

• 综 述 •

流式细胞术在冠心病患者诊疗中的作用研究进展

顾 进 综述, 顾芸芸, 仲崇明 审核

(连云港市中医院检验科, 江苏连云港 222004)

关键词: 流式细胞术; 冠心病; 诊疗

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.09.036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)09-1241-03

冠心病是危害人类健康与生命的心血管疾病,其基本病理变化是冠状动脉血管发生动脉粥样硬化病变而引起血管腔狭窄或阻塞,造成心肌缺血、缺氧或坏死。世界卫生组织将冠心病分为 5 大类:无症状心肌缺血(隐匿性冠心病)、心绞痛、心肌梗死、缺血性心力衰竭(缺血性心脏病)和猝死 5 种。临床上又常分为稳定性冠心病和急性冠状动脉综合征。流式细胞术(FCM)是一种通过荧光染料标记对单细胞或其他生物粒子进行定量分析和分选的检测手段。它综合了光学、电子学、流体力学、免疫学、细胞化学、计算机等多门学科为一体,是当代最先进的细胞分析技术。其特点是测量速度快,可进行多参数测量且既是细胞分析技术,又是精确的分选技术。由于冠心病的动脉粥样硬化的斑块是处于动态变化的过程,所以医学影像学的静态局部检测往往具有局限性,这使得非侵入性的血液学检测其相关标记物来预测动脉粥样硬化斑块的动态成为一种能够弥补影像学局限性的方法。而且近年来,随着 FCM 的发展和普及,血液学检测相关标记物变得越来越简单易行。本文对近些年使用 FCM 在冠心病患者中的使用进行综述。

1 淋巴细胞分析与冠心病的关系

炎症和免疫反应在动脉粥样硬化的发生、发展中起着重要的作用,因此与冠心病有着密切的联系。冠心病的炎症可能不仅仅局限于血管壁,而且包括全身免疫系统的反应^[1]。T 淋巴细胞亚群是公认的机体免疫反应的敏感指标,所以 T 淋巴细胞亚群与冠心病的关系也非常密切。汤涌等^[2]采用 FCM 测定 T 淋巴细胞亚群(CD4、CD8、CD4/CD8)发现,T 细胞亚群中 CD4 细胞数量在早发冠心病中明显异常,CD4/CD8 异常代表的免疫功能紊乱在早发冠心病中起着重要的作用。聂大奥等^[3]研究的结果也显示冠心病患者 CD3⁺细胞占淋巴细胞比例明显高于正常非冠心病患者人群;不稳定型心绞痛组以及急性心肌梗死组 CD4⁺及 CD8⁺细胞占 CD3⁺细胞比例明显异常于稳定型心绞痛患者;通过外周血 T 细胞与 Gensini 评分表明机体免疫功能紊乱可能参与急性心肌梗死的发生,间接或直接引起梗死面积扩大或并发症的发生。另外研究发现^[4-5],CD4⁺CD28⁻T 细胞在稳定性斑块中不存在,仅存在于不稳定性斑块,提示 CD4⁺CD28⁻T 细胞与斑块破裂有直接的关系,其原因可能是由于动脉粥样斑块中的大部分 T 细胞包括 CD4⁺CD28⁻T 细胞分泌 γ -IFN,促进巨噬细胞分化为泡沫细胞及其他抗原提呈细胞可引起斑块破裂。有学者认为^[6-7],CD4⁺CD25⁺Treg 是一个具有独特免疫调节功能的 T 细胞亚群,人体主要通过 CD4⁺CD25⁺Treg 以免疫负向调节的方式来抑制自身反应性 T 细胞的作用,减少免疫性疾病的发生,从而维持

机体内环境的稳定,维持免疫耐受,而在冠心病中其比例降低导致机体免疫功能紊乱,从而参与冠心病的发生、发展。

T 细胞表面 CD31 是血管内皮细胞(EPC)集落形成和构成中央集群必不可少的分子,而 EPC 是冠状动脉疾病(CAD)的一个重要标志,若 EPC 减少会造成心血管疾病的风险增加^[8],因此,EPC 被认为是预测冠状疾病的生物学标记。尽管 CD31 分子在 CAD 中的临床意义仍不清楚,但是 Flego 等^[9]发现在急性冠脉综合征患者体内,若 T 细胞表面 CD31 分子的抑制活性丧失后,体内会出现一种免疫球蛋白样的黏附分子,从而导致实验模型产生动脉粥样硬化样的改变,因此 Flego 等^[9]通过流式检测急性冠脉综合征患者体内 T 细胞表面 CD31 的表达以及其在 TCR 信号传导中的作用,发现在患者体内总的 CD4⁺T 细胞和 CD4⁺CD28null T 细胞表面的 CD31 表达均降低,且相比稳定性心绞痛患者,急性冠脉综合征患者体内 CD31 对 TCR 信号传导的免疫调节效果更差。该结果提示 CD31 可以作为一个新颖的靶分子来治疗急性冠脉综合征患者 T 细胞异常。因此,Kakizaki 等^[10]针对这种问题提出增加急性冠脉综合征患者体内的 CD3⁺/CD31⁺T 细胞。

T 淋巴细胞上有 3 个丝裂原激活的蛋白激酶/MAP 激酶(MAPK)信号通路,他们是 ERK1/2、JNK 和 p38。研究者通过评估这个通路的活性^[11],采用 FCM 检测磷酸化后的 ERK1/2、JNK 和 p38,他们发现稳定性心绞痛患者磷酸化的 JNK 与对照组相比,没有明显的改变;而 ERK1/2 明显增高。非 ST 段抬高型心绞痛和 ST 段抬高型心绞痛的患者磷酸化的 ERK1/2、JNK 均明显增高。除了稳定型冠状动脉疾病(CAD)患者,所有的急性冠脉综合征患者(ACS)的 p38 都增高了。这些结果可以作为诊断不稳定性心绞痛的特异性生物学标记。

有学者在患有冠状动脉疾病患者的外周血中可以检测到 OxLDL 和 HSP-60 抗原特异性 CD8⁺T 淋巴细胞^[12],OxLDL 和 HSP-60 抗原通过刺激斑块内的淋巴细胞从而成为冠心病的发病原因。作者用 p/MHC 五聚体复合物染色经过 FCM 检测,结果在健康人体内 OxLDL 和 HSP-60 抗原特异性 T 细胞不能被检测到,而在稳定型和不稳定型心绞痛患者的外周血中这两种抗原的特异性 T 细胞能够被检测到。这个发现使得人们认识到 OxLDL 和 HSP-60 抗原特异性 CD8⁺T 细胞在动脉粥样硬化冠状动脉疾病中也起到一定的作用。

2 单核细胞分析与冠心病的关系

研究发现冠心病患者 CD14⁺⁺CD16⁺单核细胞以及总的 CD16⁺的单核细胞水平显著增高,且总的 CD16⁺的单核细胞水平与冠状动脉粥样硬化斑块的不稳定性有关^[13]。Tallone

等^[14]发现冠心病患者体内 CD14⁺CD16⁺⁺ 单核细胞增高了 90%, 且鉴于 Tallone 等^[14]的研究结果, 杨国红等^[15]建立基于四色的 FCM 检测外周血单核细胞亚群及各亚群单核细胞—血小板聚集体(MPA)的方法, 并观察冠心病患者外周血单核细胞亚群及各亚群 MPA 的变化特点。他们采集冠心病患者的外周静脉血依据单核细胞和血小板的标志性分子 CD86、CD14、CD16 和 CD41 对单核细胞亚群和 MPA 进行四色的流 FCM 分析并利用 Flow-countTM 荧光微球对单核细胞亚群及各亚群所形成的 MPA 进行绝对计数, 该方法重复性好, 结果可靠。结果发现冠心病患者外周血 CD14⁺⁺CD16⁺ 和 CD14⁺CD16⁺⁺ 所占百分比和绝对计数均显著高于对照组, 冠心病患者总 MPA 以及 CD14⁺⁺CD16⁺ 相关的 MPA 所占百分比和绝对计数也显著增高, 结果提示中间型单核细胞及其形成的 MPA 可能是临床上冠心病患者的一个潜在的诊断和治疗靶点。

秦光明等^[16]利用 FCM 对冠心病患者进行单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的测定, 结果发现 MCP-1 有上升, 但是灵敏度不高, 尚不如 IL-6 等细胞因子, 还不能作为冠心病严重程度的估计和预测。但张录站等^[17]研究认为早发冠心病患者 MCP-1 水平明显增高, 是斑块不稳定的标志之一。而王锋剑等^[18]研究认为急性冠状动脉综合征患者 TLR4 和 MCP-1 水平呈正相关, 推测 MCP-1 可能与动脉硬化相关。目前关于 MCP-1 与冠心病的研究较少, 结论也不太一致, 需要更多的研究来明确其在冠心病中的应用价值。

另外, 由于 Toll 样受体分布广泛, 主要表达于单核细胞表面, 属模式识别受体, TLRs 最突出的生物学功能是促进细胞因子的合成与释放, 引发炎症反应。研究认为 TLR4 与心血管疾病关系最为密切^[19]。通过对人及小鼠模型的动脉粥样硬化组织切片进行免疫组化分析, 发现 TLR4 在粥样斑块组织表达, 尤其在巨噬细胞浸润、脂质丰富的部位明显表达。当损伤和硬化的动脉处存在有内源性配体如低度修饰的低密度脂蛋白(mLDL)时, TLRs 通路即被活化, 启动胞内信号转导, 最终激活核因子 κ B(NF- κ B), 参与动脉粥样硬化的发生、发展。免疫炎症反应不仅是动脉粥样硬化的触发因素, 而且是造成斑块不稳定的重要因素之一。赵顺锋^[20]采用 FCM 检测外周血单核细胞 TLR4 表达, 结果发现冠心病患者 TLR4 表达上调, 提示 TLR4 及其介导的炎症反应与冠心病的发生、发展有关。

清道夫受体参与血管炎疾病的发生和发展过程已经被证实, 但其机制尚不明确。Piechota 等^[21]研究清道夫受体 CD36 和 MSR1 在冠心病患者出现症状后以及治疗第六个月后的表达情况, 通过 FCM 和定量 PCR 检测发现所有有症状的急性冠脉综合征患者体内单核细胞上的 CD36 和 MSR1 mRNA 的数量及其密度都显著增高。经过 6 个月的阿托伐他汀治疗后, CD36 和 MSR1 的表达水平有了明显的下降。该研究表明清道夫受体也参与了 ACS 的发生、发展。

3 血小板功能分析与冠心病的关系

在冠状动脉粥样硬化、斑块破裂乃至血栓生成过程中, 血小板活化和血小板聚集起了举足轻重的作用^[22]。其原因是在正常血液循环中, 大量血小板几乎均处在休眠状态, 当受生理或病理刺激时, 血小板发生活化, 在相当一部分血小板膜上表达出一种或多种活化血小板分子标志代表物。

血小板 CD62P(P 选择素)是一种细胞黏附分子, 存在于内

皮细胞的 Weibel-Palade 小体和血小板的 α 颗粒中, 是血小板活化的一个特征性指标, 在炎症反应和血栓形成中起着中心调控作用, 当血小板被活化时, CD62P 迅速从胞内翻转至细胞表面, 表达明显升高^[23], 所以是血小板活化的重要标志。CD41 是血小板质膜表面变化的 GP II b/III a 糖蛋白表位, 在血小板活化时才因构象变化而暴露出来, 是血小板活化早期的标志物。由于在生理和病理情况下, 血小板群和红细胞群的大小、颗粒度会有交叉。因此, 采用 CD41/CD62 双染色计算血小板 CD62 表达阳性率, 能准确地区分血小板群, 从而更敏感而精确地检测血小板的活化状况^[24]。任澎等^[25]选择 40 例冠状动脉综合征患者采用 FCM 测定其应用阿司匹林及氯吡格雷抗血小板治疗前后血小板膜糖蛋白 GP II b/III a 和 P 选择素(CD62P)水平的变化, 并与正常组进行比较。检测结果显示发现 ACS 患者联合抗血小板治疗前后血小板 GP II b/III a 和 CD62P 的表达均明显高于对照组, 表明 AMI 患者有明显的血小板活化, 提示 ACS 患者体内血小板的黏附、聚集、释放反应均增高。同时血小板 GP II b/III a 和 CD62P 的表达是很好的血小板聚集功能的检测指标, 在药物治疗的过程中需要连续监测。

龚晓璇等^[26]首次在国内建立了用 FCM 测定血小板 COX-1、COX-2 表达的方法, 采用 FCM 检测时, 因 PE-CD42b 抗体能特异性识别血小板膜糖蛋白, 故在 FITC-COX-1、FITC-COX-2 抗体与 COX-1、COX-2 结合的基础上, 再用 PE-CD42b 标记识别血小板, 避免了源于血样中的其他成份如白细胞等外源性 COX-1、COX-2 的干扰。因此, 使用 FCM 检测血小板 COX-1、COX-2 较 Western blot 等方法具有更高的特异性, 可以提升在冠心病中的诊断价值。

4 细胞因子检测与冠心病的关系

血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)为细胞表面单链糖蛋白, 分布于内皮细胞、白细胞、单核细胞、成纤维细胞、巨噬细胞表面, sVCAM-1 是 VCAM-1 的可溶性形式。VCAM-1 主要是介导细胞间、细胞与细胞外基质黏附, 参与多细胞生物体各种生理、病理过程。在冠状动脉粥样硬化炎症过程发生发展的各个阶段都扮演着重要的角色^[27]。血管内皮细胞生长因子(VEGF)是迄今发现的具有特异性促进血管内皮细胞有丝分裂的生长因子, 在促进血管生成、再生和抗动脉硬化及治疗中发挥着重要的作用。

马爱玲等^[28]研究急性冠状动脉综合征患者与稳定性冠心病患者和健康人比较, 急性冠状动脉综合征患者的 VCAM-1 和 VEGF 水平显著高于稳定性冠心病患者和健康人。胡萍^[29]研究认为冠心病患者血清中 VCAM-1 和 VEGF 的水平显著高于健康人群, 同时 3 支病变患者 VCAM-1 和 VEGF 水平高于单支和双支病变组, 因此黏附分子水平可以判断冠脉病变数目和病变程度。郑金鼎等^[30]研究认为 VCAM-1 和 VEGF 在冠心病的发生发展中起一定的作用, 对冠心病的诊断和分层有一定的临床价值, 同时用流式细胞技术是可以准确方便地进行定量检测。因此, 利用 FCM 检测 VCAM-1 和 VEGF 对冠心病患者的临床诊疗有着非常好的作用和价值。

5 展 望

冠心病实际是炎症介导和免疫反应的过程, 斑块内活化的内皮细胞、单核巨噬细胞、T 淋巴细胞及平滑肌细胞都能通过旁分泌和自分泌作用产生各种活性物质如细胞因子、黏附分

子、蛋白水解酶等一系列炎症免疫反应物质,促进平滑肌减少和细胞外基质降解,导致斑块不稳定破裂和血栓形成。因为这是一个动态的过程,所以用影像学静态局部检测往往具有很大的局限性。而可以通过 FCM 检测不同时间段的相关生物学标记物,能够尽早的预测观测动脉粥样斑块的变化程度,为防止斑块破裂提供预防和诊断的线索。同时通过 FCM 检测冠心病患者体内的生物学标志物,临床上可以用来评估药物的疗效。因此,目前 FCM 在冠心病检测方面已经得到了广泛的应用,其准确性不但可以评估冠心病的轻重程度,还可以成为药物治疗疗效的指标之一。

FCM 发展迅速,具有自身特点及其应用优势,目前多方面应用于冠心病的研究,在该病的病情评估,指导临床治疗、疗效观察及探索发病机制等方面有一定的作用及地位。随着 FCM 技术的不断发展,未来在冠心病的研究中将会发挥更重要的作用,为该病的检测和综合防治提供新的方向。

参考文献

- [1] Baidya SG, Zeng QT. Helper T cells and atherosclerosis: the cytokine web[J]. Postgrad Med J, 2005, 81(962): 746-752.
- [2] 汤涌, 陆治平, 黄进. 早发冠心病患者淋巴细胞亚群分析[J]. 四川医学, 2010, 31(7): 984-985.
- [3] 聂大奥, 赵一俏, 靳文, 等. 外周血 T 细胞亚群构成比例与冠状动脉粥样硬化的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(6): 532-536.
- [4] 冯静, 费瑜, 孟晓萍, 等. CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞与动脉粥样硬化相关性研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(8): 707-710.
- [5] Shi B, Du X, Wang Q, et al. Increased PD-1 on CD4⁺ CD28⁻ T cell and soluble PD-1 ligand-1 in patients with T2DM: association with atherosclerotic macrovascular diseases[J]. Metabolism, 2013, 62(1): 778-785.
- [6] 殷令妮, 蔡文玮. CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞与冠状动脉粥样硬化病变的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(19): 3748-3750.
- [7] 徐林杰, 吴继雄, 许邦龙, 等. 急性冠脉综合征患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} 调节性 T 细胞的变化及意义[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(5): 637-640.
- [8] Wang CH, Hsieh IC, Cherng WJ, et al. Differentiation profile of peripheral blood-derived vascular progenitor cell predicts intimal hyperplasia after coronary stenting[J]. Heart Vessels, 2012, 27(1): 10-19.
- [9] Flego D, Severino A, Trotta F, et al. Altered CD31 expression and activity in helper T cells of acute coronary syndrome patients[J]. Basic Res Cardiol, 2014, 109(6): 448.
- [10] Kakizaki M, Nobori K, Watanabe H, et al. Increased circulating CD3⁺/CD31⁺ T cells in patients with acute coronary syndrome[J]. Heart Vessels, 2013, 28(5): 566-569.
- [11] Indolfi C, Gasparri C, Vicinanza C, et al. Mitogen-activated protein kinases activation in T lymphocytes of patients with acute coronary syndromes[J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(4): 667-679.
- [12] Ghio M, Fabbi P, Contini P, et al. OxLDL- and HSP-60 antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes are detectable in the peripheral blood of patients suffering from coronary artery disease[J]. Clin Exp Med, 2013, 13(4): 251-255.
- [13] Hristov M, Weber C. Differential role of monocyte subsets in ath-

erosclerosis[J]. Thromb Haemost, 2011, 106(5): 757-762.

- [14] Tallone T, Turconi G, Soldati G, et al. Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2011, 4(2): 211-219.
- [15] 杨国红, 卢芮伊, 孙海英, 等. 四色流式分析冠心病患者外周血单核细胞亚群及单核细胞-血小板聚集体的变化[J]. 临床心血管病杂志, 2013, 29(1): 29-33.
- [16] 秦光明, 金亚平, 王俊宏, 等. 流式细胞术检测冠心病患者七种循环标志物的应用研究[J]. 中华检验杂志, 2006, 29(7): 615-617.
- [17] 张录站, 陈忠, 马根山. 早发冠心病患者血浆 MCP-1 水平检测及其临床意义[J]. 现代医学, 2008, 36(3): 170-173.
- [18] 王锋剑, 李保, 王馨. Toll 样受体 4 和单核细胞趋化蛋白 1 与急性冠状动脉综合征的相关性研究[J]. 中国心血管杂志, 2013, 18(2): 89-92.
- [19] Ishikawa Y, Satoh M, Itoh T, et al. Local expression of Toll-like receptor 4 at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction[J]. Clin Sci(Lond), 2008, 115(4): 129-131.
- [20] 赵顺锋. 冠心病患者外周单核细胞 TLR4 表达及其与血浆 P 选择素的相关性[J]. 临床输血与检验, 2010, 12(4): 328-330.
- [21] Piechota M, Banaszewska A, Dudziak J, et al. Highly upregulated expression of CD36 and MSR1 in circulating monocytes of patients with acute coronary syndromes[J]. Protein J, 2012, 31(6): 511-518.
- [22] Gianetti J, Parrim S, Sbrana S, et al. Platelet activation predicts recurrent ischemic events after percutaneous coronary angioplasty: a 6 months prospective study[J]. Thromb Res, 2006, 118(4): 487-493.
- [23] 蔡裕福, 李平, 李存仁, 等. 冠心病患者不同治疗阶段 GP II b/III a、CD62P 状态的变化及临床价值[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8(24): 4366-4369.
- [24] 莫文宏, 杨帆, 王红, 等. 冠心病患者血小板 CD41+CD62+ 与胱抑素 C 的相关性研究[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(20): 3369-3371.
- [25] 任澎, 张冰, 马丽, 等. 急性冠状动脉综合征患者血小板膜糖蛋白 II b/III a 和 P 选择素水平的变化[J]. 中国心血管杂志, 2014, 19(3): 176-179.
- [26] 龚晓璇, 张锦英, 张秋, 等. 血小板环氧化酶及 P-选择素的检测及其在冠心病患者中的表达[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2012, 32(7): 948-951.
- [27] Kaptoge S, Seshasai SR, Gao P, et al. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis[J]. Eur Heart J, 2011, 35(9): 578-589.
- [28] 马爱玲, 邵宁, 伊善喜, 等. 急性冠状动脉综合征患者血清 ICAM-1、VCAM-1 及 CD40L 水平及葛根素对其的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2014, 30(6): 492-494.
- [29] 胡萍. 冠心病患者血清黏附分子含量检测及对病变严重程度的判断价值[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(7): 891-894.
- [30] 郑金鼎, 令颖狐, 黄山, 等. P-selectin、VCAM-1 和 VEGF 三种细胞因子标志物联合检测对冠心病的诊断价值探讨[J]. 贵州医药, 2011, 35(1): 8-10.

(收稿日期: 2016-01-18)