

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.10.020
文章编号: 1005-8982 (2019) 10-0100-05

急性冠状动脉综合征患者外周血 $\beta 2$ 整合素和 Fractalkine 的表达水平及机制研究

朱锐, 吴校林, 周青, 李彬, 李宸宇

(襄阳市中心医院 心血管内科, 湖北 襄阳 441021)

摘要: 目的 观察急性冠状动脉综合征(ACS)患者外周血中 $\beta 2$ 整合素和 Fractalkine 的表达水平并探讨其作用机制。**方法** 选取襄阳市中心医院收治的 86 例 ACS 患者, 其中不稳定型心绞痛(UA) 32 例, 急性心肌梗死(AMI) 54 例, 并以 20 例冠状动脉造影正常的患者 and 28 例稳定型心绞痛(SAP)作为对照。采用流式细胞技术检测外周血白细胞中的 $\beta 2$ 整合素 [LFA-1 (CD11a/CD18) 和 Mac-1 (CD11b/CD18)] 阳性细胞百分率, 酶联免疫吸附法检测血清中 Fractalkine、ICAM-1 的水平, Western blotting 检测外周血白细胞中 FAK、PKB 蛋白表达水平。**结果** AMI 组和 UA 组患者外周血白细胞中 LFA-1、Mac-1 阳性细胞百分率和 FAK、PKB 蛋白水平高于正常组和 SAP 组患者 ($P < 0.05$)。冠状动脉粥样硬化性心脏病患者血清中 Fractalkine、ICAM-1 水平较冠状动脉造影正常的患者升高 ($P < 0.05$)。AMI 组患者血清中 Fractalkine、ICAM-1 的水平高于正常组、UA 组及 SAP 组患者 ($P < 0.05$)。**结论** ACS 时外周循环中 Fractalkine 释放增加, 与白细胞表面的受体结合促进 $\beta 2$ 整合素及黏附分子活化, 激活 FAK-PI3K/PKB 信号通路参与 ACS 的炎症反应。

关键词: 急性冠状动脉综合征; 整合素类; 趋化因子 CX3CL1; 炎症

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

Exploring the expression of $\beta 2$ integrin and Fractalkine in acute coronary syndrome patients

Rui Zhu, Xiao-lin Wu, Qing Zhou, Bin Li, Chen-yu Li

(Department of Cardiology, Xiangyang Central Hospital, Xiangyang, Hubei 441021, China)

Abstract: Objective To observe the expression levels of $\beta 2$ integrin and Fractalkine in peripheral blood of patients with acute coronary syndrome (ACS) and to explore the possible mechanism. **Methods** Totally 86 patients with ACS admitted to our hospital were enrolled, including 32 patients with unstable angina (UA) and 54 patients with acute myocardial infarction (AMI). Another 20 patients with normal coronary angiography and 28 patients with stable angina (SAP) were regarded as control. The percentage of $\beta 2$ integrin LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) positive cells in peripheral blood leukocytes was detected by flow cytometry. The levels of Fractalkine and ICAM-1 in serum were detected by ELISA. The expression levels of FAK and Akt in peripheral blood leukocytes were assessed by Western blotting. **Results** The percentages of LFA-1, Mac-1 positive cells and the expression of FAK, PKB protein in peripheral blood leukocytes of AMI group and UA group were significantly higher than those of normal group and SAP group ($P < 0.05$). The levels of Fractalkine and ICAM-1 in patients with coronary heart disease were significantly higher than those with normal coronary angiography ($P < 0.05$). The levels of Fractalkine and ICAM-1 in the serum of patients with AMI were the highest in the four groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Increased Fractalkine that released in the peripheral circulation during ACS binds to the receptors on the surface of leukocytes and promotes activation of $\beta 2$ integrin and adhesion molecules. The FAK-PI3K/PKB signaling pathway was activated

收稿日期: 2018-11-13

[通信作者] 吴校林, E-mail: wxling.23@163.com; Tel: 15897965279

and participated in inflammatory responses of ACS.

Keywords: acute coronary syndrome; integrins; chemokine CX3CL1; inflammation

急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 主要是不稳定的冠状动脉粥样硬化斑块发生破裂,并伴发炎症激活、血小板聚集及血栓形成导致血管完全或不完全闭塞而引起心肌缺血坏死的临床综合征^[1]。斑块和血液中的淋巴细胞、巨噬细胞和肥大细胞等炎症细胞及其分泌的炎症因子密切影响着动脉粥样硬化和 ACS 的发生、发展^[2]。Fractalkine 作为一种常见的炎症趋化因子,可与白细胞表面的受体结合,触发 $\beta 2$ 整合素和黏附分子的表达和活化,参与动脉粥样硬化的炎症反应过程^[3]。因此,笔者对 ACS 患者血液中的 Fractalkine、 $\beta 2$ 整合素 [(淋巴细胞功能相关抗原 1 (LFA-1)、CD11a/CD18 巨噬细胞分子 1 (CD11b/CD18, Mac-1)]、细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 等指标进行检测并探讨其作用机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 3 月—2017 年 10 月襄阳市中心医院收治的 86 例 ACS 患者。其中,不稳定型心绞痛 (unstable angina pectoris, UA) 32 例 (UA 组),急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 54 例 (AMI 组),同时选取 20 例冠状动脉造影正常患者 (正常组) 和 28 例稳定型心绞痛 (stable angina pectoris, SAP) 患者 (SAP 组) 作为对照。纳入标准:所有患者均行冠状动脉造影检查且诊断均符合临床诊断标准。排除标准:感染性疾病、先天性心脏病、瓣膜性心脏病、自身免疫性疾病、肿瘤及严重肾功能不全。4 组患者年龄、性别、危险因素及服药情况等具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术 采用流式细胞术检测 $\beta 2$ 整合素 LFA-1 (CD11a/CD18) 和 Mac-1 (CD11b/CD18) 的表达。所有患者于入院后第 2 天清晨空腹采肘静脉血 2 ml 置于含乙二胺四乙酸抗凝的采血管中,混匀后取 100 μ l 全血加入 10 μ l 异硫氢酸荧光素标记的鼠抗人 CD11a 抗体 (美国 BD 公司) 和 10 μ l 藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记的鼠抗人 CD18 抗体 (美国 BD 公司) 置于 A 管中; 100 μ l 全血加入 10 μ l FITC 标记的鼠抗人 CD11b 抗体 (美国 BD 公司) 和 10 μ l

PE 标记的鼠抗人 CD18 抗体置于 B 管中; C 管中加入 100 μ l 全血和阴性对照抗体 (美国 BD 公司)。室温孵育 30 min, 每管中加入 1 ml 红细胞裂解液混匀后避光反应 10 min, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 ml 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 洗涤 2 次, 沉淀的白细胞加入 0.5 ml PBS 缓冲液后上机检测。采用 FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司) 检测 10 000 个细胞, Cell Quest 软件分析, 结果以阳性细胞百分率表示。

1.2.2 血清 Fractalkine 和 ICAM-1 的检测 抽取空腹静脉血 2 ml 置于无任何添加剂的采血管中, 2 h 内以 2 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清于环氧树脂管中并保存在 -70°C 冰箱中备用。血清中 Fractalkine 和 ICAM-1 的水平采用酶联免疫吸附法测定, 酶标仪为瑞士 Tecan 公司产品, 操作步骤严格按照试剂盒 (美国 Elabscience 公司) 说明书进行并绘制标准曲线。

1.2.3 Western blotting 检测 1 ml 静脉血加入 5 ml 红细胞裂解液混匀后避光反应 10 min, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 5 ml PBS 缓冲液洗涤 2 次; 再向沉淀的白细胞中加入 1.5 ml 总蛋白提取液 4°C 下 14 000 r/min 离心 30 min, 取上清保存备用。取 20 μ g 蛋白样品, SDS-PAGE 电泳, 100 V 转移约 1 h, 溴酚蓝到达分离胶的底端处附近即可停止电泳。再将蛋白电泳转移至聚偏氟乙烯膜上, 放入封闭液中 37°C 封闭 1 h; 加入武汉博士德公司的抗黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 抗体 (1:500) 和抗蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 抗体 (1:500), 4°C 过夜, 反复洗膜后, 将膜与相应的二抗孵育, 室温下轻摇 1 h, 洗膜后放入显影液显影, 定影液定影, 将胶片扫描得到照片。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 LSD- t 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料比较

4 组患者临床资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。4 组患者住院期间均服用他汀类药物和双抗血小板药物 (阿司匹林加氯吡格雷或替格瑞洛)。见表 1。

表 1 4 组患者临床资料比较

指标	<i>n</i>	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	男 / 女 / 例	吸烟 / 例	高血压 / 例	糖尿病 / 例	高血脂 / 例	双抗 / 例	他汀 / 例
正常组	20	57.6 ± 6.7	13/7	11	12	5	6	20	20
SAP 组	28	63.2 ± 7.4	16/12	15	16	8	7	28	28
UA 组	32	61.5 ± 8.3	22/10	18	20	11	10	32	32
AMI 组	54	59.4 ± 9.2	39/15	34	33	17	19	54	54
<i>F/χ²</i> 值		0.283	1.980	0.884	0.196	0.584	0.911	—	—
<i>P</i> 值		0.837	0.576	0.829	0.978	0.900	0.823	—	—

2.2 LFA-1、Mac-1 水平比较

4 组患者外周血白细胞中 LFA-1 (CD11a/CD18)、Mac-1 (CD11b/CD18) 阳性细胞百分率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); AMI 组和 UA 组患者 LFA-1、Mac-1 阳性细胞百分率高于 SAP 组和正常组患者 ($P < 0.05$), 且 AMI 组患者 LFA-1 和 Mac-1 阳性细胞百分率较 UA 组患者更高 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 4 组患者 LFA-1、Mac-1 水平比较 %

组别	<i>n</i>	LFA-1 (CD11a/CD18)	Mac-1 (CD11b/CD18)
正常组	20	17.9 ± 2.6	20.7 ± 2.9
SAP 组	28	21.4 ± 2.4	23.3 ± 3.2
UA 组	32	28.3 ± 3.0	30.4 ± 3.6
AMI 组	54	37.8 ± 3.2	41.2 ± 4.9
<i>F</i> 值		38.339	23.530
<i>P</i> 值		0.000	0.000

2.3 血清中 Fractalkine、ICAM-1 水平比较

4 组患者血清中 Fractalkine、ICAM-1 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 SAP 组患者相比, AMI 组和 UA 组患者较 SAP 组患者血清中 Fractalkine、ICAM-1 水平升高 ($P < 0.05$), 且 AMI 组患者血清中 Fractalkine、ICAM-1 水平较其他 3 组高 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 外周血白细胞 FAK、PKB 蛋白水平比较

正常组、SAP 组、UA 组及 AMI 组患者外周血白细胞 FAK 蛋白相对表达水平分别为 (0.545 ± 0.027)、(0.659 ± 0.039)、(0.783 ± 0.039) 及 (0.942 ± 0.079), 4 组患者外周血白细胞 FAK 蛋白水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 12.497$, $P = 0.002$);

表 3 4 组患者血清中 Fractalkine、ICAM-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Fractalkine/ (ng/L)	ICAM-1/ (ng/ml)
正常组	20	442.7 ± 32.1	157.9 ± 37.8
SAP 组	28	571.6 ± 37.7	359.9 ± 45.2
UA 组	32	683.4 ± 49.6	438.34 ± 48.6
AMI 组	54	873.1 ± 55.4	530.3 ± 60.1
<i>F</i> 值		83.334	53.072
<i>P</i> 值		0.000	0.000

UA 组和 AMI 组患者 FAK 蛋白水平高于 SAP 组患者 ($P < 0.05$)。正常组、SAP 组、UA 组、AMI 组患者外周血白细胞 PKB 蛋白相对表达水平分别为 (0.584 ± 0.011)、(0.620 ± 0.016)、(0.758 ± 0.030) 及 (0.853 ± 0.044)。4 组患者外周血白细胞 PKB 蛋白水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 19.431$, $P = 0.000$); UA 组和 AMI 组患者 PKB 蛋白水平高于 SAP 患者 ($P < 0.05$)。正常组和 SAP 组患者 FAK 和 PKB 蛋白水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1、2。

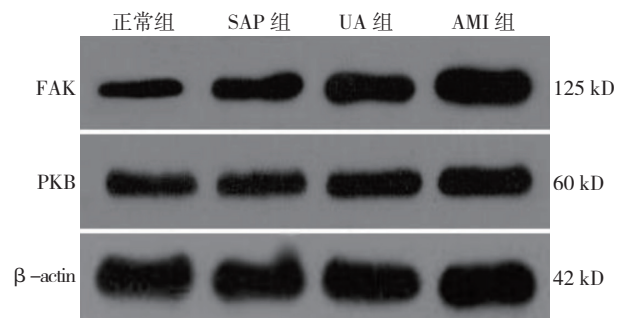


图 1 4 组患者外周血白细胞 FAK、PKB 蛋白的表达

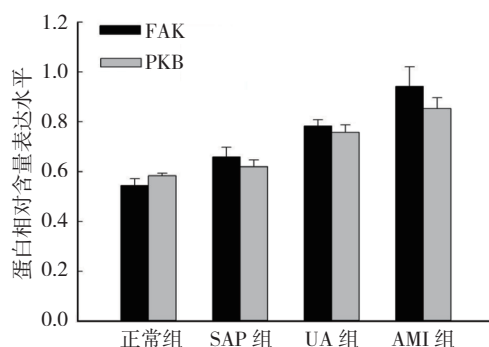


图 2 4 组患者外周血白细胞 FAK、PKB 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

动脉粥样硬化是一种血管慢性炎症反应性疾病。ACS 是动脉粥样硬化的主要临床表现,包括 ST 段抬高型心肌梗死、非 ST 段抬高型心肌梗死及 UA^[4]。ACS 通常是易损的粥样硬化斑块破裂或不稳定引起相关的冠状动脉部分或完全闭塞。易损斑块中含有大量的炎症细胞,斑块破裂后将引起血管中的白细胞聚集、黏附、游走、侵蚀。炎症细胞激活,合成和释放趋化因子、生长因子等炎症细胞因子,放大炎症反应,并促进白细胞 $\beta 2$ 整合素与黏附分子结合、血小板聚集、血栓形成及血管平滑肌细胞增殖,导致血管狭窄或闭塞^[2, 4-5]。因此,冠状动脉局部或全身的炎症反应在急性心肌梗死事件中起着重要的作用。

整合素是一类广泛存在于细胞表面的跨膜糖蛋白,是细胞外基质环境和细胞内信号传导的纽带。其主要介导细胞与细胞外基质、细胞和细胞之间的黏附,细胞迁移,参与止血、血管生成及胚胎形成等生理过程^[6-7]。其中 $\beta 2$ 整合素只表达于白细胞,也称之为白细胞整合素,在炎症反应中具有重要作用。LFA-1 (CD11a/CD18) 和 Mac-1 (CD11b/CD18) 是 $\beta 2$ 整合素的两个重要成员,其可与配体 ICAM-1 结合,调节白细胞稳定黏附到血管内皮细胞上,为白细胞穿越血管内皮提供条件,便于白细胞游走到炎症部位并发挥致炎作用^[8]。Fractalkine 也称为 CX3CL1,是趋化因子 CX3C 亚家族的唯一成员,其受体 CX3CR1 主要表达在 T 淋巴细胞、单核细胞和自然杀伤细胞上,介导 Fractalkine 的趋化作用^[9]。研究发现,Fractalkine/CX3CR1 信号通路参与动脉粥样硬化的炎症反应过程,主要起促炎症反应的作用^[9]。Fractalkine 不仅可介导白细胞黏附和跨膜转移过程促进循环中白细胞游出;还诱导 IFN- γ 、TNF- α 表达,损伤内皮细

胞,促使巨噬细胞释放基质金属蛋白酶降解粥样硬化斑块纤维组织中胶原蛋白,导致纤维帽变薄,斑块出现溃疡或破裂,诱发 ACS^[3, 9]。笔者研究发现,ACS 患者血清中 Fractalkine、ICAM-1 水平和外周血白细胞中 LFA-1、Mac-1 阳性细胞百分率高于冠状动脉造影正常和稳定型冠状动脉粥样硬化性心脏病(以下简称冠心病)患者,提示 Fractalkine、ICAM-1、LFA-1 及 Mac-1 参与 ACS 局部和全身的炎症反应并且相互作用,且 AMI 时这些炎症指标最高,炎症反应最强,这与国外的研究结果一致。

既往研究发现,当整合素与 ICAM-1 等配体结合后,FAK 构象改变,使 Tyr397 自身磷酸化,Tyr397 通过结合磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase, PI3K)的 p85 亚基 SH2 结构域激活 PI3K 途径。PKB 为 PI3K 的下游信号,参与白细胞活化、心肌缺血再灌注、细胞增殖及凋亡等很多重要的生理过程^[10-11]。笔者通过 Western blotting 技术检测外周血白细胞 FAK、PKB 蛋白表达水平,结果发现 ACS 患者 FAK、PKB 蛋白水平较冠状动脉造影正常和稳定型冠心病患者升高。这一系列研究结果表明,ACS 时外周循环中 $\beta 2$ 整合素、FRACTALKINE 等趋化因子及黏附分子表达增加、水平增高,增加的 Fractalkine 与白细胞表面的受体结合后促进 $\beta 2$ 整合素 LFA-1、Mac-1 及黏附分子 ICAM-1 活化,激活 FAK-PI3K/PKB 信号通路参与 ACS 的炎症反应。

综上所述,随着笔者对不稳定粥样硬化斑块和 ACS 炎症反应机制的进一步认识,有助于寻找 ACS 新的治疗靶点,为 ACS 的防治提供新的方向。

参考文献:

- [1] CERVELLIN G, RASTELLI G. The clinics of acute coronary syndrome[J]. Ann Transl Med, 2016, 4(10): 191-191.
- [2] SAGER H B, NAHRENDORF M. Inflammation: a trigger for acute coronary syndrome[J]. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2016, 60(3): 185-193.
- [3] IMAI T, YASUDA N. Therapeutic intervention of inflammatory/immune diseases by inhibition of the fractalkine (CX3CL1)-CX3CR1 pathway[J]. Inflamm Regen, 2016, 36: 9-9.
- [4] GEOVANINI G R, LIBBY P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates[J]. Clin Sci (Lond), 2018, 132(12): 1243-1252.
- [5] ESCARCEGA R O, LIPINSKI M J, GARCIA-CARRASCO M, et al. Inflammation and atherosclerosis: cardiovascular evaluation in patients with autoimmune diseases[J]. Autoimmun Rev, 2018, 17(7): 703-708.

- [6] FINNEY A C, STOKES K Y, PATTILLO C B, et al. Integrin signaling in atherosclerosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(12): 2263-2282.
- [7] LEY K, RIVERA-NIEVES J, SANDBORN W J, et al. Integrin-based therapeutics: biological basis, clinical use and new drugs[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(3): 173-183.
- [8] FAN Z, LEY K. Leukocyte arrest: Biomechanics and molecular mechanisms of beta2 integrin activation[J]. *Biorheology*, 2015, 52(5-6): 353-377.
- [9] LIU H, JIANG D. Fractalkine/CX3CR1 and atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(13-14): 1180-1186.
- [10] CHENG S Y, SUN G, SCHLAEPFER D D, et al. Grb2 promotes integrin-induced focal adhesion kinase (FAK) autophosphorylation and directs the phosphorylation of protein tyrosine phosphatase alpha by the Src-FAK kinase complex[J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(3): 348-361.
- [11] XU B, LEFRINGHOUSE J, LIU Z, et al. Inhibition of the integrin/FAK signaling axis and c-Myc synergistically disrupts ovarian cancer malignancy[J]. *Oncogenesis*, 2017, 6(1): DOI: 10.1016/j.cyto. 2016. 10. 008

(唐勇 编辑)