

趋化因子 CCL21 及其受体 CCR7 与 冠状动脉易损斑块的相关性研究

金鑫¹ 韩朝鑫¹ 王彦富¹ 张慧玲¹ 孙景芝¹ 张宗雷² 李清贤¹

【摘要】 目的:探讨趋化因子 CCL21 及其受体 CCR7 与冠状动脉(冠脉)易损斑块之间的关系。**方法:**选择行冠脉造影(CAG)患者 180 例,其中急性冠脉综合征(ACS)患者 60 例(ACS 组),稳定型心绞痛(SAP)患者 60 例(SAP 组),CAG 正常且没有其他粥样硬化证据患者 60 例(对照组)。ACS 组和 SAP 组患者在 CAG 后行血管内超声(IVUS)检查。采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测血清趋化因子 CCL21 及高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)的浓度,用流式细胞术测定外周淋巴细胞表面 CCR7 的表达水平。**结果:**血清趋化因子 CCL21 浓度与外周淋巴细胞 CCR7 的表达在各组之间有显著差异(均 $P<0.05$);应用 CCL21 判断 ACS 的 ROC 曲线下面积,大于应用 hs-CRP 判断 ACS 的 ROC 曲线下面积 $[(0.803\pm0.027):(0.716\pm0.021), P<0.01]$ 。IVUS 发现 ACS 组主要为脂质斑块(65%),而 SAP 组主要为纤维性斑块(57%),脂质斑块仅占 13%,两组差异有统计学意义($P<0.01$);ACS 组斑块负荷和血管重构指数明显大于 SAP 组($P<0.01$);利用 IVUS 测定的斑块负荷与趋化因子 CCL21 浓度呈显著正相关($r=0.795, P<0.01$),与外周淋巴细胞表面 CCR7 的表达呈显著负相关($r=-0.693, P<0.01$)。**结论:**趋化因子 CCL21 及其受体 CCR7 与冠脉斑块易损性密切相关,较 hs-CRP 具有更高的早期诊断和判断预后的价值。

【关键词】 冠心病;趋化因子;易损斑块;血管内超声

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2015.12.012

【中图分类号】 R541.4 **【文献标志码】** A

The correlation between chemokine CCL21, its receptor CCR7 and coronary vulnerable

JIN Xin¹ HAN Chaoxin¹ WANG Yanfu¹ ZHANG Huiling¹
SUN Jingzhi¹ ZHANG Zonglei² LI Qingxian¹

(¹Shandong Province Key Laboratory of Heart Disease Diagnosis and Treatment, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining, Shandong, 272029, China; ²Jining Medical University)

Corresponding author: LI Qingxian, E-mail: liqingxian1956@126.com

Abstract Objective: To investigate the relationship between the chemotactic factor CCL21 and its receptor CCR7 and coronary vulnerable plaque. **Method:** A total of 180 patients underwent coronary angiography (CAG) was included into three groups: acute coronary syndrome (ACS) group ($n=60$), stable angina pectoris (SAP) group ($n=60$) and control group (patients with normal coronary angiography and without other evidence of atherosclerosis, $n=60$). ACS group and SAP group underwent intravascular ultrasound (IVUS) examination after CAG. Double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA method) was used to detect the serum levels of chemokine CCL21 and hs-CRP, flow cytometry was used to determine the expression of peripheral CCR7. **Result:** Serum levels of chemokine CCL21 concentration and expression of peripheral lymphocyte CCR7 had significant difference in three groups (all $P<0.05$). The area under the ROC curve of CCL21 was greater than that of hs-CRP $[(0.803\pm0.027):(0.716\pm0.021), P<0.01]$. IVUS results showed that ACS group mainly had lipid plaque (65%), and SAP group mainly had fibrous plaque (57%) accompanied by only 13% lipid plaque ($P<0.01$). The plaque load and vascular remodeling index in ACS group were significantly higher than those in SAP group (both $P<0.01$). The plaque load was significantly positively correlated with chemokine CCL21 concentration ($r=0.795, P<0.01$), and significantly negatively correlated with the expression of peripheral lymphocyte surface CCR7 ($r=-0.693, P<0.01$). **Conclusion:** Chemokine CCL21 and its receptor CCR7 are closely related to coronary plaque vulnerability, and have more early diagnosis and prognosis values than hs-CRP.

Key words coronary heart disease; chemokine; vulnerable plaque; intravascular ultrasound

¹山东省心脏疾病诊疗重点实验室 济宁医学院附属医院(山东济宁,272029)

²济宁医学院

通信作者:李清贤, E-mail: liqingxian1956@126.com

冠心病(coronary heart disease, CHD)尤其是急性冠状动脉综合征(acute coronary syndromes, ACS)是严重威胁人类生命健康的一种疾病,目前全球范围内 CHD 患者的患病率和死亡率逐年升高^[1]。易损斑块在 ACS 的发生、发展中发挥关键性作用,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是 CHD 发生的病理基础。目前多数学者认为,AS 是一种免疫炎症反应介导的动脉壁的慢性疾病^[2]。目前研究主要集中在白细胞介素(IL)-8、IL-10、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等炎性因子与易损斑块的关系,而 T 细胞介导的免疫反应与 AS 斑块之间的关系研究较少。近年来相关研究发现,趋化因子受体 CCR7 在心血管疾病的发生、发展中呈现差异性,可能参与其病理生理过程^[3-4]。此课题主要是通过检测血清中 CCL21 在冠心病患者中的表达水平,以及其受体 CCR7 在外周淋巴细胞的表达水平,再结合 IVUS 技术检测斑块特点,以探讨其在 CHD 发展过程中的特点及与易损斑块的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

选择 2012-08—2014-08 在济宁医学院附属医院内科住院行冠脉造影(CAG)患者 180 例,分为 ACS 组 60 例,稳定型心绞痛(SAP)组 60 例和对照组(CAG 正常且没有其他粥样硬化证据)60 例。入选标准:所有患者入院后均行 CAG 检查,冠脉造影证实至少有 1 支冠脉血管管腔狭窄程度 $\geq 50\%$,即可诊断为 CHD,ACS、SAP 诊断均符合 AHA/ACC 诊断标准。冠脉狭窄程度评分标准根据 ACC/AHA 所规定的冠脉血管图像分段计分评价标准,采用 Gensini 评分系统,对每支冠脉血管病变狭窄程度进行定量评价。排除患有肝炎、甲亢、哮喘、肿瘤、血液系统疾病、感染或自身免疫性疾病、外伤、严重肝肾功能不全及有脑血管或周围血管病变的患者。

1.2 方法

所有患者入院后留取空腹静脉血 10 ml,其中 5 ml 静置 2 h 后以 $3\,000\times g$ 离心 10 min,血清标本冻存于 -80°C 冰箱中冰冻保存,采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测 CCL21 及高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)水平,试剂盒购自美国 R&D 公司,严格按说明书操作。其余 5 ml 用于外周 T 淋巴细胞提取,抗人 CD4-FITC、抗人 CCR7-PE 试剂购自美国 BD 公司。入选行 CAG 及 IVUS 患者的操作步骤严格按照根据参考文献[5]中相关操作步骤进行。

1.3 统计学处理

所得计量数据均符合正态分布,方差齐性。数据分析采用 SPSS 15.0 软件进行 t 检验、方差分析及 χ^2 检验,相关性分析采用 Pearson 相关性分析;

多元 Logistic 回归模型分析 CCL21/CCR7 以及心血管病危险因素,应用 ROC 曲线分析法评价 CCL21/CCR7 对 ACS 的早期识别和判断预后的价值。

2 结果

2.1 患者一般临床资料

3 组患者在年龄、性别、血压、BMI、吸烟史、LDL-C、尿酸、肌酐等方面差异无统计学意义,而在空腹血糖、HDL-C、Gensini 评分方面有显著差异(均 $P<0.05$)。见表 1。

2.2 血清 CCL21 浓度及 CCR7 表达水平

各组血清 CCL21 浓度及外周淋巴细胞表面 CCR7 的表达见表 2。

2.3 斑块类型及特点

ACS 及 SAP 组患者冠脉狭窄病变的斑块类型及特点见表 3。

2.4 ROC 分析

在 CHD 患者中应用 CCL21 判断 ACS 的 ROC 曲线下面积为 (0.803 ± 0.027) ,大于应用 hs-CRP 判断 ACS 的 ROC 曲线下面积 (0.716 ± 0.021) ($P<0.01$)。

2.5 相关性分析

趋化因子 CCL21 浓度与 IVUS 的测值 PB 呈显著正相关($r=0.795$, $P<0.01$),外周淋巴细胞表面 CCR7 的表达与 IVUS 的测值 PB 呈显著负相关($r=-0.693$, $P<0.01$)。

2.6 多元 Logistic 回归

多元 Logistic 回归模型分析 CCL21、CCR7、性别、年龄、BMI、吸烟、血压、空腹血糖、TG、LDL-C、HDL-C、尿酸、肌酐等水平对 CHD 危险程度的影响,最终得出 CCL21 及 CCR7 是预测易损斑块的危险因素。

3 讨论

AS 是机体对脂质代谢异常等引起动脉血管壁的一种慢性炎症免疫反应,多种免疫细胞在该疾病的发生发展过程中发挥了关键性作用。T 淋巴细胞与 AS 斑块炎症反应关系密切,体内存在多种激活 T 淋巴细胞的途径,促进 T 细胞增殖分化及调节巨噬细胞的抗原递呈功能^[6-7]。炎症免疫反应参与 CHD 开始到血栓形成的全部过程,冠脉内的不稳定斑块破裂、继发出血、血栓形成是引起 ACS 的主要原因。从炎症免疫学说提出至今,炎症反应与 CHD 之间的关系研究颇多,而且证实趋化因子介导的炎症免疫反应在心血管疾病的发生、发展中发挥关键性作用。其中趋化因子 CC 家族在心血管疾病的发生发展中发挥重要作用。目前多数学者认为,CCL21 及其受体 CCR7 是一种重要的维持机体适应性免疫稳态的趋化因子配体及受体,CCR7 可激活 T 淋巴细胞和树突细胞,并能够调节 T 细胞

表 1 患者一般资料
Table 1 General clinical data

项目	对照组	SAP 组	ACS 组
例数	60	60	60
年龄/岁	62.13±9.83	61.11±8.96	62.03±8.45
男/例(%)	29(58)	27(54)	28(56)
BMI	23.17±3.21	22.89±3.52	22.96±3.34
吸烟/例(%)	31(62)	29(58)	29(58)
收缩压/mmHg ^{a)}	142.29±23.72	140.29±25.61	141.08±24.72
舒张压/mmHg	85.65±13.12	84.98±14.59	85.03±13.48
LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	3.54±1.14	3.01±1.09 ¹⁾	2.63±0.67 ¹⁾²⁾
HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	0.95±0.23	0.96±0.20	0.97±0.16
TG/(mmol·L ⁻¹)	1.56±0.75	1.51±0.67	1.49±0.82
脂蛋白/(mmol·L ⁻¹)	248.90±165.49	230.70±125.88	231.40±109.08
尿酸/(μmol·L ⁻¹)	286.69±87.50	300.73±112.91	305.93±157.30
空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)	7.27±2.52	6.09±2.20 ¹⁾	5.05±1.65 ¹⁾²⁾
肌酐/(μmol·L ⁻¹)	54.02±8.61	52.38±7.89	50.35±9.04
Gensini 积分	16.63±1.74	78.00±15.35 ¹⁾	60.00±10.79 ¹⁾²⁾

^{a)} 1 mmHg= 0.133 kPa。与对照组比较,¹⁾ P<0.05;与 SAP 组比较,²⁾ P<0.05。

表 2 各组 CCL21 浓度及 CCR7 的表达水平
Table 2 CCL21 concentration and expression of CCR7

组别	CCL21/(pg·ml ⁻¹)	CCR7/%	hs-CRP/(mg·L ⁻¹)
对照组(60 例)	94.75±28.96	44.35±10.62	2.08±0.79
ACS 组(60 例)	1 226.59±131.44 ¹⁾	30.23±8.94 ¹⁾	10.17±1.25 ¹⁾
SAP 组(60 例)	438.31±.52 ¹⁾²⁾	35.71±9.58 ¹⁾²⁾	5.13±1.31 ¹⁾²⁾

与对照组比较,¹⁾ P<0.05;与 ACS 组比较,²⁾ P<0.05。

表 3 斑块类型及特点
Table 3 Types and characteristics of atherosclerotic plaque

组别	斑块数	脂质斑块	纤维斑块	钙化斑块	混合斑块	斑块面积/mm ²	斑块负荷/%	偏心指数	重构指数
ACS 组(60 例)	103	67	11	12	13	9.43±2.06	76±8	0.67±0.13	2.08±0.13
SAP 组(60 例)	93	12 ¹⁾	53 ¹⁾	13	15	6.57±1.79 ¹⁾	45±6 ¹⁾	0.32±0.15 ¹⁾	1.01±0.12 ¹⁾

与 ACS 组比较,¹⁾ P<0.01。

向淋巴结的归巢^[8-9]。目前国内外有关 CCR7 与 CHD 之间的关系研究较少,本课题主要研究 CCL21/CCR7 在不同类型 CHD 患者血清中的表达分布情况,利用 IVSU 技术观察易损斑块,应用统计学软件寻找其与易损斑块之间的关系。国外研究显示,在 AS 的临床及实验中粥样斑块处表达增强的稳态趋化因子 CCL21 与斑块的不稳定性有密切关系^[10]。Panda 等^[11]发现在尿毒症大鼠 AS 斑块中的巨噬细胞表面 CCR7 的表达是上调的,考虑可能是通过抑制 CCR7 信号的传导从而导致 AS 斑块逆转的受损。有研究发现,HDL-C 通过促进斑块中 CD68⁺细胞向外迁移发挥抗 AS 的作用,而 CD68⁺细胞向外迁移与 CCR7 的激活和表达是一致的^[12]。Nickel 等^[13]研究表明,树突细胞在 AS 斑块中的积累趋向于与趋化因子受体的表达下调有关,ox-LDL 诱导 CCR7 的体外表达下调,这可能减

少斑块树突状细胞的迁移。以上说明斑块及血清中 CCL21/CCR7 的表达程度与斑块的易损性有关系。本课题研究亦得出了 AS 斑块的不稳定性与血清 CCL21 浓度水平呈明显正相关,而与外周淋巴细胞表面 CCR7 的表达呈负相关,证实了稳态趋化因子 CCL21 及其受体 CCR7 与冠脉易损斑块密切相关。

CAG 被认为是诊断 CHD 的金标准,能够清晰地评价冠脉管腔狭窄严重程度,随着深入研究 CHD 的发病机制,急性心血管事件的发生主要与易损斑块的破裂有关。CAG 能够描述管腔边界,但不能评价斑块负荷、形态及组成成分,不能识别易损斑块。目前认为,IVUS 是评价粥样斑块的金标准。Hong 等^[14]利用 IVUS 测定 ACS 患者的外弹力膜面积、斑块面积、斑块负荷及重构指数方面均明显高于 SAP 患者。Ivanovic 等^[15]的研究亦显示

UAP 组斑块负荷重于 SAP 组,且斑块中坏死组织所占面积及比例明显高于 SAP 组。IVUS 因其技术性高、费用高,目前在临床上应用受到一定限制。本课题致力于寻找血清趋化因子 CCL21 及其受体 CCR7 与冠脉易损斑块之间的关系,更好地应用于临床。研究结果显示斑块负荷与外周淋巴细胞表面 CCR7 的表达呈显著负相关。本研究还显示外周淋巴细胞表面 CCR7 的表达与斑块负荷的相关性高于 hs-CRP,再次提示外周淋巴细胞表面 CCR7 的表达在预测易损斑块方面具有更高价值。即斑块负荷越重,外周淋巴细胞表面 CCR7 的表达水平越低。

本课题实验表明,血清 CCL21 的浓度及外周淋巴细胞表面 CCR7 的表达与 CHD 的危险程度密切相关,且血清 CCL21 的浓度与 CHD 危险程度呈正相关,外周淋巴细胞表面 CCR7 的表达与 CHD 危险程度呈负相关。本实验显示应用 CCL21 判断 ACS 优于 hs-CRP,提示 CCL21 可以作为预测易损斑块的一种独立血清学指标,可为早期识别 ACS 及判断预后提供重要的价值。本实验样本量少,需要更多样本量、前瞻性的研究,更深层次理解稳态趋化因子 CCL21/CCR7 信号通路 with 易损斑块之间的关系,为更好地预防和治疗心血管疾病提供有力的理论基础。

参考文献

- [1] MATHERS C D, LONCAR D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 [J]. *PLoS Med*, 2006, 3: e442.
- [2] WEBER C, NOELS H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options [J]. *Nat Med*, 2011, 17: 1410—1422.
- [3] DAMÁS J K, SMITH C, ØIE E, et al. Enhanced expression of the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in clinical and experimental atherosclerosis: possible pathogenic role in plaque destabilization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27: 614—620.
- [4] KOENEN R R, WEBER C. Chemokines: Established and novel targets in atherosclerosis [J]. *EMBO Mol Med*, 2011, 3: 713—725.
- [5] ZUO H, LIU Q, ZHANG Z, et al. Outcomes of percutaneous coronary intervention for intermediate coronary artery disease guided by intravascular ultrasound or fractional flow reserve [J]. *J South Med Univ*, 2014, 34: 704—708.
- [6] JIN T, XU X, HERELD D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease [J]. *Cytokine*, 2008, 44: 1—8.
- [7] LUCHTEFELD M, GROTHUSEN C, GAGALICK A, et al. Chemokine receptor 7 knock out attenuates atherosclerotic plaque development [J]. *Circulation*, 2010, 122: 1621—1628.
- [8] FORSTER R, DAVALOS-MISLITZ A C, ROT A. Ccr7 and its ligands: Balancing immunity and tolerance [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8: 362—371.
- [9] FEVANG B, YNDESTAD A, DAMAS J K, et al. Chemokines and common variable immunodeficiency; possible contribution of CCL19, CCL21 and CCR7 to immune dysregulation [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 158: 237—245.
- [10] DAMS J K, SMITH C, ØIE E, et al. Enhanced expression of the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in clinical and experimental atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27: 614—620.
- [11] PONDA M P, BARASH I, FEIG J E, et al. Moderate kidney disease inhibits atherosclerosis regression [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 210: 57—62.
- [12] FEIG J E, RONG J X, SHAMIR R, et al. HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 7166—7171.
- [13] NICKEL T, PFEILER S, SUMMO C, et al. oxLDL downregulates the dendritic cell homing factors CCR7 and CCL21 [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 320953.
- [14] HONG M K, MINTZ G S, LEE C W, et al. A Three-vessel virtual histology intravascular ultrasound analysis of frequency and distribution of thin-cap fibro-atheromas in patients with acute coronary syndrome or stable angina pectoris [J]. *Am J Cardiol*, 2008, 101: 568—572.
- [15] IVANOVIC M, RANCIC M, RDZANEK A, et al. Virtual histology study of atherosclerotic plaque composition in patients with stable angina and acute phase of acute coronary syndromes without ST segment elevation [J]. *Srp Arh Celok Lek*, 2013, 141: 308—314.

(收稿日期: 2015-03-11)