

· 临床研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-05-0480-05

急性冠状动脉综合征患者外周血单个核细胞 TLR4 和 TNF- α 的变化及其临床意义

张源¹, 黎玲伊¹, 陈洁¹, 杜广胜^{1,2}, 黄金¹, 白超超¹

(1.石河子大学医学院第一附属医院心内科,新疆石河子市 832008;2.佛山市第五人民医院心血管内科,广东省佛山市 528211)

[关键词] 急性冠状动脉综合征; 急性心肌梗死; Toll 样受体 4; 肿瘤坏死因子 α ; Gensini 评分

[摘要] **目的** 观察急性冠状动脉综合征(ACS)患者外周血单个核细胞 Toll 样受体 4(TLR4)和血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)浓度的变化及其与冠状动脉病变严重程度的相关性,并探讨其临床意义。**方法** 根据临床表现、心电图及冠状动脉造影结果等综合诊断选择 ACS 患者 60 例、稳定型心绞痛(SAP)患者 20 例、对照者 20 例为研究对象。其中 ACS 患者包括急性心肌梗死(AMI)30 例和不稳定型心绞痛(UAP)30 例,其冠状动脉病变程度根据 Gensini 积分进行评估;对照者为同期行冠状动脉造影检查排除冠心病者。采用流式细胞术检测各组外周血 TLR4 表达水平,同时采用 ELISA 检测血清 TNF- α 浓度。**结果** ACS 患者外周血 TLR4 表达水平和血清 TNF- α 浓度显著高于对照组和 SAP 组($P<0.01$),而 TLR4 表达水平在 AMI 组与 UAP 组之间、SAP 组与对照组之间无显著差异($P>0.05$)。ACS 患者经 PCI 治疗后外周血 TLR4 表达水平和血清 TNF- α 浓度较术前明显下降($P<0.05$);ACS 患者外周血 TLR4 表达水平和血清 TNF- α 浓度与冠状动脉病变 Gensini 积分呈正相关($r=0.715, P<0.01; r=0.333, P<0.01$)。**结论** ACS 患者外周血 TLR4 表达水平显著升高,炎症因子 TNF- α 的分泌增加,提示二者共同参与 ACS 的进展过程,并存在一定的相关性;外周血 TLR4 和 TNF- α 与冠状动脉病变程度密切相关,经 PCI 治疗后二者的表达明显降低,提示心肌灌注治疗可能改善冠状动脉的炎症反应。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Changes of Toll-like receptor 4 and tumor necrosis factor- α in patients with acute coronary syndrome and its clinical significance

ZHANG Yuan¹, LI Ling-Yi¹, CHEN Jie¹, DU Guang-Sheng^{1,2}, HUANG Jin¹, BAI Chao-Chao¹

(1.Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832008, China;2.Department of Cardiovascular, Foshan Fifth People's Hospital, Foshan, Guangdong 528211, China)

[KEY WORDS] Acute coronary syndrome; Acute myocardial infarction; Toll-like receptor 4; Tumor necrosis factor- α ; Gensini score

[ABSTRACT] **Aim** To observe the changes of Toll-like receptor 4 (TLR4) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in patients with acute coronary syndrome (ACS) and its correlation with the severity of coronary artery disease, and to explore its clinical significance. **Methods** 60 patients with ACS, 20 patients with stable angina pectoris (SAP) and 20 patients with normal control group were selected according to clinical manifestation, ECG and the results of coronary angiography. The ACS patients included 30 patients with acute myocardial infarction (AMI) and 30 patients with unstable angina pectoris (UAP). The degree of coronary artery lesion was evaluated according to the improved Gensini score. In the control group, coronary artery angiography was performed to exclude coronary artery disease. The levels of TLR4 in peripheral blood of 100 patients were detected by flow cytometry, and the concentration of TNF- α in serum were detected by ELISA. **Results** The levels of TLR4 and TNF- α in ACS group were significantly higher than those in control group and SAP group ($P<0.01$), while TLR4 levels were not significantly different between AMI group and UAP group, SAP group and control group ($P>0.05$). The levels of TLR4 and TNF- α in patients with ACS decreased but there were signifi-

[收稿日期] 2016-10-31

[修回日期] 2016-12-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360028)

[作者简介] 张源,硕士研究生,研究方向为心血管疾病,E-mail 为 yyamy127@163.com。通讯作者杜广胜,博士,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向为冠心病的基础和临床,E-mail 为 dugsh@163.com。

cantly lower than those in SAP group and control group ($P<0.05$). There was a positive correlation between the expression of TLR4 and TNF- α in blood and the Gensini score of coronary artery lesion ($r=0.715$, $P<0.01$; $r=0.333$, $P<0.01$).

Conclusions The level of TLR4 in peripheral blood of patients with ACS significantly increased, and the secretion of TNF- α increased. It was suggested that TLR4 and TNF- α concentrations in peripheral blood of patients with ACS were related to the progression of ACS. The levels of TLR4 and TNF- α in peripheral blood were closely related to the degree of coronary artery disease, and after PCI treatment, the expression of TLR4 and TNF- α decreased significantly. It is suggested that myocardial perfusion therapy may improve the coronary artery inflammation.

急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)是冠状动脉内斑块破裂、血栓形成,导致血供急剧减少或中断,引起相应的心肌急性损伤。研究报道,炎症反应与心肌细胞的损伤、凋亡有着密切的关系^[1],同时炎症反应可能参与心肌梗死的发生、发展过程^[2-3]。Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)是一类介导天然免疫和炎症反应的受体家族,该家族中 TLR4 的结构及其参与促炎反应、促进免疫细胞成熟分化及调节免疫应答等方面已研究的较为清楚,TLR4 与配体结合后最终激活核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B),导致大量炎症因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 释放,促进斑块不稳定性^[4]。有研究报道在冠状动脉狭窄发展进程中 TLR4 可以通过上调 TNF- α 的表达从进而促进动脉粥样硬化斑块炎症的活化^[5]。TNF- α 是一种具有多种生物活性的炎性细胞因子,与机体的免疫炎症反应关系密切,参与动脉粥样硬化的形成及 ACS 的发生、发展。本研究通过观察不同类型冠心病患者入院前外周血 TLR4 和 TNF- α 的水平变化及 ACS 患者行经 PCI 治疗后二者的变化,并探讨 TLR4 和 TNF- α 的表达与 ACS 患者冠状动脉病变严重程度及预后的关系。

1 资料和方法

1.1 研究对象及分组

选择 2014 年 6 月至 2015 年 8 月在石河子大学医学院第一附属医院心内科住院的 100 例患者。所有入选者均行冠状动脉造影(coronary angiography, CAG)检查。冠心病诊断符合世界卫生组织冠心病诊断^[6],经 CAG 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 20 例,为同期因不明原因出现胸部不适,经各项指标检查无异常,并行 CAG 后排除冠心病;(2)稳定型心绞痛(stable angina pectoris, SAP)组 20 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 30 例,诊断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型心绞痛;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 阴性,梗死后心绞痛除外;④急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)组 30 例,临床症状、心电图改变及动态演变,单纯右室梗死除外,CAG 诊断为冠心病。入选患者年龄要求 30 岁到 70 岁之间。排除标准(下列任何一项):严重的心功能不全、恶性肿瘤、急慢性感染、自身免疫疾病、严重肝肾功能不全、对造影剂、拜阿司匹林、氯吡格雷及他汀类药物过敏者、近期有手术或外伤史。

1.2 标本收集

所有研究对象按常规检查空腹血常规及各项生物化学指标。AMI 组抽血 2 次,分别于发病 24 h 内 PCI 术前及出院当日清晨空腹抽取静脉血 5 mL;UAP 组抽血 2 次,分别于入院后第 2 天及出院当日清晨空腹抽取静脉血 5 mL;SAP 组及对照组抽血 1 次,于入院第 2 天清晨空腹抽取静脉血 5 mL。静置 20 min、3000 r/min 离心、分离血清,外周血单个核细胞上流式细胞仪检测;血清 -80°C 保存,采用 ELISA 检测尿素氮、肌酐、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)等生物化学指标。

1.3 外周血 TLR4 的检测

采用流式细胞仪检测外周血单个核细胞中 TLR4 的表达,取肝素钠抗凝全血,收集细胞根据计数等分为实验管和同型对照管,加入红细胞裂解液,避光静置 10 min,1500 r/min 离心 10 min,弃取上清,加入 PBS 缓冲液,离心 5 min,洗涤 2 次,加入 5 μL TLR4-PE 抗体(美国 eBioscience 公司),混匀后室温避光孵育 15 min, PBS 冲洗液振洗 1 次,将荧光染色的细胞离心沉淀,加入固定剂缓冲液 1 mL,混匀,上流式细胞仪检测 TLR4 的阳性率。

1.4 血清 TNF-α 的浓度测定

采用双抗体夹心 ELISA 测定血清 TNF-α 浓度,试剂盒由武汉优尔生公司提供,严格按照试剂盒说明书步骤进行操作,用酶标仪测定吸光度值。

1.5 冠状动脉病变程度 Gensini 评分标准

冠状动脉病变程度 Gensini 评分^[3,7]由两部分组成:①根据冠状动脉狭窄最严重处狭窄程度确定基本评分:狭窄<25%计 1 分,25%~50%计 2 分,51%~75%计 4 分,76%~90%计 8 分,91%~99%计 16 分,100%计 32 分;②根据冠状动脉病变部位确定评分系数:左主干病变得分×5;前降支病变:近段得分×2.5,中段得分×1.5,远段得分×1;对角支病变:第一对角支得分×1,第二对角支得分×0.5;回旋支病变:近段得分×2.5,远段和后降支得分×1;右冠状动脉病变:近、中、远段得分×1。最终冠状动脉狭

窄积分为各分支积分之和。

1.6 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组均数间比较采用 *t* 检验,多组间样本均数比较采用方差分析,进一步两两比较采用 LSD 检验,治疗前后的计量资料采用配对 *t* 检验,两变量间的相关分析采用 Pearson 相关分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的基线资料

各组之间性别、年龄、吸烟史及高血压、糖尿病、肌酐、甘油三酯等一般临床资料差异无统计学意义($P>0.05$),ACS 组和 SAP 组 TC 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$;表 1)。

表 1. 各组患者一般临床资料比较

Table 1. The clinical data of patients in each group

项目	AMI 组 (n=30)	UAP 组 (n=30)	SAP 组 (n=20)	对照组 (n=20)	P 值
男性[例(%)]	26(86.7)	25(83.3)	7(35)	14(70.0)	0.337
年龄(岁)	52.17±11.94	55.6±10.27	52.6±10.27	50.55±9.49	0.215
吸烟[例(%)]	17(56.7)	16(53.3)	9(45.0)	8(40.0)	0.492
高血压[例(%)]	18(60.0)	14(46.6)	8(40.0)	9(45.0)	0.476
糖尿病[例(%)]	5(16.67)	5(16.67)	2(10.0)	2(10.0)	0.848
尿素氮(mmol/L)	6.057±2.46	5.88±1.29	5.8±1.50	5.78±1.92	0.449
肌酐(mmol/L)	88.68±30.71	83.43±19.77	82.41±20.12	81.90±22.05	0.178
TG(mmol/L)	1.83±0.68	1.57±0.66	1.63±0.61	1.65±0.69	0.423
LDLC(mmol/L)	2.60±0.74	2.48±0.95	2.45±0.87	2.50±0.83	0.658
HDLC(mmol/L)	0.91±0.28	0.94±0.24	0.94±0.15	0.94±0.17	0.883
TC(mmol/L)	4.8±0.97	4.08±0.87	4.04±1.05	4.03±1.06	0.024

2.2 PCI 术前外周血 TLR4 表达水平和血清 TNF-α 浓度

AMI 组和 UAP 组外周血 TLR4 表达水平显著高于 SAP 组和对照组($P<0.01$),而 TLR4 表达水平在 AMI 组与 UAP 组之间、SAP 与对照组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组、SAP 组、UAP 组及 AMI 组血清 TNF-α 浓度呈依次递增趋势,且 AMI 组和 UAP 组 TNF-α 浓度显著高于 SAP 组和对照组($P<0.01$;图 1 和表 2)。

2.3 AMI 组和 UAP 组患者 PCI 术后外周血 TLR4

表达水平及血清 TNF-α 浓度

AMI 组和 UAP 组患者 PCI 术后外周血 TLR4 表达水平、血清 TNF-α 浓度较术前显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$;图 1 和表 3)。

2.4 ACS 患者外周血 TLR4 表达水平、血清 TNF-α 浓度与冠状动脉 Gensini 评分的相关性分析

Pearson 直线相关分析显示,外周血 TLR4 ($r=0.715, P<0.01$)、血清 TNF-α ($r=0.333, P<0.01$) 与 Gensini 评分呈正相关,外周血 TLR4 的表达水平与血清 TNF-α 浓度呈显著正相关($r=0.607, P<0.01$;图 2)。

表 2. 各组外周血 TLR4 表达水平和血清 TNF-α 浓度比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2. Comparison of TLR4 and TNF-α levels in each group($\bar{x}\pm s$)

分组	AMI 组 (n=30)	UAP 组 (n=30)	SAP 组 (n=20)	对照组 (n=20)
TLR4(%)	68.61±11.91 ^a	61.61±11.40 ^a	40.05±5.13	39.48±6.65
TNF-α(ng/L)	10.64±4.29 ^a	6.43±3.23 ^a	3.01±1.08	2.14±1.27

a 为 $P<0.05$,与 SAP 组或对照组比较。

表 3. AMI 组和 UAP 组 PCI 前后外周血 TLR4 表达水平及血清 TNF-α 浓度比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3. Comparison of TLR4 and TNF-α levels between AMI group and UAP group before and after PCI ($\bar{x}\pm s$)

分组	例数	TNF-α (ng/L)		TLR4 (%)	
		PCI 术前	PCI 术后	PCI 术前	PCI 术后
AMI 组	30	10.64±4.29	5.36±3.12 ^a	68.61±11.91	53.26±10.10 ^a
UAP 组	30	6.43±3.23	3.71±2.34 ^a	61.61±11.40	45.44±10.51 ^a

a 为 $P<0.05$, 与 PCI 术前比较。

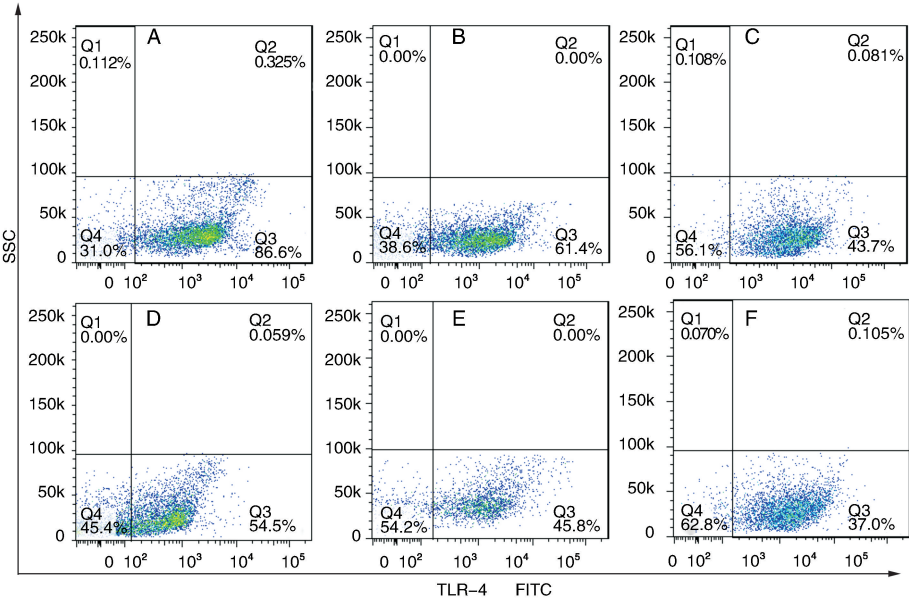


图 1. 流式细胞仪检测外周血单个核细胞 TLR4 表达水平 Q3 象限为外周血 TLR4 阳性比例。A 为 AMI 组 PCI 术前, B 为 UAP 组 PCI 术前, C 为 SAP 组, D 为 AMI 组 PCI 术后, E 为 UAP 组 PCI 术后, F 为对照组。

Figure 1. Peripheral blood TLR4 was detected by flow cytometry

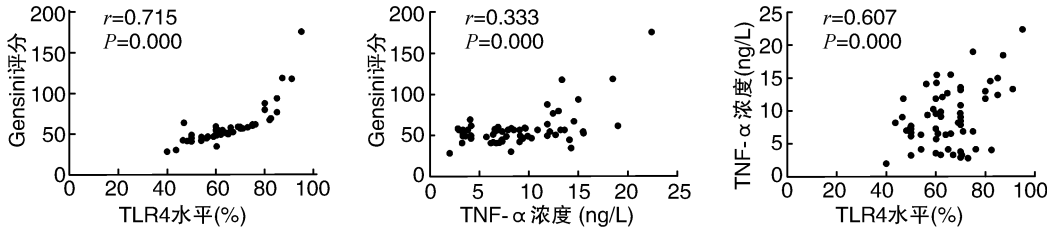


图 2. ACS 患者 Gensini 评分、外周血 LTR4 表达水平、血清 TNF-α 浓度的相关分析散点图

Figure 2. Scatter diagram of correlation analysis Gensini score, TLR4 and TNF-α in ACS patients

3 讨论

ACS 是由冠状动脉内粥样斑块破裂出血及其引起的血栓形成导致冠状动脉管腔急剧狭窄或闭塞所致。动脉粥样硬化斑块破裂的发病机制较为复杂,目前的研究认为炎症反应在动脉硬化中起到重要作用,炎症反应损伤在 ACS 发病中的作用得到认可,而 TLR4 介导的炎症反应在 ACS 中的地位受到越来越多的关注^[8]。有研究表明,当损伤和硬化的动脉处存在内源性配体时,TLR4 通路即被活化,

启动胞内信号转导,诱导巨噬细胞浸润和活化、促进脂质核心形成、降低纤维帽厚度及增加斑块破裂指数,参与动脉粥样硬化的发生、发展,最终导致斑块破裂、急性临床心血管事件发生^[9-11]。

最近有研究报道,TLR4 在 AMI 患者心肌梗死区的表达水平显著高于全身水平^[12]。另有动物实验研究显示,TLR4 基因敲除小鼠心肌梗死区炎症因子表达减弱^[13]。本研究采用流式细胞术检测了 100 例患者外周血 TLR4 的表达水平,结果发现,对照组、SAP 组、UAP 组及 AMI 组 TLR4 的表达依次升高,ACS 组

TLR4 的表达显著高于 SAP 组和对照组。由此推断, TLR4 通过促进炎症反应, 在冠状动脉斑块硬化的发展过程中起到关键的作用, 除此之外, TLR4 参与动脉粥样硬化易损斑块形成及破裂的发展过程^[10,12]。

TNF- α 是 TLR4/NF- κ B 细胞信号通路的下游炎症因子, TNF- α 对内皮细胞完整性结构产生破坏作用, 对单核巨噬细胞内膜产生促进作用。本研究采用 ELISA 检测了 100 例患者血清 TNF- α 浓度, 结果发现, AMI 和 UAP 组血清 TNF- α 浓度显著高于 SAP 组及对照组, 提示 TNF- α 水平与动脉粥样硬化斑块的活化和不稳定有关, 表明 TNF- α 参与了 ACS 的发生、发展过程。为了探讨 TLR4 与 TNF- α 在 ACS 患者炎症反应中的关系, 通过检测 ACS 组、SAP 组及对照组患者外周血 TLR4 表达水平、血清 TNF- α 浓度, 发现 ACS 患者外周血 TLR4 表达水平及血清 TNF- α 浓度显著升高。研究发现 AMI 小鼠 TLR4 的表达上调, TNF- α 分泌增加^[14]。而本研究通过对 ACS 患者外周血 TLR4 表达水平与血清 TNF- α 浓度进行相关性分析, 结果显示 TLR4 与 TNF- α 水平呈显著正相关。从而提示外周血 TLR4 表达水平上调与血清 TNF- α 浓度的明显升高与 ACS 的发生发展密切相关。

本研究中, 通过观察患者外周血 TLR4 的表达水平及血清 TNF- α 浓度与 Gensini 评分进行相关分析, 结果显示外周血 TLR4 和血清 TNF- α 与 Gensini 评分呈正相关; Gensini 积分的增加说明冠状动脉病变程度越严重, 外周血 TLR4 与 TNF- α 水平有显著升高。这提示临床工作中通过检测外周血 TLR4 水平与 TNF- α 浓度, 可为 ACS 患者早期病情严重程度的判断提供相关依据。本研究还观察到, ACS 患者经 PCI 治疗后, 其外周血 TLR4 表达水平和血清 TNF- α 浓度较术前明显降低, 这提示, 评价 PCI 治疗的效果是否可以通过检测 TLR4 及 TNF- α 水平来判断, 还需更多的临床研究去证实。

综上所述, 冠心病患者外周血 TLR4 的表达水平及血清 TNF- α 浓度较对照组增加, 二者不仅在动脉粥样硬化的形成、斑块的破裂中发挥重要作用, 而且促进 ACS 患者体内的炎症反应。本研究证实了 TLR4 和 TNF- α 与冠状动脉狭窄程度相关的同时, 还进一步阐明了 PCI 术后二者水平降低, 这可能为临床心血管事件的治疗及预后起到指导作用。

[参考文献]

[1] Wang LS, Yan JJ, Tang NP, et al. A polymorphism in the visfatin gene promoter is related to decreased plasma levels

of inflammatory markers in patients with coronary artery disease[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(2): 819-825.

- [2] Lu LF, Wang CP, Yu TH, et al. Interpretation of elevated plasma visfatin concentrations in patients with ST-elevation myocardial infarction[J]. Cytokine, 2012, 57(1): 74-80.
- [3] 陈洁, 杜广胜, 邱强, 等. 急性心肌梗死患者血清内脏脂肪素水平的变化及其临床意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(4): 402-406.
- [4] 胡泽平, 王邦宁, 李嘉嘉, 等. 接受择期 PCI 术的急性冠状动脉综合征患者外周血单核细胞 Toll 样受体 4 表达及强化阿托伐他汀治疗对其的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(4): 486-490.
- [5] 马克娟, 郝蓬, 方冬平, 等. 外周血 Toll 样受体 4 及 TNF- α 与冠状动脉支架置入术后再狭窄的关系[J]. 心肺血管病杂志, 2014, 33(5): 678-682.
- [6] Egan BM, Li J, White K, et al. 2013 ACC/AHA cholesterol guideline and implications for healthy people 2020 cardiovascular disease prevention goals[J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5(8): e003558.
- [7] Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease[J]. Am J Cardiol, 1983, 51(3): 606.
- [8] Gill R, Tsung A, Billia T, et al. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(9): 1121-1132.
- [9] McGhan LJ, Jaroszewski DE. The role of Toll-like receptor-4 in the development of multi-organ failure following traumatic haemorrhagic shock and resuscitation[J]. Injury, 2012, 43(2): 129-136.
- [10] 胡国晶, 路娇扬, 王双, 等. Toll 样受体与动脉粥样硬化易损斑块的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(5): 477-480.
- [11] Croce K, Libby P. Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis[J]. Curr Opin Hematol, 2007, 14(1): 55-61.
- [12] Kashiwagi M, Tanimoto T, Ino Y, et al. Differential expression of Toll-like receptor 4 and human monocyte subsets in acute myocardial infarction[J]. Atherosclerosis, 2012, 221(1): 249-253.
- [13] Timmers L, Sluijter JP, Keulen JK, et al. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction[J]. Circ Res, 2008, 102(2): 257-264.
- [14] 董国菊, 李立志. Toll 样受体 4 介导急性心肌梗死后炎症反应的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(10): 1735-737.

(此文编辑 文玉珊)