

脑血管疾病研究专题

高密度脂蛋白对缺血性脑卒中急性期患者
外周血中免疫细胞分布的影响

张海岳, 关经纬, 王 族, 武 霄, 宋海庆, 孟 然

(首都医科大学宣武医院 神经内科, 北京, 100053)

摘要:目的 分析高密度脂蛋白(HDL)对缺血性脑卒中急性期患者外周血中免疫细胞分布的影响。方法 纳入42例就诊于首都医科大学宣武医院的急性缺血性脑卒中患者为研究对象,所有患者发病至就诊时间均 ≤ 7 d。入院后治疗前均采集血标本,检测外周血中HDL的表达水平,应用流式细胞仪检测外周血中免疫细胞的百分比。根据HDL表达水平的不同将患者分为HDL < 1.0 mmol/L组($n=22$)和HDL ≥ 1.0 mmol/L组($n=20$)。结果 HDL < 1.0 mmol/L组外周血中CD3 $^+$ T淋巴细胞、CD3 $^+$ CD4 $^+$ T淋巴细胞百分比高于HDL ≥ 1.0 mmol/L组,但CD3 $^+$ CD8 $^+$ T淋巴细胞百分比低于HDL ≥ 1.0 mmol/L组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。2组患者外周血中单核细胞百分比差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 在缺血性脑卒中急性期患者中,较高水平的HDL常伴有低水平的CD3 $^+$ 、CD3 $^+$ CD4 $^+$ T淋巴细胞的募集,这种结果可能有利于减少缺血性卒中后的脑组织损伤。

关键词: 缺血性脑卒中; 高密度脂蛋白; T淋巴细胞; 单核细胞; 外周血; 脑组织损伤

中图分类号: R 743.3; R 446.11 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2021)17-037-06 DOI: 10.7619/jcmp.20212439

Influence of high-density lipoprotein on immune
cells distribution in peripheral blood of patients
with ischemic stroke at acute stage

ZHANG Haiyue, GUAN Jingwei, WANG Zu, WU Xiao, SONG Haiqing, MENG Ran

(Department of Neurology, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing, 100053)

Abstract: Objective To analyze the influence of high-density lipoprotein (HDL) on immune cells distribution in peripheral blood of patients with ischemic stroke at acute stage. **Methods** Totally 42 patients with acute ischemic stroke in Xuanwu Hospital of Capital Medical University were selected as research objects, and the duration from onset to treatment was 7 days and below in all the patients. Blood samples were collected before treatment after admission, the expression level of HDL in peripheral blood was detected, and the percentage of immune cells in peripheral blood was detected by flow cytometer. The patients were divided into HDL < 1.0 mmol/L group ($n = 22$) and HDL ≥ 1.0 mmol/L group ($n = 20$). **Results** The percentages of CD3 $^+$ T lymphocytes and CD3 $^+$ CD4 $^+$ T lymphocytes in peripheral blood in the HDL < 1.0 mmol/L group were significantly higher than those in the HDL ≥ 1.0 mmol/L group, but the percentage of CD3 $^+$ CD8 $^+$ T lymphocytes was significantly lower than that in the HDL ≥ 1.0 mmol/L group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the percentage of monocytes in peripheral blood between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** In patients with ischemic stroke at acute stage, the patients with higher level of HDL are often accompanied by the recruitment of low levels of CD3 $^+$ and CD3 $^+$ CD4 $^+$ T lymphocytes, which may help to reduce brain tissue damage after ischemic stroke.

Key words: ischemic stroke; high-density lipoprotein; T lymphocytes; monocyte; peripheral blood; brain tissue damage

动脉粥样硬化是缺血性脑卒中发病的重要原因^[1]。动脉粥样硬化可造成血管严重狭窄,对应脑功能区域低灌注,还会导致病变血管内湍流,易引起粥样斑块破裂或血栓形成,从而诱发缺血性脑卒中^[2-3]。缺血性脑卒中发病早期即可出现一系列的炎症反应及免疫反应,特别是 T 细胞在卒中发生后 24 h 内就被募集至脑损伤区域,是造成急性期神经细胞损伤的主要免疫细胞^[4-6]。此外,在缺血性脑卒中的早期阶段,单核细胞在外周血中的分布也明显增多^[7]。

动脉粥样硬化斑块的形成主要是因胆固醇和胆固醇酯等脂质成分的沉积。高密度脂蛋白(HDL)可促进胆固醇从细胞内流出,清除巨噬细胞内多余的胆固醇,从而降低动脉粥样硬化的发生率^[8]。此外,HDL 还具有抗炎和抗凋亡作用,在减缓动脉粥样硬化进展过程中发挥重要保护作用^[9]。本研究分析急性期缺血性脑卒中患者 HDL 对免疫细胞分布的影响,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 4 月—2020 年 1 月就诊于首都医科大学宣武医院神经内科的急性缺血性脑卒中患者 42 例为研究对象。纳入标准:① 年龄 18~80 岁者;② 发病至医院就诊时间 ≤ 7 d 者;③ 磁共振弥散序列成像(MRI-DWI)确认为新发缺血性脑卒中者;④ 患者发病时间已超过取栓和溶栓时间窗,需转入病房接受标准内科治疗(治疗方式参照中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南)。本研究通过了首都医科大学宣武医院伦理委员会的审查和批准,并在纳入研究前获得了患者的知情同意。排除标准:① 使用任何免疫抑制剂的患者;② 患有免疫性疾病的患者;③ 合并严重心脏、肝脏及脾脏疾病患者。所有患者均在入院后次日清晨空腹采集血标本,并将所有血样本进行生化检测,明确外周血 HDL 的表达水平,并进一步行流式细胞分析。

1.2 流式细胞仪检测

所有患者在接受治疗前通过肘部采集外周血标本,采用 EDTA 抗凝采血管收集 2 mL 新鲜静脉血,轻轻摇匀,充分抗凝后及时送检,行流式细胞仪检测(BD LSR II, Becton Dickinson 公司,美国)。

流式细胞仪检测方法:① 从每管获取的血样本中取 100 μ L 抗凝全血放入流式管,按荧光抗

体染色组合加入各自最佳使用量抗体。② 将血液与荧光标记抗体均匀混合后室温避光反应 20 min。③ 向每个样品管中加入 2 mL 红细胞裂解液(1x),均匀混合后室温避光孵育 10 min。④ 将流式样品管置于台式离心机中,300 转离心 5 min,弃上清。⑤ 向每个样品管中加入 2 mL 流式细胞洗液,混匀后放入台式离心机中 300 转离心 5 min,弃上清。⑥ 向每个样品管中加入 0.5 mL 流式细胞洗液,混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光,及时采用流式细胞仪检测分析。⑦ 采用美国 BD LSR II 型流式细胞仪分析细胞群,并采用 FACS Diva 6.1.3 软件分析细胞群数据。检测的细胞群有:CD3⁺T 细胞,CD3⁺CD4⁺T 细胞,CD3⁺CD8⁺T 细胞,单核细胞,CD14⁺CD16⁻单核细胞,CD14⁺CD16⁺单核细胞。本研究所使用抗体均购自 BD Pharmingen(圣何塞,加利福尼亚州,美国)或 BioLegend(圣地亚哥,加利福尼亚州,美国)。

1.3 统计学分析

本研究中所有连续变量均采用($\bar{x} \pm s$)表示。2 组连续变量对比分析前,首先运用 F 检验进行方差齐性分析。若方差齐,采用 Student's *t* 检验分析 2 组连续变量间的差异;若方差不齐,则采用 Mann-Whitney 检验分析 2 组连续变量间的差异。为减少混杂因素的影响,应用 SPSS 25.0 软件进行倾向性得分匹配分析,采用性别、陈旧性脑梗死病史、糖尿病作为协变量,匹配容差为 0.05,对 2 组进行 1:1 倾向性得分匹配分析。应用卡方检验比较计数变量间的差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

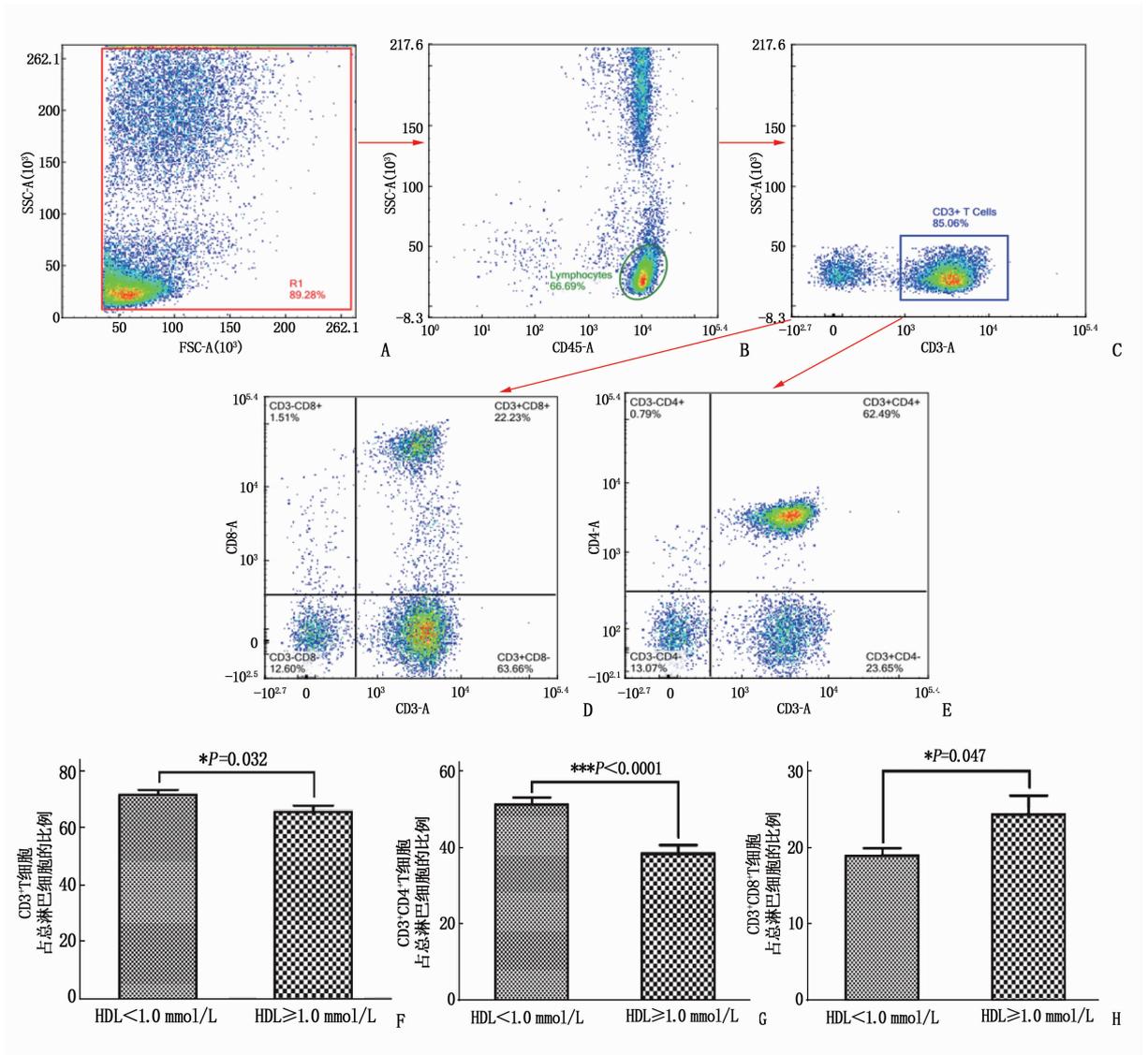
2 结果

本研究共纳入 42 例符合标准的患者,根据外周血 HDL 水平的不同分为 HDL < 1.0 mmol/L 组($n = 22$)和 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组($n = 20$)。

2.1 HDL 对 T 淋巴细胞分布的影响

本研究分析了脑卒中患者 HDL 的基础水平对急性期外周血中 T 淋巴细胞分布水平的影响,结果发现,HDL < 1.0 mmol/L 组患者 CD3⁺T 淋巴细胞百分比高于 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组,差异有统计学意义($P = 0.032$)。进一步分析发现,HDL < 1.0 mmol/L 组患者 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞百分比高于 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组,差异有统计学意义($P < 0.000 1$),但 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞百分比低于 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组,差异有统计学意义

($P=0.047$)。见图 1。



A、B、C、D、E: 外周血 T 淋巴细胞流式细胞仪检测门控策略图;

F: 2 组 CD3⁺ T 淋巴细胞百分比的比较, 与 HDL < 1.0 mmol/L 组比较, $P=0.032$;

G: 2 组 CD3⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞百分比的比较, 与 HDL < 1.0 mmol/L 组比较, $P<0.0001$;

H: 2 组 CD3⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞百分比的比较, 与 HDL < 1.0 mmol/L 组比较, $P=0.047$ 。

图 1 T 淋巴细胞在缺血性脑卒中急性期患者外周血中的比率

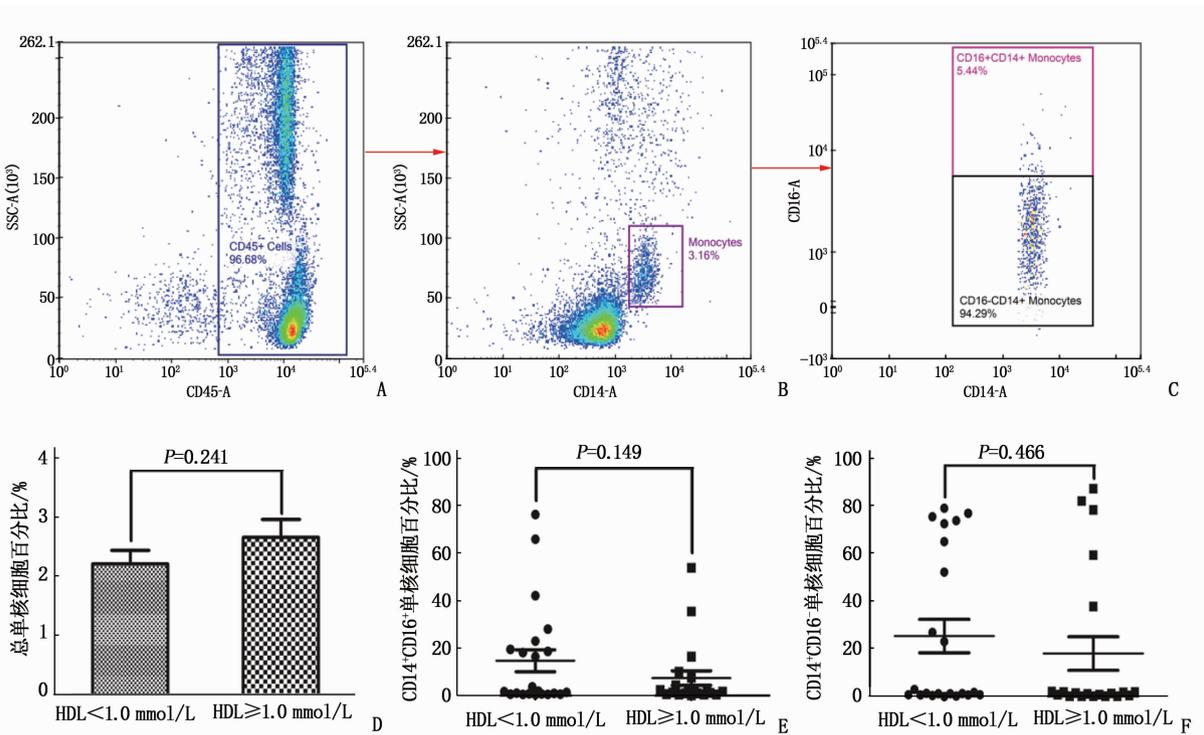
2.2 HDL 对单核细胞分布的影响

本研究通过流式细胞仪分析了入组患者外周血中单核细胞的百分比, 并分析了单核细胞的 2 种主要亚型 CD14⁺ CD16⁻ 单核细胞和 CD14⁺ CD16⁺ 单核细胞的百分比。结果显示, 在脑卒中急性期, HDL < 1.0 mmol/L 组和 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组患者外周血中总单核细胞、CD14⁺ CD16⁻ 单核细胞和 CD14⁺ CD16⁺ 单核细胞百分比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 2。

2.3 倾向评分匹配后 2 组结果比较

鉴于真实世界中女性人群平均 HDL 水平高

于男性人群^[10], 本研究中 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组中女性患者的比率也高于男性。为了减少性别对于研究结果的影响, 应用 SPSS 25.0 软件, 以性别、陈旧性脑梗死病史、糖尿病作为协变量, 匹配容差为 0.05, 对 2 组进行 1:1 倾向性得分匹配分析, 匹配后 2 组共有 13 对病例完成匹配, 见表 1。对于匹配后的 13 对患者进行统计分析, 结果发现 HDL < 1.0 mmol/L 组患者 CD3⁺ T 淋巴细胞百分比高于 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组 ($P=0.039$), CD3⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞百分比高于 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组 ($P<0.0001$), CD3⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞百分比



A、B、C：外周血单核细胞流式细胞仪检测门控策略图；D：2组总单核细胞百分比的比较；E：2组 CD14⁺CD16⁺单核细胞百分比的比较；F：2组 CD14⁺CD16⁻单核细胞百分比的比较。

图 2 单核细胞在缺血性脑卒中急性期患者外周血中的比率

表 1 匹配前后患者临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

临床资料	未匹配			倾向评分匹配后		
	HDL < 1.0 mmol/L	HDL ≥ 1.0 mmol/L	P	HDL < 1.0 mmol/L	HDL ≥ 1.0 mmol/L	P
例数	22	20	—	13	13	—
女性	3	9	0.025	3	3	1.000
年龄/岁	57.45 ± 12.79	58.10 ± 10.54	0.860	55.62 ± 13.05	55.54 ± 11.82	0.988
发病时间/d	3.64 ± 2.49	4.15 ± 1.73	0.453	3.54 ± 2.33	4.08 ± 1.44	0.486
陈旧性脑梗死	3	0	0.087	0	0	—
高脂血症	12	10	0.768	6	7	0.695
高血压	16	15	0.867	9	11	0.352
糖尿病	11	5	0.096	4	4	1.000
低密度脂蛋白/(mmol/L)	2.42 ± 0.90	2.37 ± 0.63	0.844	2.44 ± 1.07	2.38 ± 0.68	0.873
同型半胱氨酸/(μmol/L)	13.44 ± 2.37	14.08 ± 3.90	0.520	13.40 ± 1.73	13.90 ± 4.57	0.716

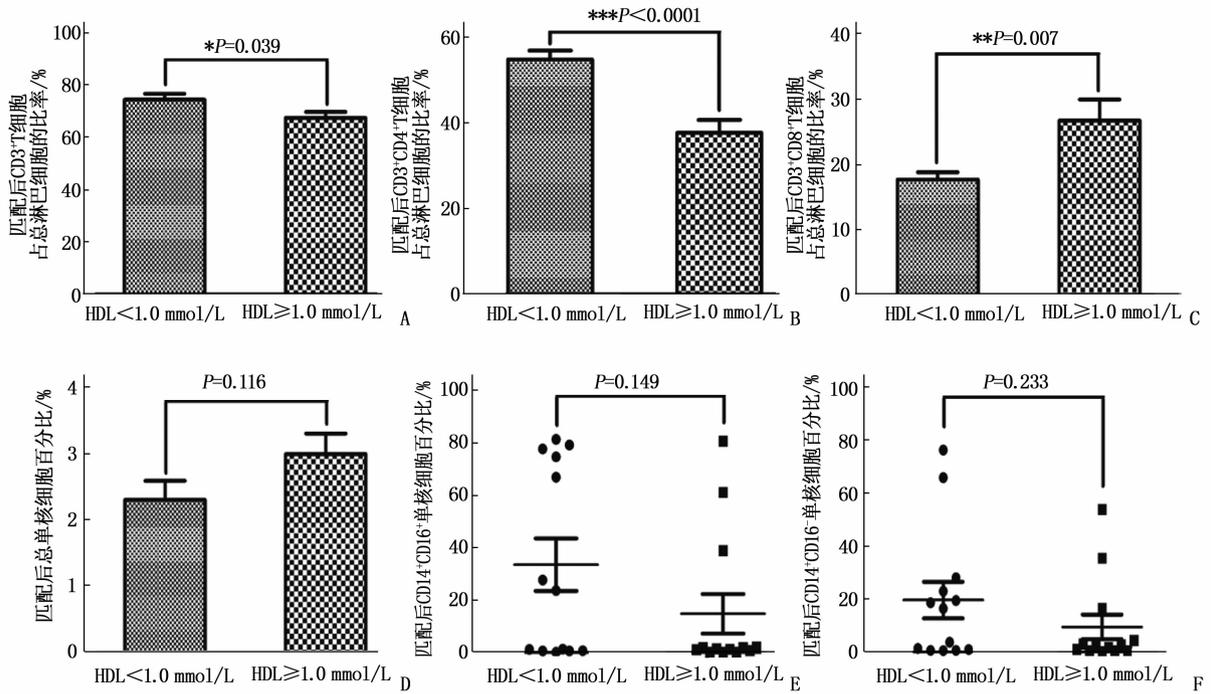
低于 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组 ($P = 0.007$)，差异均有统计学意义，见图 3。HDL < 1.0 mmol/L 组和 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组患者外周血中总单核细胞、CD14⁺CD16⁻单核细胞和 CD14⁺CD16⁺单核细胞的百分比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

大量研究^[9, 11]表明，HDL 水平与动脉粥样硬化和心脑血管疾病的风险呈负相关。HDL 是胆固醇从细胞或外周组织中转运至肝脏内代谢的主要载体，较高水平的 HDL 可减少胆固醇在动脉壁内聚集，在动脉粥样硬化病变进程中发挥保护

作用。目前研究^[12-13]发现 HDL 还具有一定的抗氧化、抗组织增生、抗血栓等作用，HDL 还可能在炎症调节中发挥额外的作用，包括抑制单核细胞活化和调节免疫系统，这些功能均有利于血管的抗动脉粥样硬化作用。

缺血性脑卒中是目前导致人类高死亡和高致残风险的主要疾病之一，也是神经科学中病因机制研究的重点^[14-15]。研究^[4]发现，缺血性脑卒中患者发病早期即可出现明显的炎症反应和免疫反应。T 细胞作为一类主要的免疫细胞，在缺血性脑卒中后的免疫反应中具有重要的调节作用。BRAIT V H 等^[16]研究发现，缺血性脑卒中发病



A: 2 组匹配后 CD3⁺ T 细胞占总淋巴细胞的比率; B: 2 组匹配后 CD3⁺ CD4⁺ T 细胞占总淋巴细胞的比率;
C: 2 组匹配后 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞占总淋巴细胞的比率; D: 2 组匹配后总单核细胞百分比;
E: 2 组匹配后 CD14⁺ CD16⁻ 单核细胞百分比; F: 2 组匹配后 CD14⁺ CD16⁺ 单核细胞百分比。

图 3 倾向性评分匹配后 T 淋巴细胞和单核细胞在缺血性脑卒中急性期患者外周血中的比率

24 h 后,在脑缺血区域及周围梗死区域即可检测到 CD3⁺ T 淋巴细胞。动物实验研究^[17]发现,在脑卒中发病后 24 ~ 72 h,在脑缺血区域可检测到 CD4⁺ T 淋巴细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞的招募和入侵,并且 CD4⁺ T 淋巴细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞在缺血性脑卒中患者发生炎症反应、脑组织损伤等过程中均发挥重要作用。本研究发现 HDL < 1.0 mmol/L 组患者 CD3⁺ T 淋巴细胞及 CD3⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞百分比高于 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组患者,但 CD3⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞百分比低于 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组,表明 HDL 可减轻脑卒中患者急性期 T 淋巴细胞的入侵,并且主要通过减少 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD3⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞的招募和入侵发挥脑保护作用,但是并不能抑制脑卒中后对 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞的募集。

单核细胞可在急性脑卒中发生后 4 h 入侵中枢神经系统,并在发病后 7 d 达到高峰^[18]。单核细胞根据分化阶段不同而分为多种亚型,其中人类最常见的亚型为 CD14⁺ CD16⁻ 单核细胞、CD14⁺ CD16⁺ 单核细胞、CD16⁺ CD14⁻ 单核细胞,这些不同亚型的单核细胞在脑卒中发生的不同阶段发挥着不同的促炎和抗炎作用^[7]。本研究发现在缺血性脑卒中急性期,HDL < 1.0 mmol/L 组和

HDL ≥ 1.0 mmol/L 组患者外周血中总单核细胞、CD14⁺ CD16⁻ 单核细胞和 CD14⁺ CD16⁺ 单核细胞的百分比差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明 HDL 对于单核细胞的调控作用较小。

既往研究^[10, 15]发现中国女性 HDL 表达水平高于男性,并且在女性绝经期后 HDL 水平无明显降低。此外,在真实世界研究^[19]中,中国女性人群糖尿病发病率低于男性。本研究也发现 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组中女性比率较高,糖尿病比率较低,符合目前中国人群流行病学规律。为了去除性别和糖尿病对于研究结果的影响,本研究通过倾向性评分匹配分析的方法来去除这些混杂因素的影响,然后检测 2 组间免疫细胞分布的差异。结果显示, HDL < 1.0 mmol/L 组患者 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD3⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞百分比高于 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组患者, CD3⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞百分比低于 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组患者,差异均有统计学意义。 HDL < 1.0 mmol/L 组和 HDL ≥ 1.0 mmol/L 组患者外周血中总单核细胞、CD14⁺ CD16⁻ 单核细胞和 CD14⁺ CD16⁺ 单核细胞的百分比差异无统计学意义。上述研究结果进一步验证了在缺血性脑卒中急性期患者中,较高水平的 HDL 常伴有低

水平的 CD3⁺T 淋巴细胞募集,并主要减少 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞的募集。虽然 HDL \geq 1.0 mmol/L 组患者外周血中 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞百分比高于 HDL $<$ 1.0 mmol/L 组患者,但是总 CD3⁺T 淋巴细胞百分比在 HDL \geq 1.0 mmol/L 组患者中偏低。由于 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞是 CD3⁺T 细胞发挥作用的 2 种主要亚型,因此 HDL \geq 1.0 mmol/L 组患者外周血 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞百分比的增加可能是因 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞的减少引起的反馈性增加,但仍需进一步研究证实。

综上所述,在缺血性脑卒中急性期患者中,较高水平的 HDL 常伴有低水平的 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞的募集,这种结果可能有利于减少缺血性卒中后的脑组织损伤。

参考文献

- [1] BARQUERA S, PEDROZA-TOBIAS A, MEDINA C, *et al.* Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease [J]. Arch Med Res, 2015, 46(5): 328 - 38.
- [2] YAMAUCHI H, HIGASHI T, KAGAWA S, *et al.* Impaired perfusion modifies the relationship between blood pressure and stroke risk in major cerebral artery disease [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2013, 84(11): 1226 - 32.
- [3] PAN Y, MENG X, JING J, *et al.* Association of multiple infarctions and ICAS with outcomes of minor stroke and TIA [J]. Neurology, 2017, 88(11): 1081 - 1088.
- [4] MALONE K, AMU S, MOORE A C, *et al.* The immune system and stroke: from current targets to future therapy [J]. Immunol Cell Biol, 2019, 97(1): 5 - 16.
- [5] ARUMUGAM T V, GRANGER D N, MATTSO M P. Stroke and T-cells [J]. Neuromolecular Med, 2005, 7(3): 229 - 42.
- [6] RAYASAM A, HSU M, KIJAK J A, *et al.* Immune responses in stroke: how the immune system contributes to damage and healing after stroke and how this knowledge could be translated to better cures? [J]. Immunology, 2018, 154(3): 363 - 76.
- [7] URRRA X, VILLAMOR N, AMARO S, *et al.* Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(5): 994 - 1002.
- [8] ROSENSEN R S, BREWER H B, ANSELL B, *et al.* Translation of high-density lipoprotein function into clinical practice: current prospects and future challenges [J]. Circulation, 2013, 128(11): 1256 - 67.
- [9] ROSENSEN R S, BREWER H B, ANSELL B J, *et al.* Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease [J]. Nat Rev Cardiol, 2016, 13(1): 48 - 60.
- [10] CAI H J, LI Z X, YANG S M. Serum high density lipoprotein cholesterol levels in Chinese healthy subjects and patients with certain diseases [J]. Atherosclerosis, 1982, 43(2 - 3): 197 - 207.
- [11] SACCO R L, BENSON R T, KARGMAN D E, *et al.* High-density lipoprotein cholesterol and ischemic stroke in the elderly: the Northern Manhattan Stroke Study [J]. JAMA, 2001, 285(21): 2729 - 35.
- [12] FLORENTIN M, LIBEROPOULOS E N, WIERZBICKI A S, *et al.* Multiple actions of high-density lipoprotein [J]. Curr Opin Cardiol, 2008, 23(4): 370 - 8.
- [13] HU J, XI D, ZHAO J, *et al.* High-density Lipoprotein and Inflammation and Its Significance to Atherosclerosis [J]. Am J Med Sci, 2016, 352(4): 408 - 15.
- [14] 曾强, 解晔, 王劲松. 江苏省扬州市 2018 年心脑血管疾病全人群流行现状研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2019, 23(24): 37 - 40.
- [15] 《中国脑卒中防治报告》编写组. 《中国脑卒中防治报告 2019》概要 [J]. 中国脑血管病杂志, 2020, 17(5): 272 - 81.
- [16] BRAIT V H, JACKMAN K A, WALDUCK A K, *et al.* Mechanisms contributing to cerebral infarct size after stroke: gender, reperfusion, T lymphocytes, and Nox2-derived superoxide [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(7): 1306 - 1317.
- [17] GU L, JIAN Z, STARY C, *et al.* T Cells and Cerebral Ischemic Stroke [J]. Neurochem Res, 2015, 40(9): 1786 - 1791.
- [18] GARCIA J H, LIU K F, YOSHIDA Y, *et al.* Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat) [J]. Am J Pathol, 1994, 144(1): 188 - 199.
- [19] XU Y, WANG L, HE J, *et al.* Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. JAMA, 2013, 310(9): 948 - 959.

(本文编辑: 梁琥)