

不同剂量阿托伐他汀对稳定型心绞痛患者循环血中内皮祖细胞的影响

苗莉¹, 罗先润¹, 高爱社², 魏娜¹, 张辉¹, 娄云霄¹, 刘安丰¹

(1. 武警河南总队医院心内科, 河南省郑州市 450052; 2. 河南中医学院病生教研室, 河南省郑州市 450008)

[关键词] 内皮祖细胞; 稳定型心绞痛; 阿托伐他汀

[摘要] **目的** 观察不同剂量的阿托伐他汀对稳定型心绞痛患者循环血中内皮祖细胞数量的影响。**方法** 选取稳定型心绞痛患者 84 例, 分别给予不同剂量的阿托伐他汀 10 mg/d、20 mg/d、40 mg/d 或 80 mg/d 治疗共 4 周。用免疫荧光法检测各组患者用药前后循环血中内皮祖细胞的数量。**结果** 不同剂量的阿托伐他汀应用后内皮祖细胞的数量均较用药前显著性增加 ($P < 0.05$), 并且内皮祖细胞的数量在 40 mg/d 组最高, 与 10 mg/d 及 20 mg/d 组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 80 mg/d 组较 40 mg/d 组略有下降, 但无统计学差异 ($P > 0.05$)。**结论** 阿托伐他汀具有剂量依赖性地促进冠心病患者循环血中内皮祖细胞数量增加的作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Dose-dependent Atorvastatin on the Numbers of Endothelial Progenitor Cells in Patients with Stable Coronary Heart Disease

MIAO Li, LUO Xian-Run, GAO Ai-She, WEI Na, ZHANG Hui, LOU Yun-Xiao, and LIU An-Feng

(Department of Cardiology, Armed Police Hospital of Henan, Zhengzhou, Henan 450052, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cell; Stable Angina; Atorvastatin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of dose-dependent atorvastatin on the numbers of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary heart disease. **Methods** 84 patients with stable coronary heart disease were randomly divided into treatment groups with atorvastatin (10, 20, 40, 80 mg/d) for 4 weeks. Circulating endothelial progenitor cells numbers were determined by immunofluorescence analysis. **Results** The numbers of endothelial progenitor cells were all increased by different dose atorvastatin ($P < 0.05$), maximum at 40 mg/d and had statistical difference compared with 10 mg/d and 20 mg/d ($P < 0.05$). Endothelial progenitor cells numbers at the dose of 80 mg/d were slightly reduced compared with 40 mg/d, but there was no statistical difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Atorvastatin dose-dependently improve the endothelial progenitor cells numbers in the patients with stable coronary heart disease.

大量研究证实, 内皮功能障碍与冠心病的发生发展密切相关。目前研究聚焦发现, 羟甲基戊二酰辅酶 A (hydroxy methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶抑制剂——他汀类降脂药除显著的降脂作用外, 还具有改善内皮功能、促进内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 的增殖分化、迁移并延缓其衰老和凋亡的作用, 从而促进损伤内皮修复、稳定动脉粥样硬化斑块、减少心血管事件的发

生^[1-2]。但不同研究中所用他汀剂量差别很大, 不同剂量的他汀除了降脂作用差异外, 并且可呈剂量依赖性地改善血管内皮功能^[3], 但是在临床患者中不同剂量的他汀对循环血中 EPC 的具体影响鲜有报道。故本试验以稳定型冠心病患者为研究对象, 应用不同剂量的阿托伐他汀治疗, 观察其对患者外周血中 EPC 数量的影响。

[收稿日期] 2014-12-29

[修回日期] 2015-06-11

[作者简介] 苗莉, 博士研究生, 副主任医师, 研究方向为冠状动脉介入术后支架内再狭窄的防治, E-mail 为 miaoliwhd@163.com。罗先润, 博士研究生, 主任医师, 研究方向为冠心病的介入治疗。高爱社, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中医药防治心血管疾病的机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2009年9月至2011年2月在本院心内科住院确诊的稳定型心绞痛患者,年龄40~65岁,共84例,诊断标准为心绞痛反复发作的临床表现持续在1个月以上,而且心绞痛发作的性质基本稳定,如每周和每日疼痛发作次数大致相同、诱发疼痛的劳累和情绪激动程度相同、每次发作疼痛的性质和疼痛的部位无改变、疼痛时限相仿(3~5 min)、用硝酸甘油后也在相近的时间内产生疗效。患者均行256排极速CT显示至少有一支血管狭窄>70%。排除标准:合并炎症疾病或恶性肿瘤,左心室射血分数<50%,合并心房颤动或其他瓣膜病,有心力衰竭临床

证据,急性脑血管病(1个月内),严重的肝脏疾病、肾功能不全、有不稳定型心绞痛证据(符合Braunwald分级II或III级),3个月之内曾服用他汀类药物治疗。将患者随机分为4组,每组21例,分别给予阿托伐他汀(立普妥,辉瑞公司)10 mg/d、20 mg/d、40 mg/d或80 mg/d,均持续治疗4周。本研究经武警河南总队医院伦理委员会批准,所有受试者均了解本研究的目的并签署知情同意书。以上患者均根据自身血压、血糖情况加以控制血压及控制血糖治疗,四组患者在年龄、性别、既往疾病、合并用药、冠状动脉病变支数等方面差异无统计学意义,具有可比性(表1);四组患者中的高血压分级差异无显著性(表2)。

表 1. 不同剂量阿托伐他汀组患者临床资料比较

Table 1. Comparison of clinical data in different doses of atorvastatin group

| 临床资料 | 10 mg/d 组 | 20 mg/d 组 | 40 mg/d 组 | 80 mg/d 组 |
|----------------|------------|------------|------------|------------|
| 年龄(岁) | 54.2 ± 6.9 | 56.2 ± 7.2 | 55.6 ± 7.7 | 53.9 ± 8.3 |
| 男性(例) | 16(76.2%) | 15(71.4%) | 15(71.4%) | 16(76.2%) |
| 吸烟(例) | 13(61.9%) | 12(57.1%) | 13(61.9%) | 14(66.6%) |
| 高血压病史(例) | 14(66.6%) | 14(66.6%) | 13(61.9%) | 13(61.9%) |
| 糖尿病史(例) | 10(47.6%) | 9(42.9%) | 9(42.9%) | 9(42.9%) |
| 总胆固醇(mmol/L) | 6.1 ± 1.8 | 6.0 ± 1.4 | 6.0 ± 1.1 | 6.1 ± 1.0 |
| 低密度脂蛋白(mmol/L) | 3.8 ± 0.7 | 4.0 ± 0.5 | 4.0 ± 0.4 | 4.1 ± 0.6 |
| 高密度脂蛋白(mmol/L) | 1.3 ± 0.4 | 1.4 ± 0.5 | 1.3 ± 0.7 | 1.2 ± 0.7 |
| 甘油三酯(mmol/L) | 3.7 ± 0.5 | 3.8 ± 1.0 | 3.8 ± 0.6 | 3.8 ± 0.4 |

表 2. 不同剂量阿托伐他汀组患者高血压分级组成比较(例)

Table 2. Classification of hypertension in different doses of atorvastatin group(case)

| 高血压分级 | 10mg/d 组 | 20mg/d 组 | 40mg/d 组 | 80mg/d 组 |
|-------|----------|----------|----------|----------|
| 1级 | 6 | 7 | 7 | 6 |
| 2级 | 6 | 5 | 5 | 6 |
| 3级 | 2 | 2 | 1 | 1 |

1.2 常规检测

所有患者均于治疗前及治疗4周后清晨空腹抽取血样,检查肾功能、心肌酶、肝功能、血脂等。

1.3 内皮祖细胞的分离、培养及鉴定

取清晨空腹静脉血50 mL,用密度梯度离心法分离出单个核细胞,接种于预先包被有人纤连蛋白的六孔板培养皿中,加入含有胎牛血清的M199培养基,在37℃、5% CO₂培养箱内培养。2天后洗掉未贴壁细胞,以后每3天更换培养液1次,培养10天后,将长有细胞的盖玻片与5 mL的2.4 mg/L ac-LDL-DiI在37℃下孵育1 h,4%多聚甲醛固定10

min,PBS液洗涤2次,再将盖玻片与5 mL的10 mg/L FITC-UEA-I在37℃下孵育1 h。在激光共聚焦显微镜下鉴定 ac-LDL-DiI 阳性细胞(发红色荧光)和 UEA-I 阳性细胞(发绿色荧光),双染色阳性细胞为正在分化的 EPC。记数15个随机选择的200倍视野中的 EPC。

1.4 统计学分析

应用 SPSS13.0 软件包进行统计学处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,各组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后血脂水平变化

治疗前四组患者间总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol,

HDLC 水平无统计学差异 ($P > 0.05$)。治疗 4 周后,与治疗前比较,四组患者的 TC、TG、LDLC 水平均显著降低 ($P < 0.05$), HDLC 无显著变化;随着阿

托伐他汀剂量的增加,TC、TG、LDLC 降低更加显著,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);各组间 HDLC 差异无显著性 ($P < 0.05$;表 3)。

表 3. 不同剂量的阿托伐他汀组治疗前后血脂指标的变化 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 3. The serum lipids in patients with different doses of atorvastatin before and after treatment ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

| 血脂 (mmol/L) | 10 mg/d 组 | | 20 mg/d 组 | | 40 mg/d 组 | | 80 mg/d 组 | |
|-------------|-----------|------------------------|-----------|-------------------------|-----------|--------------------------|-----------|---------------------------|
| | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 |
| TC | 6.1 ± 1.8 | 4.9 ± 1.1 ^a | 6.0 ± 1.4 | 3.8 ± 0.8 ^{ab} | 6.0 ± 1.1 | 2.9 ± 0.3 ^{abc} | 6.1 ± 1.0 | 1.9 ± 0.2 ^{abcd} |
| TG | 3.7 ± 0.5 | 2.9 ± 0.3 ^a | 3.8 ± 1.0 | 2.3 ± 0.2 ^{ab} | 3.8 ± 0.6 | 1.7 ± 0.3 ^{abc} | 3.8 ± 0.4 | 1.4 ± 0.4 ^{abcd} |
| LDLC | 3.8 ± 0.7 | 2.8 ± 0.4 ^a | 4.0 ± 0.5 | 2.1 ± 0.3 ^{ab} | 4.0 ± 0.4 | 1.6 ± 0.2 ^{abc} | 4.1 ± 0.6 | 0.9 ± 0.1 ^{abcd} |
| HDLC | 1.3 ± 0.4 | 1.4 ± 0.7 | 1.4 ± 0.5 | 1.5 ± 0.5 | 1.3 ± 0.7 | 1.4 ± 0.9 | 1.2 ± 0.7 | 1.4 ± 0.6 |

a 为 $P < 0.05$, 与治疗前比较; b 为 $P < 0.05$, 与 10 mg/d 组治疗后比较; c 为 $P < 0.05$, 与 20 mg/d 组治疗后比较; d 为 $P < 0.05$, 与 40 mg/d 组治疗后比较。

2.2 治疗前后外周血内皮祖细胞数量变化

激光共聚焦显微镜下计数双染色阳性细胞,即正在分化的 EPC 数量,结果显示,治疗前,四组患者外周血中 EPC 数量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗 4 周后,四组患者外周血中 EPC 数量较治疗前均明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中 EPC 的数量在 40 mg/d 组最高,与 10 mg/d 及 20 mg/d 组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 80 mg/d 组较 40 mg/d 组略有下降,但无统计学差异 ($P > 0.05$;表 4)。

2.3 治疗前后肝功能、肌酸激酶及肌酐的变化

4 周后,各组均未有明显肌痛出现,肌酸激酶及肾功能无明显变化;随着阿托伐他汀治疗剂量的增加,转氨酶有逐渐增高的趋势,但各组间比较差异无显著性,其中 20 mg/d 组有 1 例转氨酶升高超过 3 倍,40 mg/d 组有 1 例转氨酶升高超过 3 倍,80 mg/d

组有 1 例转氨酶升高超过 3 倍,1 例转氨酶升高超过 5 倍(表 5)。

表 4. 不同剂量的阿托伐他汀组治疗前后内皮祖细胞数量的变化

Table 4. The number of endothelial progenitor cells in patients with different doses of atorvastatin before and after treatment

| 分 组 | 治疗前 | 治疗后 |
|-----------|-------------|-----------------------------|
| 10 mg/d 组 | 60.1 ± 12.7 | 86.1 ± 11.9 ^a |
| 20 mg/d 组 | 65.0 ± 17.5 | 100.8 ± 19.0 ^a |
| 40 mg/d 组 | 62.8 ± 16.0 | 139.8 ± 17.0 ^{abc} |
| 80 mg/d 组 | 63.2 ± 15.3 | 128.2 ± 13.4 ^a |

a 为 $P < 0.05$, 与治疗前比较; b 为 $P < 0.05$, 与 10 mg/d 组治疗后比较; c 为 $P < 0.05$, 与 20 mg/d 组治疗后比较。

表 5. 不同剂量的阿托伐他汀治疗前后各组患者生化指标的变化

Table 5. The biochemical index in patients with different doses of atorvastatin before and after treatment

| 生化指标 | 10 mg/d 组 | | 20 mg/d 组 | | 40 mg/d 组 | | 80 mg/d 组 | |
|--------------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 |
| 丙氨酸转氨酶 (U/L) | 30 ± 24 | 29 ± 27 | 29 ± 21 | 31 ± 26 | 31 ± 23 | 34 ± 27 | 31 ± 24 | 35 ± 29 |
| 血肌酐 (μmol/L) | 68 ± 30 | 70 ± 34 | 74 ± 38 | 73 ± 33 | 71 ± 37 | 71 ± 45 | 71 ± 39 | 73 ± 44 |
| 肌酸激酶 (U/L) | 102 ± 48 | 110 ± 46 | 108 ± 44 | 106 ± 50 | 107 ± 43 | 110 ± 49 | 102 ± 46 | 107 ± 51 |

3 讨 论

冠心病是一多危险因素性疾病,多种心血管危险因素可引起内皮细胞损伤和功能障碍而参与冠

状动脉粥样硬化的形成。既往研究认为,内皮功能障碍的本质是内皮损伤和修复之间的动态平衡遭到破坏^[4-5]。内皮损伤后的修复过程除了原先存在的邻近成熟内皮细胞的参与外,也可通过 EPC 定向

分化为成熟内皮细胞参与修复损伤的内皮。因此 EPC 数量减少可能引起血管内皮修复障碍,导致血管内皮损伤和功能障碍。EPC 水平可以在一定程度上反映内皮血管内皮功能状况^[6-8]。既往已有众多研究报道冠心病患者的 EPC 数量减少,功能降低,且冠状动脉多支病变较单支病变和无冠心病者 EPC 数量明显减少^[9]。

动脉粥样硬化与血脂代谢紊乱密切相关,胆固醇在血管壁内沉积是其发生和发展的必备条件。他汀类的强效降脂疗效使其成为近年来治疗冠心病的基础用药。而近年来研究发现,他汀类降脂药除显著地降低血脂的效应外,还具有其它与降脂作用无关的内皮保护作用,如促进 NO 生成、抗氧化、抗炎以及促进 EPC 的增殖分化、迁移等作用^[2,10-11],而他汀类降脂药对 EPC 的作用越来越受到临床及科研工作者的重视。Rupp 等^[12]研究发现阿托伐他汀治疗能增加冠心病患者 EPC 数量并伴随着 EPC 迁移功能的改善,国内苏晓叶等^[13]在对 SD 大鼠的基础研究中发现,阿托伐他汀具有显著的剂量依赖性骨髓动员、促进外周血中 EPC 迁移、改善血管内皮功能的作用。而在临床中,不同剂量的他汀类降脂药对冠心病患者的外周血中 EPC 数量的具体影响尚不明确。

本研究发现随着阿托伐他汀用药剂量的增加,患者的血脂水平包括 TC、TG 及 LDLC 下降更加显著。虽然 EPC 的数量亦有着逐渐增高的趋势,40 mg/d 组的 EPC 数量显著高于 10 mg/d 组及 20 mg/d 组,但是 80 mg/d 组 EPC 数量并未进一步增高,反而较 40 mg/d 组略有下降,但并无统计学差异。在本研究观察病例中,低剂量的阿托伐他汀未有明显的肝、肾损害及肌肉等不良反应出现,而在较高剂量的 40 mg/d 组出现 1 例转氨酶升高超过 3 倍,高剂量的 80 mg/d 组有 1 例转氨酶升高超过 3 倍,1 例转氨酶升高超过 5 倍。因此,阿托伐他汀具有一定范围内剂量依赖性的增加外周血中 EPC 数量的作用,并且与降血脂的作用并不完全相关。而当达到一定的剂量后并不会进一步增加 EPC 的数量,反而可能增加其毒副作用。国外有文献报道他汀类药物可能通过 PI3K/Akt 信号途径动员骨髓 EPC,增强 EPC 增殖和迁移能力,亦有研究者称他汀类药物可通过抗衰老而促进 EPC 的增殖能力^[14-16],但是他汀类药物影响 EPC 数量和功能的确切机制目前仍不明确,尚需要进一步的基础研究和大规模随机临床对照试验予以证实。

[参考文献]

- [1] Tziomalos K, Athyros VG, Karagiannis A, et al. Lipid lowering agents and the endothelium; an update after 4 years [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2012, 10: 33-41.
- [2] Liu Y, Wei J, Hu S, et al. Beneficial effects of statins on endothelial progenitor cells [J]. *Am J Med Sci*, 2012, 344: 220-226.
- [3] Dimitris T, Evangelos O, Gerasimos S, et al. Dose-dependent effects of short term atorvastatin treatment on arterial wall properties and on indices of left ventricular remodeling in ischemic heart failure [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 227: 367-372.
- [4] Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction; the first step toward coronary arteriosclerosis [J]. *Circ J*, 2009, 73: 595-601.
- [5] Jackson KG, Poppitt SD, Minihane AM. Postprandial lipemia and cardiovascular disease risk: interrelationships between dietary, physiological and genetic determinants [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 220: 22-33.
- [6] Kunz GA, Liang G, Cuculi F, et al. Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity [J]. *Am Heart J*, 2006, 152: 190-195.
- [7] Eguchi M, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2007, 11: 18-25.
- [8] 何晋, 郑昭芬, 郭莹, 等. 非对称性二甲基精氨酸及循环内皮祖细胞与冠状动脉病变程度的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22: 1127-131.
- [9] 方叶青, 谢秀梅, 谢陪益, 等. 冠心病患者内皮祖细胞 tPA 和 PAI 表达的变化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21: 627-630.
- [10] Gu MX, Fu Y, Sun XL, et al. Proteomic analysis of endothelial lipid rafts reveals a novel role of statins in antioxidation [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11: 2365-373.
- [11] Antoniadis C, Bakogiannis C, Leeson P, et al. Rapid, direct effects of statin treatment on arterial redox state and nitric oxide bioavailability in human atherosclerosis via tetrahydrobiopterin-mediated endothelial nitric oxide synthase coupling [J]. *Circulation*, 2011, 124: 335-345.
- [12] Rupp S, Badoff C, Koyanagi M, et al. Statin therapy in patients with coronary artery disease improves the impaired endothelial progenitor cell differentiation into cardiomyogenic cells [J]. *Basic Res Cardiol*, 2004, 99: 61-70.
- [13] 苏晓叶, 刘志忠, 李小波, 等. 不同剂量的阿托伐他汀对心肌损伤大鼠内皮祖细胞动员及血管内皮功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15: 277-280.
- [14] Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals [J]. *Nat Med*, 2000, 6: 1004-010.
- [15] Assmus B, Urbich C, Aicher A, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes [J]. *Circ Res*, 2003, 92: 1049-055.
- [16] 张华奎, 牛盼盼, 李焕德, 等. 内皮祖细胞——抗动脉粥样硬化药物的新靶点[J]. *中南大学学报*, 2013, 38: 307-312.

(此文编辑 许雪梅)