

## · 论著 ·

# 急性冠脉综合征患者血清骨髓相关蛋白水平、外周血单个核细胞 Toll 样受体 4 表达情况及其相关性研究

刘贵京<sup>1</sup>, 施海法<sup>2</sup>, 张素华<sup>2</sup>, 王晓利<sup>1</sup>, 范晓飞<sup>1</sup>, 康美玉<sup>3</sup>, 呼金田<sup>4</sup>, 燕霞<sup>5</sup>

**【摘要】** **目的** 探讨急性冠脉综合征 (ACS) 患者血清骨髓相关蛋白 (MRP) 水平、外周血单个核细胞 Toll 样受体 4 (TLR4) 表达情况, 并分析二者的相关性。**方法** 选取 2015 年 3 月—2016 年 3 月河北工程大学附属医院内科收治的 ACS 患者 50 例, 其中急性心肌梗死 (AMI) 25 例 (AMI 组)、不稳定型心绞痛 (UAP) 25 例 (UAP 组); 另选取同期稳定型心绞痛 (SAP) 患者 20 例作为 SAP 组, 体检健康者 24 例作为对照组。比较 4 组受试者血压、血糖相关指标、血脂指标、血清 MRP 水平及外周血单个核细胞 TLR4 阳性率, ACS 患者血清 MRP 水平与外周血单个核细胞 TLR4 阳性率的相关性分析采用 Pearson 相关分析。**结果** (1) 4 组受试者舒张压、空腹血糖、糖化血红蛋白 (HbA<sub>1c</sub>)、高密度脂蛋白 (HDL) 及低密度脂蛋白 (LDL) 比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); UAP 组和 AMI 组患者收缩压、TG 高于对照组和 SAP 组 ( $P<0.05$ )。 (2) UAP 组和 AMI 组患者血清 MRP 水平和外周血单个核细胞 TLR4 阳性率高于对照组和 SAP 组 ( $P<0.05$ ); 对照组与 SAP 组、UAP 组与 AMI 组受试者血清 MRP 水平和外周血单个核细胞 TLR4 阳性率比较, 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。 (3) Pearson 相关分析结果显示, 血清 MRP 水平与 ACS 患者外周血单个核细胞 TLR4 阳性率呈正相关 ( $r=0.796, P<0.01$ )。**结论** ACS 患者血清 MRP 水平及外周血单个核细胞 TLR4 表达升高, 且二者呈正相关, 推测 MRP 可能通过激活 TLR4 而参与 ACS 的发生、发展。

**【关键词】** 急性冠脉综合征; 骨髓相关蛋白; Toll 样受体 4

**【中图分类号】** R 542.2 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2018.10.006

刘贵京, 施海法, 张素华, 等. 急性冠脉综合征患者血清骨髓相关蛋白水平、外周血单个核细胞 Toll 样受体 4 表达情况及其相关性研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2018, 26 (10): 24-27. [www.syxnf.net]

LIU G J, SHI H F, ZHANG S H, et al. Serum MRP level and PBMC TLR4 ratio in patients with acute coronary syndrome and their correlation [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2018, 26 (10): 24-27.

## Serum MRP Level and PBMC TLR4 Ratio in Patients with Acute Coronary Syndrome and Their Correlation LIU

Gui-jing<sup>1</sup>, SHI Hai-fa<sup>2</sup>, ZHANG Su-hua<sup>2</sup>, WANG Xiao-li<sup>1</sup>, FAN Xiao-fei<sup>1</sup>, KANG Mei-yu<sup>3</sup>, HU Jin-tian<sup>4</sup>, YAN Xia<sup>5</sup>

1. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan 056000, China

2. Department of Emergency, the Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan 056000, China

3. Medical College of Hebei University of Engineering, Handan 056000, China

4. Department of Laboratory Medicine, the Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan 056000, China

5. Department of Medical Matters, the Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan 056000, China

Corresponding author: LIU Gui-jing, E-mail: 13333006956@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the serum MRP level and PBMC TLR4 ratio in patients with acute coronary syndrome and their correlation. **Methods** From March 2015 to March 2016, a total of 50 patients with acute coronary syndrome were selected in the Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, thereinto 25 cases with acute myocardial infarction were served as AMI group, the other 25 cases with unstable angina pectoris were served as UAP group; meanwhile a total of 20 patients with stable angina pectoris were selected as SAP group, a total of 24 healthy volunteers were selected as control group. Blood pressure, blood glucose related index, blood lipid index, serum MRP level and PBMC TLR4 positive rate were compared in the four groups, and Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between serum MRP level and PBMC TLR4 positive rate in patients with acute coronary syndrome. **Results** (1) No

基金项目: 政府资助省级临床医学优秀人才项目 (361037)

1.056000 河北省邯郸市, 河北工程大学附属医院内科 2.056000 河北省邯郸市, 河北工程大学附属医院急诊科 3.056000 河北省邯郸市, 河北工程大学医学院 4.056000 河北省邯郸市, 河北工程大学附属医院检验科 5.056000 河北省邯郸市, 河北工程大学附属医院医务处

通信作者: 刘贵京, E-mail: 13333006956@163.com

statistically significant differences of DBP, FGP, HbA<sub>1c</sub>, HDL or LDL was found in the four groups ( $P>0.05$ ), while SBP and TG in UAP group and AMI group were statistically significantly higher than those in control group and SAP group ( $P<0.05$ ).

(2) Serum MRP level and PBMC TLR4 positive ratio in UAP group and AMI group were statistically significantly higher than those in control group and SAP group ( $P<0.05$ ), while no statistically significant differences of serum MRP level or PBMC TLR4 positive rate was found between control group and SAP group, between UAP group and AMI group ( $P>0.05$ ).

(3) Pearson correlation analysis results showed that, serum MRP level was positively correlated with PBMC TLR4 positive rate in patients with acute coronary syndrome ( $r=0.796$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** Serum MRP level and PBMC TLR4 positive rate are elevated in patients with acute coronary syndrome, and they are positively correlated, MRP may play a role in the occurrence development of acute coronary syndrome through activating TLR4.

**【Key words】** Acute coronary syndrome; Myeloid related proteins; Toll-like receptor 4

动脉粥样硬化以动脉壁炎性改变为主要特征, 其中炎性反应不仅在动脉粥样硬化斑块形成过程中发挥重要作用, 还影响斑块稳定性<sup>[1]</sup>。骨髓相关蛋白(myeloid related proteins, MRP)是钙结合蛋白S100家族成员, 主要通过钙离子依赖性方式形成特殊的异二聚体MRP8/MRP14而发挥作用。近年研究发现, MRP8/MRP14蛋白复合体能作为特异性配体与Toll样受体4(TLR4)结合, 刺激CD<sub>14</sub><sup>+</sup>单核细胞分泌炎症因子, 引发一系列炎症反应, 进而参与冠状动脉不稳定斑块形成<sup>[2-3]</sup>。Toll样受体(TLRs)是一类模式识别受体, 可介导免疫炎症反应, 是连接先天性免疫和获得性免疫的桥梁。既往研究结果显示, TLR4是与动脉粥样硬化关系最为密切的TLRs之一, 其主要通过识别内源性和外源性分子而启动炎症反应<sup>[4]</sup>。本研究旨在探讨急性冠脉综合征(ACS)患者血清MRP水平、外周血单个核细胞TLR4表达情况及其相关性, 现报道如下。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 选取2015年3月—2016年3月河北工程大学附属医院心内科收治的ACS患者50例, 均经冠状动脉造影确诊, 其中急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)25例(AMI组)、不稳定型心绞痛(unstable angina pectoris, UAP)25例(UAP组); 另选取同期稳定型心绞痛(stable angina pectoris, SAP)患者20例作为SAP组, 体检健康者24例作为对照组。4组受试者年龄、男性比例、体质指数(BMI)及吸烟率比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ , 见表1), 具有可比性。排除标准: (1)合并急性感染、恶性肿瘤、自身免疫系统疾病者; (2)合并严重肝、肾功能障碍者; (3)近1周内内有创伤史或手术史者。本研究经河北工程大学附属医院伦理委员会审核批准, 所有受试者知情。

### 1.2 观察指标

1.2.1 血压、血糖相关指标及血脂指标 常规测量4组受试者收缩压、舒张压, 采用全自动生化分析仪(西门子Siemens公司生产, 型号: ADVIA 2400)检测4组受试者空腹血糖、糖化血红蛋白(HbA<sub>1c</sub>)、三酰甘油(TG)、

表1 4组受试者一般资料比较

组别	例数	年龄 ( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	男性 [ $n$ (%) ]	BMI ( $\bar{x} \pm s$ , kg/m <sup>2</sup> )	吸烟 [ $n$ (%) ]
对照组	24	57.4 ± 11.5	13 (54.2)	23.0 ± 3.1	9 (37.5)
SAP组	20	55.2 ± 13.7	11 (55.0)	24.0 ± 3.9	7 (35.0)
UAP组	25	57.9 ± 10.5	13 (52.0)	23.1 ± 2.8	9 (36.0)
AMI组	25	58.6 ± 11.2	15 (60.0)	22.2 ± 3.1	10 (40.0)
$\chi^2$ (F) 值		0.340*	0.347	1.259*	0.142
P 值		0.796	0.951	0.293	0.986

注: SAP= 稳定型心绞痛, UAP= 不稳定型心绞痛, AMI= 急性心肌梗死, BMI= 体质指数; \*为F值

高密度脂蛋白(HDL)及低密度脂蛋白(LDL)。

1.2.2 血清MRP水平 采集4组受试者静脉血2 ml, 2 000 r/min离心15 min(离心半径8 cm), 留取血清并置于-75℃冰箱中保存待测, 采用酶联免疫吸附试验检测血清MRP水平。

1.2.3 外周血单个核细胞TLR4表达情况 采集4组受试者静脉血2 ml, 采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K2)抗凝处理, 在Ficoll密度梯度离心管中制备外周血单个核细胞。以 $5 \times 10^6$ 个细胞/ml浓度将细胞重悬于Stain Buffer(pH值为7.4的磷酸缓冲液+2%小牛血清+0.1%叠氮钠), 采用固定液和破膜液处理, 后1 000 r/min离心5 min(离心半径8 cm), 弃上清; 采用3 ml Stain Buffer清洗细胞3遍, 将细胞重悬于Stain Buffer, 使细胞终浓度为 $10 \times 10^6$ 个细胞/ml。取100  $\mu$ l细胞悬液( $10 \times 10^6$ 个细胞/ml)置于BD试管中, 加入5  $\mu$ l PE标记鼠抗人TLR4单抗(美国BD公司生产)混匀后室温避光孵育60 min。采用3 ml Stain Buffer清洗细胞1遍, 细胞沉淀用500 ml Stain Buffer重悬后上流式细胞仪(美国BD公司)检测外周血单个核细胞TLR4阳性率。

1.3 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析, 计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 $q$ 检验; 计数资料分析采用 $\chi^2$ 检验; 血清MRP水平与ACS患者外周血单个核

细胞TLR4阳性率的相关性分析采用Pearson相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 血压、血糖相关指标及血脂指标 4组受试者舒张压、空腹血糖、HbA<sub>1c</sub>、HDL及LDL比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。4组受试者收缩压及TG比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );UAP组和AMI组患者收缩压及TG高于对照组和SAP组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,见表2)。

2.2 血清MRP水平和外周血单个核细胞TLR4阳性率 4组受试者血清MRP水平和外周血单个核细胞TLR4阳性率比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );UAP组和AMI组患者血清MRP水平和外周血单个核细胞TLR4阳性率高于对照组和SAP组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );对照组与SAP组、UAP组与AMI组受试者血清MRP水平和外周血单个核细胞TLR4阳性率比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,见表3)。

2.3 相关性分析 Pearson相关分析结果显示,血清MRP水平与ACS患者外周血单个核细胞TLR4阳性率呈正相关( $r = 0.796, P < 0.01$ )。

表3 4组受试者血清MRP水平和外周血单个核细胞TLR4阳性率比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of serum MRP level and PBMC TLR4 positive rate in the four groups

组别	例数	MRP (mg/L)	外周血单个核细胞 TLR4 阳性 (%)
对照组	24	4.8 ± 1.9	40.75 ± 12.94
SAP组	20	5.6 ± 1.3	48.52 ± 13.45
UAP组	25	12.2 ± 3.8 <sup>ab</sup>	72.79 ± 16.81 <sup>ab</sup>
AMI组	25	13.8 ± 4.3 <sup>ab</sup>	79.62 ± 19.25 <sup>ab</sup>
F值		48.910	32.782
P值		<0.001	<0.001

注:MRP=骨髓相关蛋白,TLR4=Toll样受体4;与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与SAP组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

表2 4组受试者血压、血糖相关指标及血脂指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of blood pressure, blood glucose related index and blood lipid index in the four groups

组别	例数	收缩压 (mm Hg)	舒张压 (mm Hg)	空腹血糖 (mmol/L)	HbA <sub>1c</sub> (%)	TG (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)
对照组	24	118 ± 10	80 ± 11	5.36 ± 1.31	5.4 ± 0.9	2.19 ± 0.52	1.22 ± 0.21	2.72 ± 0.84
SAP组	20	125 ± 18	83 ± 15	5.35 ± 1.16	5.6 ± 0.7	2.07 ± 0.45	1.23 ± 0.15	2.58 ± 0.63
UAP组	25	140 ± 14 <sup>ab</sup>	88 ± 16	5.77 ± 1.27	5.7 ± 0.8	2.40 ± 0.30 <sup>ab</sup>	1.21 ± 0.52	3.08 ± 0.61
AMI组	25	143 ± 13 <sup>ab</sup>	90 ± 19	5.60 ± 1.45	5.7 ± 0.8	2.53 ± 0.38 <sup>ab</sup>	1.05 ± 0.31	2.90 ± 0.59
F值		17.589	1.980	0.565	0.746	5.563	1.554	2.356
P值		<0.001	0.123	0.640	0.527	0.002	0.206	0.077

注:HbA<sub>1c</sub>=糖化血红蛋白,TG=三酰甘油,HDL=高密度脂蛋白,LDL=低密度脂蛋白;与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与SAP组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

## 3 讨论

ACS是冠状动脉不稳定斑块破裂导致不同程度血栓形成引起的血管狭窄或闭塞,其发生机制较为复杂<sup>[5]</sup>。近年来研究表明,免疫炎症反应在斑块易损性方面具有重要作用<sup>[6-7]</sup>。MRP又称为钙卫蛋白,是由MRP8和MRP14组成的异二聚体,其主要表达于有核细胞,是巨噬细胞激活的标志物。既往研究表明,巨噬细胞激活后MRP8和MRP14迅速结合形成MRP8/MRP14异二聚体,进而改变细胞结构和细胞膜位置,加速其分泌<sup>[8-9]</sup>。MRP8/MRP14具有广泛的生物学功能,能被特异性地分泌至炎症病灶处,进而参与炎症反应<sup>[10]</sup>。既往研究表明,MRP能通过损伤内皮细胞骨架蛋白和连接蛋白而导致内皮细胞通透性增加,进而导致内皮细胞功能紊乱;此外,其还能促进内皮细胞血小板反应蛋白表达,诱导血小板黏附和血栓形成,进而参与动脉粥样硬化不稳定斑块形成<sup>[11]</sup>。近年研究发现,MRP8/MRP14可作为TLR4特异性配体而参与炎症反应<sup>[4]</sup>。LOSER等<sup>[12]</sup>研究表明,MRP8/MRP14激活TLR4炎症信号级联反应,并通过FAT/CD36依赖机制释放炎症因子,进而参与炎症反应。YONEKAWA等<sup>[13]</sup>研究发现,MRP8/MRP14作为特异性配体与TLR4结合,刺激CD<sub>14</sub><sup>+</sup>单核细胞分泌炎症因子并引发一系列炎症反应,进而参与冠状动脉不稳定斑块形成。TLRs是介导天然免疫反应的模式识别受体,在炎症和免疫应答过程中具有重要作用。截至目前,TLRs 13个家族成员中TLR4与心血管疾病关系最为密切。TLR4可导致核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)激活,诱导肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素6(IL-6)等炎症因子释放并启动炎症应答<sup>[14]</sup>。

本研究结果显示,UAP组和AMI组患者血清MRP水平高于对照组和SAP组,提示ACS患者血清MRP水平升高;但对照组与SAP组、UAP组与AMI组受试者血清MRP水平间无差异,推测MRP可能是导致冠状动脉粥样硬化斑块不稳定的重要因素之一。本研究结果还显示,UAP组和AMI组患者外周血单个核细胞TLR4



阳性率高于 SAP 组和对照组,提示 ACS 患者外周血单个核细胞 TLR4 表达升高;但对照组与 SAP 组、UAP 组与 AMI 组受试者外周血单个核细胞 TLR4 阳性率间无差异,推测外周血单个核细胞 TLR4 表达可能是导致冠状动脉粥样硬化斑块不稳定的重要因素之一。进一步分析血清 MRP 水平与外周血单个核细胞 TLR4 阳性率关系发现,血清 MRP 水平与 ACS 患者外周血单个核细胞 TLR4 阳性率呈正相关,提示 MRP 可能通过激活 TLR4 而参与 ACS 的发生、发展。

综上所述,ACS 患者血清 MRP 水平及外周血单个核细胞 TLR4 表达升高,且二者呈正相关,推测 MRP 可能通过激活 TLR4 而参与 ACS 的发生、发展,这可能为 ACS 的研究及治疗提供新的思路。但本研究为单中心研究,样本量较小,且研究结果受现有医疗设备及技术水平影响,故存在一定局限性。

作者贡献:刘贵京进行文章的构思与设计,研究的实施与可行性分析,负责文章的质量控制及审校,对文章整体负责、监督管理;施海法、张素华、康美玉、呼金田进行数据收集、整理、分析;燕霞进行结果分析与解释;王晓利、范晓飞负责撰写论文。

本文无利益冲突。

#### 参考文献

- [1] MAYERL C, LUKASSER M, SEDIVY R, et al. Atherosclerosis research from past to present on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow [J]. *Virchows Arch*, 2006, 449 (1): 96-103.
- [2] WYSS C A, NEIDHART M, ALTWEGG L, et al. Cellular actors, Toll-like receptors, and local cytokine profile in acute coronary syndromes [J]. *Eur Heart J*, 2010, 31 (12): 1457-1469. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq084.
- [3] MORROW D A, WANG Y, CROCE K, et al. Myeloid-related protein 8/14 and the risk of cardiovascular death or myocardial infarction after an acute coronary syndrome in the pravastatin or atorvastatin evaluation and infection therapy [J]. *Am Heart J*, 2008, 155 (1): 49-55.
- [4] 李玉红, 谢萍, 李远, 等. TLR4/NF- $\kappa$ B 与急性冠脉综合征的相关性及通心络的干预作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35 (19): 5502-5504. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2015.19.058.
- [5] 李艳, 李小荣. 急性冠脉综合征患者炎症因子水平变化及其与室性心律失常的关系研究 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2016, 24 (12): 7-10. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2016.12.003.
- [6] SATOH S, YADA R, INOUE H, et al. Toll-like receptor-4 is upregulated in plaque debris of patients with acute coronary syndrome more than Toll-like receptor-2 [J]. *Heart Vessels*, 2016, 31 (1): 1-5. DOI: 10.1007/s00380-014-0565-9.
- [7] 周伟. 血清肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、CD40 配体及白介素 1 $\beta$  水平与急性冠脉综合征患者室性心律失常严重程度相关性研究 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2017, 25 (4): 33-35, 47. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2017.04.007.
- [8] 张永军, 汤圣兴. 急性冠状动脉综合征生化标志物研究进展 [J]. *医学综述*, 2010, 16 (3): 429-431. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2010.03.037.
- [9] YONEKAWA K, NEIDHART M, ALTWEGG L A, et al. Myeloid related proteins activate Toll-like receptor 4 in human acute coronary syndromes [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 218 (2): 486-492. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.020.
- [10] MAISEYEU A, BADGELEY M A, KAMPFRATH T, et al. In vivo targeting of inflammation-associated myeloid-related protein 8/14 via gadolinium immunonanoparticles [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32 (4): 962-970. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.244509.
- [11] 赵汉军, 山下静也, 永井義幸, 等. 冠状动脉粥样硬化患者外周血单个核细胞钙结合蛋白 S100A8 和 S100A9 基因表达的变化 [J]. *中国循环杂志*, 2010, 25 (2): 107-110. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2010.02.009.
- [12] LOSER K, VOGL T, VOSKORT M, et al. The toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD $_8^+$  T cells [J]. *Nat Med*, 2010, 16 (6): 713-717. DOI: 10.1038/nm.2150.
- [13] YONEKAWA K, NEIDHART M, ALTWEQQ M, et al. Myeloid related proteins activate Toll-like receptor 4 in human acute coronary syndromes [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 218 (2): 486-492. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.
- [14] WYSS C A, NEIDHART M, ALTWEQQ L, et al. Cellular actors, Toll-like receptors, and local cytokine profile in acute coronary syndromes [J]. *Eur Heart J*, 2010, 31 (12): 1457-1469. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq084.

(收稿日期: 2018-06-05; 修回日期: 2018-09-19)

(本文编辑: 谢武英)