

· 临床研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2016)24-06-0582-05

冠心病患者内皮祖细胞功能和基质细胞衍生因子 1 α 与冠状动脉 Gensini 评分的相关性

何晋, 郑昭芬, 郭莹, 彭建强, 潘宏伟

(湖南省人民医院心内科, 湖南省长沙市 410005)

[关键词] 冠心病; Gensini 评分; 内皮祖细胞; 基质细胞衍生因子 1 α

[摘要] 目的 分析冠心病患者循环内皮祖细胞(EPC)功能和基质细胞衍生因子 1 α (SDF-1 α)与冠状动脉病变严重程度的相关性。方法 选择经冠状动脉造影证实的冠心病患者 80 例为冠心病组, 排除冠状动脉狭窄的 60 例为对照组。冠心病组根据 Gensini 评分标准对冠状动脉病变严重程度进行评分, 分为 3 个亚组。采集研究对象外周血进行分离培养。用噻唑蓝法评价 EPC 活性, 趋化试验评价 EPC 趋化能力; 采用酶联免疫吸附法测定血清 SDF-1 α 水平。结果 (1) 冠心病组循环 EPC 活性和趋化能力明显低于对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 随着病变程度加重, 细胞活性及趋化能力有明显下降趋势。(2) 冠心病组血清 SDF-1 α 水平明显低于对照组($P<0.01$), 重度狭窄组血清 SDF-1 α 水平明显低于轻度狭窄组($P<0.01$)。(3) 直线相关分析显示, EPC 活性、趋化能力、血清 SDF-1 α 水平随 Gensini 评分的增高而下降, 呈负相关($r=-0.224, P<0.05; r=-0.39, P<0.05; r=-0.31, P<0.05$)。血清 SDF-1 α 水平随细胞趋化能力的降低而降低, 呈正相关($r=0.38, P<0.05$)。结论 冠心病患者 EPC 功能及血清 SDF-1 α 水平明显下降, 冠状动脉病变程度越重, EPC 活性、趋化能力越低。血清 SDF-1 α 水平下降与 EPC 趋化能力减退具有一致性。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

Correlation Between the Function of Endothelial Progenitor Cell, Stromal Derived Factor-1 α and Gensini Score in Patients with Coronary Heart Disease

HE Jin, ZHENG Zhao-Fen, GUO Ying, PENG Jian-Qiang, and PAN Hong-Wei

(Department of Cardiology, People's Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410005, China)

[KEY WORDS] Coronary Heart Disease; Gensini Score; Endothelial Progenitor Cell; Stromal Derived Factor-1 α

[ABSTRACT] **Aim** To analyze the correlation between circulating endothelial progenitor cell (EPC) function, stromal derived factor-1 α (SDF-1 α) and Gensini score in patients with coronary heart disease (CHD). **Methods** 140 cases were divided into 2 groups: CHD group ($n=80$) and control group ($n=60$), and CHD group was divided into 3 subgroups according to the result of coronary angiography and the CHD Gensini score. The peripheral blood was isolated and cultured from the study subjects. EPC activity was assayed by methyl thiazolyl tetrazolium assay. EPC chemotaxis ability was evaluated by chemotaxis test. Serum SDF-1 α level was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** (1) EPC activity and chemotaxis ability in CHD group were significantly lower than those in control group ($P<0.01$, $P<0.05$). With the increase of lesion degree, the EPC activity and chemotaxis ability were significantly decreased. (2) Serum SDF-1 α level in CHD group was significantly lower than that in control group ($P<0.01$). Serum SDF-1 α level in severe stenosis group was significantly lower than that in mild stenosis group ($P<0.01$). (3) Linear correlation analysis showed that EPC activity, chemotaxis ability and serum SDF-1 α level decreased with the increase of Gensini score, and were negatively correlated ($r=-0.224, P<0.05; r=-0.39, P<0.05; r=-0.31, P<0.05$). Serum SDF-1 α level decreased with the decrease of EPC chemotaxis ability, and was positively correlated ($r=0.38, P<0.05$). **Conclusions**

[收稿日期] 2015-12-15

[修回日期] 2016-03-10

[基金项目] 湖南省科技厅课题(2013SK3193)

[作者简介] 何晋, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事心血管疾病介入治疗及干细胞治疗研究, E-mail 为 jinharry@163.com。通讯作者郑昭芬, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事心血管病介入治疗, E-mail 为 3178197496@qq.com。郭莹, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事心血管疾病的诊断及治疗。

EPC function and serum SDF-1 α level are significantly decreased in patients with CHD, and the more severe the coronary lesion degree, the lower the EPC activity and chemotaxis ability. The decrease of serum SDF-1 α level is consistent with the decrease of EPC chemotaxis ability.

目前已有许多研究发现冠心病 (coronary heart disease, CHD) 与内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 存在一定的相关性, 研究主要集中在两个方面: 在稳定型冠心病患者中, 由于内皮的损伤及修复平衡破坏, 使内皮功能受损, 而 EPC 作为保持内皮完整的重要细胞来源, 其数量减少和功能受损, 促进动脉粥样硬化的进一步进展^[1-2]; 另一方面, 有许多研究者发现, 在急性心肌梗死患者中, 由于急性缺血缺氧发生, 促使循环中 EPC 大量释放出来^[3-4]。

趋化因子 (chemokines) 作为动脉粥样硬化主要的监管分子之一, 它们由粥样斑块中的细胞表达, 并在动脉粥样硬化的炎症和愈合过程中发挥着至关重要的作用。近年来研究发现基质细胞衍生因子 1 α (stromal derived factor-1 α , SDF-1 α) 及其特异性受体 CXCR4 (stromal derived factor receptor) 不仅促进了造血祖细胞的生长、迁移和归巢, 也参与了动脉粥样硬化的发展过程。Gensini 评分对冠状动脉病变程度的评估是一种非常有效的方法, 冠状动脉病变越严重, Gensini 评分越高, 则心功能越差。Gensini 评分已广泛用于临床试验, 通过该评分法可探讨冠心病严重程度与某些生物化学指标有无关联^[5-6]。本研究拟初步探讨冠心病患者中 EPC 功能状况及血清 SDF-1 α 水平与冠状动脉病变严重程度的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

我院心内科 2014 年至 2015 年收治的行选择性冠状动脉造影术的患者, 经过筛选, 共 80 例纳入本研究 (冠心病组), 其中男性 54 例, 女性 26 例。年龄 53~78 岁, 平均 64.3 ± 8.2 岁。另选择 60 例同期行冠状动脉造影阴性人群为对照组, 男 40 例, 女 20 例, 年龄 50~76 岁, 平均 62.1 ± 7.6 岁。入选研究对象均签署知情同意书, 该研究得到本院伦理委员会批准同意。详细采集研究对象的临床资料, 包括年龄、性别、吸烟情况、血压、血糖和血脂等, 并进行比较。入选标准: (1) 冠心病组: 采用标准 Judkins 法, 常规投照行左、右冠状动脉造影。左主干、左前降支、左回旋支、右冠状动脉为主要血管, 至少 2 个正

交投照体位造影发现主要血管直径狭窄 $\geq 50\%$ 。

(2) 对照组: 经选择性冠状动脉造影证实冠状动脉正常。排除标准: 术前服用他汀类药物等其他可能影响循环 EPC 的药物 2 周以上; 急性心肌梗死发生^[4]; 肿瘤; 有慢性心功能不全等其他心脏疾患; 感染性疾病; 肝肾功能不全; 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。

1.2 冠状动脉病变程度评价及分组

冠状动脉狭窄程度以造影导管或指引导管为参照, 应用 QCA 系统软件, 采用冠状动脉直径减少的百分比定量评价; 采用 Gensini 积分法^[7-8] 来评价冠状动脉病变程度。定量评分: 狹窄 $\leq 25\%$ 为 1 分, $25\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 4 分, $76\% \sim 90\%$ 为 8 分, $91\% \sim 99\%$ 为 16 分, 100% 为 32 分。单支血管多处狭窄则以最狭窄处作为其评分。不同冠状动脉还应乘以相应系数, 分别为左主干病变 $\times 5$, 左前降支病变 $\times 2.5$ 、中段 $\times 1.5$ 、远段 $\times 1$, 对角支病变 $\times 1$, D1 $\times 1$ 、D2 $\times 0.5$, 左回旋支病变 $\times 2.5$ 、远端和后降支均 $\times 1$ 、后侧支 $\times 0.5$, 右冠状动脉病变 $\times 1$ 。患者冠状动脉狭窄程度积分为各分支积分之和。根据 Gensini 评分, 冠心病组分为 3 个亚组: 轻度狭窄组: Gensini 评分 ≤ 30 分; 中度狭窄组: Gensini 评分 $31 \sim 59$ 分; 重度狭窄组: Gensini 评分 ≥ 60 分。

1.3 EPC 的形态及鉴定

EPC 培养 7 天后, 形成一个个细胞集落, 集落中心为圆形细胞, 周围呈放射状分布的梭形细胞 (图 1)。在培养的细胞中加入浓度为 2.4 mg/L Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白 (Molecular Probes 公司), 置于 5% CO₂、37 °C 孵育箱中孵育 12 h, 然后用 2% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 平衡盐液 (D-Hanks) 洗涤 2 次后, 加入 FITC 标记荆豆凝集素 I (Sigma 公司), 37 °C 孵育 1 h, 在荧光显微镜下观察。Dil 标记乙酰化低密度脂蛋白被摄取后细胞呈红色, FITC 标记荆豆凝集素 I 染色后细胞呈绿色, 双染色的细胞为正在分化的 EPC, 呈黄色, 98% 以上的细胞为双染色阳性细胞 (图 2)。将分离获得的单个核细胞培养 7 天后, 消化贴壁细胞, 用 FITC-CD34、PE-KDR、PE-AC133 抗体标记细胞, 用流式细胞仪分析, 结果显示: 培养 7~10 天的细胞 CD34、AC133 和 KDR 的表达分别占 11.8%、0.32%、18% (图 3)。

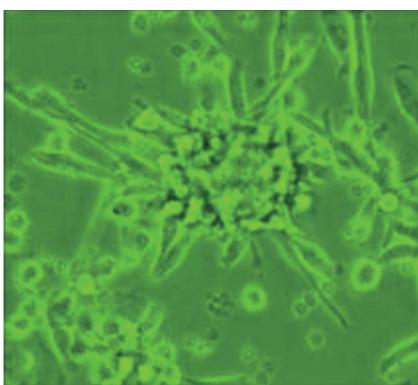


图 1. 相差显微镜下培养 7 天的外周血 EPC 形态 (200×)
Figure 1. Morphology of peripheral blood EPC cultured for 7 days under phase contrast microscope (200×)

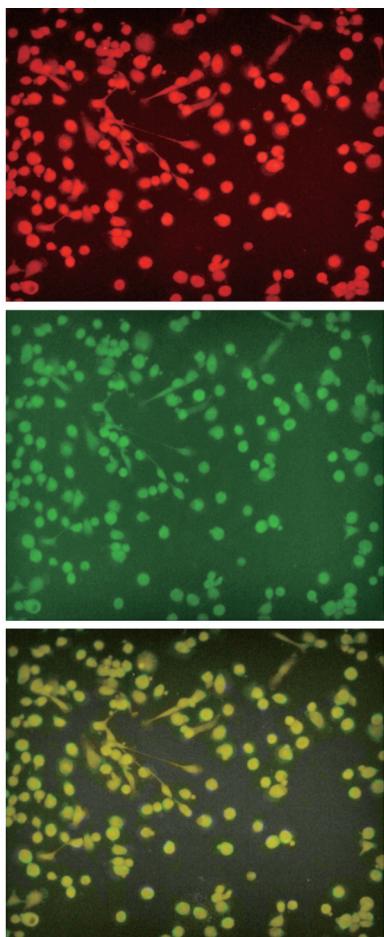


图 2. 荧光双染色鉴定 EPC (200×)
Figure 2. EPC identified by fluorescence double staining (200×)

1.4 EPC 活性及趋化能力检测

EPC 活性的检测: 取培养第 7 天的细胞, 0.5% 胰酶消化, 计数后调整细胞浓度至 2×10^8 /L, 按每孔 200 μ L 接种于 96 孔培养板, 设 3 个复孔; 按照实验分组加入不同的药物, 干预前先用无血清 RPMI-

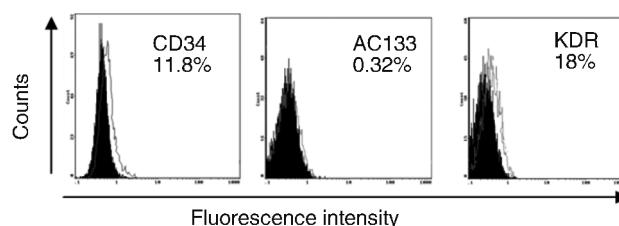


图 3. 流式细胞仪检测 EPC 抗原表达
Figure 3. Immunophenotype analysis of EPC by FACS

1640 培养基培养 24 h, 使细胞达到同步化, 测定前 4 h, 在每个孔中加入 5 g/L 浓度的噻唑蓝 20 μ L, 4 h 后吸去细胞上清液, 再加入二甲基亚砜 150 μ L, 微量振荡器震荡 10 min, 运用酶联免疫检测仪测定 490 nm 处的吸光度 (absorbance, A) 值。设置一个空白对照孔。

细胞趋化能力检测^[9]: 将含血管内皮生长因子 (50 μ g/L) 的无血清培养基 30 μ L 加入趋化板的下孔, 以无血清培养基作为对照。加盖防漏膜后固定, 于趋化板的上孔中加入 50 μ L 培养液 (含 5×10^4 个细胞), 置于 37°C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养 5 h。取出趋化膜, 刮去未穿过趋化膜的细胞, 固定细胞并用吉姆萨-伊红染色, 高倍显微镜下计数趋化细胞数并计算趋化指数 (chemotaxis index, CI)。CI = 冠心病组细胞数/对照组细胞数。

1.5 SDF-1 α 测定

研究对象均于入院 24 h 内, 清晨安静平卧状态下空腹肘静脉采血 2 mL, 采用酶联免疫吸附法按试剂盒说明书检测血清 SDF-1 α 水平。

1.6 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 Student's *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析; 计数资料用率表示, 采用 χ^2 检验进行比较; 相关性分析采用 Spearman 直线相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料分析

冠心病组、对照组年龄、性别、高血压史、糖尿病史、吸烟史均无明显差异, 冠心病组血脂水平高于对照组 ($P < 0.05$; 表 1)。

2.2 EPC 活性和趋化能力、血清 SDF-1 α 水平比较

比较两组 EPC 活性, 发现冠心病组 A 值较对照组明显下降 ($P < 0.01$; 表 2); 冠心病各亚组比较, 重度狭窄组、中度狭窄组 A 值较轻度狭窄组均有下降

($P<0.05$;表 3)。比较两组 EPC 趋化能力,发现冠心病组 CI 较对照组明显下降($P<0.05$;表 2);冠心病各亚组比较,重度狭窄组 CI 较轻度狭窄组下降($P<0.01$),中度狭窄组 CI 较轻度狭窄组下降($P<0.05$;表 3)。比较两组血清 SDF-1 α 水平,发现冠心病组较对照组明显降低($P<0.01$;表 2);冠心病各亚组比较,重度狭窄组较轻度狭窄组明显降低($P<0.01$;表 3)。

表 1. 两组基本临床资料比较

Table 1. Comparison of basic clinical data in the two groups

项 目	冠心病($n=80$)	对照组($n=60$)
年龄(岁)	64.3 ± 8.2	62.1 ± 7.6
男性(例)	54(68%)	40(67%)
吸烟(例)	34(43%)	24(40%)
高血压(例)	23(29%)	11(18%)
糖尿病(例)	12(15%)	8(13%)
甘油三酯(mmol/L)	4.53 ± 0.95^a	3.16 ± 1.69
总胆固醇(mmol/L)	1.77 ± 1.35^a	1.43 ± 1.02
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.76 ± 1.22^a	2.31 ± 0.94
高密度脂蛋白(mmol/L)	0.88 ± 0.42	0.94 ± 0.35

a 为 $P<0.05$,与对照组比较。

表 2. 两组 EPC 活性、趋化能力及血清 SDF-1 α 水平比较Table 2. Comparison of EPC activity, chemotaxis ability and serum SDF-1 α level in the two groups

项 目	冠心病($n=80$)	对照组($n=60$)
Gensini 评分	43.5 ^b	2.0
细胞活性(A 值)	0.26 ± 0.04^b	0.38 ± 0.04
趋化能力(CI)	0.76 ± 0.05^a	1
SDF-1 α ($\mu\text{g/L}$)	0.90 ± 0.08^b	1.80 ± 0.15

a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组比较。

表 3. 冠心病各亚组 EPC 活性、趋化能力及血清 SDF-1 α 水平比较Table 3. Comparison of EPC activity, chemotaxis ability and serum SDF-1 α level in the subgroups of CHD

项 目	轻度狭窄组($n=30$)	中度狭窄组($n=27$)	重度狭窄组($n=23$)
Gensini 评分	18.0 ± 6.2	45.0 ± 7.3^a	89.0 ± 13.6^{bc}
细胞活性(A 值)	0.33 ± 0.05	0.20 ± 0.02^a	0.15 ± 0.06^a
趋化能力(CI)	0.75 ± 0.06	0.67 ± 0.03^a	0.41 ± 0.02^b
SDF-1 α ($\mu\text{g/L}$)	1.30 ± 0.10	1.00 ± 0.03	0.68 ± 0.09^b

a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与轻度狭窄组比较;c 为 $P<0.05$,与中度狭窄组比较。

2.3 EPC 功能及血清 SDF-1 α 水平与冠状动脉 Gensini 评分的相关性

相关性分析显示,冠心病患者 EPC 活性、趋化能力随 Gensini 评分增加而下降,呈轻度负相关($r=-0.224, P<0.05$; $r=-0.39, P<0.05$;图 4);血清 SDF-1 α 水平随 Gensini 评分增加而下降,呈轻度负相关($r=-0.31, P<0.05$;图 5)。

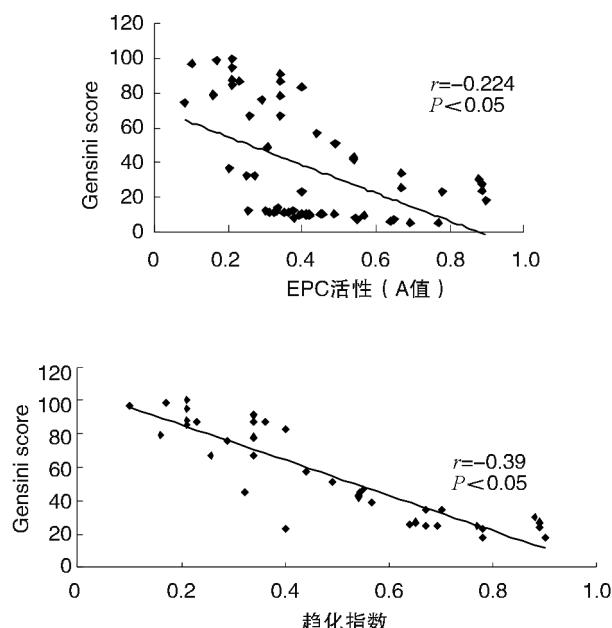
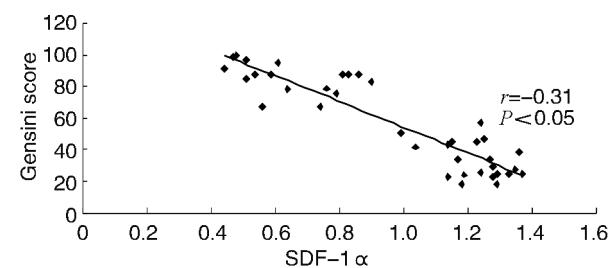


图 4. EPC 活性及趋化指数与 Gensini 评分的相关性

Figure 4. The relationship of EPC activity and chemotaxis index with Gensini score

图 5. 血清 SDF-1 α 水平与 Gensini 评分的相关性Figure 5. The relationship of serum SDF-1 α level with Gensini score

2.4 血清 SDF-1 α 水平与 EPC 功能的相关性

相关分析显示,冠心病患者血清 SDF-1 α 水平随细胞趋化能力的降低而降低,呈正相关($r=0.38, P<0.05$;图 6)。

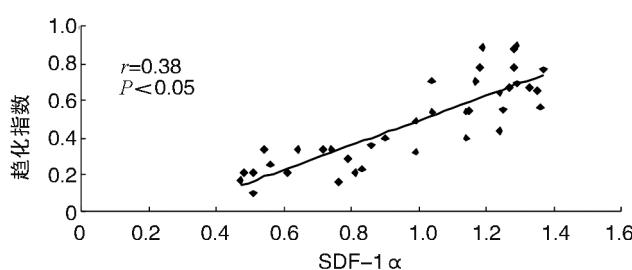


图 6. 血清 SDF-1 α 水平与 EPC 趋化指数的相关性

Figure 6. The relationship of serum SDF-1 α level with EPC chemotaxis index

3 讨 论

内皮功能障碍是动脉粥样硬化的始动环节, EPC 作为内皮细胞的前体细胞, 在内皮功能的维持和更新中起到至关重要的作用; 有学者^[10]提出循环 EPC 作为“细胞库”在修复损伤血管中起到重要作用。内膜的完整在损伤和修复中取得不断平衡, 从而维持内膜完整性, 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^[11-12]。本研究发现, 与冠状动脉造影正常患者比较, 冠状动脉存在狭窄病变的患者中, 其 EPC 活性和趋化能力是下降的, 并且随着病变积分的累积, EPC 功能进一步下降, 与冠状动脉病变积分呈负相关关系。

趋化因子 SDF-1 α 作为 CXCR 家族重要组成, 通过与 CXCR4 相互作用在动脉粥样硬化中起重要作用, 第一, 可以促进内皮细胞再生, 新生血管形成; 作为内源性修复来源的细胞库, 循环中的 EPC 在 SDF-1 α 的作用下趋化到损伤的血管处, 介导细胞的再生, 改善紊乱的内皮功能, 同时促进骨髓 EPC 的释放, 加速血管再生^[13]。第二, 可以通过抑制细胞凋亡, 稳定斑块; 已有的研究发现 SDF-1 α 能有效提高 EPC 数量, 并通过促进 EPC 黏附、增殖、诱导迁移和抑制凋亡来改善 EPC 的功能^[14]。本研究提示冠状动脉病变程度越重, EPC 活性越差, 趋化能力越低; 血液中 SDF-1 α 的水平下降与细胞趋化能力减退具有一致性。

[参考文献]

- [1] Madonna R, De Caterina R, Campagnolo P. Circulating endothelial progenitor cells: Do they live up to their name [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 67(69): 2-5.
- [2] Lev EI, Leshem-Lev D, Mager A, et al. Circulating endothelial progenitor cell levels and function in patients who experienced late coronary stent thrombosis [J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(21): 2 625-632.
- [3] Klyachkin YM, Nagareddy PR, Ye S, et al. Pharmacological elevation of circulating bioactive phosphosphingolipids enhances myocardial recovery after acute infarction [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(11): 1 333-343.
- [4] Karapetyan AV, Klyachkin YM, Selim S, et al. Bioactive lipids and cationic antimicrobial peptides as new potential regulators for trafficking of bone marrow-derived stem cells in patients with acute myocardial infarction [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(11): 1 645-656.
- [5] 高灵, 孟照辉. 冠状动脉评分方法的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(9): 1 601-609.
- [6] 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(11): 1 127-131.
- [7] Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease [J]. *Am J Cardiol*, 1983, 51(3): 606-609.
- [8] 凌琳, 承艳, 康丽娜, 等. 冠心病患者血清高敏 C 反应蛋白和 Periostin 蛋白与冠状动脉病变严重程度的相关性 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(5): 440-444.
- [9] Hu JY, Li GC, Wang WM, et al. Transfection of colorectal cancer cells with chemokine MCP-3 (monocyte chemotactic protein-3) gene retards tumor growth and inhibits tumor metastasis [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(6): 1 067-072.
- [10] Di Stefano R, Felice F, Feriani R, et al. Endothelial progenitor cells, cardiovascular risk factors and lifestyle modifications [J]. *Intern Emerg Med*, 2013, 8 (Suppl 1): S47-S49.
- [11] Padfield GJ, Tura-Ceide O, Freyer E, et al. Endothelial progenitor cells, atherosclerosis burden and clinical outcome in patients with coronary artery disease [J]. *Heart*, 2013, 99(11): 791-798.
- [12] Zhou SY, Duan XQ, Hu R, et al. Effect of non-surgical periodontal therapy on serum levels of TNF- α , IL-6 and C-reactive protein in periodontitis subjects with stable coronary heart disease [J]. *Chin J Dent Res*, 2013, 16(2): 145-151.
- [13] Elsheikh E, Andersson E, Sylvén C, et al. Plasma levels of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) and circulating endothelial progenitor cells in women with idiopathic heavy menstrual bleeding [J]. *Human Reproduction*, 2013, 29(1): 49-56.
- [14] 黎金凤, 霍亚南. 基质细胞衍生因子-1 对外周血内皮祖细胞功能影响的研究进展 [J]. 江西医药, 2013, 48(4): 369-371.

(此文编辑 曾学清)