

内皮素 1、Toll 样受体 4 与冠状动脉慢血流关系的研究

王静^{1△} 刁军¹ 李勇¹ 李莉¹ 冯建启¹ 彭城¹ 郝骥¹ 武维恒¹

[摘要] 目的:探讨血浆内皮素 1(ET-1)、Toll 样受体 4(TLR-4)与冠状动脉慢血流的关系。方法:入选 2014-01—2015-07 于本院行冠状动脉造影的 39 例冠状动脉慢血流患者为试验组,同期冠状动脉造影正常的 40 例患者为对照组,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定两组患者血浆 ET-1、TLR-4 水平。结果:两组平均血流帧数的差异有统计学意义($P<0.001$);冠状动脉慢血流患者中男性比例(79%)远大于女性;两组平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞分布宽度变异系数(RDW-CV)、ET-1、TLR-4 之间的差异有统计学意义(均 $P<0.05$),其他实验室指标的差异无统计学意义。多因素 logistic 回归分析示 ET-1、TLR-4 与冠状动脉慢血流独立相关(均 $P<0.05$);ET-1 与 TLR-4 的 Spearman 相关系数为 0.439($P<0.001$),TLR-4 与 MCHC 的 Spearman 相关系数为 0.277($P=0.014$),提示 TLR-4 与 ET-1、MCHC 显著相关,但相关关系并不密切($r<0.5$)。结论:ET-1、TLR-4 以及红细胞变形可能参与了冠状动脉慢血流的发生、发展。

[关键词] 冠状动脉慢血流;内皮素-1;Toll 样受体 4;红细胞

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2016.03.011

[中图分类号] R541.4 **[文献标志码]** A

The relationship between Endothelin-1, Toll-like receptor-4 and coronary slow flow

WANG Jing DIAO Jun LI Yong LI Li FENG Jianqi
PENG Cheng HAO Ji WU Weiheng

(Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu, 221000, China)

Corresponding author: WU Weiheng, E-mail:wwheng118@163.com

Abstract Objective: To analyze the relationship between plasma ET-1, TLR-4 and coronary slow flow (CSF). **Method:** From January 2014 to July 2015, 79 patients with angiographically proved stenosis less than 40% were divided into CSF group ($n=39$) and control group ($n=40$). The concentrations of plasma ET-1 and TLR-4 were determined by using ELISA. **Result:** The frame counts between 2 groups were significant different ($P<0.001$). In CSF group, the proportion of males (79%) was higher than females. There was significant difference in MCHC, RDW-CV, ET-1, TLR-4 between two groups ($P<0.05$). Multiple logistic regression analysis showed that ET-1, TLR-4 were independently associated with CSF ($P<0.05$). The plasma level of TLR-4 was positively related to plasma ET-1 ($r=0.439$, $P<0.001$) and MCHC ($r=0.277$, $P=0.014$), but the corrections were weak ($r<0.5$). **Conclusion:** ET-1, TLR-4 and RBC deformability may play some pathophysiologic roles in CSF.

Key words coronary slow flow; Endothelin-1; Toll-like receptor-4; red blood cell

冠状动脉慢血流(coronary slow flow, CSF)是指行冠状动脉(冠脉)造影检查示血管无明显病变(狭窄 $<40\%$),但造影剂到达远端的时间明显延长的现象。目前关于冠脉慢血流的发病机制仍不明确,现有的研究结果认为血管内皮功能失调、早期动脉粥样硬化、炎症反应、微血管病变、血液成分的异常可能参与了 CSF 的病理生理过程。内皮素 1(ET-1)是内皮细胞分泌的缩血管肽,可以增加冠脉的血管阻力,Toll 样受体 4(TLR-4)是介导天然免

疫的 Toll 样受体家族的重要成员,通过激活核因子 κ B(NF- κ B)而引起炎症反应。本研究旨在探讨 ET-1、TLR-4 与 CSF 的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

选择 2014-01—2015-07 行冠脉造影检查,结果显示血管无明显病变(管腔直径狭窄 $<40\%$)但 TIMI 血流计帧法或校正的 TIMI 血流计帧法^[1]显示造影剂通过至少 1 支冠脉的帧数 >27 帧的 39 例患者为 CSF 组,同期正常的患者 40 例为对照组。两组均排除患有心肌病、心脏瓣膜病、冠脉扩张、冠脉搭桥术后、自身免疫性疾病、肿瘤或其他严重的全身

[△]徐州医学院在读硕士研究生

¹徐州医学院第二附属医院心内科(江苏徐州,221000)

通信作者:武维恒,E-mail:wwheng118@163.com

性疾病等。

1.2 方法

1.2.1 基线资料的收集 统计两组患者的年龄、性别、吸烟史、高血压病史、糖尿病病史等基线资料,两组患者均于入院后次日晨空腹采集肘静脉血送本院检验科行全自动血细胞及生化分析。

1.2.2 血样的收集及检测 两组患者均于入院后次日晨空腹用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K2)抗凝管采集肘静脉血 3 ml,用 4 000×g 离心 10 min 后,取上清液 1 ml 于 EP 管中,编号后用-80℃低温冰箱保存,并严格按照说明书,统一采用 ELISA 测定两组患者血浆中 ET-1、TLR-4 的水平。

1.2.3 冠脉造影及 CSF 的诊断 以 Judkin 导管法进行冠脉造影,至少采用 3 种不同方法进行投影,由 3 名有经验的心内科医师进行阅读造影结果。采用 TIMI 计帧法或校正的 TIMI 血流计帧法定量评价冠脉血流,造影剂通过至少 1 支冠脉的帧数>27 帧则诊断为 CSF。

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料符合正态分布的用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用两独立样本 *t* 检验,不符合正态分布的用中位数(第 25 百分位数,第 75 百分位数)[M(QR)]表示,采用 Mann-Whitney U 检验,多因素分析采用 logistic 回归模型分析,当 *P*<0.05 时差异有统计学意义,采用 Spearman 相关系数的计算进行双变量相关分析。

2 结果

2.1 冠脉 TIMI 血流帧数的比较

对照组与 CSF 组的右冠脉(RCA)、回旋支动脉(LCX)、前降支动脉(LAD)的 TIMI 血流帧数均差异有统计学意义(均 *P*<0.001),见表 1。

2.2 基线资料的比较

对照组与 CSF 组的 MCHC、RDW-CV 均差异有统计学意义(均 *P*<0.05),其余基线资料及实验室指标均无统计学差异(表 2)。两组 MCHC、RDW-CV 的 ROC 曲线分析结果显示,MCHC 越大、RDW-CV 越小,CSF 的可能性越大(图 1,表 3)。

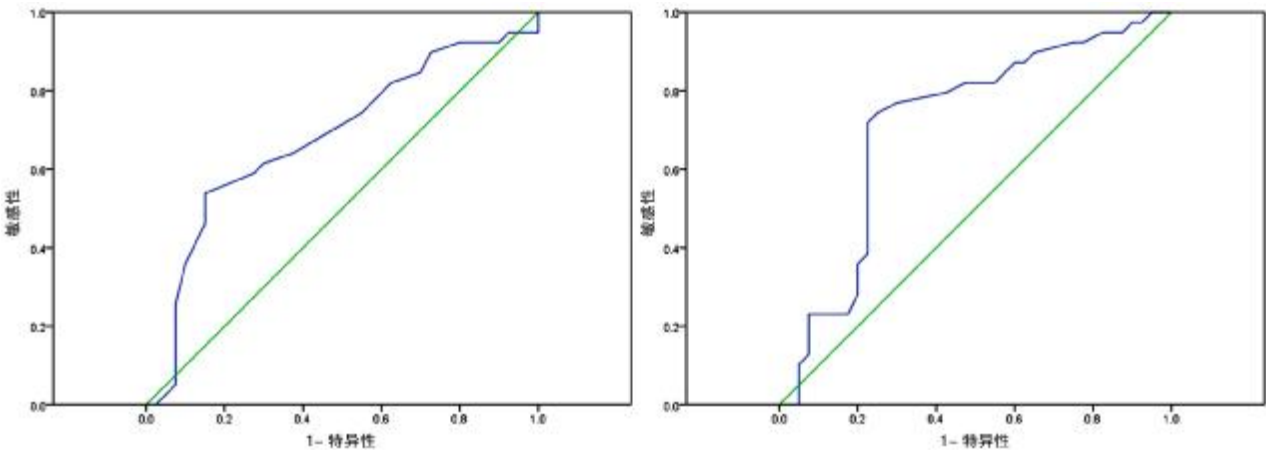
2.3 血浆 ET-1、TLR-4 水平的比较

对照组与 CSF 组血浆 ET-1、TLR-4 水平均差异有统计学意义(均 *P*<0.001,表 4)。两组 ET-1、TLR-4 的 ROC 曲线分析结果显示,ET-1、TLR-4 越大,CSF 的可能性越大(图 2,表 5)。

2.4 CSF 的影响因素

将 *t* 检验或 Mann-Whitney U 检验结果有统计学意义的指标纳入多因素 logistic 回归模型,分析显示,ET-1、TLR-4 的改变参与了 CSF 的病理生理过程(表 6)。将 TLR-4 与 ET-1、MCHC 进行相关分析,TLR-4 与 ET-1 的 Spearman 相关系数为 0.439(*P*<0.001),TLR-4 与 MCHC 的 Spearman 相关系数为 0.277(*P*=0.014),提示 TLR-4 与 ET-1、MCHC 显著相关,但相关关系并不密切(*r*<0.5)。

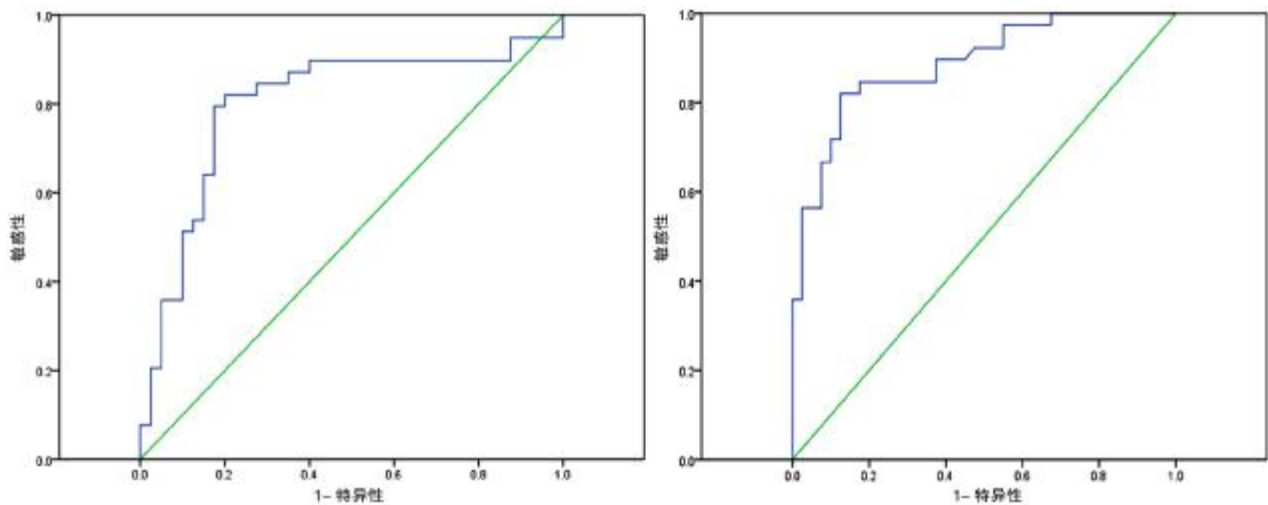
表 1 冠脉 TIMI 血流帧数			
Table 1 TIMI frames of coronary blood flow			
项目	对照组(40 例)	CSF 组(39 例)	M(QR)
RCA	18.5(14.25,21.00)	32.5(29.25,36.75)	<i>P</i> 值
LCX	21.0(17.25,23.00)	30.0(29.50,33.00)	<0.001
LAD	31.5(26.50,35.00)	52.5(48.50,55.50)	<0.001



左为 RDW-CV,右为 MCHC。

图 1 MCHC 与 RDW-CV 的 ROC 曲线

Figure 1 ROCs of MCHC and RDW-CV



左为 ET-1, 右为 TLR-4。
图 2 ET-1 和 TLR-4 的 ROC 曲线
Figure 2 ROCs of ET-1 and TLR-4

表 2 患者基线资料

Table 2 General data

$\bar{x} \pm s$

项目	对照组(40 例)	CSF 组(39 例)	P 值
年龄/岁	54(48.0,63.5)	56(50.0,63.0)	0.401
男性/例(%)	32(80)	31(79)	0.955
吸烟/例(%)	14(35)	16(41)	0.581
高血压/例(%)	24(60)	21(54)	0.581
糖尿病/例(%)	4(10.00)	1(2.56)	0.175
消化系炎症/例(%)	6(15)	9(23)	0.36
红细胞/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	4.81 ± 0.48	4.73 ± 0.42	0.406
血红蛋白/($g \cdot L^{-1}$)	146.23 ± 15.36	146.15 ± 13.76	0.982
平均血红蛋白量/pg	30.42 ± 1.31	30.92 ± 1.14	0.072
平均血红蛋白浓度/($g \cdot L^{-1}$)	327(321.25,330.75)	334(330.00,338.00)	0.001
红细胞压积/%	44.63 ± 4.21	43.56 ± 3.94	0.251
平均红细胞体积/fL	92.61 ± 3.76	92.21 ± 3.08	0.609
红细胞分布宽度变异系数/%	13(12.7,13.5)	12.6(12.3,13.1)	0.005
白细胞/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	$6.22(5.57,7.06)$	$6.02(4.93,7.61)$	0.713
淋巴细胞绝对值/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	$1.82(1.55,2.08)$	$1.74(1.42,2.23)$	0.902
单核细胞绝对值/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	$0.49(0.35,0.56)$	$0.51(0.41,0.59)$	0.399
中性粒细胞绝对值/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	$3.65(2.84,4.65)$	$3.05(2.67,5.01)$	0.624
血小板/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	205.03 ± 49.44	204.23 ± 46.80	0.942
平均血小板体积/fL	10.95 ± 0.80	10.91 ± 0.84	0.831
纤维蛋白原/($g \cdot L^{-1}$)	$3.28(2.98,3.81)$	$3.23(3.02,3.77)$	0.81
葡萄糖/($mmol \cdot L^{-1}$)	$5.56(5.11,6.34)$	$5.60(5.15,5.84)$	0.941
胆固醇/($mmol \cdot L^{-1}$)	$4.58(3.83,5.22)$	$4.35(4.05,4.82)$	0.829
高密度脂蛋白/($mmol \cdot L^{-1}$)	$1.10(0.95,1.34)$	$1.11(0.99,1.30)$	0.607
低密度脂蛋白/($mmol \cdot L^{-1}$)	$2.63(2.12,3.26)$	$2.80(2.32,3.35)$	0.648
载脂蛋白 A/($g \cdot L^{-1}$)	1.34 ± 0.20	1.32 ± 0.23	0.6
载脂蛋白 B/($g \cdot L^{-1}$)	0.97 ± 0.26	0.99 ± 0.23	0.694

表 3 MCHC 与 RDW-CV 的 ROC 分析结果

Table 3 Results of ROC analysis

项目	曲线下面积	面积的标准误	P 值	95%CI
MCHC	0.715	0.06	0.001	0.597~0.834
RDW-CV	0.681	0.062	0.006	0.561~0.802

RDW-CV 用的是假定诊断变量值越小,结果越容易发生阳性事件;MCHC 用的是假定诊断变量值越大,结果越容易发生阳性事件。

表 4 血浆 ET-1、TLR-4 水平的比较			
Table 4 Levels of ET-1 and TLR-4			M(QR)
项目	对照组(40 例)	慢血流组(39 例)	P 值
ET-1/(pg · ml ⁻¹)	6.18(5.58,7.17)	9.16(8.07,10.85)	<0.001
TLR-4/(ng · ml ⁻¹)	0.08(0.05,0.13)	0.27(0.16,0.37)	<0.001

表 5 ET-1 和 TLR-4 的 ROC 分析结果				
Table 5 Results of ROC analysis				
项目	曲线下面积	面积的标准误	P 值	95%CI
ET-1	0.801	0.054	<0.001	0.695~0.907
TLR-4	0.888	0.036	<0.001	0.817~0.959

ET-1、TLR-4 用的是假定诊断变量值越大,结果越容易发生阳性事件。

表 6 多因素 logistic 回归模型分析					
Table 6 Resul of multivariate logistic regression					
项目	偏回归系数	Wald 统计量	P 值	OR 值	95%CI
ET-1	0.382	6.03	0.014	1.465	1.08~1.986
TLR-4	1.607	14.833	<0.001	4.987	2.201~11.297
MCHC	0.045	2.589	0.108	1.046	0.99~1.105
RDW-CV	-0.604	1.182	0.277	0.547	0.184~1.624

3 讨论

CSF 的发生率在所有行冠脉造影的患者中为 1%~7%,而在因胸痛行 CAG 的患者中发生率高达 25%^[2,3]。大约 80% 的 CSF 患者有心前区不适、胸痛或心绞痛症状反复发作或长期存在。越来越多的研究显示,CSF 可能是一种能引起心肌缺血的独立因素,其预后可能较差^[3,11]。目前关于引发 CSF 的确切机制仍不明确,因此,针对 CSF 的发病机制、病理生理过程、诊断和治疗的研究具有非常重要的意义。

本研究结果显示,ET-1、TLR-4 与 CSF 独立相关,红细胞变形也可能参与了 CSF 的病理生理过程。血管内皮是血液与组织液之间的屏障,同时也是一种重要的内分泌器官。在炎症、缺氧、损伤等病理状态下,内皮细胞功能失调、内皮素分泌增加诱发血管痉挛,同时还可引起促炎性因子的合成、氧化应激以及黏附因子表达的增加。Widlansky 等^[4]的研究表明,血管内皮功能障碍在心血管事件的初发与再发中起着至关重要的作用。ET-1 是血管内皮细胞分泌的缩血管肽,其在一定程度上反映了内皮细胞的功能。Gazi 等^[5]将 33 例 CSF 患者同 48 例血流正常的患者进行对比研究,通过测量内皮依赖性的血流介导的肘静脉扩张后发现,CSF 患者存在内皮功能的异常。Arbel 等^[6]研究认为,在 CSF 患者中内皮功能受损的出现可能早于颈动脉中内膜的增厚。Chen 等^[9]对 36 例 CSF 患者进行研究后发现,尼可地尔可能通过增加血浆中一氧化氮浓度、降低 ET-1 的浓度而改善患者胸痛症状、

提高左心室功能。Sezgin 等^[7]研究发现,冠脉小血管内皮功能失调可导致心肌缺血,从而使患者出现心绞痛的症状。Tolls 是介导天然免疫的古老家族,在炎症和免疫应答中起着重要的作用,其中又以 TLR-4 同心血管疾病的关系最为密切。TLR-4 可导致 NF-κB 等的激活,诱导促炎性因子 TNF-α、IL-1、IL-6 及 IL-8 等大量产生,启动炎症应答。Edfeldt 等^[10]研究发现,TLR4 在动脉粥样硬化患者的内皮细胞中高表达。此外,内皮细胞中 TLR4 尚可 CD14 和 MD-2 识别轻度修饰型低密度脂蛋白,诱导 IL-8 的分泌,从而在血管炎的发生、发展中起作用。本研究中,CSF 患者的血浆 ET-1 水平显著升高,提示 CSF 中存在内皮细胞功能的失调、缩血管物质 ET-1 分泌的增加,从而使冠脉微循环阻力增加、冠脉远端血流灌注延迟。TLR-4 反映了机体的炎症状态,CSF 患者血浆中 TLR-4 高表达,但临床上却没有明显的炎症反应,提示机体可能存在具有持续及相对隐匿性并可引起各种并发症的非显性炎症。ET-1 与 TLR-4 的相关分析显示二者显著相关,但相关关系并不密切,提示内皮细胞功能失调有炎症因子 TLR-4 的参与,同样在 TLR-4 的分泌中,内皮细胞功能失调也起到了一定的作用。

Celebi 等^[13]研究发现,CSF 患者的血浆 ET-1 浓度显著升高,且在 CSF 组中吸烟患者的 ET-1 水平显著高于非吸烟患者,提示吸烟与 CSF 相关并可引起 ET-1 浓度的增加。王苏等^[14]对 152 例吸烟患者进行研究后同样认为吸烟可能参与了 CSF

的病理生理过程。但在本研究中并没有得到吸烟同 CSF 相关的结论。

本研究中发现,CSF 患者中存在 MCHC 的增大、RDW-CV 的减小。红细胞的可塑变形性取决于红细胞的几何形态、红细胞的内黏度和红细胞膜的弹性,MCHC 的升高可引起红细胞胞质黏度升高,细胞适用流场的能力下降、变形性减弱。变形性较低的红细胞在通过微血管时必然会在微血管内堆积和聚集,从而影响微循环的灌注。而 TLR-4 与 MCHC 的相关分析示二者显著相关,提示红细胞变形性的减弱可能和机体的微炎症有关。

本研究的不足之处在于所选取的样本例数较少;研究时间相对较短,未能给予药物干预以进一步验证结论;入选患者年龄较轻,药物依从性较差,故未能统计平时所服药物对 CSF 的影响。

综上所述,ET-1、TLR-4 以及红细胞变形可能参与了 CSF 的病理生理过程,Camsarl 等^[8]研究发现,CSF 患者存在早期动脉粥样硬化和微血管病变,而早期动脉粥样硬化、微血管病变同样可以引起内皮功能失调以及炎症因子释放的增加,因此其发病机制不能用单一学说全面解释,而是多种因素共同参与的结果,故关于 CSF 发病的具体作用机制仍有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] GIBSON C M, CANNON C P, DALEY W L, et al. TIMI frame count: a quantitative method of assessing coronary artery flow[J]. *Circulation*, 1996, 93: 879—888.
- [2] MANGIERI E, MACCHIARELLI G, CIAVOLELLA M, et al. Slow coronary flow: clinical and histopathological features in patients with otherwise normal epicardial coronary arteries[J]. *Cathet Cardiovasc Diagn*, 1996, 37: 375—381.
- [3] GOEL P K, GUPTA S K, AGARWAL A, et al. Slow coronary flow: a distinct angiographic subgroup in syndrome X [J]. *Angiology*, 2001, 52: 507—514.
- [4] WIDLANSKY M E, GOKCE N, KEANEY J J, et al. The clinical implications of endothelial dysfunction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42: 1149—1160.
- [5] GAZI E, TEMIZ A, ALTUN B, et al. Endothelial function and germ-line ACE I/D, eNOS and PAI-1 gene profiles in patients with coronary slow flow in the Canakkale population: multiple thrombophilic gene profiles in coronary slow flow[J]. *Cardiovasc J Afr*, 2014, 25: 9—14.
- [6] ARBEL Y, SZEKELY Y, BERLINER S, et al. Lack of correlation between coronary blood flow and carotid intima media thickness[J]. *Clin Hemorheol Microcirc* [J]. 2014, 56: 371—381.
- [7] SEZGIN A T, SIGIRCI A, BARUTCU I, et al. Vascular endothelial function in patients with slow coronary flow[J]. *Coron Artery Dis*, 2003, 14: 155—161.
- [8] CAMSARL A, PEKDEMIR H, CIEEK D, et al. Endothelin-1 and nitric oxide concentrations and their response to exercise in patients with slow coronary flow [J]. *Circ J*, 2003, 67: 1022—1028.
- [9] CHEN Z, CHEN X, LI S, et al. Nicorandil improves myocardial function by regulating plasma nitric oxide and endothelin-1 in coronary slow flow[J]. *Coron Artery Dis*, 2015, 26: 114—120.
- [10] EDFELDT K, SWEDENBORY J, HANSSON G K, et al. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions a possible pathway for plaque activation [J]. *Circulation*, 2002, 150: 1158—1161.
- [11] LUBOV T, MARMOR A, GORENBERG M, et al. Endothelin release: a marker for the severity of exercise-induced ischemia[J]. *Cardiol*, 2001, 79: 19—24.
- [12] YURTDAS M, YAYLALI T Y, KAYA Y, et al. Increased plasma High-sensitivity C-reactive protein and myeloperoxidase levels may predict Ischemia during myocardial perfusion imaging in slow coronary flow [J]. *Arch Med Res*, 2014, 45: 63—69.
- [13] CELEBI H, CATAKOGLU AB, KURTOGLU H, et al. The relation between coronary flow rate, plasma endothelin-1 concentrations, and clinical characteristics in patients with normal coronary arteries[J]. *Cardiovasc Revasc Med*, 2008, 9: 144—148.
- [14] 王苏,张冬花,李凤梅,等. 男性冠状动脉慢血流与吸烟的相关性研究[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2013, 27(11): 1084—1085.

(收稿日期:2015-08-17)