

高血压与心脏病

DOI: 10.11699/cyxh20131211

冠心病患者核因子- κ B 与血管细胞黏附分子-1 的变化及其相关性李银萍¹, 薛 莉²

(宁夏医科大学 1. 研究生学院研究生部, 银川 750004; 2. 总医院心内科, 银川 750004)

【摘要】目的:探讨冠心病患者外周血单核细胞核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)活性与血浆可溶性血管细胞黏附分子-1(soluble vascular cell adhesion molecule, sVCAM-1)水平的变化及其相关性,在冠心病发生、发展和病情变化中的预测价值。**方法:**采用 ELISA 方法测定急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)、不稳定型心绞痛(unstable angina pectoris, UAP)、稳定型心绞痛(stable angina pectoris, SAP)患者和对照组血浆 sVCAM-1 和 NF- κ B 浓度,采用免疫组化染色检测上述患者的外周血单核细胞 NF- κ B P65 的表达。**结果:**AMI 组、UAP 组外周血浆 sVCAM-1、NF- κ B 的浓度及外周血单核细胞 NF- κ B 的活性均高于健康对照组,差异均有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.002$)。SAP 组与健康对照组比较无明显差异($P=0.329$, $P=0.819$)。AMI 组、UAP 组 NF- κ B、sVCAM-1 表达均高于 SAP 组,AMI 组 NF- κ B、sVCAM-1 表达明显高于 UAP 组($P=0.000$, $P=0.000$),且外周血单核细胞 NF- κ B 与 sVCAM-1 的水平呈正相关($r=0.657$, $P=0.009$)。**结论:**NF- κ B、sVCAM-1 均与动脉粥样硬化斑块稳定性密切相关,且二者均参与了冠心病的发生、发展。sVCAM-1 可能通过促进 NF- κ B 的活化而导致各种促动脉粥样硬化的细胞因子和趋化因子的生成,最终促使急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)的发生。NF- κ B 作为引发炎症的关键转录因子可能上调 sVCAM-1 的表达。

【关键词】核因子- κ B;可溶性血管细胞黏附分子-1;冠心病

【中国图书分类法分类号】R541.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-09-20

Changes in nuclear factor- κ B and soluble vascular cell adhesion molecule-1 in acute coronary syndrome and their correlationLI Yinping¹, XUE Li²

(1. Postgraduate Administration Office, Postgraduate College, Ningxia Medical University;

2. Department of Cardiology, General Hospital, Ningxia Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate changes in activity of nuclear factor- κ B (NF- κ B) in peripheral blood mononuclear cells and in plasma soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) level, to discuss their correlation in patients with coronary heart disease (CHD) and to explore their predictive value in occurrence, development and progress of CHD. **Methods:** Concentrations of plasma sVCAM-1 and NF- κ B in patients with acute myocardial infarction (AMI), unstable angina pectoris (UAP) and stable angina pectoris (SAP) as well as in health controls were determined by ELISA. NF- κ B P65 expressions in peripheral blood mononuclear cells were determined by immunocytochemical staining and semiquantitative analysis. **Results:** Concentration of peripheral blood plasma sVCAM-1 and NF- κ B as well as NF- κ B activity in peripheral blood mononuclear cells were higher in AMI and UAP group than in health control group, with statistical differences ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.002$), however, there was no obvious difference in above indicators between SAP group and health control group ($P=0.329$, $P=0.819$). NF- κ B and sVCAM-1 expressions were higher in AMI and UAP group than in SAP group, higher in AMI group than in UAP group ($P=0.000$, $P=0.000$). Activity of NF- κ B in mononuclear cells of peripheral blood was significantly correlated with plasma sVCAM-1 in ACS group ($r=0.657$, $P=0.009$). **Conclusions:** NF- κ B and sVCAM-1 are closely related with atherosclerotic plaque stability and both are involved in the occurrence of CHD development. sVCAM-1 might contribute to the production of cytokines and chemokines by activating NF- κ B, which ultimately results in atherosclerosis and acute coronary syndrome. NF- κ B as a key transcription factor in inflammation may increase expression of sVCAM-1.

【Key words】 nuclear factor- κ B; soluble vascular cell adhesion molecule-1; coronary heart disease

作者介绍: 李银萍, Email: 464307690@qq.com,

研究方向: 冠心病的基础与临床。

通信作者: 薛 莉, Email: xueli8203@126.com。

炎症反应在急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)的发病机制上起关键作用^[1], 斑块内炎性细胞及其炎性产物可能是造成斑块破裂或糜烂, 继发完全或不完全闭塞性血栓形成的促发因素^[2]。近年来一些研究表明, ACS 患者的血浆可溶性血管细胞黏附分子-1(soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1)水平升高与 ACS 的活动程度有关^[3]。核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)作为一种炎症反应调节因子, 一直被认为是一种主要的冠状动脉粥样硬化发生发展的因子^[4]。但对于 NF- κ B 与 sVCAM-1 在 ACS 中的表达及其之间的关系, 以及是否可作为其发生、发展和病情变化的预测指标, 国内外资料很少提及。本研究旨在观察 ACS 患者外周血单个核细胞 NF- κ B 的活性和血浆 sVCAM-1 的水平及其之间的相关性, 探讨其在 ACS 发生、发展和病情变化的预测价值。

1 材料与方法

1.1 一般资料

按世界卫生组织(world health organization, WHO)标准选择: 2011 年 11 月-2012 年 5 月在宁夏医科大学总医院心内科住院确诊的冠心病患者共 76 例。ACS 组 56 例, 包括急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)患者 22 例, 男 15 例, 女 7 例, 平均年龄(56.77 ± 10.40)岁; 不稳定性心绞痛(unstable angina pectoris, UAP)患者 34 例; 其中男 22 例, 女 12 例, 平均年龄(53.84 ± 10.90)岁。稳定性心绞痛(stable angina pectoris, SAP)组 20 例, 男 8 例, 女 12 例, 平均年龄(56.90 ± 9.16)岁。健康对照组 20 例为年龄、性别等相匹配的体检者, 其中男 14 例, 女 6 例, 平均年龄(55.95 ± 8.04)岁。确诊冠心病的患者均为因典型或不典型胸痛而行冠脉造影检查冠状动脉主干或其分支狭窄程度均 $\geq 50\%$ 。AMI 的入选标准: 胸痛呈持续性且时间超过 30 min, 心电图可见有 2 个或 2 个以上相邻导联 ST 段抬高, 或可见有异常 Q 波形成, 酶学指标改变, 心肌酶水平明显高于正常上限 2 倍以上。UAP 的入选标准包括: 初发心绞痛、恶化劳力性心绞痛、静息心绞痛。SAP 的入选标准: 最近 3 个月心绞痛多因生气、劳累、受凉、饱食等诱发, 发作次数、缓解方式均保持稳定。剔除标准: 所有受试者严格除外合并自身免疫性疾病; 合并感染性疾病如严重的上呼吸道感染、肺部感染、肝胆道感染; 发热; 应用免疫抑制药物如类固醇; 肿瘤; 严重肝肾功能不全、恶性肿瘤、周围血管疾病、脑卒中等疾病。

1.2 方法

1.2.1 标本留取 健康对照组于晨空腹, 入选患者于入院后

给药前空腹采肘静脉抗凝血共 12 ml, 分 2 ml 抗凝血摇匀, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液保存于 -80°C 冰箱待测。采用夹心酶联免疫吸附测定法测定 sVCAM-1、NF- κ B 浓度, 其试剂盒为上海 BG 公司产品, 分析仪为酶标仪(波长为 450 nm), 严格按说明书操作进行。

1.2.2 T 淋巴细胞的分离 另 10 ml 抗凝血等体积 PBS 缓冲液稀释后缓慢加于 10 ml 的淋巴分离液上, 以 3 000 r/min 离心 25 min, 吸出试管中间的一层乳白色液体, 加入等体积的 PBS 缓冲液稀释液 1 500 r/min 离心 10 min, 共洗涤 3 次, 弃上清液, 瑞氏染色试验活细胞比例 $>95\%$ 为有效标本。

1.2.3 NF- κ B 的免疫组织化学染色 取 T 淋巴细胞加入 4% 多聚甲醛固定, 一抗选用兔抗 NF- κ B P65 亚单位的多克隆抗体(美国 Santa 公司产品), 用 SP 法试剂盒, DAB 显色试剂(北京中杉金桥公司产品)操作, 操作步骤按试剂盒说明书进行。每张切片在高倍视野下随机计数 100 个细胞, 细胞核呈棕黄色定为 NF- κ B 阳性细胞, 共选取 5 个视野, 计算细胞核阳性的细胞数占细胞总数的百分比。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件。所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。年龄、性别、高血压、糖尿病、家族史、吸烟史及血脂等诸因素对冠心病的影响采用多元 logistic 逐步回归分析。对所有数据进行方差齐性检验后, 对于方差不齐数据采用非参数秩和检验分析, NF- κ B 与 sVCAM-1 间的相关性采用直线相关分析法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 所有研究对象各项参数的比较

由表 1 可见, AMI 组及健康对照组年龄、性别构成匹配相当, 2 组间糖尿病史、家族史的发生率差异无统计学意义, 2 组之间的高密度脂蛋白-胆固醇(high-density lipoprotein cholestero, HDL-C)、低密度脂蛋白-胆固醇(low-density lipoprotein cholestero, LDL-C)水平亦未见统计学差异。然而 AMI 组的吸烟史、总胆固醇(total cholesterol, TC)水平以及合并高血压病的人数明显高于健康对照组($P=0.009$, $P=0.025$, $P=0.014$)。以冠心病为因变量, 年龄、性别、糖尿病史、高血压病史、TC、甘油三酯、HDL-C、LDL-C 等作为自变量, 进行多元 logistic 逐步回归分析(入选变量检验水准为 $\alpha=0.05$), 表明吸烟、TC、高血压均为冠心病患病的独立危险因素。

2.2 外周血浆 sVCAM-1 浓度比较

AMI 组与 UAP 组($Z_1=3.655$, $P_1=0.000$)、AMI 组与 SAP 组($Z_2=2.237$, $P_2=0.000$)、AMI 组与健康对照组($Z_3=2.237$, $P_3=0.000$)、UAP 组与 SAP 组($Z_4=1.803$, $P_4=0.002$)、UAP 组与健康对照组($Z_5=2.296$, $P_5=0.000$)、SAP 组与健康对照组($Z_6=0.949$, $P_6=0.329$)。外周血浆 NF- κ B 浓度比较: AMI 组与 UAP 组($Z_1=$

表 1 AMI 组与健康对照组研究对象的基本临床资料 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Basic clinical data of AMI group and health control group ($\bar{x} \pm s$)

观察指标	赋值说明	AMI组 (n=76)	健康对照组 (n=20)	B	P 值	OR 值	OR 的 95%CI	
							下限	上限
年龄(岁)	<45=1, 45~=2, 55~=3, 65~=4	57.55 ± 9.46	55.95 ± 8.04	0.015	0.908	1.015	0.784	1.314
性别	女=0,男=1	57	16	1.318	0.084	3.736	0.836	16.703
吸烟史	不吸=0,吸=1	24	4	2.420	0.009	11.246	1.816	69.635
高血压病史	无=0,有=1	31	2	-1.864	0.025	0.155	0.030	0.793
糖尿病史	无=0,有=1	7	0	1.660	0.080	5.257	0.820	33.698
家族史	无=0,有=1	9	2	0.359	0.733	1.433	0.182	11.273
甘油三酯(mmol/L)	≤1.7=0, >1.7=1	1.46 ± 0.45	1.71 ± 0.40	-1.240	0.109	0.289	0.063	1.319
TC(mmol/L)	≤5.2=0, >5.2=1	4.94 ± 0.64	4.67 ± 0.56	-1.389	0.014	0.249	0.082	0.757
HDL-C(mmol/L)	<0.9=0, 0.9~1.03=1, >1.03=2	1.10 ± 0.18	1.09 ± 0.13	-0.930	0.659	0.395	0.006	24.389
LDL-C(mmol/L)	≤2.58=0, >2.58=1	2.90 ± 0.43	2.96 ± 0.37	-1.271	0.126	0.281	0.055	1.431

注:B 为偏相关系数,OR 为优势比

3.655, $P_1=0.000$)、AMI 组与 SAP 组($Z_2=3.237,P_2=0.000$)、AMI 组与健康对照组($Z_3=3.237,P_3=0.000$)、UAP 组与 SAP 组($Z_4=2.202,P_4=0.000$)、UAP 组与健康对照组($Z_5=1.847,P_5=0.002$)、SAP 组与健康对照组($Z_6=0.632,P_6=0.819$)(表 2)。

表 2 各组血浆 NF-κB、sVCAM-1 浓度的变化及其比较分析

Tab.2 Changes in concentration of NF-κB and sVCAM-1 in plasma and its comparative analysis

组别(n)	NF-κB(ng/ml)	sVCAM-1(ng/ml)
AMI组 (n=22)	13.88 ± 1.45	538.80 ± 10.15
UAP 组 (n=34)	5.64 ± 0.45	429.70 ± 40.53
SAP 组 (n=20)	5.16 ± 0.74	399.20 ± 10.30
健康对照组 (n=20)	5.15 ± 0.46	392.40 ± 14.22
Z_1 值	3.655	3.655
P_1 值	0.000	0.000
Z_2 值	2.237	2.237
P_2 值	0.000	0.000
Z_3 值	2.237	2.237
P_3 值	0.000	0.000
Z_4 值	1.803	2.202
P_4 值	0.002	0.000
Z_5 值	2.296	1.847
P_5 值	0.000	0.002
Z_6 值	0.949	0.632
P_6 值	0.329	0.819

2.3 外周血单核细胞 NF-κB 的表达

免疫细胞化学染色结果见图 1。

2.4 NF-κB 与血浆 sVCAM-1 水平的相关性

对 NF-κB 活性与 sVCAM-1 水平进行线性相关分析,结果发现 NF-κB 活性与 sVCAM-1 水平呈正相关($r=0.657,P=0.009$)。

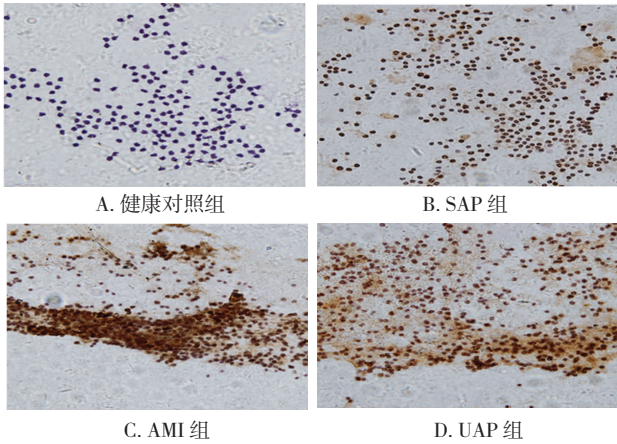


图 1 各组外周单个核血浆 NF-κB 表达 (免疫组化染色,100 ×)

Fig.1 Expressions of NF-κB in peripheral blood mononuclear plasma in each group (immunohistochemical staining, 100 ×)

3 讨论

近年来研究显示,ACS 的发生不完全与冠状动脉狭窄程度相关,还取决于冠状动脉内粥样斑块的不稳定性,而炎症可能是斑块不稳定的重要因素之一^[4]。与之关系密切的 NF-κB 是一种活跃的转录因子,活化的 NF-κB 与其靶基因的 κB 位点结合,诱导、调控许多参与炎症及免疫的黏附分子、细胞因子、趋化因子等转录,从而导致机体局部或全身性的炎症反应^[5]。然而,在各种炎症反应的刺激下又使得体内 NF-κB 活化,促进炎症细胞在粥样硬化斑块内聚集和活化,导致冠状动脉粥样硬化斑块不稳定^[6]。本研究结果显示 ACS 患者外周血单个核细胞 NF-κB 水平明显高于稳定型心绞痛患者和正常人。

同时,免疫细胞化学染色显示外周血单个核细胞 NF- κ B 活性在 ACS 患者中明显增高,其中 AMI 患者 NF- κ B 活性高于 UAP 患者,由此,本研究推测 NF- κ B 参与了炎症反应,其活化可能启动了斑块炎症发生与发展,促使斑块的不稳定和破裂,可作为斑块不稳定的外周血标志物之一。

经大量研究表明^[7-8],炎症过程中炎性细胞与血管内皮细胞在细胞黏附分子介导下发生黏附是炎症反应的关键步骤,最终导致动脉粥样硬化斑块的形成。血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)属于黏附分子中免疫球蛋白超家族的重要成员,存在于血管内皮细胞上,可介导单核细胞、嗜酸性粒细胞与内皮细胞的黏附。sVCAM-1 是 VCAM-1 脱落后进入血液后的可溶形式,其在维持正常组织的稳定、介导炎症反应、血栓形成、损伤修复及免疫调节中均发挥着重要作用^[9]。本研究观察了 NF- κ B 在 ACS 时的变化,并探讨 sVCAM-1 的变化及二者之间的相互关系。sVCAM-1 正常情况下在细胞表面呈低表达,其升高促进了白细胞的黏附过程,从而加重了由白细胞介导的炎症病理损伤,进一步加重组织缺血缺氧^[10-11]。本研究发现,ACS 患者和 UAP 患者血浆 sVCAM-1 水平均明显升高,而 ACS 组中 AMI 患者血浆 sVCAM-1 水平明显高于 UAP 组,提示其血浆水平可一定程度地反映冠心病严重性。这表明 sVCAM-1 可作为动脉粥样斑块是否稳定的标记物。同时,从本研究中发现血浆 sVCAM-1 水平和 NF- κ B 的活性成正相关。有学者提出调节 VCAM-1 基因表达的因素有多种,其中最主要的是 NF- κ B 信号通路。VCAM-1 中含有与 NF- κ B 的结合位点,激活内皮细胞上的 NF- κ B 可使 VCAM-1 等表达增强;阻断 NF- κ B 通路,可明显减少 VCAM-1 的表达^[12]。NF- κ B 通过调控内皮细胞相关黏附分子的表达,参与了动脉粥样硬化过程中的单核细胞浸润与迁移^[13]。

NF- κ B 主要生物学效应之一是促进炎症介质——血管黏附分子的表达,结合相关文献,本实验推测,NF- κ B 可能通过上调 sVCAM-1 表达而促发 ACS。而 sVCAM-1 可能通过促进 NF- κ B 的活化而导致各种促动脉粥样硬化的细胞因子和趋化因子的生成,最终促使 ACS 的发生。那么可否通过抑

制 sVCAM-1 信号,从而抑制 NF- κ B 的活化来预防动脉粥样硬化,因而降低相关的发病率和死亡率,值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2010, 17(4): 332-341.
- [2] Postadzhiyan A S, Tzontcheva A V, Kehayov I, et al. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and their association with clinical outcome, troponin T and C-reactive protein in patients with acute coronary syndromes[J]. *Clin Biochem*, 2008, 41(3): 126-133.
- [3] Tilstra J S, Clauson C L, Niedernhofer L J, et al. NF- κ B in aging and disease[J]. *Aging Dis*, 2011, 2(6): 449-465.
- [4] Soejima H, Kishikawa H, Ogawa H. Inflammatory biomarker for diagnosis of coronary diseases[J]. *Nihon Rinsho*, 2011, 69(1): 74-78.
- [5] Kim S R, Bae Y H, Bae S K, et al. Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF- κ B activation in endothelial cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(5): 886-895.
- [6] Baker R G, Hayden M S, Ghosh S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease[J]. *Cell Metab*, 2011, 13(1): 11-22.
- [7] Mashru M R, Shah V K, Soneji S L, et al. Soluble levels of cell adhesion molecules (CAMs) in coronary artery disease[J]. *Indian Heart J*, 2010, 62(1): 57-63.
- [8] Mackesy D Z, Goalstone M L. Insulin augments tumor necrosis factor- α stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2011, 8: 34.
- [9] Videm V, Albrigtsen M. Soluble ICAM-1 and VCAM-1 as markers of endothelial activation[J]. *Scand J Immunol*, 2008, 67(5): 523-531.
- [10] Tsai A K, Steffen B T, Ordovas J M, et al. Short-term fenofibrate treatment reduces elevated plasma LP-PLA2 mass and sVCAM-1 levels in a sub-cohort of hypertriglyceridemic GOLDN participants[J]. *Transl Res*, 2011, 158(2): 99-105.
- [11] Nowak M, Wielkoszynski T, Marek B, et al. Blood serum levels of vascular cell adhesion molecule (sVCAM-1), intercellular adhesion molecule (sICAM-1) and endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) in diabetic retinopathy[J]. *Clin Exp Med*, 2008, 8(3): 159-164.
- [12] Lin W N, Luo S F, Lee C W, et al. Involvement of MAPKs and NF- κ B in LPS-induced VCAM-1 expression in human tracheal smooth muscle cells[J]. *Cell Signal*, 2007, 19(6): 1258-1267.
- [13] Zerfaoui M, Suzuki Y, Naura A S, et al. Nuclear translocation of P65 NF- κ B is sufficient for VCAM-1, but not ICAM-1, expression in TNF-stimulated smooth muscle cells: differential requirement for PARP-1 expression and interaction[J]. *Cell Signal*, 2008, 20(1): 186-194.

(责任编辑:冉明会)