

• 临床研究 •

[文章编号] 1007-3949(2009)17-03-0202-04

## 急性冠状动脉综合征患者外周血 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> 内皮微粒水平增高

程海, 王涟, 张静梅, 宋杰, 康丽娜, 徐标

(南京大学医学院附属鼓楼医院心脏科, 江苏省南京市 210008)

[关键词] 内皮微粒; 急性冠状动脉综合征; 甘油三酯; 高敏 C 反应蛋白; 2 型糖尿病

[摘要] 目的 观察急性冠状动脉综合征患者与非冠心病患者外周血内皮微粒水平, 探讨 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> 内皮微粒与心血管危险因素的相关性。方法 急性冠状动脉综合征患者 56 例, 非冠心病患者 26 例, 采用流式细胞仪检测外周血 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> 内皮微粒水平。结果 与非冠心病患者比较, 急性冠状动脉综合征患者外周血 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> 内皮微粒显著增加 ( $P < 0.01$ ), 而急性心肌梗死与不稳定型心绞痛亚组之间外周血 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> 内皮微粒水平无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。所有入选患者中, 2 型糖尿病患者外周血 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> 内皮微粒水平较非糖尿病患者显著升高 ( $P < 0.05$ ); 多因素回归分析显示, 血清甘油三酯水平与外周血 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> 内皮微粒数量独立正相关 ( $r = 0.28, P < 0.05$ )。急性冠状动脉综合征组血清高敏 C 反应蛋白水平与外周血 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> 内皮微粒数量呈正相关 ( $r = 0.31, P < 0.05$ )。结论 急性冠状动脉综合征患者和糖尿病患者外周血 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> 内皮微粒增多, 提示急性冠状动脉综合征患者和 2 型糖尿病患者内皮损伤严重。CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> 内皮微粒水平增高可能与血清甘油三酯和血清高敏 C 反应蛋白水平增高有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Increased Circulating CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> Endothelial Microparticles in Patients with Acute Coronary Syndromes

CHENG Hai, WANG Lian, ZHANG Jing-Mei, SONG Jie, KANG Li-Na, and XU Biao

(Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School, Nanjing University, Nanjing 210008, China)

[KEY WORDS] Endothelial microparticles; Acute Coronary Syndromes; Triglyceride; High Sensitivity C-Reactive Protein; Type 2 Diabetes

[ABSTRACT] **Aim** To investigate circulating levels of endothelial microparticle (EMP) in the plasma of patients with acute coronary syndromes (ACS), and to explore correlations between circulating EMP count and conventional risk factors of cardiovascular disease (CVD). **Methods** A case-controlled study was conducted in 56 patients with ACS and 26 control subjects without coronary heart disease. Circulating levels of CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> EMP were measured by flow cytometric analysis. **Results** Plasma CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> EMP levels were significantly higher in patients with ACS than those in control subjects ( $P < 0.01$ ). However there was no significant difference in plasma CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> EMP counts between patients with AMI and those with UAP. Among all subjects, patients with type 2 diabetes had increased plasma CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> EMP as compared with patients without diabetes ( $P < 0.05$ ). On multivariate analysis, serum triglyceride level was the major independent factor related to plasma CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> EMP count ( $r = 0.28, P < 0.05$ ). In patients with ACS, linear regression analysis showed a strong positive correlation between serum high sensitivity C-reactive protein level and plasma CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> EMP count ( $r = 0.31, P < 0.05$ ).

**Conclusions** Plasma CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> EMP increased in patients with ACS or diabetes, and plasma CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> EMP count was correlated with conventional risk factors for CVD. These findings suggest that the more critical endothelial damage is present in ACS patients and type 2 diabetes patients, increased level of plasma CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> EMP is relative with high concentration of plasma hs-CRP and triglyceride.

血管内皮细胞在保持血管内膜的完整性, 防止  
血细胞黏附、血栓形成、血管平滑肌增生以及调节管

壁张力等方面起着重要的作用<sup>[1]</sup>。血管内皮损伤  
是动脉粥样硬化发生、发展的重要因素。内皮损伤、

[收稿日期] 2008-12-21 [修回日期] 2009-03-03

[基金项目] 国家自然科学基金 (30170370) 和江苏省自然科学基金 (BK2004083) 资助

[作者简介] 程海, 硕士, 主治医师, 主要从事冠心病、高血压病及糖尿病血管并发症的基础和临床研究, E-mail 为 tbmtmr@yahoo.com.cn  
王涟, 博士, 副主任医师, 主要从事冠心病、高血压病及糖尿病血管并发症的基础和临床研究。张静梅, 硕士, 主治医师, 主要从事冠心病、心力衰竭、糖尿病血管并发症的基础和临床研究。通讯作者徐标, E-mail 为 xubiao@medical.com.cn

炎症反应和斑块破裂导致的冠状动脉内血栓形成可引起急性冠状动脉综合征 (ACS) 的发生<sup>[2,3]</sup>。因此, 评估内皮损伤程度、内皮功能状态对预测动脉粥样硬化性疾病和急性心血管事件的发生具有重要价值。内皮微粒 (endothelial microparticles, EMP) 是内皮细胞凋亡或激活时释放出来的微小囊泡。近年来研究表明, 在内皮损伤严重的病理状态下外周血中 EMP 增多, EMP 水平与内皮功能密切相关; EMP 作为内皮损伤、功能紊乱的替代性标记逐渐已被国内外学者认可<sup>[4-6]</sup>。本研究旨在观察 ACS 患者与非冠心病患者外周血 EMP 水平, 探讨 EMP 与心血管危险因素的相关性。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

本研究在获得患者知情同意后进行。研究入选患者 82 例, 其中 ACS 患者 56 例, 包括急性心肌梗死 (AMI) 患者 32 例和不稳定型心绞痛 (UAP) 患者 24 例, 非冠心病患者 26 例。诊断标准<sup>[7,8]</sup>: UAP 为近 1 月内新发的心绞痛或 1 个月内心绞痛恶化加重 (心绞痛分级至少增加 1 级, 或至少达到 Ⅲ级, CCS 分级), 以及休息时发作的心绞痛, 心电图有至少两个相邻导联出现新的或动态的 ST 段或 T 波改变, 心脏肌钙蛋白 T (cTnT) 检查正常。④ AMI 为胸痛持续时间 > 20 min, 起病在 24 h 内, 心电图有至少两个相邻导联出现 ST 段抬高或压低, cTnT > 0.1 μg/L (正常值 < 0.05 μg/L)。排除标准: 严重肝肾功能不全; ④ 肿瘤以及其他消耗性疾病; ④ 造血系统疾病; 感染未控制; 其他部位梗塞, 如脑梗塞、肺栓塞等。所有入选患者均经冠状动脉造影证实冠状动脉病变情况。患者相关生物化学指标包括血脂、血糖及高敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 的检测由本院生物化学检验中心完成。

### 1.2 方法

为避免冠状动脉造影及相关介入治疗影响外周血 EMP 水平, 所有患者均在冠状动脉造影前进行外周血采集。AMI 患者外周血采集在胸痛发作 24 h 内, UAP 患者外周血采集在胸痛发作 72 h 内。每例患者采集 2.7 mL 外周血于枸橼酸钠抗凝管中, 两步离心提取贫血小板血浆 (PPP), 以流式细胞仪 (FACSCantq Becton Dickinson) 检测 EMP 水平。由于部分血小板、活化的单核细胞及淋巴细胞也表达 CD31, 以 CD31 为标记检测 EMP 有可能与部分血小板微粒或白细胞微粒混淆, 因此首先对贫血小板血

浆中的微粒进行细胞来源鉴定, 即同时以 FITC 标记的抗人 CD31 单抗 (anti-CD31-FITC, Caltag Laboratories) 以及针对白细胞的特异性抗体——PE-Cy5.5 标记的抗人 CD45 单抗 (anti-CD45-PE-Cy5.5, Caltag Laboratories) 或针对血小板的特异性抗体——PE 标记的抗人 CD61 单抗 (anti-CD61-PE, BD Biosciences) 标记微粒<sup>[6,9]</sup>, 结果发现 CD45<sup>+</sup> 白细胞微粒以及 CD61<sup>+</sup> 血小板微粒仅微弱表达 CD31 (图 1), 由此定义 CD31<sup>bright</sup> 微粒来源于内皮细胞, 凋亡的 EMP 表型为 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup><sup>[10]</sup>。在正式检测中, 取 50 μL 贫血小板血浆加入 5 μL anti-CD31-FITC 避光 4℃ 孵育 30 min 而后同时加入 5 μL Annexin V-APC 及 440 μL 含钙离子的结合缓冲液, 混匀避光孵育 5 min 后进行流式定时定速检测。

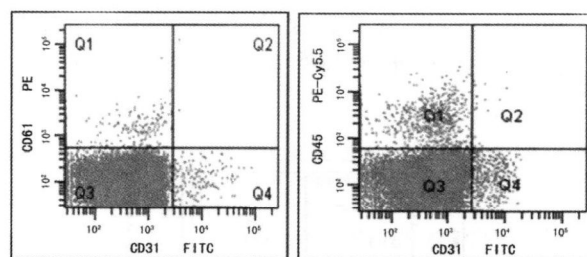


图 1 CD61<sup>+</sup> / CD31<sup>+</sup> 和 CD45<sup>+</sup> / CD31<sup>+</sup> 流式图

### 1.3 统计学方法

正态分布数值以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组均数间比较采用独立样本 *t* 检验, 分类资料比较采用  $\chi^2$  检验, EMP 水平与心血管危险因素的相关性采用多因素逐步回归分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。数据分析使用 SPSS13.0 统计软件。

## 2 结果

### 2.1 基本情况比较

ACS 患者和非冠心病患者年龄及性别分布相似。ACS 组甘油三酯 (TG) 水平较非冠心病患者显著增高, 高密度脂蛋白 (HDL) 水平显著降低, 其它心血管危险因素在两组中无显著性差异 (表 1)。

### 2.2 外周血 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> 内皮微粒水平

与非冠心病患者比较, ACS 患者外周血 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> EMP 明显增多 ( $P < 0.01$ ); UAP 和 AMI 亚组之间外周血 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> EMP 数量无显著性差异 (图 2)。

### 2.3 外周血 CD31<sup>bright</sup> / Annexin V<sup>+</sup> 内皮微粒水平与心血管危险因素的相关性

将所有入选患者按照有无 2 型糖尿病、高血压

病、吸烟进行分组,组间比较发现,2型糖尿病患者外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP水平较非糖尿病患者显著升高 ( $P < 0.05$ ), CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP与血糖水平及糖化血红蛋白 (HbA1C) 无显著相关性;高血压与非高血压病患者比较以及吸烟患者与非吸烟者比较外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP水平也无显著性差异 (图 3)。

在所有入选患者中,以血清甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白水平对外周血 CD31<sup>+</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP数量进行多因素逐步回归分析显示,血清甘油三酯水平与外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP数量独立正相关 ( $r = 0.28, P < 0.05$ );而总胆固醇、低密度脂蛋白及高密度脂蛋白水平与外周血 EMP数量无显著相关性 (图 4)。在 ACS组中,以血清 hs-CRP水平对外周血 CD31<sup>+</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP数量进行单因素线性回归分析表明,血清 hs-CRP水平与外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin

V<sup>+</sup> EMP数量呈正相关 ( $r = 0.31, P < 0.05$  图 5)。

表 1 基本资料比较

指 标	ACS组 ( <i>n</i> = 56)	非冠心病组 ( <i>n</i> = 26)
男性 [例 (%) ]	34 (61%)	11 (42%)
年龄 (岁)	69.4 ± 9.8	66.5 ± 9.6
高血压病史 [例 (%) ]	41 (73%)	11 (42%)
糖尿病史 [例 (%) ]	22 (39%)	4 (15%)
吸烟 [例 (%) ]	6 (11%)	0
甘油三酯 (mmol/L)	2.4 ± 1.8 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.6
总胆固醇 (mmol/L)	4.4 ± 0.9	4.0 ± 0.9
低密度脂蛋白 (mmol/L)	2.2 ± 0.6	2.0 ± 0.6
高密度脂蛋白 (mmol/L)	0.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.3

a为  $P < 0.05$  与非冠心病组比较。

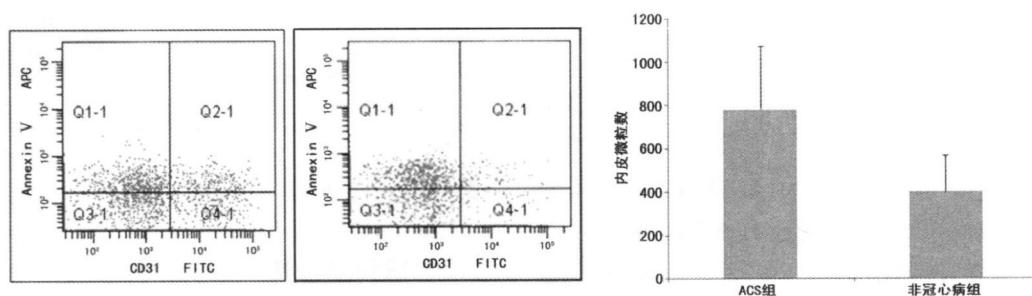


图 2 ACS患者和非冠心病患者血浆 CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP水平

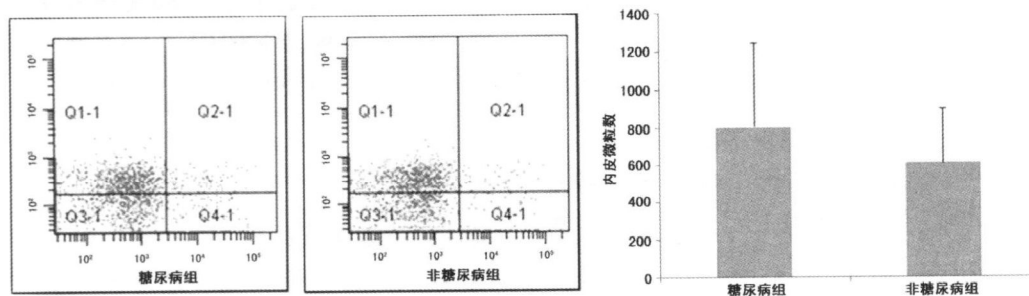


图 3 2型糖尿病患者和非糖尿病患者外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP水平

### 3 讨论

EMP是内皮细胞凋亡或激活时释放至外周血的微小囊泡,内皮细胞凋亡时释放的 EMP携带 CD31,因其以出芽方式释放过程中发生膜重构,磷脂酰丝氨酸 (PS) 转位到膜外层,而 Annexin V 是 Ca<sup>2+</sup> 依赖的磷脂结合蛋白,能够与 EMP结合<sup>[6]</sup>,所以 EMP能做为内皮凋亡的标记,通过流式细胞仪检测外周血 EMP水平,为评估内皮损伤、内皮功能提

供新的方法。

本研究发现,ACS组与非冠心病组比较外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP明显增多 ( $P < 0.01$ );亚组分析表明,UAP和AMI亚组之间外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP数量无显著差异;多因素逐步回归分析表明血清甘油三酯水平与外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP数量独立正相关,分组比较发现2型糖尿病患者外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin

V<sup>+</sup> EMP水平显著升高;但是分组比较并未发现高血压病患者及吸烟者外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP显著增加,可能与入选患者均为轻、中度高血压且多数长期接受降压药物治疗,研究人群中吸烟者样本量偏小有关。

内皮损伤、炎症反应、斑块破裂、血栓形成导致ACS的发生,内皮功能损伤在动脉粥样硬化的发生、发展及其血栓并发症中起着关键的作用<sup>[2-3]</sup>。内皮细胞凋亡与修复之间的动态平衡维持血管内膜的完整性和血管的正常功能,冠状动脉粥样硬化斑块部位的內皮细胞凋亡增加,削弱了內皮的正常抗炎、抗凝、抗血栓作用,內皮细胞凋亡增加、內皮细胞剥脱导致內皮下胶原暴露可促使局部血栓形成导致ACS的发生<sup>[4-5]</sup>。本研究中,外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP在ACS患者中明显升高,提示ACS患者內皮损伤严重,CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP与內皮损伤相关。糖尿病和高脂血症是动脉粥样硬化的危险因素,伴随显著的內皮损伤、內皮功能紊乱<sup>[11-12]</sup>。糖尿病患者体内增高的氧化应激反应以及糖基化终产物水平均可导致血管內皮损伤增加<sup>[12]</sup>。本研究中外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP在糖尿病患者中明显升高,与血清甘油三酯水平独立正相关。提示糖尿病患者內皮凋亡增加,存在显著的內皮损伤,CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP水平增高可能与血清甘油三酯水平增高有关。外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP的增加反映了內皮功能紊乱。

C反应蛋白(CRP)是炎症的急性期反应蛋白,是炎症反应的标志物,在ACS患者中增高<sup>[13]</sup>。本研究中ACS组内回归分析发现,血清hs-CRP水平与外周血 CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP数量正相关,一方面提示ACS患者內皮功能损伤增加,炎症反应加重导致CRP水平升高,內皮损伤凋亡增加导致CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP水平升高,因此CRP和CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP可能独立反映了內皮功能损伤加重。但也有研究指出CRP削弱血管的內皮依赖性舒张反应,抑制內皮细胞一氧化氮释放,损伤內皮功能<sup>[14]</sup>;而EMP可削弱离体血管的內皮依赖性舒张反应<sup>[15]</sup>,抑制体外培养的內皮细胞一氧化氮释放<sup>[16]</sup>,不排除CRP和CD31<sup>bright</sup>/Annexin V<sup>+</sup> EMP可能因损伤內皮功能而上调对方水平。

新近研究指出,EMP除作为內皮损伤标记之外,其本身也可损伤內皮功能,推进心血管疾病进展。比如,EMP可抑制体外培养的內皮细胞一氧化氮释放<sup>[16]</sup>,促进血栓事件的发生<sup>[17]</sup>,促进內皮祖细

胞凋亡<sup>[18]</sup>。鉴于EMP的诊断价值与病理作用,EMP与心血管疾病的发生发展密切相关,检测外周血EMP水平有望成为评估內皮功能的新手段。

#### [参考文献]

- [1] Osto E, Coppolino G, Volpe M, et al. Restoring the dysfunctional endothelium [J]. *Curr Pharm Des* 2007; **13**: 1053-1068.
- [2] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002; **105**: 1135-1143.
- [3] Rioufol G, Finet G, Giron I, et al. Multiple atherosclerotic plaque rupture in acute coronary syndrome: a three-vessel intravascular ultrasound study [J]. *Circulation*, 2002; **106**: 804-808.
- [4] Littlewood TD, Bennett MR. Apoptotic cell death in atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol* 2003; **14**: 469-475.
- [5] Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, et al. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis [J]. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**: 673-690.
- [6] Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, et al. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction [J]. *Front Biosci* 2004; **9**: 1118-1135.
- [7] The Joint European Society of Cardiology/American college of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined—A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American college of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol* 2000; **36**: 959.
- [8] Meier MA, Al-Badr WH, Cooper JV, et al. The new definition of myocardial infarction: Diagnostic and prognostic implications in patients with acute coronary syndromes [J]. *Arch Intern Med* 2002; **162**: 1585.
- [9] Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, et al. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease [J]. *J Am Coll Cardiol* 2005; **45**: 622-630.
- [10] Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, et al. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis [J]. *Thromb Res* 2003; **109**: 175-180.
- [11] De Micheli M, Iannuzzi A, Salvato A, et al. Impaired endothelium-dependent vascular reactivity in patients with familial combined hyperlipidaemia [J]. *Heart* 2007; **93**: 78-81.
- [12] Avogaro A, Fadini GP, Gallo A, et al. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006; **16** (Suppl 1): S39-45.
- [13] Arroyo-Espiguero R, Avanzas P, Cosin-Sales J, et al. C-reactive protein elevation and disease activity in patients with coronary artery disease [J]. *Eur Heart J* 2004; **25**: 401-408.
- [14] Qamirani E, Ren Y, Kuo L, et al. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 995-1001.
- [15] Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimi T, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction [J]. *Circulation*, 2001; **104**: 649-652.
- [16] Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, et al. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; **286**: H910-915.
- [17] Mallat Z, Benamer H, Hugel R, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes [J]. *Circulation*, 2000; **101**: 841-843.
- [18] Piro M, Schillaci G, Paltricia R, et al. Increased ratio of CD31<sup>+</sup>/CD42<sup>-</sup> microparticles to endothelial progenitors as a novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**: 530-535.

(此文编辑 文玉珊)