

临床研究

冠心病患者外周血树突状细胞亚型分布与血浆单核细胞趋化蛋白1的关系

孙子凯¹, 钟文亮², 丘毅铭³, 李志樑¹, 曹龙兴¹¹南方医科大学珠江医院心血管内科, 广东 广州 510282; ²福建医科大学附属南平第一医院心血管内科, 福建南平 353000; ³福建省龙岩人民医院心血管内科, 福建 龙岩 364000

摘要:目的 探讨冠心病患者外周血树突状细胞(DCs)亚型分布与血浆单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)浓度变化的关系。方法 连续入选2010年11月~2011年12月在我院心内科住院经冠状动脉造影术检查及治疗的患者(稳定型心绞痛10例、不稳定型心绞痛25例以及急性心肌梗死25例)60例,正常对照组28例。采用流式细胞仪四色荧光标记技术对外周血髓样树突状细胞(mDCs)和浆细胞样树突状细胞(pDCs)占外周血单核细胞比例进行检测,酶联免疫吸附测定法检测外周血浆单核细胞趋化蛋白1的表达,评价各组间差异,并对外周血髓样树突状细胞与外周血浆MCP-1进行相关性分析。结果 急性心肌梗死组和不稳定型心绞痛组mDCs占外周血单核细胞比例及mDCs实际数量明显低于对照组和稳定型心绞痛组($P<0.001$);冠心病患者外周血浆MCP-1浓度明显高于正常人($P<0.001$),并且与外周血mDCs比例呈负相关($r=-0.707, P<0.001$)。结论 MCP-1可能促进了冠心病患者外周血mDCs向AS斑块病变部位迁徙并介导了斑块局部免疫炎症反应,加剧了AS斑块的不稳定。

关键词:冠心病;树突状细胞;单核细胞趋化蛋白1

中图分类号:R541.4 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)08-1157-06

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.08.19 <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20120716.1100.017.html>

Peripheral dendritic cell subsets and changes in plasma monocyte chemoattractant protein 1 in patients with coronary heart disease

SUN Zikai¹, ZHONG Wenliang², QIU Yiming³, LI Zhiliang¹, CAO Longxing¹¹Department of Cardiology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Department of Cardiology, Nanping Firs Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Nanping 353000, China; ³Department of Cardiology, Longyan People's Hospital, Longyan 364000, China

Abstract: Objective To assess the association between peripheral blood dendritic cells subtype distribution and plasma monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) concentration in patients with coronary heart disease (CHD). **Methods** Sixty consecutive CHD patients admitted in our department during the period from November, 2010 to December, 2011 were enrolled, including 10 with stable angina pectoris (SAP), 25 with unstable angina pectoris (UAP), and 25 with acute myocardial infarction (AMI), with 28 healthy volunteers as normal controls. All the subjects underwent routine tests and coronary angiography. The percentages of peripheral blood myeloid dendritic cells (mDCs) and plasma cell-like dendritic cells (pDCs) in peripheral blood mononuclear cells were detected by flow cytometry, and plasma MCP-1 levels were detected using enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The percentage and absolute quantity of mDCs and pDCs were significantly lower in AMI and UAP groups than in the normal control and SAP groups ($P<0.001$). In the CHD patients, the plasma MCP-1 level was significantly higher than that in the normal control group ($P<0.001$) with an inverse correlation with the percentage of peripheral mDCs. **Conclusion** MCP-1 may promote the migration of mDCs into atherosclerotic plaques and mediate the local immune and inflammatory responses to aggravate plaque instability in CHD patients.

Key words: coronary heart disease; dendritic cells; monocyte chemoattractant protein 1

目前,冠心病仍是世界范围内影响人们身心健康的社会公共卫生问题之一。已有研究认为炎症反应是不稳定斑块形成与发展的核心因素,免疫与炎症反应相互促进,共同参与了动脉粥样硬化及冠心病发生发展的全

过程^[1]。树突状细胞(DCs)是机体内功能最强的专职抗原呈递细胞。通过对易损斑块进行病理学分析发现有DCs的浸润^[2],提示DCs可能参与了AS及冠心病的进展。课题组前期研究发现冠心病患者外周血髓样树突状细胞(mDCs)比例下降,据此,我们推测外周血mDCs可能是通过迁徙入血管壁内并介导了免疫炎症反应,诱导AS斑块不稳定。单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)是将抗原呈递细胞

收稿日期:2012-05-10

基金项目:福建省自然科学基金(2010J01371)

作者简介:孙子凯,硕士研究生,E-mail: ssarah@126.com

通讯作者:钟文亮,副主任医师,博士,E-mail: wenliang280@163.com

募集到血管壁的重要因子,与冠心病关系密切,是冠心病患者预后的独立预测因子之一^[3]。为验证上述假设,本实验就冠心病患者外周血mDCs比例与血浆MCP-1浓度变化的关系进行探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2010年11月~2011年12月在我院心内科住院检查及治疗的患者共88例,其中男性60例,女性28例。入选对象需满足以下条件:所有患者均行冠状动脉造影术(CAG),结果显示左冠状动脉主干(LM)、左前降支(LAD)、回旋支(LCX)或右冠状动脉(RCA)中至少1支冠状动脉血管直径狭窄程度 $\geq 50\%$;并参照1979年WHO缺血性心脏病的诊断标准分为4组。(1)稳定性心绞痛组,10例,诊断标准:劳累性心绞痛发作性质2个月内无改变,运动试验阳性。(2)不稳定性心绞痛组,25例,并符合下列条件:①心绞痛发作3d内进行性加剧,发作频繁,持续时间延长;新近发生心绞痛,每次发作持续至少15 min;②心绞痛发作时,心电图出现暂时性ST段缺血性压低 >1 mm或ST段抬高 >3 mm,发作缓解后,ST段改变迅速恢复正常或接近正常;③距末次发作24 h以内,梗死后心绞痛排除在外。(3)急性心肌梗死组,25例,根据临床症状、心电图改变及动态演变,均为Q波心肌梗死,单纯右室梗死排除在外。(4)对照组,28例,在我科常规体检患者,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;排除合并心肌炎、严重心功能不全、周围血管疾病、脑卒中、严重肝肾疾病、自身免疫性疾病、血液病、炎症感染、严重的全身其他系统疾病以及使用炎症抑制物的患者。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集 CAG采用Judkins法,按常规选择投影体位,必要时加其他体位造影,对每支血管病变定量评定。对照组、SAP患者均于入院后第2天清晨空腹采取空腹静脉血,ACS患者于入院后6 h内采取静脉血,所有受试者均采血10 ml,其中8 ml全血样本采用肝素抗凝,1000 r/min离心10 min,吸取上清液,置 -70 °C冰箱冻存至测定时;另2 ml全血样本采用EDTA抗凝,流式细胞术检测外周血DCs亚群分布。

1.2.2 外周血DCs亚群比例的流式细胞检测 每个研究对象标本取2个样本,每个样本设2个加样管,每管为100 μ l分别标记为A管(100 μ l全血分别加入10 μ l Lineage1-FITC、单克隆抗体HLA-DR-PerCP、CD123-PE、CD11c-APC)、对照管(100 μ l全血+10 μ l鼠抗人单克隆抗体IgG1-PE、IgG2a-APC);在室温、暗室内孵育20 min,加溶血剂2 ml,混匀裂解红细胞10 min,1500 r/min离心10 min,去上清后分别用PBS溶液0.5 ml,混匀后

应用流式细胞仪检测分析。主要试剂购自美国BD。应用流式细胞仪FACS-CALIBUR型(BD,美国),根据前向散射光和侧向散射光以淋巴细胞群设门,设置各通道之间的荧光补偿后,以获取条件为Lineage1-FITC阴性为门圈定R2细胞群。以CD123-PE和HLA-DR PerCP阳性为门圈定R4细胞群,定义为CD123⁺DC亚群;以CD11c-APC和HLA-DR PerCP阳性为门圈定R5细胞群,定义为CD11c⁺DC亚群。对CD123⁺的浆细胞样DC和CD11c⁺的髓样DC比例进行检测。

1.2.3 DC各亚群实际细胞量计算 应用血常规检测外周血单核细胞数量,利用下列公式根据百分比计算各例患者外周血DC各亚群实际细胞量。CD123⁺DC实际数(个/ μ l)=CD123⁺阳性百分数($\%$) \times 外周血单核总数(个/ μ l)。CD11c⁺DC实际数(个/ μ l)=CD11c⁺阳性百分数($\%$) \times 外周血单核总数(个/ μ l)。

1.2.4 血浆MCP-1检测 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆MCP-1(试剂盒购于美国Biolegend,灵敏度小于11 pg/ml)。酶标仪为Biocell HT2型酶联免疫检测仪,具体操作严格按试剂盒说明书进行。

1.3 统计方法

所有统计学处理均应用SPSS 16.0统计软件进行分析。所有实验结果以均数 \pm 标准差表示,计数资料用 χ^2 检验,多组间比较采用单因素方差分析;若方差不齐则采用Welch法,组间多重比较则采用Dunnett's T_3 。两者相关性采用Spearman相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象一般临床资料

各组在性别比例、年龄分布、高血压和吸烟分别所占人群比例、血脂、血糖水平等方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

2.2 各组研究对象外周血树突状细胞亚群比例及数量

根据细胞膜表达的CD11c和CD123表达阳性,以及其它外周血单个细胞表面标志物阴性定义外周血mDC和pDC亚群。4组外周血mDC占外周血单核细胞比例及mDC实际数量相比,差异具有统计学意义($P < 0.001$),AMI组和UAP组的mDC占外周血单个核细胞比例及mDC实际数量明显低于对照组和SAP组($P < 0.001$);4组间外周血pDC占外周血单核细胞比例及pDC实际数量相比,差异无统计学意义($P > 0.05$,表2、图1)。

2.3 各组研究对象外周血浆MCP-1浓度变化及与mDC比例的相关性

4组外周血浆MCP-1浓度分别为:对照组(0.18 ± 0.10) pg/ml、SAP组(0.47 ± 0.14) pg/ml、UAP组($0.47 \pm$

表1 各组研究对象一般临床资料情况

Tab.1 Baseline clinical data of the subjects enrolled

临床资料	对照组	稳定型心绞痛组	不稳定型心绞痛组	急性心肌梗死组	F	P
性别(男/女)	17/11	7/3	16/9	20/5	2.517	0.472
年龄(岁)	58.43±11.57	62.7±12.46	64.2±9.67	61.52±11.58	1.231	0.304
高血压(n)	17	8	20	13	5.518	0.138
吸烟者(n)	5	2	7	5	0.879	0.830
总胆固醇(mmol/L)	5.06±1.12	4.33±1.05	4.87±1.24	5.18±1.26	1.345	0.265
甘油三酯(mmol/L)	1.37±1.13	1.34±0.45	1.68±0.93	1.51±0.70	0.614	0.608
HDLC(mmol/L)	1.21±0.38	1.18±0.20	1.12±0.28	1.09±0.32	0.750	0.525
LDLC(mmol/L)	3.15±0.95	2.68±0.89	3.08±0.97	3.22±1.04	0.773	0.512
空腹血糖(mmol/L)	5.76±1.36	5.36±1.84	5.42±1.36	6.44±1.58	2.386	0.075

HDLC: 高密度脂蛋白胆固醇; LDLC: 低密度脂蛋白胆固醇

表2 各组研究对象外周血树突状细胞亚群比例及数量

Tab.2 Subset ratio and quantity of peripheral blood dendritic cells of the subjects enrolled

组别	n	髓样树突状细胞比例(%)	浆细胞样树突状细胞比例(%)	髓样树突状细胞数量(个/μl)	浆细胞样树突状细胞数量(个/μl)
对照组	28	1.26±0.35	0.16±0.05	85.87±32.49	10.56±3.92
稳定型心绞痛组	10	1.09±0.42	0.18±0.04	78.29±32.65	12.81±4.17
不稳定型心绞痛组	25	0.49±0.26*	0.15±0.09	41.63±27.79*	12.02±7.67
急性心肌梗死组	25	0.53±0.27*	0.15±0.08	48.26±23.14*	14.16±10.62
F		37.784	0.429	13.765	1.071
P		0.000	0.733	0.000	0.366

与对照组、稳定型心绞痛组相比, *P<0.001

0.18) pg/ml、AMI组(0.46±0.19) pg/ml, 4组外周血浆MCP-1浓度相比, 差异具有统计学意义($P<0.001$), 对照组MCP-1浓度低于其余3组($P<0.001$); 偏相关分析显示: 外周血浆MCP-1浓度变化及与mDC比例明显负相关($r=-0.707, P<0.001$, 图2)。

3 讨论

AS是冠心病的主要病理基础, 在AS的各个阶段其病变局部都有淋巴细胞的浸润和免疫细胞的介入^[4]。特别是当进展至急性冠脉综合征(ACS)时, AS病变处于不稳定阶段, 其外周血中可以检测到活化的T淋巴细胞和单核细胞的存在, IFN- γ 、TNF- α 和IL-6等促炎症细胞因子水平也明显升高, 说明ACS患者体内存在着免疫系统的活化和炎症加剧^[5-8]; 更进一步的研究发现, 破裂的斑块内可以检测到多种抗原的存在, 并且有大量T淋巴细胞、单核巨噬细胞以及DCs浸润^[9-10], 斑块破裂与抗原负荷、抗原提呈细胞呈正相关关系^[11-14]。这些都说明AS的发生发展与免疫炎症高度相关, 活化的免疫炎症反应可能参与了AS的发生发展的全过程。所以有观点认为AS不仅是炎症性疾病, 也是免疫性疾病^[1]。

DCs是机体内功能最强的专职抗原呈递细胞。根

据表型和功能的差别, 分为mDCs和pDCs, 在外周血液中主要以mDCs亚群为主, mDCs含量明显高于pDCs。本实验也证实了在冠心病及正常人外周血中mDCs比例及含量均明显高于pDCs。本课题组既往研究发现冠心病患者外周血mDCs比例明显下降的基础上^[15], 而AS粥样硬化斑块, 特别是易损斑块有大量DCs等抗原呈递细胞浸润, 提示DCs在抗原刺激下向动脉管壁迁徙, 使得外周血内抗原呈递细胞比例下降, 同时启动了AS斑块内的免疫炎症反应的“扳机点”, 促进了AS局部炎症及免疫反应, 与冠心病及AS不稳定斑块的发生发展高度相关。

为探讨冠心病患者外周血mDCs比例减少是否与mDCs迁徙密切相关, 本研究进一步观察了冠心病患者外周血浆MCP-1的浓度变化, 结果显示冠心病患者外周血浆MCP-1浓度明显高于正常人, 并且与外周血mDCs比例呈负相关。

MCP-1主要由内皮细胞、血管平滑肌细胞、单核细胞、巨噬细胞分泌与释放^[16]。其可能是通过促进外周血单核细胞黏附、趋化并迁移到内皮下, 吞噬脂质转化为泡沫细胞, 促进血管平滑肌细胞增生, 促进不稳定斑块形成等多环节参与AS的发生、发展^[17]。血浆MCP-1水

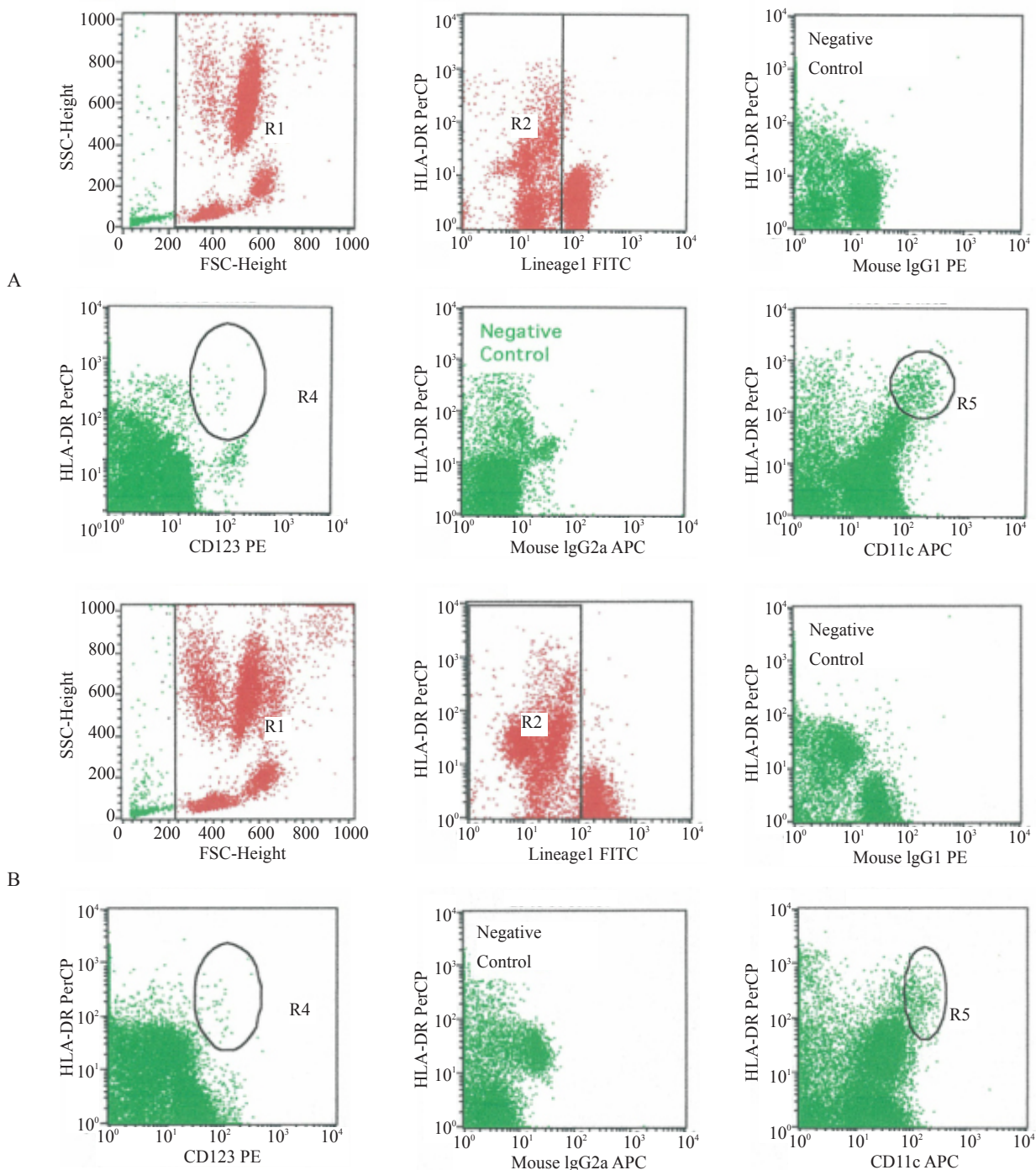


图1 流式细胞术检测各组研究对象外周血树突状细胞亚群比例

R1: 碎片和死细胞; R2: Lineage1-FITC 细胞群; R4: CD123⁺树突状细胞亚群, 即pDCs; R5: CD11c⁺树突状细胞亚群, 即mDCs; A: 对照组; B: 稳定型心绞痛组

Fig.1 Flow cytometric analysis of peripheral blood dendritic cell subset ratio in the subjects enrolled.

平不仅与冠心病发生发展关系密切^[18],也是冠心病患者预后的独立预测因子^[3]。近来研究表明MCP-1及其受体在树突状细胞中也有表达。体外实验证实,在单核细胞向DCs分化过程中,MCP-1及其受体表达持续增强,并且MCP-1可诱导DCs定向游走,DCs这种自分泌作用有助于DCs与T细胞间的相互作用以及DCs在炎症部位的聚集^[19]。本课题组也研究证实作为冠心病的

重要危险因素之一,ox-LDL可促进单核细胞源性DCs成熟以及分泌MCP-1^[20]。本研究提示在冠心病患者体内,在抗原刺激下DCs由未成熟向成熟分化过程中,通过自分泌或旁分泌的MCP-1可促进DCs由外周迁徙到AS斑块病变部位,加剧了斑块局部炎症和斑块的不稳定,促进了AS及冠心病的进展。

冠心病患者外周血mDCs比例与血浆MCP-1浓度

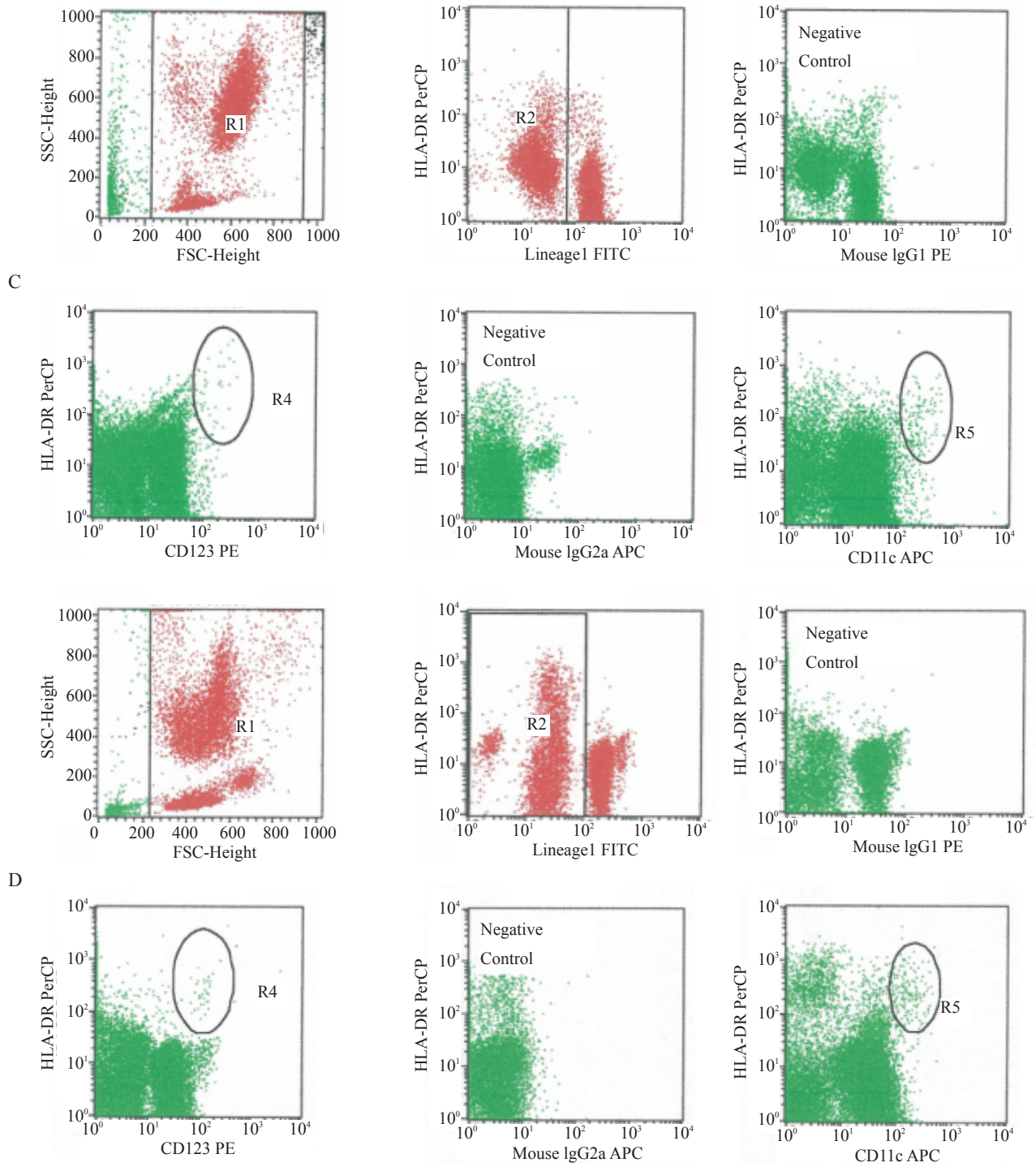


图1 流式细胞术检测各组研究对象外周血树突状细胞亚群比例

R1: 碎片和死细胞; R2: Lineage1-FITC 细胞群; R4: CD123⁺树突状细胞亚群, 即pDCs; R5: CD11c⁺树突状细胞亚群, 即mDCs; C: 不稳定型心绞痛组; D: 急性心肌梗死组

Fig.1 Flow cytometric analysis of peripheral blood dendritic cell subset ratio in the subjects enrolled.

变化呈负相关,冠心病患者外周血mDCs比例及数量的减少可能与MCP-1促进mDCs向AS斑块病变部位迁徙密切相关。在下一步研究中,我们将采用ApoE^{-/-}小鼠及小动物活体内成像技术进一步研究证实MCP-1是否促进外周血mDCs向AS斑块病变部位迁徙。

参考文献:

[1] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options[J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1410-22.

[2] Yilmaz A, Lochno M, Traeg F, et al. Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques [J]. Atherosclerosis, 2004, 176(1): 101-10.

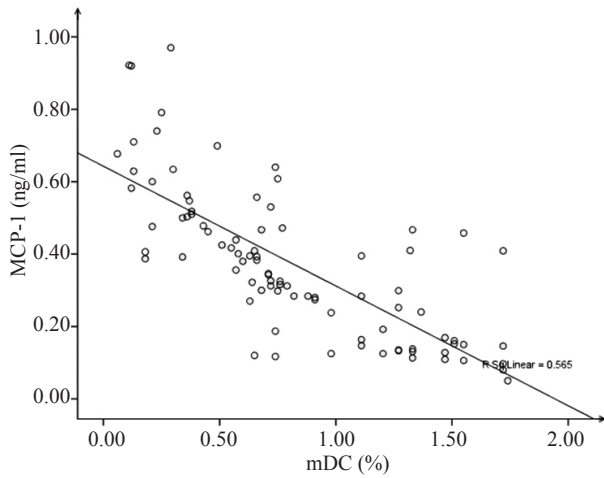


图2 外周血浆MCP-1浓度与mDC比例的偏相关分析
Fig.2 Partial correlation analysis of plasma MCP-1 and mDC percentage in the subjects enrolled.

[3] de Lemos JA, Morrow DA, Blazing MA, et al. Serial measurement of monocyte chemoattractant protein-1 after acute coronary syndromes: results from the A to Z trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 50(22): 2117-24.

[4] Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7(2): 77-86.

[5] Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. Adaptive T cell immune responses and atherogenesis[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10(2): 197-202.

[6] Macdougall IC. Could anti-inflammatory cytokine therapy improve poor treatment outcomes in dialysis patients [J]? *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19 (Suppl 5): V73-8.

[7] Osiecki H. The role of chronic inflammation in cardiovascular disease and its regulation by nutrients[J]. *Altern Med Rev*, 2004, 9 (1): 32-53.

[8] Degra T. Immunogenetic susceptibility of atherosclerotic stroke: implications on current and future treatment of vascular inflammation[J]. *Stroke*, 2004, 35(11 Suppl 1): 2712-9.

[9] Vanderlaan PA, Reardon CA. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. The unusual suspects: an overview of the

minor leukocyte populations in atherosclerosis [J]. *J Lipid Res*, 2005, 46(5): 829-38.

[10] Jongstra-Bilen J, Haidari M, Zhu SN, et al. Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(9): 2073-83.

[11] Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(11): 2302-9.

[12] Bobryshev YV. Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance [J]. *Eur Heart J*, 2005, 26(17): 1700-4.

[13] Liu P, Yu YR, Spencer JA, et al. CX3CR1 deficiency impairs dendritic cell accumulation in arterial intima and reduces atherosclerotic burden[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28 (2): 243-50.

[14] Ait-Oufella H, Kinugawa K, Zoll J, et al. Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice[J]. *Circulation*, 2007, 115(16): 2168-77.

[15] 傅强, 李志樑, 雷霄, 等. 急性冠脉综合征患者外周血树突状细胞亚群数量及比例的变化[J]. *中华心血管病杂志*, 2008, 36(3): 209-11.

[16] Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2009, 29(6): 313-26.

[17] Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications[J]. *Clin Sci*, 2009, 117(3): 95-109.

[18] Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 as a biomarker in acute coronary syndromes [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2009, 11(2): 131-8.

[19] 朱可建, Ulrich M, 郑敏. IL-18, MCP-1, RANTES 及其受体在树突状细胞中的表达与其趋化性[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 20(4): 344-5.

[20] 傅强, 李志樑, 姜立, 等. 氧化低密度脂蛋白对大鼠树突状细胞趋化因子分泌及趋化因子受体表达的影响[J]. *临床心血管病杂志*, 2008, 24(7): 497-500.

(编辑:陈望忠)