

CD4 + T 淋巴细胞异常表达程序性细胞死亡因子 4 在不稳定型心绞痛患者 PCI 围术期的作用及意义

苏强, 李浪, 周游, 刘洋, 王江友, 文伟明

(广西医科大学附属第一医院心血管内科, 广西南宁市 530021)

[关键词] 不稳定型心绞痛; CD4 + T 淋巴细胞; 程序性细胞死亡因子 4; 经皮冠状动脉介入治疗

[摘要] **目的** 探讨 CD4 + T 淋巴细胞异常表达程序性细胞死亡因子 4(PDCD4)在不稳定型心绞痛患者经皮冠状动脉介入治疗(PCI)围术期的作用及意义。**方法** 入选住院并行择期 PCI 的不稳定型心绞痛患者 33 例,同时选取 29 例只行冠状动脉造影检查而不行 PCI 的不稳定型心绞痛患者为对照组。分别于冠状动脉造影前或 PCI 术前、冠状动脉造影后或 PCI 术后 18 h ~ 24 h 抽取新鲜外周血,免疫磁珠法分选出 CD4 + T 淋巴细胞,荧光定量 PCR 检测 PDCD4 mRNA 表达,免疫印迹法检测 PDCD4 蛋白表达,酶联免疫吸附法检测血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)浓度。**结果** 与对照组相比,PCI 组术后 PDCD4 mRNA 和蛋白表达明显升高($P < 0.05$)。PCI 组术后血清 TNF- α 浓度较术前进一步升高(16.11 ± 1.45 ng/L 比 7.60 ± 0.75 ng/L; $P < 0.05$),对照组无明显变化($P > 0.05$)。**结论** 不稳定型心绞痛患者 PCI 术后 CD4 + T 淋巴细胞 PDCD4 表达上调,从而增加 PCI 术后心肌的炎症反应。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Programmed Cell Death 4 Abnormal Expression of CD4 + T Lymphocytes in Patients with Unstable Angina Pectoris During Perioperative Period of PCI

SU Qiang, LI Lang, ZHOU You, LIU Yang, WANG Jiang-You, and WEN Wei-Ming

(Department of Cardiovascular, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

[KEY WORDS] Unstable Angina Pectoris; CD4 + T Lymphocytes; Programmed Cell Death 4; Percutaneous Coronary Intervention

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and significance of programmed cell death 4 (PDCD4) abnormal expression of CD4 + T lymphocytes in patients with unstable angina pectoris during perioperative period of percutaneous coronary intervention (PCI). **Methods** A total of 62 unstable angina patients were enrolled. Of the 62 patients, 33 patients undergoing PCI were involved as PCI group, the other 29 patients without PCI were set as control group. Peripheral blood was extracted before and after coronary angiography or PCI. Circulating CD4 + T cells were obtained by magnetic cell sorting system (MACS) at baseline and 18 h ~ 24 h post-PCI. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RFQ-PCR), Western blot analysis, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to evaluate the levels of PDCD4 mRNA in CD4 + T lymphocyte, the expression of PDCD4 protein and also the serum level of tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Results** Compared to the control group, the post-operative expression of PDCD4 mRNA and protein dramatically increased in the PCI group ($P < 0.05$). Compared to the pre-operation, the serum level of TNF- α was increased in 18 h ~ 24 h post-operation in the PCI group (16.11 ± 1.45 ng/L vs 7.60 ± 0.75 ng/L; $P < 0.05$). As to the level of TNF- α in the control group, no significant change was found ($P > 0.05$). **Conclusions** The expression of PDCD4 was increased in patients with unstable angina pectoris undergoing percutaneous coronary intervention, which contributed to the intensive inflammation response in the myocardial level after PCI.

[收稿日期] 2013-01-29

[基金项目] 国家自然科学基金(81160046)资助

[作者简介] 苏强,博士研究生,研究方向为冠心病介入诊治,E-mail 为 suqiang1983@foxmail.com。通讯作者李浪,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为冠心病介入诊治,E-mail 为 drilang@163.com。周游,硕士研究生,研究方向为冠心病介入诊治。

经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)术后心肌损伤是临床棘手的并发症,是患者近期和远期预后不良的独立预测因子,研究表明 PCI 后可导致局部 CD4 + T 淋巴细胞被激活,从而诱发心肌炎症反应是术后心肌损伤的机制之一^[1]。既往研究发现 PCI 术可诱发或促进不稳定性斑块破裂,不但激活局部的 T 淋巴细胞,还可以导致外周血淋巴细胞的显著激活和氧化应激产物标志物的显著增高,并致使肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素 γ 等炎症因子增加,促进心肌局部炎症的发生发展^[2-4]。程序性细胞死亡因子 4 (programmed cell death 4, PDCD4)是近年新发现的一种肿瘤抑制因子,最初因在人类多种实体肿瘤中的重要作用而备受关注,近年来研究发现 PDCD4 有促进炎症发生的作用,Sheedy 等^[5]报道 PDCD4 可以促进核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)分泌,致使 TNF- α 分泌增多,进而促进炎症的发生。虽然 PDCD4 在 T 淋巴细胞中的致炎作用已经得到证实^[6],但在 PCI 围术期的作用目前尚不清楚。

本研究通过检测不稳定型心绞痛(unstable angina pectoris, UAP)患者 PCI 围术期 CD4 + T 淋巴细胞 PDCD4 的表达水平,同时检测血清中 TNF- α 的含量,以探讨 CD4 + T 淋巴细胞异常表达 PDCD4 在 PCI 术后心肌损伤机制中的作用。

1 对象和方法

1.1 材料

人淋巴细胞分离液(北京索莱宝科技有限公司,中国),Dynabeads[®] FlowComp[™] Human CD4 试剂盒(Dynal,挪威),RPMI1640 培养基(Hyclone, USA),TRIzol-A + 总 RNA 提取试剂(天根生化科技有限公司,中国),RevertAid[™] FirstStrand cDNA Synthesis kit (Fermentas, 立陶宛),Fase Start Universal SYBR Green Master (Rox, USA), PDCD4 mRNA、GAPDH mRNA 引物(生工生物工程有限公司,中国),兔抗人 PDCD4 单抗(Abcam, USA),羊抗兔荧光二抗(LI-COR, USA),GAPDH 单抗(上海碧云天生物技术有限公司,中国),荧光二抗(KPL, USA),蛋白 Marker (Fermentas, 立陶宛),Human TNF- α Platinum ELISA (Ebioscience, USA),Step-one 荧光定量基因扩增仪(ABI, 美国),Odyssey 双色红外激光成像系统扫描仪。

1.2 研究对象

本研究为非随机临床对照研究,选取 2011 年 11 月至 2012 年 11 月入住广西医科大学附属第一医院并择期行 PCI 的 UAP 患者 33 例,同时选取 29 例只行冠状动脉造影检查而不行 PCI 的 UAP 患者为对照组。UAP 诊断标准符合 2007 年中华医学会心血管分会的“不稳定性心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南^[7]”,UAP 患者均经冠状动脉造影证实存在冠状动脉狭窄,有行 PCI 指征,且心肌酶学标记物 CK-MB 和 CTnI 阴性,无他汀应用禁忌症。排除标准:合并严重感染或肿瘤患者,严重肝肾功能不全者,他汀类药物过敏者,脑卒中,左心室射血分数 $< 30\%$,急诊 PCI。本试验遵照广西医科大学医学伦理委员会人体试验管理规范执行,所有病例选择和标本提取均获患者知情同意并签署同意书。

1.3 采集标本

两组患者分别采集冠状动脉造影或 PCI 前、PCI 术后 18 h ~ 24 h 新鲜外周静脉血 20 mL。20 mL 中取 1 mL 血自然凝固 20 min 后,2000 r/min 离心 10 min,收集血清用于 ELISA 检测 TNF- α 。余下用肝素抗凝后分离细胞。

1.4 细胞提取

根据 Ficoll-Paque 密度梯度离心法提取两组患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),重悬于 1 mL 1640 培养基,取 10 μ L PBMC 重悬细胞加 90 μ L PBS 稀释 10 倍后作细胞计数,余下细胞严格按照 Dynabeads[®] FlowComp[™] Human CD4 磁珠分选试剂盒说明书操作分选 CD4 + T 淋巴细胞。分选出的细胞同样做细胞计数,同时用 0.4% 台盼蓝染色观察并计算活细胞存活率,存活率 $> 90\%$ 的 CD4 + T 淋巴细胞留下备用。

1.5 荧光定量 PCR 检测 PDCD4 mRNA 表达

按照 Trizol 操作说明提取细胞总 RNA,并用 Nanodrop 测量其浓度,同时用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 有无降解,调整 RNA 量为 1 g/L,逆转录合成 cDNA。采用 SYBR Green I 荧光标记法检测 PCR 产物,总反应体系为 20 μ L, PDCD4 引物上游 5'-AAC TGT GCC AAC CAG TCC AA-3',下游 5'-TCT TCT CAA ATG CCC TTT CAT C-3'; GAPDH 引物上游 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3',下游 5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3',按试剂盒说明设置反应体系及参数,每个样本均做复孔检测,同时每次反应均设置阴性孔。PCR 产物经过测

序检测。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.6 Western blot 检测 PDCD4 蛋白表达

分选出的 CD4 + T 淋巴细胞中加入 100 μ L 蛋白裂解液混匀,然后在 4℃ 下 12000 r/min 离心 20 min,提取上清转移至新离心管中,然后用 BCA 法检测蛋白浓度,内参为 GAPDH。配置 12% 分离胶和 5% 浓缩胶,进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干法转膜 40 min,用 TBST 配置的 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,1:2500 一抗 4℃ 敷育过夜,脱色摇床上用 TBST 洗膜 5 min \times 5 次,1:5000 红外荧光二抗室温敷育 2 h 后在双色红外激光成像系统扫描成像。

1.7 ELISA 检测 TNF- α 浓度

将收集的血清标本及培养基上清和 ELISA 试剂盒常温下放置约 30 min,操作步骤按说明书进行。

1.8 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用成组 t 检验,多组间比较采用方差分析,治疗前后组内比较采用配对 t 检验,治疗后组间比较采用协方差分析,计数资料以频数及构成比表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料比较

PCI 组与对照组在年龄、性别、吸烟史、糖尿病史、血脂异常、高血压、既往心血管病病史、药物治疗等方面均无显著性差异($P > 0.05$)。两组在冠状动脉病变部位、狭窄程度和数量方面均具有可比性($P > 0.05$;表 1)。

2.2 PDCD4 mRNA 的表达变化

冠状动脉造影前,PCI 组与对照组之间 PDCD4 mRNA 表达无显著性差异($P > 0.05$);冠状动脉造影后,与对照组相比,PCI 组术后 PDCD4 mRNA 表达显著升高($P < 0.05$);与术前 PCI 组相比,术后 PCI 组 PDCD4 mRNA 也明显升高($P < 0.05$;图 1)。

2.3 PDCD4 蛋白的表达变化

冠状动脉造影前,PCI 组与对照组 PDCD4 蛋白的表达无显著性差异($P > 0.05$);冠状动脉造影后,与对照组相比,PCI 组术后 PDCD4 蛋白的表达显著升高($P < 0.05$);与术前 PCI 组相比,术后 PCI 组 PDCD4 蛋白的表达也明显升高($P < 0.05$;图 2)。

2.4 血清 TNF- α 浓度变化

冠状动脉造影前,PCI 组(7.60 ± 0.75 ng/L)与对照组(7.83 ± 0.85 ng/L)之间血清 TNF- α 浓度无显著性差异($P > 0.05$);PCI 术后,PCI 组血清 TNF-

α 浓度(16.11 ± 1.45 ng/L)较术前进一步升高($P < 0.05$),对照组血清 TNF- α 浓度(8.41 ± 0.98 ng/L)无明显变化($P > 0.05$)。

表 1. 两组临床资料比较

项 目	对照组 (<i>n</i> = 29)	PCI 组 (<i>n</i> = 33)	<i>P</i> 值
男性(例)	22(76%)	27(82%)	0.33
年龄(岁)	63.25 \pm 10.09	65.57 \pm 11.45	NS
高血压(例)	15(52%)	19(58%)	0.213
糖尿病(例)	5(17%)	7(21%)	0.156
血脂异常(例)	8(28%)	11(33%)	0.24
冠心病史(例)	7(24%)	6(18%)	0.33
吸烟(例)	10(36%)	14(42%)	0.41
收缩压(mmHg)	132.57 \pm 16.79	128.86 \pm 19.14	NS
舒张压(mmHg)	82.35 \pm 10.16	78.87 \pm 11.54	NS
药物治疗			
阿司匹林(例)	29	33	NS
氯吡格雷(例)	29	33	NS
他汀类药物(例)	29	33	NS
ACEI/ARB(例)	24(83%)	29(88%)	0.326
β 受体阻滞剂(例)	18(62%)	22(67%)	0.428
钙离子通道阻滞剂(例)	6(21%)	8(24%)	0.457
硝酸酯类(例)	12(41%)	15(45%)	0.104
血管病变部位			
左前降支(例)	22(76%)	27(82%)	0.33
左主干(例)	6(21%)	5(15%)	0.324
左回旋支(例)	10(35%)	12(36%)	0.024
右冠状动脉(例)	12(41%)	15(45%)	0.104
单支血管病变(例)	17(59%)	21(64%)	0.164
双支血管病变(例)	9(31%)	9(27%)	0.106
多支血管病变(例)	2(7%)	3(9%)	NS

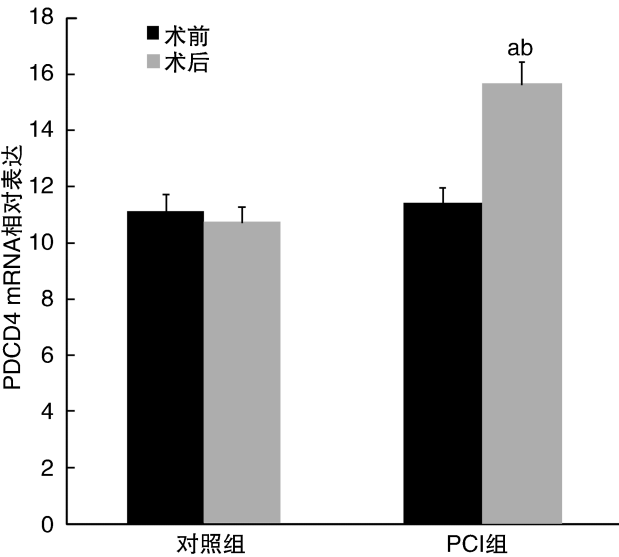


图 1. 荧光定量 PCR 检测 PDCD4 mRNA 表达 a 为 $P < 0.05$,与术后对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与术前 PCI 组比较。
Figure 1. PDCD4 mRNA expression detected by RFQ-PCR

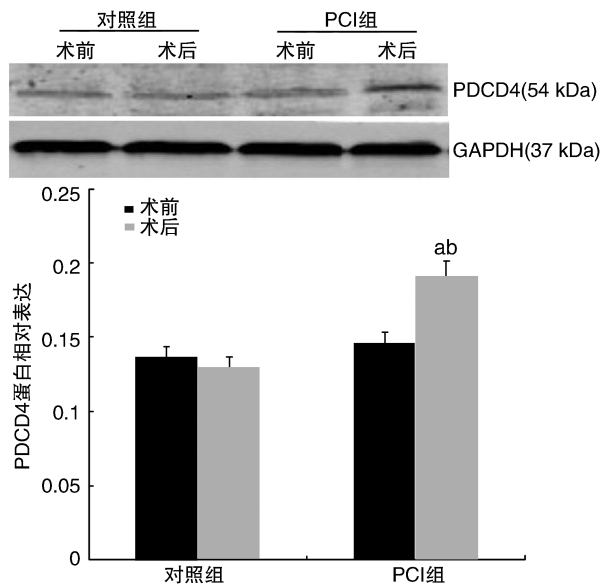


图 2. Western blot 检测 PDCD4 蛋白表达 a 为 $P < 0.05$, 与术后对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与术前 PCI 组比较。

Figure 2. PDCD4 protein expression detected by Western blot

3 讨论

术后心肌损伤(periprocedural myocardial injury, PMI)是 PCI 术常见的并发症,尤其多见于高危急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者,发生率为 30% ~ 70%^[8],一旦发生术后心肌损伤,患者远期心脏不良事件将明显增高,预后显著不良。

研究表明,冠心病患者体内存在 CD4 + T 淋巴细胞的过度激活及 TNF- α 等炎症因子的分泌^[9],而 PCI 术更是进一步加重 CD4 + T 淋巴细胞介导的炎症反应^[2]。TNF- α 是一种重要的促炎细胞因子^[10,11],可以抑制心肌的收缩功能,激活中性白细胞,促进中性白细胞和内皮细胞表达众多的黏附分子,导致中性白细胞在组织中聚集,引起组织损害。PDCD4 是近年来新发现的抑癌基因,不仅对细胞的程序性死亡进行重要调节,而且对于炎症发生也有重要作用。Yasuda 等^[12]发现敲除小鼠 PDCD4 基因后,抑炎因子 IL-10 mRNA 表达明显升高,促炎因子 TNF- α 分泌显著下降,从而抑制炎症的发生发展。Hilliard 等^[6]研究显示,敲除小鼠 PDCD4 基因后,小鼠抵抗炎症的能力增加,淋巴细胞分泌 IL-10、IL-4 炎症因子明显增多,并抑制 TNF- α 产生。这些均提示,PDCD4 在炎症的发生发展中起着重要的作用,并且主要通过增加 TNF- α 的分泌起效。

本研究中,PCI 术后 CD4 + T 淋巴细胞 PDCD4 无论是从基因水平,还是蛋白水平上表达均上调,

同时血清 TNF- α 水平也明显升高,说明 PDCD4 参与了术后 CD4 + T 淋巴细胞介导的炎症反应,进而介导术后心肌损伤。

PDCD4 的表达受多种不同因素的调节,多种不同的细胞因子可以调节 PDCD4 基因的表达。在人自然杀伤细胞和 T 细胞中 PDCD4 基因经 IL-2 和 IL-15 作用后表达下调,而 IL-12 可上调其表达^[13],相关研究表明,UAP 患者血清 IL-12 水平显著高于正常人水平,因此,IL-12 很有可能参与了 PCI 术后 PDCD4 的调控^[14]。此外,一些信号转导通路也可以对 PDCD4 进行调控,例如 TGF- β 可以上调肝癌 Huh7 细胞系 PDCD4 的表达^[15]。在分子生物学水平上,miR-21 对于 PDCD4 表达的调控是目前研究的热点。研究发现,miR-21 可以特异性结合 PDCD4 mRNA 3'-UTR,从而抑制 PDCD4 的翻译^[16,17]。我们在前期研究中发现,UAP 患者 CD4 + T 淋巴细胞 miR-21 表达异常,PCI 术后则加重这一趋势^[18]。因此,CD4 + T 淋巴细胞在 PCI 后过度激活,可能是通过上述一种或多种方式调控 PDCD4 的表达,促使 TNF- α 的分泌增多,加重心肌的炎症反应。

综上所述,UAP 患者 PCI 术后 CD4 + T 淋巴细胞 PDCD4 表达上调,增加 PCI 术后心肌的炎症反应。该机制可能是 PCI 术后心肌损伤的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] Sardella G, Accapezzato D, Di Roma A, et al. Integrin beta-2-chain (CD18) over-expression on CD4 + T cells and monocytes after ischemia/reperfusion in patients undergoing primary percutaneous revascularization[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2004, 17 (2): 165-170.
- [2] Tanaka T, Soejima H, Hirai N, et al. Comparison of frequency of interferon-gamma-positive CD4 + T cells before and after percutaneous coronary intervention and the effect of statin therapy in patients with stable angina pectoris[J]. *Am J Cardiol*, 2004, 93 (12): 1 547-549.
- [3] George J, Shmuel SB, Roth A, et al. L-arginine attenuates lymphocyte activation and anti-oxidized LDL antibody levels in patients undergoing angioplasty [J]. *Atherosclerosis*, 2004, 174 (2): 323-327.
- [4] Dumitriu IE, Baruah P, Finlayson CJ, et al. High levels of costimulatory receptors OX40 and 4-1BB characterize CD4 + CD28null T cells in patients with acute coronary syndrome[J]. *Circ Res*, 2012, 110 (6): 857-869.
- [5] Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21

- [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11 (2): 141-147.
- [6] Hilliard A, Hilliard B, Zheng SJ, et al. Translational regulation of autoimmune inflammation and lymphoma genesis by programmed cell death 4[J]. *J Immunol*, 2006, 177 (11): 8 095-102.
- [7] 柯元南, 陈纪林. 不稳定性心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35 (4): 295-304.
- [8] Morales-Villegas EC, Di Sciascio G, Briguori C. Statins; cardiovascular risk reduction in percutaneous coronary intervention-basic and clinical evidence of hyperacute use of statins[J]. *Int J Hypertens*, 2011, 2011: 904742.
- [9] Methe H, Brunner S, Wiegand D, et al. Enhanced T-helper-1 lymphocyte activation patterns in acute coronary syndromes[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45 (12): 1 939-945.
- [10] Dorge H, Schulz R, Belosjorow S, et al. Coronary micro-embolization; the role of TNF-alpha in contractile dysfunction[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34 (1): 51-62.
- [11] 林琴琴, 林蓉, 张继业, 等. 非诺贝特通过 Sirt1-NF- κ B 途径调控肿瘤坏死因子 α 诱导的 3T3-L1 脂肪细胞炎症反应[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (3): 238.
- [12] Yasuda M, Schmid T, Rubsamen D, et al. Downregulation of programmed cell death 4 by inflammatory conditions contributes to the generation of the tumor promoting microenvironment[J]. *Mol Carcinog*, 2010, 49 (9): 837-848.
- [13] Azzoni L, Zatsepina O, Abebe B, et al. Differential transcriptional regulation of CD161 and a novel gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T cells[J]. *J Immunol*, 1998, 161 (7): 3 493-500.
- [14] Lin Y, Huang Y, Lu Z, et al. Decreased plasma IL-35 levels are related to the left ventricular ejection fraction in coronary artery diseases [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (12): e52490.
- [15] Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, et al. Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2006, 25 (45): 6 101-112.
- [16] Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2008, 27 (15): 2 128-136.
- [17] Lu Z, Liu M, Stribinskis V, et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene [J]. *Oncogene*, 2008, 27 (31): 4 373-379.
- [18] 陆永光, 李浪, 陈妍梅, 等. 不稳定型心绞痛患者 CD4 + T 淋巴细胞 miRNA 的差异表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (4): 323-326.
- (此文编辑 文玉珊)