

血管内皮细胞生长因子和血浆组织激肽释放酶与冠状动脉狭窄的相关性研究

傅 聪,姚玉宇*,马根山,冯 毅,汤成春,陈 忠,戴启明,童嘉毅,丁建东,罗 丹,朱 建,李拥军,鞠成伟,陆 静,章晓国

(东南大学医学院心血管病研究所,东南大学附属中大医院心血管内科,江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:确定冠心病患者血浆中血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和组织激肽释放酶(tissue kallikrein, TK)水平与冠脉狭窄程度的相关性。方法:根据冠状动脉血管造影结果将 110 例患者按冠脉狭窄程度分为 4 组:单支狭窄 50%~69%组(组 1, $n = 32$)、单支狭窄 70%~99%和(或)多支病变(每支狭窄 50%~99%)组(组 2, $n = 29$)、单支或(和)多支完全闭塞组(组 3, $n = 25$)、正常无狭窄组(对照组, $n = 24$)。ELISA 法检测血浆中 VEGF 和 TK 的水平。结果:组 1:TK 水平为($1\ 900 \pm 461$) pg/ml, VEGF 为(54.29 ± 23.22) pg/ml;组 2:TK 水平为($2\ 203 \pm 268$) pg/ml, VEGF 为(63.00 ± 26.72) pg/ml;组 3:TK 水平为($4\ 823 \pm 1005$) pg/ml, VEGF 为(71.27 ± 17.86) pg/ml;对照组:TK 水平为(781 ± 63) pg/ml, VEGF 为(54.75 ± 23.22) pg/ml。使用多元线性逐步回归分析显示血浆中 VEGF 水平与狭窄程度之间无显著相关性,而 TK 水平与狭窄程度之间存在显著的相关性($P < 0.001$),且与高血压($P = 0.946$)、糖尿病($P = 0.288$)、吸烟($P = 0.933$)等危险因素无显著相关性。TK 水平在 $1\ 725$ pg/ml 阈值处具有诊断冠状动脉完全堵塞最高的敏感性和特异性。结论:冠心病患者血浆中 VEGF 和 TK 等促血管新生因子均高表达,TK 水平与冠状动脉狭窄程度显著独立相关,可作为反映冠状动脉狭窄严重程度的一项重要指标。

[关键词] 组织激肽释放酶;血管内皮细胞生长因子;血管新生;冠状动脉;粥样硬化

[中图分类号] R543.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)09-1241-05

Correlation between vascular endothelial growth factor, plasma tissue kallikrein and coronary artery stenosis

FU Cong, YAO Yu-yu*, MA Gen-shan, FENG Yi, TANG Cheng-chun, CHEN Zhong, DAI Qi-ming, TONG Jia-yi, DING Jian-dong, LUO Dan, ZHU Jian, LI Yong-jun, JU Cheng-wei, LU Jing, ZHANG Xiao-guo

(Department of Cardiology, Institute of Cardiovascular, Medical School of Southeast University, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the association of plasma vascular endothelial growth factor(VEGF) and tissue kallikrein (TK) levels with coronary artery stenosis degree in coronary artery disease patients. **Methods:** According to coronary angiography, the patients were stratified as 50% to 69% stenosis in one artery (group 1, $n = 32$), 70% to 99% stenosis in one artery and (or) 50% to 99% stenosis in two or three artery (group 2, $n = 29$), total occlusion in one and(or) multi-artery (group 3, $n = 25$) and no stenosis (control, $n = 24$). Plasma TK and VEGF concentrations were measured by ELISA. **Results:** TK augmented from (781 ± 63) pg/ml in no stenosis to ($1\ 900 \pm 461$) pg/ml in group 1, ($2\ 203 \pm 268$) pg/ml in group 2 and ($4\ 823 \pm 1\ 005$) pg/ml in group 3. VEGF level was (54.75 ± 23.22) pg/ml in no stenosis, (54.29 ± 23.22) pg/ml in group 1, (63.00 ± 26.72) pg/ml in group 2 and (71.27 ± 17.86) pg/ml in group 3. Linear multivariate stepwise analysis showed that TK level was independently associated with coronary artery stenosis degree ($P < 0.001$) after adjusting for hypertension ($P = 0.990$), diabetes mellitus ($P = 0.574$) and smoking ($P = 0.561$). No association was found between VEGF level and obstruction grading. A threshold of $1\ 725$ pg/ml provided the maximized predictive value of total obstruction. **Conclusion:** Plasma TK level was significantly higher in the presence of coronary artery disease. TK level was independently associated with coronary artery stenosis grading. TK measurement may be useful for the diagnosis of coronary artery stenosis grading.

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30871071, 81070085)

*通讯作者, E-mail: yaoyuyun@hot.com

[Key words] tissue kallikrein; vascular endothelial growth factor; angiogenesis; coronary artery; atherosclerosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(9): 1241-1245]

冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)是严重影响人群健康和生活质量的一种常见病、多发病。冠状动脉高度狭窄、高血压、血脂异常和吸烟都是冠心病的危险因素。目前诊断冠心病主要通过冠状动脉血管造影确定冠状动脉狭窄程度。血管造影作为一种有创的检查手段,具有一定的危险性,而目前临床上已广泛使用的心梗标志物包括肌钙蛋白 I(cTnI)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和肌红蛋白(MYO)仍很难做到较高的特异性和敏感性^[1]。因此,寻找一种可靠的急性冠脉综合症的标志物正成为研究的热点。

血管新生是器官和组织缺血性损伤后的一个重要的修复过程。在急性冠脉综合征发病后 24 h 内,即有明显的血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)介导的新生血管的形成^[2-3]。激肽释放酶-缓激肽系统(kallikrein-kinin system, KKS)在这一血管新生过程中也发挥重要的调节作用,研究已证实经组织激肽释放酶(tissue kallikrein, TK)降解产物缓激肽(bradykinin, BK)能够通过多种途径,如与 B1、B2 受体结合,上调碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、VEGF 等促进血管新生的因子促进缺血性损伤后的血管新生^[4-5]。同时,TK 基因表达上调可显著减轻缺血损伤后心肌的损伤和重塑,改善心功能^[6-7],可见 TK 在缺血性损伤后的新生血管形成过程中发挥关键性的作用。作为血管新生的一个标志物,TK 在急性冠脉综合征中的诊断价值需进一步研究。

为此,本文检测了 86 例冠状动脉血管造影阳性的冠心病患者和 24 例造影阴性的患者血浆 VEGF 和 TK 水平,讨论其与冠状动脉狭窄程度的相关性,并探讨 TK 诊断冠心病的诊断价值。

1 对象和方法

1.1 对象

选取 110 例 2010 年 4 月~2011 年 8 月在东南大学附属中大医院心脏内科就诊病例,其中冠状动脉血管造影结果阳性的冠心病患者 86 例,造影阴性患者 24 例。根据冠状动脉血管造影的检查结果,将 110 例患者分为 4 组,组 1:单支狭窄 50%~69%,32 例,男 21 例,女 11 例,其中稳定型心绞痛 29 例,不稳定型心绞痛 3 例;组 2:单支狭窄 70%~99%或

(和)多支病变(每支狭窄 50%~99%),29 例,男 17 例,女 12 例,其中稳定型心绞痛 24 例,不稳定型心绞痛 5 例;组 3:单支或(和)多支完全闭塞(至少有 1 支血管狭窄 100%),25 例,男 18 例,女 7 例;对照组:冠状动脉正常无狭窄,24 例,男 12 例,女 12 例。

病例排除标准:①<50 岁或>75 岁;②经皮冠状动脉介入治疗术(PCI)后再狭窄;③陈旧性心肌梗死;④细菌感染性疾病;⑤恶性肿瘤;⑥肝肾功能不全。所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血清样本的收集和检测

患者入院时使用 EDTA-K₃ 包被的真空采血管取静脉血 2 ml。1 000 r/min 4℃离心,20 min 分离出血浆,装入 500 μl EP 管中,-40℃保存。

1.2.2 生化检测

总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)由本院检验科测得(东芝 7600 型自动血生化分析仪,日本东芝公司)。

1.2.3 ELISA 检测 VEGF、TK 表达

VEGF 通过人 VEGF ELISA 试剂盒测得(武汉博士德生物工程有限公司)。TK 通过双抗体夹心 ELISA 法测得,检测试剂由美国南卡莱罗纳州立医科大学 Dr Julie Chao 惠赠。方法:使用抗人激肽释放酶 IgG(2 μg/ml,100 μl/孔)包被 96 孔板,4℃过夜。每孔加入 200 μl 含 1%BSA 的 PBS 缓冲液,37℃封闭 2 h。使用含 0.1%吐温-20 的 PBS 缓冲液反复清洗后,每孔加入人激肽释放酶标准品(0.04~25.00 ng/ml)和血清样本(样本经新配制的含 0.05%吐温-20 和 0.5%明胶的 PBS 稀释 15 倍)100 μl,37℃孵育 90 min。清洗液清洗 3 次后,每孔加入 100 μl 生物素标记的抗人激肽释放酶抗体(1 μg/ml),37℃孵育 60 min。使用洗液洗去未结合的生物素标记的抗体后,每孔加入 100 μl 过氧化物酶-卵白素复合物(1 μg/ml),37℃孵育 30 min。使用洗液和 PBS 缓冲液各洗数次后,每孔加入 100 μl 新配制的显色液,室温孵育 30 min 后每孔加入 50 μl 终止液,使用酶标仪在 405 nm 处读取吸光度值。通过标准曲线计算出样本中 TK 的含量。

1.3 统计学方法

使用 SPSS17.0 进行统计分析。定量资料使用单因素方差分析和独立样本的 t 检验。定性资料使用 χ^2 检验。使用最小显著差法进行组间两两比较。使用多元逐步回归进行 TK 和 VEGF 与狭窄程度、吸烟、高血压、糖尿病的相关性分析。血浆中 TK 和 VEGF 诊断冠状动脉完全阻塞的敏感性和特异性

用 ROC 曲线表示。确定检验水准为 0.05, 检验效能 0.10。

2 结果

2.1 各组病例资料

各组患者性别、年龄、高血压例数、糖尿病例数、吸烟例数、血脂之间无显著差异(表 1)。

表 1 病例资料和生化指标

Table 1 Clinical and biochemical characteristics of patients

项目	组 1	组 2	组 3	对照组	P 值
例数(n,男/女)	32(21/11)	29(17/12)	25(18/7)	24(12/12)	0.351
年龄(岁)	62.2 ± 8.2	65.7 ± 8.0	65.5 ± 8.1	61.7 ± 6.0	0.223
高血压[n(%)]	18(56.3)	14(48.3)	18(72.0)	16(66.7)	0.682
糖尿病[n(%)]	2(6.3)	3(10.3)	5(20.0)	3(12.5)	0.407
吸烟[n(%)]	9(28.1)	9(31.0)	7(28.0)	5(20.8)	0.840
TG(mmol/L)	1.50 ± 0.75	1.42 ± 0.75	1.44 ± 0.46	1.40 ± 0.50	0.949
TC(mmol/L)	4.22 ± 0.89	4.11 ± 0.90	4.25 ± 1.15	3.98 ± 0.62	0.687
LDL-C(mmol/L)	2.65 ± 0.75	2.43 ± 0.72	2.83 ± 0.99	2.39 ± 0.60	0.166
HDL-C(mmol/L)	1.11 ± 0.24	1.07 ± 0.22	0.98 ± 0.24	1.05 ± 0.18	0.124

2.2 各组病例血浆中 VEGF 水平

对照组 VEGF 为 (54.75 ± 23.22) pg/ml, 组 1 为 (54.29 ± 23.22)pg/ml, 组 2 为 (63.00 ± 26.72) pg/ml, 组 3 为 (71.27 ± 17.86) pg/ml, 4 组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.958$, 图 1)。血浆中 VEGF 水平与冠状动脉狭窄程度和斑块不稳定之间无显著相关性 ($P = 0.393$)。

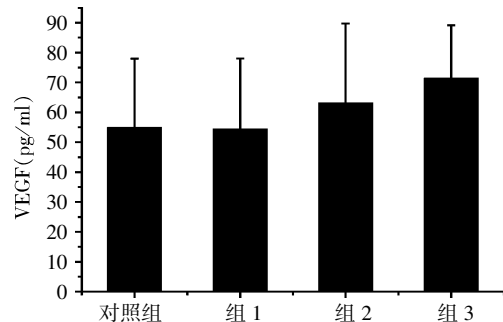
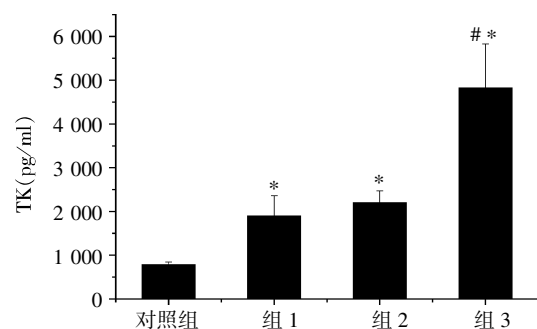


图 1 各组病例血浆中 VEGF 水平

Figure 1 Plasma VEGF level in each group

2.3 各组病例血浆中 TK 水平

对照组 TK 为 (781 ± 63)pg/ml, 组 1 TK 为 (1 900 ± 461)pg/ml, 组 2 TK 为 (2 203 ± 268)pg/ml, 组 3 TK 为 (4 823 ± 1 005)pg/ml, 组 1、组 2、组 3 与对照组比较, 组 3 与组 1、组 2 比较, P 均 < 0.05 (图 2)。多元线性逐步回归分析显示血浆中 TK 水平与冠状动脉狭窄程度和斑块不稳定之间存在显著相关性 ($P < 0.001$), 且与高血压 ($P = 0.946$)、糖尿病 ($P = 0.288$)、吸烟 ($P = 0.933$) 等冠心病的危险因素无相关。而组 1 和组 2 之间 TK 水平无显著差异 ($P = 0.581$)。



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与组 1、组 2 比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 各组病例血浆中 TK 水平

Figure 2 Plasma TK level in each group

2.4 血浆中 VEGF 和 TK 对冠心病的诊断价值

ROC 曲线显示血浆中 TK 水平具备良好的诊断冠状动脉完全阻塞的价值, 能够作为判断不稳定斑块的一项指标。结果显示在 1 725 pg/ml 阈值处获得最高的特异性和敏感性, 曲线下面积为 0.883。VEGF 不具备良好的诊断价值, 曲线下面积 0.704 (图 3)。

3 讨论

TK 是血管新生的生物标志物之一, 并对缺血损伤的组织具有良好的保护和修复作用, 促进缺血组

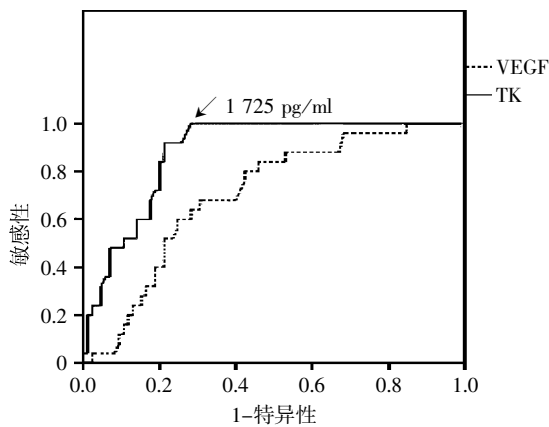


图3 VEGF和TK诊断单支和(或)多支完全闭塞的ROC曲线

Figure 3 ROC curve analysis for the predictive value of VEGF and TK for total occlusion in one and (or) multi-artery

织中新生血管形成和损伤修复^[8]。TK通过降解激肽原产生BK, BK与B2受体的结合, 激活了一系列的促血管新生的因子, 从而发挥保护作用^[9-11]。现已发现TK除了能够促进VEGF等促血管新生的因子对缺血组织进行修复, 从而发挥间接的保护作用外, 还有直接的保护作用, 减轻组织缺血后的损伤, 促进血流灌注的恢复^[12]。Paolo等^[13]发现颈动脉粥样硬化斑块的患者血浆中TK水平显著升高, 且与斑块狭窄程度呈正相关关系。而在狭窄再通以后, TK水平显著下降。VEGF水平与狭窄程度无显著的相关性, 提示在动脉粥样硬化的过程中, TK参与了发病的过程, 并与动脉粥样斑块的稳定性密切相关。在冠状动脉粥样硬化的过程中, 多种炎症因子参与斑块的形成和发展过程^[14], 同时新生血管的形成在斑块形成的过程中发挥重要作用^[15], TK的表达水平可能与斑块的狭窄程度和稳定性之间存在密切的关系。

本研究显示冠状动脉粥样硬化患者血清中TK水平显著上调, 与冠状动脉的狭窄程度存在显著的相关性, 且与吸烟、高血压、糖尿病等危险因素无显著相关性。这提示在冠状动脉粥样硬化的过程中, TK的表达升高促进了新生血管的形成, 发挥了对缺血损伤组织的保护作用。TK水平在单支狭窄50%~69%患者和单支狭窄70%~99%或(和)多支病变(每支狭窄50%~99%)患者之间无显著差异, 而与冠状动脉完全闭塞患者之间差异明显, 提示TK水平与冠状动脉粥样硬化斑块的不稳定性密切相关, 斑块不稳定和破裂导致冠状动脉完全闭塞, TK水平在这一急性期急剧升高, 但与未破裂的稳定斑块阻塞程度的相关性不明显。冠脉完全闭塞患者血浆中TK表

达显著增高提示其可以作为良好的诊断冠脉完全闭塞、评估斑块稳定性的辅助指标。ROC曲线也证实了这一推断, 显示在1 725 pg/ml处具备最高的特异性和敏感性, 可作为诊断冠状动脉狭窄程度的一项指标。

VEGF是血管新生过程中的一个重要因子, 研究已证实与冠状动脉疾病密切相关^[16]。在动脉粥样硬化不稳定斑块形成过程中, VEGF发挥着十分复杂的作用。一方面可以促进新生血管的形成, 改善血管功能, 研究证实BK可以激活VEGF的受体KDR/Flk-1, 导致内皮细胞eNOS的激活, 进而促进血管新生。另一方面又会作为炎症因子加速斑块形成的病理过程, 造成斑块不稳定^[17]。此外, 有研究指出, VEGF被酶类降解是造成动脉硬化粥样斑块不稳定出血的原因之一^[18]。本研究提示血浆中VEGF水平与冠状动脉狭窄程度无显著的相关性, 在某些冠心病患者血浆中会出现降低。可能的原因是在动脉粥样硬化发生的过程中, 由于血管内皮细胞受损, 导致某些血管新生的途径受损, 造成VEGF的表达降低。

本研究经多元逐步回归分析剔除高血压、糖尿病、吸烟等冠脉综合症的危险因素后, VEGF与冠状动脉狭窄程度无显著相关性, TK与冠心病冠状动脉狭窄程度之间存在显著的相关性, 并对冠状动脉狭窄程度具有良好的辅助诊断价值。

[参考文献]

- [1] Hassan ME, Robert HC. Cardiac markers of acute coronary syndromes: is there a case for point-of-care testing? [J]. Clin Biochem, 2002, 35(1): 13-27
- [2] Chung NAY, Lydakis C, Belgore AD, et al. Angiogenesis in myocardial infarction: An acute or chronic process? [J]. Eur Heart J, 2002, 23(20): 1604-1608
- [3] Kang S, Yang YJ, Wang QZ, et al. Angiogenesis and vasculogenesis at 7-day of reperfused acute myocardial infarction [J/OL]. Nature Precedings, 2008. <http://hdl.handle.net/10101/npre.2008.2066.1>
- [4] Parenti A, Morbidelli L, Ledda F, et al. The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway [J]. FASEB J, 2001, 15(8): 1487-1489
- [5] Knox AJ, Corbett L, Stocks J, et al. Human airway smooth muscle cells secrete vascular endothelial growth factor: up-regulation by bradykinin via a protein kinase C and prostanoid-dependent mechanism [J]. FASEB J, 2001, 15(13): 2480-2488

- [6] Ward MR, Lavoie J, Stewart DJ. "B2 or not B2? ": Kinin receptors and endothelial progenitor cell dysfunction [J]. *Circ Res*, 2008, 103(11): 1202-1203
- [7] Chao J, Yin H, Gao L, et al. Tissue kallikrein elicits cardio protection by direct kinin B2 receptor activation independent of kinin formation [J]. *Hypertension*, 2008, 52(4): 715-720
- [8] Julie C, Shen B, Gao L, et al. Tissue kallikrein in cardiovascular, cerebrovascular and renal diseases and skin wound healing [J]. *Biol Chem*, 2010, 391(4): 345-355
- [9] Oliver AS, Christine R, Costanza E, et al. Critical role of tissue kallikrein in vessel formation and maturation: implications for therapeutic revascularization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(5): 657-664
- [10] Sanchez ML, Neysari S, Jakob S, et al. B2-kinin receptor plays a key role in B1-, angiotensin converting enzyme inhibitor-, and vascular endothelial growth factor-stimulated in vitro angiogenesis in the hypoxic mouse heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 80(1): 106-113
- [11] Emanuelli C, Salis MB, Van LS, et al. Akt/ protein kinase B and endothelial nitric oxide synthase mediate muscular neovascularization induced by tissue kallikrein gene transfer [J]. *Circulation*, 2004, 110(12): 1638-1644
- [12] Smith RS Jr, Gao L, Chao L, et al. Tissue kallikrein and kinin infusion promotes neovascularization in limb ischemia [J]. *Biol Chem*, 2008, 389(6): 725-730
- [13] Paolo P, Costanza E, Elisa D, et al. Circulating tissue kallikrein levels correlate with severity of carotid atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(6): 1104-1110
- [14] Dunmore BJ, McCarthy MJ, Naylor AR, et al. Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques [J]. *J Vasc Surg*, 2007, 45(1): 155-159
- [15] Kathryn JM, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Cell*, 2011, 145(3): 341-355
- [16] Ripa RS, Jørgensen E, Baldazzi F, et al. The influence of genotype on vascular endothelial growth factor and regulation of myocardial collateral blood flow in patients with acute and chronic coronary heart disease [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2009, 69(6): 722-728
- [17] Holm PW, Slart RH, Zeebregts CJ, et al. Atherosclerotic plaque development and instability: a dual role for VEGF [J]. *Ann Med*, 2009, 41(4): 257-264
- [18] Le DJ, Ho-Tin-Noé B, Louedec L, et al. Immaturity of microvessels in haemorrhagic plaques is associated with proteolytic degradation of angiogenic factors [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 85(1): 184-193

[收稿日期] 2011-12-21

科技出版物中文字与标点符号的书写

1. 汉字的使用应严格执行国家的有关规定,除特殊需要外,不得使用已废除的繁体字、异体字等不规范汉字。
2. 标点符号的用法应以 GB/T 15834-1995《标点符号用法》为准,根据科技书刊的习惯,建议:
 - (1) 省略号用 2 个三连点,其后不写“等”字,外文字符只用 1 个三连点;
 - (2) 波浪号“~”用于表示数值范围;
 - (3) 一字线“—”用于表示地域范围、走向、相关、递进等;
 - (4) 半字线“-”用于表示复合名词等;
 - (5) 外文中的标点符号应遵循外文的习惯用法,如连字符“-”。

(本刊编辑:接雅俐)