

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.11.024

急性冠脉综合征患者 CD4⁺T 淋巴细胞亚群的变化及临床意义

陈刚¹ 吴旭¹ 王镇波¹ 王阳¹ 吴志坚^{2△}

(1 南方医科大学第五附属医院心血管内科 广东 广州 510900; 2 南方医科大学珠江医院心内科 广东 广州 510515)

摘要 目的:研究急性冠脉综合征(ACS)患者 CD4⁺T 淋巴细胞亚群的变化及临床意义。**方法:**收集 2013 年 3 月-2014 年 3 月入住我院首次行冠脉成形术(PCI)治疗的 ACS 患者 88 例以及造影结果正常患者 28 例。分别于冠脉造影时取冠脉血流式细胞技术检测 CD4⁺T 细胞亚群 Th1/Th2、Th17/Treg 比例表达变化。**结果:**与对照组相比,ACS 组患者冠脉血中 Th1、Th17 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞的百分比显著升高,而 Th1、Treg 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞的百分比显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**ACS 患者体内免疫反应增强,CD4⁺T 淋巴细胞不同功能亚群均参与了动脉粥样硬化(AS)的发生发展,Th1、Th17 可促进 AS 的进展和不稳定性,而 Th1、Treg 作用相反。

关键词:急性冠脉综合征;动脉粥样硬化;CD4⁺T 淋巴细胞

中图分类号:R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)11-2089-03

The Changes and Significance of CD4⁺T Lymphocyte Subsets in Patients with Acute Coronary Syndrome

CHEN Gang¹, WU Xu¹, WANG Zhen-bo¹, WANG Yang¹, WU Zhi-jian^{2△}

(1 Department of cardiovascular medicine, The Fifth Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510900, China; 2 Department of Cardiology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510515, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the changes and significance of CD4⁺T lymphocyte subsets in patients with acute coronary syndrome (ACS). **Methods:** 88 cases of patients with ACS and 28 normal patients by angiography admitted from Mar 2013 to Mar 2014 in our hospital were studied. The changes in expression of CD4⁺T cell subsets of Th1/Th2 and Th17/Treg ratio were detected by flow cytometry using blood collected during angiography of coronary artery. **Results:** Compared with the control group, the proportion of Th1 and Th17 cells in CD4⁺T lymphocytes in coronary blood of patients with ACS significantly increased. While, the proportion of Th2 and Treg cells in CD4⁺T lymphocytes significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Immune response of ACS patients is enhanced, CD4⁺T lymphocyte subsets with different functions are involved in the occurrence and development of atherosclerosis (AS), Th1, Th17 can promote the progression of AS and instability, while Th1, Treg has the opposite effect.

Key words: Acute Coronary Syndrome; Atherosclerosis; CD4⁺T lymphocytes

Chinese Library Classification(CLC): R541.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)11-2089-03

前言

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary atherosclerotic heart disease, CHD)是我国居民死因构成中上升最快及威胁公众健康最为严重的疾病之一^[1-3]。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠心病的主要病理基础^[4]。目前研究认为 AS 是一种慢性炎症过程,炎症反应可募集免疫细胞浸润,促进血小板黏附聚集,导致斑块破裂,管腔完全或不完全闭塞,最终导致急性冠脉综合征(Acute Coronary Syndrome, ACS)形成^[5-7]。因此参与免疫的炎症细胞及炎症因子在 ACS 的发生发展过程扮演着重要角色。本研究拟通过观察比较 ACS 患者外周血中 CD4⁺T 淋巴细胞 Th1/Th2、Th17/Treg 比例变化,进一步评估 CD4⁺T 淋巴细胞

亚群在 ACS 中的临床意义,为 ACS 的治疗提供新的思路。

1 资料和方法

1.1 研究对象

将 2013 年 3 月-2014 年 3 月在本院住院首次行冠脉成形术(PCI)治疗的 ACS 患者 88 例,诊断标准^[8]:(1)不稳定型心绞痛:近 48h 内有自发性或静息心绞痛发作至少 1 次,但心肌坏死标志物无变化,伴心电图上 ST 压低或 T 波改变;(2)ST 段抬高心肌梗死:持续性心肌缺血症状 ≥ 30 min,舌下含服硝酸甘油未能缓解;毗邻 ≥ 2 个导联 ST 段抬高(肢体导联抬高 ≥ 0.1 mv,胸导联抬高 ≥ 0.2 mv),伴或不伴心肌酶谱坏死样改变;(3)非 ST 段抬高型心肌梗死:持续性心肌缺血症状 ≥ 30 min,典型心电图动态变化,心肌酶(肌酸磷酸激酶同工酶或肌钙蛋白)坏死样变化。具有以上任何两项确诊。排除标准:(1)既往曾行冠脉支架植入或陈旧性心肌梗死病史;(2)半年内有消化道溃疡病史;严重肝病、肾病、出血性疾病、感染患者;(3)正处于其他疾病的炎症反应急性期阶段;(4)有自身免疫性疾病者;(5)妊娠和哺乳妇女;(6)对替罗非班过敏者。其中男 58 例,女 30 例;平均

作者简介:陈刚(1975-),男,本科,副主任医师,从事冠心病的防治方面的研究, E-mail: Suling031@126.com

△通讯作者:吴志坚(1967-),男,博士,副研究员,从事血管内皮细胞功能的方向研究

(收稿日期:2014-11-09 接受日期:2014-11-28)

年龄(54.3 ± 10.2)岁;其中不稳定型心绞痛 32 例,非 ST 段抬高型心肌梗死 22 例,ST 段抬高心肌梗死 34 例。另选造影正常的胸痛患者组 28 例作为对照组,男 18 例,女 10 例,有胸闷胸痛症状但冠状动脉造影正常(行心电图、心脏 B 超、颈部血管 B 超检查示正常)。两组比较,其年龄、性别、血压血脂血糖、吸烟饮酒史以及体重质量指数 (BMI) 等方面差异无显著统计学意义,两组具有可比性。

表 1 一般临床资料比较

Table 1 Comparison of general data

指标 Indexes	ACS 组(n=88)	对照组(n=28)
	ACS group	Control group
男 / 女 M/F	58/30	18/10
年龄(岁)Age(years)	54.3± 10.2	55.2± 9.6
BIM(kg/m ²)	22.1± 3.0	21.6± 2.8
吸烟 Smoking	51(57.9%)	16(57.1%)
饮酒 Drinking	55(62.5%)	17(64.3%)
高血压 Hypertension	42(47.7%)	14(50.0%)
糖尿病 Diabetes mellitus	16(18.1%)	5(17.8%)
冠心病家族史 Family history of coronary heart disease	13(14.8%)	4(14.3%)

1.2 方法

1.2.1 观察指标 分别于冠脉造影时取冠脉血检测 CD4⁺ T 细胞亚群 Th1/Th2、Th17/Treg 比例表达变化,主要通过检测 Th1 细胞代表因子 INF- γ 、Th2 细胞型细胞因子 IL-4, Th17 型细胞因子 IL-17 以及 Treg 细胞分泌的 Foxp3 表达情况。

1.2.2 检测方法 两组均于行急诊冠脉造影时利用指引导管抽取冠脉内血液 5ml,肝素钠抗凝。采用淋巴细胞分离液(天津灏洋公司)分离出外周血单个核细胞(PBMC)。10%小牛血清的 1640 培养基重悬细胞,制备成单细胞悬液,细胞浓度 1×10^7 /mL。分别加入 Ionomycin ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)、PMA ($100 \text{ ng}/\text{mL}$)以及 BFA $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, 37°C , 5%CO₂ 孵箱孵育 6 小时。孵育后的细胞用 PBS 洗涤,加入 FITC-CD4 抗体 $1 \mu\text{L}$, 4°C 避光孵育 60 min。所有样本加 PBS 洗涤 1 次,弃上清。加入 Foxp3 检测打孔 / 固定浓缩液 1 mL,并旋涡混匀,置于 4°C 避光孵育 1 h。再加入 2 mL 稀释至 $1 \times$ 的透化工作液洗涤细胞,重悬细胞。每样本再分为

两管,一管加抗 IL-4 抗体以及抗 INF- γ 抗体各 $1 \mu\text{L}$,另一管加抗 Foxp3 抗体 $0.5 \mu\text{L}$,抗 IL-17A 抗体 $1 \mu\text{L}$ 。设立同型对照管,置于 4°C 避光孵育 60 分钟后,加入 2 mL 透化工作液洗涤细胞 2 次,冷 PBS 重悬细胞,迅速上流式细胞仪检测。所有抗体均购自广州必第生物科技有限公司。

1.3 统计学分析

采用 SPSS16.0 统计软件对数据进行统计分析,数据均以均数士标准差($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示,根据数据类型对其进行配对 t 检验、卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者各 CD4⁺ T 亚群中占 CD4⁺ T 淋巴细胞的比例

见图 1,表 2 两组比较,冠脉血中 Th1 与 Th2 占 CD4⁺ T 细胞的比例具有显著性差异($P < 0.05$);与对照组 Th1 细胞百分比(7.03 ± 3.01)比较,ACS 组 Th1 细胞百分比显著增高(10.66 ± 5.08);对照组 Th2 细胞百分比为(2.45 ± 1.13),ACS 组 Th2 细胞百分比(1.43 ± 0.86)显著降低。

两组比较,冠脉血中 Th17 与 Treg 占 CD4⁺ T 细胞的比例具有显著性差异($P < 0.05$);与对照组 Th17 细胞百分比(1.81 ± 1.09)比较,ACS 组 Th17 细胞百分比显著(2.77 ± 1.13)增高;而 Treg 细胞百分比两组比较,对照组 Treg 细胞百分比为 4.57 ± 1.66 ,ACS 组 Treg 细胞百分比(2.13 ± 1.07)显著降低。

表 2 不同 CD4⁺ T 亚群在冠脉血 CD4⁺ T 淋巴细胞中的比例

Table 2 Percentages of CD4⁺ T subsets in CD4⁺ T lymphocytes in

Blood ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

T subsets / CD4 ⁺ T cells (%)	对照组 Control group	ACS 组 ACS group
Th1/CD4 ⁺	7.03± 3.01	10.66± 5.08*
Th2/CD4 ⁺	2.45± 1.13	1.43± 0.86*
Th17/CD4 ⁺	1.81± 1.09	2.77± 1.13*
Treg/CD4 ⁺	4.57± 1.66	2.13± 1.07*
CD4 ⁺ T	39.88± 4.23	41.23± 5.09

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

Note: compared with control group,* $P < 0.05$.

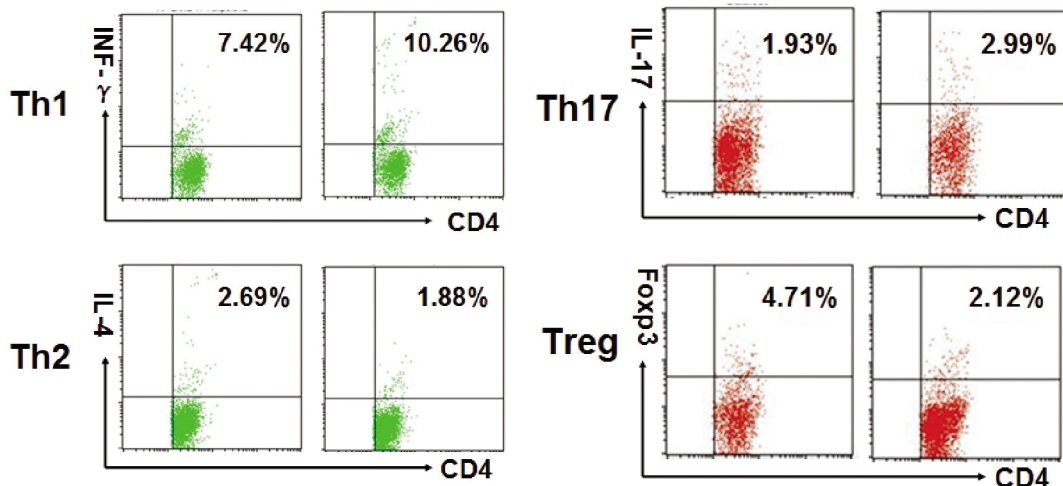


图 1 不同组间冠脉血中各亚群占 CD4⁺ T 细胞的比例(%)

Fig. 1 Percentages of CD4⁺ T subsets in CD4⁺ T lymphocytes in Blood(%)

3 讨论

目前冠心病依然是我国目前居民死因构成中上升最快及威胁公众健康最为严重的疾病之一,其发生的主要病理基础是AS^[9-11]。目前研究发现在AS的各个阶段都有炎症因子、炎症免疫细胞的介入,炎症广泛参与了AS发生发展的全过程^[12]。既往研究已证明动脉粥样硬化斑块是由巨噬细胞和T淋巴细胞构成的炎性斑块^[13],其中CD4⁺辅助性T淋巴细胞在AS发展过程中发挥至关重要的作用^[14]。CD4⁺T淋巴细胞根据分泌的细胞因子的不同可分化为Th1、Th2、Th17以及Treg4等多个功能亚群,不同的功能亚群发挥着不同的免疫调节作用。Th1细胞主要分泌细胞因子IFN- γ 和IL-2促进细胞免疫;Th2细胞主要分泌IL-4、IL-5以及IL-13。一般认为健康人群体内Th1和Th2细胞间存在平衡关系,Th1/Th2细胞失衡参与自身免疫、感染、肿瘤、心血管及代谢等的多种疾病发生发展^[15],其中IFN- γ 和IL-2的Th1细胞亚群可加速动脉粥样硬化的进程^[16,17]。Th17是2005年发现的新T细胞亚群,其特点是产生以IL-17为代表的炎性细胞因子^[18];而调节性T细胞是一群具有抑制其它免疫细胞功能的免疫调节细胞,在自身免疫耐受中起着非常重要的作用^[19]。

本研究通过流式细胞仪检测技术分析ACS患者冠脉内血中CD4⁺T淋巴细胞不同功能亚群变化研究,进一步评估CD4⁺T淋巴细胞在ACS患者动脉粥样硬化斑块破裂中发挥的作用,为找出ACS的发病机制和治理措施提供一条新思路。本研究结果显示与造影结果正常患者比较,ACS患者冠脉血中促进免疫的Th1、Th17细胞占总CD4⁺T淋巴细胞百分比显著升高;而Th2细胞以及具有抑制其它免疫细胞功能的免疫调节细胞Treg占总CD4⁺T淋巴细胞百分比显著降低,差异均具有统计学意义。该结果表明ACS患者体内免疫反应增强,CD4⁺T淋巴细胞不同功能亚群均参与了AS的发生发展,且各自在AS发病中发挥不同的作用机制,Th1细胞分泌的IFN- γ 及Th17细胞分泌IL-17A可以加剧局部或系统多种炎性细胞的激活,从而导致动脉粥样硬化斑块的不稳定。而Th2和Treg分泌的相关因子IL-4、IL-10和Foxp3等抗炎细胞因子在拮抗动脉粥样硬化发展中起相反作用,与相关报道有相似^[4,16,20]。

参考文献(References)

- [1] 潘永寿, 庾红玉, 阮坚, 等. 冠心病患者左室峰值充盈率与左室心肌质量的相关性分析[J]. 广西医学, 2012, 34(1): 23-25
Pan Yong-shou, Yu Hong-yu, Ruan Jian, et al. Correlation analysis of left ventricular peak filling rate and left ventricular mass [J]. Guangxi Medical Journal, 2012, 34(1): 23-25
- [2] Nishizawa T, Kanter JE, Kramer F, et al. Testing the role of myeloid cell glucose flux in inflammation and atherosclerosis [J]. Cell Rep, 2014, 7(2): 356-365
- [3] Wang J, Liu H, Sun J, et al. Varying Correlation Between 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography and Dynamic Contrast-Enhanced MRI in Carotid Atherosclerosis: Implications for Plaque Inflammation[J]. Stroke, 2014, 45(6):1842-1845
- [4] Rosenson RS, Brewer HB, Rader DJ. Lipoproteins as biomarkers and therapeutic targets in the setting of acute coronary syndrome [J]. Circ Res, 2014, 114(12): 1880-1889
- [5] Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty

- streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association [J]. Circulation, 1994, 89 (5): 2462-2478
- [6] Olson NC, Doyle MF, Jenny NS, et al. Decreased naive and increased memory CD4 (+) T cells are associated with subclinical atherosclerosis: the multi-ethnic study of atherosclerosis[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71498
- [7] Hong M, Jiang Z, Zhou YF. Effects of thermotherapy on TH1/TH2 cells in esophageal cancer patients treated with radiotherapy[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(5): 2359-2362
- [8] Ji NF, Xie YC, Zhang MS, et al. Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 21(1): 76-81
- [9] Pradhan P, Qin H, Leleux JA, et al. The effect of combined IL10 siRNA and CpG ODN as pathogen-mimicking microparticles on Th1/Th2 cytokine balance in dendritic cells and protective immunity against B cell lymphoma[J]. Biomaterials, 2014, 35(21): 5491-504
- [10] Vinson A, Curran JE, Johnson MP, et al. Genetical genomics of Th1 and Th2 immune response in a baboon model of atherosclerosis risk factors[J]. Atherosclerosis, 2011, 217(2): 387-394
- [11] Daugherty A, Rateri DL. T lymphocytes in atherosclerosis: the yin-yang of Th1 and Th2 influence on lesion formation [J]. Circ Res. 2002, 90(10): 1039-1040
- [12] Zhu ZF, Meng K, Zhong YC, et al. Impaired circulating CD4⁺ LAP⁺ regulatory T cells in patients with acute coronary syndrome and its mechanistic study[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88775
- [13] Lin YZ, Wu BW, Lu ZD, et al. Circulating Th22 and Th9 levels in patients with acute coronary syndrome [J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 635672
- [14] Zhang L, Wang T, Wang XQ, et al. Elevated frequencies of circulating Th22 cell in addition to Th17 cell and Th17/Th1 cell in patients with acute coronary syndrome [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e71466
- [15] Ma Y, Yuan X, Deng L, et al. Imbalanced frequencies of Th17 and Treg cells in acute coronary syndromes are mediated by IL-6-STAT3 signaling[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e72804
- [16] Zheng Y, Wang Z, Deng L, et al. Osteopontin promotes inflammation in patients with acute coronary syndrome through its activity on IL-17 producing cells[J]. Eur J Immunol, 2012, 42(10): 2803-2814
- [17] Sato K, Nuki T, Gomita K, et al. Statins reduce endothelial cell apoptosis via inhibition of TRAIL expression on activated CD4 T cells in acute coronary syndrome [J]. Atherosclerosis, 2010, 213(1): 33-39
- [18] Feng DY, Zhang CT, Ma YX, et al. Kv1.3 potassium channel expression changes after CD4(+) and subsets CD28(null)/CD28(+)T cells activation in peripheral blood of patients with acute coronary syndrome[J]. Chinese Journal of Cardiology, 2009, 37(7):599-604
- [19] Pryshchep S, Sato K, Goronzy JJ, et al. T cell recognition and killing of vascular smooth muscle cells in acute coronary syndrome [J]. Circ Res, 2006, 98(9): 1168-1176
- [20] Liu Y, Syed Z, Scirica BM, et al. ECG Morphological Variability in Beat Space for Risk Stratification After Acute Coronary Syndrome[J]. J Am Heart Assoc, 2014, 3(3). pii: e000981