

外周血单核细胞亚型 2 分布与冠心病表型的相关性分析

林明辉¹, 梁运², 陈清华², 陈宋明²

(1. 潮安县庵埠华侨医院内科, 广东省潮州市 515638; 2. 汕头大学医学院第一附属医院心内科, 广东省汕头市 515000)

[关键词] 急性冠状动脉综合征; 单核细胞亚型; 冠状动脉狭窄率

[摘要] **目的** 通过比较不同临床类型冠心病患者外周血单核细胞亚型 2 (Mon2) 的比例变化特征, 揭示 Mon2 型单核细胞与冠心病临床表型的内在联系。**方法** 利用流式细胞技术, 以 CD14⁺CD163⁺ 作为 Mon2 单核细胞的标记, 检测 90 例冠心病患者 [病例组, 稳定型心绞痛 (SAP) 组 28 例; 不稳定型心绞痛 (UAP) 组 30 例; 急性心肌梗死 (AMI) 组 32 例] 与 5 例健康对照个体 (对照组) 外周血 Mon2 单核细胞的比例以及 CD163 平均荧光强度 (MFI) 分布差异; 回归分析 Mon2 单核细胞亚型比例、CD163 荧光强度与冠状动脉狭窄程度的相关性。**结果** Mon2 型单核细胞比例、CD163 荧光强度在病例组与对照组分布差异有显著性 ($P < 0.001$), 且 Mon2 型单核细胞比例在 SAP 组为 24.3% (19.1% ~ 29.5%), UAP 组为 11.1% (6.1% ~ 16.9%), AMI 组为 8.2% (3.3% ~ 13.1%), 差异具有高度显著性 ($P = 0.001$)。循环血单核细胞 CD163 的平均荧光强度在 SAP 组为 1.58 (1.38 ~ 1.78), UAP 组为 1.21 (1.04 ~ 1.39), AMI 组为 1.10 (0.94 ~ 1.27), 差异具有显著性 ($P = 0.008$); Mon2 型单核细胞比例及 CD163 荧光强度与冠状动脉评分无相关性。**结论** 冠心病患者外周血 Mon2 分布比例与冠心病患者表型严重程度密切相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Correlation Between Subtype 2 of Peripheral Monocytes and Clinical Types of Coronary Artery Disease

LIN Ming-Hui¹, LIANG Yun², CHEN Qing-Hua², and CHEN Song-Ming²

(1. Internal Department, An-Bu Overseas Chinese Hospital, Chaoan County, Guangdong 515638, China; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shantou University, Shantou, Guangdong 515000, China)

[KEY WORDS] Acute Coronary Syndromes; Monocyte Macrophage Subsets; Rate of Coronary Stenosis

[ABSTRACT] **Aim** The roles of monocyte/macrophage subsets (Mon1, Mon2, Mon3) are different on atherosclerotic inflammation. The aim of this article is to identify the distribution of monocyte Mon2 in patients with different clinical types of coronary artery disease, and to reveal correlation between monocyte Mon2 and atherosclerosis. **Methods**

Totally 90 patients with coronary artery disease (stable angina pectoris, SAP, 28; unstable angina pectoris, UAP, 30; and acute myocardial infarction, AMI, 32) and 5 controls were enrolled. Mon2 were evaluated with CD14⁺CD163⁺ using flow cytometry. Correlation between Mon2 and coronary score was evaluated using unitary linear recursive analysis.

Results Monocyte Mon2 proportions were significantly different between patients with coronary artery disease and controls ($P = 0.001$), furthermore among patients with coronary artery disease, Mon2 proportions had significant difference in SAP (24.3%, 19.1% ~ 29.5%), UAP (11.1%, 6.1% ~ 16.9%) and AMI group (8.2%, 3.3% ~ 13.1%), respectively. Value of CD163 MFI had significant difference in SAP (1.58, 1.38 ~ 1.78), UAP (1.21, 1.04 ~ 1.39) and AMI group (1.10, 0.94 ~ 1.27), respectively. However, no correlation was found between coronary score and Mon2 proportion and CD163 MFI. **Conclusions** The distribution of monocyte Mon2 varies was correlated with type of coronary artery disease.

[收稿日期] 2013-09-27

[基金项目] 广东省自然科学基金 (S2011010005099)

[作者简介] 林明辉, 副主任医师, 研究方向为冠心病基础与临床研究, E-mail 为 583441426@qq.com。梁运, 硕士, 住院医师, 研究方向为炎症与冠心病, E-mail 为 longen083@163.com。通讯作者陈宋明, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为炎症与动脉粥样硬化, E-mail 为 csm1002@126.com。

冠状动脉粥样硬化性心脏病严重危害人民健康^[1],动脉粥样硬化斑块炎症反应是斑块稳定性的重要决定因素之一。单核巨噬细胞系在冠状动脉斑块炎症的形成和进展中发挥核心的作用。外周血单核细胞可依据表型不同分为三种亚型,其中单核细胞1型(Mon1),占绝大多数,大于85%,促进炎症反应^[2];单核细胞2型(Mon2)数量较少,但具有抗炎作用^[3],高表达CD163是其特征^[4];单核细胞3型(Mon3)则数量极少且为贴壁运行巡逻单核细胞。各亚型单核细胞功能是不同的,特别是特定的微环境对炎症应激的反应性更显著不同^[5]。本研究拟通过比较不同临床类型冠心病病人外周血单核细胞亚型2的分布特征,旨在揭示单核细胞偏极分化在冠心病进展中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2011年6月~2012年6月在汕头大学医学院第一附属医院心内科住院并经冠状动脉造影确诊的冠心病患者90例[病例组,不稳定型心绞痛(UAP)组30例;急性心肌梗死(AMI)组32例;稳定型心绞痛(SAP)组28例]以及5例正常对照个体作为研究对象。不稳定型心绞痛与稳定型心绞痛鉴别诊断主要依靠临床症状及实验室检查。排除合并其他炎症性疾病及恶性肿瘤的患者,同时记录患者高血压病、糖尿病、吸烟、高血脂、肥胖、入院后用药情况等。每例患者均在造影穿刺成功后抽取动脉血2 mL并用肝素抗凝,术前三已征得患者本人或家属同意并签署知情同意书,本研究经汕头大学医学院伦理委员会审查同意。

1.2 流式检测

血液标本在采集后12 h内用于流式检测,避光下按说明加入流式抗体CD14、CD163各20 μ L,经红细胞裂解液裂解红细胞后上流式机检测,检测后使用软件FlowJo (Treestar Inc, San Carlos, CA)行流式分析。在前向散射(forward scatter)及侧向散射(sideward scatter)初步选定单核细胞,在初选定的单核细胞中再选择CD14阳性细胞。在CD14 CD163点阵图使用5例正常人确定Mon2 gate,再用Mon2 gate分析各个患者血标本Mon2比例(图1)。

1.3 CD163MFI分析

为量化CD163在单核细胞膜上的表达强度,使用FlowJo流式分析软件分析每例标本单核细胞CD163相对平均荧光强度。

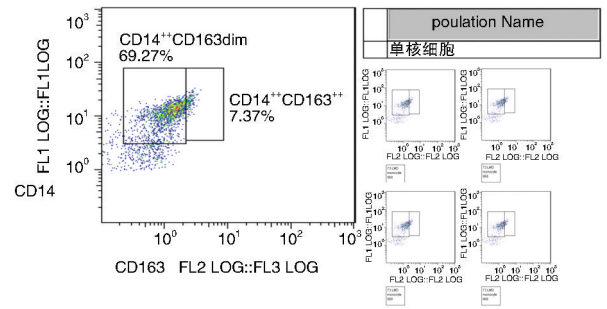


图1. Mon2单核细胞的设门筛选(正常人Mon2比例为7.37%)

Figure 1. Screening of monocyte Mon2 cells (reference value is 7.37%)

1.4 冠状动脉造影冠状动脉狭窄评分

采用GE3100 DSA机, Judkins法冠状动脉造影,按照美国心脏病学会/美国心脏协会(ACC/AHA)冠状动脉造影指南冠状动脉评分方法对患者冠状动脉病变进行评分^[6]。冠状动脉造影评分主要围绕8支血管进行评分,即:左主干、前降支近段、前降支中段、第一对角支、回旋支近段、回旋支中段、右冠状动脉近段、右冠状动脉中段。每支血管按最狭窄处评分:<10%计0分;10%~49%计1分;50%~74%计2分;75%~89%计3分;90%~100%计4分。每个患者积分累加即患者该次冠状动脉造影得分。得分越高,冠状动脉狭窄程度越严重。

1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0对数据进行分析,计量资料多组间比较用方差分析,计数资料用 χ^2 检验,两组数据的相关性分析用一元线性回归方程。如计量资料方差不齐,经数据转换使方差齐再行分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 基线特征

各组患者年龄、性别及冠心病危险因素如高血压、高脂血症、低HDL、肥胖、吸烟及临床用药情况等差异无显著性,各组中白细胞计数($P = 0.12$)及单核细胞比例($P = 0.87$)也无统计学差异(表1)。对照组5例,年龄 45 ± 9 岁,4男1女,抽烟2例,无心血管病史。

2.2 患者单核细胞亚型特征

Mon2比例在病例组为17.5%(3.3%~29.5%),在对照组为7.4%(5.2%~9.5%),病例

组与对照组间差异具有显著性($P = 0.001$)；Mon2 比例在 SAP 组为 24.3% (19.1% ~ 29.5%)，UAP 组为 11.1% (6.1% ~ 16.9%)，AMI 组为 8.2% (3.3% ~ 13.1%)，Mon2 单核细胞亚型三组差异具有显著性($P = 0.001$)。相对于 SAP 组，UAP 组和 AMI 组 Mon2 比例降低，差异具有显著意义($P < 0.05$)，但 UAP 与 AMI 之间差异无显著性($P = 0.15$ ；图 2)。

表 1. 患者临床特征归纳

Table 1. The sum of clinical characteristics

指 标	SAP 组 (n = 28)	UAP 组 (n = 30)	AMI 组 (n = 32)	P 值
年龄(岁)	58 ± 16	62 ± 11	66 ± 12	0.13 ^a
男/女(例)	11/3	13/2	26/6	0.24 ^b
冠心病危险因素(例)				
糖尿病(例)	6(21%)	6(20%)	8(25%)	1.0 ^b
高血压(例)	7(25%)	8(27%)	6(19%)	0.33 ^b
高脂血症(例)	6(21%)	3(10%)	8(25%)	0.40 ^b
低 HDL(例)	3(11%)	4(13%)	4(13%)	0.66 ^b
吸烟(例)	8(29%)	10(33%)	12(38%)	0.59 ^b
肥胖(例)	1(4%)	0(0%)	0(0%)	0.44 ^b
入院后使用药物(例)				
他汀类	24(86%)	28(93%)	20(63%)	0.13 ^b
β受体阻滞剂	20(71%)	14(47%)	22(69%)	0.47 ^b
ACEI/ARB	16(57%)	16(53%)	18(56%)	0.67 ^b
阿司匹林	28(100%)	28(93%)	32(100%)	0.82 ^b
白细胞计数($\times 10^9/L$)	6.68 ± 1.76	7.56 ± 2.19	8.81 ± 2.52	0.12 ^a
单核细胞比例(%)	7.96 ± 3.52	8.57 ± 2.06	7.87 ± 2.60	0.87 ^a

P 值表示三组间的差异，a 为方差分析，b 为 χ^2 检验。

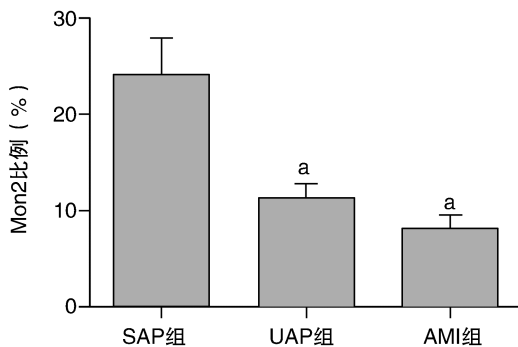


图 2. Mon2 单核细胞比例在三组患者中的比较 a 为 $P < 0.05$ ，与 SAP 组比较。

Figure 2. Monocyte Mon2 proportion in three groups

2.3 单核细胞 CD163 平均荧光强度

使用 FlowJo 分析 CD163 平均荧光强度，对照组 CD163 MFI 为 1.92 (1.56 ~ 2.37)，病例组为 1.26 (0.94 ~ 1.78)，病例组与对照组间差异具有显著性($P = 0.002$)；SAP 组 CD163 MFI 为 1.58 (1.38 ~ 1.78)，UAP 组为 1.21 (1.04 ~ 1.39)，AMI 组为

1.10 (0.94 ~ 1.27)，三组间差异具有显著性($P = 0.008$)，UAP 组及 AMI 组相对于 SAP 组降低，差异具有显著性 ($P < 0.05$ ；图 3)。

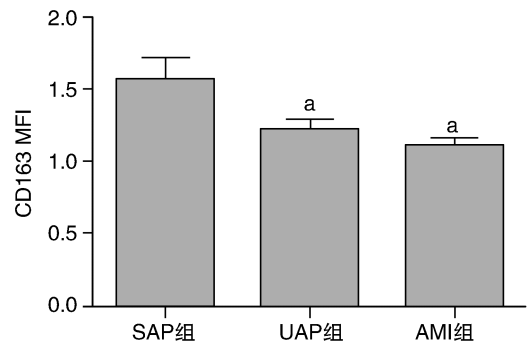


图 3. CD163 MFI 在各组患者的表达 a 为 $P < 0.05$ ，与 SAP 组比较。

Figure 3. CD163 MFI in three groups

2.4 冠状动脉评分与 Mon2 单核细胞比例、CD163 MFI 的相关性分析

将冠状动脉评分与 Mon2 单核细胞亚型比例、CD163 MFI 做一元线性回归，结果发现 Mon2 单核细胞比例、CD163 MFI 与冠状动脉狭窄评分没有相关性(图 4)。

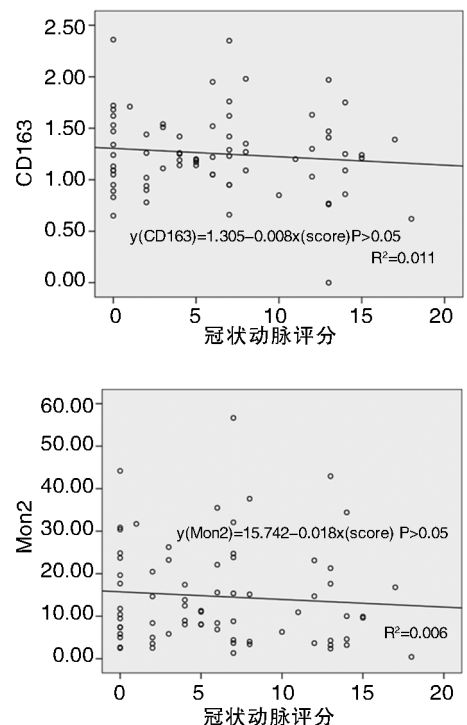


图 4. 冠状动脉评分与 Mon2 单核细胞比例、CD163 MFI 的相关性

Figure 4. Correlation between monocyte Mon2 proportion, CD163 MFI and coronary score

3 讨论

众多研究表明,冠心病是一种炎症相关性疾病,单核巨噬细胞系在冠状动脉斑块炎症的形成和进展发挥了核心的作用。作为血液中主要的炎症细胞,单核细胞数量及表型变化必然与冠心病的发生发展相关联。急性冠状动脉综合征是冠心病严重类型,严重威胁人类健康,为进一步阐述单核细胞在 ACS 中的作用,我们进一步研究了单核细胞亚型 2 分布与 ACS 的相关性。

证据表明,从骨髓释放的单核细胞一开始是 CD163⁺ 的(即 Mon2 细胞),释放到外周血后,在炎症刺激的情况下,Mon2 单核细胞上的 CD163 被刺激并脱落^[7],在 CD163 脱落的过程中伴随着 Mon2 向 Mon1 转变(此过程无法逆转)。也就是说,在炎症刺激的过程中,具有抗炎作用的 Mon2 单核细胞会向促炎作用的 Mon1 单核细胞转变。本实验用 CD163⁺ 作为 Mon2 的生物学标志,发现相对于 SAP 组患者,UAP 和 AMI 组患者 Mon2 比例明显下降,提示具有抗炎作用的 Mon2 细胞减少可能是冠心病趋于不稳定的原因,检测冠心病患者外周血单核细胞亚型 2 分布情况有助于 ACS 的诊断。

附着在单核细胞上的 CD163 为膜型 CD163,脱落下来的 CD163 便形成可溶性 CD163。本实验观察到,在 ACS 患者(不稳定型心绞痛及急性心肌梗死)中,外周血单核细胞膜上 CD163 表达强度下降,说明通过检测单核细胞膜上 CD163 表达水平,也可作为判断冠心病稳定性的指标。

冠状动脉造影是诊断冠心病的金标准,能准确诊断冠状动脉狭窄,但却不能诊断不稳定性斑块^[8]。目前用于不稳定性斑块诊断较公认的是光学相干层析技术(optical coherence tomography, OCT)^[9]和血管内超声(intravenous ultrasound, IVUS)^[10],它们能准确探测斑块内部结构,但由于价格昂贵,它们在国内推行普及尚受一定程度的限制。ACS 的病理基础是斑块不稳定,并非狭窄程度。我们的相关性研究正好也证实,外周血 Mon2 单核细胞分布和膜型 CD163 表达均与斑块狭窄程度无关,进一步说明冠心病的稳定性与狭窄程度无关,而与炎症相关。

斑块的炎症水平决定其稳定性,寻找能反映斑块稳定性的血液指标具有重大的临床意义。本研

究发现的单核细胞亚型与 ACS 的相关性将为冠心病稳定性诊断提供新的简便的生化诊断线索。但由于样本量偏少,更准确的结论有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Thompson RC, Allam AH, Lombardi GP, et al. Atherosclerosis across 4000 years of human history: the horus study of four ancient populations [J]. *Lancet*, 2013, 381 (9 873): 1 211-222.
- [2] Hristov M, Weber C. Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis [J]. *Thromb Haemost*, 2011, 106 (5): 757.
- [3] Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, et al. Peripheral blood CD14 high CD16 + monocytes are main producers of IL-10 [J]. *Scand J Immunol*, 2008, 67(2): 152-159.
- [4] Shantsil E, Wrigley B, Tapp L, et al. Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets; possible implications for cardiovascular disease pathophysiology [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(5): 1 056-066.
- [5] 杨阳, 彭道泉. 单核细胞表型与动脉粥样硬化关系的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (8): 702-706.
- [6] Feild DJ. Guidelines for coronary angiography: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on assessment of diagnostic and therapeutic cardiovascular procedures (Subcommittee on coronary angiography) [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1987, 10 (4): 935-950.
- [7] Burdo TH, Soulas C, Orzechowski K, et al. Increased monocyte turnover from bone marrow correlates with severity of SIV encephalitis and CD163 levels in plasma [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(4): e1000 842.
- [8] Goldstein JA. Angiographic plaque complexity: the tip of the unstable plaque iceberg [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39 (9): 1 464-467.
- [9] Fujii K, Kawasaki D, Masutani M, et al. OCT assessment of thin-cap fibroatheroma distribution in native coronary arteries [J]. *JACC: Cardiovasc Imaging*, 2010, 3 (2): 168-175.
- [10] Hartmann M, Huisman J, Bose D, et al. Serial intravascular ultrasound assessment of changes in coronary atherosclerotic plaque dimensions and composition: an update [J]. *Eur J Echocardiogr*, 2011, 12(4): 313-321.

(此文编辑 李小玲)