

冠心病合并糖尿病患者外周血 Th1/Th2 细胞水平的研究

李晓燕 张华丽 韩淑芳 康玲 耿雪

【摘要】 目的 通过对冠心病合并糖尿病患者外周血中 Th1/Th2 细胞水平变化的研究,推测 Th1/Th2 细胞失衡在糖尿病患者动脉硬化过程中的作用。**方法** 选取研究对象 94 例(冠心病患者 32 例,冠心病合并糖尿病患者 36 例,健康对照者 26 例),提取外周血单个核细胞(PBMC),流式细胞术检测 Th1/Th2 细胞水平,分析研究对象外周血中 Th1/Th2 的变化。**结果** 冠心病组 Th1 细胞水平较对照组明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);冠心病组 Th2 细胞水平较对照组明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。冠心病合并糖尿病组患者 Th1 细胞水平较冠心病组和对照组明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);冠心病合并糖尿病组患者 Th2 细胞水平较冠心病组和对照组明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 冠心病合并糖尿病患者比冠心病患者体内存在更严重的 Th1/Th2 失衡,合并更严重的免疫炎症反应。

【关键词】 冠心病; 糖尿病; Th1 细胞; Th2 细胞; 流式细胞术

Changes of Th1/Th2 cell ratio in the peripheral blood of patients with both coronary heart disease and diabetes LI Xiao-yan, ZHANG Hua-li, HAN Shu-fang, KANG Ling, GENG Xue. Department of Cardiology, General Hospital of Jinan Military Region, Jinan 250031, China

Corresponding author: LI Xiao-yan, Email: lixiaoyan902006@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes of Th1/Th2 cell ratio in the peripheral blood of patients with both coronary heart disease and diabetes, to speculate that the role what the imbalance of Th1/Th2 cells play in atherosclerosis. **Methods** To extract the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 94 cases [32 patients with CHD, 36 patients with both coronary heart disease and diabetes mellitus (CHD + DM), 26 healthy controls], the Th1/Th2 cell ratio were tested by flow cytometry. Finally, we analyzed the changes of Th1/Th2 cell ratio. **Results** Compared with control group, the level of Th1 cells of CHD group was significantly higher, and there was significant difference ($P < 0.01$); the level of Th2 cells was lower than the control group patients, there was significant difference ($P < 0.05$). Compared with the CHD group and control group, the level of Th1 cells of the CHD + DM group was significantly higher ($P < 0.01$). The difference in levels of Th2 cells between the control, CHD and CHD + DM groups was also significant ($P < 0.05$). **Conclusions** Compared with patients with normal blood glucose, diabetic patients with coronary heart disease had a more serious Th1/Th2 imbalance and combined more severe immune and inflammatory responses.

【Key words】 Coronary disease; Diabetes mellitus; Th1 cells; Th2 cells; Flow cytometry

近年来心血管疾病的发病率明显增加,现已排在各种疾病之首。糖尿病(diabetes mellitus, DM)作为冠心病(coronary heart disease, CHD)的等危症,其发病率也明显增加。有研究证实^[1],中国的 CHD 患者中,有高达 76.9% 的人合并有高血糖。CHD 合并 DM 患者的冠状动脉病变程度更严重,而且常累及多支冠状动脉,呈弥漫性病变。CHD 与 DM 之间的内在关系,越来越受到研究者的关注,许多学者认为炎症是这两种疾病进展的共同土壤^[2]。而辅助性 T 细胞(T helper cell, Th)失衡可进一步加剧炎症反应,并可能在 CHD 合并

DM 患者的病情进展中发挥重要作用^[3]。

对象与方法

一、研究对象

选取 2010 年 11 月至 2011 年 4 月在济南军区总医院心内科住院的 94 例患者,根据冠状动脉造影(CAG)或 320 排冠状动脉 CT 结果和 OGTT 试验,将研究对象分为 CHD 组($n=32$)、CHD + DM 组($n=36$)和对照组($n=26$)。排除标准为先前三个月内发生过心肌梗死(MI)、脑中风或短暂性脑缺血发作;NYHA 分级 III 或 IV 的心力衰竭;严重的肝肾功能不全及各种急慢性感染性疾病、各种恶性肿瘤患者;自身免疫性疾病、结缔组织病和风湿性疾病患者;甲状腺及肾上腺等内分泌疾病患者;其他心脏病,如心肌炎、心肌病、心内膜炎、风湿性心脏病患者;近 3 周内服用了免疫抑制剂患者;3 个月受过创伤或者接受了手术的患者;对造影剂过敏者;近期血糖波动较大患者。

二、研究方法

1. 常规生化检查:总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),肌酐(Cr)和空腹血糖(FPG)均随入院常规检查。

2. 人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的分离:入院后次日清晨抽取患者空腹外周血 3 ml,肝素钠抗凝,应用 Ficoll 淋巴细胞分离液(美国 GE 公司)密度梯度离心法分离 PBMC, 3000 r/min,离心 20 min。

3. PBMC 胞内细胞染色及流式细胞仪分析:将分离好的 PBMC 用 1640 培养液(Life Technology)重悬,加入胎牛血清(杭州四季青生物有限公司)0.1 ml, PMA (1 mg/L)、ionomycin (50 mg/L)和 Brefeldin A (500 mg/L)(均购自 Sigma-Aldrich),孵育 4 h 后,加入鼠抗人 CD3-FITC 抗体(美国 BD 公司),室温孵育 20 min。洗涤后加入 fix/perm 液破膜,洗涤后加入鼠抗人 IFN- γ -PE、IL-4-PE 的抗体或小鼠 IgG1-PE/IgG1-PE 的同型抗体(均购自美国 Biolegend 公司),孵育后流式细胞仪检测。用前向散射光(FSC)及侧向散射光(SSC)圈出淋巴细胞,结果表示为 CD3⁺T 细胞亚群中细胞因子染色阳性的细胞百分比,其中 IFN- γ /CD3 细胞为 Th1 细胞,IL-4/CD3 细胞为 Th2 细胞。

三、统计学分析

应用 SPSS 16.0 统计软件进行统计处理,数值均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间的数据比较采用 t 检验,计数资料间的比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性, $P < 0.01$ 表示差异有极显著性。

结 果

1. 三组患者一般临床资料比较:CHD 组、CHD + DM 组与对照组的年龄、性别、TC、LDL-C、Cr 及体重指数(BMI)比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

2. 各组患者 Th1/Th2 细胞水平比较:CHD 组 Th1 细胞水平较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);CHD 组 Th2 细胞水平较对照组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。CHD + DM 组 Th1 细胞水平较 CHD 组和对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);CHD + DM 组 Th2 细胞水平较 CHD 组和对照组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 2,图 1,2)。

3. 各组冠状动脉病变特点分析结果:CHD 组研究对象共 32 例,其中单支病变者 14 例,占 43.75%;双支病变 10 例,占 31.25%;三支病变 8 例,占 25.00%。CHD + DM 组研究对象共 36 例,其中单支病变者 9 例,占 25.00%,双支血管病变者 12 例,占 33.33%,三支血管病变者 15 例,占 41.67%。两组之间比较有统计学差异($P < 0.05$)(表 3)。

表1 各组基线资料比较

组别	例数	男/女 (例)	年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	TC(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	LDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	Cr($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)	FPG($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)	BMI(kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)
对照组	26	12/14	59.2 ± 8.3	5.13 ± 0.95	107 ± 11.7	85.7 ± 8.1	4.5 ± 1.3 ^a	23.57 ± 2.87
CHD组	32	14/18	60.1 ± 8.5	5.08 ± 1.17	108 ± 9.8	86.3 ± 8.3	4.8 ± 2.0 ^a	24.10 ± 2.75
CHD + DM组	36	17/19	59.3 ± 8.6	5.22 ± 1.23	108 ± 9.5	86.8 ± 9	8.8 ± 2.3	25.02 ± 2.28

注:与CHD + DM组比较,^aP < 0.05

表2 各组外周血Th1/Th2细胞水平的比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Th1 (IFN- γ /CD3) ^a	Th2 (IL-4/CD3)
对照组	26	9.47 ± 1.34	2.14 ± 0.18
CHD组	32	16.17 ± 1.26	1.71 ± 0.12
CHD + DM组	36	27.09 ± 1.82	1.14 ± 0.13

注:各组之间两两比较,^aP < 0.01

表3 CHD组与CHD + DM组冠状动脉病变特点分析[例,(%)]

组别	例数	单支病变	双支病变	三支病变
CHD组	32	14(43.75)	10(31.25)	8(25.00)
CHD + DM组	36	9(25.00) ^a	12(33.33) ^a	15(41.67) ^a

注:与CHD组比较,^aP < 0.05

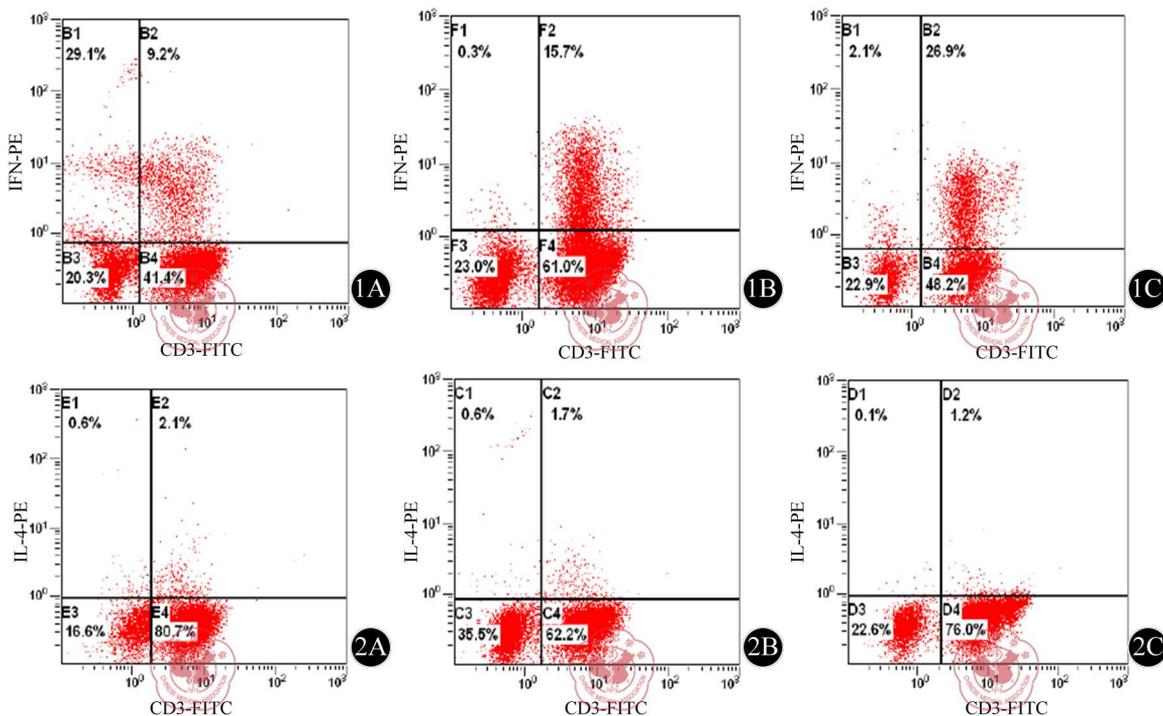


图1 流式细胞仪检测各组Th1 (IFN- γ /CD3) 细胞水平。1A: 对照组; 1B: CHD组; 1C: CHD+DM组

图2 流式细胞仪检测各组Th2 (IL-4/CD3) 细胞水平。2A: 对照组; 2B: CHD组; 2C: CHD+DM组

讨 论

DM 与 CHD 之间的内在关系,越来越受到研究者的关注。随着“共同土壤”学说的提出^[2],人们认识到 CHD 与 DM 存在着共同的发病机制,炎症是其共同的土壤。很多研究资料表明^[4-7];炎症与 CHD、DM 的发生发展密切相关。CHD + DM 患者与单纯的 CHD 患者相比,有更为严重的炎症反应及免疫调节的异常,而且冠状动脉病变的严重程度与患者体内糖化血红蛋白水平、白细胞、纤维蛋白原及 C 反应蛋白存在明显的正相关关系,提示 CHD + DM 患者体内存在较高的炎症水平^[8-10]。

许多研究证实, Th 细胞在动脉粥样硬化的进程中起重要作用。按功能和分泌细胞因子的不同, Th 细胞可以分为 Th1 和 Th2 两群。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 和 IL-2; Th2 细胞主要分泌 IL-4 和 IL-10。IFN- γ 和 IL-2 是两种重要的前炎性细胞因子,可以进一步促进巨噬细胞、自然杀伤细胞等效应细胞的活化,上调细胞间黏附分子等表达,加剧斑块的不稳定。而 IL-10 是一种重要的抗炎细胞因子, IL-4 和 IL-10 都可以抑制辅助性 T 淋巴细胞向 Th1 细胞分化,避免 Th1 细胞的过度激活。正常情况下, Th1 和 Th2 细胞趋于动态平衡。一旦 Th1/Th2 的平衡被打破, Th1 亚群过度激活导致炎症反应瀑布效应的出现,将进一步促进斑块向不稳定状态发展,导致心血管事件发生。

为了进一步探索 Th 细胞水平与 CHD + DM 患者动脉硬化程度的关系,推测高血糖加剧动脉硬化进展的细胞机制,本实验对 CHD + DM 患者外周血中 Th 细胞水平进行分析。通过胞内细胞染色发现, Th1 细胞在 CHD + DM 患者中的比例较 CHD 患者及健康人明显增高,而 Th2 细胞则显著降低,说明 CHD + DM 患者体内存在着较单纯 CHD 患者更为严重的 Th1/Th2 细胞功能失衡。而 Th1/Th2 细胞的失衡可能会加剧系统及局部炎症反应,加速动脉粥样硬化的发生、发展。这可以解释为何 CHD + DM 患者的三支病变发生率较 CHD 患者明显升高,且易呈弥漫性病变。由此我们推测, Th1/Th2 亚群的失衡可能在 CHD 合并 DM 患者的病情进展中发挥了重要作用,其通过诱发机体发生严重的免疫炎症反应,最终加重动脉粥样硬化的程度。研究结果从免疫调节失衡角度分析 CHD + DM 患者体内炎症反应加剧的病理机制,为抗动脉粥样硬化治疗提供了新的作用靶点。

参 考 文 献

- [1] Hu DY, Pan CY, Yu JM. The relationship between coronary artery disease and abnormal glucose regulation in China the China Heart Survey. *Eur Heart J*, 2006, 27:2573-2579.
- [2] Ge J, Jia Q, Liang C, et al. Advanced glycosyl at ion end products might promote atherosclerosis through inducing the immune maturation of dendritic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25:2157-2163.
- [3] Jagannathan-Bogdan M, McDonnell ME, Shin H, et al. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J Immunol*, 2011, 186:1162-1172.
- [4] Delfino RJ, Staimer N, Tjoa T, et al. Circulating biomarkers of inflammation, antioxidant activity, and platelet activation are associated with primary combustion aerosols in subjects with coronary artery disease. *Environ Health Perspect*, 2008, 116:898-906.
- [5] Das UN. Can Endogenous lipid molecules serve as predictors and prognostic markers of coronary heart disease. *Lipids Health Dis*, 2008, 20:7-19.
- [6] Nishida K, Okada Y, Nawata M, et al. Induction of hyperadiponec inemia following long-term treatment of patients with rheumatoid arthritis with infliximab (IFX), an anti-TNF- α antibody. *Endocr J*, 2008, 55:213-216.
- [7] Kawamura N, Dyck PJ, Schmeichel AM, et al. Inflammatory mediators in diabetic and non-diabetic lumbosacral radiculoplexus neuropathy. *Acta Neuropathol*, 2008, 115:231-239.
- [8] 张元春, 罗常有, 尹庆, 等. 冠心病血糖异常患者炎症因子与糖化血红蛋白的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17:925-928.
- [9] 丁风华, 陆林, 蒲里津, 等. 糖化白蛋白与糖尿病并发冠心病的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16:138-140.
- [10] Gerstein H. Glycosylated hemoglobin: finally ready of prime time as cardiovascular rrisk factor. *Anuintern Med*, 2004, 141:475-476.

(收稿日期:2011-05-16)

(本文编辑:张岚)

李晓燕, 张华丽, 韩淑芳, 等. 冠心病合并糖尿病患者外周血 Th1/Th2 细胞水平的研究[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 5(17):