

绝经后期超重女性循环内皮祖细胞数量和功能的变化及与内皮功能的关系

黄振华¹, 廖瑾莉¹, 罗 瑛², 刘志豪¹, 杨 震³, 詹 红¹

(中山大学附属第一医院 1.急诊科, 3.心内三科, 广东省广州市 510080;

2.中南大学湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 超重; 绝经后期; 内皮祖细胞; 内皮功能

[摘要] 目的 探讨绝经后期超重女性循环内皮祖细胞(EPC)数量和功能的变化及与肱动脉血流介导的内皮依赖性舒张功能(FMD)的关系。方法 招募绝经后期体重正常女性 20 例, 绝经后期超重女性 20 例, 体重正常男性 20 例和超重男性 20 例, 取外周血用流式细胞仪测定 CD34 和 KDR 双标阳性循环 EPC 水平, ac-LDL 及 lectin 荧光标记方法评估体外培养的 EPC 数量, MTT 法和 Transwell 小室评估 EPC 的增殖能力和迁移能力, 内皮功能通过 FMD 测量。结果 四组人群循环 EPC 数量差异无统计学意义($P>0.05$); 与超重男性相比, 绝经后期超重女性 EPC 功能及 FMD 差异无统计学意义($P>0.05$); 与体重正常人群相比, 超重人群 FMD 明显下降($P<0.05$), EPC 的迁移和增殖能力明显减弱($P<0.05$)。循环 EPC 的迁移和增殖功能与 FMD 具有明显的相关性($r=0.45, P<0.05; r=0.52, P<0.05$)。结论 绝经后期超重女性 FMD 和循环 EPC 数量及功能没有得到保留, 且明显减弱。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The relation between change of the number and functional activity of circulating endothelial progenitor cells and endothelial function in overweight and postmenopausal women

HUANG Zhen-Hua¹, LIAO Jin-Li¹, LUO Ying², LIU Zhi-Hao¹, YANG Zhen³, ZHAN Hong¹

(1. Department of Emergency, 3. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Sun Yet-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 2. Department of Geriatric Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

[KEY WORDS] Overweight; Postmenopausal; Endothelial progenitor cells; Endothelial function

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relation between change of the number and functional activity of circulating endothelial progenitor cells and endothelial function in overweight and postmenopausal women. **Methods** Eighty volunteers were divided into four groups: healthy postmenopausal women ($n=20$), overweight postmenopausal women ($n=20$), healthy men ($n=20$) and overweight men ($n=20$). Flow cytometry analysis was used to detect the number of CD34 and KDR double-positive labeled circulating endothelial progenitor cells in the four groups, and acetylated low density lipoprotein (ac-LDL) and lectin fluorescent staining method were explored to detect the number of cultured endothelial progenitor cells. In addition, the migration and proliferation of endothelial progenitor cells were detected respectively with MTT and Transwell method. Finally, vascular endothelial function was investigated by brachial artery-based flow-mediated dilatation (FMD). **Results** No significant differences were found among the number of circulating endothelial progenitor cells in the four groups ($P>0.05$). There was no conspicuous difference in activity of circulating endothelial progenitor cells as well as FMD between overweight men and postmenopausal overweight women ($P>0.05$). Compared with the normal weight group, the FMD, migration, and proliferation of circulating endothelial progenitor cells were remarkably decreased in overweight group ($P<0.05$). A strong significant correlation was found between the migra-

[收稿日期] 2017-11-17

[修回日期] 2017-12-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31270992 和 30800215); 广东省自然科学基金项目(2014A030313086); 广东省科技计划项目(2013B021800275); 广州市科技计划珠江新星项目(2013J2200019); 中山大学青年教师培育项目(13ykpy24)

[作者简介] 黄振华, 硕士研究生, 研究方向为急危重症及心血管病, E-mail 为 huangzh12306@163.com。通讯作者詹红, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为急危重症及心血管病, E-mail 为 zhanhong81@126.com。

tion and proliferation of circulating endothelial progenitor cells and FMD ($r=0.45$, $P<0.05$; $r=0.52$, $P<0.05$, respectively) in overweight group. **Conclusion** The number and functional activity of circulating endothelial progenitor cells and endothelial function in overweight postmenopausal women were not preserved, and which were significantly declined.

超重和肥胖是冠心病等心脑血管疾病的独立危险因素,其可引起血管内皮功能障碍^[1-2]。内皮损伤是导致动脉硬化形成的始动环节,内皮功能障碍的本质是内皮损伤与修复之间动态平衡的破坏^[3]。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)具有有效修复血管内皮损伤并参与血管新生,改善血管内皮功能,在内皮损伤后的修复中起着重要的作用^[4]。大量研究证实肥胖或超重可引起循环中EPC数量减少、功能损害,并影响内皮修复能力,破坏内皮损伤和修复之间的平衡,从而导致血管内皮功能障碍,促进冠心病等心脑血管病的发生发展^[5-6]。大量研究显示绝经前期女性EPC数量与功能均优于同龄男性和绝经后期女性,获得心血管疾病的风险也明显降低,这可能与雌激素水平相关^[7-8]。既往研究发现绝经前期高血压前期、糖尿病女性循环EPC数量与功能是得到保留的^[7-9],而目前尚不清楚绝经后期超重女性人群循环EPC数量和功能是否也得到保留。因此,我们假设绝经后期超重女性人群EPC数量及功能未得到保留。本研究拟探讨绝经后期循环EPC数量和功能的变化,旨在证实绝经后期超重女性血管损伤的可能相关机制,为该人群相关血管损伤修复寻找新的干预靶点。

1 资料和方法

1.1 研究对象

在湘雅医院招募了80例志愿者,分为4组:绝经后期体重正常女性20例、绝经后期超重女性20例、正常体重男性20例、超重男性20例。纳入标准:年龄 ≥ 45 岁,已经完成最后一次月经女性及与年龄相匹配男性。排除标准:年龄 <45 岁的女性;合并高血压、糖尿病、冠心病等患者;肝肾功能不全及造血系统等原发性疾病;精神病患者及不配合人群。绝经后期是指绝经后的生命时期。在早期阶段,虽然卵巢停止分泌激素,但仍能分泌少量雄激素,一般60岁进入老年期,此期卵巢已完全衰竭,雌激素水平更低,不足以维持女性第二性征^[10]。

1.2 材料

内皮细胞基础培养基2购自美国Clonetics, CD34流式细胞荧光抗体购于BD公司, ac-LDL购于

Molecular Probes公司, lectin购于Sigma公司, Transwell迁移小室24孔购自美国Corning公司, 纤维连接蛋白购自Hematologic Technologies公司, MTT购自Fluka公司, 红细胞裂解液购自美国Stem Cell Technologies公司。

1.3 肱动脉血流介导的内皮依赖性舒张功能测定

受试者取仰卧位,左上臂充分暴露,将超声探头(HPsonos2500超声心动图仪)置于肘窝上方,取得最大的肱动脉内径和最佳的直线状动脉壁血液界面,记录基础肱动脉二维图像,固定探头,给袖带充气至250 mmHg至完全阻断血流5 min后迅速放气,记录放气30 s至1 min间肱动脉二维图像。肱动脉血流介导的内皮依赖性舒张功能(flow-mediated dilatation, FMD) = (充血后内径 - 基础内径) / 基础内径 $\times 100\%$ 。

1.4 人外周血EPC的分离和培养

参考文献^[10],取外周静脉血,提取EPC,用PBS等体积稀释后,加入含Ficoll-Paque人淋巴细胞分离液的离心管上层,常温下离心,吸取中间白膜层细胞, PBS洗涤2次后,离心8 min获取单核细胞。将单核细胞重悬于含胎牛血清的EPC全培养基,置37℃,每4天换液1次。培养一周。

1.5 流式细胞仪测定循环EPC水平

参考文献^[7,9,11],取外周血100 μL ,加入三种抗体(CD34及KDR)各10 μL ,室温放置30 min,加入红细胞裂解液2 mL,离心5 min,弃上清,再离心5 min, 2%多聚甲醛固定。

1.6 荧光标记方法评估培养的EPC数量

参考文献^[9,12-13],培养7天后去培养基, PBS洗2遍,加稀释后的Dil-ac-LDL,孵育2 h, 4%甲醛固定10 min,加1%曲拉通200 μL /孔,孵育20 min,再加1:100稀释的lectin,孵育1 h,荧光显微镜下观察。

1.7 EPC迁移、增殖能力检测

将 2×10^4 个EPC悬浮液加入Transwell上室,在下室中加入含50 $\mu\text{g/L}$ 血管因子(VEGF165)的DMEM培养液中,培养24 h后,取上室并轻擦掉上室膜上未迁移的细胞,随机选取5个连续显微镜视野($200\times$)计数迁移的细胞,取平均数^[14]。

消化各组初级EPC集落单位并计数,将100 μL 1×10^3 个/L EPC均匀接种到明胶包被的96孔培养板($n=5$),置于37℃、5%CO₂培养箱培养24 h,之后

每孔加 10 μ L MTT(5 g/L),再培养 4 h,置酶标仪于波长 490 nm 处测 A 值^[15]。

1.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 T 检验;计数资料以频数或率等指标来表示,组间差异性运用 χ^2 检验;EPC 功能与 FMD 之间的关系采用单因素相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料比较

男性身高、体重明显高于女性($P<0.05$),超重男性、绝经后期超重女性的 BMI 明显高于体重正常男性、绝经后期体重正常女性($P<0.05$),其余指标均无统计学差异($P>0.05$;表 1)。

表 1. 四组间一般临床和生物化学指标比较

Table 1. Comparison of general clinical and biochemical indexes in the four groups

项目	绝经后期体重正常 女性($n=20$)	绝经后期超重 女性($n=20$)	体重正常男性 ($n=20$)	超重男性 ($n=20$)
年龄(岁)	56.1 \pm 4.7	57.3 \pm 4.5	56.7 \pm 4.4	55.3 \pm 4.1
身高(cm)	163.6 \pm 5.6	162.6 \pm 6.2	169.3 \pm 6.3 ^a	167.8 \pm 5.0 ^a
体重(kg)	57.7 \pm 4.2	70.0 \pm 5.6 ^b	63.0 \pm 6.5 ^a	74.7 \pm 4.5 ^{ab}
BMI(kg/m ²)	21.6 \pm 1.6	26.5 \pm 1.8 ^b	21.9 \pm 1.4	26.6 \pm 2.3 ^b
收缩压(mmHg)	119.4 \pm 9.5	120.9 \pm 5.9	121.3 \pm 6.6	123.3 \pm 9.2
舒张压(mmHg)	73.2 \pm 6.8	75.0 \pm 5.2	74.7 \pm 6.3	76.5 \pm 6.9
心率(次/分)	74.8 \pm 8.7	75.9 \pm 8.5	73.6 \pm 8.6	76.6 \pm 8.0
雌激素(pmol/L)	106.0 \pm 26.2	116.5 \pm 37.0	102.5 \pm 20.1	108.1 \pm 19.9
AST(mmol/L)	25.0 \pm 6.9	26.6 \pm 6.3	28.4 \pm 4.0	26.3 \pm 5.1
ALT(mmol/L)	21.5 \pm 5.7	23.5 \pm 4.7	24.78 \pm 5.6	24.1 \pm 6.1
BUN(mmol/L)	5.4 \pm 0.7	5.5 \pm 0.9	5.1 \pm 0.9	5.3 \pm 0.7
Cr(mmol/L)	69.1 \pm 12.7	71.4 \pm 11.6	66.3 \pm 14.3	68.1 \pm 13.7
LDL(mmol/L)	2.62 \pm 0.39	2.76 \pm 0.39	2.56 \pm 0.46	2.71 \pm 0.42
TC(mmol/L)	4.38 \pm 0.53	4.54 \pm 0.56	4.23 \pm 0.63	4.48 \pm 0.58
HDL(mmol/L)	1.33 \pm 0.20	1.27 \pm 0.13	1.29 \pm 0.14	1.23 \pm 0.12
TG(mmol/L)	1.58 \pm 0.19	1.67 \pm 0.20	1.63 \pm 0.17	1.69 \pm 0.16
FPG(mmol/L)	4.34 \pm 0.46	4.68 \pm 0.56	4.76 \pm 0.50	4.54 \pm 0.48

a 为 $P<0.05$,与女性比较;b 为 $P<0.05$,与体重正常男性、绝经后期体重正常女性比较。

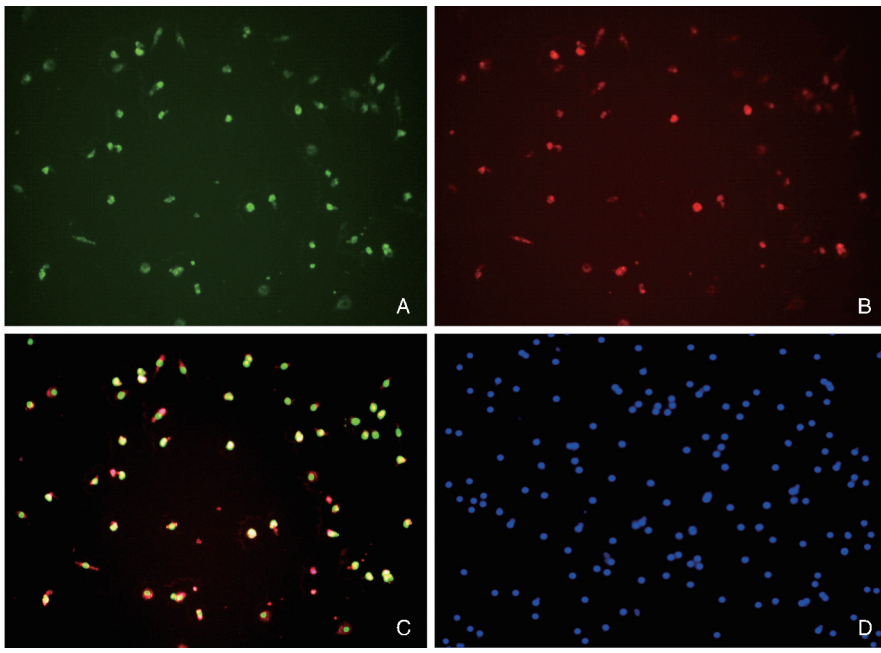


图 1. EPC 的鉴定与迁移 A 为 lectin 所染的 EPC(绿色)荧光图(200 \times);B 为 Dil-ac-LDL 所染的 EPC(红色)(200 \times)的荧光图,C 为 lectin 与 Dil-ac-LDL 双标的 EPC(200 \times),D 为 EPC 迁移的结晶紫染色图。

Figure 1. Identification and migration of endothelial progenitor cells

2.2 FMD 比较

超重者 FMD 明显小于体重正常者 ($P < 0.05$), 体重正常的男性与女性之间以及超重的男性与女性之间 FMD 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 2)。

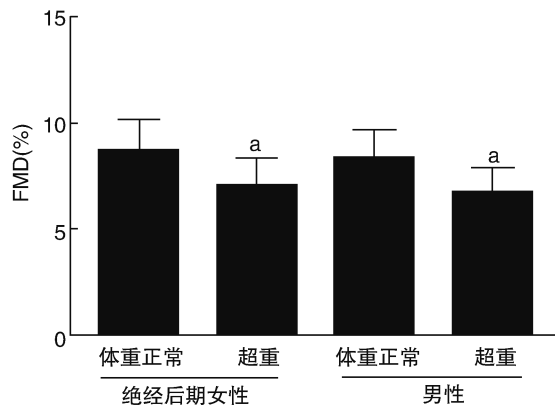


图 2. 各组 FMD 相互比较 a 为 $P < 0.05$, 与体重正常者比较。
Figure 2. Comparison of FMD in each group

2.3 循环 EPC 数量比较

各组循环 EPC 数量差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 3 和 4)。

2.4 循环 EPC 功能比较

与绝经后期体重正常女性相比, 绝经后期超重女性循环 EPC 迁移和增殖能力明显下降 ($P < 0.05$); 与超重男性相比, 绝经后期超重女性循环 EPC 迁移和增殖能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与体重正常男性相比, 超重男性循环 EPC 迁移和增殖能力明显下降 ($P < 0.05$); 与体重正常男性相比, 绝经后期体重正常女性循环 EPC 迁移和增殖能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 5 和 6)。

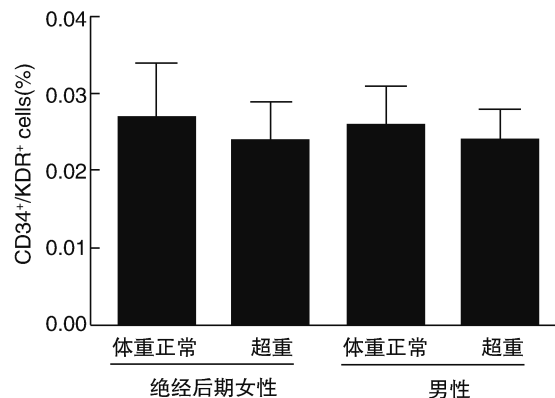


图 3. 流式细胞仪计循环 EPC 数量
Figure 3. The number of circulating endothelial progenitor cells in each group by fluorescence activated cell sorting analysis

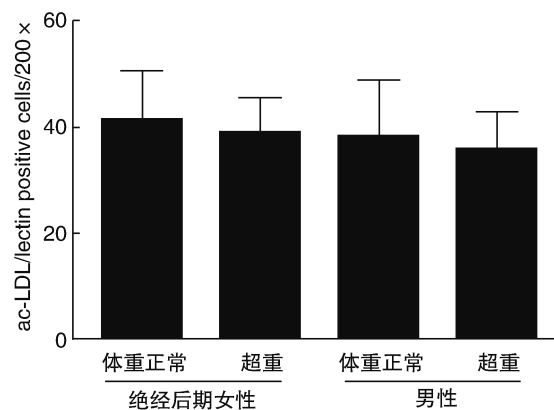


图 4. 显微镜计循环 EPC 数量
Figure 4. The number of circulating endothelial progenitor cells in each group by phase-contrast fluorescent microscope

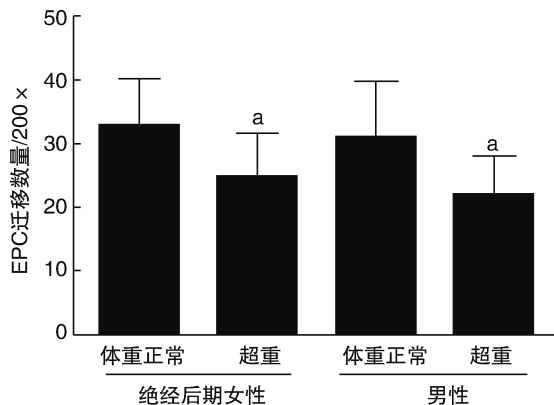


图 5. 各组循环 EPC 迁移能力比较 a 为 $P < 0.05$, 与体重正常者比较。
Figure 5. Comparison of the migration of circulating endothelial progenitor cells in each group

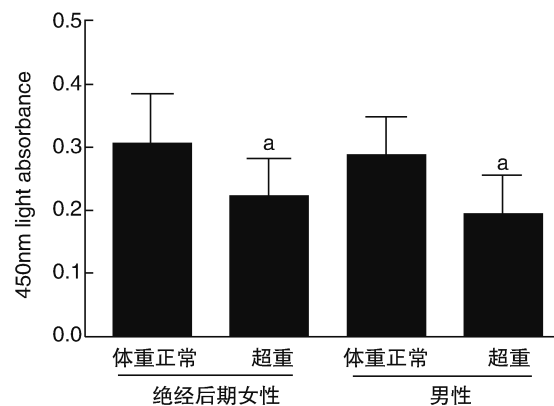


图 6. 各组 EPC 增殖能力比较 a 为 $P < 0.05$, 与体重正常者比较。
Figure 6. Comparison of proliferation of circulating endothelial progenitor cells in each group

2.5 循环 EPC 功能与 FMD 的关系

循环 EPC 迁移能力与 FMD 正相关($r=0.45, P<0.05$), 循环 EPC 增殖能力与 FMD 正相关($r=0.52, P<0.05$; 图 7 和 8)。

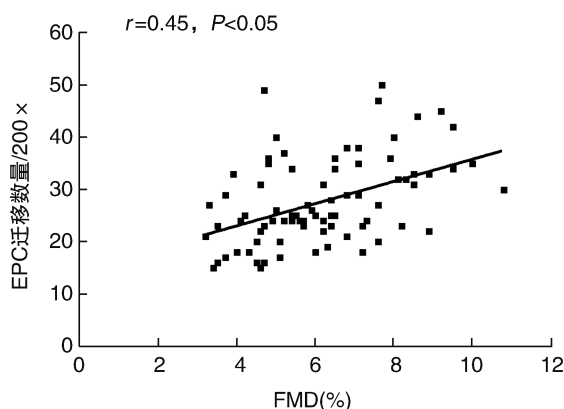


图 7. EPC 迁移能力与 FMD 的相关性

Figure 7. The correlation between circulating EPC migration and FMD

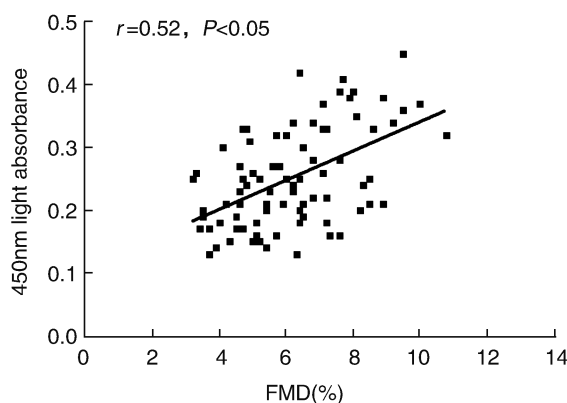


图 8. EPC 增殖能力与 FMD 的相关性

Figure 8. The correlation between circulating EPC proliferation and FMD

3 讨论

内皮功能障碍是肥胖或超重导致冠心病等心脑血管疾病的中心环节^[2]。研究发现, 肥胖可致循环 EPC 数量减少, 迁移和增殖能力减弱, 导致内皮细胞得不到修复及更新, 血管内皮受损修复能力下降^[16]。因此, 提高循环 EPC 的数量, 提高其相应的功能, 修复损伤的血管内皮, 对防治动脉粥样硬化性心脑血管疾病至关重要。

研究发现, 绝经前期女性循环 EPC 存在性别差异, 相对同龄成年男性和绝经后期女性, 绝经前期

女性 EPC 数量增加和功能增强, 发生心血管疾病的风险明显降低^[7,9]。我们前期研究发现绝经前期高血压前期与糖尿病女性循环 EPC 数量及功能明显高于同龄健康男性和高血压前期或糖尿病男性^[7,9], 提示绝经前期女性可改善血管内皮修复能力, 但目前没有数据显示绝经后期超重女性循环 EPC 是否存在类似有利情况。因此, 本研究拟探讨绝经后期超重女性 EPC 数量及功能的变化。

本研究发现, 相比男性, 绝经后期超重女性 EPC 数量及迁移和增殖能力没有得到保留, 提示绝经后期超重女性的内源性血管内皮修复能力下降, 这可能与雌激素水平下降有关。同时还发现相对体重正常的女性和男性相比, 绝经后期超重女性和超重男性的 EPC 迁移及增殖能力明显减弱, 说明超重是引起循环 EPC 功能受损的关键因素之一, 提示循环 EPC 功能减弱可能是肥胖或超重导致各种心血管疾病发生发展的分子细胞学机制。

FMD 能如实反映心血管的内皮功能紊乱, 是一种无创、可重复的检测血管功能的新技术^[17-18]。本研究发现, 绝经后期超重女性 FMD 明显低于绝经后期体重正常女性与体重正常男性, 说明绝经后期超重女性内皮功能受损可能与 EPC 功能下降有关。此外, 循环 EPC 迁移和增殖能力与 FMD 密切相关($r=0.45, P<0.05; r=0.52, P<0.05$), 提示循环 EPC 迁移和增殖能力与血管内皮功能密切相关。

总之, 本研究发现: 相对体重正常的男性和女性, 绝经后期超重女性循环 EPC 数量和功能并没有得到保留, 内皮功能也相应下降, 这可能与机体内的雌激素水平有关。因此, 维持高水平的循环 EPC 数量和功能以及较强的内源性内皮修复能力可能是绝经后期超重女性血管保护的机制之一。

[参考文献]

- [1] Mikirova NA, Casciari JJ, Hunninghake RE, et al. Effect of weight reduction on cardiovascular risk factors and CD34-positive cells in circulation [J]. *Int J Med Sci*, 2011, 8(6): 445-452.
- [2] Maceneaney OJ, Kushner EJ, Van Guilder GP, et al. Endothelial progenitor cell number and colony-forming capacity in overweight and obese adults [J]. *Int J Obes* (2005), 2009, 33(2): 219-225.
- [3] Radke RM, Diller G, Duck M, et al. Endothelial function in contemporary patients with repaired coarctation of aorta [J]. *Heart (British Cardiac Society)*, 2014, 100(21): 1696-701.
- [4] Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, et al. Circulating endothelial

- progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(7): 593-600.
- [5] Tobler K, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM, et al. Reduction of both number and proliferative activity of human endothelial progenitor cells in obesity [J]. *Int J Obes* (2005), 2010, 34(4): 687-700.
- [6] Heida N, Muller J, Cheng I, et al. Effects of obesity and weight loss on the functional properties of early outgrowth endothelial progenitor cells [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(4): 357-367.
- [7] Zeng H, Jiang Y, Tang H, et al. Abnormal phosphorylation of Tie2/Akt/eNOS signaling pathway and decreased number or function of circulating endothelial progenitor cells in prehypertensive postmenopausal women with diabetes mellitus [J]. *BMC Endocr Disord*, 2016, 16: 13.
- [8] Da Silva LHA, Panazzolo DG, Marques MF, et al. Low-dose estradiol and endothelial and inflammatory biomarkers in menopausal overweight/obese women [J]. *Climacteric*, 2016, 19(4): 337-343.
- [9] Zhen Y, Xiao S, Ren Z, et al. Increased endothelial progenitor cells and nitric oxide in young prehypertensive women [J]. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2015, 17(4): 298-305.
- [10] 蒋艳平, 王波, 曾高峰, 等. 高血压前期人群一氧化氮水平的性别差异及其与内皮祖细胞的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(9): 934-938.
- [11] Yang Z, Chen L, Su C, et al. Impaired endothelial progenitor cell activity is associated with reduced arterial elasticity in patients with essential hypertension [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2010, 32(7): 444-452.
- [12] Yang Z, Xia W, Zhang Y, et al. Shear stress-induced activation of Tie2-dependent signaling pathway enhances re-endothelialization capacity of early endothelial progenitor cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(5): 155-163.
- [13] Bai Y, Xiao S, Tang Y, et al. Shear stress-mediated up-regulation of GTP cyclohydrolase/tetrahydrobiopterin pathway ameliorates hypertension-related decline in reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells [J]. *J Hypertens*, 2017, 35(4): 784-797.
- [14] 盛祖龙, 姚玉宇, 黎叶飞, 等. 缓激肽对内皮祖细胞存活、迁移及凋亡的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(1): 17-21.
- [15] 崔斌, 刘曦, 李佳蓓, 等. 氯化锂通过激活 Wnt 信号通路促进内皮祖细胞的增殖能力 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(10): 985-988.
- [16] Rossi F, Bertone C, Michelon E, et al. High-density lipoprotein cholesterol affects early endothelial progenitor cell number and endothelial function in obese women [J]. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 2013, 21(11): 2356-361.
- [17] Liu X, Zhang G, Zhang X, et al. Lacidipine improves endothelial repair capacity of endothelial progenitor cells from patients with essential hypertension [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(4): 3317-326.
- [18] Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, et al. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(3): 454-471.
- (此文编辑 文玉珊)