

急性心肌梗死患者血管紧张素 II 水平对外周血内皮祖细胞的影响

朱傲霜^{1,2}, 丁志坚^{1*}, 卢绪章^{2,3}, 夏蕾², 李海燕¹

(¹南京医科大学附属常州第二人民医院心内科, ²中心实验室, ³血液科, 江苏 常州 213003)

[摘要] 目的:急性心肌梗死(acute myocardial infraction, AMI)患者外周血中血管紧张素 II (angiotensin II, Ang-II)水平对内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的数目变化的影响。方法:入选的 28 例 AMI 患者(实验组)和 30 例冠状动脉造影阴性患者(对照组),用 ELISA 法检测 AMI 患者急性期、恢复期以及对照组血清中 Ang-II、基质细胞衍生因子-1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α)的水平,同时用密度梯度离心法获得单个核细胞,用 CD34、VEGF 和 CD133 抗体标定 EPCs,用流式细胞仪检测外周血中 EPCs 占单个核细胞的比率。结果:AMI 患者急性期 Ang-II 水平 (90.40 ± 6.39)pg/ml 明显高于恢复期(72.57 ± 2.42)pg/ml 和对照组(69.14 ± 3.73)pg/ml ($P = 0.002 4$),同时 AMI 患者急性期 EPCs 占外周血单个核细胞的比率为为(0.043 \pm 0.004)%, 明显高于恢复期 (0.024 \pm 0.010)% 和对照组 (0.012 \pm 0.001)% ($P < 0.000 1$), 但 AMI 患者急性期 SDF-1 α 的水平 (171.1 ± 35.81) pg/ml 同恢复期(130.30 ± 28.84) pg/ml 及对照组(116.50 ± 29.19) pg/ml 之间无明显差异($P = 0.370 3$)。在 AMI 患者急性期外周血中 EPCs 和 Ang-II 水平呈负相关, 而与 SDF-1 α 水平无明显相关性。结论:AMI 患者急性期循环中的 Ang-II 水平及 EPCs 数量均升高,但是 Ang-II 抑制了 EPCs 的数量。

[关键词] 急性心肌梗死; 血管紧张素 II; 内皮祖细胞

[中图分类号] R542.2*2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)11-1565-05

Effect of angiotensin II concentration on peripheral blood endothelial progenitor cells in acute myocardial infraction

ZHU Ao-shuang^{1,2}, DING Zhi-jian^{1*}, LU Xu-zhang^{2,3}, XIA Lei², LI Hai-yan¹

(¹Department of Cardiology, ²Central Laboratory, ³Department of Hematology, Changzhou No.2 People's Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of angiotensin II (Ang-II) on numerous of endothelial progenitor cells (EPCs) in acute myocardial infraction (AMI). **Methods:** Twenty-eight patients with AMI and 30 controls with negative results of coronary artery angiography were selected in the study. The concentration of Ang-II and stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) in different periods of patients was determined with immunosorbent assay (ELISA). Circulating EPCs were stained with anti-CD34, VEGF and CD133 antibodies, and then the ratio of EPCs to plasma mononuclear cells was analyzed by three-colour flow cytometry. **Results:** The concentration of Ang-II in acute stage of AMI patients was (90.40 ± 6.39) pg/ml and higher than that of AMI patients in recovery stage [(72.57 ± 2.42) pg/ml] and control group [(69.14 ± 3.73) pg/ml] ($P = 0.002 4$). But the concentration of SDF-1 α of AMI patients in acute stage was (171.10 ± 35.81)pg/ml and had not significant difference with that of AMI patients in recovery stage [(130.30 ± 28.84) pg/ml] and control group [(116.50 ± 29.19) pg/ml] ($P = 0.370 3$). Circulating EPCs were significantly increased in acute stage of AMI patients [(0.043 \pm 0.004)%] compared with the recovery stage of AMI patients [(0.024 \pm 0.010)%] and control group [(0.012 \pm 0.001)%] ($P < 0.000 1$). In acute stage of AMI patients, circulating EPCs had negative correlation with the concentration of Ang-II ($r = -0.801, P < 0.001$), but had no correlation with the concentration of SDF-1 α ($r = -0.076, P = 0.702$). **Conclusion:** Quantity of EPCs and concentration of Ang-II increased in acute stage of AMI patients, but Ang-II could reduce the quantity of EPCs.

[Key words] acute myocardial infraction; angiotensin II; endothelial progenitor cell

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(11): 1565-1569]

[基金项目] 常州市卫生局重大课题(ZD201012)

*通讯作者, E-mail: dingzhijian@medmail.com.cn

以动脉粥样硬化为病理基础的冠状动脉粥样硬化性心脏病的发病率正逐年上升,内皮细胞损伤是动脉粥样硬化的重要始动环节。血管内膜损伤后,内皮修复极为重要。传统观念认为只有依靠损伤血管内膜邻近的内皮细胞分化、增殖才能参与及促进损伤处内皮细胞再生。但近年来动物实验和临床研究证实,内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)能够分化成血管内皮细胞的干细胞^[1-2],研究表明血管内皮受损后新生血管中 25%的内皮细胞由内皮祖细胞分化而来^[3-4],而组织损伤和缺血促使实质细胞和炎症细胞合成并释放血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质细胞衍生因子-1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α)^[5]等促血管新生因子,动员并趋化骨髓中的 EPCs 整合到血管新生的活跃区域,参与内皮修复及血管新生。

众所周知,肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)是重要的体液调节系统,而血管紧张素 II(angiotensin II, Ang-II)作为 RAS 的中心环节,除调节电解质平衡和血管张力外,还与平滑肌细胞的迁移和增殖、增加血管炎症调节酶的表达等有关,本课题组也曾报道过血管紧张素受体阻断剂(receptor blocking pharmac, ARB)可通过抑制心肌组织中的 RAS 而改善心肌肥厚及纤维化^[6]。研究表明急性心肌梗死(acute myocardial infraction, AMI)患者早期使用血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACE-I)可有效改善心肌梗死后心衰及心室重构^[7],间接证明心肌梗死后患者的循环 RAS 被激活,肾素、Ang-II 水平升高诱发心力衰竭及导致心室重构。本研究通过分析 AMI 患者循环中 Ang-II 的水平以及外周血中 EPCs 数量的变化,探讨循环中 RAS 对 EPCs 的影响。

1 资料和方法

1.1 资料

1.1.1 研究对象

28 例 AMI 患者为南京医科大学附属常州第二人民医院 2009 年 10 月~2011 年 8 月收治的初诊患者,入院距发病时间均 < 72 h,平均发病时间 25 h,AMI 诊断均符合 WHO 诊断标准。28 例患者中,男 17 例,女 11 例,38~78 岁,中位年龄 65 岁。另选同期入院冠状动脉造影阴性的患者为对照组,男 14 例,女 16 例,37~79 岁,中位年龄 68 岁。两组在

性别以及中位年龄上差异无统计学意义。排除标准:所有入选者均排除近期手术外伤史、糖尿病、皮肤溃疡、炎症、肿瘤和血液系统疾病等影响 EPCs 的因素。所有患者均检测高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、甘油三酯(triglyeride, TG)。临床基本资料如表 1 所示。

表 1 患者临床基本资料

Table 1 The baseline data of the study participants

指标	对照组 (n = 30)	AMI 组 (n = 28)
体质指数(BMI)	22.42 ± 2.12	25.75 ± 1.96
高血压史[n(%)]	22(73.3)	23(82.1)
糖尿病史[n(%)]	7(23.3)	13(46.4)
吸烟史[n(%)]	13(43.3)	17(60.7)
HDL-C(mmol/L)	1.41 ± 0.36	1.04 ± 0.28
LDL-C(mmol/L)	2.21 ± 0.73	2.59 ± 0.73
TG(mmol/L)	1.47 ± 1.22	1.99 ± 1.52

1.1.2 试剂和仪器

淋巴细胞分离液(Ficoll, 美国 Gibco 公司);抗 CD34-FITC、抗 CD133-PE、抗 VEGF-R2 biotin conjugate 抗体(美国 BD 公司);Percp Streptavidin 抗体(美国 R&D Systems 公司);SDF-1 α 和 Ang-II 的 ELISA 试剂盒(美国 Calbiochem 公司);流式细胞仪(FACS Canto II, 美国 BD 公司);酶标仪(Spectra-Max340PC384, 美国 Molecular Devices 公司)。

1.2 方法

1.2.1 检测外周血中 EPCs 细胞

目前认为 EPCs 细胞表面表达 CD34、VEGF 和 CD133 抗原^[4],用不同荧光标记的这 3 种抗原的抗体标识 EPCs 细胞,用流式细胞仪检测外周血中 EPCs 占单个核细胞的比率,具体方法为:抽取各组患者外周血 5 ml,用淋巴细胞分离液分离人外周血中的单个核细胞,用 PBS 洗 2 次后,每 100 μ l 体积 1×10^6 个细胞中加入抗 VEGF-R2 biotin conjugate 抗体 4 μ l,4 $^{\circ}$ C 遮光条件下孵育 30 min 后,用 PBS 洗 2 次,再同时加入抗 CD34 抗体 10 μ l、抗 CD133 抗体 4 μ l、Percp Streptavidin 4 μ l,再次在 4 $^{\circ}$ C 遮光条件下孵育 30 min 后,用 PBS 洗 2 次后进行流式细胞仪检测,计数 5×10^5 个细胞,测定 CD34⁺ VEGF⁺CD133⁺ 细胞在单个核细胞中的比率。

1.2.2 检测血清中 Ang-II 及 SDF-1 α 水平

分别在 AMI 组急性期、恢复期以及对照组抽取

外周血 5 ml, 立即在 4℃, 3 000 r/min 条件下离心 30 min, 取血清保存于 -20℃ 冰箱中待测。检测血清中 Ang- II 以及 SDF-1α 含量, 均按照 ELISA 检测试剂盒说明书操作, 采用双抗体夹心 ELISA 方法。用酶标仪在波长 450 nm 处测定各个样本的吸光度值, 算出每个样本的细胞因子的浓度水平。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件处理数据, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组均数间的比较应用 *t* 检验, 多个均数间的比较用单因素方差分析, 两两比较采用 *q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。外周血中 Ang- II、SDF-1α 浓度与 EPCs 细胞数量进行非线性相关分析 (Pearson 相关性检验)。

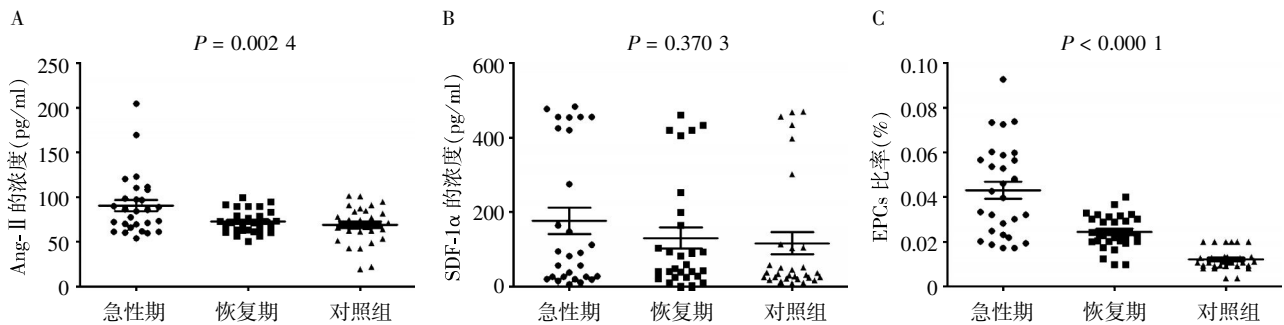
2 结果

2.1 AMI 患者体内 Ang- II 及 SDF-1α 水平的变化

AMI 组急性期血清中 Ang- II 的水平为 (90.40 ± 6.39) pg/ml, 明显高于恢复期 (72.57 ± 2.42) pg/ml 以及对照组 (69.14 ± 3.73) pg/ml ($P = 0.002 4$, 图 1A), 而 AMI 组急性期血清中 SDF-1α 的水平为 (171.10 ± 35.81) pg/ml, 虽然较恢复期 (130.30 ± 28.84) pg/ml 以及对照组 (116.50 ± 29.19) pg/ml ($P = 0.370 3$) 的平均水平升高, 但是两者之间差异无统计学意义 (图 1B)。

2.2 AMI 患者循环中 EPCs 数目的变化

AMI 组患者的急性期外周血中 EPCs 为 $(0.043 \pm 0.004)\%$, 明显高于恢复期 $(0.024 \pm 0.010)\%$ 以及对照组 $(0.012 \pm 0.001)\%$ ($P < 0.000 1$, 图 1C)。



A: 各组血清中 Ang- II 的水平; B: 各组血清中 SDF-1α 的水平; C: 各组外周血中 EPCs 占单个核细胞的比率。

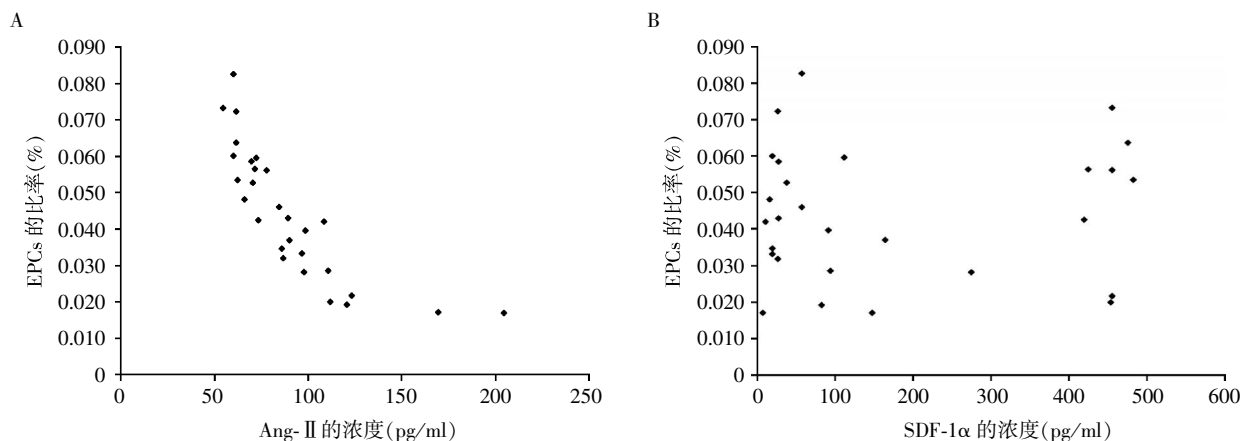
图 1 血清中 Ang- II、SDF-1α 的浓度及外周血中内皮祖细胞的数量

Figure 1 Serum levels of Ang-II and SDF-1α, and the quantities of circulating EPCs

2.3 EPCs 和 Ang- II、SDF-1α 变化的相关性

进一步分析血清中 Ang- II、SDF-1α 水平与患者外周血中 EPCs 变化的相关性, 发现虽然急性期 AMI 患者的 Ang- II 和 EPCs 细胞均升高, 但是他们

的变化呈明显的负相关 (Spearman $r = -0.937 6$, $P < 0.0001$, 图 2A), 而 SDF-1α 水平与 EPCs 细胞的变化无明显相关性 (Spearman $r = 0.095 6$, $P = 0.628 6$, 图 2B)。



A: 外周血中 EPCs 的比率与血清中 Ang- II 的相关性; B: 外周血中 EPCs 的比率与血清中 SDF-1α 的相关性。

图 2 AMI 急性期循环中 EPCs 的比率与血清中 Ang- II、SDF-1α 变化的相关性

Figure 2 The correlation of circulating EPCs with the concentration of Ang- II or SDF-1α in the acute stage of AMI

3 讨论

EPCs 是骨髓造血细胞来源的、能够分化为成熟内皮细胞的前体细胞,同时表达 CD34、VEGF 和 CD133 抗原标志物,人外周血中的 EPCs 参与修复受损的内皮细胞,并促进缺血组织的血管再生,因此在维持血管内皮稳定和改善组织供血中起重要作用^[4]。各种引起冠心病的危险因素亦会引起 EPCs 细胞数目和功能的改变^[2,8]。本研究中发现,急性期的 AMI 患者血循环中 EPCs 数目明显高于对照组,且到了恢复期明显下降(图 1C),说明在 AMI 急性期 EPCs 的动员和迁徙增加。AMI 患者循环中 EPCs 的增加有利于受损内皮细胞的修复及缺血组织的血管新生,减少心肌组织的坏死。

RAS 其生理作用的核心环节是 Ang-Ⅱ,调节心血管功能的稳定性。Ang-Ⅱ 是生物活性肽,最初被认为可以调节水电解质平衡、血压和血管张力。最近的研究表明,Ang-Ⅱ 除具有上述功能外,还能够通过 Ang-Ⅱ 的 1 型受体介导,促进 EPCs 的衰老,减少外周血循环中 EPCs 的数目^[9-10],减弱 EPCs 内皮修复能力^[11]。AMI 患者冠状动脉发生急性闭塞而导致心肌缺血,通过激肽-缓激肽的途径激活了 RAS 系统,使患者 Ang-Ⅱ 的水平增高,研究表明 Ang-Ⅱ 抑制血管内皮细胞释放一氧化氮,抑制血管活性物质的表达,从而导致血管内皮的功能障碍,影响受损心肌的再灌注^[12-13]。本研究表明虽然 AMI 患者在急性期 Ang-Ⅱ 浓度和 EPCs 数量均明显增高,但是两者之间的升高呈负相关,说明 Ang-Ⅱ 对循环中 EPCs 的数目增加有抑制作用。有研究表明冠心病患者外周血中 EPCs 的增加与炎症反应有关^[14]。AMI 患者在急性期血管内皮的炎症反应引起外周血中 EPCs 数量的增加,但同时 EPCs 被外周血中的 Ang-Ⅱ 抑制,从而减弱了 EPCs 修复血管内皮的能力。

SDF-1 α 也被称为 CXCL12, CXC 家族的化学因子,它和表达在 EPCs 表面的 CXCR4 配体结合,诱导 EPCs 细胞归巢^[15]。近年来多项研究证实了 SDF-1 α 在 EPCs 细胞的迁移和归巢中的重要作用^[16-17]。在本研究中 AMI 患者急性期外周血清中 SDF-1 α 的水平较恢复期稍增高,但未发生 AMI 的对照组比较并无统计学意义,而且血清中 SDF-1 α 的水平与外周血中 EPCs 数目的增加并无相关性。这一结果与 Ziegler 等^[16]的结果似乎并不一致,考虑可能有以下两方面的原因:①组织缺血后虽然局部 SDF-1 α 表达迅速增高^[16],促进 EPCs 黏附及归巢等修复作用,但

是可能并未引起血液中 SDF-1 α 浓度的明显增加^[18];②另一组研究曾观察到 Ang Ⅱ 抑制 SDF-1 α 这一现象^[19],考虑亦不能排除 AMI 后 Ang Ⅱ 升高而抑制 SDF-1 α 表达这一可能,但相关机制尚有待进一步探讨。

综上所述,本研究表明在 AMI 急性期,虽然患者外周血中 Ang-Ⅱ 浓度和 EPCs 数目均增高,但是 Ang-Ⅱ 对外周血中的 EPCs 有抑制作用,因此 AMI 患者早期应用 Ang-Ⅱ 抑制剂可以减少其对 EPCs 的抑制作用,从而增加外周血中 EPCs 的动员以及缺血区域 EPCs 的迁徙,促进缺血区域的内皮修复。

[参考文献]

- [1] Thal MA, Krishnamurthy P, Mackie AR, et al. Enhanced angiogenic and cardiomyocyte differentiation capacity of epigenetically reprogrammed mouse and human endothelial progenitor cells augments their efficacy for ischemic myocardial repair[J]. *Circ Res*, 2012, 111(2):180-190
- [2] 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
- [3] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302):964-967
- [4] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors[J]. *Blood*, 2000, 95(3):952-958
- [5] Ho TK, Shiwen X, Abraham D, et al. Stromal-cell-derived factor-1(SDF-1)/CXCL12 as potential target of herapeutic angiogenesis in critical leg ischaemia[J]. *Cardiol Res Pract*, 2012, 2012:143209
- [6] Takeda Y, Zhu A, Yoneda T, et al. Effects of aldosterone and angiotensin Ⅱ receptor blockade on cardiac angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme 2 expression in Dahl salt-sensitive hypertensive rats[J]. *Am J Hypertens*, 2007, 20(10):1119-1124
- [7] Konishi M, Haraguchi G, Yoshikawa S, et al. Additive effects of β -blockers on renin-angiotensin system inhibitors for patients after acute myocardial infarction treated with primary coronary revascularization[J]. *Circ J*, 2011, 75(8):1982-1291
- [8] Fujita Y, Asahara T. Evaluation of circulating endothelial progenitor cells in cardiovascular risk[J]. *Circ J*, 2011, 75(11):2541-2542
- [9] You D, Cochain C, Loinard C, et al. Combination of the

- angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril and the diuretic indapamide activate postnatal vasculogenesis in spontaneously hypertensive rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2008,325(3):766-773
- [10] Min LJ, Mogi M, Iwanami J, et al. Angiotensin II type 2 receptor deletion enhances vascular senescence by methyl methanesulfonate sensitive 2 inhibition[J]. *Hypertension*,2008,51(5):1339-1344
- [11] Li H, Liu Q, Wang N, et al. Correlation of different NADPH oxidase homologues with late endothelial progenitor cell senescence induced by angiotensin II :effect of telmisartan[J]. *Intern Med*,2011,50(16):1631-1642
- [12] Yung LM, Wong WT, Tian XY, et al. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats [J]. *PLoS One*, 2011,6(3):e17437
- [13] Sakuta T, Morita Y, Satoh M, et al. Involvement of the renin-angiotensin system in the development of vascular damage in a rat model of arthritis:effect of angiotensin receptor blockers [J]. *Arthritis Rheum*,2010,62(5):1319-1328
- [14] George J, Goldstein E, Abashidze S, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation[J]. *Eur Heart J*, 2004,25(12):1003-1008
- [15] Shen L, Gao Y, Qian J, et al. A novel mechanism for endothelial progenitor cells homing: The SDF-1/CXCR4-Rac pathway may regulate endothelial progenitor cells homing through cellular polarization [J]. *Med Hypotheses*,2011,76(2):256-258
- [16] Ziegler M, Elvers M, Baumer Y, et al. The bispecific SDF1-GPVI fusion protein preserves myocardial function after transient ischemia in mice [J]. *Circulation*,2012,125(5):685-696
- [17] Shao H, Tan Y, Eton D, et al. Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels[J]. *Stem Cells*,2008,26(5):1376-1384
- [18] Ripa RS, Wang Y, Goetze JP, et al. Circulating angiogenic cytokines and stem cells in patients with severe chronic ischemic heart disease--indicators of myocardial ischemic burden? [J]. *Int J Cardiol*,2007,120(2):181-187
- [19] Gil-Bernabe P, Boveda-Ruiz D, D'Alessandro-Gabazza C, et al. Atherosclerosis amelioration by moderate alcohol consumption is associated with increased circulating levels of stromal cell-derived factor-1 [J]. *Circ J*,2011,75(9):2269-2279

[收稿日期] 2012-07-17

(上接第 1560 页)

- in gastric cardia cancer[J]. *J Surg Oncol*,2011,104(7):728-733
- [5] Haas M, Dimmler A, Hohenberger W, et al. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia [J]. *BMC Gastroenterol*, 2009,4:9-65
- [6] Bacić D, Uravić M, Bacić R, et al. Augmentation of regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) correlates with tumor stage in patients with colorectal cancer[J]. *Coll Antropol*, 2011,35(2):65-68
- [7] Wang LH, Su L, Wang JT. Correlation between elevated FOXP3 expression and increased lymph node metastasis of gastric cancer[J]. *Chin Med J (Engl)*,2010,123(24):3545-3549
- [8] Wu MY, Kuo TY, Ho HN. Tumor-infiltrating lymphocytes contain a higher proportion of FOXP3 (+) T lymphocytes in cervical cancer[J]. *J Formos Med Assoc*,2011,110(9):580-586
- [9] Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, et al. Cutting edge: Direct suppression of B cells by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. *J Immunol*,2005,175(7):4180-4183
- [10] Walker LS, Chodos A, Eggena M, et al. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells *in vivo* [J]. *J Exp Med*,2003,198(2):249-258
- [11] 徐安琪, 杨晓帆, 王慧娟, 等. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺: 与 SLE 疾病相关的 Treg 标志[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2012,32(6):745-753

[收稿日期] 2012-02-13