·临床研究·

[文章编号] 1007-3949(2020)28-08-0692-05

冠心病患者 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3 与肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6 变化的研究

李 宁, 朱国斌

(山西医科大学第二医院心内科,山西省太原市 030000)

[关键词] 冠心病; T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3; 肿瘤坏死因子 α; 白细胞介素 6

[摘 要] **目的** 探讨冠心病患者外周血 $CD14^+$ 单核细胞膜型 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3(flTim-3)的阳性率及外周血清中可溶性 Tim-3(sTim-3)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白细胞介素 6(IL-6)浓度的变化及临床意义。**方法** 以 196 例拟诊冠心病者为研究对象,所有入选者均行冠状动脉造影。根据冠状动脉造影结果和冠心病诊断标准,把入选患者分为非冠心病组(n=54)、稳定型心绞痛(SAP)组(n=87)、急性冠状动脉综合征(ACS)组(n=55)。记录一般资料。采用流式细胞仪测定外周血单核细胞 flTim-3 的阳性率,采用酶联免疫吸附法测定血清 sTim-3、TNF-α、IL-6 的浓度。**结果** 与非冠心病组比较,SAP 组、ACS 组患者 flTim-3 阳性率、TNF-α、IL-6 浓度增高,且 ACS 组更高,差异有统计学意义(P<0.05);而 sTim-3 浓度降低,且 ACS 组更低,差异有统计学意义(P<0.05)。Pearson 相关分析显示,flTim-3 与 TNF-α、IL-6 呈正相关,sTim-3 与 TNF-α、IL-6 呈负相关(P<0.01)。Logistic 回归分析显示,flTim-3、sTim-3、TNF-α、IL-6 与冠心病临床表型具有相关性(P<0.05)。**结论** flTim-3、sTim-3 可能通过调节单核/巨噬细胞炎症因子的表达而影响冠心病的临床表型,flTim-3、sTim-3 对冠心病临床表型有预测价值。

[中图分类号] R54 [文献标识码] A

Study on the changes of T cell immunoglobulin and mucin-domain containing molecule family-3, tumor necrosis factor α and interleukin-6 in patients with coronary heart disease

LI Ning, ZHU Guobin

(*Department of Cardiology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi* 030000, *China*)

[**KEY WORDS**] coronary heart disease; T cell immunoglobulin and mucin-domain containing molecule family-3; tumor necrosis factor-α; interleukin-6

[**ABSTRACT**] **Aim** To investigate the changes of the positive rate of full-length membrane-enchored T cell immunoglobulin and mucin-domain containing molecule family-3 (flTim-3) on $CD14^+$ monocyte in peripheral blood and the levels of serum soluble Tim-3 (sTim-3), tumor necrosis factor α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) in patients with coronary heart disease (CHD) and their clinical significance. **Methods** 196 suspected CHD patients were selected as the study subjects, and all the selected patients underwent coronary angiography. According to the results of coronary angiography and CHD diagnostic criteria, the selected patients were divided into non-CHD group (n=54), stable angina pectoris (SAP) group (n=87) and acute coronary syndrome (ACS) group (n=55). General information was recorded. The positive rate of flTim-3 in peripheral blood monocytes was determined by flow cytometry. The concentrations of serum sTim-3, TNF-α and IL-6 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with non-CHD group, flTim-3 positive rate, TNF-α, IL-6 concentrations in SAP group and ACS group were higher, and ACS group was higher more, the difference was statistically significant (P<0.05); While sTim-3 concentration was lower, ACS group was lower more, the difference was statistically significant (P<0.05). Pearson correlation analysis showed that flTim-3 was positively correlated with TNF-α and IL-6, while sTim-3 was negatively correlated with TNF-α and IL-6 (P<0.01). Logistic regression analysis showed that flTim-3, sTim-3, TNF-α, IL-6 were correlated with the clinical phenotype of CHD (P

[收稿日期] 2019-04-13 [修回日期] 2020-01-03

[作者简介] 李宁,硕士,研究方向为冠心病的临床研究,E-mail 为 369400244@qq.com。通信作者朱国斌,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为冠心病的基础与临床研究,E-mail 为 19834515760@139.com。

<0.05). **Conclusion** FlTim-3 and sTim-3 affect the clinical phenotype of CHD by regulating the expression of monocyte/macrophage inflammatory factors. FlTim-3 and sTim-3 have predictive value for the clinical phenotype of CHD.

冠心病在中国的发病率逐年升高,尽管经皮冠状动脉介入术、溶栓、药物治疗已经在临床上广泛推广,但冠心病的致死率仍居高不下[1],如何更有效的预防及治疗冠心病,仍需我们进一步研究。高血脂、高血压、高血糖等危险因素导致冠状动脉内皮细胞功能紊乱或结构破坏,外周血循环中的 $CD14^+$ 单核细胞向受损的内皮细胞靠拢并一步一步透过内皮细胞间隙迁移至内皮细胞下,吞噬沉积在内皮下的脂质成分,在氧化型低密度脂蛋白等刺激下释放大量炎症因子,是动脉粥样硬化斑块形成的重要环节。T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3(T cell immunoglobulin and mucin-domain containing molecule family-3,Tim-3)是一种新型免疫调节分子,表达于 Th1 细胞、单核细胞/巨噬细胞、NK 细胞、树突样细胞等。有膜型 Tim-3(full-length membrane-enchored Tim-3,flTim-3)和可溶性 Tim-3(soluble Tim-3,sTim-3)两种表达形式,它既可以负向调节免疫反应,也可以正向促进单核/巨噬细胞的炎症反应[2-3]。本临床研究进一步探讨冠心病患者 flTim-3 的阳性率,sTim-3 与肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素 6(interleukin-6,IL-6)的变化规律,以期找到更多和冠心病相关的危险因素,同时有望找到抑制单核/巨噬细胞在参与动脉粥样硬化形成过程中释放炎症因子的新靶点。

1　资料和方法

1.1　一般资料

选择 2017 年 9 月至 2018 年 9 月山西医科大学第二医院拟诊冠心病患者 196 例为研究对象,都得到患者的同意并签署知情同意书。所有入组患者入院后均行冠状动脉造影,结果由 2 位以上冠状动脉介入的专家评估血管病变情况。根据病史、临床症状、心电图检查、心肌酶及冠状动脉造影结果,按冠心病诊治指南推荐的诊断标准[4],把入选患者分为非冠心病组(n=54)、稳定型心绞痛(stable angina pectoris,SAP)组(n = 87)、急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome,ACS)组(n = 55)。54 例非冠心病者(经冠状动脉造影证实)包括男 29 例,女 25 例,年龄 43 ~ 81 岁,平均(57.13±8.37)岁;87 例 SAP 患者,包括男 49 例,女 38 例,年龄 40 ~ 79 岁,平均(56.87±8.34)岁;55 例 ACS 患者,包括男 32 例,女 23 例,年龄 45 ~ 78 岁,平均(54.13±10.76)岁。

1.2　纳入及排除标准

纳入标准:非冠心病组经冠状动脉造影证实左前降支、左回旋支、右冠状动脉及其分支血管均无狭窄。有以下情况之一则入选 SAP 组、ACS 组:(1)有典型心绞痛发作症状;(2)有典型心电图表现、心肌酶动态演变;(3)经冠状动脉造影证实至少在左前降支、左回旋支、右冠状动脉 3 支主要血管中有一支狭窄程度大于 50%。排除标准:(1)有感染性疾病的患者;(2)有免疫功能紊乱的患者;(3)有自身免疫性疾病的患者;(4)有传染病的患者;(5)有血液系统疾病的患者;(6)有恶性肿瘤的患者。

1.3　检测指标及方法

(1)所有入组患者在发病入住本院心内科时记录一般资料,第 2 天晨起空腹抽取外周血若干管,用肝素抗凝,由山西医科大学第二医院检验科医师协助完成外周血清空腹血糖(fasting plasma glucose,FPG)、甘油三酯(triglyceride,TG)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein,LDL)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein,HDL)、脂蛋白(a)[lipoprotein(a),Lp(a)]、同型半胱氨酸(homocysteine,Hcy)的测定。

(2)其中一管外周血 4 000 r/min 离心 20 min,取上层血清,采用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)法检测 TNF-α、IL-6、sTim-3 的浓度,操作步骤按说明书进行。ELISA 试剂盒买自英国 Abcam 公司。

(3)其中一管外周血在采血后 2 h 内利用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC),取 PBMC 于试管中,按照“CD14 MicroBeads,human”说明书分别向试管中加入相应量的抗体及磁珠,进行分选实验,倾倒的液体为目的细胞,洗涤后加入 2% 多聚甲醛/PBS 溶液固定,随后加入抗人 Tim-3 荧光标记单克隆抗体,用流式细胞仪检测样品中 flTim-3 阳性细胞百分比。抗人 Tim-3 荧光标记单克隆抗体、人淋巴细胞分离液购于 BioLegend 公司,“CD14 MicroBeads,human”购自德国 Partec 公司。

1.4　统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件处理数据。符合正态分布的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,不符合正态分布的

计量资料用中位数(四分位间距)表示,计数资料采用百分比进行描述。符合正态分布的计量资料采用单因素方差分析及多个样本均数间的两两比较(SNK-q),不符合正态分布的采用 Kruskal-Wallis H 非参数检验及多个样本间的两两比较(Nemenyi 检验);各组间定性资料比较用 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson 相关分析;运用多因素回归分析,以临床表型为因变量,以与冠心病强相关的因素及 flTim-3、sTim-3、TNF-α、IL-6 为自变量,即回归模型纳入高血压病史、糖尿病病史、性别、TC、LDL、HDL、Lp(a)、Hcy、flTim-3、sTim-3、TNF-α、IL-6,应用无序多分类 Logistic 回归进行分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 非冠心病组、SAP 组、ACS 组一般资料的比较

与非冠心病组比较,SAP 组与 ACS 组患者的高血压病史、糖尿病病史、TC、LDL、HDL、Lp(a)、Hcy、性别差异有统计学意义($P<0.05$;表 1),而吸烟史、饮酒史、年龄、体质指数(body mass index, BMI)、FPG、TG 差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1. 3 组一般资料比较

Table 1. Comparison of general information among three groups

项目	非冠心病组($n=54$)	SAP 组($n=87$)	ACS 组($n=55$)
高血压病史[例(%)]	21(38.89)	62(71.26)[a]	41(74.55)[ab]
糖尿病病史[例(%)]	20(37.04)	53(60.92)[a]	48(87.27)[ab]
吸烟史[例(%)]	25(46.30)	42(48.28)	27(49.09)
饮酒史[例(%)]	23(42.60)	36(41.38)	22(40.00)
男性[例(%)]	29(53.70)	49(56.32)[a]	32(58.18)[ab]
年龄(岁)	57.13±8.37	56.87±8.34	54.13±10.76
BMI(kg/m^2)	24.63±5.21	25.82±4.89	27.23±3.14
FPG(mmol/L)	5.64±2.10	5.79±2.34	6.72±2.52
TC(mmol/L)	4.26(3.16,5.18)	4.83(3.97,6.20)[a]	5.66(4.33,7.12)[ab]
TG(mmol/L)	1.64(0.56,1.72)	1.75(1.26,2.94)	1.83(1.68,4.21)
LDL(mmol/L)	2.47(2.05,3.26)	2.78(2.31,4.26)[a]	3.42(2.96,5.82)[ab]
HDL(mmol/L)	1.22(0.78,1.62)	1.04(0.66,1.27)[a]	0.84(0.61,0.99)[ab]
Lp(a)(mmol/L)	48.57±102.44	93.78±185.42[a]	163.53±269.74[ab]
Hcy(μmol/L)	12.34±2.87	21.30±3.58[a]	32.25±4.38[ab]

a 为 $P<0.05$,与非冠心病组比较;b 为 $P<0.05$,与 SAP 组比较。

2.2 非冠心病组、SAP 组、ACS 组 flTim-3 阳性率、sTim-3、TNF-α、IL-6 水平比较

与非冠心病组比较,SAP 组、ACS 组患者 flTim-3 阳性率、TNF-α、IL-6 浓度增高,且 ACS 组更高,差异有统计学意义($P<0.05$);而外周血清 sTim-3 浓度降低,且 ACS 组更低,差异有统计学意义($P<0.05$;表 2)。

表 2. 3 组间 flTim-3 阳性率、sTim-3、IL-6、TNF-α 的比较

Table 2. Comparison of the expressions of flTim-3, sTim-3, IL-6, TNF-α among three groups

分组	flTim-3 阳性率	sTim-3(ng/L)	TNF-α(ng/L)	IL-6(ng/L)
非冠心病组	0.127±0.557	913.757±122.906	249.805±23.388	70.331±12.938
SAP 组	0.145±0.105[a]	809.687±99.700[a]	283.824±46.761[a]	86.633±11.648[a]
ACS 组	0.160±0.606[ab]	676.812±130.140[ab]	322.594±61.475[ab]	95.170±18.834[ab]
F	19.989	11.906	6.714	8.879
P	<0.001	<0.001	0.003	0.007

a 为 $P<0.05$,与非冠心病组比较;b 为 $P<0.05$,与 SAP 组比较。

2.3　flTim-3 阳性率、sTim-3 与 TNF-α、IL-6 之间的相关性

通过对所有入组患者的 flTim-3、sTim-3、TNF-α、IL-6 进行 Pearson 相关分析，发现 flTim-3 与 TNF-α、IL-6 呈正相关，sTim-3 与 TNF-α、IL-6 呈负相关（$P<0.01$；表 3）。

2.4　冠心病不同临床表型与各危险因素间的无序 Logistic 回归分析结果

在其他相关危险因素固定的条件下，flTim-3、sTim-3、TNF-α、IL-6 仍与冠心病临床表型独立相关（$P<0.05$；表 4）。

表 3. flTim-3 阳性率、sTim-3 与 TNF-α、IL-6 之间的相关性

Table 3. The correlation between flTim-3, sTim-3 and TNF-α, IL-6

指标	TNF-α		IL-6	
	r	*P*	*r*	*P*
flTim-3 阳性率	0.276	0.001	0.239	0.005
sTim-3	−0.638	<0.001	−0.854	<0.001

表 4. 冠心病临床表型与各种危险因素的 Logistic 回归分析结果

Table 4. Logistic regression analysis of clinical phenotypes and risk factors for coronary heart disease

冠心病分类	指标	β	SE	Wald 值	OR 值	*P* 值	95% CI
SAP	flTim-3 阳性率	0.882	0.146	36.484	2.416	<0.001	1.815～3.219
	sTim-3	0.355	0.134	7.062	1.426	0.008	1.097～1.853
	TNF-α	0.306	0.110	7.709	1.358	0.005	1.094～1.685
	IL-6	0.505	0.110	21.179	1.657	<0.001	1.336～2.054
ACS	flTim-3 阳性率	1.216	0.156	60.422	3.374	<0.001	2.482～4.581
	sTim-3	0.687	0.241	8.108	1.988	0.004	1.239～3.190
	TNF-α	0.395	0.151	6.817	1.484	0.009	1.104～2.000
	IL-6	0.309	0.143	4.704	1.362	0.030	1.030～1.802

3　讨　论

T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3 是一种新型免疫调节分子，选择性表达于终末分化的 Th1 细胞上，负向调节 Th1 细胞所介导的免疫反应。近年来研究发现 Tim-3 同样表达于多种固有免疫细胞表面，如单核细胞、巨噬细胞、树突样细胞等。通过 mRNA 选择剪切作用可表达全长的 flTim-3 和可溶性的 sTim-3，flTim-3 由胞膜外的 IgV 区、黏蛋白区、跨膜区及胞质区组成，sTim-3 缺少黏蛋白区及跨膜区，仅含 IgV 区及胞质区。累积的证据表明，Tim-3 在不同疾病中有多种表现和功能[5]。然而 Tim-3 在动脉粥样硬化进展中的作用尚不是很清楚。Tim-3 越来越被认为是先天免疫细胞炎症的调节因子，包括单核细胞、巨噬细胞[6]。活化的单核细胞，作为先天细胞的代表，产生高水平的促炎细胞因子，如 TNF-α、IL-6，并参与多种疾病的发生[7-8]。有证据表明[9]，免疫反应介导的炎症改变参与了动脉粥样硬化斑块形成的各个阶段，其中单核/巨噬细胞是动脉粥样硬化斑块中的主要成分。

在本研究中，我们发现在冠心病患者随着冠状动脉病变严重程度的增加，flTim-3 表达上调，而 sTim-3 却下降。张宏鹏等[10]发现阻断 Tim-3 在巨噬细胞上的信号通路后，可抑制巨噬细胞的促炎作用，增加胆固醇酯的流出。且 Sun 等[11]证明阻断小鼠巨噬细胞 flTim-3 可减少炎症因子的表达。我们的数据为冠状动脉粥样硬化的研究提供了新的思路，针对 Tim-3 可能是一个有吸引力的免疫疗法的新目标。最近 Tim-3 成为冠心病的新热点。江洪生等[12]发现 Tim-3 的高表达，在冠心病中可抑制炎症应答，减缓动脉粥样硬化的形成。在这项研究，有以下证据，我们证明了 flTim-3 可能通过促进单核/巨噬细胞炎症因子的释放加速粥样斑块的形成，而 sTim-3 可能起相反的作用；首先，在冠心病患者随着冠状动脉病变严重程度的增加，flTim-3 表达增加，sTim-3 表达降低，尤其是 3 支病变组；第二，冠心病患者 flTim-3 表达与 TNF-α、IL-6 变化一致，sTim-3 与 TNF-α、IL-6 变化相反。

Zhang 等[13]研究发现：用脂多糖或氧化型低密度脂蛋白诱导 flTim-3 过表达的巨噬细胞可促进其 TNF-α、IL-6 的释放，阻断 flTim-3 信号通路后，TNF-α、IL-6 的释放明显减少。Yang 等[14]发现：flTim-3

介导的 NF-κB/TNF-α 信号通路的激活参与糖尿病患者的肾损伤,尤其是足细胞的损伤。Wang 等[15]发现脂多糖和半乳糖凝集素 9 刺激外周血单核细胞后,TNF-α、IL-6 的表达增加,促进慢性乙型肝炎患者的炎症反应。这些证据与我们的研究结论具有一致性。而 sTim-3 和 flTim-3 在单核/巨噬细胞调节过程中作用不同,sTim-3 可能通过与 flTim-3 竞争性结合 Tim-3 配体(Tim-3 ligand,Tim-3L),而阻止 Tim-3L 同 flTim-3 的结合,抑制单核/巨噬细胞的功能[16]。王莹等[17]发现 SAP 及 ACS 患者在发病时,sTim-3 浓度均降低,与我们的发现一致。但 Tim-3 还参与动脉粥样硬化进程中 T 细胞的调节。王莹等[17]证实 Tim-3 可通过调节 $CD4^+/CD8^+$的变化,引起机体免疫紊乱,从而促进粥样硬化斑块的形成。最近 Wang 等[18]证实粪便细菌含量及成分可以通过调节 flTim-3 的表达而影响 TNF-α、IL-6,有望通过干预肠道菌群来调节动脉粥样硬化的进程。但本研究未全面阐述 Tim-3 对粥样斑块形成过程中的作用,仍需进一步研究。

[参考文献]

[1] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 中国心血管病报告 2017 概要[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(1): 1-8.

[2] Dixon KO, Das M, Kuchroo VK. Human disease mutations highlight the inhibitory function of TIM-3[J]. Nat Genet, 2018, 50(12): 1640-1641.

[3] Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells[J]. Science, 2007, 318(5853): 1141-1143.

[4] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(5): 380-393.

[5] Das M, Zhu C, Kuchroo VK. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity[J]. Immunol Rev, 2017, 276(1): 97-111.

[6] Ranferi OG, Luis TB, Isabel SO. TIM-3 regulates distinct functions in macrophages[J]. Front Immunol, 2016, 7: 229.

[7] Zhang JY, Zou ZS, Huang A, et al. Hyper-activated pro-inflammatory CD16 monocytes correlate with the severity of liver injury and fibrosis in patients with chronic hepatitis B[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17484.

[8] 王建旗, 史旭波, 马长生, 等. 炎症预测和预防动脉粥样硬化性心血管事件的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2018, 39(5): 687-690.

[9] Pang XF, Liu RM, Xia YF. Effects of inhibitors of the renin-angiotensin system on reducing blood pressure and expression of inflammatory factors in CHD patients: A network Meta-analysis[J]. J Cell Physiol, 2018, 234(5): 5988-5997.

[10] 张宏鹏, 王欣然, 徐玲玲, 等. miR-155 调控 Tim-3 的表达影响泡沫细胞形成的机制研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2017, 14(4): 187-191.

[11] Sun JL, Huang QJ, Li SF, et al. miR-330-5p/Tim-3 axis regulates macrophage M2 polarization and insulin resistance in diabetes mice[J]. Mol Immunol, 2018, 95: 107-113.

[12] 江洪生, 彭定凤, 胡勇钧, 等. 白细胞介素-7 调控 T 细胞表面 TIM-3 的表达在冠状动脉粥样硬化性心脏病中的作用[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(12): 1040-1046.

[13] Zhang W, Zhang Y, Fang Q. Effect of galectin-9/Tim-3 pathway on the polarization of M1/M2 subtype in murine macrophages induced by lipopolysaccharide[J]. Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2018, 30(9): 836-841.

[14] Yang H, Xie T, Li D, et al. Tim-3 aggravates podocyte injury in diabetic nephropathy by promoting macrophage activation via the NF-κB/TNF-α pathway[J]. Mol Metab, 2019, 23: 24-36.

[15] Wang JY, Li C, Fu JJ, et al. Tim-3 regulates inflammatory cytokine expression and Th17 cell response induced by monocytes from patients with chronic hepatitis B[J]. Scand J Immunol, 2019, 89(5): e12755.

[16] Li YM, Shi YY, Li Y, et al. Soluble Tim-3 and Gal-9 are associated with renal allograft dysfunction in kidney transplant recipients: A cross-sectional study[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 55: 330-335.

[17] 王莹, 康秀文, 骆继业, 等. 冠心病患者外周血 Tim-3 及 $CD4^+$、$CD8^+$的表达[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(17): 2847-2849.

[18] Wang SX, Liu YY, Xue M, et al. Fecal bacteria from ulcerative colitis patients downregulate Tim-3-mediated inhibitory effects on monocytes in vitro[J]. Microb Pathog, 2019, 128: 147-152.

(此文编辑 曾学清)