

冠心病患者内皮祖细胞 tPA 和 PAI 表达的变化

方叶青^{1,2}, 谢秀梅², 谢陪益¹, 苏又苏¹, 方红城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. 中南大学湘雅医院心血管内科, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 内皮祖细胞; 冠心病; 细胞数量; 组织型纤溶酶原激活剂; 纤溶酶原激活物抑制物

[摘要] **目的** 探讨冠心病患者外周血中内皮祖细胞(EPC)的变化及其组织型纤溶酶原激活物(tPA)和纤溶酶原激活剂抑制物(PAI)的表达。**方法** 选择冠心病患者 57 例和对照组 30 例,提取内皮祖细胞进行数量和细胞集落的比较。利用 ELISA 法和底物发光法检测 EPC 分泌 tPA 和 PAI 的浓度和活性;用 RT-PCR 法检测 EPC 的 tPA 和 PAI mRNA 表达。**结果** 冠心病患者 EPC 数量较对照组明显减少(23.1 ± 1.8 比 56.7 ± 2.4 , $P < 0.05$),形成细胞集落数(14.7 ± 2.5 比 24.2 ± 1.7 , $P < 0.05$)、细胞增殖能力也明显降低,冠心病患者 EPC 的 tPA 表达较对照组下降,PAI 表达增强。**结论** 冠心病患者外周血 EPC 数量减少和功能障碍可能在疾病的发生发展中起作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Research of Endothelial Progenitor Cells from Prepheral Blood in Patients with Coronary Heart Diseases

FANG Ye-Qing^{1,2}, XIE Xiu-Mei², XIE Pei-Yi¹, SU You-Su¹, and FANG Hong-Cheng¹

(1. Cardiovascular Department, Shenzhen Nanshan Hospital Affiliated to Guangdong Medical College, Shenzhen, Guangdong 518000, China; 2. Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cells; Coronary Heart Disease; Tissue - type Plasminogen Activator(tPA); Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)

[ABSTRACT] **Aim** To study the change of EPC and expression of its tPA and PAI in patients with coronary heart disease. **Methods** EPC isolated from peripheral blood of patients with coronary heart diseases ($n = 57$) and control ($n = 30$) were cultured and tPA and PAI in the supernatant were determined by ELISA and Substrate chemiluminescence. The expression of tPA mRNA and PAI mRNA were detected by RT-PCR. **Results** The number of EPC was significantly reduced in patients with CAD compared with control subjects. The cell colony forming was also decreased in patients with CAD. The concentration and activity of EPC patients with CAD were lower than EPC of control group. The tPA mRNA expression, the concentration and activity of EPC had degression tendency in patients with coronary heart diseases, and PAI displayed opposite tendency. **Conclusion** The number of EPC were decreased and their function were impaired in patients with CAD, which may play an important role in the initiation and progression of CAD.

内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)是一种起源于骨髓的原始细胞^[1],在一定条件下可定向化为成熟的内皮细胞,不仅参与胚胎血管生成,还参与出生后的血管发生过程,还参与出生后的血管发生过程,减轻血管修复时内膜的增厚,在血管新生和维持内皮功能的完整性方面起重要作用。内皮受损,以及凝血纤溶系统的变化在动脉粥样硬化的发生发展中起重要作用,有研究表明冠心

病患者 EPC 减少,但是冠心病患者的 EPC 纤溶系统的变化研究甚少,本文就此进行探讨。

1 资料与方法

1.1 对象和标本

选择我院心内科 2006 年 5 月-2007 年 1 月的住院患者,临床表现及心电图变化符合 1979 年国际心

[收稿日期] 2013-03-07

[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),2012 年深圳市科技局项目(2012195)和 2011 年深圳市南山区科技局项目(2011011)

[作者简介] 方叶青,博士研究生,副教授,研究方向为心血管疾病的干细胞治疗,E-mail 为 fangyeqing2005@163.com。通讯作者方红城,主任医师,研究方向为冠心病的介入治疗,E-mail 为 fangyeqing2005@163.com。

脏病协会及 WHO 冠心病的诊断标准,依照冠状动脉造影证实冠状动脉左前降支(LAD)、左回旋支(LCX)、右冠状动脉(RCA)中任何一支 $\geq 75\%$ 均为冠状动脉病变。筛选共 57 例纳入研究,其中男 41 例,女 16 例。另选择冠脉造影阴性的对照组 30 例,其中男 19 例,女 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 小时内处理标本。所有采血者均排除术前服用他汀类药物、血管紧张素转换酶抑制剂、管紧张素 II 受体阻滞剂、阿司匹林、抗氧化剂、调脂药物等;排除下列疾病:血小板减少症、贫血、肿瘤、感染性疾病、皮肤溃疡、肝肾功能不全、严重外周血管疾病史;合并先天性心脏病;合并瓣膜性心脏病史;排除心功能不全($EF < 45\%$)等其他心脏疾患、既往有心肌梗死病史;既往曾接受过冠状动脉介入治疗或冠状动脉旁路手术治疗史、近期无其他手术史。

1.2 仪器与试剂

生长因子 VEGF165 为 pepro Tech EC 公司产品,bFGF 为 BD Bioscience 公司产品, FITC-CD34、PE-KDR、UEA-1、DiI-LDL 为 R&D 公司, Trizol 为 MIC 公司产品。

1.3 EPC 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 2×10^6 浓度接种在已用 200 $\mu\text{g/L}$ 纤维连接蛋白包被 4 h 的 6 孔板。并加以血管内皮生长因子 165 (VEGF165) 0 $\mu\text{g/L}$ 和 bFGF 20 $\mu\text{g/L}$ 的 1640 培养基培养细胞 4 天,用 Hank's 洗去未贴壁细胞,贴壁细胞进行细胞分析。

1.4 EPC 的鉴定

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

1.5 EPC 的细胞增殖能力观察

将 EPC 培养 7 天后,消化贴壁细胞,以 4×10^4 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 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 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

以 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,用 M-MLV 逆转

录酶(MBI)将提出的 RNA 逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应.引物通过斯坦福大学在线引物设计软件设计,tPA 引物序列为上游 5'-GAAGAGAGGGCTCTGCTGTG-3',下游 5'-GAGAAG-TACAGGGCCTGCTG-3',引物全长 299 bp;PAI 引物序列为上游 5'-CAGACCAAGAGCCTCTCCAC-3',下游 5'-ATCACTTGGCCCCATGAAAAG-3',引物全长 202 bp;内参 GAPDH 上游 5'-TCCCATCACCATC-TRCCA-3',下游 5'-CCTGCTRCACCA CCTTCT TG-3',引物全长 587 bp。PCR 反应条件:95℃,预变性 1 min 后,95℃变性 30 s \rightarrow 60℃退火 30 s \rightarrow 68℃延伸 90 s \rightarrow 68℃,终末延伸 10 min,tPA、PAI 和 GAPDH 均为 25 个循环。

1.7 tPA 和 PAI 的检测

使用 ELISA 法检测组织型纤溶酶原激活物(tPA)和纤溶酶原激活物抑制剂(PAI)的含量,用底物发光法监测 tPA 和 PAI 的活性。

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,方差不齐时先进行数据转换,组间用比较单因素方差分析,相关性分析采用双变量分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组临床资料的比较

将对照组和冠心病患者的各项情况进行比较,冠心病患者的吸烟人数和高血压患者的数量和比例均较对照组高,血脂单项比较中,TC、TG、和 LDL 与对照组比较均升高,差异有显著性($P < 0.05$;表 1)。

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,为细胞集落较小而分散(图 1A1 和 B1)。将冠心病患者和对照组的 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,具有显著差异性($P < 0.05$;表 2 和图 1A2 和 B2)。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 acLDL-DiI 和 UEA-I 对细胞染色后,通过共聚焦显微镜鉴定,acLDL-DiI 和 UEA-I 双染色阳性细胞被认为是正在分化的 EPC(图 1A3),冠心病患者的外周血的双染色阳性细胞较对照组明显降低(图 1B3)。

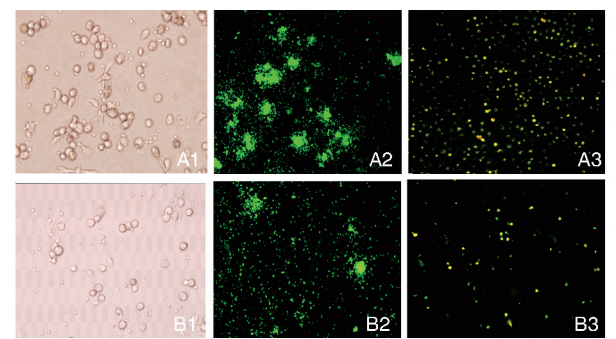


图 1. 冠心病患者与对照组细胞形态比较 上图为对照组, 下图为冠心病组。A1、B1 为培养 7 天后的 EPC(×40); A2、B2 为细胞集落(×10); A3、B3 为荧光双染色双阳性细胞(×40)。

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

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

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

项 目	对照组(<i>n</i> = 30)	冠心病组(<i>n</i> = 57)
年龄(岁)	62.1 ± 7.6	64.3 ± 8.2
女性(例)	11	16
吸烟者(例)	9(30%)	24(42%) ^a
吸烟数量(支/日)	11.31 ± 5.1	18.25 ± 3.4
高血压(例)	6(20%)	22(39%) ^a
收缩压(mmHg)	133 ± 21.2	143.7 ± 25.22 ^a
舒张压(mmHg)	80.25 ± 13.5	87.01 ± 18.16 ^a
脉压差(mmHg)	50.28 ± 16.12	58.21 ± 5.6 ^a
糖尿病(例)	3(10%)	9(16%)
空腹血糖(mmol/L)	4.5 ± 1.23	5.18 ± 1.76
总胆固醇(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。

表 2. 两组细胞数目和细胞集落数目比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Numer and clusters of EPC for patients with CAD and control subject($\bar{x} \pm s$)

指 标	冠心病组	对照组
细胞数目	23.1 ± 1.8 ^a	56.7 ± 2.4
细胞集落数目	14.7 ± 2.5 ^a	24.2 ± 1.7

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.3 EPC 的增殖活性比较

将分离获得的 EPC 培养 7 天后,消化贴壁细

胞,两组均以 4×10^4 密度接种在 96 孔板,利用 MTT 检测细胞的增殖性,发现对照组细胞的增殖呈现明显的上升趋势,检测第从第 1 天到第 5 天(相当于第 8 ~ 12 天)细胞的 OD 值都是呈逐渐上升的趋势,特别是在第 6 天(相当于第 13 天的细胞)的 EPC 可以出现明显得对数增长期,显示正常外周血 EPC 具有良好的细胞增殖活性。但冠心病患者 EPC 增殖活性明显低下,没有明显的对数增长期(图 2)。

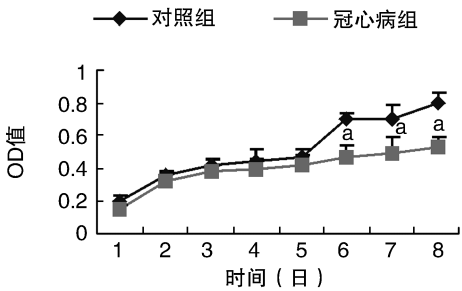


图 2. 冠心病组与对照组生长曲线比较 a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 2. The comparison of growth curve in CAD and control subjects

2.4 tPA 和 PAI 含量的变化

将 EPC 培养 7 天后的上清液用 ELISA 法测定 tPA 和 PAI 的含量,发现与对照组比较,冠心病患者的 tPA 含量明显下降,具有统计学意义 $P < 0.05$,而 PAI 含量明显升高,差异具有显著性($P < 0.01$;表 3)。

2.5 tPA 和 PAI 活性的变化

将 EPC 培养 7 天后的上清液用底物发光法测定 tPA 和 PAI 的活性,发现与对照组比较,冠心病患者的 tPA 活性明显下降($P < 0.01$),而 PAI 活性明显升高,差异具有显著性($P < 0.05$;表 3)。

表 3. 冠心病患者外周血清中 tPA 和 PAI 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3. The contents of tPA and PAI in CAD and control subjects ($\bar{x} \pm s$)

指 标	对照组(<i>n</i> = 30)	冠心病组(<i>n</i> = 57)
tPA 含量($\mu\text{g/L}$)	12.27 ± 3.5	9.87 ± 1.5 ^a
PAI 含量($\mu\text{g/L}$)	35.24 ± 5.71	41.29 ± 4.28 ^a
tPA 活性(kIU/L)	0.41 ± 0.11	0.19 ± 0.07 ^b
PAI 活性(kAU/L)	0.73 ± 0.16	1.27 ± 0.34 ^a

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

2.6 tPA 和 PAI 表达

将外周血的 EPC 在体外培养 7 ~ 14 天后,提取

mRNA,用 RT-PCR 法检测 tPA 和 PAI 基因表达,结果发现与对照组比较,冠心病患者 tPA 表达减弱,PAI 的表达增强(图 3)。

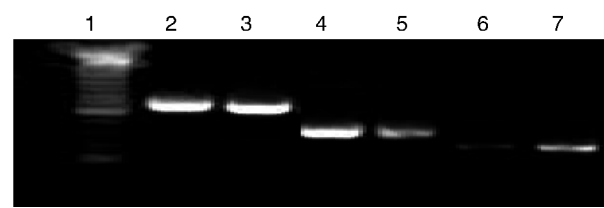


图 3. 冠心病组与对照组 tPA 和 PAI 表达 1 为 Marker,2 为对照组 GAPDH,3 为冠心病组 GAPDH,4 为对照组 tPA,5 为冠心病组 tPA,6 为对照组 PAI,7 为冠心病组 PAI。

Figure 3. The expression of tPA mRNA and PAI mRNA in EPC with CAD and control subjects

3 讨 论

EPC 可以分化为成熟内皮细胞参与出生后血管新生和内皮损伤后的修复过程^[14],参与缺血组织血管新生,减轻血管修复时内膜的增厚,在血管新生和维持内皮功能的完整性有重要作用。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^[5]。本研究发现与他人和我们的前期研究一致,冠心病患者的 EPC 数量和活性较正常人比较明显下降,表现为不仅是细胞数量的减少,同时还有细胞形态的改变、细胞形成集落的能力降低以及 EPC 的增殖能力的低下等^[6-7]。

tPA 和 PAI 是一对重要的血浆纤溶平衡调节因子,tPA 是纤维蛋白溶解系统的重要组成部分,由血管内皮细胞分泌,能够转化纤溶酶原成为具有催化作用的纤溶酶,PAI 的主要功能是阻止 tPA 激活纤溶酶原,局部的纤溶系统平衡取决于局部 tPA 和 PAI 的浓度,tPA 和 PAI 能够在体内以 1:1 的比例形成稳定的复合物,从而维持纤溶系统平衡^[8]。

我们进行了冠心病患者的纤溶指标 tPA 和 PAI 的检测,发现与对照组比较,不仅是冠心病患者的 EPC 的 mRNA 中 tPA 的表达明显降低和 PAI 表达明显增强,而且 EPC 分泌 tPA 的作用明显减弱,至 tPA 的浓度和活性均降低,相应的出现 PAI 的浓度和活性增高,整体表现为纤溶系统的活性降低。在我们的研究中发现 EPC 能产生组织型纤溶酶原激活剂,但是由于冠心病患者 EPC 的数量和活性下降可能出现 tPA 分泌减少,PAI 水平升高^[9],这和 Shi-

rota 等^[10]的研究相类似。PAI 是体内最重要的纤溶活性调节剂,维持着纤溶平衡,PAI 通过阻止纤溶酶形成及细胞外基质的降解,调节平滑肌细胞增殖和迁移,PAI 异常表达所致的细胞表面纤溶活性降低可引起或加重血栓形成^[11]。本研究表明,冠心病患者不仅存在 EPC 数量的减少,还存在着 EPC 的纤溶功能受损,这直接导致了患者体内纤溶活性增加,血液的高凝状态,可能导致心梗的发生。但冠心病患者 EPC 的纤溶功能低下的具体机制还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Werner N, Nickenig G. Clinical and therapeutical implications of EPC biology in Atherosclerosis[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10 (2): 318-332.

[2] Frana CN, Pinheiro LF, Izar MC, et al. Endothelial Progenitor Cell Mobilization and Platelet Microparticle Release Are Influenced by Clopidogrel Plasma Levels in Stable Coronary Heart Disease[J]. Circ J, 2012, 76(3): 729-736.

[3] Schwarz TM, Leicht SF, Radic T, et al. Vascular Incorporation of Endothelial Colony-Forming Cells Is Essential for Functional Recovery of Murine Ischemic Tissue Following Cell Therapy[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 22 (2): e13-21.

[4] Shi B, Liu ZJ, Zhao RZ, et al. Effect of mesenchymal stem cells on cardiac function and restenosis of injured artery after myocardial infarction[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2011, 91 (32): 2 269-273.

[5] George 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- 60.

[6] 方叶青, 张松荣, 方红城, 等. EPC 的变化与冠心病危险因素相关性的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(1): 37-41.

[7] 方叶青, 张松荣, 方红城, 等. 冠心病患者内皮祖细胞变化与冠脉病变相关性的研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(3): 215-218.

[8] Siren V, Kauhanen P, Carpen O, et al. Urokinase, tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 expression in severely stenosed and occluded vein grafts with thrombosis [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2003, 14(4): 369-377.

[9] 李明, 王越晖, 林 杉, 等. 冠心病患者肿瘤坏死因子-α 和组织纤溶酶原激活物抑制剂-1 的相关性研究[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(4): 714-715.

[10] Shirota T, Yasui H, Shimokawa H, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration[J]. Biomaterials, 2003, 24(13): 2 295- 302.

[11] 刘 慧, 高传玉, 李海剑, 等. 氯沙坦对兔腹主动脉内皮损伤后过氧化物酶体增殖物激活受体-α 与纤溶酶原激活物抑制因子-1 表达的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2010, 45(2): 293-295.