

# 内皮微颗粒与心血管疾病的临床评估

崔丽 综述, 李莹, 李纪明 审校

(同济大学附属东方医院心内科, 上海市 200120)

[关键词] 内皮微颗粒; 内皮功能; 心血管疾病; 临床评估

[摘要] 内皮微颗粒是从激活或者凋亡的内皮细胞表面脱落的无核囊泡样结构, 通过表面蛋白分子介导体内生物过程中的信息传导, 其释放受到体内多种因素的精密调节, 在心血管疾病发生发展过程中起着重要的作用。本文将对内皮微颗粒的结构、功能及其与心血管疾病的关联, 尤其是内皮微颗粒在心血管疾病风险评估、监测和治疗中的临床意义, 并结合目前研究进展做一综述。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Endothelial Microparticles and Clinical Assessment of Cardiovascular Diseases

CUI Li, LI Ying, and LI Ji - Ming

(Department of Cardiology, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China)

[KEY WORDS] Endothelial Microparticles; Endothelial Function; Cardiovascular Diseases; Clinical Assessment

[ABSTRACT] Endothelial microparticles are the vesicles without nucleus shed from the plasma membranes of endothelial cells that are activated or undergoing apoptosis, which is involved in many signal transduction in vivo. The action of endothelial microparticles detaching from the endothelial cell is regulated precisely by a variety factors in vivo, and which play a key role in the occurrence and development of cardiovascular diseases. In this paper the structure, function of the endothelial microparticles and their association with cardiovascular diseases, especially the clinical significance of endothelial microparticles in cardiovascular diseases risk assessment, monitoring and treatment, combined with the current research progress are reviewed.

微颗粒(microparticles, MP)是细胞在激活或凋亡时释放入血的大小为 $0.05 \sim 1.0 \mu\text{m}$ 的微小无核囊泡状结构, 表面表达磷脂酰丝氨酸和多种蛋白分子。根据其来源不同, 可以分为血小板、白细胞、红细胞、内皮细胞来源的微颗粒。内皮微颗粒(endothelial microparticles, EMP)是指内皮细胞来源的微颗粒, 目前普遍认为 EMP 不仅是存在于循环中的内皮细胞脱落的碎片, 而且通过其表面不同蛋白分子与靶细胞相互作用起到信息传递的作用, 参与到许多与循环系统疾病相关的病理生理过程中。

### 1 EMP 的形成和结构

内皮细胞在受到多种细胞因子和补体等刺激

激活或者损伤时, 细胞膜脂质双分子层脂质的非对称分布会被破坏, 胞内钙离子快速上升激活翻转酶导致主要由磷脂酰丝氨酸组成的带负电荷的内层外翻, 发生细胞骨架重构, 从而导致膜出泡和 EMP 的脱落<sup>[1]</sup>。细胞囊泡化是一种细胞骨架的收缩结果, 通过电子扫描显微镜和流式细胞仪监测激活的人类脑微血管内皮细胞, 发现受到刺激以后肌动蛋白在基底膜的重新分配与位于顶部的富含肌动蛋白的颗粒样结构的增多有关, 而这种颗粒样结构的增多又直接与电子显微镜观察到的电子透明膜突起相关, 同时免疫蛋白印迹技术显示细胞骨架蛋白的表达和分布在母代细胞和微颗粒之间有很多区别。提示肌动蛋白可能通过和新形成的肌动蛋白富集的结构相互作用, 在激动剂诱导的内皮

[收稿日期] 2012-11-12

[基金项目] 上海市科委攻关项目(10411968000); 上海市自然科学基金(10ZR1406600); 辉瑞制药有限公司研究者发起基金项目(WS1788785)

[作者简介] 崔丽, 研究生, 研究方向为糖代谢异常与动脉粥样硬化, E-mail 为 licuitongji@sina.com。通讯作者李莹, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究方向为临床电生理、动脉粥样硬化与内皮功能障碍, E-mail 为 yingcnli@gmail.com。

细胞表面突起的形成中,起到一个强烈的促进作用,从而导致微颗粒形成和脱落<sup>[2]</sup>。目前已证实促进 EMP 产生的因素有:剪切力、炎症、毒素、活性氧簇和氧化型低密度脂蛋白等<sup>[3]</sup>,与暴露于健康个体来源的 IgG 相比暴露于抗磷脂抗体综合症患者纯化的 IgG 使人脐静脉内皮细胞产生更多的 EMP,并且这些微颗粒表面含有 E-选择素的比例更高<sup>[4]</sup>。继孙娟等<sup>[5]</sup>采用蛋氨酸灌胃复制高同型半胱氨酸血症模型并证明高浓度同型半胱氨酸可以诱导血管内皮功能障碍并促进微循环障碍和微血栓形成之后, Sekula 等<sup>[6]</sup>以人脐静脉内皮细胞为研究对象提出高同型半胱氨酸血症对于内皮功能的损伤与 EMP 的脱落有关,即 EMP 的脱落可能是血管内皮细胞对高同型半胱氨酸血症的生理反应。EMP 上存在着多样和丰富的生物学效应物质,如膜锚定受体、表面粘附分子,介导细胞间的特定反应与串话。显然,EMP 表面外翻的磷脂酰丝氨酸为凝血酶的组装提供了一个很好连接位点,从而启动凝血级联反应<sup>[5]</sup>。EMP 在形成的过程中胞膜皱缩包裹胞质,因此它们携带大量的细胞因子、趋化因子、酶、生长因子和信号蛋白。近年通过检测 EMP 携带的特定功能的 microRNA 进一步完善了对 EMP 结构的探索, Hunter 等<sup>[7]</sup>发现亲代细胞与微颗粒含有的 microRNA 不全相同,在待测的 420 个 microRNA 中,两者都含有的 microRNA 有 71 个,不同的有 33 个,其中显著差别的有 4 个,研究显示 EMP 携带特定 microRNA 从细胞分离可能与细胞自身保护及血管稳态的改变有关。

2 EMP 的生物学作用

释放入循环的 EMP 可以通过不同的机制对血管产生生物学效应,内皮微颗粒具有促进凝血,扩大炎症反应,导致内皮功能障碍,影响血管新生等作用<sup>[8]</sup>。EMP 在凝血平衡中起到关键作用,可以通过刺激细胞产生细胞因子和其他的炎症介质从而介导细胞间的反应,如 Sabatier 等<sup>[9]</sup>研究显示 EMP 能与单核细胞结合,诱导单核细胞表达组织因子,激活其产生促凝活性。Lacroix 等<sup>[10]</sup>从有血栓性血小板减少性紫癜的患者或心血管疾病的患者以及健康个体血浆中分离出循环微颗粒,用流式细胞仪识别微颗粒上的纤溶酶原激活物同时,用显色底物法定量测定产生纤溶酶原的激活能力以及明胶酶谱法测定纤溶活性。结果显示内皮和白细胞微颗粒分别具有组织纤溶酶原激活剂和尿激酶纤溶酶

原激活剂的作用,在病理状态调节一部分循环的纤溶活性。EMP 还在一定程度上导致了内皮功能的障碍,从急性心肌梗死、肾病或代谢综合征患者以及肺动脉高压鼠循环中分离的 EMP 能损伤体外培养的动脉内皮依赖的血管舒张作用,而来自于健康个体的 EMP 无此作用<sup>[11-13]</sup>,微颗粒通过烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(NADPH)和线粒体衍生的活性氧簇(ROS)促进内皮衰老。这种氧化还原敏感过程可能在老化产生的血管功能障碍中起重要作用<sup>[14]</sup>。证实 EMP 上有 annexin I 表达,并且内皮细胞上存在相应的受体磷脂酰丝氨酸受体。EMP 与内皮细胞以一个 annexin I/磷脂酰丝氨酸受体依赖的方式结合,保护靶细胞对抗凋亡。EMP 诱导的对抗凋亡的活性可能涉及抑制 p38 活性<sup>[15]</sup>。最近有研究证明循环中的内皮微颗粒可以影响血管新生,Mezentsev 等证实 EMP 减少内皮细胞的增殖和新生血管的生成,而 Lacroix 和 Taraboletti 等证实低剂量的 EMP 促进内皮细胞毛细血管样结构的生成,而高剂量的 EMP 则抑制新生血管的生成<sup>[16,17]</sup>。由此可见,EMP 对于血管新生存在不确定性,其具体的调节机制有待进一步研究求证。

3 EMP 的检测及意义

EMP 表面除了带有负电荷的磷脂部分还有各种蛋白分子,目前国内外对于 EMP 的细胞蛋白分子表型都进行了大量的研究<sup>[18]</sup>。研究显示 EMP 表面存在 CD31(血小板-内皮细胞粘附分子),CD144(上皮型钙粘附分子),CD105(细胞膜糖蛋白),CD54(细胞间粘附分子-1),CD62E(E-选择素),CD146(黑色素瘤粘附分子),但缺乏 CD41(血小板糖蛋白)或 CD42(血小板糖蛋白)<sup>[11]</sup>特定的 CD 组合可用于流式细胞术检测不同标记的 EMP 的水平,诸多研究证明 EMP 与心血管疾病涉及到的不同的病理生理机制有关,主要机制都涉及内皮功能障碍。

内皮微颗粒含有一些亲代细胞蛋白的子集,在某些疾病血中内皮微颗粒的数量增加,对于临床诊断它们可能是一个更有吸引力的生物标志。有实验通过创建一个 TNF-α 激活内皮细胞的体外模型,并对 EMP 蛋白组学分析通过质谱法进行检测,研究其内容物的改变,对于分析内皮微颗粒的动态分泌过程提供有价值的信息<sup>[19]</sup>。

目前临床体内检测内皮功能的指标主要有以下几种:FMD(肱动脉血流介导的舒张),PWV(脉搏波速度),CAAI(颈动脉增强指数),IMT(颈动脉

内膜中膜厚度)。通过以上指标与 EMP 之间的关系间接反映 EMP 与内皮功能障碍之间的关系。FMD 是一种可操作的非侵入性检测血管内皮障碍的方法,FMD 的下降反映了内皮功能障碍。一项研究表明在 44 个终末期肾衰患者,EMP 的水平与 FMD 下降程度高度相关( $r = -0.54, P = 0.004$ )<sup>[11]</sup>。PWV 是评价动脉僵硬程度的一个指标,动脉弹性下降, PWV 升高。快速的脉搏波带来的剪切力扰乱内皮环境并会导致循环中 EMP 的增加,在上面提到的终末期肾病患者,EMP 与增加的 PWV 显著相关<sup>[11]</sup>。在另一个高血压患者与正常对照组患者比较的实验中,踝臂 PWV 和内皮微颗粒呈正相关( $r = 0.46$ )<sup>[20]</sup>,在未控制的高血压患者 PWV 和 EMP 均最高,血压控制良好的患者仅 EMP 轻度高于正常血压者。CAAI 是间接测量动脉僵硬指数的指标,有研究显示内皮微颗粒与 CAAI 正相关( $r = 0.46, P = 0.002$ )<sup>[11]</sup>。有研究证明内皮微颗粒水平与颈动脉内膜厚度没有相关性,但是和 IMT 与颈动脉管腔比值中度相关( $r = 0.16, P < 0.05$ )<sup>[21]</sup>。以上证据证明 EMP 与内皮功能障碍之间有良好的相关性,同时为 EMP 成为新的临床检测内皮功能的成熟指标提供支持。

#### 4 EMP 与心血管疾病

大量的临床研究证明,EMP 与心血管事件的发生相关,在一个不同程度的 CHD 患者与对照组的 EMP 的横断面比较研究中,EMP 水平在心肌梗死患者中最高,不稳定型心绞痛其次,稳定型心绞痛最低<sup>[22]</sup>。迄今为止,对于 EMP 在 CVD 中的作用最有说服力的证据来自于关于 EMP 水平与 CVD 事件的相关性的前瞻性队列研究,经过 3~6 年的随访,CVD(包括中风和猝死)患者循环中有更高的 EMP 的水平。最近一项国内的临床研究显示与稳定型心绞痛组患者相比,急性冠状动脉综合征组患者外周血中 CD144<sup>+</sup>/annexin V<sup>+</sup> 微颗粒显著增多,表明来源于血管内皮细胞的凋亡微颗粒明显增加,侧面反映急性冠脉综合征患者的内皮细胞的凋亡增加<sup>[23]</sup>。最近越来越多的研究证明 EMP 与 CVD 的包括高血压,糖尿病等在内的风险因素相关<sup>[24-26]</sup>。在一项针对 200 例稳定型 CHD 患者的研究中,每加入一个经典风险因素,C 统计显示 EMP 水平从 0.64 增加到 0.70<sup>[25]</sup>。一项 83 人的研究中,将入组病人分为正常血压组,未控制高血压组,和较好控制血压组,三组平均血压为 121/74 mmHg, 152/89 mm-

Hg, 127/78 mmHg 未控制血压组释放的 EMP 是正常组的两倍<sup>[27]</sup>,而控制良好组居于两者之间。但是也有一些研究显示 EMP 水平与高血压并没有相关。多项研究显示糖尿病患者比非糖尿病患者有更高的 EMP 水平<sup>[24, 28]</sup>。一项日本开展的 334 人的研究中,包括 232 个糖尿病患者与 102 个非糖尿病患者,糖尿病患者的 EMP 水平是非糖尿病者的两倍<sup>[28]</sup>。EMP 的水平与糖尿病的并发症相关。例如,伴有冠状动脉疾病的糖尿病患者比没有冠状动脉疾病的糖尿病患者有更高的 EMP 水平<sup>[28]</sup>。虽然大量证据证明 EMP 和糖尿病中的大血管并发症可能有关,但是 EMP 与小血管并发症之间可能并没有这样的相关性,在一项韩国开展的 89 人的研究中,入组病人为至少有一项血管并发症者,结果显示 EMP 与大血管并发症相关(调整的 OR 值为 8.0[95% CI 1.4-47])但是与小血管并发症之间没有相关(调整的 OR 值为 0.8[95% CI 0.12-5.7])<sup>[29]</sup>。向红等<sup>[30]</sup>选取高血压合并糖尿病患者 50 例(HP+DM 组),单纯高血压患者 46 例(HP 组),单纯糖尿病患者 48 例(DM 组)以及健康志愿者 50 例(NT 组),检测采用流式细胞术检测受试者血浆中 CD31<sup>+</sup>/CD42<sup>-</sup> EMP 的水平,结果显示与 HP、DM 及 NT 组相比,HP+DM 组的内皮微颗粒水平显著升高,DM 组的内皮微颗粒水平比 HP 组显著升高。心血管疾病及其主要风险因素一般是以动脉粥样硬化或者内皮功能障碍为病理基础,EMP 通过上面提到的各种对血管产生的生物学效应使其可能成为 CVD 的发病机制及转归中的影响因素,而不仅仅是一种风险增加的标志,从而从一个新的层面反映导致 CVD 的原因,目前 EMP 在心血管疾病发生发展过程中的分子机制与临床应用研究尚有待于进一步研究。

#### 5 EMP 临床应用的限制

目前关于 EMP 临床应用的主要限制是如何定义和检测 EMP? 定义 EMP 的标准表面分子标志组合,制订检测 EMP 的标准流程和分析其数据变量的标准方法等问题在全球成为研究热点,最近国际血栓和止血协会对以上过程的标准化做出了巨大的努力;另一个主要限制是目前大部分的证据源自于横断面研究,前瞻性研究数据较少<sup>[31]</sup>;其他限制包括有哪些因素能影响体内 EMP 短期或长期改变以及 EMP 随采集时间长短的波动程度等。最后,EMP 的研究在一些关键性问题上尚存在一些数据冲突。例如,一些研究显示 EMP 和血压有关,而另一部分



研究则显示无关,然而大部分实验是通过高血压分层而不是与实际的血压相关,是否这些数据冲突源于方法学的不同仍不清楚,因此血压和 EMP 之间的关系还需要进一步的阐明<sup>[17]</sup>。目前 EMP 的研究还处于早期阶段,大量证据显示 EMP 将可能应用于许多领域的临床应用中,并可能成为评价所有血管健康的一个非常有用的分子标志。

## 6 结 语

内皮是所有心血管疾病风险因素与心血管事件的最终共同途径,EMP 可能成为一个用来整体评价心血管系统的状况的生物标志。就其本身而论,EMP 在心血管疾病初级预防的风险评估中是非常有用的,特别是那些处于中度风险的。有证据证明在已知心血管疾病的患者中 EMP 对于复发高风险个体的确定更有价值,从而提高他们二级预防的效果。如果对于心血管风险因素的治疗,EMP 呈现敏感的下降趋势,它们可能在监测治疗方面也非常有用。最后如果 EMP 和心血管疾病有因果关系,它们可能会是新的治疗靶点。

### 【参考文献】

- [1] Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, et al. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(7): 399-406.
- [2] Latham S L, Chaponnier C, Dugina V, et al. Cooperation between beta- and gamma-cytoplasmic actins in the mechanical regulation of endothelial microparticle formation [J]. *FASEB J*, 2013, 27(2): 672-683.
- [3] Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, et al. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? [J]. *Eur J Clin Invest*, 2004, 34(6): 392-401.
- [4] Pericleous C, Clarke LA, Brogan PA, et al. Endothelial microparticle release is stimulated in vitro by purified IgG from patients with the antiphospholipid syndrome [J]. *Thromb Haemost*, 2013, 109(1): 72-78.
- [5] 孙娟,谭红梅,程超,等. 高同型半胱氨酸诱导血管内皮功能障碍促进微循环障碍和微血栓形成[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(12): 2336-340.
- [6] Sekula M, Janawa G, Stankiewicz E, et al. Endothelial microparticle formation in moderate concentrations of homocysteine and methionine in vitro[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2011, 16(1): 69-78.
- [7] Hunter M P, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles

- [J]. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3694.
- [8] 夏金盈,华奇峰,李莹. 内皮微颗粒与冠心病[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, (2): 160-164.
- [9] Sabatier F, Roux V, Anfosso F, et al. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity [J]. *Blood*, 2002, 99(11): 3962-970.
- [10] Lacroix R, Plawinski L, Robert S, et al. Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis [J]. *Haematologica*, 2012, 97(12): 1864-872.
- [11] Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimi T, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction[J]. *Circulation*, 2001, 104(22): 2649-652.
- [12] Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(11): 3381-388.
- [13] Tual-Chalot S, Guibert C, Muller B, et al. Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182(2): 261-268.
- [14] Burger D, Kwart DG, Montezano AC, et al. Microparticles induce cell cycle arrest through redox-sensitive processes in endothelial cells: implications in vascular senescence[J]. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(3): e1842.
- [15] Jansen F, Yang X, Hoyer FF, et al. Endothelial microparticle uptake in target cells is annexin I/phosphatidylserine receptor dependent and prevents apoptosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(8): 1925-935.
- [16] Mezentsev A, Merks RM, O'Riordan E, et al. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(3): H1106-114.
- [17] Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro[J]. *Blood*, 2007, 110(7): 2432-439.
- [18] Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles[J]. *J Thromb Haemost*, 2004, 2(10): 1842-851.
- [19] Liu Y, Huang W, Zhang R, et al. Proteomic analysis of TNF-alpha-activated endothelial cells and endothelial microparticles[J]. *Mol Med Rep*, 2012 [Epub ahead of print].
- [20] Wang J M, Su C, Wang Y, et al. Elevated circulating endothelial microparticles and brachial-ankle pulse wave

- velocity in well-controlled hypertensive patients [J]. *J Hum Hypertens*, 2009, 23(5): 307-315.
- [21] Chironi GN, Simon A, Boulanger CM, et al. Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling[J]. *J Hypertens*, 2010, 28(4): 789-796.
- [22] Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes[J]. *Am Heart J*, 2003, 145(6): 962-970.
- [23] 李莹, 夏金盈, 陆英, 等. 冠状动脉性心脏病患者外周血中 CD144 ~ +/Annexin V ~ + 内皮微颗粒水平的变化[J]. *上海医学*, 2012, (1): 53-57.
- [24] Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, et al. Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(7): 601-608.
- [25] Sinning JM, Losch J, Walenta K, et al. Circulating CD31 +/Annexin V + microparticles correlate with cardiovascular outcomes [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(16): 2034-041.
- [26] Amabile N, Guerin A P, Tedgui A, et al. Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(5): 1873-880.
- [27] Wang J M, Su C, Wang Y, et al. Elevated circulating endothelial microparticles and brachial-ankle pulse wave velocity in well-controlled hypertensive patients [J]. *J Hum Hypertens*, 2009, 23(5): 307-315.
- [28] 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(10): 1622-630.
- [29] Jung KH, Chu K, Lee ST, et al. Risk of macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus: endothelial microparticle profiles[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2011, 31(5): 485-493.
- [30] 向红, 黄榕, 周亚丽. 高血压与糖尿病对动脉弹性指数及循环内皮微颗粒影响的对比研究[J]. *南方医科大学学报*, 2010(10): 2387-389.
- [31] Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol[J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(3): 437-446.

(此文编辑 李小玲)