

# 端粒长度与动脉粥样硬化性脑梗死及斑块稳定性的相关研究

李丹青<sup>1</sup>,李淮玉<sup>1</sup>,李静<sup>2</sup>,张梅<sup>2</sup>

(1. 安徽医科大学附属省立医院神经内科,安徽 合肥 230001;

2. 淮南市第一人民医院神经内科,安徽 淮南 232000)

**摘要:**目的 探讨端粒长度与动脉粥样硬化性脑梗死及颈动脉斑块稳定性之间是否相关。方法 选取急性前循环动脉粥样硬化型脑梗死患者 70 例作为观察组并根据超声结果将其分为稳定斑块组及不稳定斑块组,同时选取健康体检者 68 例作为对照组。通过实时荧光定量 PCR 法测定外周血白细胞端粒长度。比较观察组与对照组以及稳定斑块组与不稳定斑块组的端粒长度是否存在差异。结果 观察组与对照组的外周血白细胞端粒长度差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。不稳定斑块组与稳定斑块组外周血端粒长度差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 端粒长度与动脉粥样硬化性脑梗及动脉粥样硬化斑块稳定性之间有相关性。

**关键词:**外周血白细胞;端粒长度;动脉粥样硬化性脑梗死;颈动脉斑块;稳定性

**doi:**10.3969/j.issn.1009-6469.2018.02.018

## Relationship between telomere length and atherosclerotic cerebral infarction and plaque stability

LI Danqing<sup>1</sup>, LI Haiyu<sup>1</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, ZHANG Mei<sup>2</sup>

(1. Department of Neurology, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei, Anhui

230001, China; 2. Department of Neurology, Huainan First People's Hospital, Huainan, Anhui 232000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the relationship between telomere length and atherosclerotic cerebral infarction and plaque stability. **Methods** Seventy patients with acute cerebral infarction were randomly divided into stable plaque group and unstable plaque group. Sixty-eight healthy subjects were selected as the control group. The telomere length of peripheral blood leukocytes was determined by real-time fluorescence quantitative PCR. There was a difference in the telomere length between the case group and the control group and the stable plaque group and the unstable plaque group. **Results** The telomere length of peripheral blood leukocytes in the case group and the control group was statistically significant ( $P < 0.05$ ). There was a significant difference in telomere length between the unstable plaque group and the stable plaque group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** There is a correlation between telomere length and the stability of atherosclerotic cerebral infarction and atherosclerotic plaque.

**Keywords:** peripheral white blood cell; telomere length; atherosclerotic cerebral infarction; carotid plaque; stability

随着我国逐渐迈入老龄化社会,糖尿病、高血脂、高血压等基础疾病的发病率逐渐提高,与此相关的脑血管疾病更上升为第一位死亡和致残的疾病,成为危害中老年人健康和生活方式的常见病和多发病。其中缺血性卒中尤其是大动脉粥样硬化性缺血性卒中在临床实践中更是极为常见。

有研究表明,动脉粥样硬化所造成的脑血管狭窄以及斑块的形成和不稳定性是缺血性脑卒中尤其是大动脉粥样硬化性缺血性卒中发生的根本原因,且斑块的不稳定性相较于血管狭窄可能更为危险<sup>[1]</sup>。

既往对动脉粥样硬化性脑梗死的研究,多集中在动脉粥样硬化过程中的慢性炎症方面,尤其是促进动脉粥样硬化不稳定斑块形成及发展的炎性因子及抗炎因子,而很少涉及到细胞老化方面。而众所周知,动脉粥样硬化的始动环节恰恰是血管内皮

细胞的老化及功能障碍。研究发现:端粒可以被认为是细胞衰老的生物钟。端粒越短,表明细胞分裂能力越差,剩余的分裂次数越少;端粒越长,则表明细胞分裂能力强,剩余的分裂次数多。端粒的缩短参与细胞的衰老。发生在血管中,端粒的损耗可能会导致血管内皮细胞、内皮祖细胞以及平滑肌细胞衰老和功能障碍,进而参与动脉粥样硬化(AS)的病理演进<sup>[2-6]</sup>,最终引发相应的心脑血管疾病。

外周血白细胞端粒长度(LTL)与脑卒中的相关研究尚不多且结果并非完全一致,与大动脉粥样硬化性脑梗死的研究则更少。此外,LTL与缺血性卒中发生密切相关的斑块的稳定性研究国内外则更难以找到。因此,本文旨在研究LTL与大动脉粥样硬化性脑梗死及动脉粥样硬化斑块稳定性之间的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2015 年 12 月—2016 年 9 月入住安徽医科大学附属省立医院神经内科的急性前循环梗死患者(年龄 40~86 岁)70 例作为观察组,以及与之年龄、性别匹配的来自安徽省立医院检中心的健康体检者 68 例(年龄 47~90 岁)作为对照组。根据患者的临床表现,神经系统查体、影像学检查,由神经内科两位主治以上职称医师确诊。所有患者均根据 2010 年中国急性缺血性卒中诊治指南的诊断标准确诊<sup>[7]</sup>。排除系统性疾病(如胶原性疾病、炎症、肝脏或肾脏疾病、代谢性疾病等),排除心源性卒中、其他原因引起的缺血性脑卒中,如血管壁炎症:结核性、梅毒性、化脓性、钩端螺旋体感染、结缔组织病、变态反应性动脉炎等;夹层动脉瘤、脱水、全身感染、先天性血管畸形、真性红细胞增多症、高凝状态、吸毒等继发的缺血性脑卒中以及原因不明性的脑卒中。记录研究对象的基线临床资料包括年龄、性别、血脂、血糖、尿酸、吸烟史、饮酒史、糖尿病史、高血压史、冠心病史等。同时,记录观察组的颈动脉超声检查结果。实验排除 14 例研究对象,其中包括质量不好的 DNA 以及加样不好的 DNA。最终纳入 70 例前循环大动脉粥样硬化性脑梗死患者作为观察组,以及 68 例健康体检者作为对照组,使用实时荧光定量 PCR 仪检测其外周血白细胞相对端粒长度。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 检测端粒长度<sup>[8-9]</sup>** 所有对象均于入组次晨空腹抽取静脉血 2 mL -20 ℃ 保存以用来提取外周血白细胞 DNA,外周血细胞 DNA 提取试剂盒购自于北京康为世纪公司,操作步骤严格按照操作说明书来进行。DNA 提取完成后,使用紫外分光光度计测定 DNA 浓度和纯度,若样品 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 1.7~1.9 之间,表明 DNA 纯度符合要求,然后稀释 DNA 样本至 100 mg · L<sup>-1</sup> 以下。若未达到上述要求,说明提取的 DNA 不纯,予以舍弃或重新提取 DNA,直至符合要求。经过上述过程,最终所有样本的 DNA 浓度和纯度均能达到实验要求。然后使用实时荧光定量 PCR 进行外周血白细胞端粒的检测。

原理:相对端粒长度可以通过使用实时荧光定量聚合酶链反应检测外周血白细胞端粒重复拷贝数(T)和单拷贝基因-globin 的拷贝数(S),用端粒重复拷贝数 T 和-globin 基因拷贝数的比值 T/S 表示。实时荧光定量 PCR 中,Ct 值表示每个反应管内的荧光信号到达设定域值时的循环数。相对端粒长度(T/S) = 2 - [Ct( telomere) - Ct(β - globin)样

品]/2 - [Ct( telomere) - Ct(β - globin)标准品]。使用实时荧光定量 PCR 仪测量相对端粒长度时,采用双标准曲线法。提取培养的 HEK293S 细胞 DNA 作为标准品以设立标准曲线。其稀释梯度如下:293 标准品 100 μg · L<sup>-1</sup> → 梯度 200,100,50,25,12.5,6.25,3.125 μg · L<sup>-1</sup>。

其反应体系为 20 μL,采用 SYBR@ Green。

根据相关文献,其引物序列如下:

Telomere-F: 5' CCGTTTGTTCGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT 3'

Telomere-R: 5' GGCTTGCCgTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT3'

β-globin-F: 5' GCTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC3'

β-globin-R: 5' CACCA ACTTCATCCACGTTCA-CC3'

反应条件:Telomere:95 ℃,15 s;54.3 ℃,60 s。

Globin:95 ℃,15 s;56 ℃,60 s。

**1.2.2 颈动脉血管超声检查** 对每一位入组患者,使用多普勒超声诊断仪进行颈动脉血管超声检查,检查前调整探头频率在 7.5~10 MHz 之间。检查时嘱患者取仰卧位并充分放松,帮助患者头部转向检查者的对侧以充分暴露头颈部,这样更有利于检查。然后将超声探头放置于被检查者胸锁乳突肌的前缘或后缘,从一侧颈动脉的起始处采用横向和纵向的方式依次探查,检查完后再使用相同的方法检查另一侧。斑块形成定义为颈动脉局部 IMT ≥ 1.2 mm 或者 ≥ 临近中间内中膜厚度的 1.5 倍。根据颈动脉超声斑块的回声特点,将斑块分为稳定性斑块和不稳定性斑块。若回声较高或不均质,则提示斑块较稳定,若回声较低或出现不规则无回声区,则提示斑块不稳定,如脂质型软斑块、混合型斑块等。通过斑块内部回声特点,将 70 例患者分为不稳定颈动脉粥样硬化斑块组和稳定颈动脉粥样硬化斑块组。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS17.0 统计软件对收集的数据进行处理。当  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。首先采用 Kolmogorov-Smirnov 正态分布检验法对所有计量资料进行变量分布的检验,符合正态分布的资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。然后进行方差齐性检验,如果方差齐,两组间差异比较用  $t$  检验;若方差不齐,两组间差异比较采用  $t'$  检验;不符合正态分布的计量资料,如本文中的三酰甘油,使用中位数、四分位数间距表示,组间比较采用 Mann-Whitney 秩和检验。计数资料用频数(百分比)表示,两组间差异的比较采用  $\chi^2$  检验。其中,白细胞端粒长度在统计

学分析之前,首先要进行相应的数据处理,即取 T/S 值的自然对数用于统计学处理。

## 2 结果

**2.1 基线资料比较** 本次研究共纳入研究对象 138 例,其中观察组大动脉粥样硬化性脑梗死患者 70 例,对照组健康体检者 68 例。观察组男 45 例,女 25 例,年龄 40~86 岁,平均年龄 65.39 岁。对照组男 40 例,女 28 例,年龄 47~90 岁,平均年龄 62.22 岁。性别分布采用  $\chi^2$  检验,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。年龄符合正态分布采用  $t$  检验,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。故观察组及对对照组性别年龄相匹配,具有可比性。其他血管危险因素,观察组和对照组在性别、年龄、三酰甘油、尿酸间的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),然而在总胆固醇及高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL),高血压病史、糖尿病病史、吸烟史及饮酒史中差异有统计学意义( $P<0.05$ )。这与既往的研究大致相符合,体现了上述因素为血管危险因素。

**2.2 观察组与对照组间端粒长度的比较** 观察组外周血端粒长度 1.31(0.88~1.94),对照组 LTL 1.84(1.06~2.63),取相对端粒长度的自然对数进行统计学分析,Kolmogorov-Smirnov 正态分布检验法检验变量的分步,不符合正态分布,组间比较采用非参数检验中的 Mann-Whitney 秩和检验,结果发现 Mann-Whitney( $Z$ ) = -3.158,  $P=0.002$ ,差异有统计学意义。说明端粒缩短与大动脉粥样硬化性脑梗死可能具有一定的相关性。但不能排除其他危险因素可能造成的差异。下面进一步分析,端粒长度与颈动脉斑块的关系。

**2.3 稳定斑块组与不稳定斑块组间端粒长度的比较** 观察组按照颈动脉彩超的检测结果分为不稳定斑块组(40 例)以及稳定斑块组(30 例)。不稳定斑块组端粒长度(1.48±0.78),明显短于稳定斑块组(1.72±0.49)。Kolmogorov-Smirnov 正态分布检验法检验变量的分步,符合正态分布,不符合方差齐性,故组间比较采用近似  $t$  检验,结果  $t' = -3.750$ ,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。这说明端粒缩短可能与斑块的形成及不稳定性相关。

## 3 讨论

端粒是位于真核细胞染色体末端的线性 DNA 蛋白质复合体。其由短串联重复序列 TTAGGG 及端粒结合蛋白构成。端粒的单链 DNA3'端与端粒结合蛋白结合形成 1 个被称为 T 环的端粒环。T 环可以看做染色体的“帽”结构,其可以隐藏染色体 DNA 末端,防止染色体 DNA 末端被核酸酶降解<sup>[10]</sup>,从而起到保护作用。但是由于线性 DNA 复制时具有不完全特性,即每次细胞分裂端粒都可能会丢失一小部分序列(大约 50~200 bp),因此,端粒会随着细胞的不断分裂会进行性缩短。一定限度的缩短并不会影响细胞的基本生命活动,但当端粒缩短到无法维持 T 环时,那么端粒就无法保护染色体的末端,染色体将失去稳定性,发生畸变、断裂或缺失,细胞将进入衰老和死亡。因此端粒被称为细胞衰老的生物钟。端粒越短,细胞分裂能力越差,剩余的分裂次数越少;端粒越长,细胞分裂能力强,剩余的分裂次数多。端粒的损耗可能会导致血管内皮细胞、内皮祖细胞以及平滑肌细胞衰老和功能障碍,进而参与动脉粥样硬化的病理演进<sup>[2-6]</sup>,最

表 1 观察组和对照组血管危险因素的比较

项目	对照组( $n=68$ )	观察组( $n=70$ )	$t(\chi^2)[Z]$ 值	$P$ 值
年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$ )	62.22 ± 10.00	65.39 ± 10.69	1.797	0.075
男性/例(%)	40(58.82)	45(64.28)	(0.435)	0.510
总胆固醇/(mmol · L <sup>-1</sup> , $\bar{x} \pm s$ )	4.21 ± 0.97	5.22 ± 0.85	6.461	<0.01
三酰甘油 <sup>a</sup> /mmol · L <sup>-1</sup>	1.50(1.15~1.95)	1.51(1.04~2.07)	[0.368]	0.713
LDL-C/(mmol · L <sup>-1</sup> , $\bar{x} \pm s$ )	2.55 ± 0.76	3.10 ± 0.8	0.3625	<0.01
HDL-C/(mmol · L <sup>-1</sup> , $\bar{x} \pm s$ )	1.10 ± 0.26	1.40 ± 0.33	6.080	<0.01
尿酸/(μmol · L <sup>-1</sup> , $\bar{x} \pm s$ )	329.79 ± 116.80	358.82 ± 80.1	1.684	0.095
高血压/例	有 20 无 48	有 53 无 17	(29.680)	<0.01
糖尿病/例	有 8 无 60	有 20 无 50	(6.024)	0.014
吸烟史/例	有 14 无 54	有 25 无 45	(3.893)	0.048
饮酒史/例	有 10 无 58	有 20 无 50	(3.898)	0.048

注:a 示三酰甘油用中位数(四分位数间距)表示。

终引发相应的心脑血管疾病。

近年来对于 LTL 与卒中发生、发展相关性研究,尚不是很多且存在差异。Ding 等<sup>[11]</sup> 纳入脑卒中患者及健康对照组各 1 309 例,比较其外周血端粒长度,结果观察组 LTL 比对照组显著缩短,进一步随访其中 858 例脑卒中患者 5 年,发现端粒长度缩短可以预测卒中后的死亡风险。哈佛医学院在护士健康研究中心和医生健康研究中心进行前瞻性的研究,采用巢式病例对照研究的方法<sup>[12]</sup>,结果发现 LTL 与年龄成反比,观察组与对照组端粒长度差异无统计学意义,并未说明端粒长度与脑卒中之间的联系。一项来自欧洲的研究也未说明端粒长度与脑卒中之间的联系<sup>[13]</sup>。国内相关研究尚不多,Zhang 等<sup>[14]</sup> 大样本前瞻性病例对照研究,选取 1 801 名健康体检者作为对照组、1 756 例卒中患者作为观察组(其中动脉粥样硬化性脑梗死 767 例,腔隙性脑梗死 503 例,脑出血 486 例),然后随访 4.5 年。通过回归分析在校正危险因素后,最终得出的结果是,动脉粥样硬化性脑梗死患者,端粒较短者发生全因死亡的风险增加 69%,心脑血管死亡风险是长端粒组的 2.57 倍。并未发现腔隙性脑梗死和脑出血端粒缩短与全因死亡和心脑血管死亡风险的关系。在此基础上,李静等<sup>[15]</sup> 对外周血白细胞相对端粒长度与脑卒中的相关性进行了研究,他们进行的是病例对照研究,纳入了观察组初发脑卒中患者 543 例(其中 224 例为动脉粥样硬化性脑梗死)和健康对照组 616 例作为对照组,RT-PCR 检测相对端粒长度。通过多元 Logistic 回归模型分析卒中与端粒长度的关系,最终并未发现端粒长度与卒中之间相关,在进一步对卒中亚型的分析过程中,得出动脉粥样硬化性脑梗死组与对照组比较,端粒长度显著缩短。这与之前 Zhang 等<sup>[14]</sup> 的研究是相符合的。Ding 等<sup>[11]</sup> 的病例对照研究,结果亦显示脑卒中患者端粒长度较对照组显著缩短;动脉粥样硬化性脑梗死和腔隙性脑梗与对照组比较,端粒长度显著缩短;而脑出血与对照组比较端粒长度差异无统计学意义。以上这些研究提示,LTL 并非是与各类型卒中均存在相关性,其主要与大动脉粥样硬化性脑梗死有关。本次研究结果也证明了端粒长度与大动脉粥样硬化性脑梗死存在相关且 LTL 可能成为预测急性动脉粥样硬化性脑梗死的生物指标。猜测原因,端粒长度的缩短可能是通过促进动脉粥样硬化的发生发展来促进动脉粥样硬化性脑梗死的发生。

端粒与动脉粥样硬化的研究由来已久,源于 Chang 等<sup>[16]</sup> 的研究,他们发现受到较大血管动力应

力组的内皮细胞端粒损耗率高于另一组。因此 Chang 等认为端粒长度可以用来反映动脉粥样硬化的演进过程,而老化的血管细胞的可能在动脉粥样硬化中起了很大作用。在 Chang 研究的基础上,Okuda 等<sup>[17]</sup> 通过比较腹主动脉远端和近端内皮细胞的 DNA 端粒长度,发现远端腹主动脉内层和中层细胞的端粒长度与其动脉粥样硬化的程度成反比,进一步支持了 Chang 等<sup>[16]</sup> 的观点。美国弗明汉心脏研究组报道,在肥胖男性个体中端粒缩短是颈动脉内膜-中膜厚度(IMT)增厚的独立预测因子;一项对男性颈动脉粥样硬化斑块和端粒长度的研究<sup>[18-19]</sup> 发现颈动脉粥样硬化越明显,端粒长度越短。Chen 等<sup>[20]</sup> 研究了美洲印第安人的短端粒长度与动脉粥样硬化的发生及进展的关系,该研究是前瞻性队列研究,纳入 2 819 个在基线时间段(2001—2003 年)无心血管疾病的参与者,最终随访到 2006—2009 年(平均随访时间是 5.5 年),结果提示低端粒长度与斑块的发生及进展相关。上述研究从流行病学角度说明了端粒长度与动脉粥样硬化发生发展相关,本次研究结果与此相符,表现为不稳定斑块组 LTL 低于稳定斑块组,结合大动脉粥样硬化性脑梗死的病因及发病机制,猜测 LTL 促进大动脉粥样硬化性脑梗死的发生可能是通过影响斑块的性质,促进斑块破裂来实现的。

## 参考文献

- [1] BAZAN HA, SMITH TA, DONOVAN MJ, et al. Future management of carotid stenosis; role of urgent carotid interventions in the acutely symptomatic carotid patient and best medical therapy for asymptomatic carotid disease[J]. *Ochsner J*, 2014, 14(4): 608-615.
- [2] MINAMINO T, MIYAUCHI H, YOSHIDA T, et al. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis; role of telomeres in endothelial dysfunction[J]. *J Cardiol*, 2003, 41(1): 39-40.
- [3] MURASAWA S, LLEVADOT J, SILVER M, et al. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells [J]. *Circulation*, 2002, 106(9): 1133-1139.
- [4] MCKEE JA, BANIK SS, BOYER MJ, et al. Human arteries engineered in vitro[J]. *EMBO Rep*, 2003, 4(6): 633-638.
- [5] MINAMINO T, KOMURO I. Vascular cell senescence; contribution to atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2007, 100(1): 15-26.
- [6] ANDREASSI MG. DNA damage, vascular senescence and atherosclerosis[J]. *J Mol Med*, 2008, 86(9): 1033-1043.
- [7] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010[J]. *中华神经科杂志*, 2010, 43(2): 146-153.
- [8] CAWTHON RM. Telomere measurement by quantitative PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(10): e47.