

冠心病患者血小板对人脐静脉内皮细胞黏附因子表达的影响

李桂华, 史坚, 齐蕊, 朱宁, 李忠艳

(大连医科大学附属第二医院心脏内科, 辽宁省大连市 116027)

[关键词] CD54; CD106; 冠心病; 内皮细胞

[摘要] 目的 探讨冠心病患者血小板与人脐静脉内皮细胞相互作用后内皮细胞表面 CD54、CD106 的表达水平。方法 选择急性冠状动脉综合征患者 43 例、稳定型心绞痛患者 21 例及对照组 33 例, 采用流式细胞术分别检测血小板与内皮细胞相互作用后内皮细胞表面 CD54、CD106 的表达水平。结果 急性冠状动脉综合征组内皮细胞表面 CD54 的表达水平较对照组显著升高($P < 0.01$), 较稳定型心绞痛组也升高($P < 0.05$); 稳定型心绞痛组和对照组比较, CD54 表达水平无显著性差异($P > 0.05$)。CD54 与心肌标志物肌钙蛋白 T 和肌酸激酶同工酶呈显著正相关($P < 0.01$)。CD106 的表达水平在各组中均未见明显差异($P > 0.05$)。结论 与急性冠状动脉综合征患者血小板相互作用后, 人脐静脉内皮细胞表面 CD54 的表达水平显著提高, 并且与心肌坏死标志物水平呈正相关, 提示 CD54 可能是预示急性冠状动脉综合征及其严重程度的重要指标。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

Expression of Adherence Factors on the Surface of Endothelial Cells after Interaction with Platelets from the Patients with Coronary Heart Disease

LI Gui-Hua, SHI Jian, QI Rui, ZHU Ning, and LI Zhong-Yan

(Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116027, China)

[KEY WORDS] CD54; CD106; Coronary Heart Disease; Endothelial Cell

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expressions of CD54, CD106 on the surface of endothelial cells after interaction with platelets from the patients with coronary heart disease (CHD). **Methods** To draw blood from acute coronary syndrome patients (acute coronary syndrome group), patients with stable angina (stable angina group) and healthy people (control group), the platelets were extracted and interacted with endothelial cells. Then the expression of CD54, CD106 on the surface of endothelial cells were tested. **Results** The expression level of CD54 on the surface of endothelial cells in acute coronary syndrome group were obviously higher than in control group ($P < 0.01$), and higher than in stable angina group ($P < 0.05$); but no difference was found in CD54 between control group and stable angina group. The expression level of CD54 was significantly and positively related with the markers of myocardial necrosis such as initial troponin I and initial creatine kinase-MB (CK-MB). There were no obvious differences of the expression level of CD106 among each group ($P > 0.05$). **Conclusions** After interaction of endothelial cells with platelets, the expression level of CD54 on the surface of endothelial cells from the patients with acute coronary syndrome was obviously increased, and was associated with the markers of myocardial necrosis. We can infer that CD54 is a very important index which can be used to predict the occurrence and severity of CHD.

CD54 又称细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 是炎症家族里重要的黏附受体, 属于免疫球蛋白超家族, 分子量为 55 kDa, 以二聚体形式表达于内皮细胞表面。CD54 在炎症

发生时白细胞与内皮细胞的黏附及伴随的炎症反应中起重要作用, 其介导的白细胞黏附增加还可促进原有斑块的不稳定性, 增加心血管危险事件的发生^[1,2]。CD106 又称血管细胞黏附因子 1 (vascular

[收稿日期] 2013-05-21

[基金项目] 大连市科技局科技计划项目(2008J22JH016)

[作者简介] 李桂华, 硕士, 主治医师, 研究方向为高血压和冠心病的基础及临床, E-mail 为 15842669396@163.com。通讯作者李忠艳, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为高血压和冠心病的基础及临床, E-mail 为 LZYheart@aliyun.com。史坚, 硕士, 住院医师, 研究方向为冠心病的基础和临床, E-mail 为 shijian006@126.com。

cell adhesion molecule-1, VCAM-1), 亦属于免疫球蛋白超家族, VCAM-1 仅在活化的血管内皮上表达, 并受白细胞介素等多种细胞因子的激发。CD106 在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 早期内皮细胞受损后表达增加, 介导炎性细胞在损伤部位聚集, 促进炎性过程, 进而形成恶性循环; 其免疫过程在 As 发生发展中起了极其重要的作用^[3,4]。近年研究显示炎症反应在冠心病的发展中起了重要的作用。其中, 血小板不仅具有促进血栓形成的作用, 而且是炎症和 As 的重要联系体^[5]。被激活后的血小板通过表达和释放炎症因子机制, 促进内皮细胞活化及变性, 形成 As^[6]。本研究对急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS) 患者血小板与人脐静脉内皮细胞孵育后内皮细胞上 CD54、CD106 的表达水平进行检测, 并将其与心肌标志物肌钙蛋白 T(troponin T, TnT) 和肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB, CK-MB) 作相关分析。

1 对象和方法

1.1 研究对象

住院患者 97 例, 均为胸痛待查患者, 1 年内均未服用任何抗血小板药物, 根据患者临床症状、生物化学检查、心电图及冠状动脉造影检查结果, 将患者分为 3 组: ①急性冠状动脉综合征组: 43 例, 包括不稳定型心绞痛(unstable angina, UA) 亚组和急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI) 亚组; ②稳定型心绞痛组: 21 例, 为住院患者中既往曾明确诊断为冠心病心绞痛, 近期心绞痛发作的性质在 1~3 个月内无改变; ③对照组: 33 例, 为住院患者中满足条件的非冠心病病人, 及不明原因或不典型心前区疼痛, 其既往史及体检、心电图、胸片、心脏超声及肝肾功能、血糖等生物化学指标经检测分析, 并经冠状动脉 CT 血管成像(computed tomography angiography, CTA) 或冠状动脉造影确诊无冠心病。采集所有入选对象的有关临床资料, 剔除有急、慢性病毒或细菌感染史、有免疫系统异常或肿瘤病史的患者。

1.2 血小板悬液制备

所有患者入院后立即采肘静脉血 5 mL, 枸橼酸抗凝, 室温下以 600 g 离心力离心 20 min, 将上清液移至抗凝管中, 加入等体积 2% 甲醛混匀, 固定, 加入大约 2.5 倍体积洗液, 1 500 g 离心力离心 10 min, 移去上清, 用适量台氏液悬浮, 制成血小板悬液

(浓度约 $2 \times 10^{11}/L$)。

1.3 与血小板相互作用后内皮细胞表面黏附因子表达水平检测

24 孔板内植入密度为 $2 \times 10^9/L$ 的人脐静脉内皮细胞悬液, 每孔 1 mL。细胞贴壁后, 取富含血小板悬液 100 μL (2×10^7 个血小板) 加入 24 孔板中与内皮细胞相互作用, 孵育 1 h 后吸弃培养液, 每孔加入 PBS 1 mL, 摇床上震荡 5 min, 轻洗去血小板, 加入 1 mL 培养液孵育过夜, 分别与荧光标记的单克隆抗体 CD54-FITC (Biozol, Germany)、CD106-PE (Biozol, Germany) 室温下避光孵育 20 min, 洗去多余抗体, 制备单细胞悬液, 4℃ 下 24 h 内应用库尔特公司 EPICS XL 型流式细胞仪检测内皮细胞表面 CD54、CD106 的表达水平。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计分析, 计数资料以率表示, 采用 χ^2 检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 Mann-Whitney U 检验, 以 Pearson 相关方程计算变量间关系。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基线特征

各组间年龄、男女比例没有显著差异; 在 3 组患者中主要危险因素也没有明显差异(表 1)。

表 1. 一般临床资料

Table 1. General clinical data

指 标	对照组 (n = 33)	稳定型心绞痛组(n = 21)	急性冠状动脉综合征组(n = 43)
年龄(岁)	60.8 ± 11.9	64.2 ± 9.1	61.9 ± 11.0
女性(例)	14(42.4%)	7(33.3%)	16(37.2%)
血小板($10^9/L$)	198.5 ± 44.5	178.7 ± 44.4	223.0 ± 58.7
体质指数(kg/m ²)	25.2 ± 3.5	26.3 ± 3.4	26.4 ± 3.9
吸烟(例)	9(27.3%)	9(42.9%)	22(51.2%)
高血压(例)	24(72.7%)	14(66.7%)	24(55.8%)
高脂血症(例)	20(60.6%)	9(42.9%)	23(53.5%)
糖尿病(例)	5(15.2%)	4(19.0%)	7(16.3%)

2.2 各组心肌标志物比较

急性冠状动脉综合征组心肌标志物 TnT 和 CK-MB 较对照组和稳定型心绞痛组明显升高(P < 0.01; 表 2)。

表 2. 各组心肌标志物比较

Table 2. Comparison of cardiac markers

指 标	对照组($n=33$)	稳定型心绞痛组($n=21$)	急性冠状动脉综合征组($n=43$)
TnT($\mu\text{g/L}$)	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	7.2 ± 20.3^{ab}
CK-MB($\mu\text{g/L}$)	2.2 ± 4.1	1.7 ± 3.2	52.8 ± 170.1^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与稳定型心绞痛组比较。

2.3 内皮细胞表面 CD54、CD106 的表达水平

急性冠状动脉综合征组 CD54 水平较对照组显著升高($P < 0.01$), 与稳定型心绞痛组相比也存在差异性($P < 0.05$); 而稳定型心绞痛组与对照组比较, 其 CD54 表达水平无显著性差异($P > 0.05$)。CD106 在急性冠状动脉综合征组、稳定型心绞痛组及对照组间均未见明显差异($P > 0.05$; 表 3)。

表 3. 内皮细胞表面 CD54、CD106 的表达水平

Table 3. Expression levels of CD54 and CD106 on the surface of endothelial cells

指 标	对照组($n=33$)	稳定型心绞痛组($n=21$)	急性冠状动脉综合征组($n=43$)
CD54	$60.9\% \pm 20.7\%$	$66.3\% \pm 30.5\%$	$82.8\% \pm 17.3\%^{ab}$
CD106	$1.0\% \pm 1.0\%$	$1.3\% \pm 0.9\%$	$1.5\% \pm 1.5\%$

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与稳定型心绞痛组比较。

2.4 相关性分析

与血小板相互作用后内皮细胞表面 CD54 与 CD106 的表达无相关关系($r = 0.028$, $P > 0.05$), 但 CD54 与心肌标志物肌钙蛋白 T 和 CK-MB 的表达均呈正相关(r 分别为 0.327 和 0.262, $P < 0.05$)。

3 讨 论

冠心病又称冠状动脉粥样硬化性心脏病, 其中, 不稳定斑块破裂导致的血小板聚集、血栓形成可导致 ACS。较多研究^[7-9]证实动脉粥样硬化斑块的形成及不稳定性与炎症反应有关, 而内皮细胞在此炎症反应中发挥重要作用。有学者证实, 缺血性心脏病患者血清内 ICAM-1 及 VCAM-1 的表达水平较正常人显著增高, 并与患者的心功能分级呈正相关^[10]; 但具体机制尚无研究。已有研究证实高糖刺激下的人脐静脉内皮细胞核因子 κB p65 (nuclear factor-kappa B p65, NF- κB p65)、ICAM-1 和 VCAM-1 的表达均显著升高^[11]。本实验选取冠心病患者, 首次从细胞水平检测 ICAM-1 及 VCAM-1 的表达水

平, 进一步揭示血小板与内皮细胞作用的机制。

CD54 属于细胞表面黏附因子, 在病变早期, 可能通过 NF- κB 系统促进早期炎症反应, 并且受 Egfl7 调控^[12]。有研究证实^[13], ICAM-1 的表达水平在血小板增多症及血小板减少症中明显增高, 可推断 ICAM-1 的表达受血小板数量的影响。本实验提取同等数量血小板, 避免产生该干扰。诸多国外学者在临床实验中已证实, 血液及内皮细胞表面 CD54 的表达水平在不同严重程度的冠心病患者中具有显著性差异, 但血小板的活化对内皮细胞的影响尚未证实。本研究显示, ACS 患者的血小板与内皮细胞相互作用后 CD54 的表达较另两组存在明显差异, 且 CD54 与心肌标志物肌钙蛋白 T 和 CK-MB 的表达均呈正相关, 故提示 ACS 患者的血小板活化可能与内皮细胞活化后表达 CD54 增加有关, 并且 CD54 的升高与 ACS 的严重程度相关。

CD106 属于血管细胞黏附因子, 在病变早期主要促使单核细胞向内皮黏附、迁移, 在进展期则促进已迁入病灶的单核细胞滚动和淋巴细胞激活, 并增加其他细胞与细胞间的相互作用^[14]。本研究显示, CD106 在各组的表达未见明显差异, 提示急性冠状动脉综合征患者的血小板活化与 CD106 的相关性小。这可能与其它实验使用血液样本检测可溶性 CD106 而本实验使用内皮细胞直接检测 CD106 有关或与本实验例数较小有关。

ICAM-1 持续存在于内皮细胞, 在促炎症因子的刺激下表达增加。而 VCAM-1 仅在活化的血管内皮上表达。可溶性黏附分子是白细胞、内皮细胞或其他细胞表面的黏附分子脱落下来进入血液的循环形式。急性 ACS 患者的主动脉内皮本身就有损伤, 故检测血清 ICAM-1 及 VCAM-1 均升高。而本研究采用的是正常人脐静脉内皮细胞。故推测 ACS 患者的血小板活化与 CD54 的相关性强。这需要在此研究的基础上, 同时检测血清 ICAM-1 及 VCAM-1 予以证实。

目前, 血小板、炎症因子及内皮细胞间相互作用与冠心病的关系受到广泛关注, 血小板表面胶原受体、血小板活性及血小板与内皮细胞的相互作用将会成为众多学者关注的新焦点。本实验于细胞水平证实冠心病严重程度与血小板与内皮细胞的相互作用有关, 利用这一机制可研制出针对黏附分子作用的各种制剂, 如抗黏附分子的单克隆抗体, 也可更进一步深入从基因水平探讨其发生机制, 或许能为寻找冠心病更有效的早期诊断、治疗方法提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells [J]. *Pharmacological Reports*, 2009, 61(1): 22-32.
- [2] Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhalawon B, et al. Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration [J]. *Circulation Research*, 2011, 108(3): 335-343.
- [3] Lu HH, Sheng ZQ, Wang Y, et al. Levels of soluble adhesion molecules in patients with various clinical presentations of coronary atherosclerosis [J]. *Chin Med J*, 2010, 123(21): 3 123-126.
- [4] Eschen O, Christensen JH, Johnsen SP, et al. Adhesion molecules and C-reactive protein are associated to adverse events in angina pectoris [J]. *Scand Cardiovasc J*, 2010, 44(3): 153-160.
- [5] 陆再英, 钟南山, 谢毅, 等. 内科学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008; 282.
- [6] Thygesen K, Alpert JS, White HD. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF task force for the redefinition of myocardial infarction [J]. *Kardiol Pol*, 2008, 66(1): 47-62.
- [7] Eid RE, Rao DA, Zhou J, et al. Interleukin-17 and interferon- γ are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cell and act synergistically on vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 2009, 119(10): 1 424-432.
- [8] Reiss AB, Glass AD. Atherosclerosis: immune and inflammatory aspects [J]. *J Investig Med*, 2006, 54(3): 123-131.
- [9] Shantsila E, Lip GY. Monocytes in acute coronary syndromes [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(10): 1 433-438.
- [10] Tousoulis D, Homaei H, Ahmed N, et al. Increased plasma adhesion molecule levels in patients with heart failure who have is chemic heart disease and dilated cardiomyopathy [J]. *Am Heart J*, 2001, 141(2): 277-280.
- [11] 李珊, 郑丽丽, 李冲. 胰高血糖素样肽 1 受体激动剂对高糖诱导的血管内皮细胞 NF- κ B、ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(4): 331-334.
- [12] Mitesh V, Laura C, Jemy M, et al. Epidermal growth factor-like domain 7 suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression in response to hypoxia/reoxygenation injury in human coronary artery endothelial cells [J]. *Circulation*, 2010, 122(Suppl 1): S156-S161.
- [13] Ulger Z, Aksu S, Aksoy DY, et al. The adhesion molecules of L-selectin and ICAM-1 in thrombocytosis and thrombocytopenia [J]. *Platelets*, 2010, 21(1): 49-52.
- [14] 张新超. 细胞黏附分子在动脉粥样硬化发生发展中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, 7(2): 87-92.

(此文编辑 曾学清)