

高血压循环内皮祖细胞变化和动脉弹性的关系

杨震¹, 夏文豪¹, 罗初凡², 张媛媛¹, 苏晨¹, 陈龙¹, 廖新学¹, 陶军¹

(中山大学附属第一医院 1.高血压血管病科,2.心血管介入病区 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨高血压患者循环内皮祖细胞(EPC)数量和功能变化与动脉弹性的关系。【方法】检测 20 例高血压患者和 21 例年龄匹配血压正常者的大动脉弹性(C1)和小动脉弹性(C2)。同时用流式细胞仪测定测定 CD34 和 KDR 双标阳性循环内皮祖细胞水平,ac-LDL 及 lectin 荧光标记方法评估体外培养内皮祖细胞数量,检测内皮祖细胞的迁移和增殖能力。【结果】与血压正常者相比,高血压患者 C1 和 C2 减退,循环内皮祖细胞迁移和增殖功能明显下降,但是两组患者内皮祖细胞数量无明显差别。循环内皮祖细胞迁移或增殖功能和 C1 或 C2 呈明显正相关,多元回归分析显示循环内皮祖细胞迁移或增殖功能是 C1 或 C2 的独立预测因素。【结论】高血压动脉弹性下降与循环内皮祖细胞功能受损密切相关,提示内源性血管内皮修复能力下降是高血压血管损伤的重要机制。

关键词: 高血压;内皮祖细胞;动脉弹性;血管损伤

中图分类号:R541.4 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2012)01-0054-06

Relationship between Alteration of Circulating Endothelial Progenitor Cells and Arterial Elasticity in Patients with Essential Hypertension

YANG Zhen¹, XIA Wen-hao¹, LUO Chu-fan², ZHANG Yuan-yuan¹, SU Chen¹, CHEN Long¹,
LIAO Xin-xue¹, TAO Jun¹

(1.Department of Hypertension & Vascular Disease, 2.Department of Cardiac Intervention, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to investigate the association between alteration in circulating endothelial progenitor cells (EPC) and hypertension-related reduced arterial elasticity. 【Methods】 We measured the artery elasticity profiles including C1 large and C2 small artery elasticity indices in the patients with essential hypertension ($n = 20$) and age-matched normotensive subjects ($n = 21$). We also performed flow cytometry analysis to evaluate the number of CD34 and KDR double-positive labeled circulating EPC before and after exercise, and acetylated-LDL and lectin fluorescent staining method to evaluate the number of cultured EPC. In addition, the EPC migratory and proliferative activities were measured. 【Results】 Compared with normotensive subjects, the patients with hypertension exhibited decreased C1 large and C2 small artery elasticity indices. The number of circulating EPC was not different between the two groups. The migratory and proliferative activities of circulating EPC in hypertensive patients were lower than those in normotensive subjects. Both proliferatory and migratory activities of circulating EPC closely correlated with C1 large and C2 small artery elasticity indices. Multivariate analysis identified both proliferative and migratory activities of circulating EPC as independent predictors of C1 large and C2 small artery elasticity indices. 【Conclusion】 The present study demonstrates for the first time that impaired activity of circulating EPC is associated with reduced arterial elasticity in patients with hypertension. The fall in endogenous repair capacity of vascular endothelium may be an important mechanism underlying hypertension-related vascular injury.

Key words: hypertension; endothelial progenitor cells; arterial elasticity; vascular injury

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(1):54-59]

收稿日期: 2011-09-14

基金项目:国家自然科学基金(u0732002, 30800215, 30770895),广东省自然科学基金博士启动项目(8451008901000793),广州市科技计划项目(2007Z3-E0241)

作者简介:杨震,博士,主治医师,研究方向:心血管内科,E-mail: yangzhen107107@yahoo.com.cn. *通信作者:陶军,教授,博士生导师,E-mail: taojungz@yahoo.com

高血压是心血管病最重要的危险因素,可导致心、脑、肾等靶器官的损害,严重危害人们的健康和生活。血管损伤是高血压发病的关键环节之一,而动脉弹性减退是高血压血管病变的重要标志。研究表明,动脉弹性减退的高血压患者具有较高的心血管事件发生风险,提示动脉弹性是评估和预测高血压心血管风险的重要指标^[1-2]。但是,有关高血压导致动脉弹性减退的相关机制,目前尚不完全清楚。近来研究发现骨髓和外周血中存在内皮细胞的前体细胞-内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)^[3-5]。内皮祖细胞能加快损伤血管再内皮化,抑制病理性新生内膜形成,参与血管内皮损伤的修复过程。在多种血管疾病危险因素存在和动脉粥样硬化血管疾病发生时,循环内皮祖细胞存在数量和功能下降,并且与多种危险因素和分层密切相关。我们在既往的研究中探讨了生理性衰老血管功能的变化与循环内皮祖细胞关系,结果发现生理性衰老引起的血管功能障碍与循环内皮祖细胞数量减少密切相关^[6]。由于内皮功能障碍与高血压引起的动脉弹性减退密切相关^[7-8],我们推测循环内皮祖细胞数量和功能下降可能是高血压导致动脉弹性减退的重要机制。因此,我们进一步观察高血压患者循环内皮祖细胞数量和功能变化与动脉弹性的关系,以探讨高血压所致动脉弹性减退可能的细胞生物学机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

CD34 流式细胞荧光抗体购于 BD 公司, EGM-2 培养基购于 Clonetics 公司, 纤维连接蛋白购于 Hematologic Technologies 公司, ac-LDL 购于 Molecular Probes 公司, Lectin 购于 Sigma 公司, 二苯基四氮唑溴盐(MTT) 购自 Fluka 公司。

1.2 病例入选

我们招募了 20 例原发性高血压患者和 21 例年龄匹配血压正常者, 原发性高血压患者 SBP \geq 140 mmHg 或者 DBP \geq 90 mmHg, 并且排除继发性高血压。所有志愿者通过询问病史、详细的体格检查和实验室检查, 排除了糖尿病、恶性肿瘤、感染或炎症性疾病, 以避免对循环内皮祖细胞数量和功能产生影响。两组患者基本临床资料见下表 1。

表 1 高血压患者和血压正常对照者的基本临床资料

Table 1 Clinical and biochemical characteristics in normotensive controls and hypertensive patients

Characteristics	Normotensive subjects	Hypertensive patients
	(n = 21)	(n = 20)
Age /years	54.1 \pm 5.5	55.7 \pm 6.3
Height /cm	159.7 \pm 6.9	161.7 \pm 5.7
Mass/kg	60.6 \pm 4.3	63.1 \pm 8.2
BMI / (kg/cm ²)	23.8 \pm 1.4	24.1 \pm 2.7
Systolic blood pressure /mmHg	123.9 \pm 9.9	152.6 \pm 10.3 ¹⁾
Diastolic blood pressure/mmHg	74.7 \pm 7.6	88.9 \pm 5.5 ¹⁾
Heart rate / (beats/min)	67.4 \pm 8.9	73.2 \pm 8.8 ¹⁾
AST / (mmol/L)	28.3 \pm 6.7	29.4 \pm 5.5
ALT / (mmol/L)	22.0 \pm 8.4	25.2 \pm 8.8
BUN / (mmol/L)	5.5 \pm 1.1	5.1 \pm 1.0
Cr / (mmol/L)	60.1 \pm 15.7	59.8 \pm 15.0
FPG / (mmol/L)	4.4 \pm 0.7	4.5 \pm 0.9
LDL / (mmol/L)	3.4 \pm 0.9	3.4 \pm 1.0
TC / (mmol/L)	5.3 \pm 1.0	5.4 \pm 0.8
HDL / (mmol/L)	1.5 \pm 0.4	1.3 \pm 0.3
TG / (mmol/L)	1.5 \pm 1.0	1.6 \pm 0.8
hrCRP / (mmol/L)	1.1 \pm 1.0	2.1 \pm 2.4

BMI: body mass index; LDL: low-density lipoprotein; TC: total cholesterol; HDL: high density lipoprotein; TG: triglyceride; FPG: fasting plasma glucose; hrCRP: hyper-sensitive C-reactive protein. 1) $P < 0.05$ vs normotensive subjects

1.3 动脉弹性测定

控制环境温度于 23 $^{\circ}$ C, 让受试者卧位休息至少 15 min。检测前 12 h 时禁止摄入酒精和咖啡, 以及禁烟。采用美国 HDI 公司生产的 CVProfilor-2020 型动脉弹性功能测定大动脉弹性指数(C1)和小动脉弹性指数(C2)^[6]。

1.4 流式细胞仪测定循环内皮祖细胞水平

取 200 μ L 外周血与 KDR 流式细胞荧光抗体孵育 20 min, 之后加入 CD34 流式细胞荧光抗体孵育 20 min。最后将红细胞溶解, 剩余细胞用 20 g/L 多聚甲醛固定, 以流式细胞仪进行检测。CD34 和 KDR 双阳性细胞为循环内皮祖细胞^[5,9]。

1.5 荧光标记方法评估培养内皮祖细胞数量

取患者外周血约 50 mL 置于肝素管中, 用 Ficoll-Paque 法离心后, 小心提取血清和 Ficoll 分离液交界处的单个核细胞层, 置于以纤维连接蛋白预衬的 EGM-2 培养基中。细胞培养一周后取一部分贴壁细胞在 10 μ g/L ac-LDL 溶液中孵育 1 h,

之后 20 mL/L 多聚甲醛固定,以 10 $\mu\text{g/L}$ lectin 抗体溶液孵育 1 h,并置于荧光显微镜下观察拍片,红色和绿色双染色细胞为内皮祖细胞,具体方法参见我们既往报道^[5,9-13]。

1.6 内皮祖细胞迁移能力检测

将含 50 $\mu\text{g/L}$ VEGF 的 DMEM 培养液加入改良 Boyden 小室的下室,用 2.5 g/L 胰酶消化贴壁细胞,悬浮于 DMEM 培养液中。将含贴壁细胞的 DMEM 培养液注入上室,培养 24 h 后,轻轻刮去滤膜上面的未迁移细胞,用甲醇固定, Giemsa 溶液染色,计数迁移的细胞。

1.7 内皮祖细胞能力增殖检测

EPC 培养 7 d 后,如上述用 2.5 g/L 胰酶消化贴壁细胞,悬浮于 DMEM 培养液中。将相同数量的内皮祖细胞接种到包被有人纤维连接蛋白 96 孔培养板,每孔加 10 μL MTT (5 g/L),培养 4 h 后,弃去上清液,再加入二甲基亚砜 (150 μL /孔) 充分振荡 10 min 后,在酶标仪下于波长 490 nm 处测 OD 值^[5,9]。

1.8 统计学分析

组间计量资料的比较采用 Student *t* 检验,内皮祖细胞数量和功能与动脉弹性的关系之间关系采用 Pearson 相关分析。为评估内皮祖细胞数量和功能对动脉弹性的独立预测价值,采用多元回归分析多种临床因素对动脉弹性的影响。统计软件为 SPSS 11.0, $P < 0.05$ 为有统计学意义,图表结果以均数 \pm 标准差表示。

2 结 果

2.1 两组患者动脉弹性的比较

如表 1 所示,高血压患者 SBP、DBP 和 HR 高于血压正常对照者,其他临床资料无统计学差异。与血压正常对照者相比,高血压患者的 C1 和 C2 均明显降低 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.05$, 图 1, 2)。

2.2 两组患者循环内皮祖细胞数量和功能的比较

与血压正常对照者相比,高血压患者的 CD34+KDR+细胞无明显差别 ($P > 0.05$, 图 3)。同时,荧光标记方法评估显示高血压患者的 ac-LDL+lectin+细胞无明显差别 ($P > 0.05$, 图 4)。体外功能检测提示与血压正常对照者相比,高血压患者循环内皮祖细胞的迁移和增殖能力明显降低 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.05$, 图 5, 6)。

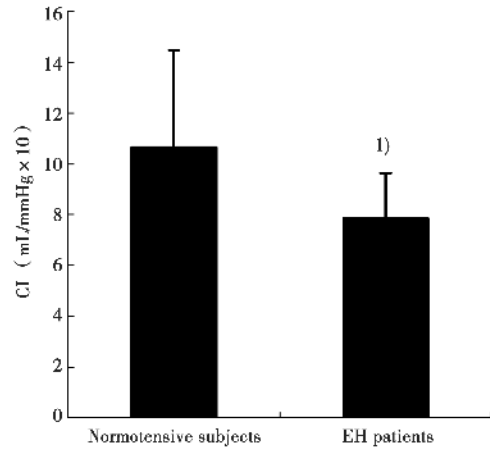


图 1 两组患者 C1 的比较。

Fig.1 Comparison of C1 large artery elasticity in two groups

1) $P < 0.05$ vs normotensive subjects

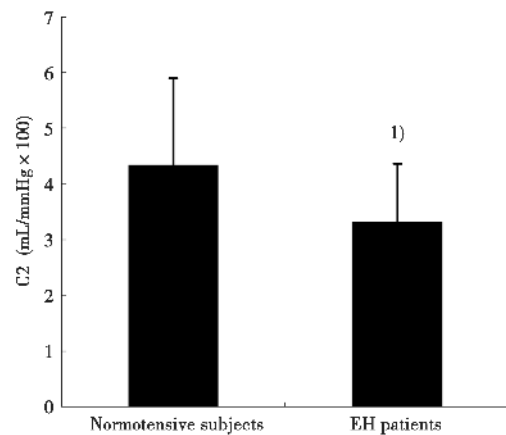


图 2 两组患者 C2 的比较

Fig.2 Comparison of C2 small artery elasticity in two groups

1) $P < 0.05$ vs normotensive subjects

2.3 内皮祖细胞功能与动脉弹性之间的关系

我们对两组患者内皮祖细胞功能与动脉弹性进行了直线相关回归分析,结果发现,循环内皮祖细胞迁移功能与 C1 或 C2 呈显著的直线相关回归关系(图 7, 8, $P < 0.05$)。同时,循环内皮祖细胞增殖功能与 C1 或 C2 也呈明显的直线相关回归关系(图 9, 10, $P < 0.05$)。上述结果提示,循环内皮祖细胞迁移和增殖功能可能与动脉弹性有关。

2.4 多种临床因素对动脉弹性的多元回归分析

为进一步评估内皮祖细胞数量和功能对动脉弹性的独立预测价值,我们采用了多元回归分析多种临床因素对动脉弹性的影响(表 2)。结果提示脉压、循环内皮祖细胞迁移和增殖功能是 C1 的独立预测因素 ($\text{adjusted } R^2 = 0.59, P < 0.001$)。同

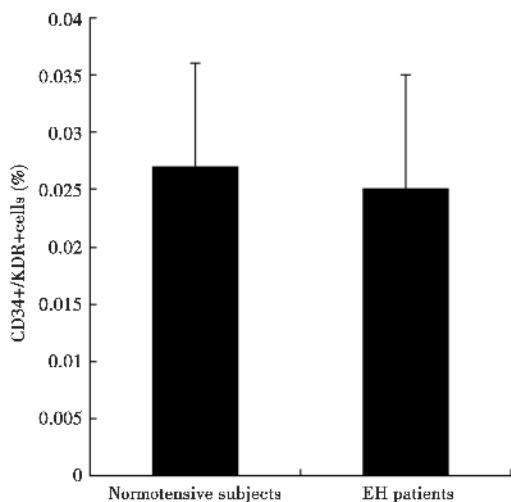


图 3 两组患者 CD34+KDR+细胞的比较

Fig.3 Comparison of CD34+KDR+ cells in two groups

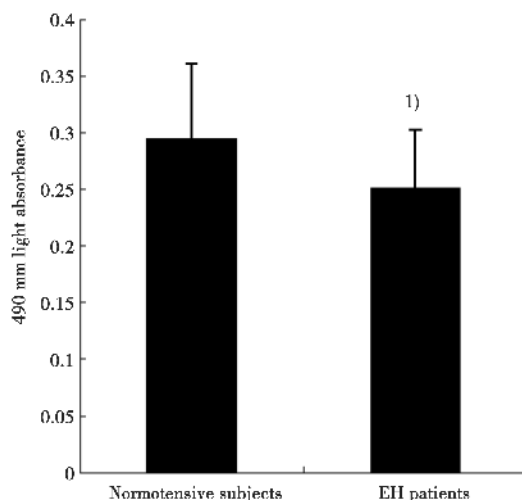


图 6 两组患者增殖能力的比较

Fig.6 Comparison of proliferative activity in two groups

1) $P < 0.05$ vs normotensive subjects

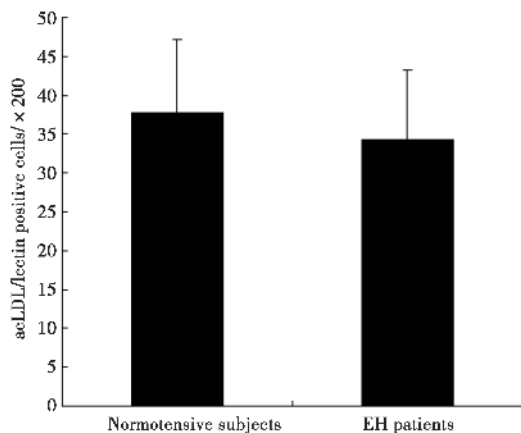


图 4 两组患者 ac-LDL+lectin+细胞的比较

Fig.4 Comparison of ac-LDL+lectin+ cells in two groups

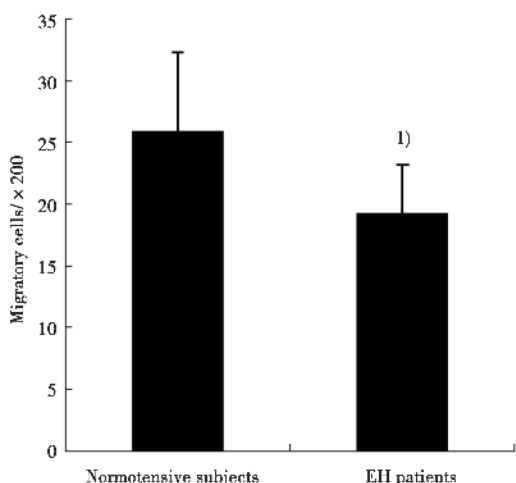


图 5 两组患者迁移能力的比较

Fig.5 Comparison of migratory activity in two groups

1) $P < 0.05$ vs normotensive subjects

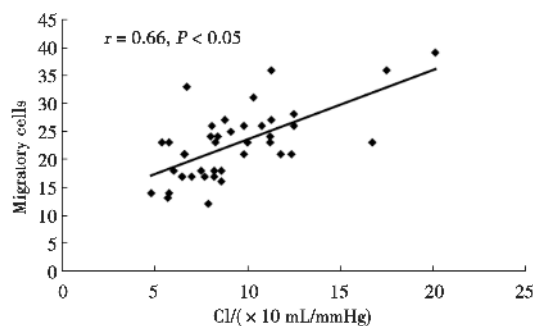


图 7 循环内皮祖细胞迁移功能与 C1 的直线相关回归关系

Fig.7 The correlation between migratory activity of circulating EPC and C1

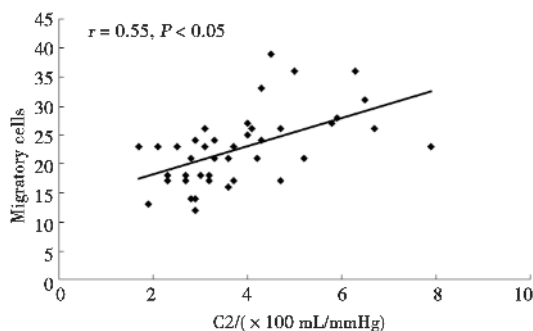


图 8 循环内皮祖细胞迁移功能与 C2 的直线相关回归关系

Fig.8 The correlation between migratory activity of circulating EPC and C2

时,循环内皮祖细胞迁移和增殖功能是 C2 的独立预测因素($adjusted R^2 = 0.270, P < 0.05$)。上述结果提示,循环内皮祖细胞迁移和增殖功能是 C1 和 C2 的独立预测因素。

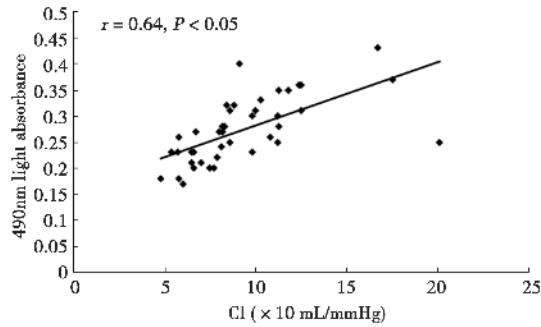


图 9 循环内皮祖细胞增殖功能与 C1 的直线相关回归关系

Fig.9 The correlation between proliferatory activity of circulating EPC and C1

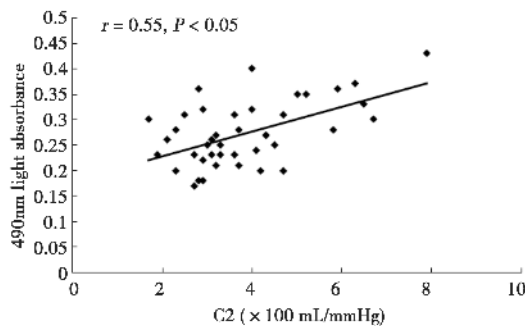


图 10 循环内皮祖细胞增殖功能与 C2 的直线相关回归关系

Fig.10 The correlation between proliferatory activity of circulating EPC and C2

3 讨论

本研究表明,与血压正常者相比,原发性高血压患者动脉弹性明显减退,循环内皮祖细胞迁移和增殖功能显著下降。同时,循环内皮祖细胞迁移或增殖功能和 C1 或 C2 呈明显正相关,多元回归分析显示内皮祖细胞迁移或增殖功能是 C1 或 C2 的独立预测因素,提示高血压血管内皮修复能力下降和功能障碍,导致动脉弹性减退。

高血压患者在病程早期即可出现明显血管损伤,动脉弹性功能是其重要标志之一,甚至在血压未明显升高之前就存在血管弹性的异常变化。研究显示,反映动脉弹性功能的指标可以预测高血压患者发生心血管事件的风险。大动脉弹性指数 C1 是舒张期血流容积减少与压力下降之间的比值,又称容量顺应性。小动脉弹性指数 C2 是舒张期血流容积振荡变化与振荡压力变化之间的比值,又称振荡顺应性。C1 与 C2 分别反映大动脉与

表 2 多元回归分析

Table 2 Multivariate Linear Regression Analysis

Variable	C1		C2	
	Standard coefficient	P Value	Standard coefficient	P Value
Age	0.139	0.314	-0.060	0.477
BMI	-0.071	0.606	-0.130	0.908
Systolic blood pressure	0.292	0.320	-0.045	0.640
PP	-0.559	0.045	0.168	0.455
Heart rate	-0.235	0.065	0.124	0.297
LDL	-0.125	0.273	-0.159	0.623
TG	-0.124	0.279	0.074	0.852
FPG	-0.094	0.461	0.032	0.712
hrCRP	0.155	0.328	0.077	0.876
CD34+KDR+ positive cells	0.125	0.344	0.027	0.682
DiI-acLDL/lectin positive cells	-0.091	0.423	0.062	0.030
EPC migration	0.347	0.021	0.435	0.027
EPC proliferation	0.309	0.029	0.419	< 0.05
Adjusted R ²	0.590		0.270	
Significance (ANOVA)		< 0.001		

Bold entries indicate significant p values. ANOVA: analysis of variance; EPC: endothelial progenitor cells

小动脉弹性功能,C1 和 C2 越小,表示大动脉与小动脉弹性越差。本研究发现,高血压患者 C1 与 C2 均明显减退,这与前述报道一致^[1-2],提示高血压导致动脉弹性减退。

研究表明,骨髓和外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞—内皮祖细胞,是修复血管内皮结构和功能损伤的重要细胞生物学机制^[3]。在衰老和高脂血症等多种心血管疾病危险因素存在时,循环内皮祖细胞数量和功能明显下降,并且与内皮依赖舒张功能的减退有关。通过增加内皮祖细胞的数量和改善其功能活性能有效改善受损的内皮依赖性的舒张功能,修复血管内皮损伤,对心、脑、肾等靶器官的血管损伤也有保护作用^[4]。本研究发现,高血压患者循环内皮祖细胞的迁移和增殖功能明显降低,提示内皮祖细胞功能下降可能是高血压患者血管损伤的重要细胞生物学机制。同时,相关分析显示循环内皮祖细胞迁移或增殖功能与 C1 或 C2 呈明显正相关,进一步的多元回归分析显示循环内皮祖细胞迁移和增殖功能是 C1 和 C2 的独立预测因素,提示循环内皮祖细胞功能下降与高血压动脉弹性减退密切相关。因此,基于本试验及之前的研究报道^[10-13],我

们提出高血压状态下循环内皮祖细胞功能受损导致内源性血管内皮修复能力下降,是高血压致动脉弹性减退的机制之一。其中,对于小动脉可能通过导致血管内皮细胞功能紊乱增加血管壁张力,导致震荡顺应性即 C2 下降;对于大动脉可能通过内皮功能紊乱影响血管结构而发挥作用,导致容量顺应性即 C1 下降。

本研究还发现高血压患者循环内皮祖细胞数量与血压正常者无明显差别,这与前述报道相似^[14-15]。国外亦有报道高血压患者循环内皮祖细胞数量明显减少,与本研究结果有所差别^[16]。我们认为这种差异可能与不同研究的病例入选标准、内皮祖细胞数量检测方法和体外培养条件有关。由于本研究选择病例以血压轻度升高为主,这表明轻度高血压可能主要导致循环内皮祖细胞功能受损而非数量的减少。但是,有关具体的机制仍有待于进一步探讨。

总之,高血压导致循环内皮祖细胞功能受损和动脉弹性降低,并且循环内皮祖细胞功能受损与动脉弹性下降密切相关,提示内源性血管内皮修复能力下降是高血压血管损伤的重要机制之一。因此,循环内皮祖细胞可作为评估高血压血管损伤新的分子生物学标记物和重要治疗靶点。

参考文献:

- [1] Cohn JN, Duprez DA, Grandits GA. Arterial elasticity as part of a comprehensive assessment of cardiovascular risk and drug treatment [J]. *Hypertension*, 2005, 46(1): 217-220.
- [2] Franklin SS. Arterial stiffness and hypertension: a two-way street? [J]. *Hypertension*, 2005, 45(3): 349-351.
- [3] Boos CJ, Lip GYH, Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48(8): 1538-1547.
- [4] Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: Limitations for therapy? [J]. *Arter Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(2): 257-266.
- [5] Yang Z, Wang JM, Chen L, et al. Acute exercise-induced nitric oxide production contributes to upregulation of circulating endothelial progenitor cells in healthy subjects [J]. *J Hum Hypertens*, 2007, 21(6): 452-460.
- [6] Tao J, Wang Y, Yang Z, et al. Circulating endothelial progenitor cell Deficiency contributes to impaired arterial elasticity in persons of advancing age [J]. *J Hum Hypertens*, 2006, 20(7): 490-495.
- [7] Laurent S. Surrogate measures of arterial stiffness: do they have additive predictive value or are they only surrogates of a surrogate? [J]. *Hypertension* 2006, 47(3): 325-326.
- [8] Ziemann SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(5): 932-943.
- [9] 杨震,李德昶,夏文豪,等. 急性运动后健康人循环内皮祖细胞的动态变化及其与 NO 水平的关系 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2009, 30(5): 501-506.
- [10] Yang Z, Tao J, Wang JM, et al. Shear stress contributes to t-PA mRNA expression in human endothelial progenitor cells and nonthrombogenic potential of small diameter artificial vessels [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(2): 577-584.
- [11] Yang Z, Wang JM, Wang LC, et al. In vitro shear stress modulates antithrombogenic potentials of human endothelial progenitor cells [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2007, 23(2): 121-127.
- [12] 杨震,陶军,王洁梅,等. 切应力对内皮祖细胞 t-PA 基因表达和小径人工血管移植通畅率的影响 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2007, 28(1): 25-29.
- [13] 杨震,陶军,涂昌,等. 小径聚氨酯人工血管内皮化种子细胞的体外诱导分化及种植 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(2): 138-141.
- [14] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. *Circ Res*, 2001, 89(1): e1-e7.
- [15] Delva P, Degan M, Vallerio P, et al. Endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension [J]. *J Hypertens*, 2007, 25(1): 127-132.
- [16] Pirro M, Schillac G, Menecali C, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitors and HOXA9 expression in CD34+ cells of hypertensive patients [J]. *J Hypertens*, 2007, 25(10): 2093-2099.

(编辑 孙慧兰)