

冠心病患者循环内皮祖细胞与尿酸检测及相关性

崔斌, 黄岚, 宋耀明, 耿召华, 晋军

(中国人民解放军第三军医大学新桥医院全军心血管内科中心, 重庆市 400037)

[关键词] 内科学; 冠心病患者循环内皮祖细胞与尿酸的关系; 免疫细胞化学; 内皮祖细胞; 尿酸; 细胞培养; 冠心病

[摘要] 目的 探讨冠心病患者循环内皮祖细胞与尿酸的关系及临床意义。方法 42 例冠心病患者均经选择性冠状动脉造影证实有明显的冠状动脉狭窄; 36 例对照组经临床检查和选择性冠状动脉造影排除冠心病。测定各组患者血清尿酸水平; 采集研究对象外周血进行内皮祖细胞的分离培养, 14 天后倒置相差显微镜下计数细胞克隆形成单位评估循环内皮祖细胞水平。结果 冠心病组血清尿酸水平明显高于对照组 ($P < 0.01$), 单支与多支冠状动脉病变组尿酸水平差异无显著性 ($P > 0.05$)。冠心病组中稳定型心绞痛组及急性冠状动脉综合征组循环内皮祖细胞水平均明显低于对照组 ($P < 0.01$); 单支、双支、三支冠状动脉病变组内皮祖细胞水平均显著低于对照组 ($P < 0.01$)。血清尿酸与循环内皮祖细胞水平呈负相关 ($r = -0.382$, $P = 0.037$)。结论 冠心病患者血清尿酸水平与循环内皮祖细胞水平呈负相关, 血清尿酸可能通过抑制内皮祖细胞数量从而减弱内皮祖细胞参与损伤内皮修复的能力, 与冠心病发生及临床表现相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Relationship between Uric Acid and Circulating Endothelial Progenitor Cell in Patients with Coronary Artery Disease and Its Clinical Significance

CUI Bin, HUANG Lan, SONG Yao-Ming, GENG Zhao-Hua, and JIN Jun

(Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cell; Uric Acid; Cell Culture; Coronary Artery Disease; Endothelial Cell; Mononuclear Cell

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the correlation between uric acid and circulating endothelial progenitor cell (EPC) in patients with coronary artery disease (CAD) and its clinical significance. **Methods** 78 cases were divided into 3 groups: stable angina pectoris (SAP) group ($n = 18$), acute coronary syndrome (ACS) group ($n = 24$) and control group ($n = 36$), and CAD patients were divided into 3 groups according to the result of coronary angiography: single vessel disease group ($n = 18$), double vessels disease group ($n = 14$) and triple vessels disease group ($n = 10$). The concentration of serum uric acid was measured with method of uric acid enzyme. Total mononuclear cell were isolated from peripheral blood by Ficoll density gradient centrifugation, and were cultured in M199 medium supplemented with 20% fetal bovine serum, 50 $\mu\text{g/L}$ vascular endothelial growth factor (VEGF). After 14 days cultured, the number of colony-forming units of EPC were counted by phase-contrast microscope.

Results The uric acid level in the CAD group was significantly higher than those in control group ($P < 0.01$), and there was no statistical difference between the uric acid level of single vessel disease group and that of multiple vessels disease groups ($P > 0.05$). The number of colony-forming units of circulating EPC in CAD group (including SAP and ACS groups) was significantly lower than those in control group ($P < 0.01$), and the circulating EPC level of single, double, triple vessels disease group were significantly lower than that of control group ($P < 0.01$). It was also observed there was a strong negative correlation between the concentration of serum uric acid and the number of colony-forming units of circulating EPC ($r = -0.382$, $P = 0.037$).

Conclusions The serum uric acid concentration in CAD group was higher than that of control group, but the levels of uric acid were independent of the degree of coronary artery disease. The levels of circulating EPC of CAD patients were lower than those of healthy person. Uric acid and EPC were associated with CAD and the severity of coronary artery lesion, and the level of uric acid was negatively correlated with the number of colony-forming units of circulating EPC. These data indicate that uric acid may impair EPC-mediated reendothelialization after endothelial cell injury by inhibiting the number of the EPC, and uric acid and EPC are correlated with the degree of patient's condition and the clinical situation of cardiovascular disease.

[收稿日期] 2005-01-04 [修回日期] 2005-11-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30470729)

[作者简介] 崔斌, 博士, 研究方向为冠心病的诊治与预防, E-mail 为 cuibin_xqhospital@126.com。通讯作者黄岚, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病的诊治和血管损伤与修复的研究, 联系电话为 023-68755601, E-mail 为 huanglans@21cn.com。宋耀明, 副主任医师, 副教授, 主要从事心脏电生理与起搏方面的研究, E-mail 为 ymsong@mail.xqhospital.com.cn。

流行病学研究表明,吸烟、高血压、糖尿病和高脂血症是冠心病(coronary artery disease, CAD)的主要危险因素。近年来报道尿酸可能成为新的冠心病危险因素^[1,2]。研究发现治疗性血管生成可作为挽救缺血组织的重要策略,内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)的动员、分化在此过程中占有重要作用^[3]。然而,冠心病患者循环EPC与尿酸之间的关系尚不十分清楚,本研究通过测定冠心病患者尿酸浓度及循环EPC水平,探讨两者之间的相关性及其临床意义。

1 对象与方法

1.1 对象及分组

选择2003年11月至2004年7月行选择性冠状动脉造影的78例患者,其中男性57例,女性21例,平均 60 ± 10 岁。分为稳定型心绞痛(stable angina pectoris, SAP)组($n=18$)、急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)组($n=24$)及对照组($n=36$)。并根据冠状动脉造影结果分为单支病变组($n=18$)、双支病变组($n=14$)及三支病变组($n=10$)。各组之间年龄、性别差异均无显著性。急性冠状动脉综合征和稳定型心绞痛诊断标准按2000年美国心脏病学会(ACC)及美国心脏病协会(AHA)的诊断和命名标准,经选择性冠状动脉造影术判断至少有一处狭窄,且在50%以上(直径法)。对照组为临床表现或心电图变化怀疑冠心病,经选择性冠状动脉造影术证实无狭窄者。排除标准:术前2月内服用他汀类药物;④未绝经女性;⑤明确的增生性视网膜膜疾病;⑥肿瘤;⑦合并其他器质性心脏病,如心肌炎和心肌病等;⑧感染性疾病;⑨肝肾功能不全;⑩严重的其它系统疾病。

1.2 血清尿酸测定

全部研究对象入院后清晨抽取空腹静脉血3 mL,离心分离血清,采用尿酸酶法测血尿酸浓度。

1.3 循环内皮祖细胞水平测定

采集入选对象抗凝外周血20 mL, Ficoll 密度梯度离心法收集白膜层的单个核细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次,接种于包被人纤维连接蛋白(human fibronectin, Sigma 公司)的24孔培养板中。在含青霉素 10^5 u/L、链霉素100 mg/L、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 0.05 mg/L(Pepro Tech 公司)和20%优质胎牛血清(Hyclone 公司)的M199(Hyclone 公司)培养基中培养,3~4天更换培养基一次;培养14天后倒置相差显微镜下随机选取

3个视野计数细胞克隆形成单位数目,取平均值。

1.4 循环内皮祖细胞内皮功能鉴定

细胞与DiI-ac-LDL(Molecular Probe 公司, 2.4 mg/L) 37℃下孵育1 h以检测EPC对乙酰化低密度脂蛋白(acetylated low density lipoprotein, ac-LDL)的摄取。然后用2%多聚甲醛固定细胞10 min。固定后用PBS液浸洗,再将FITC-UEA-I(Vector 公司, 10 mg/L)加于上述标本37℃下孵育1 h。通过荧光显微镜(fluorescence microscope, Leica)检测细胞的荧光表达情况。

1.5 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数比较采用方差分析,相关性分析采用双变量相关分析。统计学处理用SPSS10.0软件完成。

2 结果

2.1 内皮祖细胞的形态及其内皮功能特征

内皮祖细胞克隆中心为圆形细胞,周围为梭形细胞呈放射状分布(图1)。用DiI-ac-LDL及FITC-UEA-I对细胞染色后,通过荧光显微镜观察,发红色荧光的为DiI-ac-LDL阳性细胞,发绿色荧光的为UEA-I(即lectin)阳性细胞,染色双阳性细胞为正在分化的EPC^[4,5](图2)。

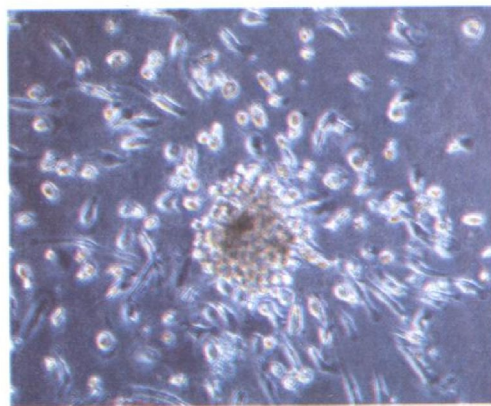


图1. 内皮祖细胞克隆形成单位中心为圆形细胞,周围的梭形细胞呈放射状分布($\times 200$)

2.2 各组尿酸浓度及循环内皮祖细胞水平比较

冠心病组血清尿酸浓度较对照组显著升高($P < 0.01$), ACS组尿酸浓度明显高于SAP组($P < 0.05$)及对照组($P < 0.01$),但SAP组与对照组之间尿酸浓度差异无显著性($P > 0.05$)。冠心病组循环EPC水平明显低于对照组($P < 0.001$), ACS组较SAP组明显降低($P < 0.01$)。尿酸与循环EPC水平呈负相关性($r = -0.382$, $P = 0.037$)(表1)。

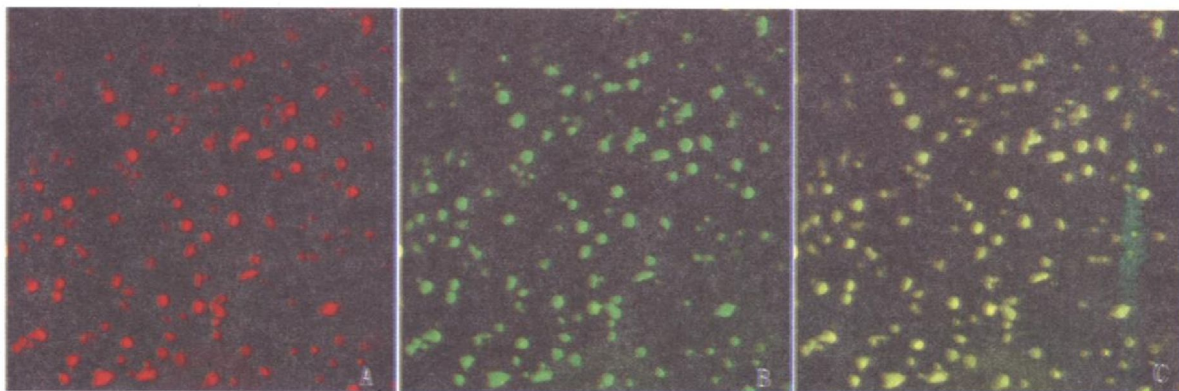


图 2. 通过荧光显微镜鉴定细胞对 DiI ac-LDL 摄取(红色)和植物凝集素结合(绿色), 染色双阳性细胞(黄色)为正在分化的内皮祖细胞($\times 200$)

表 1. 各组尿酸及内皮祖细胞水平的比较($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	尿酸 (mmol/L)	EPC 克隆形成 单位(个)
对照组	36	302 \pm 66	37.0 \pm 5.5
冠心病组	42	380 \pm 82 ^a	12.8 \pm 6.4 ^a
SAP 组	18	336 \pm 64	17.0 \pm 5.6 ^a
ACS 组	24	398 \pm 83 ^{ab}	11.2 \pm 6.0 ^{ac}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 SAP 组比较。

2.3 冠状动脉病变程度与尿酸及内皮祖细胞水平的比较

所有冠状动脉病变组尿酸水平均较对照组显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 单支与多支病变组相互比较, 尿酸水平差异无显著性 ($P > 0.05$)。随着冠状动脉病变支数的增加循环内皮祖细胞的水平呈逐渐降低趋势, 各冠状动脉病变(单支、双支、三支)组 EPC 水平均显著低于对照组 ($P < 0.01$) (表 2)。

表 2. 不同冠状动脉病变程度组尿酸及循环内皮祖细胞水平的比较($\bar{x} \pm s$)

病变程度	n	尿酸 (mmol/L)	EPC 克隆 形成单位(个)
对照组	36	302 \pm 66	37.0 \pm 5.5
单支病变	18	376 \pm 99 ^a	15.6 \pm 4.8 ^b
双支病变	14	376 \pm 52 ^a	12.1 \pm 7.3 ^b
三支病变	10	395 \pm 89 ^b	8.0 \pm 5.5 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

高尿酸血症常与一些代谢紊乱如肥胖、高血糖、高血脂和胰岛素抵抗等并存, 研究发现许多高尿酸

血症患者最终发生冠心病, 认为高尿酸血症与冠心病密切相关^[6]。内皮祖细胞是能直接分化为血管内皮细胞的前体细胞。近来研究发现内皮祖细胞存在于成体骨髓、外周血及脐血中, 并参与治疗性血管新生和损伤血管的再内皮化过程, 对内皮修复、维持血管稳定具有重要作用^[3,7]。新近研究表明外周血中 CD34⁺/KDR⁺ 内皮祖细胞水平可预测心血管事件发生及心血管疾病引起的死亡, 并且有助于识别心血管危险因素增加的患者^[8]。

为了解冠心病患者尿酸与循环内皮祖细胞的相关性及其临床意义, 本研究测定了冠心病患者尿酸浓度及循环 EPC 水平。研究表明, 冠心病组血清尿酸水平较对照组显著升高, ACS 组尿酸水平明显高于 SAP 组, 但 SAP 组与对照组之间尿酸水平差异无显著性; 所有冠状动脉病变组尿酸水平均较对照组显著升高, 但单支与多支病变组相互比较, 尿酸水平差异无显著性, 提示尿酸可能参与了动脉粥样斑块的形成和发展。此外, 我们还发现冠心病组循环 EPC 水平明显低于对照组, ACS 组循环 EPC 水平较 SAP 组明显降低, 随着冠状动脉病变支数的增加循环内皮祖细胞的水平呈逐渐降低趋势, 提示冠心病的发生及冠状动脉病变程度可能与循环 EPC 数量减少有关。相关性分析显示尿酸浓度与循环 EPC 水平呈负相关, 提示尿酸可能通过某种途径影响循环 EPC 的数量。

高尿酸血症促发冠心病的确切机制目前尚不清楚。尿酸可能通过以下途径对动脉粥样硬化形成发生效应: ①高尿酸血症促进低密度脂蛋白氧化和脂质过氧化; ②高尿酸血症伴随氧自由基生成增加并参与炎症反应; ③高尿酸血症促进血小板粘附、聚集; ④高尿酸血症是胰岛素抵抗综合征的一个标志, 常合并高血压、高胰岛素血症及血脂代谢紊乱^[9]。

研究发现在组织缺血、血管损伤、心血管危险因素、严重烧伤等病理性刺激及他汀药物、细胞生长因子作用下循环 EPC 数量可发生变化^[10,11]。本研究发现尿酸与循环 EPC 水平呈负相关,推测尿酸可能通过上述途径引起血管内皮损伤及功能失调,同时通过抑制 EPC 数量及功能从而减弱内皮祖细胞对损伤内皮的修复能力,参与冠心病的发生、发展。本研究提示尿酸和内皮祖细胞有可能与动脉粥样硬化、冠心病的发生及临床表现相关,研究冠心病患者血尿酸浓度与循环内皮祖细胞水平的相关性,为尿酸对冠心病影响的可能机制提供进一步的理论依据。

[参考文献]

- [1] Cullen BF, Larson MG, Kannel WB, Levy D. Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: The Framingham Heart disease[J]. *Ann Intern Med*, 1999, **131** (1): 7-13
- [2] Fang J, Alderman MH. Serum uric acid and cardiovascular mortality: The NHANES I epidemiologic follow-up study[J]. *J Am Med Assoc*, 2000, **283** (18): 2404-410
- [3] Sznitko PE, Fedak PW, Weisel RD, Stewart DJ, Kutryk MJ, Verma S, et al. Endothelial progenitor cell: new hope for a broken heart[J]. *Circulation*, 2003, **107** (24): 3093-100
- [4] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cell inversely correlate with risk factors for coronary artery disease[J]. *Circ Res*, 2001, **89** (1): e1-7
- [5] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cell for therapeutic neovascularization[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (7): 3422-427
- [6] Brand FN, McGee DL, Kannel WB, Stokes J, Castelli WP. Hyperuricemia as a risk of coronary heart disease: the Framingham study[J]. *Am J Epidemiol*, 1985, **121** (1): 11-18
- [7] Walter DH, Kilian Ritting, Ferdinand HB, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow derived endothelial progenitor cell[J]. *Circulation*, 2002, **105** (25): 3024-027
- [8] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cell and cardiovascular outcomes[J]. *N Engl J Med*, 2005, **353** (10): 999-1007
- [9] Wannamethee SG, Shaper AG, Whincup PH. Serum uric acid and the risk of major coronary heart disease events[J]. *Heart*, 1997, **78** (2): 147-153
- [10] Mihail H, Wolfgang Erl, Peter CW. Endothelial progenitor cell mobilization, differentiation, and homing[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (7): 1185-189
- [11] 崔斌, 黄岚. 内皮祖细胞的生物学特性及在缺血性疾病中的应用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (4): 526-528

(此文编辑 朱雯霞)

2005 年编辑部特邀审稿专家

白小涓 教授, 中国医科大学附属第一医院

曹铁生 教授, 第四军医大学唐都医院

陈胜利 教授, 广州医学院市第一人民医院

陈义汉 教授, 同济大学同济医院

邓仲端 教授, 华中科技大学同济医学院

丁 华 教授, 山东大学医学院

范 利 教授, 解放军总医院

符伟国 教授, 复旦大学中山医院

傅明德 教授, 四川大学华西基础医学与法医学院

葛焕琦 教授, 吉林大学第二医院

贡沁燕 教授, 复旦大学上海医学院

郭维琴 教授, 北京中医药大学东直门医院

韩 梅 教授, 河北医科大学

韩雅玲 教授, 解放军沈阳军区总医院

黄德嘉 教授, 四川大学华西医院

黄荷凤 教授, 浙江大学医学院妇产科医院

贾国良 教授, 第四军医大学西京医院

姜 勇 教授, 南方医科大学基础医学院

蒋世良 教授, 协和医科大学阜外医院

匡希斌 教授, 南华大学附属第二医院

李 莹 教授, 协和医科大学阜外医院

李学军 教授, 北京大学医学部

刘志民 教授, 第二军医大学长征医院

吕传真 教授, 复旦大学华山医院

齐永芬 博士, 北京大学医学部

苏 琦 教授, 南华大学医学院

苏镇培 教授, 中山大学附属第一医院

孙 明 教授, 中南大学湘雅医院

孙建宁 教授, 北京中医药大学中药学院

汪培山 教授, 天津医科大学

王 抒 教授, 卫生部北京老年医学研究所

王 佐 博士, 南华大学心血管病研究所

吴清玉 教授, 清华大学华信医院

吴移谋 教授, 南华大学

伍 卫 教授, 中山大学附属第一医院

谢梅林 教授, 苏州大学医学院

徐也鲁 教授, 上海交通大学医学院

杨期东 教授, 中南大学湘雅医院

张 强 教授, 中国医科大学第一医院

张岫美 教授, 山东大学医学院

郑强荪 教授, 第四军医大学唐都医院

朱依纯 教授, 复旦大学上海医学院

庄一义 教授, 解放军南京军区总医院

邹云增 教授, 复旦大学中山医院