·临床研究·

[文章编号] 1007-3949(2012)20-09-0814-05

冠心病患者内皮祖细胞变化与冠状动脉病变的相关性

方叶青[1], 张松荣[2], 方红城[1], 谢陪益[1], 苏又苏[1]

(1. 广东医学院附属南山医院心血管内科, 广东省深圳市 518000; 2. 深圳市宝安区人民医院, 广东省深圳市 518000)

[关键词] 内皮祖细胞; 冠心病; 细胞数量; 冠状动脉病变

[摘 要] **目的** 观察冠心病患者外周血中提取的内皮祖细胞的细胞形态、数量、集落数与正常对照组的区别。并研究冠心病患者冠状动脉狭窄的不同范围和程度与内皮祖细胞数量变化的相关性。**方法** 选择冠心病患者 57 例和对照组 30 例,从外周血获取单个核细胞,体外培养后进行细胞分析和计数。并分析冠状动脉狭窄的不同范围和程度,患者内皮祖细胞数量和成集落数量的区别,并进行相关分析。**结果** (1)冠心病患者外周血内皮祖细胞数量(23.1 ± 1.8 比 56.7 ± 2.4)和细胞集落数(14.7 ± 2.5 比 24.2 ± 1.7)较对照组明显减少;(2)随着冠状动脉狭窄范围的扩大和狭窄程度的加重,内皮祖细胞的数量和活性明显下降。**结论** 冠心病患者外周血内皮祖细胞的数量和成集落的数量明显降低;冠心病患者外周血内皮祖细胞的数量与冠状动脉病变的范围和狭窄程度呈负相关。

[中图分类号] R5 [文献标识码] A

The Relationship Between Endothelial Progenitor Cells and Coronary Artery Stenosis in Patients of Coronary Heart Diseases

FANG Ye-Qing[1], ZHANG Song-Rong[2], FANG Hong-Cheng[1], XIE Pei-Yi[1], and SU You-Su[1]

(1. *Cardiovascular Deparment*, *Shenzhen Nanshan Hospital Affiliated to Guangdong Medical College*, *Shenzhen*, *Guangdong* 518000, *China*; 2. *The People's Hospital of Baoan*, *Shenzhen*, *Guangdong* 518000, *China*)

[**KEY WORDS**] Endothelial Progenitor Cells; Coronary Heart Disease; Cell Number; Coronary Artery Stenosis

[**ABSTRACT**] **Aim** To investigate the isolation and culture of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with coronary heart diseases, and to determine cell shape, amount and clusters. And to study the correlation of endothelial progenitor cells (EPC) number and the stenosis degree in coronary artery. **Methods** Mononuclear cells were isolated from peripheral blood of patients with coronary heart diseases ($n = 57$) and control ($n = 30$). The isolated cells were cultured. And the correlation of EPC number and the stenosis degree of coronary artery was studied in patients with coronary heart disease. **Results** The number of EPC was significantly reduced in patients with coronary artery disease (CAD) compared with control subjects (23.1 ± 1.8 vs 56.7 ± 2.4). In addition, the number of cell clusters was also impaired in patients with CHD (14.7 ± 2.5 vs 24.2 ± 1.7). EPC number and function were decreased with the degree and extent of coronary artery stenosis. **Conclusions** The number of cell clusters, proliferative capacity of EPC was significantly reduced in patients with CHD compared with control subjects. The number of EPC have negative correlation with the degree and extent of coronary artery stenosis.

冠心病(coronary heart disease, CAD)的主要病理改变是血管病变,而内皮损伤和内皮功能障碍与其关系密切。内皮损伤和修复之间动态平衡失调会导致内皮功能障碍,而内皮功能障碍是动脉粥样硬化发生的始动环节,并影响着动脉粥样硬化的进展过程。近年的研究表明,内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)可以分化为成熟内皮细胞,参与出生后血管新生[1,2]和内皮损伤后的修复过程[3,4],参与缺血组织血管新生,减轻血管修复时内膜的增厚[5],对血管新生和维持内皮功能的完整性

[收稿日期] 2011-09-05

[基金项目] 湖南省教育厅 2006 年度"十一·五"重点项目资助课题 (200656)

[作者简介] 方叶青,博士,副教授,研究方向为冠心病的干细胞研究,E-mail 为 fangyeqing2005@163.com。张松荣,博士,讲师,研究方向为医学统计学,E-mail 为 zhangsr168@126.com。通讯作者苏又苏,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为冠心病的介入治疗,E-mail 为 sys831@126.com。

有重要作用[6]。不同的冠状动脉病变范围及病变程度直接影响患者生存质量。我们对冠心病患者 EPC 数量和活性进行了研究,并分析其与患者冠状动脉病变的范围及程度的相关性。

1 资料与方法

1.1 对象和标本

选择我院心内科 2006 年 5 月至 2007 年 1 月的住院患者,经选择性冠状动脉造影证实为冠心病,筛选共 57 例纳入研究,其中男性 41 例,女性 16 例。另选择冠状动脉造影阴性的对照组 30 例,其中男性 19 例,女性 11 例。无菌条件下从股动脉处收集入选对象肝素抗凝外周血 20 mL,注入已加低分子肝素钠 500 U 的抗凝离心管,摇匀,采集后 4 h 内处理标本。所有采血者均排除近期外伤手术史、皮肤溃疡、炎症、肿瘤和血液系统疾病等影响 EPC 的因素。

1.2 仪器与试剂

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)165 为 Pepro Tech EC 公司产品,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)为 BD Bioscience 公司产品,FITC-CD34、PE-KDR、荆豆凝集素 1(Ulex Europaeus agglutinin-1,UEA-1)、Dil-LDL 为 R&D 公司产品,Trizol 为 MIC 公司产品。

1.3 内皮祖细胞的分离培养

取外周血 20 mL,注入已加低分子肝素钠 500 U 的抗凝离心管,用 Hank's 液对倍稀释混匀。使用密度梯度离心法提取单个核细胞,以每孔 2×10^6 个细胞的浓度接种在已用 200 μg/L 纤维连接蛋白包被 4 h 的 6 孔板。并加 VEGF165 10 μg/L 和 bFGF 20 μg/L RPMI1640 培养基,培养细胞 4 天,用 Hank's 液洗去未贴壁细胞,贴壁细胞进行细胞分析。

1.4 内皮祖细胞的鉴定

将培养第 7 天的 EPC 与 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(acetylated low density lipoprotein-Dil,ac-LDL-Dil)24 mg/L 和 FITC 标记的荆豆凝集素 1(UEA-1)10 mg/L 混合,通过激光共聚焦显微镜鉴定 UEA-1 和 ac-LDL-Dil,双染色阳性的细胞被认为是正在分化的 EPC。

1.5 内皮祖细胞的增殖能力观察

将 EPC 培养 7 天后,消化贴壁细胞,以每孔 4×10^4 个细胞接种于 96 孔板,每孔加细胞悬液 200 μL,设 3 个复孔,培养时间分别为 1、2、3、4、5、6、7 天,用噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)检测细胞的增殖性,在酶标仪上检测各孔吸光值,记录结果,绘制细胞生长曲线图。

1.6 冠状动脉造影方法及冠状动脉病变程度评价

采用常规股动脉穿刺或桡动脉穿刺方法行选择性冠状动脉造影检查。采用 Gensini 积分法和血管病变支数来评价冠状动脉病变程度。根据 Gensini 积分法对冠状动脉病变程度进行定量评价:狭窄≤25% 为 1 分,25% ~49% 为 2 分,50% ~74% 为 4 分,75% ~89% 为 8 分,90% ~99% 为 16 分,100% 为 32 分。不同节段冠状动脉评分系统按 Gensini 标准,左主干病变 ×5,左前降支(left anterior descending coronary artery,LAD)为近段 ×2.5、中段 ×1.5、远段 ×1,对角支 D1 ×1、D2 ×0.5,左回旋支(left circumflex coronary artery,LCX)为近段病变 ×2.5、远段和后降支均 ×1,后侧支 ×0.5,右冠状动脉(right coronary artery,RCA)病变近、中、远和后降支均 ×1。每例患者冠状动脉病变程度的最终积分为各分支积分之和。

1.7 试验分组

根据冠状动脉造影结果及 Gensini 积分法两个方面对试验进行分组:(1)冠状动脉造影结果分为 3 组:多支病变组($n=36$):2 支或 2 支以上血管病变为多支病变组,左主干病变被认为同时累及 LAD 与 LCX 为多支病变组;单支病变组($n=21$):1 支血管病变为单支病变组;对照组($n=30$)。(2)以 Gensini 积分结果分 3 组:积分≤30 分组;积分 30 ~60 分组;积分≥60 分组。

1.8 统计学分析

所有数据均采用 SPSS for Windows 13.0 软件进行统计学处理,各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 F 检验和 t 检验,方差不齐时先行数据转换,组间比较采用单因素方差分析,相关性分析采用双变量分析,$P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 冠心病患者临床资料的比较

将对照组和冠心病组的各项情况进行比较,冠心病组的吸烟比例和高血压患者所占比例均较对照组高,血脂单项比较中,胆固醇(cholesterol,CHO)、甘油三酯(triglyceride,TG)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein,LDL)与对照组比较均升高,差异有显著性($P<0.05$)(表 1)。

表 1. 冠心病组与对照组临床基本资料比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Basic clinical data for patients with CHD and control subjects ($\bar{x} \pm s$)

项　目	对照组 ($n=30$)	冠心病组 ($n=57$)
年龄	62.1 ± 7.6	64.3 ± 8.2
男/女(例)	19/11	41/16
吸烟(例)	9(27%)	24(42%)[a]
吸烟数量(支/日)	11.31 ± 5.10	18.25 ± 3.40
高血压(例)	6(18%)	22(39%)[a]
收缩压(mmHg)	133.00 ± 21.20	143.70 ± 25.22[a]
舒张压(mmHg)	80.25 ± 13.50	87.01 ± 18.16[a]
脉压差(mmHg)	50.28 ± 16.12	58.21 ± 5.60[a]
糖尿病(例)	3(10%)	9(16%)
空腹血糖(mmol/L)	4.50 ± 1.23	5.18 ± 1.76
胆固醇(mmol/L)	3.16 ± 1.69	4.53 ± 0.95[a]
甘油三酯(mmol/L)	1.43 ± 1.02	1.77 ± 1.35
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.31 ± 0.94	2.76 ± 1.22[a]
高密度脂蛋白(mmol/L)	0.94 ± 0.35	0.78 ± 0.42

a 为 $P<0.05$,与对照组比较。

2.2 细胞形态观察

与对照组比较,冠心病患者的 EPC 在刚分离的单个核细胞数量及用生长因子诱导分化 7 天后的细胞数目明显减少,分化为杆形和梭形的细胞数目也明显减少;而且,细胞集落数明显减少,细胞集落较小而分散(图 1)。

2.3 光镜下细胞计数和细胞集落的比较

将冠心病组和对照组的 EPC 数量比较,发现冠心病患者的 EPC 数量和形成集落数与对照组比较明显降低,差异具有显著性($P<0.05$)(表 2)。

2.4 荧光双染色阳性细胞的比较

分离获得的单个核细胞培养 7 天后形成了梭形的内皮样细胞。用 ac-LDL-DiI 和 UEA-1 对细胞染色后,通过共聚焦显微镜鉴定,ac-LDL-DiI 和 UEA-1 双染色阳性细胞被认为是正在分化的 EPC(图 1),冠心病患者外周血的双染色阳性细胞较对照组明显降低。

表 2. 冠心病组与对照组细胞数目和细胞集落数目比较

Table 2. Number and clusters of EPC for patients with CHD and control subject

项　目	对照组	冠心病组
细胞数目	56.7 ± 2.4	23.1 ± 1.8[b]
细胞集落数目	24.2 ± 1.7	14.7 ± 2.5[a]

a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组比较。

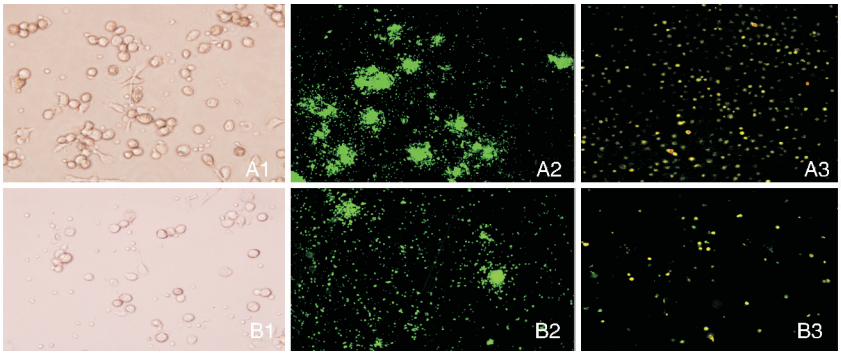

图 1. 冠心病组与对照组细胞形态比较　A 为对照组,A1:培养 7 天后的 EPC(×40),A2:细胞集落(×10),A3:荧光双染色双阳性细胞(×40)。B 为冠心病组,B1:培养 7 天后的 EPC(×40),B2:细胞集落(×10),B3:荧光双染色双阳性细胞(×40)。

Figure 1. Cell forms of patients with CHD and control subjects

2.5 不同冠状动脉病变支数冠心病患者内皮祖细胞数量和活性

根据冠状动脉造影结果,将单支病变、多支病变患者和对照组的 EPC 数量和活性进行比较,发现冠心病患者的 EPC 数量与细胞形成的集落与对照组比较明显减少,差异具有显著性($P<0.01$),而且随着冠状动脉病变范围的广泛化,EPC 的数量和细胞形成集落的能力逐渐下降,多支病变组与对照组比较,差异有显著性($P<0.01$)。而且冠心病患者的细胞(第 6 天)增殖活性与对照组比较出现明显的增殖低下,病变范围越广泛,细胞的增殖能力越低(表 3、图 2、图 3)。

2.6 不同冠状动脉病变程度冠心病患者内皮祖细胞数量

根据冠状动脉造影结果,对不同冠状动脉狭窄程度评分患者与对照组的 EPC 数量进行比较,发现冠心病患者随着冠状动脉狭窄程度的不断加重,EPC 的数量出现明显的降低,将冠心病患者的冠状动脉狭窄程度与 EPC 的数量进行相关趋势比较,有明显的逐渐下降趋势($R^2=0.6199$,图 4)。

表 3. 不同冠状动脉病变支数冠心病患者 EPC 数量和活性($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Number and proliferative capacity of EPC in CHD patients with different number of diseased vessels($\bar{x} \pm s$)

项　目	对照组	单支病变组	多支病变组
细胞数目	56.7 ± 1.8	39.7 ± 2.4[a]	22.1 ± 1.8[b]
细胞集落数目	24.2 ± 2.5	15.3 ± 1.7[a]	9.9 ± 2.5[b]
细胞增殖活性(OD)	0.702 ± 0.048	0.511 ± 0.026[a]	0.409 ± 0.027[a]

a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组比较。

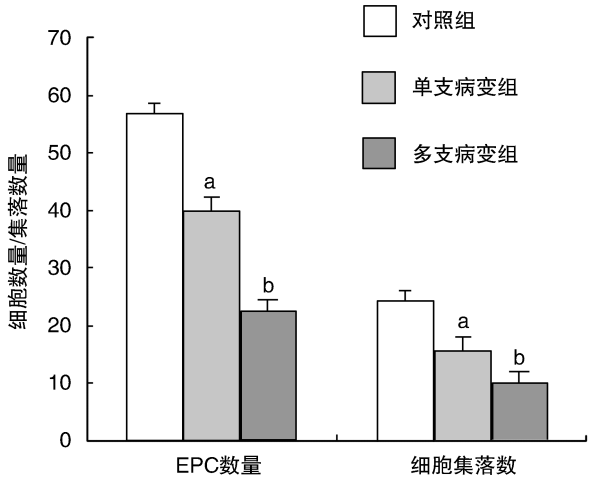

图 2. 不同冠状动脉病变支数患者 EPC 的数量和细胞集落数目比较　a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组比较。

Figure 2. Number and clusters of EPC in CHD patients with different number of diseased vessels

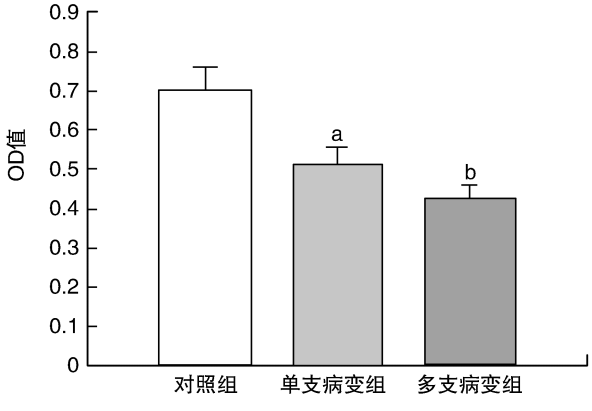

图 3. 不同冠状动脉病变支数患者 EPC 增殖能力　a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组比较。

Figure 3. Proliferative capacity of EPC in CHD patients with different number of diseased vessels

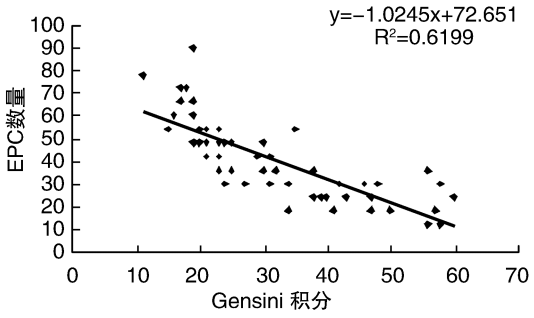

图 4. 不同冠状动脉病变程度冠心病患者 EPC 数量

Figure 4. Number of EPC in CHD patients with different degree of lesion

3　讨　论

内皮祖细胞是一种多能干细胞,能进入到血液循环,增殖并分化为血管内皮细胞,但尚未表达成熟血管内皮细胞的表面特征。EPC 可以分化为成熟内皮细胞,参与出生后血管新生[1,2]和内皮损伤后的修复过程[3,4]。EPC 数量和功能的受损可导致内皮损伤与修复之间动态平衡的破坏,所以 EPC 数量的减少和功能的降低可能与冠状动脉疾病的血管损伤有关[7]。Schmidt Lucke 等[8]研究发现,EPC 对冠状动脉性疾病的内皮修复过程起着重要的作用,其数量减少是预示动脉粥样硬化疾病进展的独立因素。Vasa 等[9]研究发现,CHD 患者循环血中的 EPC 数量下降了近 40%,而且迁移能力受损,并与危险因子的数目呈负相关。本实验发现冠心病患者 EPC 的数量比对照组明显降低,在整个体外细胞培养过程中,由于细胞数量减少导致细胞间的相互促进增殖的作用降低,细胞的集落形成减少,而且集落变小和稀疏,EPC 形状逐渐向梭形细胞分化的能力降低,所以最终导致细胞的增殖和黏附活性也明显降低。

随着冠状动脉病变程度的加重,EPC 水平逐渐降低。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。EPC 数量减少及功能损伤可能导致冠心病患者冠状动脉自身修复能力降低和缺血心肌新生血管减少。在刘燕荣等[10]的研究中,考虑导致冠心病患者 EPC 数量减少的确切机制可能包括通过调节氧化应激水平、冠心病及其危险因素可引起内皮损伤和功能障碍、EPC 凋亡的增加、冠心病的危险因素可能通过影响其他信号转导途径而调节 EPC 的分化和动员。本研究显示多支病变者较单支病变者有降低趋势,EPC 数量随着 CAG Gensini 评分的增加而呈下降趋势。有学者[11]提出循环 EPC 是修复损伤血管的“细胞库”。在正常情

况下内皮损伤和 EPC 修补之间存在动态平衡,维持内膜完整性,而 EPC 数量减少可能影响内皮修复,导致内膜完整性受损,促进动脉粥样硬化发生、发展[8]。EPC 数量越少,动脉粥样硬化的程度越重,EPC 数量和动脉粥样硬化的严重性存在线性关系。Chironi 等[13]发现在颈动脉、主动脉、股动脉部位,动脉粥样硬化越严重,内皮祖细胞的数量越少。Kunz 等[14]研究发现 EPC 数量能独立预测冠状动脉造影显示的病变严重程度。本研究显示 EPC 数量与冠状动脉病变严重程度呈显著负相关关系,推测冠心病患者体内 EPC 不足,可能是冠心病的发病机制之一。

[参考文献]

[1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.

[2] Ichioka S, Kudo S, Shibata M, et al. Bone marrow cell implantation improves flap viability after ischemia reperfusion injury[J]. Ann Plast Surg, 2004, 52(4): 414-418.

[3] Matsuo Y, Imanishi T, Hayashi Y, et al. The effect of senescence of endothelial progenitor cells on in-stent restenosis in patients undergoing coronary stenting[J]. Intern Med, 2006, 45(9): 581-587.

[4] Kong D, Melo LG, Gnecchi M, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk[J]. Circulation, 2004, 110(14): 2 039-046.

[5] Suzuki T, Nishida M, Futami S, et al. Neoendothelialization after peripheral blood stem cell transplantation in humans: a case report of a Tokaimura nuclear accident victim [J]. Cardiovasc Res, 2003, 58(2): 487-492.

[6] Herbrig K, Pistrosch F, Oelschlaegel U, et al. Increased total number but impaired migratory activity and adhesion of endothelial progenitor cells in patients on long-term hemodialysis[J]. Am J Kidney Dis, 2004, 44(5): 840-849.

[7] Geoge J, Herz I, Coldstein E, et al. Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(12): e57-e60.

[8] Schmidt Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predict future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair[J]. Circulation, 2005, 111(22): 2 981-987.

[9] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. Cir Res, 2001, 89(1): E1-E7.

[10] 刘燕荣, 陈君柱, 王兴祥, 等. 冠心病患者外周血内皮祖细胞的数量和功能变化[J]. 浙江大学学报(医学版), 2005, 34(2): 27-29.

[11] Rosenzweig A. Endothelial progenitor cells[J]. N Engl J Med, 2003, 348(6): 581-582.

[12] Dinuneler S, Zeiher AM. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? [J]. J Mol Med, 2004, 82(10): 671-677.

[13] Chironi G, Walch L, Pernollet MG, et al. Decreased number of circulating CD34(+) KDR(+) cells in asymptomatic subjects with preclinical atheroselerosis[J]. Atherosclerosis, 2007, 191(1): 115-120.

[14] Kunz GA, Liang G, Cueuli F, et al. Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity [J]. Am Heart J, 2006, 152(1): 190-195.

(此文编辑　曾学清)