

- and critically ill patients[J]. Int J Infect Dis, 2011, 15(5):326-331.
- [12] Wang X, Theodore MJ, Mair R, et al. Clinical validation of multiplex Real-Time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(3):702-708.
- [13] Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, et al. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR[J]. Br J Ophthalmol, 2011, 95(3):345-349.
- [14] 王蓉美, 蔡庆, 高和, 等. 采用 PCR 与 RFLP 方法快速诊断细菌感染[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2009, 23(12):1167-1169.
- [15] Cloud JL, Harmsen D, Iwen PC, et al. Comparison of traditional phenotypic identification methods with partial 5' 16S rRNA gene sequencing for species-level identification of nonfermenting Gram-negative bacilli[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4):1442-1444.
- [16] 陈茶, 屈平华, 顾全, 等. 基于细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与测序分析在临床不常见菌鉴定中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(7):612-619.
- [17] Pett E, Saeed K, Dryden M. Fusobacterium species infections: clinical spectrum and outcomes at a district general hospital[J]. Infection, 2014, 42(2):363-370.
- [18] Adékambi T, Berger P, Raoult D, et al. rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of mycobacterium bolletii sp. nov., mycobacterium phocaicum sp. nov. and mycobacterium aubagnense sp. nov[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56(1):133-143.
- [19] Zhang YY, Li YB, Huang MX, et al. Novel species including mycobacterium fukienense sp. is found from tuberculosis patients in Fujian province, China, using phylogenetic analysis of mycobacterium chelonae/abscessus complex[J]. Biomed Environ Sci, 2013, 26(11):894-901.
- [20] Josefson P, Strålin K, Ohlin A, et al. Evaluation of a commercial multiplex PCR test (SeptiFast) in the etiological diagnosis of community-onset bloodstream infections[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(9):1127-1134.
- [21] Kitahara K, Yasutake Y, Miyazaki K. Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in Escherichia coli[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(47):19220-19225.
- [22] Rajendhran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond[J]. Microbiol Res, 2011, 166(2):99-110.
- [23] Shinoy M, Dennehy R, Coleman L, et al. Immunoproteomic analysis of proteins expressed by two related pathogens, Burkholderia multivorans and Burkholderia cenocepacia, during human infection[J]. PLoS One, 2013, 8(11):e80796.
- [24] Suppiah J, Thimma JS, Cheah SH, et al. Development and evaluation of polymerase chain reaction assay to detect Burkholderia genus and to differentiate the species in clinical specimens[J]. FEMS Microbiol Lett, 2010, 306(1):9-14.
- [25] Ecker DJ, Sampath R, Li H, et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2010, 10(4):399-415.

(收稿日期:2014-11-26)

• 综 述 •

内皮细胞微粒的研究进展

李 贤 综述, 王德明[△] 审校

(南华大学第二附属医院麻醉科, 湖南衡阳 421001)

关键词: 内皮细胞微粒; 心血管疾病; 糖尿病; 肺部疾病**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2015.04.038**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2015)04-0522-03

血管内皮细胞是衬覆于血管内壁的单层扁平细胞,在保持血管内膜的完整性和维持血管的正常功能方面有着重要的作用。内皮细胞微粒(EMPs)是内皮细胞激活或凋亡时从其表面释放的直径小于 1 μm 的微囊泡,具有内皮细胞的某些抗原特性,可有效反映内皮细胞的结构和功能状态。研究表明,EMPs 不仅是内皮功能紊乱的新的标志物,并被认为是炎症、血管损伤、内皮功能障碍和血栓形成中发挥着重要的生物学作用^[1]。在患有心血管疾病、糖尿病、肺部疾病等疾病的患者血液中 EMPs 水平都有增加。本文就 EMPs 可能的形成机制、检测方法及其与疾病的相互作用做一综述。

1 EMPs 的形成机制

细胞膜磷脂酰丝氨酸(PS)的暴露和连续不断的微粒脱落是一个普遍存在的过程,它不断清除衰老的细胞并维持组织和机体的平衡。微粒的脱落是所有真核生物受刺激或凋亡时的一个原始应激反应^[2]。相同细胞起源的微粒或许会由不同的蛋白质和磷脂组成。用 TNF- α 刺激脐静脉内皮细胞后,第一

次记录了 EMPs 的增殖。然而,除了 TNF- α ,其他的炎症因子、细菌的脂多糖、活性氧、酰溶酶原激活抑制剂、凝血酶、喜树碱、C-反应蛋白、尿毒素也能刺激试体内的 EMPs 增加^[3]。当然,微粒的形成过程是十分复杂的,其具体机制目前尚不明确。

1.1 细胞活化 正常细胞膜的磷脂双分子层是由外层的磷脂酰胆碱和鞘磷脂与内层的磷脂酰乙醇胺和 PS 组成^[4]。这种磷脂分布的不对称性是由氨基磷脂转移酶、ATP 依赖性氨基磷脂特异性移位酶和磷脂爬行酶的跨膜平衡来维持的。当细胞受到刺激时,细胞内的 Ca^{2+} 会增加,ATP 依赖性氨基磷脂特异性移位酶和磷脂爬行酶活性增加,氨基磷脂转移酶活性降低,导致细胞膜的不对称性消失,PS 暴露在细胞膜的表面,细胞膜出芽形成微粒。然而,并不是 PS 暴露在细胞膜的表面就会有微粒的脱落,它还受细胞内 Ca^{2+} 浓度的调节。已经被证实细胞骨架的重组在微粒的释放中起重要的作用。细胞受刺激会出芽形成微粒,并且不同的刺激形成不同的微粒^[5]。

1.2 细胞凋亡 凋亡是活体内个别细胞的程序性死亡,是细

胞的主动死亡方式。凋亡的主要特点是细胞皱缩,细胞质边集,细胞核裂解。细胞凋亡与半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)和 Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(ROCK)有关。有研究表明,ROCK I 和 Caspase 3 的激活导致了细胞皱缩,DNA 降解,细胞膜骨架的破坏,细胞出芽形成微粒^[6]。EMP 可通过内皮细胞活化及凋亡两种机制形成,且其组成成分不尽相同。这说明其生物学作用可能不尽相同。

2 EMPs 的生物学作用

2.1 促炎症反应 EMPs 尤其是成熟内皮细胞起源的 EMPs,它们的膜表面表达多种黏附分子,如 CD54(ICAM-1)、CD62P(P-selectin)、CD62E(E-selectin)和 CD31(PECAM)^[1],EMP 通过这些黏附分子促使白细胞聚集发挥促炎作用。EMP 还能与单核细胞黏附并结合,结合后的单核细胞穿越内皮细胞间隙的能力增强。陆永光等^[7]研究发现 EMPs 可通过活化核转录因子- κ B,使表达的 ICAM-1 mRNA 和蛋白呈时间依赖性上调。EMP 的这一作用可被 NF- κ B 的特异性拮抗剂二硫代氨基甲酸吡咯烷抑制。表明 EMPs 可通过刺激核转录因子- κ B 信号转导通路使炎症因子 ICAM-1 的表达增加。通过对内皮细胞的培养发现微粒的释放与 IL-6 的释放有关,这意味着微粒的形成与经典炎症细胞因子的产生有关^[3]。EMP 促进炎症因子的产生,炎症因子又可以诱导 EMPs 的产生。

2.2 促凝血作用 内毒素血症、血栓性血小板减少性紫癜、高血压等患者血液中微粒水平都有升高。因这些患者的血液处于高凝状态,可以假设微粒与凝血有正相关关系。这是因为带负电荷的 PS 分布在 EMPs 双分子的外层,PS 可增加组织因子(TF)的促凝活性。TF 是最重要的生理性凝血启动因子,激活因子 VII 及凝血级联反应,导致血栓的形成。血小板也参与凝血过程并且在凝血过程中发挥重要作用。有研究表明,EMP 膜上可结合 vWF 和 FV III,表面结合有 vWF 和 FV III 的 EMPs 能促进血小板的聚集并增加它们的稳定性,进一步促进凝血^[8]。表达在 EMPs 表面的黏附分子如 PECAM-1、ICAM-1、F-选择素、E-选择素、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)和玻璃黏连蛋白受体也可进一步加强血小板与 EMPs 的连接^[9],使血小板聚集。

2.3 加重血管内皮功能障碍 近年来内皮细胞功能不全(ECD)已成为人们研究的热点。一氧化氮是内皮细胞产生的,是内皮细胞性血管舒张的主要决定性因素,EMP 能通过抑制一氧化氮的产生而抑制内皮细胞依赖的血管舒张^[10]。EMP 还可使乙酰胆碱介导的血管舒张作用减弱,并增加过氧化物的产生,这些效应与 EMPs 的浓度呈正相关关系。Mezentsev 等^[11]通过研究不同浓度 EMPs 对影响血管生成各参数的影响,发现随着 EMPs 作用时间的延长与浓度的提高,内皮细胞的增殖率减少,凋亡率增加,修复能力下降,使内皮细胞功能受到损伤。李红昆^[12]的研究指出,caspase-3 是促进细胞凋亡的关键酶,内皮细胞中发现 caspase-3 的表达且 EMPs 浓度越高,caspase-3 活性越高,表明 EMPs 可以诱导内皮细胞的凋亡,且呈浓度依赖性。

3 EMPs 的检测

EMP 的定量检测结果可作为内皮功能紊乱的评价指标,其定性分析结果可作为内皮细胞发生凋亡或活化的鉴别依据,但目前 EMPs 的检测还未形成统一的标准。

3.1 流式细胞术 流式细胞术被广泛地应用到对临床标本中 EMPs 的检测,但此方法存在不足,如对微粒的敏感度差、对

小微粒检测困难^[3]。EMP 表面表达了多种特异性标志物,可通过检测所表达的标志物来检测 EMPs,流式细胞术正是运用了这个原理。收集标本后,根据研究目的,加入荧光素标记的高特异性抗体,结合 EMPs 上的特异性标志物,或加入膜联蛋白(Annexin V)结合 PS。但是,Annexin V 对于 EMPs 来说既缺乏特异性又缺乏敏感性,并且只有部分 EMPs 能与 Annexin V 结合。识别 EMPs 所用的内皮特异性标志物包括 CD31、CD105、CD54、CD62E、CD144 等,但是由于多数标志物都不是在内皮细胞特有表达的,所以有必要去发现其他的更具特异性的标志物来精确地检测 EMPs。

3.2 酶联免疫吸附测定(ELISA) 与应用流式细胞术分析微粒相比,ELISA 技术的应用没有那么普遍。ELISA 是免疫酶测定法的一种,是利用抗原与抗体间反应的特异性对检体进行检测。Annexin V 与 PS 有很强的亲和力,因此把 Annexin V 与固相载体(聚苯乙烯板)连接,然后利用 Annexin V 捕获标本中的 EMPs,显色并测定。ELISA 测定微粒具有对弱抗原敏感性高、不受微粒大小限制、一次能完成大量标本检测等优点,但是有与其结合的抗体性质易变、不能直接定量、易受可溶性抗原干扰等缺点。

4 EMPs 与疾病

4.1 EMPs 与心血管疾病 急性冠脉综合征(ACS)是由急性心肌缺血引起的一组临床综合征,内皮损伤是 ACS 发病的关键。EMP 能反应内皮细胞的损伤程度。Bernal-Mizarachi 等^[13]的前瞻性病例对照研究发现:冠状动脉疾病(CAD)患者循环中的 CD31⁺ EMPs 和 CD51⁺ EMPs 都明显升高,并指出,检测 EMPs 水平能够区别 CAD 患者与健康人。ACS 患者 CD31⁺ EMPs 的水平与稳定型心绞痛和对照组相比都明显升高,分别是 2.5 倍和 12.0 倍,表明 CD31⁺ EMPs 是 ACS 的特异性标志。但是,CD51⁺ EMPs 在 ACS 和稳定型心绞痛之间与心肌梗死和不稳定型心绞痛之间都没有明显差别,因此,得出 CD31⁺ EMPs 反映急性局部缺血,CD51⁺ EMPs 反映慢性内皮损伤。Mallat 等^[14]的实验发现,与稳定型冠脉病变患者和非冠脉病变患者相比,ACS 患者的血液循环中被抗 CD146 和抗 CD31 抗体捕获的微粒都明显升高的,同时指出被这两种抗体捕获的微粒都起源于内皮细胞。

高血压与 EMPs 之间的相互作用也有报道。Preston 等^[15]的研究把实验对象根据舒张压的值分为 3 组,第一组为重度高血压患者组 24 例,舒张压大于或等于 120 mm Hg;第二组为轻度高血压患者组 19 例,舒张压:95~100 mm Hg;第三组为血压正常人群组 16 例,舒张压小于 90 mm Hg。实验结果显示第一组血液中 EMPs 的水平与第二组和第三组相比都明显升高,并且 EMPs 水平与收缩压或舒张压值有明显的正相关关系。还指出 CD31⁺ EMPs 水平与微血管内皮细胞的凋亡程度有关,重度高血压患者 CD31⁺ EMPs 水平的持续升高预示着内皮细胞凋亡的不断增多。Amabile 等^[16]实验发现,与对照组相比,肺动脉高压患者血液中 EMPs 水平明显升高,并且通过实验得出 CD144⁺ EMPs 和 CD31⁺ EMPs 能够作为预测肺动脉高压患者血流动力学紊乱程度的因子。CD62e⁺ EMPs 与肺动脉高压患者的高敏 C 反应蛋白(hsCRP)有相关关系,hsCRP 是心血管事件强有力的预测因子之一。

4.2 EMPs 与糖尿病 Sabatier 等^[17]报道,一型糖尿病患者与健康人相比,循环中 EMPs 水平明显升高,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。并发 1~2 个微血管病变的 1 型糖尿病患者循环中 EMPs 水平无并发症的 1 型糖尿病患者更高。EMP 的

水平与 1 型糖尿病并发微血管病患者蛋白尿的严重程度呈正相关关系。可推测, EMPs 是 1 型糖尿病肾病患者内皮损伤的标志。Koga 等^[18]报道称, CD144⁺ EMPs 是内皮细胞起源的特异性微粒。糖尿病患者与健康人相比, 血液中的 CD144⁺ EMPs 明显升高。同时指出, 在糖尿病并发 CAD 的患者循环中 CD144⁺ EMPs 的水平比无并发 CAD 的比率明显升高, 因此得出循环中的 CD144⁺ EMPs 是糖尿病患者是否并发 CAD 的一个独立有效的预测因素。更有趣的是, 他们发现无心绞痛发作的人来讲, CD144⁺ EMPs 的升高是并发 CAD 的一个严重的危险因素。

4.3 EMPs 与肺部疾病 把 EMPs 静脉注入小鼠体内, 可诱导小鼠发生急性肺损伤。Buesing 等^[19]做了相似的实验。他们把 EMPs(200 000/mL)与脂多糖(2 mg/kg)单独或者两者同时静脉注入小鼠体内。通过 ELISA 法观察血清中 IL-1 β 和 TNF- α 的变化, 并分析肺泡灌洗液。结果发现注射 EMPs 后肺部的 IL-1 β 和 TNF- α 水平明显升高, 并进一步刺激更多的中性粒细胞在肺部浸润。他们还发现小鼠肺部的髓过氧化物酶水平也明显升高。因此, EMPs 是通过启动细胞因子的增加从而招募更多的中性粒细胞和继发性髓过氧化物酶的释放增加来引发肺损伤。通过减少或阻断 EMPs 释放途径来治疗肺损伤将会是一个很有效的方法。Thomashow 等^[20]的实验发现, 与对照组相比, 慢性阻塞性肺疾病(COPD)和肺气肿患者循环中 CD31⁺ EMPs 都会升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。CD31⁺ EMPs 不仅在重度 COPD 患者中升高, 在轻度 COPD 患者中也明显升高, 并且循环中 CD31⁺ EMPs 的水平随着 COPD 严重程度的增加而增加。CD31⁺ EMPs 与患者的肺功能也有关系, 他们发现 CD31⁺ EMPs 水平与患者的第一秒用力呼出量成正比。该研究还发现 CD31⁺ EMPs 水平与肺部微血管的灌注呈负相关关系。

5 小 结

近年来针对 EMPs 的研究开展得越来越广泛和深入, 很多疾病的患者血液中都可以检测到 EMPs 水平或性质的改变。EMPs 的水平与性质不仅可反映其来源细胞的结构和功能状态, 并参与许多疾病的病理生理过程。相信通过进一步研究 EMPs 的形成机制、检测方法及其与心血管疾病、糖尿病等疾病的相互作用, 将为这些疾病的预防、诊断和治疗提供一个合理、全新的方法。

参考文献

- [1] Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, et al. Endothelial microparticles in diseases[J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 335(1): 143-151.
- [2] Morel O, Morel N, Jesel L, et al. Microparticles; a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis[J]. *Semin Immunopathol*, 2011, 33(5): 469-486.
- [3] Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(1): 27-33.
- [4] Viera AJ, Mooberry M, Key NS, et al. Microparticles in cardiovascular disease pathophysiology and outcomes[J]. *J Am Soc Hypertens*, 2012, 6(4): 243-252.
- [5] Wu ZH, Ji CL, Li H, et al. Membrane microparticles and diseases

- [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(18): 2420-2427.
- [6] Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, et al. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2011, 32(11): 659-665.
- [7] 陆永光, 李浪, 符春晖, 等. 内皮细胞微粒对人脐静脉内皮细胞 ICAM-1 表达和 NF- κ B 活性的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(11): 1291-1295.
- [8] Markiewicz M, Richard E, Marks N, et al. Impact of endothelial microparticles on coagulation, inflammation, and angiogenesis in age-related vascular diseases[J]. *J Aging Res*, 2013, 2013: 734509.
- [9] Eyre J, Burton JO, Saleem MA, et al. Monocyte- and Endothelial-Derived microparticles induce an inflammatory phenotype in human podocytes[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2011, 119(3): 58-66.
- [10] Burger D, Touyz RM. Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells[J]. *J Am Soc Hypertens*, 2012, 6(2): 85-99.
- [11] Mezentsev A, Merks RM, O'Riordan E, et al. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(3): 1106-1114.
- [12] 李红昆. 内皮细胞微粒与冠心病关系的研究进展[J]. *广西医学*, 2013, 35(1): 104-106.
- [13] Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes[J]. *Am Heart J*, 2003, 145(6): 962-970.
- [14] Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes[J]. *Circulation*, 2000, 101(8): 841-843.
- [15] Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles[J]. *Hypertension*, 2003, 41(2): 211-217.
- [16] Amabile N, Heiss C, Real WM, et al. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(11): 1268-1275.
- [17] Sabatier F, Darmon P, Hugel B, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles[J]. *Diabetes*, 2002, 51(9): 2840-2845.
- [18] Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, et al. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45(10): 1622-1630.
- [19] Buesing KL, Densmore JC, Kaul S, et al. Endothelial microparticles induce inflammation in acute lung injury[J]. *J Surg Res*, 2011, 166(1): 32-39.
- [20] Thomashow MA, Shimbo D, Parikh MA, et al. Endothelial microparticles in mild chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis Chronic Obstructive Pulmonary Disease study[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 188(1): 60-68.

(收稿日期: 2014-10-08)