

慢性阻塞性肺疾病相关性肺动脉高压患者 外周血单核细胞 Rho 激酶水平测定

蔡茜¹, 吴尚洁², 赵雪峰²

(1. 长沙市第三医院呼吸科, 长沙 410015; 2. 中南大学湘雅二医院呼吸科, 长沙 410011)

[摘要] 目的: 通过比较 Rho 关联含卷曲螺旋蛋白激酶 1(Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1, ROCK1) 在不同研究对象外周血单核细胞中的表达规律, 探讨 RhoA/Rho 激酶信号通路在慢性阻塞性肺疾病相关肺动脉高压中的作用。**方法:** 选取 2010 年 12 月至 2011 年 4 月在长沙市第三医院体检的健康不吸烟者 10 人(A 组), 同期同院呼吸内科住院的慢性阻塞性肺疾病不合并肺动脉高压者 10 人(B 组), 以及同期同院呼吸内科住院的慢性阻塞性肺疾病相关性肺动脉高压患者 10 人(C 组)。分别抽取各研究对象静脉血 20 mL, 以 percoll 非连续密度梯度离心沉降法分离单个核细胞, 并培养使单核细胞贴壁。刮下贴壁细胞裂解后取上清液, 用 ELISA 法分别检测 3 组 ROCK1 水平。所有研究对象经肺功能仪检查肺功能, 以彩色多普勒测定肺动脉收缩压。**结果:** 1) 3 组研究对象中 C 组肺动脉收缩压显著高于 A 组与 B 组, (均 $P < 0.01$)。2) 3 组研究对象中 C 组外周血单核细胞 ROCK1 水平高于 A、B 两组 (均 $P < 0.05$); B 组外周血单核细胞 ROCK1 水平高于 A 组 ($P < 0.05$)。3) 3 组研究对象中外周血单核细胞中 ROCK1 水平与肺动脉收缩压呈正相关关系 ($r = 0.661, P < 0.05$)。4) 3 组研究对象中外周血单核细胞中 ROCK1 水平与肺功能 FEV1% 无相关关系 ($r = 0.131, P > 0.05$)。**结论:** Rho 激酶在肺动脉高压发病机制中具有重要意义; 单核细胞中 ROCK1 水平可能反映慢性阻塞性肺疾病相关性肺动脉高压患者的病情严重程度。

[关键词] 肺动脉压; 慢性阻塞性肺疾病; ROCK1; 单核细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.05.004

Measurement of Rho-kinase in peripheral blood monocytes in patients with pulmonary arterial hypertension related to chronic obstructive pulmonary diseases

CAI Qian¹, WU Shangjie², ZHAO Xuefeng²

(1. Department of Respiratory Disease, Third Hospital of Changsha, Changsha 410015;

2. Department of Respiratory Disease, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT

Objective: To determine effects of the RhoA/Rho kinase signaling pathway on patients with pulmonary arterial hypertension related to chronic obstructive pulmonary diseases by testing levels of Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1(ROCK1) in peripheral blood monocytes in healthy subjects, patients with chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), and patients

收稿日期 (Date of reception): 2011-05-14

作者简介 (Biography): 蔡茜, 主治医师, 硕士研究生, 主要从事慢性阻塞性肺疾病方面的研究。

通信作者 (Corresponding author): 吴尚洁, Email: wushangjie@medmail.com.cn

with pulmonary arterial hypertension related to COPD.

Methods: Ten healthy subjects (Group A), 10 patients with COPD (Group B), and 10 patients with pulmonary arterial hypertension related to COPD (Group C) were enrolled, all of whom were hospitalized in the Third Hospital of Changsha between Dec. 2010 and Apr. 2011. Twenty-milliliters of blood was collected from each subject. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated by Percoll® and, monocytes were incubated. Levels of ROCK1 in the three groups were measured by ELISA. The pulmonary function was measured by spirometric tests, and the pulmonary arterial systolic pressure (PASP) was detected by color Doppler echocardiogram.

Results: 1) The PASP in Group C was significantly higher than that of Groups A and B ($P < 0.01$). 2) The levels of ROCK1 in monocytes of Group C were higher than those of Groups A and B ($P < 0.05$). The levels of ROCK1 in monocytes of Group B were higher than those of Group A ($P < 0.05$). 3) The levels of ROCK1 in monocytes of the three groups showed a positive correlation with PASP ($r = 0.661, P < 0.05$). 4) The levels of ROCK1 in monocytes of the three groups showed a negative correlation with forced expiratory volume at the first second/ forced vital capacity (FEV1%) ($r = 0.131, P > 0.05$).

Conclusion: Rho kinase plays a key role in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. The ROCK1 may be a marker of the severity of pulmonary arterial hypertension related to COPD.

KEY WORDS

pulmonary arterial pressure; chronic obstructive pulmonary diseases; ROCK1; monocytes

肺动脉高压 (pulmonary arterial pressure, PAH) 是一组预后不良的疾病, 以增高的肺动脉压力和阻力为特征。肺动脉高压的定义为静息状态右心导管测定平均肺动脉压 ≥ 25 mmHg^[1-3]。发病机制为: 低氧性血管收缩、充气过度的机械刺激、毛细血管的缺失、炎症、吸烟的毒性损伤^[4-6]。慢性缺氧及慢性炎症是慢性阻塞性肺疾病 (chronical obstructive pulmonary diseases, COPD) 相关肺动脉高压的主要发病原因。COPD 是以不完全可逆的气流受限为特点, 气流受限呈进行性加重, 且多与肺部对有颗粒和气体的异常炎症反应有关的呼吸道疾病, 其本质是小气道炎症, 也是一种全身炎症性疾病^[2]。RhoA/Rho 激酶信号通路是机体各组织中普遍存在的一条信号转导通路。它伴随多种炎症介质和细胞因子受体后偶联机制的活化而激活, 通过激酶级联反应直接参与细胞内微丝骨架构型的调控。单核细胞等炎症细胞以及其分泌的细胞因子在 COPD 相关肺动脉高压的发病机制中起着重要的作用。而 RhoA/Rho 激酶信号通路被认为可以影响细胞移动、黏附、增殖、基因表达及对钙离子的敏感性收缩, 是控制这些细胞行为的直接上游信号通路。本研究通过酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定健康不吸烟人群、COPD 不合并肺动脉高压患者及 COPD 相关肺动脉高压患者外周血单核细胞中 Rho 关联含卷曲螺旋蛋白激酶

1 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1, ROCK1) 水平, 比较 3 组患者血清、外周血单核细胞中 ROCK1 中的表达规律, 探讨 RhoA/Rho 激酶信号通路在 COPD 相关肺动脉高压中的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取 2010 年 12 月至 2011 年 4 月在长沙市三医院接受健康体检检查的健康不吸烟者 10 人 (A 组)、呼吸内科住院的 COPD 不合并肺动脉高压者 10 人 (B 组) 以及呼吸内科住院的 COPD 相关肺动脉高压患者 10 人 (C 组)。A 组被试者经问诊和常规体格检查排除肿瘤、全身各器官系统急、慢性疾病, 肺功能及胸片检查正常。B 组及 C 组患者均符合中华医学会呼吸分会 2009 年制定的慢性阻塞性肺疾病诊断标准; 即患者有反复发作的咳嗽、咳痰, 每年发作超过 3 个月以上, 且连续 2 年以上, 体格检查有肺气肿体征, 肺功能检查示吸入支气管扩张剂 (沙丁胺醇 400 μ g) 后第一秒用力呼气容积 / 用力肺活量 (the forced expiratory volume at the first second/ forced vital capacity, FEV1/FVC) $< 70\%$ 。C 组患者还同时符合 2009 年欧洲心脏病学会肺动脉高压诊治指南中肺动脉高压的诊断标准; 即经心脏彩色多普勒超声心

动图(美国 HP 公司)证实静息状态时平均肺动脉压 ≥ 25 mmHg, 并伴有气促、下肢浮肿等肺动脉高压表现。所有研究对象年龄、性别、体质量上匹配, 均排除合并心脑血管疾病、慢性肝病、结缔组织病、恶性肿瘤、消化系统疾病、急性感染性疾病等肺外疾病。如合并支气管哮喘、支气管扩张、肺结核、肺栓塞等其他肺部疾病也不纳入研究中。且均无服用他汀类药物(有研究^[7-9]表明该药物能降低 ROCK 活性)史。

1.2 肺功能检查

所有研究对象在肺功能室行肺功能检查, 检查前一天未使用 β_2 -受体激动药、抗胆碱能药物、茶碱类药物以及糖皮质激素。主要测定指标为: FVC, FEV1, FEV1/FVC 及 FEV1 占预计值的百分比 (FEV1%)。

1.3 肺动脉压力测定

研究对象均通过彩色多普勒超声心动图检测安静状态下肺动脉收缩压 (pulmonary arterial systolic pressure, PASP)。根据简化的 Bernoulli 公式^[10], 三尖瓣峰压力梯度 = $4 \times$ (三尖瓣返流速度), $PASP =$ 三尖瓣返流压力梯度 + 右心房血压的估计值。右心房血压通常可以通过下腔静脉的直径和呼吸变异来估计, 一般的估值在 5~10 mmHg 之间。这种 PASP 的预测法准确, 并已被证明与经右心导管测量的肺心病患者血流动力学数据有良好关联性 (高达 97%)^[11]。肺动脉平均压 = $0.61 \times PASP + 2$ mmHg^[4]。

1.4 外周血单核细胞的提取

1) 抽各研究对象空腹静脉血 20 mL, 并以 0.5 mmol/L 的 EDTA 0.3 mL 抗凝后置入 50 mL 离心管中, 加入 6% 羟乙基淀粉 (美国 DUPONT 公司) 4 mL, 轻轻混匀后离心 (1000 r/min, 共 15 min, 20℃)。

2) 将上层液体 (弃去下层红细胞) 吸出放入 50 mL 离心管中, 加入 15 mL 0.1 mmol/L PBS (湘雅二医院中心实验室配制) 离心 (1500 r/min, 共 15 min, 20℃), 得到离心管底部的白细胞沉淀。去除上清液, 将白细胞吹匀后再加入 15 mL 0.1 mmol/L PBS, 将所得细胞洗涤 2 遍并离心 (2000 r/min, 共 6 min, 20℃), 备用。

3) 配制不同密度的 Percoll® 液: 先将 9 份 Percoll® 原液 (密度 1.131) (北京索莱宝科技有限公司) 与 1 份 9% 氯化钠混合配制成 100% Percoll® (密度约 1.127)。调整 pH 值至 7.4; 将 7 份 100% Percoll® 与 3 份 0.9% 氯化钠混合配制成 70% Percoll® (密度约 1.090); 将 6 份 100% Percoll® 与 4 份 0.9% 氯化钠混合配制成 60%

Percoll® (密度约 1.077); 最后将 3 份 100% Percoll® 与 7 份 0.9% 氯化钠混合配制成 30% Percoll®。

4) 取一 15 mL 离心管, 用新生牛血清 (杭州四季青生物制剂公司) 将管壁湿润后弃去血清 (有利于 Percoll® 液的分层加入), 再依次加入 70% Percoll® 及 60% Percoll® 各 3 mL, 30% Percoll® 2 mL 以及步骤 2 中所得的白细胞悬液。离心 (2500 r/min, 共 25 min, 20℃)。根据细胞的不同的漂浮密度 (表 1), 70% Percoll® 与 60% Percoll® 之间的为中性粒细胞, 60% Percoll® 与 30% Percoll® 之间的为单个核细胞。

表 1 人不同血细胞的悬浮密度

Table 1 Suspended density of different blood cells

	红细胞	中性粒细胞	单核细胞	淋巴细胞
密度	1.09~1.11	1.080~1.085	1.050~1.066	1.052~1.077

5) 用毛细吸管小心将单个核细胞层移出, 放入 15 mL 离心管中, 加 0.1 mmol/L PBS 10 mL 后洗涤 2 遍 (2000 r/min, 共 6 min, 20℃), 以去除残存的 Percoll® 液与血小板。

6) 将所得的单个核细胞以 1×10^6 /孔培养于 12 孔培养板 (美国 Corning 公司) 中。使用 1640 培养基在 37℃, 5% CO₂ 条件下 (CO₂ 孵育箱由美国 Forma 公司提供) 孵育 3 h 后, 以 0.1 mmol/L PBS 轻轻冲去未贴壁细胞, 再用细胞刮将贴壁细胞刮下, 用瑞氏染色法鉴定, 单核细胞在 95%。将贴壁细胞刮下后以 0.1 mmol/L PBS 洗涤 2 遍, 再将细胞悬液存放于 -80℃ 低温冰箱 (美国 FORMA 公司) 中。以上操作均在无菌条件下进行。

1.5 ROCK1 水平测定

将单核细胞以超声波法裂解后取上清液, ROCK1 检测采用固相夹心酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法, 试剂盒由美国 D&G 公司提供。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。方差齐性用 Levene 法检验, 在方差齐性基础上, 多组间均数比较采用单因素方差 (ANOVA) 分析。检验水准取 $\alpha = 0.05$, 双侧 $P < 0.05$ 为有统计学意义。对有相关趋势的变量采用直线相关分析, $P < 0.05$ 为有相关关系。

2 结果

2.1 3 组研究对象的一般情况比较

3 组研究对象之间的年龄、性别、体质量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); C 组 PASP 明显高于 A、B 两组 ($P < 0.01$); B 组 PASP 高于 A 组 ($P < 0.05$, 表 2)。

2.2 3组外周血单核细胞中 ROCK1 水平的比较

C组单核细胞中 ROCK1 水平高于 A组和 B组 ($P<0.05$); B组单核细胞中 ROCK1 水平高于 B组 ($P<0.05$, 表 3)。

表 2 3组研究对象的一般情况 ($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	男/女	年龄/岁	PASP/mmHg	FEV1%
A组	5/5	62.5 ± 7.0	22.86 ± 3.73	85.6 ± 3.9
B组	7/3	63.7 ± 9.0	26.60 ± 4.88 [*]	57.8 ± 5.2 [*]
C组	6/4	65.4 ± 8.0	61.89 ± 9.75 ^{***}	55.6 ± 4.3 [*]

与 A组比较, ^{*} $P<0.05$; ^{**} $P<0.01$; 与 B组比较, ^{***} $P<0.01$ 。

表 3 3组研究对象单核细胞中 ROCK1 水平比较 ($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	单核细胞计数 / ($\times 10^8/L$)	单核细胞中 ROCK1 水平 / (pmol/L)
A组	1.72 ± 0.20	38.5 ± 3.6
B组	2.73 ± 0.41 [*]	41.2 ± 3.0 [*]
C组	4.02 ± 1.84 ^{**}	45.9 ± 5.1 [*]

与 A组比较, ^{*} $P<0.05$; 与 B组比较, ^{**} $P<0.05$ 。

2.3 3组外周血单核细胞 ROCK1 水平与 PASP 相关性分析

3组研究对象外周血单核细胞中 ROCK1 水平与 PASP 呈正相关 ($r=0.661, P<0.05$)。

2.4 3组外周血单核细胞 ROCK1 水平与肺功能 FEV1% 相关性分析

3组研究对象外周血单核细胞中 ROCK1 水平与肺功能 FEV1% 无相关关系 ($r=0.131, P>0.05$)。

2.5 3组 PASP 与 FEV1% 相关性分析

3组研究对象 PASP 与肺功能 FEV1% 无相关关系 ($r=0.178, P>0.05$)。

2.6 3组单核细胞计数比较

本实验对 3组研究对象中各血液样本进行单核细胞计数, 并进行比较。结果显示 C组单核细胞计数高于 A、B 两组, B组高于 A组 ($P<0.05$, 表 3)。

3 讨论

目前细胞因子炎症学说认为在 COPD 患者气道、肺实质和血管中存在着慢性炎症。多种炎症细胞、细胞因子及炎症介质相互作用共同参与炎症过程, 导致气道壁的受损和肺组织的破坏, 并最终导致肺气肿。当机体受到吸烟、感染及环境等因素的刺激后, 单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等迅速

合成和释放细胞因子, 诱导血管内皮细胞增加黏附分子合成, 激活白细胞表面的黏附分子使其表达上调, 使白细胞快速黏附、渗出, 参与炎症反应^[11]。根据目前数据显示, 因呼吸衰竭入院的 COPD 患者, 其肺动脉高压发生率为 20%; 虽然总体上严重程度较轻, 但进展性 COPD 患者, 肺动脉高压的发生率高 ($>50%$)^[12-13]。本实验发现肺动脉压的上升与 COPD 的严重程度不成正比, 肺功能很差的病人不一定有肺动脉高压, 这一点与以上研究相符。Rho 激酶又称为 Rho 相关激酶, 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员, 以两种同源性极高的异构体形式存在 (ROCK1 和 ROCK2), 是目前功能研究最为清楚的 Rho 下游靶效应分子。有研究^[14-15]表明缺氧可引起 Rho/ROCK 信号通路活化, 而活化的 ROCK 可对其底物肌球蛋白磷酸酶进行磷酸化修饰, 使肌球蛋白轻链 (MLC) 不能脱磷酸化, 从而提升肌球蛋白轻链磷酸化水平, 引起细胞肌动蛋白聚合增加、应力纤维形成与局部黏附激酶活化, 进而影响细胞移动、黏附、增殖、基因表达^[14-17], 使肺动脉管壁增厚、管腔狭窄甚至闭锁, 从而导致肺动脉高压^[17]。

本实验研究了 COPD 相关肺动脉高压患者外周血中重要的炎症细胞——单核细胞中 ROCK1 水平与肺动脉高压的关系, 发现 ROCK1 水平是随着肺动脉压升高而上升, 二者为正相关关系, 还发现 3组研究对象中 COPD 相关肺动脉高压患者外周血单核细胞计数较另两组高, 提示 ROCK1 水平升高可能与炎症细胞增多有关。这与众多研究^[14-16]表明 RhoA/Rho 激酶通路可影响细胞增殖的观点相符。推测肺及系统性炎症引起肺血管重构和肺纤维化所致的肺动脉高压可能与 RhoA/Rho 激酶信号通路激活有关; 即 RhoA/Rho 激酶信号通路激活后使得炎症细胞增多, 炎症细胞及相关炎症介质导致肺血管收缩及重塑, 从而引起肺动脉压力升高。

参考文献

1. Hatano S, Strasser T. Primary pulmonary hypertension[C]. Geneva: WHO, 2005.
2. Barst R, McGoon M, Torbicki A, et al. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2004,43(12):S40-47.
3. Pauwels RA, Buist S, Calverley PM, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop Summary[J]. Am J

- Respir Crit Care Med,2001,163(5):1047-1048.
4. Galiè N, Hoepfer MM, Humbert M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension[J]. Eur Heart, 2009, 30(20):2493-2537.
 5. Hassoun PM, Mounthou L, Barbera JA, et al. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(1):S10-19.
 6. Morrell N, Adnot S, Archer S, et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(1):S20-31.
 7. Do e Z, Fukumoto Y, Takaki A, et al. Evidence for Rho-kinase activation in patients with pulmonary arterial hypertension[J]. Circ J, 2009, 73(9):1731-1739.
 8. 代丽, 吴尚洁. 阿托伐他汀抑制RhoA/Rho激酶活性逆转低氧性肺动脉高压大鼠肺动脉高压和肺血管重构[J]. 中南大学学报: 医学版, 2011, 36(1):58-63.
DAI Li, WU Shangjie. Atorvastatin attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats by inhibiting RhoA/Rho kinase pathway[J]. Central South University. Medical Science, 2011, 36(1):58-63.
 9. Rashid M, Tawara S, Fukumoto Y, et al. Importance of Rac1 signaling pathway inhibition in the pleiotropic effect of HMG-CoA reductase inhibitors[J]. Circ J, 2009(73): 361-370.
 10. Hachulla E, Gressin V, Guillemin L, et al. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: A French nation-wide prospective multicenter study[J]. Arthritis Rheum, 2005, 210(52):3792-3800.
 11. 孙兴珍, 田向阳. Rho激酶在肺动脉高压大鼠组织中的表达[J]. 河北医药, 2008, 30(11):1662-1664.
SUN Xingzhen, TIAN Xiangyang. Expression of Rho kinase in lung tissues of rats with pulmonary hypertension[J]. Hebei Medical Journal, 2008, 30(11):1662-1664.
 12. Dartevielle P, Fadel E, Mussot S, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension[J]. Eur Respir J, 2004, 27(23):637-648.
 13. Reichelt A, Hoepfer MM, Galanski M, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: evaluation with 64-detector row CT versus digital subtraction angiography[J]. Eur J Radiol, 2009, 71(1):49-54.
 14. Profirovie J, Gorovoy M, Niu J, et al. A novel mechanism of G protein-dependent phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein[J]. J Biol Chem, 2005, 280(38):32866-32867.
 15. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPase: Biochemistry and biology[J]. Anna Rev Cell Dev Biol, 2005, 231(10):247-269.
 16. Jemigan NL, Walker BR, Resta TC. Chronic hypoxia augments protein kinase G-mediated Ca^{2+} desensitization in pulmonary vascular smooth muscle through inhibition of RhoA/Rho kinase signaling[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(6):1220-1229.
 17. Connolly MJ, Aaronson PI. Key role of the RhoA/Rho kinase system in pulmonary hypertension[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2011, 24(1):1-14.
- (本文编辑 陈丽文)