

慢性阻塞性肺疾病稳定期患者循环内皮祖细胞水平的 Meta 分析

何梦钰¹, 沈红², 孙理想¹, 孙德芳¹, 解卫平^{1*}¹南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学第二附属医院呼吸内科, 江苏 南京 210011

[摘要] **目的:**采用 Meta 分析综合评价慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)稳定期患者循环内皮祖细胞(circulating endothelial progenitor cells, cEPCs)水平的变化规律。**方法:**利用计算机检索 Pubmed、Embase、Web of science 数据库,收集国内外发表的有关 COPD 稳定期患者 cEPCs 水平的文献,经质量评价后按制定标准纳入文献,应用 Stata14 软件进行分析。**结果:**共纳入 12 项研究,包括 550 例研究对象。分析结果显示,COPD 稳定期患者 cEPCs 水平明显低于对照组,结果合并后标准化均数差(standardized mean difference, SMD)为-1.38,95% 可信区间(confidence interval, CI)为-2.01~-0.74, Z=4.23 ($P < 0.001$)。亚组分析提示采用流式细胞计数 cEPCs, COPD 稳定期患者 cEPCs 水平显著低于健康人水平;而采用外周 EPCs 集落计数法发现 COPD 稳定期患者 cEPCs 数量与健康人之间无明显统计学差异。以敏感性分析、漏斗图法和剪补法分析表明结果稳定、可信。**结论:**COPD 稳定期患者 cEPCs 水平较正常人显著降低,可能会减弱 COPD 内皮修复功能,特别是在采用流式细胞计数 cEPCs 时。

[关键词] 内皮祖细胞;慢性阻塞性肺疾病;Meta 分析**[中图分类号]** R563**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2018)02-272-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20180230

Meta-analysis of the level of circulating endothelial progenitor cells in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease

He Mengyu¹, Shen Hong², Sun Lixiang¹, Sun Defang¹, Xie Weiping^{1*}¹Department of Respiratory & Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029;²Department of Respiratory, the Second Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210011, China

[Abstract] **Objective:** To analyze the level of circulating endothelial progenitor cells (cEPCs) in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods:** Major online database including Pubmed, Embase, Web of science were searched to find published case-control studies on the association between cEPCs and patients with stable COPD. The results were analyzed using Stata14 software. **Results:** A total of 12 studies containing 550 subjects were enrolled. Meta analysis showed that the level of cEPCs was significantly declined in patients with stable COPD (standardized mean difference (SMD) = -1.38, 95% confidence interval (CI) (-2.01, -0.74), Z=4.23 ($P < 0.001$)). Subgroup analysis indicated that using flow cytometry the level of cEPCs was remarkable decreased in patients with stable COPD than normal controls; however, there is no statistic significance in the level of cEPCs between patients with stable COPD and controls by counting EPCs colony forming units. By sensitivity analysis, funnel plot, and "trim and fill", it showed that the results were robust. **Conclusion:** The level of cEPCs is low in patients with stable COPD compared with healthy controls, especially by the method of flow cytometry, which may lead to the deficient capacity of endothelial repairing.

[Key words] endothelial progenitor cells; chronic obstructive pulmonary diseases; Meta-analysis

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(02):272-276]

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)

[基金项目] 国家自然科学基金(81273571);江苏高校优势学科建设工程资助(JX10231802);江苏省普通高校研究生科研创新计划(KYLX15_0949)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wpxie@njmu.edu.cn

首次由日本科学家 Asahara 等^[1]从外周血中提取,将其定义为一种来源于骨髓的具有强大增殖潜能、能够分化为成熟内皮细胞的循环细胞。越来越多的研究证实 EPCs 不仅参与胚胎时期血管形成,也参与出生后血管内皮损伤后修复和血管新生过程^[2-3]。

动物实验证实,缺血缺氧造成血管内膜损伤,释放细胞因子,趋化外周血中的EPCs归巢至损伤内皮处,定植并修复损伤的内皮细胞,维持血管内膜的完整性^[4]。因此,外周内皮祖细胞(circulating endothelial progenitor cells, cEPCs)的水平与缺血缺氧性疾病有密切联系。

近年研究发现缺氧导致的内皮细胞损伤在慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的发生发展过程中扮演重要角色^[5],而骨髓来源的EPCs具有修护损伤内皮的功能,已成为潜在的预后相关生物标志物及治疗新靶点。目前已有多项研究关注COPD稳定期与cEPCs数量之间的相关性,但由于单个研究样本量较少,且样本纳入标准及研究方法不一,使各研究间存在差异。因此,有必要对cEPCs水平与COPD稳定期的关系进行系统、全面和可靠的评价。本研究对cEPCs水平与COPD稳定期关系的文献进行Meta分析,为COPD更有效的防治提供参考。

1 资料和方法

1.1 资料

检索PubMed、Embase、Web of science数据库2006年1—11月公开发表的比较正常人和COPD稳定期患者循环血中EPCs水平的文献,其中包括期刊论文和会议文献等。检索方法:以(“endothelial progenitor cells”OR(“endothelial”AND“progenitor”AND“cells”)OR“endothelial progenitor cells”OR(“endothelial”AND“progenitor”AND“cell”)OR“endothelial progenitor cell”)AND(“pulmonary disease, chronic obstructive”OR(“pulmonary”AND“disease”AND“chronic”AND“obstructive”)OR“chronic obstructive pulmonary disease”OR(“chronic”AND“obstructive”AND“pulmonary”AND“disease”))为关键词。

纳入标准:①必须是在公开发行的杂志上以论文形式发表的文章;②研究内容为病例组(COPD稳定期患者)与对照组(健康人群)cEPCs水平的病例对照研究;③COPD稳定期患者诊断根据GOLD指南确诊,对照组为年龄、性别相当的健康者;④排除COPD急性发作期、肿瘤、感染、免疫、血液、消化系统疾病及其他呼吸系统疾病患者;⑤可提取样本含量、均数及标准差等数据,或可根据文献提供数据转化出均数和标准差。排除标准:①同一研究数据重复发表,仅计1次;②无目标结果、质量差或信息太少的文献;③设计方法有误、综述及数据描述不

清无法利用的文献非原始数据的文献,如综述。

1.2 方法

由2位作者分别通过阅读文献标题及摘要排除明显不符合纳入标准的文献,再阅读全文,依据纳入、排除标准选出符合要求的研究,提取各研究的信息,收集研究对象的基本资料、检测指标及检测数据。如2位作者对提取的文献有异议,请第3位作者讨论,决定是否纳入。

1.3 统计学方法

采用Stata14软件分析数据。cEPCs水平采用标准化均数差(standardized mean difference, SMD)表示,各效应量以95%可信区间(confidence interval, CI)表示。用 Q 检验对各研究间异质性进行判断。若为同质研究($P > 0.05, I^2 < 50%$),采用固定效应模型,若存在异质性($P < 0.05, I^2 > 50%$)则采用随机效应模型分析并进行敏感性分析,以判断结果的稳定性和可信性。采用漏斗图法和剪补法检测发表偏倚。

2 结果

2.1 纳入文献的基本情况

12篇文献最终纳入^[6-17],各研究结果汇总见表1。12项研究均提供了组间完整的性别、年龄指标,共550例研究对象,包括COPD稳定期患者339例,对照组211例。5项研究采用无吸烟史的健康人群作为对照,其余研究采用的对照人群包含了有吸烟史的健康人群。10项研究采用流式细胞计数检测外周血cEPCs水平,2项研究采用细胞集落计数检测外周血cEPCs水平。6项研究以欧洲人群为研究对象,5项以亚洲人群为研究对象,1项人群以北美洲人群为研究对象。

2.2 Meta分析

2.2.1 cEPCs与COPD稳定期患者的相关性

12项研究异质性 $I^2=90.4%, P < 0.05$,表明存在异质性,采用随机效应模型分析数据。结果显示两组cEPCs水平差异有统计学意义,合并后 $SMD=-1.38$,95%CI为(-2.01~-0.74), $Z=4.23(P < 0.001)$,提示COPD稳定期与cEPCs水平有关,COPD稳定期患者cEPCs水平较正常人明显降低。在纳入的12项研究中,其中10项研究采用流式细胞分析cEPCs,各项研究间存在统计学异质性($I^2=89.6%, P < 0.05$),故采用随机效应模型进行合并分析。结果显示两组外周血cEPC的水平差异有统计学意义,合并后 $SMD=-1.64$,95%CI为-2.37~-0.90, $Z=4.37(P < 0.001)$,图1)。采用流式细胞仪检测外周血cEPCs发现,COPD

表1 纳入研究的文献概况
Table 1 Studies included in the research

作者	年份	国家/地区	研究对象		病例组/对照组(例)	EPCs水平检测方法
			病例组	对照组		
Brittan等 ^[6]	2013	英国/欧洲	COPD稳定期患者	正常健康者(含吸烟者)	39/19	流式细胞术检测
Huertas等 ^[7]	2010	意大利/欧洲	COPD稳定期患者	正常健康者(无吸烟者)	39/12	流式细胞术检测
Liu等 ^[8]	2012	中国/亚洲	COPD稳定期患者	正常健康者(无吸烟者)	25/16	流式细胞术检测
Palange等 ^[9]	2006	意大利/欧洲	COPD稳定期患者	正常健康者(无吸烟者)	18/12	流式细胞术检测
Salter等 ^[10]	2016	加拿大/北美洲	COPD稳定期患者	正常健康者(无吸烟者)	9/8	流式细胞术检测
Liu等 ^[11]	2014	中国/亚洲	COPD稳定期患者	正常健康者(含吸烟者)	26/24	流式细胞术检测
Sala等 ^[12]	2010	西班牙/欧洲	COPD稳定期患者	正常健康者(含吸烟者)	44/20	流式细胞术检测
Yang等 ^[13]	2013	中国/亚洲	COPD稳定期患者	正常健康者(无吸烟者)	20/20	流式细胞术检测
Kim等 ^[14]	2012	韩国/亚洲	COPD稳定期患者	正常健康者(含吸烟者)	23/28	细胞集落数
Liu等 ^[15]	2016	中国/亚洲	COPD稳定期患者	正常健康者(含吸烟者)	40/18	细胞集落数
Fadini等 ^[16]	2006	意大利/欧洲	COPD稳定期患者	正常健康者(含吸烟者)	15/15	流式细胞术检测
Pizarro等 ^[17]	2010	西班牙/欧洲	COPD稳定期患者	正常健康者(含吸烟者)	15/11	流式细胞术检测

稳定期患者cEPCs水平较正常人明显降低。另有2项研究采用细胞集落计数cEPCs,各项研究间存在统计学异质性($I^2=86.8\%$, $P < 0.05$),故采用随机效应模型进行合并分析。结果显示两组外周血cEPC的水平差异无统计学意义,合并后SMD=-0.24,95%CI为-1.23~0.74, $Z=0.49$ ($P=0.627$,图1)。

2.2.2 cEPCs水平在COPD稳定期患者与有或无吸烟史的正常间状况

根据对照组人群选择是否包含有吸烟史的健康者进行分层分析,分为吸烟组与不吸烟组。Meta分析显示:吸烟组SMD(95%CI)为-0.57(-0.98~-0.16), $Z=2.70$ ($P=0.007$),提示COPD稳定期患者cEPCs数量与有吸烟史的健康人群相比低0.16~0.98倍标准差。不吸烟组SMD(95%CI)为-2.76(-4.32~-1.20), $Z=3.47$ ($P=0.001$),提示COPD稳定期患者cEPCs数量与无吸烟史的健康人群相比低1.20~4.32倍标准差(图2)。

2.4 发表偏倚

漏斗图不对称,提示存在发表偏倚(图3)。敏感性分析(图4)采用逐一剔除所纳入的研究,再重新进行合并,观察SMD和CI来评估结论的稳定性。结果无实质性改变,说明稳定。剪补法提示有缺失文献5篇,加上缺失文献数量再次行meta命令计算采用随机效应模型,得到合并后的SMD为-1.903,95%CI为-2.751~-1.055,与未剪补结论一致,说明虽然存在一定的发表偏倚,但结果稳定、可靠。

3 讨论

以EPCs为基础的干细胞移植治疗发现,EPCs

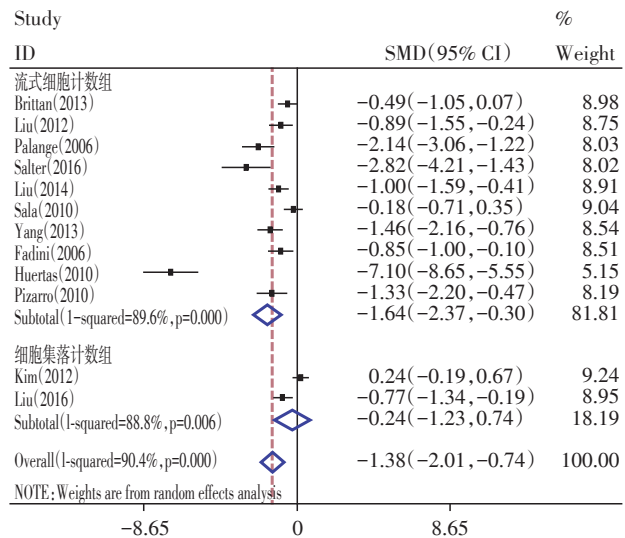


图1 cEPCs与COPD稳定期患者的Meta分析(流式细胞仪或细胞集落数计数)

Figure 1 Meta-analysis of the relationship between cEPCs level and patients with stable COPD (flow cytometry or counting colony forming units)

能够形成稳定的血管结构并成为移植受者循环系统的一部分,通过重塑动静脉及毛细血管内膜维持血管完整性^[18]。近年EPCs在缺血缺氧疾病的病理生理过程中的作用越来越受到重视。研究发现在肺外疾病慢性缺血缺氧情况下,如慢性心力衰竭、糖尿病和慢性肾衰竭,患者体内cEPCs数量较正常人群明显减少;目前已知在心血管危险因素增加时,cEPCs数量下降,这些研究认为cEPCs数量与缺血缺氧性疾病危险因素呈负相关,可以作为反映疾病状态的生物标志物^[19]。

目前关于EPCs与COPD之间的关系尚存在争

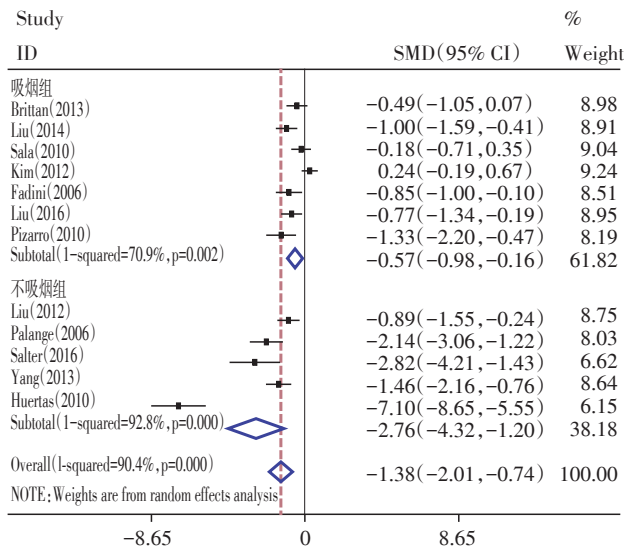


图2 COPD患者cEPCs与是否有吸烟史的正常对照cEPCs的Meta分析

Figure 2 Meta-analysis of the relationship between cEPCs level and patients with stable COPD and normal controls with or without smoking history

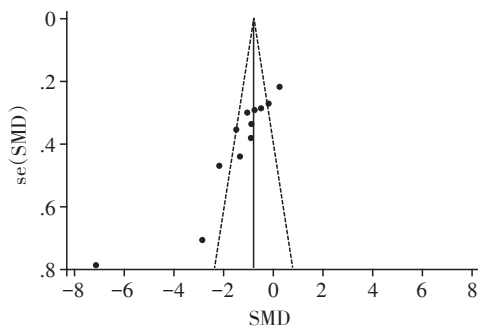


图3 漏斗图检测Meta分析发表偏倚

Figure 3 Funnel plot for analyzing publication bias

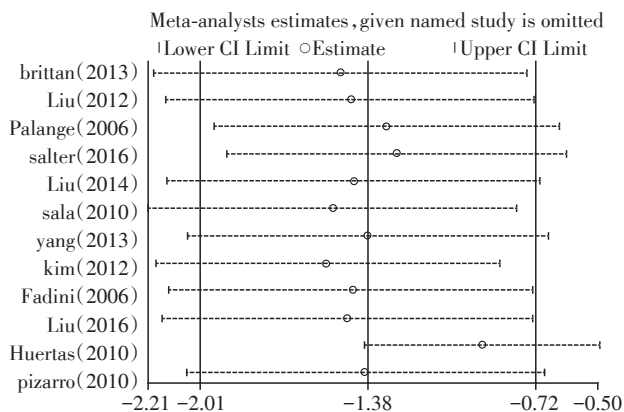


图4 敏感性分析

Figure 4 Sensitivity analysis of the Meta-analysis

议。Meta分析作为循证医学中生产高质量证据的重要方法之一,可以有效系统地评估cEPCs与COPD稳定期之间的关系。本文进行的Meta分析纳

入了12项有关于cEPCs与COPD稳定期患者的研究,其中3项报道COPD稳定期患者cEPCs水平与健康人之间无统计学差异,而另外9项研究发现COPD稳定期患者cEPCs水平低于健康者。从森林图中观察到COPD稳定期患者cEPCs数量比健康人低0.74~2.01倍标准差。EPCs数量下降继而功能异常使其失去修复受损内皮的功能,导致内皮细胞功能紊乱,进一步有可能引发缺氧性肺血管收缩和平滑肌的异常增殖,促使COPD及相关性肺动脉高压的发生。本研究提示COPD的发生可能与cEPCs数量减少有关。

常见的cEPCs检测方法包括使用流式细胞仪计数特异性表面标志物阳性的细胞,采用条件培养基体外培养外周血单个核细胞后进行EPCs集落计数。本文纳入的12项研究中,采用cEPCs细胞的检测方法存在差异。其中10项研究采用流式细胞计数法,2项研究采用外周血细胞集落计数法。采用流式细胞计数cEPCs,分析发现COPD稳定期患者cEPCs数量比健康人低0.9~2.37倍标准差。采用外周血细胞集落计数法,Meta分析发现COPD稳定期患者cEPCs数量与健康人之间无明显统计学差异。但由于仅2项研究采用此方法检测cEPCs,且观察细胞集落形成的时间不一致(Kim等^[14]于体外培养7d后计数细胞集落,Liu等^[15]于体外培养后21d计数细胞集落),因而存在较大异质性。

目前已知的影响cEPCs数量的因素诸多,如年龄、高血压、高血糖、运动等。吸烟作为COPD发生的首要危险因素,也对cEPCs的数量及功能有重要影响。Clauss等人发现吸烟可致体外培养的具有高度增殖潜能的EPCs过早发生细胞衰老^[20];在香烟提取物诱导小鼠肺气肿模型中发现EPCs逐渐失去其干细胞性质^[21]。本文纳入的12项研究中,有7项研究选择的对照组包含了有吸烟史的健康人群,其余5项研究选择了无吸烟史的健康人群。亚组分析可以发现,COPD稳定期患者cEPCs数量与无吸烟史的健康人群相比显著降低(相差1.20~4.32倍标准差),而COPD稳定期患者cEPCs数量与有吸烟史的健康人群相比仅低0.16~0.98倍标准差。由此推测,吸烟人群cEPCs降低,吸烟可导致EPCs数量减少及功能下降,cEPCs含量降低减弱了机体本身对内膜的修复,促进COPD的发生,但仍需研究进一步探讨吸烟与不吸烟人群之间的差异。

本研究存在一定的局限性。首先,纳入12项研究包括550例患者,可能导致统计检验效能不足。其次,关于cEPCs的检测及鉴定方法目前并未有统

一标准,本Meta分析纳入的12项研究中采用了2种不同方法检测cEPCs细胞,包括流式细胞仪计数、体外培养EPCs集落计数。其次,目前尚未发现鉴定cEPCs的特异性表面标志物。现采用流式细胞仪鉴定EPCs的表面标志物包括:干细胞特性的表面标志物,如CD133、CD34,及内皮细胞特性的表面标志物,如KDR。因为EPCs的鉴定方法存在很大争议,这也使得相关研究存在差异和发表偏倚,但本Meta分析逐一剔除所纳入研究进行敏感性分析并未发现鉴定方法的差异对统计学结论的影响。

本文的结果提示,COPD稳定期患者cEPCs数量较正常人群显著下降,提示COPD患者自身内膜修复功能受损,EPCs数量降低可能加剧了COPD的发展,但是还有待进一步研究以确定两者的因果关系。

[参考文献]

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967
- [2] Tongers J, Roncalli JG, Losordo DW. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation [J]. *Microvasc Res*, 2010, 79(3): 200-206
- [3] Malinovskaya NA, Komleva YK, Salmin VV, et al. Endothelial progenitor cells physiology and metabolic plasticity in brain angiogenesis and blood-brain barrier modeling [J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 599
- [4] Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair [J]. *Circulation*, 2005, 111(22): 2981-2987
- [5] Santos S, Peinado VI, Ramirez J, et al. Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD [J]. *Eur Respir J*, 2002, 19(4): 632-638
- [6] Brittan M, Hoogenboom MM, Padfield GJ, et al. Endothelial progenitor cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305(12): L964-969
- [7] Huertas A, Testa U, Riccioni R, et al. Bone marrow-derived progenitors are greatly reduced in patients with severe COPD and low-BMI [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2010, 170(1): 23-31
- [8] Liu X, Xie C. Human endothelial progenitor cells isolated from COPD patients are dysfunctional [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 363(1-2): 53-63
- [9] Palange P, Testa U, Huertas A, et al. Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD [J]. *Eur Respir J*, 2006, 27(3): 529-541
- [10] Salter BM, Manzoor F, Beaudin S, et al. Dysregulation of vascular endothelial progenitor cells lung-homing in subjects with COPD [J]. *Can Respir J*, 2016, 2016: 1472823
- [11] Liu Y, Liu X, Lin G, et al. Decreased CD34+ cell number is correlated with cardiac dysfunction in patients with acute exacerbation of COPD [J]. *Heart Lung and Circulation*, 2014, 23(9): 875-882
- [12] Sala E, Villena C, Balaguer C, et al. Abnormal levels of circulating endothelial progenitor cells during exacerbations of COPD [J]. *Lung*, 2010, 188(4): 331-338
- [13] Yang Y, Gan Y, Cao J, et al. Decreased and dysfunctional circulating endothelial progenitor cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin Med J*, 2013, 126(17): 3222-3227
- [14] Kim EK, Lee JH, Jeong HC, et al. Impaired colony-forming capacity of circulating endothelial progenitor cells in patients with emphysema [J]. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2012, 227(4): 321-331
- [15] Liu P, Zhang H, Liu J, et al. Changes of number and function of late endothelial progenitor cells in peripheral blood of COPD patients combined with pulmonary hypertension [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2016, 64(4): 323-329
- [16] Fadini GP, Schiavon M, Cantini M, et al. Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(7): 1806-1813
- [17] Pizarro S, Peinado VI, Vives M, et al. Endothelial progenitor cells in COPD: Relationship between circulating cells and their presence in pulmonary arteries [J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2010, 181(1)
- [18] Richardson MR, Yoder MC. Endothelial progenitor cells: quo vadis? [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(2): 266-272
- [19] Huertas A, Palange P. Circulating endothelial progenitor cells and chronic pulmonary diseases [J]. *Eur Respir J*, 2011, 37(2): 426-431
- [20] Clauss M, Lewellen KA, Green LA. Cigarette smoke (CS) induces premature senescence in highly proliferative endothelial colony forming cells (ECFC) [J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2014, 189
- [21] He ZH, Chen Y, Chen P, et al. Decitabine enhances stem cell antigen-1 expression in cigarette smoke extract-induced emphysema in animal model [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(2): 131-139

[收稿日期] 2017-05-23