

急性心肌梗死患者外周血 T 淋巴细胞表达人白细胞 - DR 抗原的变化

张志方 王巍松 张春艳^① 吕 品 林文健

中山医科大学生理学教研室, ^①免疫学教研室, 广州 510089)

主题词 心肌梗死, 急性; T 淋巴细胞; 人白细胞 - DR 抗原; 流式细胞术; 植物凝集素; 沸波醇酯; Ionomycin; CD4 - CD8 比值

摘 要 为研究急性心肌梗死患者外周血 T 淋巴细胞表达人白细胞 - DR 抗原的变化。将新鲜的全血或经培养的全血与抗体混合, 取有核细胞, 加入抗 IgG·异硫氰酸荧光素和抗 IgG·藻红蛋白, 用流式细胞仪技术进行分析。结果发现: ① CD3 抗原阳性细胞无显著改变, CD8 抗原阳性细胞和人白细胞 - DR 抗原阳性细胞显著增高, CD4 抗原阳性细胞和 CD4/CD8 比值显著降低; ② CD3 抗原和 DR 抗原双阳性细胞和 CD4 抗原和 DR 抗原双阳性细胞显著增加, CD8 抗原和 DR 抗原双阳性细胞无显著变化, CD4 抗原和 DR 抗原与 CD8 抗原和 DR 抗原比值增高; ③ 在植物凝集素、沸波醇酯和沸波醇酯 + ionomycin 等刺激剂存在的情况下, CD3 抗原和 DR 抗原表达降低, CD8 抗原和 DR 抗原表达与对照组无显著性差异。提示急性心肌梗死患者 T 淋巴细胞表达白细胞 - DR 抗原异常。

Changes of Human Leukocyte Antigen DR (HLA - DR) Antigens Expression on the Peripheral Blood T - Lymphocyte in Patients with Acute Myocardial Infarction

ZHANG Zhi - Fang, WANG Wei - Song^②, ZHANG Chun - Yan^①, LU Pin^② and LIN Wen - Jian

Department of Physiology, ^① Department of Immunology, Sun Yat - Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089. ^② Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of JNUMC, Guangzhou 510632, China)

MeSH Myocardial Infarction, Acute; T-Lymphocytes; HLA-DR Antigens; Flow Cytometry; Phytohemagglutinins; Phorbol 12, 13-Dibutyrate; Ionomycin; CD4-CD8 Ratio

ABSTRACT **Aim** The changes of human leukocyte antigen DR (HLA-DR) antigens expression on the peripheral blood T-lymphocyte in patients with acute myocardial infarction were studied with flow cytometric analysis. **Methods** Blood samples or cultured blood samples were mixed with monoclonal antibody. Whole peripheral blood mononuclear cells were obtained from blood samples. The mononuclear cells were incubated with fluorescein isothiocyanate, FITC; or phycoerythrin, PE)-labeled monoclonal antibodies. The samples were analyzed with flow cytometry (FACStar) on the dual labeling. **Results** ① There are no significant differences between the patients with acute myocardial infarction and normal controls in CD3 + cells. The CD8 + cells and the human leukocyte antigen DR + cells had significantly increased in patients with acute myocardial infarction. The CD4 + cells and the CD4/CD8 ratio had significantly decreased in patients with acute myocardial infarction; ② In patients with acute myocardial infarction, the percentages of CD3 + DR + cells and CD4 + DR + cells increased significantly, the CD4 DR/CD8 DR ratios were increased. ③ Under the induction of phytohemagglutinin, phorbol dibutyrate or phorbol dibutyrate + ionomycin, the competence of human leukocyte antigen DR expression on CD3 + cell in patients with acute myocardial infarction are decreased significantly. The competence of human leukocyte antigen DR expression on CD8 + cell in patients with acute myocardial infarction have no difference from normal control. **Conclusion** There are abnormal human leukocyte antigen DR expression on T-lymphocyte and its subsets in patients with acute myocardial infarction.

多年来人们对与冠心病有关的病理生理学变化作了大量的研究, 除了高血压、高血脂及高血糖等因素外, 免疫损伤在冠心病中的作用已日益受到重视。实验表明, 机体免疫功能紊乱可能参与急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 的发生, 间接或直接引起梗死面积扩大或并发症的发生^[1,2]。我们的实验结果也表明, AMI 患者存在着严重的细胞免疫

功能紊乱现象^[3], 为进一步研究 AMI 患者细胞免疫功能的变化, 本研究利用双色免疫荧光标记流式细胞仪技术观察急性心肌梗死患者外周血活性 T 淋巴细胞及其亚群表达人白细胞 - DR (human leukocyte antigen-DR, HLA-DR) 抗原的变化。

1 对象和方法

1.1 对象

根据 1979 年 ISFC/WHO 诊断标准,选择发病 5 天内 AMI 病人 15 例,其中男性 11 例,女性 4 例,平均年龄 66.4 ± 9.5 岁,所有患者均无免疫性疾病和近期感染。正常对照组 12 例,其中男性 8 例,女性 4 例,平均年龄 60.7 ± 8.7 岁,全部来自于健康体检者,并经体检和实验室检查确认无心脑血管及肝肾等疾病。

1.2 试剂

小鼠抗人荧光标记单克隆抗体抗 CD3、抗 CD4、抗 CD8 和抗 DR 等均购自美国 BDIS 公司 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose); 植物凝集素 (phytohemagglutinin, PHA) 购自中国科学院上海生物化学研究所; RPMI-1640 培养基、沸波醇酯 (phorbol 12, 13-dibutyrate, PDB) 和 Ionomycin (IONO) 购自美国 Sigma 公司。

1.3 淋巴细胞体外活化

取 AMI 患者及正常人外周血 5 mL, 肝素抗凝, 分四组进行全血体外培养。简述如下: ①抗凝血按 1:1 用完全 RPMI-1640 培养基稀释, 在 5% CO₂、37℃ 的条件下培养 72 h。②抗凝血按 1:1 用完全 RPMI-1640 培养基稀释后, 分别加入刺激剂 PHA (20 ng/L)、PDB (1×10^{-7} mol/L) 和 PDB (1×10^{-7} mol/L) + IONO (2×10^{-7} mol/L), 在 5% CO₂、37℃ 的条件下培养 72 h。

1.4 淋巴细胞荧光抗体标记

新鲜的全血或经培养的全血 30 μ L 与抗体 10 μ L 混合, 室温孵育 30 min。红细胞裂解液 0.155 mol/L NH₄Cl, 0.01 mol/L KHCO₃, 0.1 mol/L EDTA, pH 7.4) 裂解红细胞, 离心获取有核细胞, 用 PBS 洗

涤两次后, 加入抗 IgG·异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 10 μ L, 室温孵育 30 min, PBS 洗涤。第二次荧光标记方法同上, 标记荧光单抗为抗 IgG·藻红蛋白 (phycoerythrin, PE)。PBS 洗涤后用 1% 多聚甲醛固定 10 min 后, 用流式细胞仪分析。

1.5 流式细胞仪数据获取和分析

全部数据用流式细胞仪 (FAC Star Plus, 美国 BD 公司) 和软件 LYSYS II 进行双色荧光参数获取和分析。简述如下: 在前散射 (FSC) 和侧散射 (SSC) 的二维 Dot-plot 图中, 划出淋巴细胞区, 然后对淋巴细胞作 FITC 和 PE 的荧光强度检测, 荧光 I (FL1) 为 FITC, 滤过片为 530 ± 10 nm 带通, 荧光 II (FL2) 为 PE, 滤光片为 575 ± 10 nm 带通。数据分析时, 在确定每次检测阳性细胞百分率之前, 根据 Isotype 的非特异性荧光强度设定界限, 以确定双阴性、双阳性和单阳性区。

1.6 统计学处理

计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 实验结果用 GB-Stat 数据统计软件分析, 两组均数比较使用 Student *t* 检验。

2 结果

2.1 急性心肌梗死患者外周血 T 细胞亚群和人白细胞-DR 抗原表达水平的变化

由表 1 (Table 1) 可见, 与对照组相比较, AMI 患者外周血 CD3 阳性细胞无明显改变, CD4 阳性细胞显著减少 ($P < 0.05$), CD8 阳性细胞和 DR 阳性细胞显著增加 ($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$), CD4/CD8 比值明显降低 ($P < 0.01$)。表明 AMI 患者细胞免疫功能紊乱。

表 1. 急性心肌梗死患者外周血 T 细胞亚群和人白细胞-DR 抗原表达水平的改变

Table 1. Changes of T-cell subsets and expressions of human leukocyte antigen DR in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction (AMI) ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	CD3 + (%)	CD4 + (%)	CD8 + (%)	DR + (%)	CD4/CD8
Control	12	62.8 ± 12.0	40.8 ± 10.3	23.9 ± 10.7	17.8 ± 9.6	1.7 ± 0.6
AMI	15	68.4 ± 8.0	29.1 ± 13.2^a	46.6 ± 19.4^c	36.2 ± 12.7^b	0.7 ± 0.3^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$, compared with control group

2.2 急性心肌梗死患者 T 细胞及其亚群表达人白细胞-DR 抗原的改变

急性心肌梗死患者 T 细胞及其亚群表达人白细胞-DR 抗原的百分率见表 2 (Table 2), 可见 CD3 和 DR 双阳性细胞和 CD4 和 DR 双阳性细胞显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), CD8 和 DR 双阳性细胞未见

明显改变, CD4 和 DR 双阳性细胞与 CD8 和 DR 双阳性细胞比值显著升高 ($P < 0.001$)。说明 AMI 患者活性 T 淋巴细胞平衡失调。

2.3 不同处理因素对急性心肌梗死患者 T 淋巴细胞表达 CD3DR 抗原的影响

植物凝集素 (PHA)、沸波醇酯 (PDB) 和沸波醇酯

(PDB) + IONO 对 AMI 患者 T 淋巴细胞表达 CD3 和 DR 抗原的百分率见表 3 (Table 3)。与对照组相比, AMI 患者外周血淋巴细胞在培养前表达 CD3 和 DR 抗原百分率显著增高 ($P < 0.05$); 培养后与对照组无显著性差异; 在 PHA、PDB 和 PDB + IONO 刺激情况下, 与对照组相比表达 CD3 和 DR 抗原百分率显著减少 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 与 AMI 组培养后未加刺激剂组相比未见显著增加; PHA、PDB 和 PDB + IONO 三种刺激情况之间表达 CD3 和 DR 无显著性差异。说明 AMI 患者淋巴细胞表达 DR 的能力虽然增高, 但对 PHA、PDB 和 PDB + IONO 等刺激剂的反

应能力却显著降低。

表 2. 急性心肌梗死患者 T 细胞及其亚群表达 DR 抗原的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Changes of human leukocyte antigen DR expression on T lymphocyte and its subsets in patients with acute myocardial infarction

Groups	n	CD3 + DR + (%)	CD4 + DR + (%)	CD8 + DR + (%)	CD4 + DR / CD8 + DR
Control	12	8.6 ± 7.7	2.0 ± 1.8	7.0 ± 5.4	0.3 ± 0.3
AMI	15	21.3 ± 9.2 ^a	14.4 ± 8.5 ^b	7.2 ± 4.2	2.0 ± 0.8 ^c

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$, compared with control group

表 3. 植物凝集素 (PHA)、沸波醇酯 (PDB) 和沸波醇酯 (PDB) + ionomycin (IONO) 对急性心肌梗死患者淋巴细胞表达 CD3DR 抗原的影响

Table 3. Effects of phytohemagglutinin, phorbol dibutyrate or phorbol dibutyrate + ionomycin on CD3 + DR + expression on T-lymphocyte in patients with acute myocardial infarction ($\bar{x} \pm s$, %)

Groups	n	BC	AC	PHA	PDB	PDB + IONO
Control	12	10.1 ± 5.6	12.3 ± 6.9	28.7 ± 16.8	37.3 ± 17.7	40.8 ± 22.6
AMI	15	21.3 ± 9.2 ^a	8.4 ± 7.7	9.17 ± 5.85 ^b	10.1 ± 6.2 ^c	15.9 ± 6.4 ^b

BC: before culture; AC: after culture. a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$, compared with control group

2.4 不同处理因素对急性心肌梗死患者 T 淋巴细胞表达 CD8 和 DR 的影响

植物凝集素 (PHA)、沸波醇酯 (PDB) 和沸波醇酯 (PDB) + IONO 对急性心肌梗死患者 T 淋巴细胞表达

CD8 和 DR 抗原的百分率见表 4 (Table 4)。AMI 患者外周血淋巴细胞在培养前、培养后、PHA 刺激、PDB 刺激和 PDB + INON 刺激等情况下, 表达 CD8 和 DR 抗原百分率与对照组相比, 均无显著性差异。

表 4. 植物凝集素、沸波醇酯和沸波醇酯 + ionomycin 对急性心肌梗死患者淋巴细胞表达 CD8DR 抗原百分率的影响

Table 4. Effects of phytohemagglutinin, phorbol dibutyrate or phorbol dibutyrate + ionomycin on CD8 + DR + expression on T-lymphocyte in patients with acute myocardial infarction ($\bar{x} \pm s$, %)

Groups	n	BC	AC	PHA	PDB	PDB + IONO
Control	12	8.0 ± 7.3	10.5 ± 7.4	17.3 ± 10.4	28.0 ± 16.2	29.7 ± 18.1
AMI	15	7.2 ± 4.2	5.2 ± 5.2	13.3 ± 12.5	16.7 ± 10.5	32.8 ± 20.9

BC: before culture, AC: after culture

3 讨论

急性心肌梗死患者存在免疫功能异常已经为多数实验所证实 [4~8]。T 淋巴细胞 (CD3 阳性细胞) 主要分为 CD4 + 亚群和 CD8 + 亚群, 在机体免疫功能中发挥细胞免疫作用, 同时对体液免疫功能有重要的调节作用, 因此, 研究急性心肌梗死患者 T 淋巴细胞的功能改变是研究其免疫功能异常的重要途径之一。Syrjala [5] 的报道表明, AMI 患者 CD4/CD8 比值持续低者, 多提示预后严重。我们的实验结果表明, AMI 患者外周血 CD3 阳性细胞无明显改变, CD4 阳性细胞显著减少, CD8 阳性细胞、CD4/CD8 比值明显

降低, 同时发现 DR + 细胞显著增加。说明 AMI 患者不仅存在 T 淋巴细胞及其亚群功能失调现象, 而且存在表达 DR 抗原异常。

各类淋巴细胞发挥功能与其活性有关, DR 抗原 (免疫相关抗原 Ia) 作为 T 淋巴细胞的表面活性标志, 在免疫调节中起重要作用, 如调节 TH 细胞辅助抗体 (包括自身抗体) 的产生、各种淋巴因子的生成、TS 细胞功能的诱导及成为 CD4 Tc 细胞的靶抗原引起靶细胞溶解等。有学者已开始检测该抗原在 T 细胞及其亚群中的分布以进一步确定机体的免疫功能状态及其与疾病的关系 [9~12]。Serner 等 [13] 也报道:

不稳定性心绞痛患者急性发作期,外周血 CD4 和 CD8 表达 DR 抗原显著增加,血浆可溶性 IL-2R 显著增加,而稳定性心绞痛患者无此变化。我们采用双色免疫荧光标记流式细胞仪技术检测了 AMI 患者淋巴细胞亚群及其活性标志的变化。结果发现 CD8 和 DR 双阳性细胞无明显改变,CD3 和 DR 双阳性、CD4 和 DR 双阳性细胞显著增加,CD4 和 DR 与 CD8 和 DR 比值显著增高;说明 AMI 患者 T 细胞及其亚群表达 DR 异常,且主要是 CD4 阳性细胞表达 DR 的异常。由于 DR 抗原在 CD4 阳性细胞中主要表达在 TH 细胞上,从而进一步提示 AMI 患者外周血 TH 细胞处于高活性状态。

植物凝集素活化 T 细胞的作用是通过与 T 细胞表面的 TCR 肽链的结合来实现的。PHA 通过使 CD3 分子的磷酸化而激活磷脂酶 $C\gamma$ (PLC γ), PLC γ 能使三磷酸肌醇分解产生 IP3 和 DG,由 DG 激活 PKC,从而导致 DR 的表达。PDB 是 DG 的类似物,由于能自由透过细胞膜,这样就能绕过细胞膜受体直接激活 PKC。因此,如果 T 细胞对 PHA 的刺激应答呈低反应,而对 PDB 的刺激呈高反应,便可以将低活化反应的缺陷定位于信息跨膜分子与 PKC 激活途径上。IONO 则能在细胞膜上造成钙孔使细胞膜外 Ca^{2+} 进入膜内,导致细胞内游离钙浓度升高;因此,即使细胞膜或内质网本身存在缺陷不能使细胞内的游离钙浓度升高,IONO 也能模拟 Ca^{2+} 依赖的生物学事件。本研究发现,AMI 患者外周血 CD3 阳性细胞表达 DR 增多,经培养后却降至正常,在 PHA、PDB 和 PDB + IONO 刺激情况下反而低于正常,且在三种刺激情况下 CD3 阳性细胞表达 DR 无显著性差异。说明 CD3 阳性细胞对三种刺激情况的反应能力降低,这种低反应能力与 PHA、PDB 和 IONO 的作用途径无关。同时也提示 AMI 患者血液中可能有另外一种或几种尚不清楚的刺激因素导致了 CD3 阳性细胞表达 DR 增加。对 CD8 阳性细胞表达 DR 的研究发现,AMI 患者外周血表达 DR 在培养前、培养后、以及 PHA、PDB、PDB + IONO 刺激情况下,与对照组相比均无显著性差异。由于 CD3 阳性细胞主要由 CD8 阳性细胞和 CD4 阳性细胞组成,说明 CD3 阳性细胞表达 DR 的变化不是由 CD8 阳性细胞的变化引起,很可能与培养前的结果一样,是由 CD4 阳性细胞变化引起。由于 CD4 阳性 T 细胞有诱导和辅助细胞毒性 T 细胞前身成熟为细胞毒性 T 细胞并增强 B 细胞产生抗体等作用,因此,提示急性心肌梗死患者存在的免

疫功能紊乱与 T 细胞和 B 细胞功能的异常增强有关。

本研究发现,AMI 患者 CD3 和 DR 双阳性细胞和 CD4 和 DR 双阳性细胞明显增多,结合有关文献报道^[6~8],AMI 患者外周血 IL-6、sIL-2R、mIL-2R 等增多,表明 AMI 患者 T 淋巴细胞功能严重紊乱,并且有免疫损伤的存在。对 AMI 患者免疫功能紊乱的进一步研究将有助于阐明 AMI 患者免疫损伤的机理,并对 AMI 患者的治疗提供实验和理论依据。

参考文献

- 1 Hansson GH. Immune and inflammatory mechanisms in the development of atherosclerosis. *Br Heart J*, 1993, **69** (Suppl): 38 - 41
- 2 Kaufman HS, Kvitash VI. Immunologic abnormalities associated with acute ischemic heart disease. *Ann Allergy*, 1989, **63**: 287 - 290
- 3 王巍松,张志方,吕品,等. 急性心肌梗死患者外周血活性 T 淋巴细胞亚群的研究. *中国病理生理杂志*, 1999, **15** (5): 15 - 18
- 4 Blum A, Sclarovsky S, Rehavia E, et al. Levels of lymphocyte subpopulation, interleukin-1 (and soluble interleukin-2 receptor in acute myocardial infarction. *Am Heart J*, 1994, **27** (3): 1 226 - 230
- 5 Syrjala H. Low CD4 + /CD8 + T lymphocyte ratio in acute myocardial infarction. *Clin Exp Immunol*, 1991, **83**: 326 - 328
- 6 Tashiro H, Shimokawa H, Yamamoto K, et al. Monocyte-related cytokines in acute myocardial infarction. *Am Heart J*, 1995, **130**: 446 - 452
- 7 徐兴芳,段义臣,赵连明,等. 急性心肌梗死患者 IL-6 活性的检测. *上海免疫学杂志*, 1996, **16** (2): 75
- 8 刘成玉,曲彦,谭润鸾. 急性心肌梗死病人血清 sIL-2R 水平、mIL-2R 和 T 淋巴细胞亚群的变化. *高血压杂志*, 1997, **5** (1): 30 - 32
- 9 Raziuddin S, Nur MA, Alwabel AA. Increased circulating HLA-DR + CD4 + cell in systemic lupuserythematosus. *Scand J Immunol*, 1990, **31**: 139 - 143
- 10 John YC, Paul G. Activated < Ia + > T lymphocytes and their subsets in autoimmune thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986, **62**: 403 - 406
- 11 Raziuddin S, Shetty S, Ibrahim A, et al. Activated CD4-positive T lymphocytes and impaired cell-mediated immunity in patients with carcinoma of the urinary with schistosomiasis. *Cancer*, 1990, **65**: 931 - 935
- 12 Festin R, Bjokland A, Thomas HT. Single laser flow cytometric detection of lymphocytes binding three antibodies labelled with fluorochrome conjugate. *J Immunol Methods*, 1990, **126**: 59 - 65
- 13 Neri Serneri GG, Prisco D, Martini F, et al. Acute T-cell activation is detectable in unstable angina. *Circulation*, 1997, **95** (7): 1 806 - 812

此文 1999 - 03 - 24 收到, 1999 - 05 - 10 修回)

此文编辑 胡必利)