

老年脑梗死患者微栓子信号、调节性 T 细胞、载脂蛋白 A1、脂蛋白磷脂酶 A2 水平

董礼全 孙海荣 王鹏飞 仲伟斌 高 犇 潘旭东¹ (威海市立医院神经内科, 山东 威海 264200)

【摘要】 目的 探讨老年脑梗死患者急性期微栓子信号(MES)、CD₄⁺CD₂₅^{high}调节性 T 细胞(Treg)、载脂蛋白(Apo)A1、脂蛋白磷脂酶(Lp-PL)A2 的特点。方法 连续纳入 222 例老年脑梗死患者,146 例同期老年健康体检对照人群。行颈部颅内血管超声、MES、Treg、ApoA1、Lp-PLA2 检测。根据斑块性质、动脉狭窄程度、MES 检测分组。结果 不稳定斑块组 MES 阳性率、ApoA1、Lp-PLA2 水平显著高于非不稳定斑块组和对照组,Treg 水平显著低于非不稳定斑块组和对照组($P < 0.05$)。重度狭窄组 MES 阳性率、Lp-PLA2 水平显著高于非重度狭窄组和对照组,ApoA1 水平显著高于对照组,Treg 水平显著低于对照组($P < 0.05$)。MES 阳性组 ApoA1、Lp-PLA2 水平显著高于阴性组和对照组,Treg 显著低于阴性组和对照组($P < 0.05$)。结论 老年脑梗死患者急性期 MES 阳性率、ApoA1、Lp-PLA2 水平升高,Treg 水平降低,不稳定斑块患者显著。

【关键词】 脑梗死;微栓子信号;调节性 T 细胞;载脂蛋白 A1;脂蛋白磷脂酶 A2

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9202(2018)03-0677-04;doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2018.03.067

脑梗死是一种不同分型的临床综合征,发病过程中伴有炎性免疫反应。有报道在急性梗死动物的血液、脑组织病理中可见炎性免疫细胞异常反应^[1,2]。本研究分析老年脑梗死急性期患者动脉硬化斑块、动脉狭窄及微栓子信号(MES)、调节性 T 细胞(Treg)、载脂蛋白(Apo)A1 和脂蛋白磷脂酶(Lp-PL)A2 的表达水平。

1 对象与方法

1.1 对象 2012 年 10 月至 2015 年 1 月青岛大学附属医院神经内科住院老年脑梗死患者 222 例,其中男 121 例,女 101 例,年龄 61 ~ 95 岁,平均(69±5)岁,符合第四届全国脑血管病学术会议诊断表标准,病情允许且能配合检查。对照组为我院同期查体者 146 例,其中男 76 例,女 70 例,年龄 61 ~ 85 岁,平均(65±4)岁。排除标准:①伴肿瘤、免疫病、血液病、急性感染性疾病者;②脑梗死后遗症病史或近 2 w 服用抗血小板聚集、降脂药者;③房颤及心脏超声证实有心源性栓子来源患者;④脑出血患者;⑤近 4 w 有外伤史或外科手术史;⑥近 2 w 服用中药汤剂者;⑦最近 3 个月参加过或者正在参加其他临床研究者。

1.2 动脉病变检测 采用德利凯(EMS-9EBX2P)型超声诊断仪,发病 1 w 内完成检测,探测显示颈内动脉起始至大脑中动脉 M1 段,观察有无斑块,测量管腔内中膜厚度、管腔管径。判断标准:颈动脉内中膜增厚>

1.0 mm 为增厚;管腔内中膜局部增厚>1.2 mm 粥样硬化斑块形成。斑块分为以下 4 种:(1)较均的低回声脂质型软斑块;(2)等回声的纤维型斑块;(3)强回声或伴声影的钙化型硬斑块;(4)回声不均的溃疡型混合斑块。软斑块及混合斑块为不稳定斑块,纤维斑块及钙化型硬斑块为稳定斑块。管腔狭窄程度:轻中度狭窄(<70%);重度狭窄≥70%。

1.3 MES 的识别 采用德利凯(EMS-9EBX2P)型超声诊断仪,发病 1 w 内完成 MES 检测,患者取安静仰卧位,2 MHz 探头取得症状侧大脑中动脉清晰信号,固定 Spencer 头架,深度 50 ~ 60 mm,两点间距大于 6 mm,取样容积为 6 ~ 12 mm,由 2 名神经内科医师共同检测,检测完毕回放每个微栓子信号,除外伪差和干扰,采用 1995 年第 9 届国际脑血液循环会议制定的标准,①时程短暂,持续时间<300 ms;②强度较背景血流信号≥3 dB;③单向出现于多普勒频谱中;④音频信现为“劈啪音”或“鸟鸣声”;⑤在心动周期内随机出现;⑥在 2 个监测深度存在时间延迟。检测时间 60 min,将监测结果 MES≥1 者入选阳性组。

1.4 Treg 和 ApoA1 检测 患者在入院次日清晨空腹肘静脉采血 2 ml,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,6 h 内流式细胞术检测。EPICS XL-4 型流式细胞仪进口于美国贝克曼公司,Optilyse C 溶血素,小鼠抗人荧光单抗 CD25-FITC、CD4-PE-Cy5 及同型对照进口于法国 Immunotech 公司。小鼠抗人荧光单抗 CD95-PE 及同型对照购于晶美生物公司。抗体组合为 CD25-FITC、CD95-PE、CD4-PE-Cy5。CD₄⁺CD₂₅⁺Treg 中 CD25 表达荧光强度>100 者为 CD₄⁺CD₂₅^{high}Treg。以 FS-SS 设门分析外周血 Treg 和 CD95/ApoA1 的表达。见图 1。

1.5 Lp-PLA2 检测 患者在入院次日清晨空腹肘静脉采血 2 ml,EDTA 抗凝,1 500 r/min 离心 10 min,收集上清液,-70℃ 保存,应用中美合资天津康尔克生物

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2011HM087)

1 青岛大学医学院附属医院神经内科

通信作者:潘旭东(1962-),男,主任医师,博士,博士生导师,主要从事脑血管病研究。

第一作者:董礼全(1980-),男,主治医师,博士,主要从事脑血管病研究。

科技有限公司试剂盒,固相夹心法酶联免疫吸附实验(ELISA),175 ng/ml 以下为正常。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行 χ^2 、 t 检验。

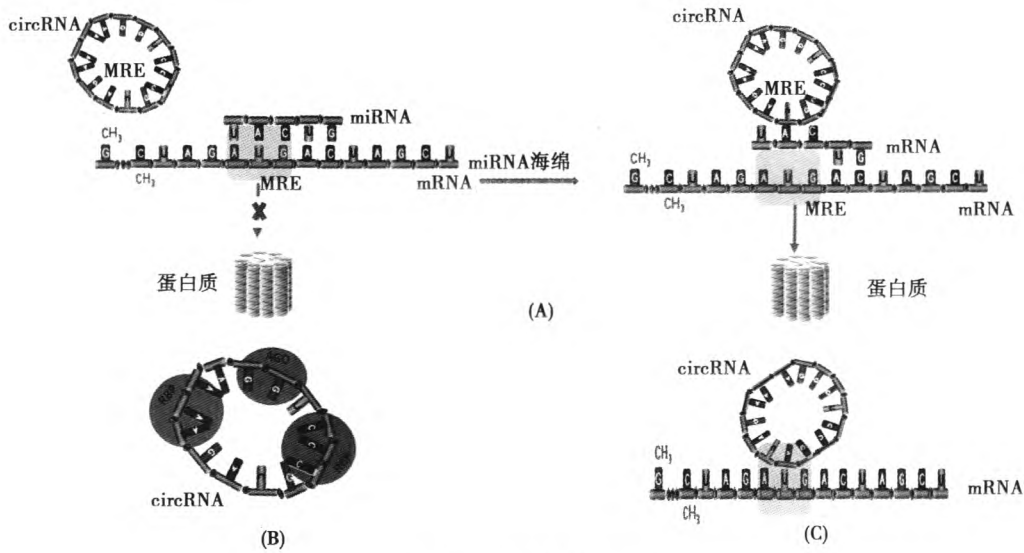


图 1 流式细胞检测图

2 结果

脑梗死组 MES 阳性率、ApoA1、Lp-PLA2 水平显著高于对照组, Treg 水平显著低于对照组 ($P < 0.05$)。不稳定斑块组 MES 阳性率显著高于非不稳定斑块组和对照组, Treg 显著低于非不稳定斑块组和对照组, ApoA1 显著高于非不稳定斑块组和对照组, Lp-PLA2 显著高于非不稳定斑块组和对照组 (均 $P < 0.05$)。重

度狭窄组 MES 阳性率显著高于非重度狭窄组和对照组, Treg 显著低于对照组, ApoA1 显著高于对照组, Lp-PLA2 显著高于非重度狭窄组和对照组 (均 $P < 0.05$)。MES 阳性组 Treg 显著低于 MES 阴性组和对照组, ApoA1 显著高于 MES 阴性组和对照组, Lp-PLA2 显著高于 MES 阴性组和对照组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组 MES、Treg、ApoA1、Lp-PLA2 的检测 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MES 阳性(n)	Treg (%)	ApoA1 (%)	Lp-PLA2 (ng/ml)
脑梗死组	222	56 ¹⁾	8.98 ± 1.27 ¹⁾	34.57 ± 2.12 ¹⁾	255.85 ± 10.77 ¹⁾
不稳定斑块组	38	30 ¹⁾²⁾	7.45 ± 1.87 ¹⁾²⁾	36.57 ± 2.32 ¹⁾²⁾	311.33 ± 10.77 ¹⁾²⁾
非不稳定斑块组	184	26	9.30 ± 2.71	34.16 ± 1.12	244.39 ± 9.67
重度狭窄组	18	14 ¹⁾³⁾	7.98 ± 1.97 ¹⁾	33.47 ± 2.52 ¹⁾	295.23 ± 11.37 ¹⁾³⁾
非重度狭窄组	204	42	9.07 ± 2.71	34.67 ± 2.12	252.38 ± 10.07
MES 阳性组	56	-	7.49 ± 1.77 ¹⁾⁴⁾	36.97 ± 2.72 ¹⁾⁴⁾	308.21 ± 9.57 ¹⁾⁴⁾
MES 阴性组	166	-	9.48 ± 2.71	33.76 ± 1.12	238.19 ± 8.92
对照组	146	2	10.27 ± 1.25	27.38 ± 1.51	137.22 ± 8.97

与对照组比较:1) $P < 0.05$; 与非不稳定斑块组比较:2) $P < 0.05$; 与非重度狭窄组比较:3) $P < 0.05$; 与 MES 阴性组比较:4) $P < 0.05$

3 讨论

脑梗死是由多种病因所引起的脑细胞缺血坏死,老年脑梗死病因包括年龄、高血压、糖尿病、吸烟、高脂血症、家族遗传等有关,部分患者病因不明,其中动脉粥样硬化仍然是老年脑梗死的主要病理改变,可表现为动脉内膜增厚、斑块形成、动脉狭窄等^[3,4],动脉硬化斑块好发于颈内动脉虹吸段、颈动脉分叉处等,斑块的大小关乎动脉腔的通畅,斑块纤维膜是否破溃关乎是否形成附壁血栓,斑块是否稳定关乎是否出现斑块脱落而引起的栓塞,进而可出现脑梗死。MES 是

脑梗死危险因素^[5],欧洲脑卒中组织(ESO)指出经颅多普勒(TCD)是监测脑血流中 MES 的唯一方法^[6]。Treg 在维持人体正常免疫耐受中发挥重要的作用^[7,8],其在脑梗死急性期间的具体作用机制尚不明确,近来研究表明,只有高表达 CD25 的 Treg 在免疫抑制功能方面更具代表性。ApoA1 为凋亡因子^[9],其属于肿瘤坏死因子(TNF)受体家族。脑梗死急性期大量脑细胞死亡,继而大量胶质细胞增殖,凋亡伴随在脑梗死全过程^[10],Lp-PLA2 是一种新的炎症标记物,具有促炎症的作用,Lp-PLA2 在破裂动脉粥样斑块中凋亡

的巨噬细胞高聚集区中高度表达^[11,12]。

动脉粥样硬化不可避免地伴随在人类的生命之中,颈部动脉粥样硬化是全身动脉粥样硬化的缩影,可在局部表现为形成斑块,斑块也可随年龄增加而增大,可能因为治疗而稳定或逆转。斑块的性状受多种因素影响,一般年龄、男性、吸烟、高血压、糖尿病及高脂血症等是斑块形成的常见因素^[13]。有些斑块可短期内增大明显,斑块内粥样物质短期内增多,纤维帽相对变薄,一旦破溃,则斑块表面容易形成血小板、红细胞等聚集,在局部形成新的血栓或者脱落后形成栓子。本研究发现在急性期不稳定斑块患者外周血 ApoA1 升高, Treg 降低,提示免疫耐受受到抑制,细胞凋亡增速,可能与斑块内皮细胞、泡沫细胞和梗死的脑细胞有关。Tsimikas 等^[14]认为 Lp-PLA2 是识别脑卒中风险的预警因子,与本文结果一致。

脑血供分为全循环和后循环,一般约有 4/5 的脑血供来自前循环,颈内动脉狭窄则引起血供减少,为了满足脑血供被迫经基底动脉环等代偿,可引起前循环盗血、代偿性血压增高,心脏负担代偿增加,灌注不足引起前后循环缺血,后循环过度灌注诱发后循环脑出血等风险^[15],动脉粥样硬化斑块体积的扩增是导致颈动脉管腔狭窄最常见的病因。如果不稳定斑块破溃,表面聚集形成血栓,也可短时间引起管腔狭窄或闭塞。颈动脉狭窄常位于颈内外动脉分叉段、虹吸部及颈内动脉末段^[16]。这些部位发生血流动力学改变,血流对动脉内膜冲击大,容易形成内皮损伤和湍流,长期颈动脉狭窄可引起智能下降^[17]。本研究提示狭窄部位有利于 MES 形成。脑梗死预警因子 Lp-PLA2 水平高,可能与狭窄部位血管内皮损伤有关,大部分颈动脉狭窄慢性进展形成,即便是在发生急性脑梗死时,炎症免疫反应也相对较轻。

TCD 可以检测到的血流中通过的微小颗粒信号称为 MES,这些小颗粒多为微小血栓碎片等^[18]。脑血流中 MES 的发现加深了对脑梗死发病机制的理解,特别是脑栓塞机制有了直观的证据, MES 对缺血性脑卒中有预警作用, MES 减少是有疗效的依据^[19]。本研究说明 MES 阳性患者体内明显的存在炎症免疫反应, Treg 降低提示患者免疫耐受不稳,出现了急性免疫反应, ApoA1 升高可能与微小栓子栓塞引起脑细胞坏死有关,尽管这种栓塞在目前的弥散加权成像 (DWI) 也不能完全可视,但确实存在。 Lp-PLA2 水平高提示血管内皮炎症较重,也是 MES 大部分来源于受损的动脉内膜的侧面证据。患者多来源于主动脉弓以上的前循环系统,如果在颈动脉未发现栓子来源则提示临床应该向下寻找如心脏和主动脉弓甚至下肢动脉病变。

综上,脑梗死是一类血栓病变,是一类血管壁病变,也是一类炎症免疫病变。脑梗死急性期对上述指标检测有利于合理判断病情,对充分理解发病机制有

帮助,对抗血小板聚集、调制稳定斑块抗炎等治疗的强度和疗程有指导意义,对个体化诊治有促进作用。

4 参考文献

- Lee JH, Kwon KY, Yoon SY, *et al.* Characteristics of platelet indices, neutrophil-to-lymphocyte ratio and erythrocyte sedimentation rate compared with C reactive protein in patients with cerebral infarction; a retrospective analysis of comparing haematological parameters and C reactive protein [J]. *BMJ Open*, 2014; 4(11): e006275.
- Garcia JH, Liu KF, Ho KL. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex [J]. *Stroke*, 1995; 26(4): 636-43.
- Kobayashi A, Wardlaw JM. Oxfordshire community stroke project clinical stroke syndrome and appearances of tissue and vascular lesions on pre-treatment CT in hyperacute ischemic stroke among the first 510 patients in the third international stroke trial (IST-3) [J]. *Stroke*, 2009; 40(3): 743-8.
- Kinsella JA, Tobin WO, Kavanagh GF, *et al.* Increased thrombin generation potential in symptomatic versus asymptomatic moderate or severe carotid stenosis and relationship with cerebral microemboli [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2015; 86(4): 460-7.
- Müller HF, Viacoz A, Fisch L, *et al.* ¹⁸F-DG-PET-CT: an imaging biomarker of high-risk carotid plaques. Correlation to symptoms and microembolic signals [J]. *Stroke*, 2014; 45(12): 3561-6.
- Jeong HS, Song HJ, Lee JH, *et al.* Interpretation of TCD spectral patterns detected during carotid artery stent interventions [J]. *J Endovasc Therapy*, 2011; 18(4): 518-26.
- Wang WJ, Liu FJ, Liu X, *et al.* Adoptive transfer of pregnancy-induced CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells reverses the increase in abortion rate caused by interleukin 17 in the CBA/JxBALB/c mouse model [J]. *Hum Reprod*, 2014; 29(5): 946-52.
- Dennis B, Gower L, Emanuela I, *et al.* Mast cells suppress murine GVHD in a mechanism independent of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells [J]. *Blood*, 2013; 122(22): 3659-65.
- Fortner KA, Rosemary K. Fas (CD95/APO-1) limits the expansion of T lymphocytes in an environment of limited T-cell antigen receptor/MHC contacts [J]. *Int Immunol*, 2011; 23(2): 75-88.
- Fortner KA, Budd RC. The death receptor Fas (CD95/APO-1) mediates the deletion of T lymphocytes undergoing homeostatic proliferation [J]. *J Immunol*, 2005; 175(7): 4374-82.
- Matter CM, Chadjichristos CE, Meier P, *et al.* Role of endogenous Fas (CD95/Apo-1) ligand in balloon-induced apoptosis, inflammation, and neointima formation [J]. *Circulation*, 2006; 113(15): 1879-87.
- Wang T, Karino K, Yamasaki M, *et al.* Effects of G994T in the Lp-PLA2 gene on the plasma oxidized LDL level and carotid intima-media thickness in Japanese: the Shimane Study [J]. *Am J Hypertens*, 2009; 22(7): 742-7.
- 邵红, 谢立凯, 吕丹. 2 型糖尿病患者血糖波动与颈动脉粥样硬化斑块的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2013; 31(12): 4518-20.
- Tsimikas S, Mallat Z, Talmud PJ, *et al.* Elevated oxidized phospholipids on apolipoprotein B-100 particles predict 6-year cardiovascular events in the Epic-Norfolk Study: potentiation of risk with lipoprotein-associated (Lp-PLA2) and soluble phospholipase A2 (sPLA2) activity [J]. *Circulation*, 2008; 118: 118-23.
- Sharma VK, Paliwal PR, Sinha AK. Plaque inflammation imaging in severe carotid stenosis and recurrent cerebral ischemia [J]. *J Nucl Med Technol*, 2015; 43(4): 299-300.

- 16 董礼全. MES 与 CD4⁺CD25⁺Treg 等指标的研究[D]. 青岛:青岛大学, 2016.
- 17 向静. 老年认知功能障碍与颈动脉硬化及相关基因多态性研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2013.
- 18 Wang HJ, Kim SJ, Hong JM, et al. Microembolic signals in acute posterior circulation cerebral ischemia: sources and consequences [J]. Stroke, 2012; 43(4): 747-52.
- 19 Al-Atassi T, Lam K, Forgie M, et al. Cerebral microembolization after bioprosthetic aortic valve replacement; comparison of Warfarin plus aspirin versus aspirin only [J]. Circulation, 2012; 126(11 suppl 1): S239-44.

[2016-07-07 修回]

(编辑 张慧)

脂多糖在人缺氧诱导心肌细胞凋亡中的作用及相关机制

杜 锋 (甘肃省第二人民医院急诊科, 甘肃 兰州 730000)

〔摘要〕 目的 探讨脂多糖在人缺氧诱导心肌细胞凋亡中的作用及机制。方法 收集在该院行风心病换瓣手术的患者二尖瓣乳头肌组织, 分离、纯化得到心肌细胞; 分别用 40、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 脂多糖预处理心肌细胞 6 h, 设置空白对照; 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、3% O_2 、5% CO_2 、95% N_2 缺氧条件下培养 24 h; 原位末端标记 (TUNEL) 法测定凋亡细胞。分别与脂多糖处理前后、缺氧诱导后采用 qRT-PCR 检测细胞中 miR-211 表达情况, Western 印迹检测细胞中 Sirt1 蛋白水平。结果 缺氧条件下培养 24 h 后, 脂多糖组心肌细胞凋亡率明显高于对照组, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 脂多糖组明显高于 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 脂多糖组 (均 $P < 0.05$)。脂多糖处理前, 3 组细胞中 miR-211、Sirt1 相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 脂多糖处理 6 h 和缺氧诱导后, 40、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 脂多糖组细胞中 miR-211 相对表达量均明显高于同期对照组和脂多糖处理前, Sirt1 蛋白相对表达量均明显低于同期对照组 (均 $P < 0.05$), 其中 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 脂多糖组变化更明显。结论 脂多糖可加速缺氧诱导的心肌细胞凋亡, 其作用机制与上调 miR-211 表达及抑制 Sirt1 蛋白表达有关。

〔关键词〕 心肌细胞; 脂多糖; miR-211; Sirt1; 细胞凋亡

〔中图分类号〕 R54 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1005-9202(2018)03-0680-03; doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2018.03.068

脂多糖是引发炎症和休克的主要介质之一, 可诱导心肌细胞炎性因子表达, 引发心肌细胞肥大、凋亡, 导致充血性心力衰竭^[1]。心肌损伤是导致难治性低血压及脓毒症死亡的主要因素, 通过体外缺氧处理可较好地模拟体内心肌缺血状态^[2]。微小 RNA (miRNA) 在细胞多种代谢途径中起到关键调控作用。相关研究显示, miRNA 参与了脂多糖的病理生理过程, 脂多糖可通过影响 miRNA 表达进而调节细胞凋亡和炎症反应^[3]。最新研究发现, miR-211 在卵巢癌等多种肿瘤细胞中异常表达, 而 Sirt1 可能是 miR-211 潜在的作用靶蛋白^[4]。本研究旨在探究 miR-211/Sirt1 信号通路在脂多糖对心肌细胞损伤中的作用。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂 肥大心肌组织取自甘肃省第二人民医院行风心病换瓣手术的患者二尖瓣乳头肌; 脂多糖购于北京中生瑞泰科技有限公司; 聚氰基丙烯酸正丁酯 (BCA) 试剂盒、细胞增殖与活性检测 (CCK-8) 试剂盒、蛋白裂解液购于上海玉博生物科技有限公司; RT-PCR 逆转录试剂盒、Sybr Green II 购于北京亚太恒信生物科技有限公司; Sirt1 抗体购于美国 CST 中国分公司。

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞分离与纯化 取二尖瓣乳头肌组织, 剪成边长为 1 mm^3 的正方体组织糜, 3 g/L 胰蛋白酶和 1 g/L 胶原酶消化后收集悬液, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 培养基悬浮, 接种在 3 cm 细胞培养皿中, 差速贴壁法在细胞培养箱中孵育 2 h, 将培养液离心后再次接种到培养基中, 细胞密度约为 $6 \times 10^5/\text{L}$, 每 3 d 换液 1 次, 取 4~6 d 细胞进行实验。细胞经电镜、免疫组化鉴定, 除肥大外无其他病变。加入不同浓度脂多糖进行处理 6 h 后将其分为对照组、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 脂多糖组及 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 脂多糖组。

1.2.2 缺氧条件下培养心肌细胞 先用大培养皿将 DMEM 培养基展开放入低氧 (3% O_2 、5% CO_2 、95% N_2) 培养箱中培养 3 h, 取 4~6 d 状态良好的原代心肌细胞, 弃去原培养液, 滴加胰蛋白酶和乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液, 光学显微镜下观察, 多数细胞变圆、突起收回时用吸管去除酶溶液, 加入 3~4 ml 经低氧饱和处理的 DMEM 培养基, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 3% O_2 、5% CO_2 、95% N_2 培养箱, 在此缺氧条件下培养 24 h, 再放回 22% O_2 、5% CO_2 的培养箱中 4 h。

1.2.3 原位末端标记 (TUNEL) 测定凋亡细胞 采用 TUNEL 法标记凋亡细胞, 取 3 组细胞, 用 10% 中性甲醛溶液固定 20 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 用 0.3% TRITONX-100 通透 10 min, PBS 洗涤后按 1:9 比例混合 A 液和 B 液, 将配成的 TUNEL 反应混合液均匀覆盖到细胞表面, 常规培养 2 h, PBS 洗涤后用含

基金项目: 甘肃省科技厅科技支撑计划项目 (1404FKCA109)

第一作者: 杜 锋 (1963-), 男, 副主任医师, 主要从事急诊外科研究。