

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.08.005
文章编号: 1005-8982(2019)08-0025-05

特发性心房颤动患者 Th17 细胞及其细胞因子的表达水平及其相关性研究

谢文超¹, 刘明¹, 邹光新¹, 林智海¹, 姚光²

(1. 玉林市第一人民医院 心内科, 广西 玉林 537000; 2. 玉林市第四人民医院 心内科, 广西 玉林 537012)

摘要:目的 通过检测特发性心房颤动(AF)患者外周血 Th17 细胞及其细胞因子,探讨两者的相关性。**方法** 选取 2016 年 2 月—2018 年 2 月于玉林市第一人民医院心内科就诊的特发性 AF 患者 80 例,其中阵发性心房颤动(PAF)患者 34 例,慢性心房颤动(CAF)患者 46 例,选取年龄匹配的同期健康体检者 80 例作为对照组,流式细胞术检测患者外周血单核淋巴细胞 Th17 细胞百分率,ELISA 法检测患者血清白细胞介素 17(IL-17)、IL-6、IL-22 及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)水平,对患者的临床资料进行比较。**结果** PAF 组、CAF 组及对照组基线资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。3 组患者的 Th17 细胞百分率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$); PAF 组、CAF 组高于对照组($P < 0.05$), CAF 组高于 PAF 组($P < 0.05$)。3 组患者 IL-17、IL-6、IL-22、MMP-9 浓度比较,差异有统计学意义($P < 0.05$); PAF 组、CAF 组 IL-17、IL-6、IL-22、MMP-9 高于对照组($P < 0.05$), CAF 组 IL-17、IL-6、MMP-9 高于 PAF 组($P < 0.05$)。AF 患者 Th17 细胞百分率与左心房内径呈正相关($P < 0.05$),与左心室射血分数呈负相关($P < 0.05$)。**结论** 特发性 AF 患者外周血 Th17 细胞比例、IL-17、IL-6 及 IL-22 升高,且升高水平与 AF 进程和心肌纤维化水平相关。

关键词: 心房颤动; T 淋巴细胞; 细胞因子类

中图分类号: R541.75

文献标识码: A

Expression of Th17 cells and cytokines in patients with idiopathic atrial fibrillation

Wen-chao Xie¹, Ming Liu¹, Guang-xin Zou¹, Zhi-hai Lin¹, Guang Yao²

(1. Department of Cardiology, the First People's Hospital of Yulin, Yulin, Guangxi 537000; 2. Department of Cardiology, the Fourth People's Hospital of Yulin, Yulin, Guangxi 537012, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between Th17 cells and cytokines in peripheral blood of patients with idiopathic atrial fibrillation (AF). **Methods** Totally 80 patients with AF admitted to department of cardiology in our hospital were enrolled, including 34 patients with paroxysmal AF (PAF) and 46 patients with chronic AF (CAF), and the other 80 persons with the same age in the health examination were the control group. Flow cytometry was used to detect the percentage of peripheral blood mononuclear lymphocyte (PBMCs) Th17 cells. The levels of serum interleukin IL-17, IL-6, IL-22 and matrix metalloproteinase -9 (MMP-9) were detected by ELISA. The differences between the control group and the AF group were compared, and the correlation analysis was made. **Results** There were no significant difference in baseline data among PAF group, CAF group and control group ($P > 0.05$). The percentage of Th17 cells in the PAF group and CAF group were higher than that in the control group ($P < 0.05$), and the percentage of Th17 cells in the CAF group were higher than that in the PAF group

收稿日期: 2018-10-11

[通信作者] 刘明, E-mail: mliu1997@163.com; Tel: 13877568558

($P < 0.05$). Compared to control group, the levels of IL-17, IL-6, IL-22 and MMP-9 were higher in PAF group and CAF group ($P < 0.05$). The levels of IL-17, IL-6 and MMP-9 in the CAF group were higher than that in the PAF group ($P < 0.05$). The percentage of Th17 cells in AF patients was positively correlated with left atrial diameter (LAD) and negatively correlated with left ventricular ejection fraction (LVEF) ($P < 0.05$). **Conclusions** The percentage of Th17 cells and the levels of IL-17, IL-6 and IL-22 in peripheral blood of patients with idiopathic AF are increased and related to the process of AF and the level of myocardial fibrosis.

Keywords: atrial fibrillation; T-lymphocytes; cytokine

心房颤动 (atrial fibrillation, AF) 是临床常见的心律失常, 往往与脑卒中、心力衰竭密切相关。现有的成果表明 AF 与炎症有密切关系^[1-2]。AF 患者心房组织有炎症浸润, 炎症反应导致心房、心室纤维化, 形成炎症-纤维化恶性循环, 促进 AF 的进展^[3]。有研究证实, AF 炎症浸润表现为淋巴细胞等免疫细胞在心房组织募集并释放相关细胞因子^[4]。

辅助性 T 淋巴细胞亚群 17 (helper T cell 17, Th17) 是 CD4⁺T 淋巴细胞的一个亚群, 主要分泌白细胞介素-17 (Interleukin 17, IL-17)。Th17 和 IL-17 广泛参与心血管疾病的发生、发展。然而, Th17 与特发性 AF 的关系如何, 目前研究不多, 故笔者设计本研究, 以期治疗 AF 提供新的靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 2 月—2018 年 2 月于玉林市第一人民医院心内科就诊的特发性 AF 患者 80 例。根据 2010 年欧洲心脏病学会指南对 AF 患者进行诊断及分组^[5]。其中, 阵发性心房颤动 (paroxysmal atrial fibrillation, PAF) 患者 34 例作为 PAF 组, 慢性心房颤动患者 46 例作为慢性房颤组。选取年龄匹配的同期健康体检者 80 例作为对照组。纳入标准: 根据心电图或者动态心电图提示为 AF。排除标准: ①器质性心脏病合并 AF, 包括冠状动脉硬化性心脏病合并 AF、先天性心脏病合并 AF、瓣膜性心脏病合并 AF、肺源性心脏病合并 AF 及心肌病合并 AF; ②急性或者慢性炎症; ③自身免疫性疾病如心肌炎、风湿热及类风湿性疾病等; ④甲状腺功能异常; ⑤严重肝、肾功能不全; ⑥恶性肿瘤; ⑦近期开放性手术及创伤史。本研究经本院伦理委员会批准通过, 患者均遵循自愿原则。

1.2 诊断标准

PAF 诊断: AF 患者在发病 7 d 内自行终止或进行干预后终止; 慢性心房颤动诊断: 包括持续性或永久性 AF, 指患者 AF 持续时间 > 7 d, 或患者和临床医

生共同决定放弃恢复和 / 或维持窦性心律的治疗。

1.3 主要试剂及仪器

CD4-FITC 抗体、IL-17-PE 抗体及 IgG1-PE 同型对照抗体购自美国 BD 公司。IL-17 酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、IL-6 ELISA 试剂盒、IL-22 ELISA 试剂盒及基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) ELISA 试剂盒购自美国 RayBiotech 公司, FC-500 型流式细胞仪购自美国贝克曼公司。

1.4 方法

1.4.1 标本处理 所有患者在清晨抽取静脉血, 分别置于普通干燥管 5 ml、抗凝管 2 ml。2 h 内将 5 ml 外周血在 4℃、以 2 000 r/min 离心 20 min 取上层血清, -80℃ 保存。2 ml 抗凝血按照 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。用 RPMI 1640 培养液 + 胎牛血清重悬 PBMCs, 加入刺激剂 50 μg/L 佛波酯、500 μg/L 离子霉素及 1.7 μg/ml 莫能霉素在 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 细胞培养箱培养 4 h, PBS 清洗后离心备用。加入 CD4-FITC 抗体, 4℃避光孵育 30 min, 固定和破膜后均分为 2 管, 对照管加入 IgG1-PE 10 μl, 测定管加入 IL-17-PE 10 μl, 避光孵育 30 min, 用流式细胞仪检测。

1.4.2 Th17 细胞检测 Th17 细胞数量以 IL-17⁺ 细胞数量表示, Th17 细胞百分率以 IL-17⁺ 细胞数量除以 CD4⁺T 细胞数量表示, 用前向散射光及侧向散射光圈出淋巴细胞, 以 CD4⁺T 细胞设门, 检测 IL-17-PE⁺ 细胞数量。流式结果分析使用 FlowJo 软件 (美国 Tree Star 公司)。

1.4.3 ELISA 检测 血清 IL-17、IL-6、IL-22 及 MMP-9 表达水平按照 ELISA 试剂盒说明书进行检测。

1.4.4 超声心动图检测 心脏彩超测量左心房内径 (left atrial dimension, LAD)、右房内径 (right atrial dimension, RAD)、左心室舒张末期内径 (left ventricular end diastolic dimension, LVDd) 及左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)。

1.5 统计学方法

数据分析采用SPSS 19.0统计学软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用单因素方差分析,进一步两两比较用SNK- q 检验;计数资料以率(%)表示,比较用 χ^2 检验,相关性分析用Spearman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组患者一般资料比较

3组患者在年龄、男性比例、高血压、糖尿病及吸烟方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

2.2 3组患者Th17细胞及其细胞因子比较

2.2.1 Th17细胞百分率 对照组、PAF组、慢性房颤组患者Th17细胞百分率分别为(0.95 \pm 0.22)%、(2.98 \pm 0.38)%和(3.17 \pm 0.52)%,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F = 695.000, P = 0.000$);进一步两两比较经SNK- q 检验,PAF组、慢性房颤组高于对照组($P < 0.05$),慢性房颤组高于PAF组($P < 0.05$)。见图1、2。

2.2.2 IL-17 对照组、PAF组、慢性房颤组外周血IL-17浓度分别为(11.42 \pm 5.67)、(33.64 \pm 8.95)和(38.16 \pm 11.88) pg/ml,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F = 170.400, P = 0.000$);进一步两两比

较经SNK- q 检验,PAF组、慢性房颤组高于对照组($P < 0.05$),慢性房颤组高于PAF组($P < 0.05$)。见图3。

2.2.3 IL-6 对照组、PAF组、慢性房颤组外周血IL-6浓度分别为(11.66 \pm 6.85)、(21.94 \pm 9.02)和(26.05 \pm 9.89) pg/ml,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F = 48.910, P = 0.000$);进一步两两比较经SNK- q 检验,PAF组、慢性房颤组高于对照组($P < 0.05$),慢性房颤组高于PAF组($P < 0.05$)。见图3。

2.2.4 IL-22 对照组、PAF组、慢性房颤组外周血IL-22浓度分别为(0.33 \pm 0.24)、(0.79 \pm 0.22)和(0.91 \pm 0.38) pg/ml,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F = 71.230, P = 0.000$);进一步两两比较经SNK- q 检验,PAF组、慢性房颤组高于对照组($P < 0.05$),慢性房颤组与PAF组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图3。

2.3 3组患者MMP-9水平比较

对照组、PAF组及慢性房颤组患者MMP-9水平分别为(194.71 \pm 86.95)、(386.52 \pm 132.41)和(541.86 \pm 200.68) ng/ml,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F = 95.450, P = 0.000$);进一步两两比较经SNK- q 检验,PAF组、慢性房颤组高于对照组($P < 0.05$),慢性房颤组高于PAF组($P < 0.05$)。见图4。

表1 3组患者一般资料比较

组别	<i>n</i>	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	男性例 (%)	高血压例 (%)	糖尿病例 (%)	吸烟例 (%)
对照组	80	65.41 \pm 16.87	50 (62.50)	45 (56.25)	16 (20.00)	28 (35.00)
PAF组	34	69.58 \pm 16.41	24 (70.59)	20 (58.82)	6 (17.65)	11 (32.35)
慢性房颤组	46	67.72 \pm 14.86	33 (71.74)	22 (47.83)	8 (17.39)	12 (26.09)
<i>F</i> / χ^2 值		0.859	1.394	1.180	0.165	1.073
<i>P</i> 值		0.426	0.498	0.554	0.921	0.585

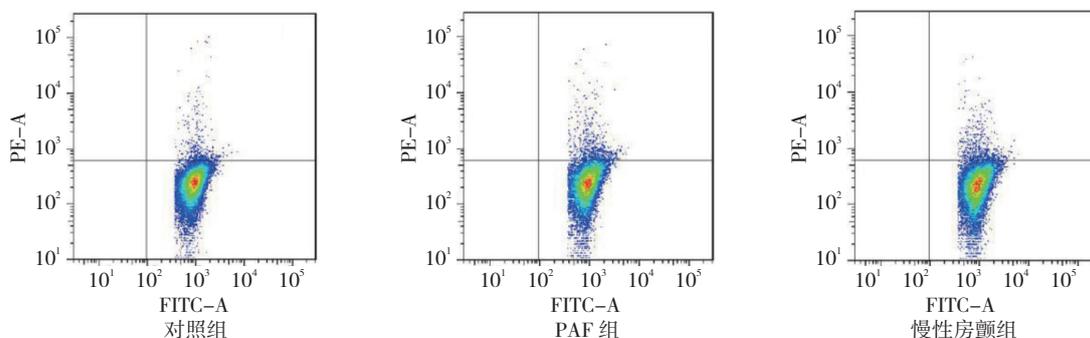


图1 3组患者Th17细胞表达流式图

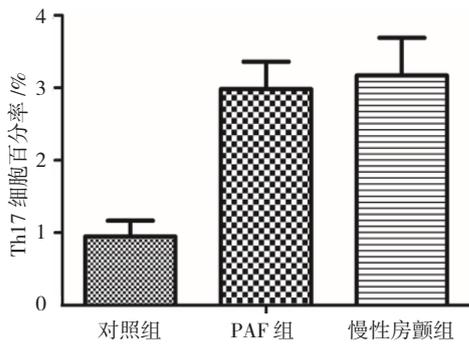


图 2 3 组患者 Th17 细胞百分率比较 ($\bar{x} \pm s$)

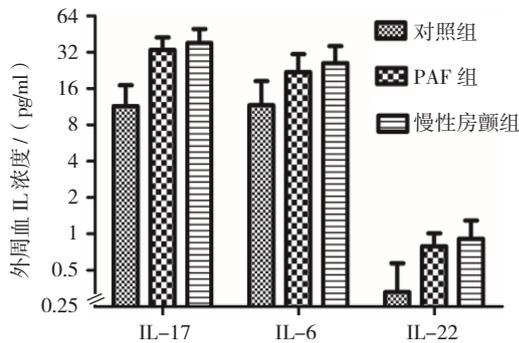


图 3 3 组患者 IL-17、IL-6 及 IL-22 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

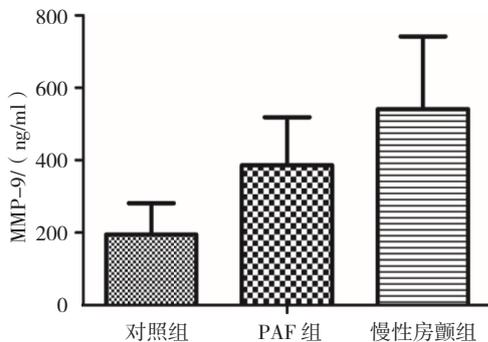


图 4 3 组患者 MMP-9 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.4 AF 患者 Th17 细胞百分率与超声心动图参数的相关性

AF 患者 Th17 细胞百分率与 LAD 呈正相关 ($r_s = 0.387, P = 0.028$), 与 LVEF 呈负相关 ($r_s = -0.268, P = 0.035$), 与 RAD 和 LVDD 无相关性 ($r_s = 0.045$ 和 $0.156, P = 0.827$ 和 0.581)。

3 讨论

本研究发现, AF 患者外周血中 Th17 细胞及其分泌的 IL-17、IL-6 及 IL-22 较对照组升高, 而 Th17 细胞是一类强烈促炎细胞, 表明 AF 与 Th17 细胞介导的炎症浸润相关。Th17 细胞是近年来发现的 CD4⁺T 淋

巴细胞亚群, 其主要通过分泌的 IL-17 在心血管疾病中起着重要的作用。WU 等^[6]研究表明 Th17 细胞分泌的细胞因子在 AF 患者中高表达, 提示 Th17 细胞参与 AF 的病理进程。HE 等^[7]发现在冠状动脉旁路移植术后出现 AF 的患者 Th17/Treg 比例失衡, 其可以作为预测术后 AF 的准确性、特异性的指标。葛卫力等^[1]的研究提示在持续性 AF 患者中, Th17 及其细胞因子 IL-17 升高。这些研究都表明 Th17 细胞及 IL-17 与 AF 密切相关。而笔者的研究对象是特发性 AF 患者, 排除器质性心脏病, 减少临床混杂因素影响, 提供更加直接的证据表明 AF 与炎症相关。既往研究表明, 持续性或永久性 AF 患者的 CRP 水平明显高于 PAF 患者, 提示较高的炎症因子可能与 AF 程度有关^[8]。本研究也发现慢性心房颤动患者 Th17 细胞及 IL-17、IL-6 较 PAF 升高, 提示慢性心房颤动的炎症水平高于 PAF, 表明炎症与 AF 进程相关。

本研究还发现, 外周血 IL-6 在 PAF 及慢性心房颤动患者中高表达, 与 AULIN 等发现血清中的 CRP 和 IL-6 在 AF 期间显著增加的结果是一致的^[9]。CANPOLAT 等^[10]报道称血清 IL-6 水平升高与电复律和导管消融后 AF 复发风险增加有关。在长期随访中, 血清 IL-6 水平与接受抗凝治疗的永久或者阵发性 AF 患者的不良事件和死亡率有关^[11]。这些证据表明, IL-6 与 AF 有密切联系, 而 IL-6 是 Th17 细胞分泌的细胞因子之一, 也就是表明, Th17 细胞可以通过分泌 IL-6 引起心房炎症浸润导致 AF。但是 IL-6 来源不只是 Th17 细胞, 最近的研究表明, 活化的 B 细胞可以通过分泌 IL-6 促进 CD4⁺T 细胞分化为 Th17 细胞^[12]。所以, 在免疫调控网络中, IL-6 在不同的作用靶点扮演不同的角色, 而 IL-6 如何发挥不同的生物学效应还需进一步研究。

结构重构、电重构在 AF 的发生发展中起着重要的作用, 其中结构重塑与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 有关。而 ECM 的组成和变化又由 MMPs 调节。IYER 等^[13]研究发现 MMP-9 在心肌梗死后 ECM 重塑中起关键作用。本研究发现, MMP-9 在 PAF 及慢性心房颤动患者中升高, 并且在慢性心房颤动患者较 PAF 患者增高, 提示 AF 与心肌重构有关。进一步研究表明, 持续性 AF 患者血清纤维蛋白炎症生物标志物 MMP-9、Ⅲ型胶原及 hs-CRP 水平高于无 AF 对照组, 并且与左房容积、心房重构指数呈正相关^[14]。但 Th17 或者 IL-17 如何影响 MMP-9 还需进一步的研究。

综上所述, PAF 及慢性心房颤动患者 Th17 细胞

激活,其分泌的IL-17、IL-6及IL-22升高,并且纤维化标志物MMP-9也高表达,与AF的进程有关,炎症和纤维化共同作用于AF的发生与发展。本研究样本量偏小,且为单中心研究,今后还需要多中心、大样本量研究进一步证实。

参考文献:

- [1] 葛卫力,江建军,朱敏,等. Th17, IL-17在长程持续性心房颤动中的作用机制[J]. 中国现代医学杂志, 2018(17): 77-80.
- [2] 张韩,李彦明,刘枫,等. 房颤患者左心房内径与血清骨保护素及其受体轴的关系及临床意义[J]. 临床心血管病杂志, 2015(3): 334-336.
- [3] TARNOWSKI D, PLICHTA L, FORKMANN M, et al. Reduction of atrial fibrillation burden by pulmonary vein isolation leads to a decrease of CD11b expression on inflammatory cells[J]. *Europace*, 2018, 20(3): 459-465.
- [4] HU Y F, CHEN Y J, LIN Y J, et al. Inflammation and the pathogenesis of atrial fibrillation[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2015, 12(4): 230-243.
- [5] CAMM A J, KIRCHHOF P, LIP G Y, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the task force for the management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC)[J]. *Europace*, 2010, 12(10): 1360-1420.
- [6] WU N, XU B, LIU Y, et al. Elevated plasma levels of Th17-related cytokines are associated with increased risk of atrial fibrillation[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(2): 6543-6548.
- [7] HE Y, CHEN X, GUO X, et al. Th17/Treg ratio in serum predicts onset of postoperative atrial fibrillation after off-pump coronary artery bypass graft surgery[J]. *Heart Lung Circ*, 2017, 18(4): 673-677.
- [8] LETSAS K P, KORANTZOPOULOS P, FILIPPATOS G S, et al. Uric acid elevation in atrial fibrillation[J]. *Hellenic J Cardiol*, 2010, 51(3): 209-213.
- [9] AULIN J, SIEGBAHN A, HIJAZI Z, et al. Interleukin-6 and C-reactive protein and risk for death and cardiovascular events in patients with atrial fibrillation[J]. *American Heart Journal*, 2015, 170(6): 1151-1160.
- [10] CANPOLAT U, AYTEMIR K, YORGUN H, et al. The role of preprocedural monocyte-to-high-density lipoprotein ratio in prediction of atrial fibrillation recurrence after cryoballoon-based catheter ablation[J]. *Europace*, 2015, 17(12): 1807-1815.
- [11] ROLDAN V, MARIN F, DIAZ J, et al. High sensitivity cardiac troponin T and interleukin-6 predict adverse cardiovascular events and mortality in anticoagulated patients with atrial fibrillation[J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(8): 1500-1507.
- [12] WU X Z, SHI X Y, ZHAI K, et al. Activated naive B cells promote development of malignant pleural effusion by different regulation of TH1 and TH17 response[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 315(3): L443-L455.
- [13] IYER R P, JUNG M, LINDSEY M L. MMP-9 signaling in the left ventricle following myocardial infarction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 311(1): H190.
- [14] SONMEZ O, ERTEM F U, VATANKULU M A, et al. Novel fibroinflammation markers in assessing left atrial remodeling in non-valvular atrial fibrillation[J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20: 463-470.

(李科 编辑)