

氧化型低密度脂蛋白对急性冠状动脉综合征患者 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞表达的影响

章 爽, 崔天盆, 赵 岚, 胡志敏

(武汉市第一医院检验科, 湖北省武汉市 430022)

[关键词] 调节性 T 细胞; 氧化型低密度脂蛋白; 急性冠状动脉综合征

[摘 要] 目的 探讨氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)对急性冠状动脉综合征(ACS)患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(Tregs)表达的影响。方法 收集健康对照组 30 例,男 16 例,女 14 例,平均年龄 58.45 ± 5.98 岁;稳定型心绞痛(SA)患者 23 例,男 12 例,女 11 例,平均年龄 59.27 ± 6.93 岁;急性冠状动脉综合征患者 45 例,其中不稳定型心绞痛(UA)患者 27 例,男 14 例,女 13 例,平均年龄 62.33 ± 7.32 岁,急性心肌梗死(AMI)患者 18 例,男 11 例,女 7 例,平均年龄 65.71 ± 8.12 岁,外周血标本,通过 ELISA 检测血浆 ox-LDL、IL-10 表达水平,通过流式细胞术检测各组患者 Tregs 表达水平。密度梯度离心法分离外周血淋巴细胞,用 ox-LDL 孵育淋巴细胞 48 h 后流式细胞术检测 Treg 表达水平。结果 与健康对照组和 SA 组相比,ACS 患者外周血 ox-LDL 水平显著升高($P < 0.05$),而 IL-10 和 Tregs 表达水平显著下降($P < 0.05$),ox-LDL 与 Tregs 水平呈明显的负相关($r = -0.72, P < 0.01$),与 IL-10 也呈明显的负相关($r = -0.516, P < 0.01$),同时 ox-LDL 作用于外周血淋巴细胞 48 h 后,Tregs 水平明显下降。结论 ox-LDL 可以下调 ACS 患者 Tregs 的表达,减弱 Tregs 的保护作用,进一步促进动脉粥样硬化进展。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Oxidized LDL on Peripheral Blood Level of CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells in Patients with Acute Coronary Syndrome

ZHANG Shuang, CUI Tian-Pen, ZHAO Lan, and HU Zhi-Min

(Department of Clinical Laboratory, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan, Hubei 430022, China)

[KEY WORDS] Regulatory T Cells; Oxidized LDL; Acute Coronary Syndrome

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of oxidized LDL (ox-LDL) on peripheral blood level of regulatory T cells (Tregs) in patients with acute coronary syndrome (ACS). **Methods** 18 patients with acute myocardial infarction (AMI), 27 patients with unstable angina (UA), 23 patients with stable angina (SA) and 30 healthy subjects (NC) were recruited. The plasma levels of ox-LDL and IL-10 were measured by ELISA, and the percentage of Tregs in peripheral blood were detected by flow cytometry. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were prepared by Ficoll density gradient, then were incubated with ox-LDL for 48 h for analysis of flow cytometry. **Results** The frequencies of Tregs and level of IL-10 were significant lower in AMI and UA patients than those in the SA and NC groups, while the level of ox-LDL was elevated markedly in patients with AMI and UA compared with SA and NC group. In addition, the levels of plasma ox-LDL were negatively correlated with the levels of Tregs and IL-10. Moreover, the peripheral blood level of Tregs was obviously decreased after incubation with ox-LDL for 48 h. **Conclusion** ox-LDL could down-regulate the peripheral blood level of Tregs in patients with ACS, thereby promoting the progression of ACS.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症性疾病,在发达国家的死亡率中占据首位^[1]。炎症和免疫应答在 As 发展过程中起着重要作用。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipopro-

tein, ox-LDL)是 As 发展的一个主要危险因素,高浓度的 ox-LDL 沉积于血管内膜造成内皮细胞的炎症损伤是启动 As 的机制,ox-LDL 促进内皮细胞分泌炎症因子和趋化因子,从而产生炎症反应和免疫应

[收稿日期] 2013-08-14

[作者简介] 章爽,硕士,技师,主要从事炎症与动脉硬化研究。通讯作者崔天盆,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事临床免疫学研究,E-mail 为 tianpencui@hotmail.com。

答^[2]。CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, Tregs)作为免疫调节细胞可以调节免疫应答,抑制过度的免疫激活,下调炎症反应,起着抗As的作用,近年来的研究显示冠心病患者外周血中Tregs的表达比例明显降低^[3],但其确切机制仍然不清,而且冠心病患者外周血ox-LDL与Tregs之间的关系尚未报道,因此本文主要探讨ox-LDL对ACS患者外周血中Tregs表达的影响及其机制。

1 对象和方法

1.1 主要试剂与仪器

RPMI1640完全培养基、胎牛血清购于Gibco公司,LDL、ox-LDL购自Sigma公司,ox-LDL、ELISA试剂盒购自Mercodia公司,IL-10试剂盒购自Biolegend公司,FITC标记的抗人CD4以及PE标记的抗人CD25单克隆抗体购自BD Biosciences公司。Ficoll淋巴细胞分离液购自中国医学科学院生物医学工程研究所。

1.2 研究对象

选择2012年9月至2013年6月我院心血管内科住院的经冠状动脉造影证实为冠心病的68例患者作为研究对象,男37例,女31例,平均年龄 62.44 ± 7.05 岁,其中急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)组18例,有典型的胸痛症状,典型的心电图改变,肌酸激酶同工酶和肌钙蛋白显著升高;不稳定型心绞痛(unstable angina, UA)组27例,休息时自发性心绞痛,无心肌酶谱的改变。心电图有ST压低或T波的改变;稳定型心绞痛(stable angina, UA)23例,典型的劳力型心绞痛,无心肌酶谱的改变。另选30例健康体检者做为健康对照组,男16例,女14例,平均年龄 58.45 ± 5.98 岁。患者和健康对照组之间年龄和性别差异无显著性,有可比性。排除标准:严重的系统感染,肝脏疾病(如乙型肝炎,丙型肝炎),肿瘤,血液系统疾病,自身免疫性疾病以及免疫缺陷病,近期内服用过非甾体类抗炎及免疫抑制剂。同时本研究征得本院伦理委员会的同意。

1.3 样本的采集与处理

患者在入院后24 h内于清晨空腹肘静脉采血,使用高速离心机 3 kr/min ,10 min,将分离后的上层血浆样本置于 -80°C 冰箱保存直至检测。

1.4 生化指标检测

空腹12 h后采静脉血分离血清,利用酶法测定总胆固醇、甘油三酯,直接测定法检测高密度脂蛋白、低密度脂蛋白。以上测定均在全自动生化分析

仪上进行,每次测定用高、低值2种质控样品进行质控,其质控均符合英国RIQAS质控标准。

1.5 血浆ox-LDL和IL-10水平检测

将血浆标本从冰箱中取出放置室温平衡至完全溶解,采用ELISA按照试剂说明书进行操作。

1.6 外周血Tregs表达水平检测

将外周血 $1\ 500\text{ r/m}$ 离心5 min,吸弃上层血浆,然后用等体积PBS稀释下层血细胞,再与等体积的Ficoll淋巴细胞分离液混匀, $2\ 500\text{ r/m}$,15 min,降速时缓慢,用吸管小心吸取中间层淋巴细胞,用PBS洗两遍,弃上清,重悬于 $300\ \mu\text{LPBS}$,加入FITC标记的抗人CD4以及PE标记的抗人CD25单克隆抗体避光孵育30 min,PBS洗两次后,重悬于 $300\ \mu\text{L PBS}$,美国Bechman公司流式细胞仪检测。

1.7 检测ox-LDL对Tregs表达水平的影响

采用Ficoll淋巴细胞分离液通过密度梯度离心法分离淋巴细胞后,分别加入PBS,50 mg/L的LDL和50 mg/L的ox-LDL孵育48 h,然后加入FITC标记的抗人CD4以及PE标记的抗人CD25单克隆抗体避光孵育30 min,PBS洗两次后,重悬于 $300\ \mu\text{L PBS}$,美国Bechman公司流式细胞仪检测。

1.8 统计学处理

以上各组实验至少独立重复3次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果均用SPSS 18.0统计软件进行统计学处理。组间比较采用方差齐性检验和 t 检验,多组间两两比较采用 q 检验,指标间相关性采用Pearson相关性检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组一般临床资料比较

各组在性别、年龄、高血压、糖尿病及吸烟等方面差异均无统计学意义($P > 0.05$);与健康对照组相比,ACS组(包括AMI组和UA组)的总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白含量显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而SA组与健康对照组相比无显著性差异,AMI组与UA相比也无显著性差异($P > 0.05$;表1)。

2.2 外周血Tregs表达水平

与健康对照组Tregs表达水平($3.73\% \pm 0.57\%$)相比,AMI组($1.59\% \pm 0.45\%$)和UA组($1.71\% \pm 0.51\%$)外周血Tregs表达水平显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而SA组($3.13\% \pm 0.61\%$)与对照组及AMI组与UA组相比Tregs表达水平无显著性差异($P > 0.05$;图1)。

表 1. 各组患者一般临床资料

Table 1. The genera clinical data in each group

| 指 标 | 健康对照组 (n = 30) | 稳定型心绞痛组 (n = 23) | 不稳定型心绞痛组 (n = 27) | 急性心肌梗死组 (n = 18) |
|-----------------|-------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| 年龄(岁) | 58.45 ± 5.98 | 59.27 ± 6.93 | 62.33 ± 7.32 | 65.71 ± 8.12 |
| 男/女(例) | 16/14 | 12/11 | 15/12 | 10/8 |
| 总胆固醇 (mmol/L) | 4.32 ± 0.74 | 4.41 ± 1.01 | 4.81 ± 1.35 ^a | 4.95 ± 1.21 ^a |
| 甘油三酯 (mmol/L) | 1.24 ± 0.71 | 1.31 ± 0.76 | 1.71 ± 0.86 ^a | 1.65 ± 0.81 ^a |
| 低密度脂蛋白 (mmol/L) | 2.32 ± 0.54 | 2.36 ± 0.81 | 2.83 ± 0.85 ^a | 2.91 ± 0.91 ^a |
| 高密度脂蛋白 (mmol/L) | 1.47 ± 0.41 | 1.41 ± 0.14 | 1.31 ± 0.12 | 1.30 ± 0.13 |
| 高血压(例) | 10(33.33%) | 9(39.13%) | 13(48.15%) | 8(44.44%) |
| 糖尿病(例) | 4(13.33%) | 5(21.74%) | 8(29.63%) | 5(27.78%) |
| 吸烟(例) | 6(20%) | 5(21.74%) | 7(25.93%) | 6(33.33%) |

a 为 $P < 0.05$, 与健康对照组比较。

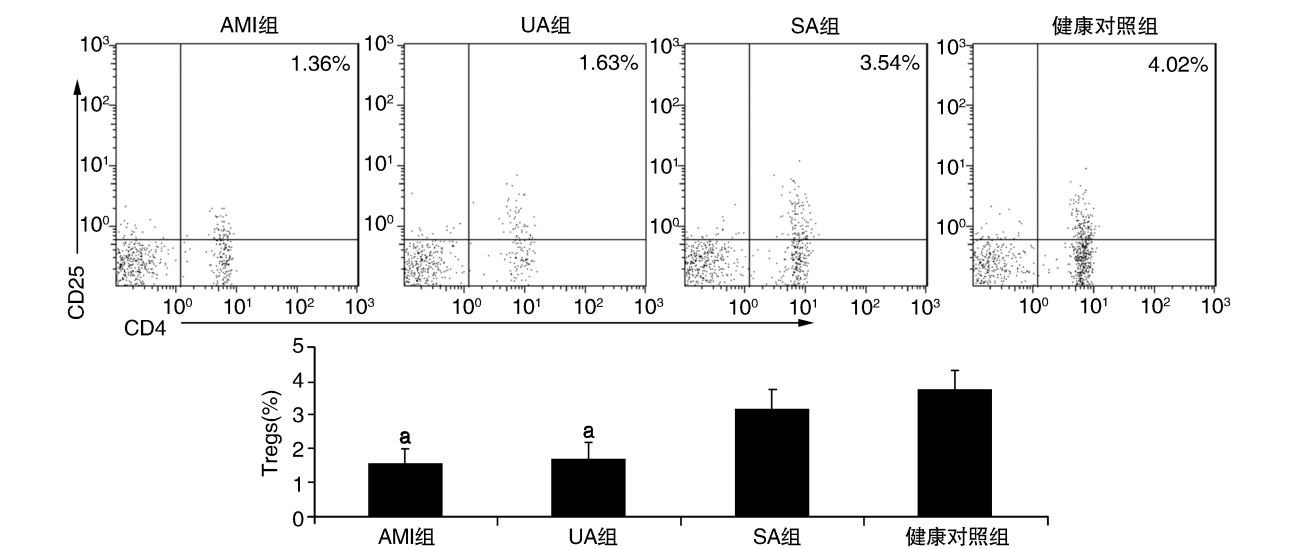


图 1. 外周血 Tregs 表达水平 a 为 $P < 0.05$, 与健康对照组相比。

Figure 1. The expression level of Tregs in peripheral

2.3 外周血 ox-LDL 和 IL-10 表达水平

与健康对照组相比,AMI 和 UA 组患者 ox-LDL 水平显著升高,而 IL-10 水平显著下降,具有统计学意义 ($P < 0.05$), SA 组与健康对照组 AMI 与 UA 组相比 ox-LDL 与 IL-10 水平并无显著性差异 ($P > 0.05$;表 2)。

2.4 外周血 ox-LDL 与 Tregs 和 IL-10 的相关性分析

经 Pearson 相关性分析发现,ACS 患者外周血 ox-LDL 与 Tregs 呈明显的负相关 ($n = 45, r = -0.72, P < 0.01$),同时 ACS 患者外周血 ox-LDL 与 IL-10 也呈明显的负相关 ($n = 45, r = -0.516, P < 0.01$;图 2)。

2.5 ox-LDL 对外周血 Tregs 表达水平的影响

ACS 患者外周血淋巴细胞分别经 PBS、50 mg/L

的 LDL 和 50 mg/L ox-LDL 孵育 48 h 后,与对照组 PBS 相比,ox-LDL 可以显著抑制 Tregs 的表达,并具有统计学意义 ($P < 0.05$;图 3)。

表 2. CHD 患者外周血 ox-LDL 和 IL-10 表达水平

Table 2. The levels of plasma ox-LDL and IL-10 in patients with CHD

| 分 组 | n | ox-LDL(μg/L) | IL-10 (ng/L) |
|----------|----|-----------------------------|--------------------------|
| 健康对照组 | 30 | 189.48 ± 33.12 | 7.17 ± 0.82 |
| 稳定型心绞痛组 | 23 | 210.11 ± 27.51 | 6.35 ± 0.91 |
| 不稳定型心绞痛组 | 27 | 290.21 ± 38.25 ^a | 3.74 ± 0.51 ^a |
| 急性心肌梗死组 | 18 | 308.21 ± 40.45 ^a | 3.23 ± 0.43 ^a |

a 为 $P < 0.05$, 与健康对照组比较。

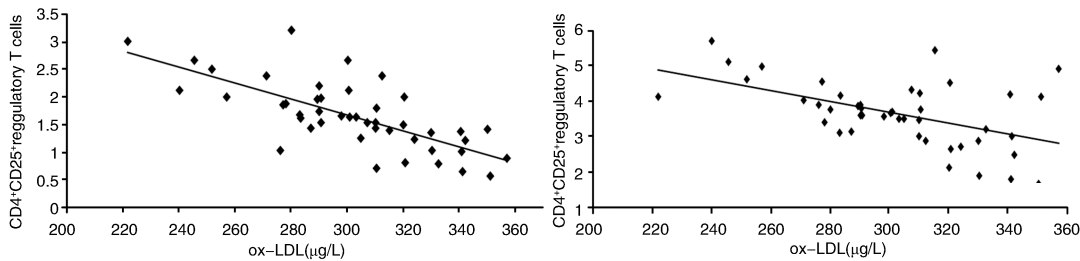


图 2. ACS 患者外周血 ox-LDL 与 Tregs 和 IL-10 的相关性分析
Figure 2. The correlation analysis of plasma ox-LDL and Tregs, IL-10 levels

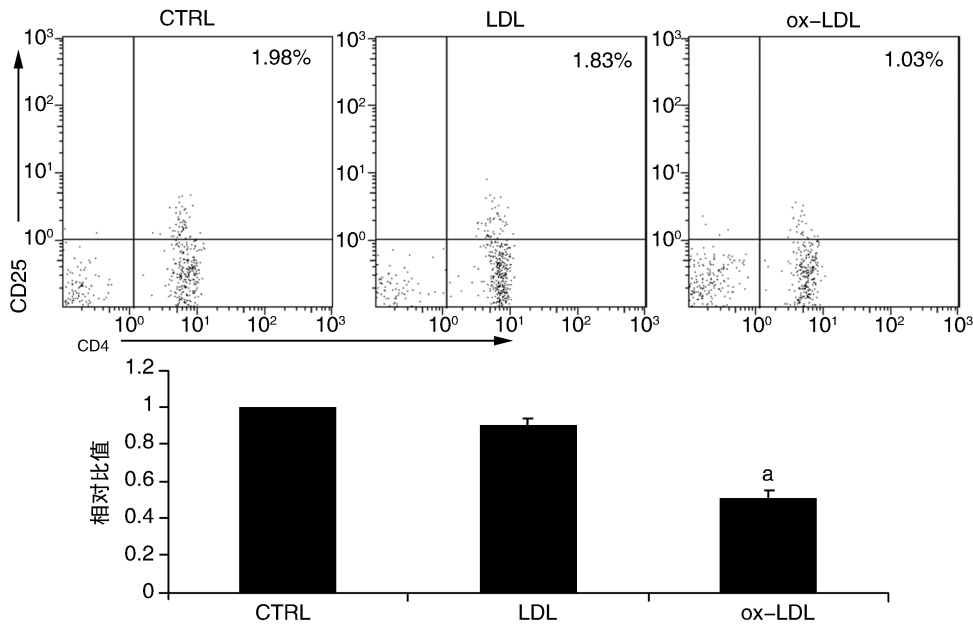


图 3. ox-LDL 下调 ACS 患者外周血 Tregs 表达水平
Figure 3. ox-LDL down-regulates the peripheral blood level of Tregs in patients with ACS

3 讨论

动脉粥样硬化是一种多因素的大动脉炎性疾病,其中炎症和免疫应答起着重要作用,Tregs 作为体内专职的炎症负性调节细胞,可以控制炎症应答和维持免疫耐受^[4],近年来有研究表明,Tregs 在 ACS 患者外周血中表达下调,但是其具体的机制不详。ox-LDL 是促进 As 起始和进展的一个非常重要的因素,最近的研究发现,ox-LDL 可以促进内皮细胞、巨噬细胞及 CD4⁺ T 淋巴细胞凋亡,下调它们的比例^[5-7]。ox-LDL 是否会影响外周血 Tregs 的表达还并不清楚,因此本研究检测了 ACS 患者外周血 Tregs 的表达水平并对 ox-LDL 对 ACS 患者 Tregs 表达水平的影响进行了探讨。

Tregs 是体内一类具有免疫调节功能的 T 细胞亚群,能够负向调节机体的免疫炎症反应,维持机

体内环境的稳定。近年来的研究表明,Tregs 在一些自身免疫性疾病以及炎症病患者外周血中表达显著下调,如系统性红斑狼疮、1 型糖尿病、内风湿关节炎等^[8-10],为了探讨 Tregs 在冠心病患者外周血的表达水平,我们分别检测了 AMI、UA、SA 患者和健康对照组外周血 Tregs 的表达水平,结果显示,与 SA 患者和健康对照组相比,AMI 和 UA 患者外周血 Tregs 表达水平明显降低。同时,我们的结果与 Mor 等^[11]研究相一致,Mor 等证实 Tregs 具有抗 As 的作用,给予 ApoE 基因敲出小鼠移植 Tregs 后,可以明显降低 As 斑块的形成。这说明 ACS 患者外周血 Tregs 的降低导致其对自身 CD4⁺ 辅助性 T 细胞和 CD8⁺ 杀伤性 T 细胞的抑制能力减弱,从而导致了 ACS 患者的细胞免疫反应的过度激活,促进了斑块的形成和不稳定。Tregs 主要是通过分泌抗炎性细胞因子发挥作用,如 IL-10,IL-10 可以抑制 Th1 型免

疫反应,促进 Tregs 的增殖和分化,抑制基质金属蛋白酶 9(MMP-9)的产生和释放,提高组织型基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP)的产生,从而抑制粥样斑块的形成、维持斑块的稳定性。本研究显示与健康对照组和 SA 患者相比,IL-10 在 ACS 患者外周血表达显著降低,从而促进了斑块的不稳定,加速了 ACS 的形成。

ox-LDL 是引起 As 起始和进展,并引起斑块不稳定的一个重要因素。有研究表明,冠心病患者血浆中 ox-LDL 特异性标志物的增加,意味着 ACS 的出现,同时,ox-LDL 的水平与 ACS 的严重程度呈明显的正相关^[12],在我们的研究中 ACS 患者血浆 ox-LDL 水平明显高于 SA 患者和健康对照组,这与相关文献的报道也是一致的^[13]。为了进一步研究冠心病患者体内 ox-LDL 与 Tregs 之间的关系,我们对 ox-LDL 与 Tregs 进行了相关性分析,发现 ox-LDL 与 Tregs 呈明显的负相关,同时 ox-LDL 与 IL-10 也呈明显的负相关,这说明 ox-LDL 可能抑制 Tregs 的表达,为了验证我们的猜想,我们分别将 LDL 和 ox-LDL 与 ACS 患者外周血淋巴细胞各孵育 48 h,结果显示与对照组相比,ox-LDL 可以显著降低 Tregs 表达水平,而 LDL 的效果并不显著。同时,其他研究者证明,Tregs 损伤的胸腺输出和增加的细胞凋亡是非 ST 段抬高型 ACS 患者 Tregs 降低的主要原因,而 ox-LDL 可以明显的诱导 Tregs 的凋亡^[14],同时,ox-LDL 也可以促进 Tregs 转录因子 Foxp3 的甲基化,降低 Foxp3 mRNA 的表达,增加 DNA 甲基化转移酶的表达^[15],从而下调 ACS 患者 Tregs 的水平,进而增加了 ACS 发病风险。

综上所述,ox-LDL 作为 ACS 的发病的一个危险因素,可以通过下调 ACS 患者外周血 Tregs 的表达水平促进 ACS 进展。结果从新的角度阐明了 ox-LDL 促进 As 发展的机制,为 As 的防治提供了一个新的靶点。

[参考文献]

- [1] World Health Organization. www.who.int/cardiovascular_disease.
- [2] Lusis AJ. Atherosclerosis[J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 233-241.
- [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] Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease[J]. *Immunol Rev*, 2006, 212: 8-27.
- [5] 李秀丽. 氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮祖细胞增殖、凋亡及 bcl-2 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15(10): 755-758.
- [6] Kinscherf R, Claus R, Wagner M, et al. Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide dismutase and p53 dependent[J]. *FASEB J*, 1998, 12(6): 461-467.
- [7] Meier P, Spertini F, Blanc E, et al. Oxidized low-density lipoproteins activate CD4⁺ T cell apoptosis in patients with end-stage renal disease through Fas engagement[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(1): 331-342.
- [8] Crispin JC, Martínez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *J Autoimmun*, 2003, 21(3): 273-276.
- [9] Kukreja A, Cost G. Marker J Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(1): 131-140.
- [10] Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy[J]. *J Exp Med*, 2004, 200(3): 277-285.
- [11] Mor A, Planer D, Luboshits G, et al. Role of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in experimental atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(4): 893-900.
- [12] Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW, et al. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(3): 360-370.
- [13] Ehara S, Ueda M, Naruko T, et al. Pathophysiological role of oxidized low-density lipoprotein in plaque instability in coronary artery diseases[J]. *J Diabetes Complications*, 2002, 16(1): 60-64.
- [14] Zhang WC, Wang J, Shu YW, et al. Impaired thymic export and increased apoptosis account for regulatory T cell defects in patients with non-ST segment elevation acute coronary syndrome[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(41): 34 157-166.
- [15] Jia L, Zhu L, Wang JZ, et al. Methylation of FOXP3 in regulatory T cells is related to the severity of coronary artery disease[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 228(2): 346-352.

(此文编辑 李小玲)