

外周血 T 细胞亚群构成比例与冠状动脉粥样硬化的关系

聂大奥^{1,2}, 赵一俏², 靳文², 李志樑³, 傅强³, 叶文胜³, 赵令斋⁴, 邓西龙⁴

(1. 南方医科大学第三临床医学院, 广东省广州市 510630; 2. 南方医科大学

非直属附属广东省第二人民医院心血管内科, 广东省广州市 510317; 3. 南方医科大学珠江

医院心血管内科, 广东省广州市 510282; 4. 广州市第八人民医院重症医学科, 广东省广州市 510060)

[关键词] 冠心病; 动脉粥样硬化; 流式细胞术; T 淋巴细胞亚群

[摘要] **目的** 探讨冠心病患者外周血 T 细胞亚群构成比例与冠状动脉粥样硬化病变程度的关系, 为 T 淋巴细胞介导的免疫炎症反应诱导斑块进展提供依据。**方法** 选择 2012 年 6 月至 2012 年 12 月在南方医科大学珠江医院心内科住院经冠状动脉造影术检查及治疗患者 57 例, 其中造影检查正常 13 例(对照组), 稳定型心绞痛 14 例, 不稳定型心绞痛 15 例, 急性心肌梗死 15 例。采用流式细胞仪检测外周血 CD3⁺ 细胞占淋巴细胞比例, CD4⁺、CD8⁺ 细胞占 T 淋巴细胞比例, 以及 CD4⁺CD25⁺Treg 和 CD4⁺CD28⁻T 细胞占 CD4⁺T 细胞比例, 评价各组间差异, 并对外周血 T 淋巴细胞亚群与冠状动脉粥样硬化病变程度(改良 Gensini 评分)进行相关性分析。**结果** 稳定型心绞痛组、不稳定型心绞痛组以及急性心肌梗死组患者 CD3⁺ 细胞占淋巴细胞比例明显高于对照组(均 $P < 0.05$); 与对照组和稳定型心绞痛组相比, 不稳定型心绞痛组以及急性心肌梗死组 CD4⁺ 及 CD8⁺ 细胞占 CD3⁺ 细胞比例差异有统计学意义(均 $P < 0.05$); CD4⁺CD25⁺Treg 及 CD4⁺CD28⁻T 细胞占 CD4⁺ 细胞比例差异也有统计学意义(均 $P < 0.05$)。外周血 CD3⁺T 细胞与 Gensini 评分呈显著正相关($r = 0.608, P < 0.01$); CD4⁺T 细胞与 Gensini 评分呈显著正相关($r = 0.624, P < 0.01$); CD8⁺T 细胞与 Gensini 评分呈显著负相关($r = -0.548, P < 0.01$); CD4⁺CD25⁺Treg 细胞与 Gensini 评分呈显著负相关($r = -0.617, P < 0.01$); CD4⁺CD28⁻T 细胞与 Gensini 评分呈正相关, 但相关关系不大($r = 0.399, P < 0.01$)。**结论** T 淋巴细胞亚群广泛参与了动脉粥样硬化的发生发展, 对冠心病临床危险分层有一定的预测价值。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Correlation Between Peripheral Blood T Lymphocyte Subgroup Proportion and the Severity of Coronary Atherosclerosis

NIE Da-Ao^{1,2}, ZHAO Yi-Qiao², JIN Wen², LI Zhi-Liang³, FU Qiang³, YE Wen-Sheng³, ZHAO Ling-Zhai⁴, and DENG Xi-Long⁴

(1. The Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510630; 2. Cardiovascular Department, Affiliated Nanyue Hospital, Guangdong No. 2 Provincial People's Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510317; 3. Cardiovascular Department, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282; 4. Guangzhou No. 8 People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510060, China)

[KEY WORDS] Coronary Heart Disease; Atherosclerosis; Flow Cytometry; T-lymphocyte Subsets

[ABSTRACT] **Aim** To assess the correlation between the peripheral blood T cell subgroup proportion and the degree of coronary atherosclerosis in patients with coronary heart disease; to provide the evidence for the T lymphocyte mediating immune inflammation, and inducing plaque progression. **Methods** Fifty-seven patients were enrolled after routine and coronary angiography examinations between June 2012 and December 2012. The proportion of peripheral blood CD3⁺ cell in peripheral blood lymphocyte, and CD4⁺, CD8⁺ cell in the T lymphocyte, and CD4⁺CD25⁺Treg, CD4⁺CD28⁻T cell in the CD4⁺T cells, were detected by flow cytometry using five-color fluorescent markers. Correlation between the

[收稿日期] 2013-03-14

[基金项目] 广东省科技计划资助项目(2011B031800301)

[作者简介] 聂大奥, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础和临床治疗, E-mail 为 328099124@ qq.com。通讯作者赵一俏, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础和临床治疗, E-mail 为 1078109229@ qq.com。

peripheral blood T lymphocyte subgroup and the degree of coronary atherosclerosis (modified Gensini standard) was analyzed. **Results** The proportion of peripheral blood CD3⁺ cell in stable angina pectoris(SAP) group, unstable angina pectoris(UAP) group and acute myocardial infarction (AMI) group were significantly higher than those in control group (all $P < 0.05$). The proportion of CD4⁺ cell and CD8⁺ cell in UAP group and AMI group were significantly different compared with those in control group and SAP group (all $P < 0.05$). The proportion of CD4⁺CD25⁺Treg and CD4⁺CD28⁻ cell in UAP group and AMI group were significantly different compared with those in control group and SAP group (all $P < 0.05$). The peripheral blood CD3⁺ cell were positively correlated with Gensini score($r = 0.608, P < 0.01$). The CD4⁺ cell were positively correlated with Gensini score ($r = 0.624, P < 0.01$). The CD8⁺ cell were negatively correlated with Gensini score ($r = -0.548, P < 0.01$). The CD4⁺CD25⁺Treg were negatively correlated with Gensini score ($r = -0.617, P < 0.01$). The CD4⁺CD28⁻T cell were positively correlated with Gensini score($r = 0.399, P < 0.01$). **Conclusions** T lymphocyte subgroup plays an important role in the development and progression of atherosclerosis, and has certain prospective value in the clinical evaluation of the severity of the coronary disease.

冠心病(coronary heart disease, CHD)尤其是急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)是危及患者生命的主要原因。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是冠心病的病理基础。大量研究表明^[1-3], As 是一种慢性免疫炎症性疾病。目前与 T 淋巴细胞相关的免疫细胞及免疫分子在冠心病发生发展中的作用已成为研究热点。本研究拟通过流式细胞术检测不同临床分型冠心病患者外周血 T 细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD25⁺Treg、CD4⁺CD28⁻T 细胞比例,旨在探讨 T 淋巴细胞亚群是否与 As 的进展相关。

1 对象与方法

1.1 研究对象与分组

选择 2012 年 6 月至 2012 年 12 月在南方医科大学珠江医院心内科住院的患者共 57 例,其中男 41 例,女 16 例。所有入选患者行冠状动脉造影检查(coronary arteriography, CAG)。冠心病诊断符合世界卫生组织冠心病诊断标准,经冠状动脉造影证实至少有一支冠状动脉内径狭窄 $\geq 50\%$ 。根据以下诊断标准,将入选患者分为 4 组:(1)对照组,13 例,有胸痛病史,经体检、心电图及负荷试验、心脏超声、CAG 等检查均未发现异常。(2)稳定型心绞痛(stable angina pectoris, SAP)组,14 例,劳累性心绞痛发作 2 月内无改变,运动试验阳性,CAG 诊断为冠心病。(3)不稳定型心绞痛(unstable angina pectoris, UAP)组,15 例,诊断为冠心病并符合下列条件:①静息型心绞痛,持续时间 > 20 min;严重初发型心绞痛或恶化性心绞痛;②心绞痛发作时,心电图出现短暂的缺血性 ST 段改变,发作缓解后,ST 段改变迅速恢复正常或接近正常;③心肌肌钙蛋白 T(cTnT)阴性,梗死后心绞痛排除在外。(4)急性心肌梗

死(acute myocardial infarction, AMI)组,15 例,根据临床症状、心电图改变及动态演变,单纯右心室梗死排除在外,CAG 诊断为冠心病。入选患者排除以下情况:合并脑卒中、严重的肝肾功能不全者;此前 6 个月内发生过心肌梗死者;入院时心前区疼痛超过 12 h 者;排除严重感染性疾病、自身免疫性疾病者,以及应用炎症抑制药物如非甾体类抗炎药、类固醇及鸦片类等药物者。

1.2 主要试剂和设备

荧光素偶联抗体(美国 BD 公司):CD3-FITC MAB, CD4-ALEXA 700 MAB, CD8-PerCP-Cy5.5 MAB, CD25 NHP APC MAB, MS IgG1 KPA ITCL NHP APC, CD28 NHP PE MAB, MS IgG1 KPA ITCL NHP PE;红细胞裂解液(美国 BD 公司):PHARM LYSE 10 \times 100 ML,流式细胞仪(美国 BD 公司):FACS Canto II。

1.3 标本的采集

对照组、SAP 组患者均于入院后第 2 天清晨空腹采取静脉血,ACS 患者于入院后急诊手术前采取静脉血,所有受试者均采血 10 mL,其中 8 mL 全血样本送本院检验中心进行常规检查;另 2 mL 全血样本采用 EDTA 抗凝,流式细胞术检测外周血 T 细胞亚群比例。

1.4 外周血 T 淋巴细胞亚群比例检测

流式细胞仪五色荧光标记技术检测外周血 T 淋巴细胞亚群。每个研究对象标本取 2 份新鲜全血 100 μ L 分别加入流式管,标记为实验管和对照管。实验管和对照管均加入 20 μ L CD3-FITC MAB, 5 μ L CD4-ALEXA 700 MAB, 5 μ L CD8-PerCP-Cy5.5 MAB;实验管再加入 20 μ L CD25 NHP APC MAB, 20 μ L CD28 NHP PE MAB;对照管加入 20 μ L CD25 以及 CD28 同型对照抗体;混匀、室温避光孵育 30 min,加入红细胞裂解液 1 mL,混匀、室温避光 15 min, PBS 洗涤离心 2

次,去上清后加入 PBS 300 μ L,混匀后用流式细胞仪分析检测 CD3⁺细胞占淋巴细胞比例,CD4⁺、CD8⁺细胞占 T 淋巴细胞比例,以及分别以对照管设门圈定 CD4⁺CD25⁺Treg 和 CD4⁺CD28⁻T 细胞,检测其占 CD4⁺T 细胞比例。

1.5 冠状动脉造影及评价

所有患者均行冠状动脉造影检查,采用 Judkins 法,造影结果由 2 名有经验的医师分析完成。经股动脉或桡动脉做冠状动脉造影,狭窄程度以直径法表示,冠状动脉狭窄以心外膜下主要血管 $\geq 50\%$ 为有意义病变。冠状动脉狭窄 $<50\%$ 者为正常(对照组)。采用改良 Gensini 标准,对主要冠状动脉左主干、左前降支、左回旋支、右冠状动脉中任何一支狭窄进行积分; $\leq 25\%$ 为 1.0 分,26%~49%为 1.5 分,50%为 2.0 分,51%~74%为 3.0 分,75%为 4.0 分,76%~89%为 6.0 分,90%为 8.0 分,91%~98%为 12.0 分,99%为 16.0 分,100%为 32.0 分。不同节段冠状动脉评分系数按该标准,冠状动脉病变程度的最终积分为各支积分之和。

表 1. 各组患者一般临床资料比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The clinical data of patients in the comparison group($\bar{x} \pm s$)

一般资料	对照组	SAP 组	UAP 组	AMI 组	F/ χ^2	P
男/女(例)	13(8/5)	14(10/4)	15(11/4)	15(12/3)	0.286	0.593
年龄(岁)	61.4 \pm 18.4	60.9 \pm 9.7	69.0 \pm 13.9	60.3 \pm 14.5	1.205	0.317
高血压(例)	4(30.8%)	4(28.6%)	3(20.0%)	6(40.0%)	0.015	0.902
TC(mmol/L)	3.65 \pm 0.49	3.62 \pm 0.37	3.84 \pm 0.81	4.62 \pm 0.85 ^{abc}	3.108	0.034
TG(mmol/L)	3.65 \pm 0.49	3.62 \pm 0.37	3.84 \pm 0.81	4.62 \pm 1.70	0.800	0.499
FPG(mmol/L)	6.32 \pm 1.74	6.23 \pm 1.66	7.39 \pm 2.78	7.67 \pm 2.96	1.354	0.267
UA(μ mol/L)	388.2 \pm 97.7	377.1 \pm 87.5	383.7 \pm 100.9	475.1 \pm 129.4 ^{abc}	2.835	0.047
Gensini 评分	6.04 \pm 5.38	33.36 \pm 14.03 ^a	52.60 \pm 15.15 ^{ab}	72.97 \pm 12.62 ^{abc}	71.734	<0.001

a 为 $P < 0.05$,与对照组相比;b 为 $P < 0.05$,与 SAP 组相比;c 为 $P < 0.05$,与 UAP 组相比。

2.2 外周血 T 淋巴细胞亚群比例

AMI 组、UAP 组、SAP 组 CD3⁺细胞占淋巴细胞比例,及 CD4⁺、CD8⁺细胞占 T 淋巴细胞比例,与对照组比差异有显著性(均 $P < 0.05$);CD4⁺CD25⁺Treg 和 CD4⁺CD28⁻T 细胞占 CD4⁺T 细胞比例在 AMI 组、UAP 组较 SAP 组和对照组差异有显著性(均 $P < 0.05$);可见,AMI 组、UAP 组、SAP 组较对照组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺CD28⁻T 细胞比例升高,而 CD8⁺T 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 细胞降低(表 2 和图 1)。说明免疫反应与冠状动脉粥样斑块不稳定性之间存在密切联系。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件包进行数据处理。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析;若方差不齐采用 Welch 法,组间多重比较则采用 Dunnetts' T3 检验。计数资料用 χ^2 检验。相关性分析采用 Pearson 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基线资料

各组患者间性别比例、年龄分布、高血压患者比例、甘油三酯(triglyceride, TG)、空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)等方面比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。血清总胆固醇(serum total cholesterol, TC)、尿酸(uric acid, UA)在 AMI 组与其他三组间比较差异有显著性($P < 0.05$),后三组间比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);冠状动脉 Gensini 评分在四组间相比有统计学差异(均 $P < 0.01$;表 1)。

2.3 外周血 T 淋巴细胞亚群比例与冠状动脉病变程度的相关性分析

分别对 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD25⁺Treg, 及 CD4⁺CD28⁻T 细胞与 Gensini 评分指标采用 Pearson 直线相关分析,结果提示:外周血 CD3⁺T 细胞($r = 0.608, P < 0.01$)和 CD4⁺T 细胞($r = 0.624, P < 0.01$)均与 Gensini 评分呈显著正相关;外周血 CD8⁺T 细胞($r = -0.548, P < 0.01$)和 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞($r = -0.617, P < 0.01$)均与 Gensini 评分呈显著负相关;外周血 CD4⁺CD28⁻T 细胞与 Gensini 评分呈正相关,但相关关系不大($r = 0.399, P < 0.01$)。

表 2. 各组患者外周血 T 细胞亚群数量($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 2. Peripheral blood T cell subsets proportion in patients of each group($\bar{x} \pm s, \%$)

项 目	对照组	SAP 组	UAP 组	AMI 组	F	P
CD3 ⁺	47.76 ± 10.07	56.61 ± 7.49 ^a	63.17 ± 9.79 ^a	70.17 ± 10.59 ^{abc}	13.855	<0.001
CD4 ⁺	41.44 ± 9.14	52.49 ± 9.60 ^a	62.54 ± 9.32 ^{ab}	68.28 ± 11.32 ^{ab}	19.670	<0.001
CD8 ⁺	53.92 ± 10.87	44.66 ± 9.86 ^a	36.39 ± 11.20 ^{ab}	31.10 ± 9.54 ^{ab}	12.827	<0.001
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg	57.51 ± 12.62	50.19 ± 9.27	39.85 ± 11.88 ^{ab}	32.37 ± 9.56 ^{ab}	14.568	<0.001
CD4 ⁺ CD28 ⁻ T	12.61 ± 9.06	13.04 ± 6.44	20.68 ± 9.50 ^{ab}	22.65 ± 11.55 ^{ab}	4.321	0.008

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 SAP 组相比; c 为 $P < 0.05$, 与 UAP 组相比。

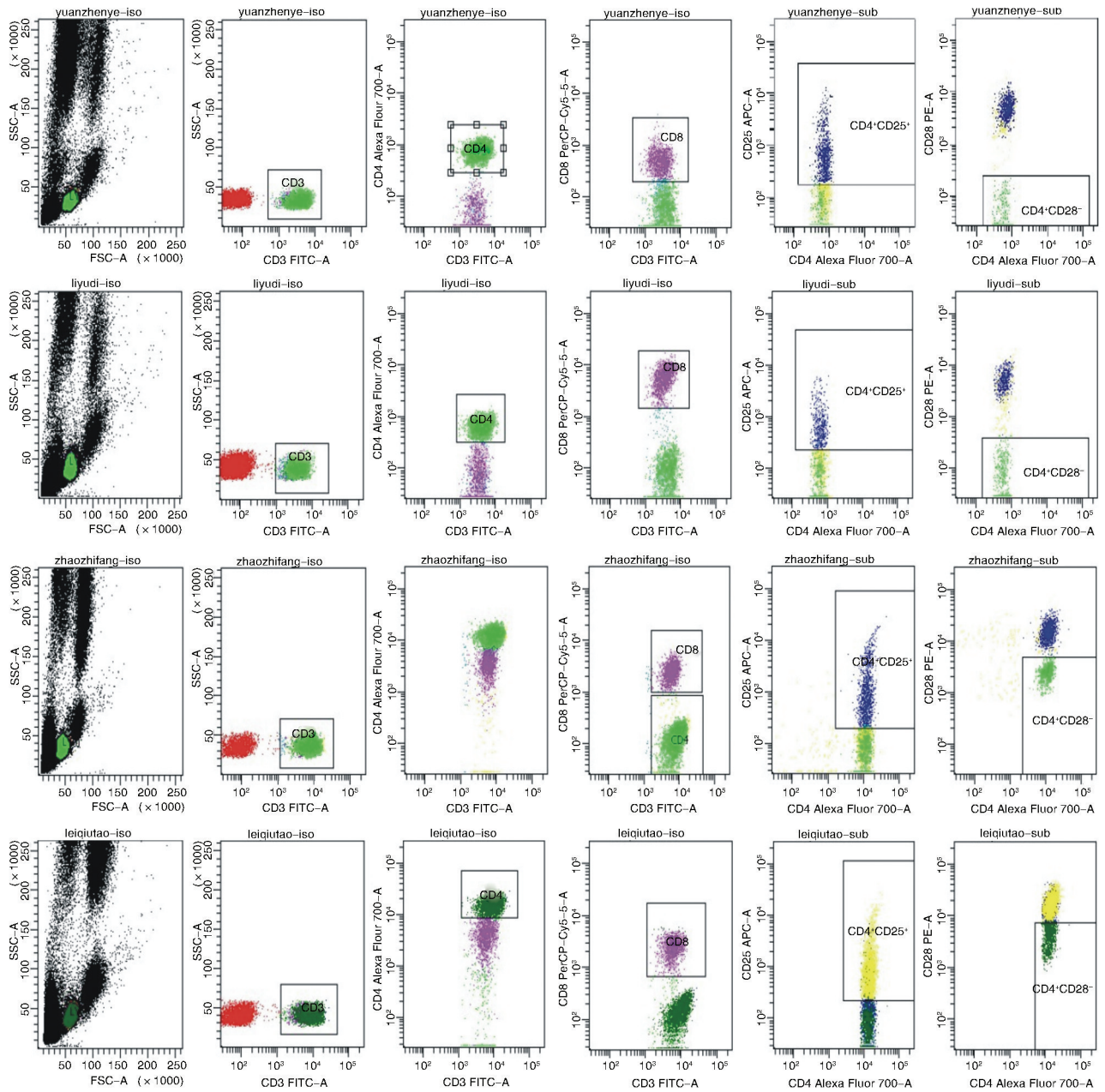


图 1. 流式细胞术检测各组外周血 T 淋巴细胞亚群比例 从上到下依次为对照组、SAP 组、UAP 组和 AMI 组。

Figure 1. Peripheral blood T lymphocyte subsets proportion was detected by flow cytometry

3 讨论

免疫炎症反应是 As 发生发展的核心问题。在动脉粥样斑块处,除了巨噬细胞的吞噬和分泌作用外,T 淋巴细胞在粥样斑块的进展中亦发挥着重要的作用^[4]。实验表明,机体免疫功能紊乱可能参与 AMI 的发生,间接或直接引起梗死面积扩大或并发症的发生,临床上检测 T 淋巴细胞亚群(CD3)可反映机体免疫功能的状况。CD4⁺细胞^[5]具有协助体液免疫和细胞免疫功能,它通过分泌大量的细胞因子和促使 B 细胞产生抗体来发挥其免疫学功能。CD8⁺细胞^[5]分为杀伤性 T 细胞和抑制性 T 细胞,其中 CD8⁺抑制性 T 细胞,具有抑制体液免疫和细胞免疫的功能。它们相互协调,相互制约,共同参与对机体免疫应答的调节作用,它们在活性、数量、比例上的变化与疾病的发展、演变均有关系。改良的冠状动脉 Gensini 评分通过 CAG 对冠状动脉病变支数和狭窄程度积分,可以较客观的反映冠状动脉病变程度。本研究也证实随着冠状动脉粥样硬化病变程度加重,冠状动脉 Gensini 评分升高,机体免疫炎症反应激活,外周血 CD3⁺细胞显著升高,其中 CD4⁺细胞比例升高,CD8⁺细胞比例降低,导致原有免疫状态失衡。

最近的研究显示,CD4⁺CD28⁻T 细胞参与斑块不稳定和急性冠状动脉事件的发生。与 SAP 相比,ACS 患者外周血 CD4⁺CD28⁻T 细胞亚群明显增加^[6]。研究发现 CD4⁺CD28⁻T 细胞在稳定性斑块中不存在,仅存在于不稳定性斑块,提示 CD4⁺CD28⁻T 细胞与斑块破裂有直接的关系。目前有关调节 CD4⁺CD28⁻T 细胞优先聚集于小稳定斑块处的确切机制尚不明确,动脉粥样斑块中的大部分 T 细胞包括 CD4⁺CD28⁻T 细胞分泌 γ 干扰素(interferon gamma, IFN- γ)^[7],促进巨噬细胞分化为泡沫细胞及其它抗原提呈细胞可引起斑块破裂。此次我们检测了不同分组冠心病患者外周血中 CD4⁺CD28⁻T 细胞比例,发现随着冠状动脉 Gensini 评分升高,CD4⁺CD28⁻T 细胞比例逐渐升高。可见,随着患者 CD4⁺CD28⁻T 淋巴细胞增殖,这些细胞亚群独特的生物学功能促使了冠状动脉粥样硬化斑块的进展。

Sakaguchi 等^[8]开辟了调节性 T 细胞(Treg)研究的新纪元,他们研究发现输入去除 CD4⁺CD25⁺Treg 的小鼠可以出现严重的多器官自身免疫性疾

病。CD4⁺CD25⁺Treg 可以阻止出生后 3 天摘除胸腺的小鼠发生器官特异性的自身免疫反应。这说明 CD4⁺CD25⁺Treg 在产生和保持外周自身免疫耐受方面起支柱作用^[7]。CD4⁺CD25⁺Treg 是一个具有独特免疫调节功能的 T 细胞亚群,人体主要通过 CD4⁺CD25⁺Treg 以免疫负向调节的方式来抑制自身反应性 T 细胞的作用,减少免疫性疾病的发生,从而维持机体内环境的稳定,维持免疫耐受^[9]。

综上所述,本研究表明外周血 T 细胞亚群构成比例与冠状动脉粥样硬化病变程度密切相关,外周 T 细胞参与 As 斑块的发生、发展。调节 T 细胞亚群可能是冠心病治疗的潜在靶点。

[参考文献]

[1] Cretney E, Xin A, Shi W, et al. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2011, 12(4): 304-311.

[2] 杨永宗. 中国动脉粥样硬化病理生理学研究近况[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(4): 481-489.

[3] 刘俊. 动脉粥样硬化中的免疫调节[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(11): 957-962.

[4] 郑华, 吴塞珠, 赖文岩. 冠心病与 T 细胞增殖反应的相关性[J]. 中华老年心血管病杂志, 2008, 10(9): 665-667.

[5] 冯静, 费瑜, 孟晓萍, 等. CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞与动脉粥样硬化相关性研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(8): 707-710.

[6] 赵一俏, 傅强, 李志梁, 等. 冠心病患者外周血 CD4⁺CD28⁻T 细胞和 CD4⁺CD25⁺T 细胞亚群变化[J]. 南方医科大学学报, 2006, 27: 474-476.

[7] 陈珂, 马礼坤, 李庆, 等. 冠心病患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞、高敏 C 反应蛋白、白细胞计数的变化及意义[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(24): 4166-168.

[8] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-164.

[9] 殷令妮, 蔡文玮. CD4⁺CD25⁺调节 T 细胞与冠状动脉粥样硬化病变的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(19): 3748-750.

(此文编辑 许雪梅)