

充血性心力衰竭患者线粒体 DNA 缺失的意义

赵志明¹ 李庚山² 许家珊² 蒋锡嘉²



摘要 为探讨线粒体 DNA(mtDNA)5.0 kb 缺失与充血性心力衰竭(CHF)发病的关系,应用聚合酶链反应(PCR)技术分析 72 例 CHF 患者的 mtDNA。结果显示,CHF 患者 mtDNA 5.0 kb 缺失率明显高于对照组(0.254%±0.08%比 0.032%±0.01%, $P < 0.01$);CHF 组内扩张型心肌病组及冠心病组 mtDNA 5.0 kb 缺失率高于风湿病及高血压心脏病组($P < 0.05$)。研究中还发现,随着心功能分级增加,mtDNA 5.0 kb 缺失率增高($P < 0.05$)。提示 mtDNA 缺失影响心肌细胞线粒体呼吸功能,心肌能量供应障碍与 CHF 的发生、发展有关。

关键词 充血性心力衰竭 线粒体 DNA 缺失

Significance of mitochondrial DNA deletion in congestive heart failure

Zhao Zhiming Li Gengshan Xu Jiali et al

(Department of Geriatric, the First Affiliated Hospital of Hubei Medical University, Wuhan 430060)

Abstract The relationship between mitochondrial DNA (mtDNA)5.0 kb deletion and congestive heart failure(CHF)was investigated in 72 CHF patients by polymerase chain reaction (PCR) technique. The results showed much higher levels of mtDNA 5.0 kb deletion in the patients of CHF than in those of control(0.254±0.08% vs 0.032±0.01%, $P < 0.01$). The levels of mtDNA 5.0 kb deletion in the group of coronary artery disease and dilated cardiomyopathy were much higher than in those of rheumatic heart disease and hypertensive heart disease, respectively($P < 0.05$). The study also demonstrated the levels of mtDNA 5.0 kb deletion were increased with the increased heart functional classes($P < 0.05$). Thus,mtDNA deletion may effect the developmental mechanism of CHF.

Key words Congestive heart failure Deletion mitochondrial DNA

近年来众多研究表明,线粒体 DNA(mtDNA)的缺失或突变与某些心脏病的发病关系密切^[1,2]。由于 mtDNA 的缺失或突变可使细胞线粒体功能减退,以致诸如心脏、肌肉这些氧化代谢旺盛的器官发生能量代谢障碍,并最终出现器官功能衰竭。本研究应用聚合酶链反应(PCR)技术分析充血性心力衰竭(CHF)患者外周血淋巴细胞 mtDNA 5.0 kb 的缺失率,以探讨 mtDNA 缺失与 CHF 发病

的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 CHF 组:经病史、体检、心电图、超声心动图、X 线等检查确诊的住院 CHF 患者 72 例,男 40 例,女 32 例;平均年龄 53(38~59)岁。基础心脏病包括风湿病 18 例,扩张型心肌病 18 例,高血压心脏病 22 例,冠心病 14 例。心功能分级按 NYHA 标准,Ⅱ级 21 例,Ⅲ级 28 例,Ⅳ级 23 例。

1.1.2 正常对照组:经体检、心电图、超声心

¹武汉 湖北医科大学附属第一医院老年病科(430060)

²湖北医科大学附属第一医院心内科

动图、X 线等检查排除糖尿病及其他心肺疾病者 15 例,男 8 例,女 7 例;平均年龄 54(36~58)岁。

1.2 方法

1.2.1 研究对象均取晨起肘静脉全血 5 ml,分离出外周血淋巴细胞,按常规法提取淋巴

细胞 DNA(其中含有 mtDNA)。

1.2.2 PCR 扩增

1.2.2.1 PCR 引物设计参照文献[3],其序列见表 1,由中国科学院上海细胞生物学研究所合成。

表 1 PCR 反应引物序列

引物	序列 5'~3'	对应位点
L828	CCCCTCTAGAGCCCCTGTAAAGC	8 282~8 305
L80	CACCCACCGGAAACAGCAGTGATT	800~825
H1385	GTTGAGGTCTAGGGCTGTTA	1 3851~1 3832
H135	CACCTCATGGGCTACACCTTGACCT	1 350~1 326

注:引物 L828、L80 被用于扩增 mtDNA 轻链,引物 H1385、H135 扩增 mtDNA 重链。L828/H1385 一对引物扩增 mtDNA 5.0 kb 缺失,L80/H135 一对引物扩增保守区,不产生 mtDNA 缺失。

1.2.2.2 PCR 反应程序为:94℃变性 30 s,56℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,循环 30 次。反应在 Perking Elmer DNA 扩增仪中进行。反应产物经溴化乙锭染色后,1%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察。

1.2.2.3 PCR 产物的定量分析:用紫外分光光度计分别扫描由引物 L828/H1385 及引物 L80/H135 扩增产物。因 L828/H1385 扩增产物主要反映缺失 mtDNA 含量,L80/H135 扩增产物反映正常无缺失 mtDNA 含量,故经紫外分光光度计扫描后计算两者的相对含量,即为 mtDNA 5.0 kb 缺失率。

1.3 统计方法:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,作 t 检验或方差分析, $P < 0.05$ 为显著性差异界值。

2 结果

CHF 组所有病例均可扩增出 593 bp 片段,对应于 mtDNA 5.0 kb 缺失,正常对照组受检者也可扩增出上述 593 bp 片段,但量偏低;对应于保守区的另一对引物扩增出 410 bp 片段,为正常不产生缺失片段,未发现其他扩增产物。

CHF 组 mtDNA 5.0 kb 缺失率为 0.254%±0.08%,而正常对照组仅有低水平 mtDNA 5.0 kb 缺失(0.032%±0.01%),两组比较有极显著差异 ($P < 0.01$)。而 CHF 组内各基础心脏病组 mtDNA 缺失率比较见表 2,以冠心病及扩张型心肌病组 mtDNA 缺失

率最高。mtDNA 5.0 kb 缺失率随心功能分级的增高而增高 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 四种伴 CHF 的心脏病 mtDNA 5.0 kb 缺失率比较

组别	例数	缺失率(%)
冠心病	14	0.297±0.078 ^{**△}
扩张型心肌病	18	0.310±0.073 ^{**△}
风心病	18	0.207±0.070 ^{**}
高血压心脏病	22	0.201±0.076 ^{**}
正常对照	15	0.032±0.010

与对照组比较^{**} $P < 0.01$;与风心病及高血压心脏病组比较[△] $P < 0.05$

表 3 CHF 患者心功能分级与 mtDNA 5.0 kb 缺失率关系

心功能分级	例数	缺失率(%)
I	21	0.163±0.055
II	28	0.239±0.053
IV	23	0.339±0.059

3 讨论

线粒体是细胞的供能装置,其功能的正常有赖于 mtDNA 的完整。由于 mtDNA 编码线粒体参与氧化磷酸化的 13 种多肽,mtDNA 的异常(缺失或突变)必将影响线粒体的氧化磷酸化功能,线粒体呼吸功能受损,能量生成减少,最终会导致细胞器官功能受损。mtDNA 5.0 kb 缺失是人类较为多见的缺失突变类型,其与神经肌肉及心肌损害的关系密切,该片段缺失会造成氧化磷酸化中

某些多肽生成障碍,线粒体呼吸功能受损^[4]。文献报道 mtDNA 5.0 kb 缺失可见于多种心脏病及某些正常人^[5],本研究也发现相似情况,但器质性心脏病 mtDNA 5.0 kb 缺失量明显高于正常对照者。

冠心病患者由于心肌慢性缺血,耗竭心肌线粒体的氧和基质,使氧化磷酸化酶水平下降,线粒体内氧自由基生成增加,清除减少,且因 mtDNA 既无组氨酸又无自身修复系统,极易受到氧自由基的损伤而引起突变^[2]。Corral 等^[5]发现扩张型心肌病 mtDNA 5.0 kb 缺失率较正常对照者高 40~45 倍,本研究也出现扩张型心肌病伴 CHF 者有高水平 mtDNA 5.0 kb 缺失。至于扩张型心肌病 mtDNA 缺失是继发于外在因素的损伤还是内在缺陷有待进一步证实。钱伟等^[6]认为 mtDNA 5.0 kb 缺失是由于心脏前或(和)后负荷增加,心肌耗能增多,线粒体功能活跃,心肌内有大量氧自由基生成,使心肌 mtDNA 受损机率增加,直至影响线粒体功能,供能障碍,心功能受损。高血压心脏病与 mtDNA 缺失的关系尚未见报道,作者认为高血压病患者心脏后负荷增加,其发生 mtDNA 5.0 kb 缺失的过程可能与风心病相似。

本研究还表明,mtDNA 缺失量越大,心功能分级增加,这是由于缺失突变的积累使心肌线粒体氧化磷酸化能力逐渐下降,细胞产生 ATP 供能越来越少的缘故^[7]。

mtDNA 缺失只有超过一定“阈值”时才会引起器官功能障碍,这可解释正常对照者

有低水平 mtDNA 缺失并不引起器官能量供应障碍,但此“阈值”如何确定,有待进一步研究。

参考文献

- 1 Ozawa T, Tanaka M, Sugigama S, et al. Multiple mitochondrial DNA deletions exist in cardiomyocytes of patients with hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 170: 830
- 2 Hattori K, Tanaka M, Sugiyama S, et al. Age-dependent increase in deleted mitochondrial DNA to preshycardia. *Am Heart J*, 1991, 121: 1735
- 3 Anne M, Iemo E. Mitochondrial DNA deletions in dilated cardiomyopathy; a clinical study employing endomyocardial sampling. *JACC*, 1994, 23: 935
- 4 Shon EA, Rizzato R, Moros CT, et al. A direct repeat in a hotspot for large scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science*, 1989, 244: 346
- 5 Corral D, Stephen G, Shoffner JM, et al. Hypoxemia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction. *JAMA*, 1991, 266: 1812
- 6 钱伟, 谢毅, 张宝仁, 等. 风湿性心脏病心肌线粒体 DNA 4977 的定量研究. *中华医学杂志*, 1995, 75: 473
- 7 Dimauro S, Carlos T, Morace. mitochondrial Encephalomyo. pathies. *Arch Neurol*, 1993, 50: 1197

(收稿 1997-10-06)

(编辑 范永祚)

举办心律失常治疗与食管心房调搏专题讲习研讨会通知

我厂决定在 1998 年 7、9、10 月分别在桂林、北京及苏州等地举办“心律失常治疗与食管心房调搏专题讲习研讨会”,将邀请国内著名的心电生理专家授课。会议期间将提供我厂生产的“DF-4A 型心脏电生理刺激仪”(食管调搏仪)和体外临时起搏器及配套导管等,并现场操作示教,优惠供应。欲参加会议医师,请分别在 1998 年 7 月 30 日、8 月 30 日及 9 月 15 日之前来信或来电登记。来信请寄:苏州市北园路 7 号,苏州工业园区东方电子仪器厂朱兴元收。邮编:215001。联系电话:0512-5911564、9041074。

苏州工业园区东方电子仪器厂