

# 单核细胞表面受体 VSTM1 与冠状动脉粥样硬化及斑块稳定性之间的关系<sup>\*</sup>

上海交通大学医学院附属第九人民医院 王晓菲 范虞琪 张俊峰 王长谦\*, 上海 201900

**摘要** 目的:探讨单核细胞表面 VSTM1 的表达水平与冠状动脉病变的相关性及临床意义。方法:选择确诊或疑诊冠心病而行冠状动脉造影检查的患者 121 例,依据患者冠状动脉造影检查结果,将入选者分为对照组和实验组。对照组为冠脉造影堵塞 <50% 者;实验组为冠脉造影堵塞 ≥50% 者;实验组根据临床症状分为不稳定型心绞痛、稳定型心绞痛以及急性心肌梗死组,根据病变情况又分为单支、两支及三支病变组。比较各组 VSTM1 水平,并计算 Gensini 积分,探讨 VSTM1 水平与 Gensini 积分和病变支数的关系。结果:①急性心肌梗死组和不稳定型心绞痛组的 VSTM1 水平显著低于稳定型心绞痛组和对照组(均  $P < 0.05$ )。②单支、双支及三支病变组间的 VSTM1 水平比较,差异无统计学意义。③VSTM1 水平与冠状动脉 Gensini 评分无明显相关关系( $R = 0.15$ )。结论:单核细胞表面 VSTM1 表达的降低可能与动脉粥样硬化斑块的不稳定性有关,动态监测单核细胞表面 VSTM1 表达水平对预测冠状动脉病变进展具有较好的临床价值。

**关键词** 冠状动脉疾病; VSTM1; 冠状动脉造影术; Gensini 积分; 急性心肌梗死

**中图分类号** R541.4      **文献标识码** A      **DOI** 10.11768/nkjwzzz.20190508

**Relationship between VSTM1 and coronary atherosclerosis and plaque stability** WANG Xiao-fei, FAN Yu-qi, ZHANG Jun-feng, WANG Chang-qian\*. The Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

**Abstract** Objective: To investigate the correlation between the expression of VSTM1 on monocyte surface and coronary artery disease and its clinical significance. Method: 121 consecutive patients with confirmed or suspected coronary heart disease undergoing coronary angiography were enrolled in this study. All patients were divided into control group and experimental group according to the results of coronary angiography. The control group was divided into unstable angina pectoris, stable angina pectoris and acute myocardial infarction subgroups according to clinical symptoms. The experimental group was divided into single vessel, two vessel and three vessel lesions subgroups according to the results of coronary angiography. The levels of VSTM1 in each group were measured, and the Gensini score was calculated to explore the relationship between the levels of VSTM1 and the Gensini score and the number of lesions in each group. Results: ①VSTM1 levels in acute myocardial infarction subgroup and unstable angina subgroup were significantly lower than those in stable angina subgroup and control group ( $P < 0.05$ ). ②There was significant difference in the expression of VSTM1 between the two-vessel lesion subgroup and control group ( $P < 0.05$ ). ③There was no significant correlation between VSTM1 level and Gensini score ( $R = 0.15$ ). Conclusion: The decrease of VSTM1 expression on monocyte surface may be related to the instability of atherosclerotic plaque. Dynamically monitoring the expression of VSTM1 on monocyte surface has good clinical value in predicting the progression of coronary artery disease.

**Key words** Coronary artery disease; VSTM1; Coronary angiography; Gensini score; Acute myocardial infarction

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是严重危害人类健康的常见病、多发病,是心肌梗死和脑梗死等心脑血管事件发病的共同基础和致死的主要原因<sup>[1]</sup>。AS 是综合性的慢性病理过程,其发病机制主要有脂质浸润学说、血栓形成学说、损伤反应学说

等。Ross<sup>[2]</sup>提出 AS 是一种炎症性疾病而不是单纯由于脂质沉积所致,并且这一学说已被广泛接受。VSTM1 (V-set and transdomain containing 1), 也被称为 SIRL1 (signal inhibitory receptor on leukocytes-1), 是近期发现的细胞膜受体<sup>[3,4]</sup>。本研究测定冠心病患者单核细胞表面 VSTM1 的表达水平和动脉粥样硬化斑块形成及稳定性之间的关系,探讨 VSTM1 在冠状动脉粥样硬化形成过程中的作用。

\*基金项目:国家自然科学基金(No:81470546)

\*通信作者:王长谦,E-mail:changqianwang@hotmail.com

## 资料与方法

**一般资料** 选择2018年1月~6月上海交通大学医学院附属第九人民医院收治的确诊或疑诊冠心病而行冠状动脉造影检查的患者121例。排除严重肝肾功能不全、纽约心功能分级(NYHA)Ⅱ级以上的心功能不全、合并感染、近期重大手术、外伤史以及患有肿瘤、血液、免疫系统疾病的患者。入选患者依据临床情况接受包括冠状动脉血运重建术以及阿司匹林、氯吡格雷、西洛他唑、替罗非班、低分子肝素、ACEI/ARB、β受体阻断剂、钙通道阻滞剂、硝酸酯类药物、洋地黄类以及利尿剂等基础药物治疗。

### 方法

**1. 冠状动脉造影术** 冠状动脉造影术(coronary angiography,CAG)采用荷兰飞利浦公司产FD20型心血管造影仪,穿刺采用标准Judkins法或右桡动脉途径进行,以确定狭窄病变的部位及程度。

**2. VSTM1的测定** 患者入院后完成相关临床资料收集及生化指标检查。所有患者均于入院当天即刻采静脉血2 mL,EDTA-K抗凝充分混匀,离心5 min,去除部分血浆。依次取抗凝血200 μL等量加入3支流式试管中。用免疫荧光抗体间接标记法标记单核细胞表面VSTM1的表达:第一管为空白组;第二管为同型对照组(ISO):加VSTM1的同型对照2 μL;第三管为检测管:加一抗4 μL。后4℃冰箱孵育30 min。取出3支试管,空白组什么都不加;同型对照组(ISO)加CD14的同型对照10 μL;检测管加CD14 10 μL。3管均加裂解液2 mL,放4℃冰箱孵育10 min。加PBS液终止反应,离心400 g(1 500转/min)5 min,弃上清。加PBS液,洗涤2次,离心5 min,弃上清。在ISO管和检测管加1.5 mL PBS液+1 μL二抗,放冰箱孵育30 min,用PBS液洗涤2次,1 h内上机检测。

用Becton Dickinson FACS Calibnr流式细胞仪测定单核细胞表面VSTM1的荧光强度。激发波长为488 nm,采用分析检测软件(Cellquest)进行数据分析,根据细胞大小,细胞内颗粒密度,前向角散射和侧向角散射得到二维点图,将白细胞分为中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞3个亚群,又根据CD14的荧光强度进一步证实单核细胞亚群的纯度。用门圈出拟测定的单核细胞群,分析10 000个单核细胞。

通过直方图调出平均荧光强度。

**3. 计算各组Gensini积分** 按照Gensini积分方法及相关积分分段评价标准<sup>[5]</sup>计算各组Gensini积分。采用Gensini积分进行冠脉病变程度的评价。

(1)根据冠脉狭窄程度评估积分:①管腔狭窄≤25%计1分;②管腔狭窄26%~50%计2分;③管腔狭窄51%~75%计4分;④管腔狭窄76%~90%计8分;⑤管腔狭窄91%~99%计16分;⑥管腔狭窄100%计32分。(2)根据病变部位不同,求出单处病变积分与系数乘积:①左主干病变×5;②前降支近段×2.5;③前降支中段×1.5;④回旋支开口处×3.5;⑤回旋支近段×2.5;⑥左室后侧支×0.5,前降支第一对角支、第二对角支,心尖部,回旋支的钝缘支、远段,右冠状动脉近段、中段、远段、后降支×1。(3)以上积分求和,为每例患者的Gensini总积分,积分值越高病变程度越重。

**统计学处理** 采用SPSS 18.0统计软件。计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,均数比较采用t检验,多重比较选择LSD(Least-significant difference)方法,方差分析前行方差齐性检验;计数资料用百分数表示,采用 $\chi^2$ 检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

## 结 果

**基线资料** 将冠状动脉分支直径丢失50%以上定义为显著狭窄,列入冠心病组(实验组);<50%者,且根据临床症状可除外冠心病者列入对照组。根据临床症状以及造影情况,将实验组分为不稳定型心绞痛组、稳定型心绞痛组以及急性心肌梗死组。各组间年龄、性别、高血压及糖尿病史、甘油三酯(TG)、胆固醇(CH)、糖化血红蛋白(GHb)等指标之间差异均无统计学意义(均P>0.05),见表1。

**VSTM1表达水平** 急性心肌梗死组和不稳定型心绞痛组VSTM1表达水平明显低于稳定型心绞痛组和对照组(P<0.05),急性心肌梗死组与不稳定型心绞痛组间差异无统计学意义(P>0.05),对照组与稳定性斑块组间差异无统计学意义(P>0.05)。VSTM1水平与冠状动脉Gensini评分无明显相关性(R=0.15),见表2。

**VSTM1表达与冠状动脉病变程度、冠状动脉斑块性质的关系** 冠脉病变组VSTM1表达水平低于对照组,但仅双支病变组和对照组比较,差异有统计学意义(P<0.05),见表3。

表 1 4 组基线资料比较

组别	例	年龄 (岁)	Ghb (%)	CH (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL (mmol/L)	HDL (mmol/L)
对照组	33	58.2 ± 6.2	6.21 ± 1.33	4.05 ± 1.18	1.75 ± 1.12	2.73 ± 0.90	1.01 ± 0.26
稳定型心绞痛组	28	62.4 ± 10.1	6.48 ± 1.31	4.26 ± 1.44	1.58 ± 1.07	2.54 ± 0.84	1.04 ± 0.22
不稳定型心绞痛组	29	64.5 ± 9.8	6.44 ± 1.17	4.40 ± 1.39	1.61 ± 1.15	2.66 ± 0.97	1.08 ± 0.26
急性心肌梗死组	32	66.0 ± 8.2	6.49 ± 1.26	4.47 ± 1.22	1.66 ± 1.10	2.78 ± 0.88	0.99 ± 0.18
组别	例	男性 [例(%)]	家族史 [例(%)]	吸烟 [例(%)]	高血压 [例(%)]	糖尿病 [例(%)]	
对照组	33	19(57.58)	3(9.09)	7(21.21)	21(63.64)	7(21.21)	
稳定型心绞痛组	28	18(64.29)	2(7.14)	10(35.71)	15(53.70)	9(32.14)	
不稳定型心绞痛组	29	18(62.07)	3(10.34)	11(37.93)	18(62.07)	9(31.03)	
急性心肌梗死组	32	23(71.88)	4(12.5)	15(48.00)	17(53.13)	11(33.33)	

注: LDL 低密度脂蛋白; HDL 高密度脂蛋白

表 2 4 组 VSTM1 表达水平比较

(x ± s)

组别	例	VSTM1	Gensini 评分(分)
对照组	33	76284.52 ± 29920.60	7.03 ± 5.95
稳定型心绞痛组	28	77704.48 ± 25361.91	30.46 ± 29.84
不稳定型心绞痛组	29	52396.69 ± 28109.62 *▲	41.47 ± 30.42
急性心肌梗死组	32	53179.35 ± 20116.80 *▲	50.71 ± 36.42

注: 与稳定型心绞痛组比较, \*P &lt; 0.05; 与对照组比较, ▲P &lt; 0.05

表 3 各组 VSTM1 表达水平比较 (x ± s)

组别	例	VSTM1
对照组单支病变	33	76284.52 ± 29920.60
单支病变	35	63728.74 ± 31279.63
双支病变	26	56852.29 ± 25320.98 *
三支病变	27	61775.61 ± 23760.08

注: 与对照组比较, \*P &lt; 0.05

## 讨 论

VSTM1 位于人染色体 19q.13.4, 毗邻于白细胞受体复合体(leukocyte receptor complex)区域, 和诸多调控白细胞功能的受体蛋白, 如 LAIR-1 等高度相似。VSTM1 作为细胞膜受体, 具有胞外序列、穿膜序列及胞内序列。其胞内序列在不同种属动物中高度保守, 提示了其功能的重要性。VSTM1 的胞内序列包含着 2 个 ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) 区域, 通过酪氨酸的磷酸化调控, 影响其下游作用靶点。VSTM1 主要分布在髓系细胞, 尤其是在单核细胞表面高表达<sup>[3,4]</sup>。研究发现 VSTM1 可以减少中性粒细胞内活性氧(ROS)的生成, 因为: ①VSTM1 可以减少 ROS 等自由基生成<sup>[6]</sup>, 而体内自由基的生成能促进体内 LDL 的氧化, 形成 oxLDL。而 oxLDL 正是激活单核/巨噬细胞功能并导致动脉粥样硬化的关键起始因子; ②VSTM1 水平和炎症水平负相关。在外周血单核细

胞中, 高表达 VSTM1 的单核细胞的 TNFα 水平明显低于低表达 VSTM1 的单核细胞。在肺炎患者中, 同样发现中性粒细胞低表达 VSTM1 的疾病严重度高于高表达 VSTM1 组。同时, 炎症反应是导致斑块破损的重要因素; ③VSTM1 可以减少 ROS 等自由基生成, 而自由基能促进细胞凋亡; ④VSTM1 调控 ROS 水平, ROS 可以影响单核/巨噬细胞 oxLDL 摄取。因此, VSTM1 在调控 oxLDL 激活单核/巨噬细胞功能中可能起到了重要的作用。

VSTM1-V1 在细胞表面表达, 并可能通过与体内其他细胞表面或者体液中的配体相结合, 为细胞在静息状态下提供了一个激活阈值<sup>[7]</sup>, 防止炎症细胞对自身的损伤作用。研究显示, 微生物感染和炎症刺激可以导致中性粒细胞和单核细胞 VSTM1 的迅速下调, 细胞阈值下降, 从而激活细胞的炎症反应<sup>[8]</sup>。此外 VSTM1-V1 在吞噬细胞免疫抑制性调节中发挥重要作用, 激活 VSTM1 后, 可以降低中性粒细胞的杀伤微生物活性, 可能与 ROS 产生的抑制有关<sup>[8]</sup>。这些都进一步证实 VSTM1 水平的降低是反映冠脉病变不稳定斑块发展的一个重要标志物。

本研究发现斑块越不稳定的患者, 其单核细胞表面 VSTM1 表达越低, 提示单核细胞表面 VSTM1 表达的降低可能与动脉粥样硬化斑块的不稳定性

(下转第 393 页)

## 讨 论

PMPs 是被激活或凋亡时的血小板细胞膜形成的直径约  $0.1 \sim 1.0 \mu\text{m}$  的微小囊泡, 通过表面的磷脂质(PS)和组织因子的表达参与机体凝血过程, 是血小板活化的标记物之一。当血小板受凝血酶、组胺、抗血小板抗体、高剪切力、纤溶酶、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )或氧自由基等物质刺激发生活化后, PMPs 表达量显著上调, 是血小板活化的有效指标, 同时 PMPs 也是活化血小板的刺激因素, 其通过直接及间接作用激活血小板, 两者互为因果, 促进血栓形成、延伸<sup>[2,4,6,7]</sup>。本研究中 PMPs 在 ACS 患者表达显著上调, 其中以 AMI 患者循环 PMPs 水平最高, 显著高于 UA、SA 患者及健康者, 与既往研究一致<sup>[4]</sup>。AMI 相对于 UA 而言心肌缺血更严重和持久, 心肌细胞严重损伤乃至发生坏死, 是 ACS 中最凶险的一类, 其病理基础是血管内皮损伤, 局部血小板活化聚集后吸附纤维蛋白以及红细胞形成红色血栓<sup>[8]</sup>, 最终致使冠状动脉血流中断, PMPs 在 AMI 患者中表达显著高于 UA 患者, 一定程度上说明 PMPs 可能与 ACS 患者病情严重程度有关, 这与 PMPs 表面富含的磷脂酰丝氨酸(PS)参与促凝血功能有关, PS 参与促凝蛋白复合物形成, 同时经相关作用导致血小板膜释放出更多的凝血酶原, 加剧凝血反应, 同时 PMPs 所含的 PAF、Ca<sup>2+</sup> 依赖蛋白酶等物质可直接活化血小板, 而活化的血小板生成 PMPs 增加, 最终引

起血液高凝状态<sup>[2]</sup>, 这在一定程度上可以解释 PMPs 与 ACS 患者病情的关系。

GRACE 评分包括年龄、血压、ST 段改变、心率等八个方面, 其综合评定 ACS 患者危险分层的指标, 被指南推荐为 ACS 患者院内外危险评估的主要标志<sup>[9]</sup>。本文发现, GRACE 评分属高危者循环中 PMPs 水平显著高于中危及低危患者, 且发生 MACE 的患者循环 PMPs 表达水平高, 中危患者 PMPs 水平显著高于低危患者, 表明 PMPs 水平越高, ACS 患者危险性越高, 病情越严重。

## 参 考 文 献

- 贾晓丽,熊晓兰,肖超,等.三个血浆生物标志物对急性冠脉综合征预后作用的研究进展[J].医学与哲学,2017,38(581):55-57.
- 柳桂萍,张育.血小板微颗粒的生物学功能及其与相关临床疾病的关系[J].中华临床医师杂志(电子版),2016,10(2):243-247.
- 李益民,黄进,陆治平,等.急性冠脉综合征患者冠脉血小板微粒水平[J].中国循证心血管医学杂志,2014,6(5):568-570.
- 杨婉花,石斌,刘长芳,等.血小板微粒对急性冠脉综合征患者危险程度及对疾病预后的预测作用[J].中国老年学杂志,2014,34(1):58-60.
- 韩良富,卞晓洁,郭艳霞,等.GRACE 风险评分系统在苏州地区急性心肌梗死患者中的验证研究[J].中国急救医学,2015,5(11):1003-1008.
- 高稳,罗心平,李剑.血小板微颗粒与急性冠脉综合征[J].国际心血管病杂志,2013,40(3):132-135.
- Zwicker JI, Trenor CC 3rd, Furie BC, et al. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(4):728-733.
- 李堪董,郑有民,刘超权.不同性别青年急性心肌梗死患者的临床资料分析[J].内科急危重症杂志,2018, 24(6): 475-477.
- 黄振华,廖瑾莉,肖孝勇,等.GRACE 评分对急性胸痛患者 30d 心血管不良事件的预测价值[J].中山大学学报(医学版),2018, 39(1):82-84.

(2018-07-20 收稿 2019-04-02 修回)

(上接第 383 页)

有关,因此,动态监测单核细胞表面 VSTM1 表达对预测冠状动脉病变进展具有较好的临床价值。

本研究发现单核细胞表面 VSTM1 水平在反映患者冠状动脉狭窄严重程度方面无敏感性。且仅双支病变组和对照组的 VSTM1 表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 可能是因为 VSTM1 是一种炎性负性指标, 斑块越不稳定其水平越低, 研究发现不稳定型冠心病患者(包括心肌梗死和不稳定型心绞痛患者) VSTM1 水平较稳定型心绞痛患者明显降低, 急性冠脉综合征的病理基础是粥样硬化斑块破裂及血栓形成, 其发生不一定均发生在有严重冠脉狭窄的患者。

## 参 考 文 献

- Jin YY, Chen QJ, Yang W, et al. Upregulation of microRNA-98 increases radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma [J]. J Radiat Res, 2016, 57(5): 468-476.

- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. N Engl J Med, 1999, 340(2):115-126.
- Steevels TA, Lebbink RJ, Westerlaken GH, et al. Signal inhibitory receptor on leukocytes-1 is a novel functional inhibitory immune receptor expressed on human phagocytes. J Immunol, 2010, 184(9):4741-4748.
- Steevels TA, van Avondt K, Westerlaken GH, et al. Signal inhibitory receptor on leukocytes-1 (SIRL-1) negatively regulates the oxidative burst in human phagocytes[J]. Eur J Immunol, 2013, 43(5):1297-308.
- Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease[J]. Am J Cardiol, 1983, 51(3):606-610.
- Kumar D, Puan KJ, Andiappan AK, et al. A functional SNP associated with atopic dermatitis controls cell type-specific methylation of the VSTM1 gene locus[J]. Genome Medicine, 2017, 20, 9(1):18-33.
- Barrow AD, Trowsdale J. You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off." the ambiguity of immunoreceptor signaling[J]. Eur J Immunol, 2006, 36(7):1646-1653.
- Steevels TA, van Avondt K, Westerlaken GH, et al. Signal inhibitory receptor on leukocytes-1(SIRL-1)negatively regulates the oxidative burst in human phagocytes[J]. Eur J Immunol, 2013, 43(5):1297-1308.

(2018-10-11 收稿 2019-03-19 修回)