

复方丹参滴丸联合瑞舒伐他汀对伴颈动脉粥样硬化脑梗死患者调节性 T 细胞水平的影响

洪雁¹, 何云燕¹, 杨元菊², 安中平¹

1. 天津市环湖医院 神经内科五病区, 天津 300350

2. 山东省曹县人民医院 康复医学科, 山东 菏泽 274400

摘要: 目的 研究调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 与急性脑梗死患者颈动脉粥样硬化 (carotid atherosclerosis, CAS) 程度的相关性, 以及复方丹参滴丸和瑞舒伐他汀对 CAS 患者 Tregs 水平的影响。方法 用流式细胞术 (FCM) 检测治疗组 (复方丹参滴丸联合瑞舒伐他汀) 及对照组 (瑞舒伐他汀) 治疗前后外周血中 Tregs 所占 CD4⁺T 细胞数的百分比, 用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定外周血浆白细胞介素-10 (IL-10) 和转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 的浓度。结果 随着 CAS 程度加重, Tregs、IL-10 和 TGF- β 1 水平降低, 治疗 2 周后, Tregs、IL-10、TGF- β 1 水平较治疗前升高, 重度 CAS 组患者, 治疗组 Tregs、IL-10 升高程度明显高于对照组。结论 Tregs 占外周血 CD4⁺T 细胞的比例降低的程度可间接反映 CAS 病变的程度。联用他汀类药物与复方丹参滴丸除调脂作用外, 还通过抗炎、抗氧化作用, 上调 Tregs、IL-10 的水平, 协同抗 CAS。

关键词: 复方丹参滴丸; 瑞舒伐他汀; 颈动脉粥样硬化; 调节性 T 细胞; 白细胞介素-10; 转化生长因子- β 1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)08-1624-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.08.022

Effect of Compound Danshen Dropping Pills combined with simvastatin treatment on level of regulatory T cells in patients with carotid atherosclerotic cerebral infarction

HONG Yan¹, HE Yun-yan¹, YANG Yuan-ju², AN Zhong-ping¹

1. The 5th Department of Neurology, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300350, China

2. Department of Rehabilitation Medicine, Caodian People's Hospital, Heze 274400, China

Abstract: Objective To study the correlation of regulatory T cells (Tregs) and carotid atherosclerosis (CAS) in patients with acute cerebral infarction, and the effects of Compound Danshen Dropping Pills and simvastatin on Tregs level in CAS patients. **Methods** Flow cytometry (FCM) was used to detect the percentage of Tregs in the peripheral blood of treatment group and control group before and after treatment. Plasma levels of interleukin 10 (IL-10), and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method to detect IL-10 and TGF- β 1 of peripheral blood plasma. **Results** With CAS aggravation, percentage of Tregs, IL-10, and TGF- β 1 levels reduced. After two weeks of treatment, the levels of Tregs, IL-10, and TGF- β 1 were higher than those before treatment. In severe CAS patients, Tregs and IL-10 increased significantly in treatment group than those in control group. **Conclusion** The proportion of Tregs in peripheral blood CD4⁺T cells can indirectly reflect the degree of CAS lesions. The combination of simvastatin and Compound Danshen Dropping Pills has lipid-regulation, anti-inflammatory, and anti-oxidant effect, and also up-regulates the levels of Tregs and IL-10, which can achieve the role of anti-atherosclerosis.

Key words: Compound Danshen Dropping Pills; simvastatin; carotid atherosclerosis; Tregs; IL-10; TGF- β 1

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是心脑血管系统疾病所共有的病理基础, 可累及全身大、中动脉, 尤以颈动脉及冠状动脉为著。AS 的发病机制相当复杂, 免疫炎症反应可能是 AS 的重要发病

机制之一, 参与并始终贯穿于 AS 的启动、发生、形成、发展, 斑块形成乃至破裂及血栓形成^[1]。调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 能发挥免疫调节作用, Tregs 的细胞数量及功能对 AS 的发生发

收稿日期: 2016-12-20

基金项目: 天津市卫生局科技攻关项目 (13KG120)

作者简介: 洪雁 (1973—), 女, 副主任医师, 博士, 主要研究方向为脑血管病和锥体外系疾病的治疗。Tel: 13002208326 E-mail: ho_ya1@163.com

展产生重要的影响^[2]。瑞舒伐他汀可使血清总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)浓度降低、高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)浓度升高,从而起到保护心脑血管以免发生AS,防止AS斑块形成的作用^[3]。此外,瑞舒伐他汀还具有抗炎、抗氧化、调节内皮功能、免疫调节、抗肿瘤、保护心肌等功能^[4-6]。复方丹参滴丸可通过调节机体脂质代谢、抗炎、抗氧化、改善血管功能、抑制血栓形成等多种机制发挥防治AS的作用^[7]。本研究通过检测复方丹参滴丸联合瑞舒伐他汀治疗前后伴颈动脉粥样硬化(carotid atherosclerosis, CAS)脑梗死患者Tregs水平,分析Tregs与急性脑梗死患者CAS程度的相关性,探讨复方丹参滴丸联合瑞舒伐他汀治疗对脑梗死患者Tregs水平的影响。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取天津市环湖医院2014年5月—2016年5月,发病时间在72h之内的急性脑梗死患者,均行头CT和/或MRI检查证实,所有患者符合第四届脑血管病会议制定的诊断标准,通过颈部血管超声或/和颅内-主动脉弓上CTA检查发现存在动脉粥样硬化,患者和/或其家属知情同意。排除标准:1)存在肿瘤、血液系统疾病、全身免疫性疾病、脑动脉瘤、静脉窦血栓、动静脉畸形或夹层、动脉炎及烟雾病的患者;2)近3个月患急性冠脉综合征、脑出血者、外周血管闭塞性疾病;3)严重肝、肾功能异常、心力衰竭、感染;4)病前服用他汀类药物、免疫抑制剂、糖皮质激素的患者;5)心源性脑栓塞的患者;6)患者或家属拒绝以及不能配合检查的患者。

依据颈部血管超声/CTA/MRA的检查结果将患者分为3组:轻度CAS组(在颈动脉发现一个或更多的颈动脉斑块,脑血管狭窄程度为0~49%的患者)、中度CAS组(在颈动脉发现一个或更多的颈动脉斑块,脑血管狭窄程度为50%~69%的患者)、重度CAS组(在颈动脉发现一个或更多的颈动脉斑块,脑血管狭窄程度为70%~99%或完全闭塞患者),每组各100例患者,共300例。将每组患者再随机分为对照组和治疗组各50例。

1.2 方法

1.2.1 基线比较 收集CAS不同程度3组患者的一般临床资料(性别、年龄、吸烟情况、高血压、糖尿病、高脂血症、饮酒情况)及血液生化、免疫

等相关指标[TC、LDL-C、超敏C-反应蛋白(hs-CRP)]。

1.2.2 治疗方法 在接受脑梗死急性期规范化抗栓治疗及控制合并症和危险因素的基础上,对照组给予瑞舒伐他汀(规格10 mg×7片,英国阿斯利康制药有限公司分装)10 mg,每晚1次口服;治疗组在对照组基础上给予复方丹参滴丸(规格27 mg×180粒,天士力制药集团股份有限公司)10粒,口服,每日3次;各组均治疗2周,分别于治疗前后检测Tregs、白细胞介素-10(IL-10)和转化生长因子β1(TGF-β1)水平。

1.2.3 流式细胞术检测患者外周血中Tregs占CD4⁺T细胞数的百分比 取100 μL肝素抗凝全血,加入CD4-FITC和CD25-APC抗体(BD biosciences),并设置对照抗体管,室温避光孵育15~30 min,加入流式细胞仪专用红细胞裂解液,室温裂解15~30 min,以500×g离心5 min,加入PBS漂洗2次,离心后弃上清,然后加入500 μL PBS上机,使用CELLQuest软件,获取和分析50 000个细胞,并分析结果。

1.2.4 ELISA法检测外周血浆IL-10、TGF-β1的浓度 将人IL-10 ELISA试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司)和人TGF-β1 ELISA试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司)室温下放置30 min,分别向已设定的3种孔中加入标准品、待测样品和PBS各100 μL;加入酶标复合物,37℃温育1 h后反复冲洗5次,经过显色和终止反应,用酶标仪测定各孔吸光度(A)值。根据标准品的A值建立标准曲线,计算出待测样品的IL-10、TGF-β1浓度。

1.3 统计学分析

使用SPSS 17.0统计学软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验和方差分析,进一步两两比较采用LSD(Fisher's least significant test)法。

2 结果

2.1 患者一般临床资料的比较

不同程度CAS组的急性脑梗死患者年龄、性别比、高血压、糖尿病、高脂血症、吸烟、饮酒史相比,差异无显著性($P>0.05$);不同程度CAS患者的TC、LDL-C水平比较,差异无显著性($P>0.05$)。3组不同程度CAS患者hs-CRP水平比较,差异显著,重度CAS组hs-CRP水平高于轻、中度CAS组($P<0.05$),中度CAS组hs-CRP水平高于轻度CAS组($P<0.05$)。见表1。

表 1 3 组不同程度 CAS 患者一般临床资料的比较

Table 1 Comparison of clinical data among three groups

组别	例数	年龄/岁	男性/例	吸烟/例	饮酒/例	高血压/例	糖尿病/例	高脂血症/例	TC/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	hS-CRP/(mg·L ⁻¹)
轻度 CAS	100	66.23±9.02	61	41	30	57	35	38	5.22±0.64	3.12±0.92	14.6±11.2
中度 CAS	100	68.62±9.41	64	42	31	67	33	42	5.41±1.36	3.23±0.67	27.8±19.2*
重度 CAS	100	67.73±11.40	64	44	32	64	38	45	5.54±1.40	3.35±0.81	53.6±36.1*#

与轻度 CAS 组比较: * $P<0.05$; 与中度 CAS 组比较: # $P<0.05$, 表 2 同* $P<0.05$ vs mild CAS group; # $P<0.05$ vs moderate CAS group, table 2 is same

2.2 不同程度 CAS 组间治疗前 Tregs、IL-10 及 TGF-β1 水平的比较

不同程度 CAS 组患者治疗前的 Tregs、IL-10、TGF-β1 比较显示, 随着 AS 程度加重 Tregs 水平进行性降低, 差异显著 ($P<0.05$); 重度 CAS 组 IL-10、TGF-β1 水平低于轻、中度 CAS 组, 差异显著 ($P<0.05$), 但轻、中度 CAS 组患者 IL-10、TGF-β1 水平相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

2.3 治疗前后各组患者 Tregs 水平的比较

治疗 2 周后复查各组患者外周血 Tregs 水平结果发现, 重度 CAS 患者治疗组和对照组 Tregs 百分比均较治疗前有明显上升, 差异显著 ($P<0.05$); 轻度与中度 CAS 患者治疗组和对照组治疗后 Tregs 水平较治疗前有上升, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$), 治疗后, 重度 CAS 组患者治疗组 Tregs 水平明显高于对照组 ($P<0.05$)。见表 3。

2.4 治疗前后各组患者 TGF-β1 水平的比较

治疗 2 周后各组 TGF-β1 水平较治疗前升高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$), 治疗后各 CAS 不同程度组治疗组与对照组 TGF-β1 水平无明显差异 ($P>0.05$)。见表 3。

2.5 治疗前后各组患者 IL-10 水平的比较

重度 CAS 组患者治疗组和对照组治疗后 IL-10 水平均较治疗前有明显上升, 差异显著 ($P<0.05$); 轻度与中度 CAS 组治疗组和对照组治疗后 IL-10 水平较治疗前上升, 但无明显统计学意义 ($P>0.05$), 治疗后, 重度 CAS 组患者治疗组 IL-10 水平明显高于对照组 ($P<0.05$)。见表 3。

3 讨论

AS 的发病机制主要有几大学说: 脂质浸润学说、内皮细胞损伤学说、血管内血栓形成学说和慢性免疫炎症反应损伤学说。目前认为慢性免疫炎症

表 2 3 组不同程度 CAS 患者治疗前血浆 Tregs、IL-10 及 TGF-β1 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of Treg, IL-10, and TGF-β1 levels in plasma of patients among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Tregs/%	IL-10/(pg·mL ⁻¹)	TGF-β1/(pg·mL ⁻¹)
轻度 CAS	100	0.53±0.26	968.0±82.2	471.9±75.4
中度 CAS	100	0.30±0.09*	923.0±58.2	449.5±46.9
重度 CAS	100	0.15±0.05#	836.8±168.2*#	386.5±56.8*#

表 3 各组治疗前后患者血中 Tregs、TGF-β1、IL-10 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of Treg level in plasma of patients in each group before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别		例数	Tregs/%		TGF-β1/(pg·mL ⁻¹)		IL-10/(pg·mL ⁻¹)		
			治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	
轻度 CAS	治疗	50	0.52±0.19	0.54±0.10	472.7±65.3	505.5±73.1	967.0±91.1	986.3±82.6	
	对照	50	0.54±0.23	0.55±0.27	470.7±66.0	508.2±76.3	965.8±82.2	981.1±83.5	
中度 CAS	治疗	50	0.31±0.14	0.34±0.12	447.5±46.9	472.9±48.2	924.5±55.6	947.4±57.1	
	对照	50	0.29±0.08	0.32±0.28	450.9±47.3	468.1±49.3	922.0±57.3	944.4±60.3	
重度 CAS	治疗	50	0.15±0.10	0.32±0.16 ^{▲△}	385.5±62.4	422.5±44.8	836.2±159.2	906.1±148.5 ^{▲△}	
	对照	50	0.16±0.08	0.24±0.11 [▲]	387.2±68.2	412.8±46.0	837.8±143.7	878.6±156.4 [▲]	

与重度 CAS 同组治疗前比较: [▲] $P<0.05$; 与重度 CAS 对照组治疗后比较: [△] $P<0.05$ [▲] $P<0.05$ vs pretreatment of same group in severe CAS group; [△] $P<0.05$ vs post-treatment of control group of severe CAS group

反应参与并始终贯穿于 AS 的启动、发生和发展的全过程^[1]。Tregs 是一类控制体内自身免疫反应的 T 细胞亚群,有体外实验研究显示,诱导 Tregs 的生成能够延缓 AS 的发展进程,Tregs 通过细胞接触抑制和分泌 IL-10、TGF- β 等细胞因子来抑制效应 T 细胞的活化和增殖而发挥抗炎作用,抑制斑块的形成和发展^[8]。

小鼠模型研究证据证明,在 AS 发生时,Tregs 细胞数量明显减少^[9];而 Roland 等^[10]实验发现去除小鼠体内的 Tregs 细胞,随着动脉粥样硬化斑块面积增加,血管壁的炎症反应也明显加重了,说明 Tregs 细胞数量减少会促进 AS 的发展。有研究发现随着 CAS 程度加重,不稳定斑块中 γ 干扰素 (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-2 (IL-2) 等炎症因子共同发挥免疫作用,最终导致纤维帽变薄、斑块破裂,发生急性脑梗死^[11]。当炎症因子增多时,能够抑制 Tregs 功能、降低 Tregs 数目,导致其负性免疫调节功能降低^[12]。基于上述理论,为了解 Tregs 水平与 CAS 严重程度的关系,本研究设计检测不同程度 CAS 患者外周血中 Tregs 以及相关的细胞因子 (IL-10、TGF- β) 水平。研究结果显示,随着 AS 程度加重,Tregs 占外周血 CD4⁺T 细胞的比例进行性降低 ($P<0.05$);重度 CAS 组 IL-10、TGF- β 1 水平明显低于轻、中度 CAS 组 ($P<0.05$)。本研究证实了 Tregs 占外周血 CD4⁺T 细胞的比例降低的程度可间接反映 CAS 病变的程度。伴 CAS 的急性脑梗死患者 Tregs 百分比的降低导致其分泌的 IL-10、TGF- β 1 等细胞因子减少,这 2 种抑制性炎症因子减低导致免疫稳态失衡,进一步加重脑组织损伤,这在重度 CAS 患者改变尤其显著。因此,Tregs 在外周血中的数量与 CAS 的严重程度相关,动脉狭窄程度越重,Tregs 所占外周 CD4⁺T 细胞比例越低。重度 CAS 组的 hS-CRP 等炎症标记物水平升高,也证实 AS 的过程存在慢性炎症反应,而 Tregs 为调节炎症反应的重要细胞组成,对于防止 AS 具有重要意义。

他汀类药物除使 TC、LDL-C 浓度降低外,还可通过抑制外周血中炎症因子,如 IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 等,抑制效应性 T 细胞的活化,发挥抑制免疫的作用而抑制 AS 进程^[5]。体外实验研究显示 AS 小鼠用辛伐他汀 ig 治疗 6 周后,Tregs 细胞数较前增多,IL-10、TGF- β 等保护性细胞因子水平也上调^[13]。本研究显示,伴 CAS 的急性脑梗死患者他汀治疗 2

周后复查,Tregs、IL-10 均有上调,重度 CAS 组患者上调明显。这说明他汀类药物不仅通过其调脂、抗炎、抗氧化作用来延缓 AS,还可通过上调 Tregs、IL-10 水平发挥抗 AS 作用^[14]。TGF- β 1 水平上调不明显可能与其不仅由 Tregs 分泌,还与巨噬细胞、内皮细胞及其他炎性细胞功能有关,同时与他汀治疗时间短相关。

复方丹参滴丸为丹参、三七和合成冰片为主的复合中药制剂。研究显示丹参酮 II_A 可通过抑制核转录因子- κ B (NF- κ B) 的激活及其相关黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达,从而发挥抗 AS 作用^[15]。丹参多酚酸盐能够通过降低 AS 过程中的核心炎症因子(如 IL-6 水平)来抑制 AS 炎症反应^[16]。郑楚等^[17]研究显示三七花总皂苷可显著降低 AS 大鼠血清 TG、TC、LDL 和升高 HDL。因此复方丹参滴丸可通过免疫调节作用,防止脂质在动脉管壁及细胞内的沉积,达到抗 AS 作用。本研究结果显示他汀类药物与复方丹参滴丸合用的治疗组较对照组相比,治疗组 Tregs 百分比,IL-10 水平升高明显高于对照组 ($P<0.05$)。说明他汀类药物与复方丹参滴丸合用可通过抑制炎症因子,上调 Tregs 细胞数较目,IL-10、TGF- β 1 等保护性细胞因子水平达到协同抗 AS 作用。因此他汀类药物与复方丹参滴丸联用,增强了抗炎及免疫调节作用,其抗 AS 效果优于单用他汀类药物。

因此,Tregs 作为调节性 T 细胞亚群具有抑制免疫炎症反应、抗 AS 的作用,随着 CAS 程度越重,Tregs、IL-10、TGF- β 1 水平越低。联用他汀类药物与复方丹参滴丸除调脂作用外,还通过抗炎、抗氧化作用,上调 Tregs、IL-10 的水平,协同抗 CAS。

参考文献

- [1] Wick G, Xu Q. Atherosclerosis-an autoimmune disease [J]. *Exp Gerontol*, 1999, 34(4): 559-566.
- [2] Hasib L, Lundberg A K, Zachrisson H, et al. Functional and homeostatic defects of regulatory T cells in patients with coronary artery disease [J]. *J Intern Med*, 2016, 279(1): 63-77.
- [3] Rifai N, Ridker P M. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease [J]. *Clin Chem*, 2013, 47(3): 403-411.
- [4] 刘明,刘熙鹏,丁奇,等.瑞舒伐他汀对人胶质瘤 U251 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *现代药物与临床*, 2016, 31(4): 415-418.
- [5] Endres M. Statins: potential new indications in

- inflammatory conditions [J]. *Atheroscler Suppl*, 2006, 7(1): 31-35.
- [6] 何 勇, 张 月. 瑞舒伐他汀对不稳定型心绞痛患者冠状动脉支架植入术后的心肌保护作用 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(2): 233-236.
- [7] 王春田, 李 敏. 丹参煎剂对高脂血症动脉粥样硬化大鼠血脂影响随机平行对照研究 [J]. 放射免疫学杂志, 2011, 24(1): 15-17.
- [8] Li H, Ding Y, Yi G, *et al*. Establishment of nasal tolerance to heat shock protein-60 alleviates atherosclerosis by inducing TGF- β -dependent regulatory T cells [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2012, 32(1): 24-30.
- [9] Meng X, Li W, Yang J, *et al*. Regulatory T cells prevent plaque disruption in apolipoprotein E-knockout mice [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(3): 2684-2692.
- [10] Klingenberg R, Gerdes N, Badeau R M, *et al*. Depletion of FOXP3 regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(3): 1323-1334.
- [11] Wigren M, Nilsson J, Kolbus D. Lymphocytes in atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2012, 413(19/20): 1562-1568.
- [12] Dietel B, Cicha I, Voskens C J, *et al*. Decreased numbers of regulatory T cells are associated with human atherosclerotic lesion vulnerability and inversely correlate with infiltrated mature dendritic cells [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 230(1): 92-99.
- [13] 孟 晓. 调节性 T 细胞稳定动脉粥样硬化易损斑块的实验研究 [D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [14] 赵 菁, 耿文静, 翟博智, 等. 银丹心脑通软胶囊联合瑞舒伐他汀钙和硫酸氢氯吡格雷对伴有 2 型糖尿病急性脑梗死患者血脂、颈动脉粥样硬化斑块及神经功能恢复的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2707-2712.
- [15] 崔广智, 金树梅, 赵桂峰, 等. 丹参酮 II_A 对 TNF- α 诱导的 ECV304 细胞 NF- κ B、I κ B- α 表达及粘附分子 ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(12): 1671-1675.
- [16] 高玉琪, 罗南萍, 梁 春, 等. 丹参多酚酸盐对 ApoE^{-/-} 小鼠血清 IL-6 的影响 [J]. 放射免疫学杂志, 2011, 24(1): 15-17.
- [17] 郑 楚, 杨冬业, 徐 勤, 等. 三七花总皂苷对动脉粥样硬化模型大鼠血脂及血液流变学影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 162-164.