胞表面;ITGA5、ITGB1 的转录产物分别为 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 亚单位, $\beta 1$ 亚单位可同 $\alpha 1$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 等多种 α 亚单位共同组成 $\beta 1$ 组整合素。在表达下调的 2 条 mRNA 中,ITGB1BP3 转录产物为 $\beta 1$ 整合素连接蛋白 3;ITGB7 转录整合素的 $\beta 7$ 亚单位,可分别同 αE 、 $\alpha 4$ 两种亚单位结合。(2)本研究结果显示, $\beta 2$ 组整合素的 3 个 α 亚单位 mRNA 表达均有上调,但 $\beta 2$ 亚单位的表达没有显著差异,考虑可能同 α 、 β 两类亚单位功能不同所致, αL 、 αM 、 αX 亚单位主要功能为同各自配体连接,提供信号,而 $\beta 2$ 亚单位则仅负责信号的转导,由此提示,在静脉血栓形成过程中, $\beta 2$ 组整合素同其配体之间的作用在白细胞同静脉壁内皮的相互作用过程中加强,即粘附作用加强。 $\beta 1$ 组整合素中,仅有 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 亚单位表达上调,而 $\alpha 1$ 、 $\alpha 4$ 亚单位表达没有显著差异;由于 $\alpha 5\beta 1$ 同时存在于血小板表面,考虑 $\alpha 5$ 亚单位的表达上调可能同时存在白细胞与血小板两者的因素。由此,考虑可能在静脉血栓栓塞过程中, $\beta 1$ 组整合素同其配体的连接作用并未加强,而信号转导功能增强,同样可以加强白细胞同静脉壁内皮之间的粘附。在表达上调的 4 条白细胞相关整合素基因 mRNA 中,ITGAM 与 ITGAX 的表达显著上调,其中 ITGAM 分布于单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞,ITGAX 分布于单核细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞以及部分淋巴细胞,而表达未见显著上调的 ITGAL 广泛分布于各种白细胞上,提示在静脉血栓栓塞症中,中性粒细胞以及单核细胞作用较大。来自美国的 Wakefield TW 曾报道静脉血栓形成可能同静脉壁的中性粒细胞、单核细胞浸润有关,意大利的 Caimi G、我国的周翔宇等亦有研究报道提示静脉血栓形成过程中存在中性粒细胞的异常活化^[7-10]。

3.2 血小板相关整合素基因 mRNA (1)血小板表达的整合素有 5 种: $\alpha II\beta 3$ (GP II b/III a)、 $\alpha V\beta 3$ 、 $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$,其中 GP II b/III a 在血小板分布最广,在血小板聚集作用最大,也最受研究者们关注。关于其它 4 种血小板整合素的报道相对较少,目前所得到的结论是: $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$ 可分别与胶原蛋白、纤维连接蛋白、层粘连蛋白连接,参与正常止血及血栓形成等过程, $\alpha V\beta 3$ 则主要与玻粘蛋白、骨桥蛋白结合,骨桥蛋白存在于动脉粥样硬化的斑块及受损的血管中。在本研究中的 11 条血小板相关整合素基因 mRNA 中,有 45.45% (5 条)表达较对照组上调,其中 36.36% (4 条)表达显著上调,

另有 9.09% (1 条)表达下调,共 54.55% 较对照组出现表达差异。在表达上调的 5 条 mRNA 中,ITGA2B、ITGA5、ITGAV、ITGB1、ITGB3 的转录产物(αII 、 $\alpha 5$ 、 αV 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 亚单位)共可组成 3 种分布于血小板的整合素,即 $\alpha II\beta 3$ 、 $\alpha V\beta 3$ 、 $\alpha 5\beta 1$,占有血小板表达的整合素的 60%。(2)GP II b/III a 是一类血小板释放因子,是血小板聚集、细胞外基质扩布及血块收缩过程中的必需要素。它在正常血液循环中处于静止状态,只有在受到来自血小板、活化的抗体或可溶性激动剂(如凝血酶、TXA-2)等的刺激时才发挥作用。本研究中,GP II b/III a 的两个亚单位,即 αII 、 $\beta 3$ 的表达均有显著上调,提示在静脉血栓栓塞过程中,血小板活化,刺激 GP II b/III a 释放,使之通过与邻近血小板的可溶性纤维蛋白原(soluble fibrinogen)或 VIII 因子(von Willebrand factor, VWF)之间的交叉耦合成血小板的聚集,并通过同配体的连接加强血小板在细胞外基质中的扩布,通过与纤维蛋白的连接使血块发生收缩,从而介导局部血栓形成。约有 70% 的 GP II b/III a 存在于静息的血小板表面,剩余 30% 以隐蔽状态分布在开放管道系统和血小板 α 颗粒上,当静脉血管内皮受到损伤血小板活化时,隐蔽状态的 GP II b/III a 复合物全部表达在膜表面,同时空间构型改变,暴露纤维蛋白原受体的结合部位,获得受体活性,从而导致纤维蛋白原构型变化,进一步加速血小板的活化和释放反应。 $\alpha V\beta 3$ 可同纤维连接蛋白、玻粘蛋白、骨桥蛋白、纤维蛋白原、VIII 因子等多种配体连接,在机体中参与血管重塑、血栓形成、新生血管形成等多种病理生理过程。研究表明, $\alpha V\beta 3$ 同骨桥蛋白之间的相互作用使它在动脉血栓的形成中发挥重要作用,但关于它在静脉血栓形成中的作用报道甚少。本研究结果提示 $\alpha V\beta 3$ 的两个亚单位的表达均有显著上调,表明 $\alpha V\beta 3$ 在静脉血栓形成中也有重要作用,目前考虑可能机制为: $\alpha V\beta 3$ 表达显著上调后,同分布于静脉内皮细胞的纤维连接蛋白、骨桥蛋白、纤维蛋白原、VIII 因子相互连接,导致血液粘滞度升高,引起静脉血栓的形成。前面已述, $\alpha 5\beta 1$ 既分布于血小板表面,也分布于单核细胞、淋巴细胞表面,它的主要配体是纤维连接蛋白,同时也是层粘连蛋白的配体。纤维连接蛋白主要参与血小板聚集,提示可能主要是分布于血小板的 $\alpha 5\beta 1$ 表达上调。

3.3 其他整合素相关基因 mRNA (1)在其他 11 条整合素相关基因 mRNA 中,有 27.27% (3 条)表达较对照组上调,其中 9.09% (1 条)表达显著上

调,另有 27.27% (3 条)表达显著下调,共 54.55% (6 条)较对照组出现表达差异。在表达上调的 3 条基因 mRNA 中,ITGA11、ITGA7 的转录产物 $\alpha 11$ 、 $\alpha 7$ 亚单位均可同 $\beta 1$ 亚单位共同组成 $\beta 1$ 组整合素, $\alpha 11\beta 1$ 的配体为胶原蛋白, $\alpha 7\beta 1$ 的配体为层粘连蛋白;ITGB5 的转录产物 $\beta 5$ 亚单位可以同 αV 亚单位组成 $\alpha V\beta 5$,其配体为纤维连接蛋白 (fibronectin),同时, αV 、 $\beta 1$ 亚单位的基因 mRNA 表达也有上调。目前关于 $\alpha 7\beta 1$ 、 $\alpha 11\beta 1$ 、 $\alpha V\beta 5$ 的具体作用机制尚需探讨,考虑这 3 种整合素在静脉血栓形成过程中表达整体上调,提示胶原蛋白、层粘连蛋白、纤维连接蛋白在静脉血栓形成过程中同整合素之间的连接加强,信号转导增强。而在表达显著下调的 3 条基因 mRNA 的转录产物中, $\alpha 8$ 同 $\beta 1$ 亚单位组成 $\alpha 8\beta 1$, $\beta 6$ 、 $\beta 8$ 则分别同 αV 亚单位组成 $\alpha V\beta 6$ 、 $\alpha V\beta 8$,3 组整合素的主要配体均为纤维连接蛋白。过去关于纤维连接蛋白在动脉血栓形成过程中的作用报道较多,但尚缺少它在静脉血栓形成过程中作用的报道,本研究结果提示纤维连接蛋白在静脉血栓形成过程中同整合素的连接作用有显著加强或者减弱,目前具体机制尚需进一步探讨。值得一提的是,在静脉血栓形成过程中,纤维连接蛋白的多个整合素受体 $\alpha V\beta 5$ 、 $\alpha 8\beta 1$ 、 $\alpha V\beta 6$ 、 $\alpha V\beta 8$ 的表达水平改变并不一致,其原因尚待研究。(2) 本研究结果显示,在静脉血栓形成过程中,白细胞相关整合素基因 mRNA 中有部分表达上调,主要为 $\beta 1$ 及 $\beta 2$ 组;血小板相关整合素基因 mRNA 中,表达上调的整合素占分布于血小板的所有整合素的 60%,主要为 $\beta 1$ 及 $\beta 3$ 组。提示分布于白细胞的整合素在静脉血栓形成过程中发挥部分作用,而分布于血小板的整合素在静脉血栓形成过程中发挥较大作用, $\beta 1$ 组整合素表达的的上调可能同白细胞及血小板两者同时相

关。在其他整合素相关基因 mRNA 中,亦有部分表达上调或下调,它们的主要配体为纤维连接蛋白,提示纤维连接蛋白在静脉血栓形成过程中也发挥一定作用,但具体机理尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Smith A,Quarmby JW,Collins M,et al. Changes in the levels of soluble adhesion molecules and coagulation factors in patients with deep vein thrombosis[J]. *Thromb Haemost*,1999,82(6):1593-1599.
- 2 王仕华,王乐民,王 辰,等. 肺动脉血栓栓塞症诊断与治疗的建议[J]. *中国医药导刊*,2001,3:401-417.
- 3 Becattini C,Agnelli G. Pathogenesis of venous thromboembolism[J]. *Curr Opin Pulm Med*,2002,8(5):360-364.
- 4 Quarmby J,Smith A,Collins M,et al. A model of in vivo human venous thrombosis that confirms changes in the release of specific soluble cell adhesion molecules in experimental venous thrombogenesis[J]. *J Vasc Surg*,1999,30(1):139-147.
- 5 Poredos P,Jezovnik MK. The role of inflammation in venous thromboembolism and the link between arterial and venous thrombosis[J]. *Int Angiol*,2007,26(4):306-311.
- 6 Prescott SM,Weyrich AS,Zimmerman GA. Classification of venous thromboembolism(VTE). The clot is hot:inflammation,myeloid leukocytes,and venous thromboembolism[J]. *J Thromb Haemost*,2005,3(11):2571-2573.
- 7 Wakefield TW,Strieter RM,Prince MR,et al. Pathogenesis of venous thrombosis:A new insight[J]. *Cardiovasc Surg*,1997,5(1):6-15.
- 8 周翔宇,何延政,何春水,等. 急性下肢深静脉血栓形成患者 CD62L 和 CD11b/CD18 表达的意义[J]. *泸州医学院学报*,2007,30(5):352-355.
- 9 Reiter M,Bucek RA,Koca N,et al. Deep vein thrombosis and systemic inflammatory response:A pilot trial[J]. *Wien Klin Wochenschr*,2003,115(3-4):111-114.
- 10 Caimi C,Canino B,Ferrara F,et al. Polymorphonuclear leukocyte integrins in deep venous thrombosis[J]. *Clin Appl Thromb Hemost*,2005,11(1):95-97.

[收稿日期 2009-09-07][本文编辑 韦挥德 黄晓红]

《中国临床新医学》杂志投稿须知

凡投本刊的稿件,务请补全以下内容与项目:

1. 中文摘要、关键词(按规范格式书写)。
2. 英文题目,作者(汉拼),英文单位名称,英文摘要和关键词(按规范格式书写)。
3. 论文的统计学处理方法。
4. 单位投稿介绍信。
5. 作者简介(姓名、性别、出生年月、学历、学位、职称、研究方向)。
6. 须寄(送)A4 纸打印稿一份,并发电子邮件到本编辑部。
6. 第一作者联系地址、邮编、电话和 E-mail。

• 本刊编辑部 •