

静脉血栓栓塞症与冠状动脉粥样硬化患者 T 细胞免疫功能变化的比较分析*

周琳¹ 王乐民¹ 蒋金法¹ 徐文俊¹ 许嘉鸿¹ 宋浩明¹

[摘要] **目的:**研究静脉血栓栓塞症(VTE)患者、冠心病(CHD)患者与正常对照组之间 T 淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺)水平变化以及超敏 C-反应蛋白(high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)的差异。**方法:**入选 247 名研究对象,其中正常对照组 82 例,VTE 组 51 例,CHD 组 114 例。分别检测 T 淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺)、hs-CRP、空腹血糖(FBG)以及血脂系列。**结果:**VTE 组与对照组相比,CD3⁺ T 淋巴细胞显著降低($P < 0.05$),CD4⁺ T 淋巴细胞没有显著性差异($P > 0.05$),CD8⁺ T 淋巴细胞显著降低($P < 0.01$),CD4/CD8 比例升高($P < 0.05$)。CHD 组与对照组相比,CD8⁺ T 显著降低($P < 0.01$),CD4/CD8 升高($P < 0.05$)。VTE 组与 CHD 组相比 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 无显著性差异。观察 3 组间 CD 值过低、正常及过高各占比例,并行 χ^2 值检验,结果发现 VTE 组、CHD 组与对照组相比有统计学意义,主要表现在 CD3⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞下降的比例升高;CD4⁺/CD8⁺ 升高的比例显著增多,而 CHD 组与 VTE 组没有明显区别。VTE 组和 CHD 组 hs-CRP 均高于对照组,而 VTE 组和 CHD 组间差异没有统计学意义。**结论:**VTE 组与 CHD 组均存在 T 淋巴细胞免疫功能紊乱,表现为 CD3⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞减少,CD4⁺ T 淋巴细胞没有明显变化,CD4/CD8 比值显著升高。提示 VTE 和 CHD 患者整体的 T 细胞识别抗原和转导活化信号的功能下降,同时 T 细胞直接杀伤病毒微生物的功能显著下降。同时炎症因子 hs-CRP 在 VTE 组及 CHD 组均明显升高,提示相同的炎症免疫机制参与了静脉血栓与动脉血栓的发生发展。

[关键词] 免疫功能;T 淋巴细胞;静脉血栓栓塞症;冠状动脉粥样硬化

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2015.05.016

[中图分类号] R543.5 **[文献标志码]** A

Comparison of immune function of T cells in patients with venous thromboembolism or coronary artery atherosclerosis

ZHOU Lin WANG Lemin JIANG Jinfu XU Wenjun XU Jiahong SONG Haoming
(Department of Cardiology, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai, 200065, China)

Corresponding author: SONG Haoming, E-mail: songhao-ming@163.com

Abstract Objective: Recent studies showed the major risk factors of arterial thrombotic diseases were closely related to venous thrombosis. This study aimed to investigate the expressions of CD3, CD4 and CD8 in T lymphocytes, CD4/CD8 ratio and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) in patients with VTE, coronary artery atherosclerosis (CAA) and healthy subjects. **Method:** A total of 82 healthy subjects, 51 VTE patients and 114 CAA patients were recruited, and the expressions of CD3, CD4 and CD8 in T lymphocytes and CD4/CD8 ratio were determined. The serum hs-CRP was also measured. **Result:** When compared with healthy subjects, VTE patients had significantly reduced CD3 expression ($P < 0.05$), comparable CD4 expression ($P > 0.05$), significantly reduced CD8 ($P < 0.01$) and increased CD4/CD8 ratio ($P < 0.05$). CHD patients had significantly reduced CD8 ($P < 0.01$) and increased CD4/CD8 ratio ($P < 0.05$). However, VTE patients had comparable expressions of CD3, CD4 and CD8 and CD4/CD8 ratio to CAA patients. In addition, results showed, among patients with VTE or CAA, the proportion of patients with reduced CD3⁺ and CD8⁺ T lymphocytes or increased CD4⁺/CD8⁺ ratio increased significantly when compared with healthy subjects. In addition, hs-CRP in VTE group and CAA group was significantly higher than that in healthy subjects. **Conclusion:** The antigen recognition and signal transduction activation of T cells reduce significantly in patients with VTE or CAA, and the killing effect of T cells on pathogens including virus is also significantly compromised. In addition, inflammatory and immune mechanisms are involved the occurrence and development of venous and arterial thrombosis.

Key words immune function; T cell; venous thromboembolism; coronary atherosclerosis

*上海市卫生局课题(No:2010108);上海市科委重点项目课题(No:11411951400);上海市卫生局青年课题(No:2009Y071)

¹同济大学附属同济医院心内科(上海,200065)
通信作者:宋浩明,E-mail:songhao-ming@163.com

以往的观点认为静脉血栓和动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是 2 种完全不同、各自独立的疾病,这种观点正受到挑战。2003 年 Prandoni 等^[1]报道了一过性静脉血栓患者伴有更多发的颈部 AS 斑块,提示动脉硬化可以导致静脉血栓或两者可能分享共同的危险因素。2007 年 Srensen 等^[2]报道了静脉血栓患者随后 20 年内因急性冠脉事件再住院的队列研究,发现静脉血栓栓塞症(VTE)患者随后的心血管事件风险明显增加。2008 年 Ageno 等^[3]采用 meta 分析评估心血管危险因素与 VTE 的关系,发现动脉血栓性疾病的主要危险因素与静脉血栓明显相关,提示心血管疾病的危险因素也直接参与了 VTE 的发病。进一步探索这种关联性的潜在机制,有望对 VTE 发病机制的探索、高危人群的筛选、危险因素的修正,乃至 VTE 的一级和二级预防具有重大意义。在以往研究的基础上笔者进一步比较本院 VTE、冠心病(CHD)患者及正常对照组的 T 细胞免疫功能、超敏 C-反应蛋白(hs-CRP)及心血管危险因素,分析静脉血栓与动脉血栓的关联性,探索 VTE 的发病机制以及易患因素。

1 对象与方法

1.1 对象

选取 2008-01—2012-08 同济大学附属同济医院就诊的患者 247 例,其中明确诊断 VTE 且排除 CHD 的住院患者 51 例(VTE 组),CHD 住院患者 114 例(CHD 组),门诊体检的健康者 82 例(正常对照组),实验经伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。其中 VTE 和 CHD 患者均排除恶性肿瘤、自身免疫性疾病、服用免疫抑制剂、动脉血栓的患者。CHD 患者的诊断符合中华医学会心血管分会 2007 年《冠心病诊断与治疗指南》中诊断标准,并排除先天性心脏病、心肌病、瓣膜病。肺血栓栓塞症(PTE)患者的诊断均符合以下 3 项中任意 2 项:①选择性肺动脉造影显示肺动脉阻塞或者充盈缺损;②肺通气-灌注扫描显示单发或者多发的血流灌注缺损、通气正常或者不正常,通气-灌注比值不匹配;③临床诊断:具有肺栓塞危险因素及临床表现、心电图和胸片排除其他心肺疾病,并且超声心动图、胸部 CT、动脉血气分析、D-D 二聚体检测、Wells 评分等相结合支持 PTE 诊断者。深静脉血栓(DVT)由下肢血管彩超确诊。

1.2 方法

化验指标均为患者入院及门诊时测定,所有受试者均在清晨采取空腹肘静脉血,应用 BECKMAN COULTER 检测试剂盒,取部分检测样本在 BECKMAN 全自动生化分析仪上检测 hs-CRP、FBG、总胆固醇(total cholesterin, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high

density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)。取部分检测样本应用美国 BD 公司 CD3/CD4/CD8 三色单克隆抗体,采用 EPICS XL-II 流式细胞仪(美国 BECKMANCOULTER 公司)对 T 细胞表面分化抗原进行检测。

1.3 统计学处理

所有数据汇总后,采用 Epidata3.1 进行双份录入比对。统计分析采用 SPSS14.0 软件分析。正态分布的连续型变量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。偏态分布的连续型变量以中位数和四分位间距表示,采用 Wilcoxon 检验。离散型变量采用频数和百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。计算相对危险度(odd ratio, OR)和 95% 置信区间(confidence intervals, CI)。所有检验均为双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组基线数据及 CD 值比较

247 名研究对象的基线数据及 CD3、CD4、CD8、CD4/CD8 比值见表 1。

2.2 3 组间组两两比较的 χ^2 值

CD3 测定正常值:60%~85%;CD4 测定正常值:24.5%~48.8%;CD8 测定正常值:18.5%~42.1%;CD4/CD8 测定正常值:1.02~1.94:1。笔者分别观察了对照组、VTE 组、CHD 组 T 细胞 CD 系列过低、正常及过高各占比例,同时行 χ^2 值检验,结果发现 3 组相比均有统计学意义,主要表现在 CD3 和 CD8⁺ T 细胞下降的比例升高;CD4/CD8 升高的比例显著增多($P < 0.01$)。而 CHD 组与 VTE 组没有明显区别($P > 0.05$)。其中 VTE 组 CD3⁺ T 异常 18 例(16 例降低,2 例升高),CD4⁺ T 细胞异常 18 例(7 例降低,11 例升高),CD8⁺ T 细胞异常 15 例(均降低),CD4/CD8 异常 30 例(9 例降低,21 例升高),升高比例高达 42%,见表 2。

3 讨论

DVT 和 PTE 具有高发病率、高病死率和高误诊率、高漏诊率的特点,据美国报道,每年有 0.05% 的患者发生 DVT^[4]。近 20 年,亚洲(包括中国、日本、泰国、新加坡、台湾等)PTE 的临床报道例数逐年大幅升高^[5]。目前为止,VTE 的病因及发病机制并不清楚。现在延用的仍是 Vichrow(1856 年)提出的血栓形成三要素学说即血流缓慢、凝血功能亢进和血管壁损伤。然而,获得性 VTE 的发生仅用三要素学说难以解释临床上的困惑。美国胸科学会(ACCP)连续多年制订血栓预防指南对外科手术患者进行危险分层以及应用抗凝药物治疗或预防 VTE,但 VTE 的发病率不减反增。

表 1 患者的基线数据及 CD3、CD4、CD8、CD4/CD8 比值

Table 1 Characteristics, expressions of CD3, CD4, CD8 and CD4/CD8 ratio in different groups at baseline

项目	例(%)		
	对照组	VTE 组	CHD 组
例数	82	51	114
男性	27(32.9)	15(45.5)	51(44.7)
年龄/岁	64.10±15.20	66.00±15.10	67.00±9.60
吸烟	36(43.9)	8(15.7) ¹⁾	28(24.6) ¹⁾
饮酒	13(15.9)	4(7.8)	10(8.8)
BMI	24.90±3.70	24.70±2.53	23.80±3.50
高血压	0	21(41.2) ¹⁾	95(83.3) ¹⁾²⁾
糖尿病	0	9(17.6) ¹⁾	33(28.9) ¹⁾
FBG/(mg·dl ⁻¹)	4.53±1.07	5.85±2.93 ¹⁾	6.29±3.39 ¹⁾
TC/(mg·dl ⁻¹)	4.50±0.90	5.05±1.12 ¹⁾	4.93±1.23 ¹⁾
HDL-C/(mg·dl ⁻¹)	1.15±0.32	1.02±0.35 ¹⁾	0.94±0.26 ¹⁾
LDL-C/(mg·dl ⁻¹)	2.80±0.78	3.36±1.01 ¹⁾	3.30±0.99 ¹⁾
TG/(mg·dl ⁻¹)	1.67±1.28	1.96±1.93	1.85±1.40
hs-CRP/(mg·L ⁻¹)	6.17±5.38	18.30±12.00 ¹⁾	17.36±11.76 ¹⁾
CD3	70.90±7.20	65.00±13.90 ¹⁾	66.40±12.40
CD4	39.90±7.20	38.50±13.30	39.10±12.00
CD8	27.90±6.10	22.90±7.40 ¹⁾	24.20±8.80 ¹⁾
CD4/CD8	1.50±0.48	1.91±1.09 ¹⁾	1.85±1.03 ¹⁾

与对照组比较,¹⁾ P<0.05;与 VTE 组比较, P<0.05。

表 2 对照组、VTE 组、CHD 组两两比较的 χ^2 值Table 2 The comparison of χ^2 value between control group, VTE group and CHD group

变量	例(%)		
	对照组	VTE 组	CHD 组
CD3			
过低	3(3.7)	16(32) ¹⁾	34(30.4) ¹⁾²⁾
正常	78(93.9)	32(64) ¹⁾	75(67.0) ¹⁾²⁾
过高	2(2.4)	2(4) ¹⁾	3(2.7) ¹⁾²⁾
CD4			
过低	1(1.2)	7(14) ¹⁾	8(7.1) ¹⁾²⁾
正常	78(94.0)	32(64) ¹⁾	82(73.2) ¹⁾²⁾
过高	4(4.8)	11(22) ¹⁾	22(19.6) ¹⁾²⁾
CD8			
过低	3(3.6)	15(30) ¹⁾	29(25.9) ¹⁾²⁾
正常	79(95.2)	35(70) ¹⁾	82(73.2) ¹⁾²⁾
过高	1(1.2)	—	1(0.9) ¹⁾²⁾
CD4/CD8			
过低	7(8.4)	9(18) ¹⁾	22(19.6) ¹⁾²⁾
正常	70(84.3)	20(40) ¹⁾	51(45.5) ¹⁾²⁾
过高	6(7.2)	21(42) ¹⁾	39(34.8) ¹⁾²⁾

与对照组比较,¹⁾ P<0.01;与 VTE 组比较,²⁾ P>0.05。

有关 AS 发病机制的研究已经经历了一个半世纪,目前研究认为 AS 是一种慢性炎症性疾病。而他汀类药物通过抗炎机制显著降低了 AS 的发生发展,更具有里程碑式的意义。近年来研究认为静脉血栓和 AS 并不是两个各自独立的疾病,他们

之间具有潜在的关联性,并且分享了共同的危险因素,包括肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常(高三酰甘油, HDL 降低)、吸烟等。本研究结果发现, CHD 传统危险因素高血压、高血糖、吸烟、TC、HDL、LDL-C 与静脉血栓显著相关。AS 与 VTE 的这种关联性,为进一步探索 VTE 发病机制,筛选高危人群,以及制定一级和二级预防 VTE 预防措施打开了一扇窗口。

从 2004 年开始,课题组一直致力于 VTE 的基础与临床研究。应用基因芯片联合荧光定量 PCR 技术在外周血细胞检测 PTE 患者 mRNA 变化。发现 T 淋巴细胞相关 mRNA 表达在 PTE 患者组发生显著性降低。表现为 CD3G、CD3D、CD247 和 ZAP-70 的 mRNA 表达显著降低, T 细胞粒酶 A、B mRNA 显著降低,提示细胞毒性 T 细胞杀伤功能受损^[6]。对于 AS, T 淋巴细胞的募集和活化,分泌炎症因子促进 AS 的进展,贯穿于 AS 形成的各个阶段。静脉血栓是否同动脉血栓一样,也是一种炎症反应过程, T 淋巴细胞功能紊乱参与了 VTE 的发生和发展?

在此基础上本研究观察比较了 VTE 患者、CHD 患者及正常对照者的 T 细胞亚群和 hs-CRP 的变化。结果发现 VTE 患者确实存在明显的 T 淋巴细胞功能的紊乱,主要表现在 CD3⁺ T 细胞与 CD8⁺ T 细胞亚群减少, CD4⁺/CD8⁺ 比例显著升高,而 CD4⁺ T 细胞无明显改变。CD3⁺ T 细胞数量

降低则提示患者整体的 T 细胞识别抗原和转导活化信号的功能下降。CD8⁺T 细胞数量显著下降也意味着 CD8⁺CTL 细胞的减少,而 CD8⁺CTL 细胞正是机体细胞免疫的主要效应细胞,表明 T 细胞直接杀伤病毒微生物的功能显著下降。CD4⁺/CD8⁺ 比值,是判断人体免疫功能紊乱的临床诊断敏感指标,增高表明患者细胞免疫功能的下降主要在于整体的活化以及直接杀伤病毒微生物功能的下降,并未显著影响到对免疫应答起辅助和调节作用的 CD4⁺T 细胞。同时本研究发现 CHD 患者 T 细胞免疫紊乱与 VTE 表现完全相似,T 细胞免疫功能存在障碍。

T 细胞的活化、克隆、扩增需要特异性抗原的刺激。某些自身抗体和相关病原微生物病原体如肺炎衣原体、单纯性疱疹、巨细胞病毒,可能作为抗原存在而激活 T 淋巴细胞。感染作为 AS 的重要发病原因,近年来已有不少报道。2006 年, Smeeth 等^[7]报道了 VTE 的发生与感染有关,发现 VTE 常常发生在感染后 2 周内。2011 年 Schmidt 等^[11]回顾性研究了 1.5 万例 VTE 患者,发现感染患者 VTE 风险增加 2 倍,尤其在感染两周内,随后风险逐渐降低。本研究中入选的 VTE 患者近 50% 合并感染,另有 16% 患者 VTE 发生在骨折后 2 周内。2010 年笔者报道了 1 例 SARS 死亡患者在多个脏器发现静脉血栓^[9]和 1 例年轻肺动脉高压患者淋巴结中发现病毒样结构^[10]。病变中发现的病原体是直接引起病理变化还是通过免疫反应起作用尚未明确,也可能与其他危险因素共同起作用。感染——尤其是病毒的感染可导致 T 细胞遭受攻击而受损,从而不同程度地影响机体的免疫系统,出现继发性免疫缺陷。而肿瘤、严重营养不良、服用免疫抑制剂、其他因素(包括高龄、肥胖、糖尿病、高血压、吸烟)等也常伴程度不同的免疫功能异常。因此我们推测免疫机制参与了动脉血栓以及静脉血栓的发生发展。

在所有炎症与细胞因子中,hsCRP 是预测心血管危险最有力的炎症标记物之一,CRP 水平的升高与冠脉病变程度紧密相关。本研究发现 hsCRP 在 VTE 组及 CHD 组均明显升高,提示炎症机制参与了静脉血栓的发病。

综上所述,笔者推测炎症和免疫机制是 AS 和 VTE 相关联的桥梁。共同的危险因素通过炎症免疫反应损伤血管内皮,干扰凝血系统平衡导致静脉或动脉系统的血栓形成。本研究的局限性是研究

方法比较简单,需要通过更深入的临床试验以及实验动物模型进一步证明 VTE 症状和这些免疫的相关性及机制。但是 VTE 炎症免疫学说的提出,可以给我们一些新的启示,同时展现出一种新的研究方向和途径,具有重大意义。

参考文献

- [1] PRANDONI P, BILORA F, MARCHIORI A, et al. An association between atherosclerosis and venous thrombosis[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348:1435-1441.
- [2] SRENSSEN HT, HORVATH-PUHO E, PEDERSEN L, et al. Venous thromboembolism and subsequent hospitalisation due to acute arterial cardiovascular events: a 20-year cohort study[J]. *Lancet*, 2007, 370: 1773-1779.
- [3] AGENO W, BECATTINI C, BRIGHTON T, et al. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: a meta-analysis[J]. *Circulation*, 2008, 117: 93-102.
- [4] FOWKES F J I, PRICE J F, FOWKES F G R. Incidence of diagnosed deep vein thrombosis in the general population: systematic review[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2003, 25:1-5.
- [5] RO A, KAGEYAMA N, TANIFUJI T, et al. Pulmonary thromboembolism: Overview and update from medicolegal aspects[J]. *Leg Med(Tokyo)*, 2008, 10: 57-71.
- [6] DUAN Q, GONG Z, SONG H, et al. Symptomatic venous thromboembolism is a disease related to infection and immune dysfunction[J]. *Int J Med Sci*, 2012, 9: 453-461.
- [7] SMEETH L, COOK C, THOMAS S, et al. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting [J]. *Lancet*, 2006, 367:1075-1079.
- [8] SCHMIDT M, HORVATH-PUHO E, THOMSEN R W, et al. Acute infections and venous thromboembolism[J]. *J Intern Med*, 2012, 271:608-618.
- [9] XIANG-HUA Y, LE-MIN W, AI-BIN L, et al. Severe acute respiratory syn-drome and venous thromboembolism in multiple organs [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182:436-437.
- [10] WANG L, GONG Z, LIANG A, et al. Compromised t-cell immunity and virus-like structure in a patient with pulmonary hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182:434-435.

(收稿日期:2014-07-13;修回日期:2014-08-18)