

• 临床检验研究论著 •

冠心病患者血浆相关细胞因子检测及临床意义*

吴艾霖, 熊怡淞[△]

(中国人民解放军成都军区总医院检验科, 四川成都 610083)

摘要:目的 检测冠心病(CAD)患者外周血促炎性和抗炎性细胞因子表达水平,并探讨其临床意义。方法 收集急性冠状动脉综合征(ACS)患者 52 例,稳定型心绞痛(SA)患者 48 例,健康对照(NC)56 例,ELISA 法检测血浆 IL-2、IL-10、IL-12、IFN- γ 和 IL-17A 表达;同时常规测定患者血脂水平,按血脂正常与否将冠心病患者分为血脂正常组和血脂异常组。结果 ACS、SA 和 NC 三组患者血浆 IL-12 及 IFN- γ 水平较低,接近或低于试剂盒检测线性范围。ACS 和 SA 组 IL-2 水平显著高于 NC 组,差异具有统计学意义。ACS 组 IL-10 和 IL-17A 表达均显著高于 SA 组和对照组,而 SA 组与对照组之间无差异。冠心病血脂正常组和血脂异常组 IL-2、IL-10 和 IL-17A 均高于 NC 组,而冠心病两组之间差异无统计学意义。结论 冠心病特别是 ACS 患者血浆促炎性细胞因子表达增高,负反馈增加抗炎性细胞因子表达,而血脂正常与否与上述细胞因子表达无明显关系。

关键词:冠状动脉疾病; 细胞因子类; 炎症; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)05-0536-03

Detection of plasma cytokines in patients with coronary artery disease and its clinical significance*

Wu Ailin, Xiong Yisong[△]

(Department of Clinical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China)

Abstract: Objective To detect the expression of plasma cytokines in patients with coronary artery disease (CAD) and to explore its clinical significance. **Methods** 52 acute coronary syndrome (ACS), 48 stable angina (SA) and 56 normal controls (NC) were enrolled in the study. ELISA was used to detect plasma IL-2, IL-10, IL-12, IFN- γ and IL-17A levels. Meanwhile, blood lipid levels of CAD patients were also detected and patients were divided into two groups, normal lipid group and abnormal lipid group. **Results** IL-12 and IFN- γ levels in ACS, SA and NC groups were all near or lower than the detection limits of the ELISA kits. IL-2 levels in ACS and SA groups were both higher than that in NC group. IL-10 and IL-17A in ACS group were both significantly higher than those in SA and NC groups, but there was no difference of IL-10 and IL-17A in SA and NC groups. IL-2, IL-10 and IL-17A levels in both normal lipid group and abnormal lipid group were significantly higher than those in NC group, but there was no difference between normal lipid group and abnormal lipid group. **Conclusion** The pro-inflammatory cytokines were elevated in coronary artery disease especially ACS patients, which may negative feedback on the up-regulation of anti-inflammatory cytokines. However, whether serum lipid is within the normal range or not seems irrelevant to those cytokine levels.

Key words: coronary artery disease; cytokine; inflammation; enzyme-linked immunosorbent assay

冠心病(coronary artery disease, CAD)被认为是一种免疫炎症性疾病,促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子在参与疾病发生和发展过程中起重要作用,而细胞因子的表达和平衡与疾病进程和预后直接相关。在部分发生急性不良事件的冠心病患者中,可检测到细胞因子表达谱的失衡,说明细胞因子的表达不仅关系到全身炎症水平,还与局部斑块稳定性有直接联系。本研究拟通过检测两类冠心病患者血浆促炎性和抗炎性细胞因子的表达水平,并分析血脂正常与否与这些细胞因子表达的关系,探讨相关细胞因子在不同类型冠心病中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 10 月至 2012 年 6 月本院心内科住院患者,经冠状动脉造影诊断为冠心病,其诊断符合 WHO 关于冠心病的诊断标准。入选急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)52 例,其中男 32 例,女 20 例,平均年龄(51.4 \pm 13.6)岁;稳定型心绞痛(stable angina, SA)48 例,其中男 29 例,女 19 例,平均年龄(50.3 \pm 11.5)岁;健康对照(NC)56 例,其中男 34 例,女 22 例,平均年龄(49.2 \pm 12.1)岁。健康对照者既往无冠心病史,心电图和颈动脉超声结果均正常。以上入选者均空腹采集静脉血 10 mL,5 mL 用乙二胺

四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝,用于细胞因子检测;5 mL 不抗凝,用于血脂检测。

1.2 主要仪器和试剂 人 IL-2、IL-10、IL-12 和 IFN- γ ELISA 检测试剂盒购自美国 eBioscience 公司;人 IL-17A 检测试剂盒购自美国 R&D 公司;血脂检测试剂盒(TG, TCHO, LDL, HDL, apo A, apo B)购自中生北控生物科技股份有限公司,用 Beckman AU2700 全自动生化分析仪检测;550 型酶联免疫分析仪购自美国 Bio-Rad 公司;恒温离心机购自美国 Beckman 公司;超低温冰箱购自美国 REVCO 公司。

1.3 ELISA 检测冠心病患者血浆细胞因子 4 $^{\circ}$ C 恒温离心分离冠心病患者及健康对照者血浆(1 000 \times g, 15 min),操作在血液离体后 1 h 内完成。将分离得到的血浆冻存于-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱备用。细胞因子检测操作按说明书进行,IL-2、IL-12、IFN- γ 检测线性范围 4~500 pg/mL,IL-10 检测线性范围 2~300 pg/mL,IL-17A 检测线性范围 0~2 000 pg/mL,标准曲线 r^2 均大于 0.98。

1.4 统计学处理 采用 SigmaStat 3.5 统计软件,检测数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,如数据满足方差分析条件,用方差分析进行统计;如不满足,用非参数检验(秩和检验)进行统计,以 $P<0.05$ 为

* 基金项目:成都军区总医院院管课题资助项目(2011YG-C05)。

通讯作者, E-mail: xys10@163.com。

作者简介:吴艾霖,女,主管技师,主要从事临床免疫学检验研究。 [△]

差异有统计学意义。

2 结 果

ELISA 检测 100 例冠心病患者及 56 例健康对照者外周血浆 IL-2、IL-12、IFN- γ 、IL-10 及 IL-17A 结果如表 1 所示。可见,健康对照组、ACS 和 SA 三组患者血浆 IL-12 及 IFN- γ 水平较低,接近或低于试剂盒检测线性范围,误差较大,比较无实际意义,未进行统计学分析。ACS 和 SA 组患者血浆 IL-2 水平显著高于健康对照组,差异具有统计学意义。有趣的是,ACS 组 IL-10 水平显著高于 SA 和健康对照组,可能是由于心

肌梗死发生后,激活机体抗炎性免疫反应,负反馈引起 IL-10 分泌增加。IL-17A 在 ACS 组表达显著高于 SA 组和健康对照组,而 SA 组 IL-17 表达与健康对照组比较差异无统计学意义。

笔者将冠心病患者按照血脂是否正常分为两组:血脂异常组和血脂正常组。结果发现,IL-2、IL-10 和 IL-17A 的表达在血脂异常组和血脂正常组都明显高于健康对照组,而冠心病两组之间差别无统计学意义(表 2)。说明冠心病患者外周血上述细胞因子的表达和血脂正常与否无明显关系。

表 1 冠心病患者及对照组血浆细胞因子检测比较

组别	n	IL-2	IL-10	IL-12	IFN- γ	IL-17A
冠心病组	100	24.929 \pm 11.624 ^a	10.534 \pm 4.614 ^a	1.662 \pm 1.326	4.378 \pm 4.641	34.505 \pm 29.875 ^a
ACS 组	52	23.459 \pm 7.047 ^{ad}	13.115 \pm 4.311 ^{ac}	1.936 \pm 0.865	5.004 \pm 4.547	49.628 \pm 33.629 ^{ac}
SA 组	48	26.521 \pm 15.026 ^a	7.738 \pm 3.052 ^b	1.366 \pm 1.650	3.700 \pm 4.694	18.121 \pm 11.212 ^b
健康对照组	56	17.814 \pm 4.211	7.372 \pm 1.730	1.691 \pm 0.827	3.495 \pm 2.134	13.374 \pm 8.953

^a: $P < 0.05$,^b: $P > 0.05$,与健康对照组比较;^c: $P < 0.05$,^d: $P > 0.05$,与 SA 组比较。

表 2 冠心病血脂正常和异常组血浆细胞因子比较

组别	n	IL-2	IL-10	IL-12	IFN- γ	IL-17A
冠心病组	100	24.929 \pm 11.624 ^a	10.534 \pm 4.614 ^a	1.662 \pm 1.326	4.378 \pm 4.641	34.505 \pm 29.875 ^a
血脂异常组	45	26.214 \pm 14.140 ^{ab}	10.689 \pm 4.884 ^{ab}	1.712 \pm 1.627	4.840 \pm 5.799	38.618 \pm 36.689 ^{ab}
血脂正常组	55	23.877 \pm 9.072 ^a	10.407 \pm 4.422 ^a	1.622 \pm 1.032	3.999 \pm 3.430	31.139 \pm 22.669 ^a
健康对照组	56	17.814 \pm 4.211	7.372 \pm 1.730	1.691 \pm 0.827	3.495 \pm 2.134	13.374 \pm 8.953

^a: $P < 0.05$,与健康对照组比较;^b: $P > 0.05$,与血脂正常组比较。

3 讨 论

细胞因子是一种全身性炎症和局部炎症反应之间的桥梁。促炎性细胞因子、抗炎性细胞因子以及一些趋化因子已被证实存在于动脉粥样硬化斑块局部,调节着局部的免疫反应。促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子之间的平衡决定着斑块的稳定性,是影响 CAD 患者预后的重要因素。一些主要的促炎性细胞因子包括肿瘤坏死因子- α 、IL-1、IL-12、IL-18 和干扰素- γ 等,抗炎性细胞因子主要有 IL-4、IL-10、IL-13 和转化生长因子- β 等。IL-2 主要是由活化的 T 细胞释放,其主要作用是刺激淋巴细胞生长,其中包括许多 T 细胞亚类,如 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞、调节性 T 细胞和 NK 细胞等^[1-3]。IL-12 在动脉粥样硬化中的主要作用是诱导 Th1 型免疫反应,并能诱导干扰素- γ 产生^[3-4]。干扰素- γ 能促进 Th1 型免疫反应和 Th1 型相关细胞因子的分泌,抑制血管平滑肌细胞合成细胞外基质^[5-8]。相反地,IL-10 是主要的抗炎性细胞因子之一,在 CAD 发病过程中起保护作用^[3]。IL-10 可以抑制 Th1 型免疫反应,促进调节性 T 细胞的增殖和分化。高浓度的 IL-10 血清水平预示着 ACS 患者预后良好^[9]。反之,低浓度 IL-10 血清水平不仅是粥样斑块不稳定的标志,也是发生急性心肌梗死事件后预后差的指标。

本研究发现,ACS 患者血浆 IL-12 和 IFN- γ 水平比健康对照组略有升高,提示 ACS 患者存在全身的 Th1 型炎症反应。但两细胞因子的表达均较低,接近或低于 ELISA 试剂盒的检测下限水平。SA 患者两细胞因子表达与健康者基本相同。笔者还观察到 IL-2 在 ACS 和 SA 患者外周血表达都高于健康对照,提示动脉粥样硬化患者外周血存在促 T 细胞增殖的条件。血浆 IL-10 水平在 ACS 患者显著高于 SA 或对照组,可能原因是心肌梗死发生后调节性免疫系统被激活,刺激机体分泌抗炎性细胞因子以抵抗炎症反应,或提示溶栓治疗成功。因此,笔者认为,冠心病 ACS 患者和 SA 患者具有比健康对照更强的促进 T 细胞增殖的条件和炎性细胞因子分泌能

力,可能是通过激活的外周血单核细胞-淋巴细胞或斑块局部巨噬细胞-淋巴细胞相互作用而引起的。但控制炎性细胞因子分泌的机制和关键分子仍有待进一步阐明。

IL-17A 是 IL-17 家族的细胞因子之一,主要由 CD4⁺ TH17 细胞, $\gamma\delta$ T 细胞,iNKT 细胞等产生^[10]。IL-17 可刺激巨噬细胞产生 TNF- α ,IL-1 β 和 IL-6 等促炎性细胞因子^[11],而 TNF- α 和 IL-1 β 可以作用于内皮细胞使其产生 GM-CSF 或 G-CSF^[12-13]。IL-17 还可以通过内皮细胞产生 CXC 趋化因子和 NO 释放,增加内皮通透性,促进外周血单个核细胞向血管内皮趋化和黏附,进而进入内皮下^[14-15]。而本研究发现,IL-17A 在冠心病 ACS 患者表达明显高于 SA 患者和健康对照组,说明急性冠脉综合征患者 IL-17 细胞因子通路活跃,介导动脉粥样硬化炎症反应强烈,IL-17A 在 ACS 的发生发展中可能起到促进性作用。

控制血脂水平是冠心病治疗的目标之一^[16-17]。本研究发现,冠心病血脂正常组和血脂异常组 IL-2、IL-10 和 IL-17A 的表达均显著高于健康对照组,但血脂正常组和血脂异常组之间三种细胞因子的表达没有差异。可能是由于部分患者经降脂治疗后,虽然血脂水平控制在正常范围内,但引起体内炎症反应的因素没有消除,机体仍处于较高的炎症水平,体内促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子的分泌与血脂异常的冠心病患者没有差别。该结果也说明冠心病的治疗不是以单纯降低血脂为目标,而是结合降脂和抗炎治疗等措施在内的综合治疗。

总之,本研究认为冠心病特别是 ACS 患者血浆促炎性细胞因子表达增高,负反馈引起抗炎性细胞因子表达增强,而血脂正常与否与上述细胞因子表达无明显关系。控制全身炎症反应能有效降低冠心病的危险等级,是冠心病治疗的重要目标之一。

参考文献

[1] Frostegard J, Wu R, Giscombe R, et al. Induction of T-cell activa-

- tion by oxidized low density lipoprotein[J]. *Arterioscler Thromb*, 1992, 12(4):461-467.
- [2] Upadhy S, Mooteri S, Peckham N, et al. Atherogenic effect of interleukin-2 and antiatherogenic effect of interleukin-2 antibody in apo-E-deficient mice[J]. *Angiology*, 2004, 55(3):289-294.
- [3] Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways[J]. *Physiol Rev*, 2006, 86(2):515-581.
- [4] Fernandes JL, Mamoni RL, Orford JL, et al. Increased Th1 activity in patients with coronary artery disease[J]. *Cytokine*, 2004, 26(3):131-137.
- [5] Eid RE, Rao DA, Zhou J, et al. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells[J]. *Circulation*, 2009, 119(10):1424-1432.
- [6] Guo M, Mao X, Ji Q, et al. Inhibition of IFN regulatory factor-1 down-regulate Th1 cell function in patients with acute coronary syndrome[J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(2):241-252.
- [7] Hao XR, Cao DL, Hu YW, et al. IFN-gamma down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXRalpha in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 203(2):417-428.
- [8] Nareika A, Sundararaj KP, Im YB, et al. High glucose and interferon gamma synergistically stimulate MMP-1 expression in U937 macrophages by increasing transcription factor STAT1 activity[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(2):363-371.
- [9] Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, et al. Serum level of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes[J]. *Circulation*, 2003, 107(16):2109-2114.
- [10] Butcher M, Galkina E. Current views on the functions of interleukin-17A-producing cells in atherosclerosis[J]. *Thromb Haemost*, 2011, 106(5):787-795.
- [11] Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages[J]. *J Immunol*, 1998, 160(7):3513-3521.
- [12] Numasaki M, Takahashi H, Tomioka Y, et al. Regulatory roles of IL-17 and IL-17F in G-CSF production by lung microvascular endothelial cells stimulated with IL-1beta and/or TNF-alpha[J]. *Immunol Lett*, 2004, 95(1):97-104.
- [13] Numasaki M, Tomioka Y, Takahashi H, et al. IL-17 and IL-17F modulate GM-CSF production by lung microvascular endothelial cells stimulated with IL-1beta and/or TNF-alpha[J]. *Immunol Lett*, 2004, 95(2):175-184.
- [14] Miljkovic Dj, Cvetkovic I, Vuckovic O, et al. The role of interleukin-17 in inducible nitric oxide synthase-mediated nitric oxide production in endothelial cells[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(3):518-525.
- [15] Liao YH, Xia N, Zhou SF, et al. Interleukin-17a contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(4):420-429.
- [16] 农少云, 梁娟英. 冠心病患者血脂和总胆汁酸测定结果及临床意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(19):2414-2415.
- [17] 郑红云, 李艳, 岳永奇, 等. 脂蛋白、载脂蛋白与超敏 C 反应蛋白联合检测在冠心病诊断中的意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(15):1884-1886.

(收稿日期:2012-12-06)

(上接第 535 页)

寒杆菌 LAMP 检测方法的最低检测限为 1×10^1 CFU/mL 左右,说明伤寒杆菌 LAMP 检测方法灵敏度较高。结果表明,本试验设计的伤寒杆菌 LAMP 检测方法具有良好的特异性和较高的灵敏度,而且操作简便、快速,有望用于伤寒杆菌的临床现场检验。

参考文献

- [1] 黄剑芳. 浅谈伤寒杆菌不同检查方法的比较[J]. *中外医疗*, 2011, 30(12):112-112.
- [2] 滕小春. 伤寒检测方法探讨及结果分析[J]. *检验医学与临床*, 2011, 08(9):1130-1131.
- [3] 黄永亮. 伤寒杆菌实验室诊断研究进展[J]. *实用医技杂志*, 2007, 14(17):2400-2402.
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12):E63.
- [5] Yano A, Ishimaru R, Hujikata R. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification[J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 68(2):414-420.
- [6] Xiao B, Zhu YH, Zou QM. A simple and sensitive technique-Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)[J]. *Chin J Lab Med*, 2005, 28(6):761-763.
- [7] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. *Mol Cell Life Sci*, 2002, 16(3):223-229.
- [8] Endo S, Komori T, Ricci G, et al. Detection of gp43 of paracoccidiosis by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 234(1):93-97.
- [9] Njiru ZK, Mikosza AS, Matovu E, et al. African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA[J]. *Int J Parasitol*, 2008, 38(5):589-599.
- [10] Kono T, Savan R, Sakai M, et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification[J]. *J Virol Methods*, 2004, 115(1):59-65.
- [11] Song T, Toma C, Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 243(1):259-263.
- [12] Kawasaki ST, Kawamoto S. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances[J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2007, 70(3):499-501.
- [13] Poon LL, Wong BW, Ma EH, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Clin Chem*, 2006, 52(2):303-306.
- [14] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2004, 59(2):145-157.

(收稿日期:2012-11-02)