

• 论 著 •

冠心病患者外周血内皮微粒变化及其与炎症因子的相关性研究

郑力辉¹, 郭 菲², 韩 笑¹, 黄立娟³

(1. 哈尔滨市第一医院检验科, 黑龙江哈尔滨 150010; 2. 黑龙江农垦总局总医院检验科, 黑龙江哈尔滨 150010; 3. 哈尔滨医科大学附属第二医院检验科, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要:目的 探讨不同类型冠状动脉粥样硬化性心脏病(CHD)患者外周血内皮微粒(EMPs)水平变化及其与白细胞介素-6(IL-6)和C反应蛋白(CRP)的相关性。方法 选择CHD患者38例,分为心肌梗死(MI)组13例、不稳定型心绞痛(UA)组13例、稳定性心绞痛(SA)组12例,以12例健康者作为对照组。采用流式细胞术检测血浆EMPs水平;采用酶联免疫吸附法和特种蛋白分析仪分别检测血清IL-6和CRP水平。结果 MI组、UA组EMPs水平高于SA组和对照组($P<0.05$)。CHD患者体内EMPs水平与IL-6、CRP具有显著的相关性(相关系数分别为0.79、0.50, $P<0.05$)。结论 EMPS可作为监测和评估CHD患者内皮细胞损伤程度的指标;EMPs可能通过增强炎性反应性血管损伤而在CHD发生、发展过程中发挥重要作用。

关键词:内皮微粒; 冠心病; 白细胞介素-6; C反应蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.21.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)21-3112-03

Correlation between endothelial microparticles and interleukin-6 and C-reactive protein in patients with coronary heart disease

Zheng Lihui¹, Guo Fei², Han Xiao¹, Huang Lijuan³

(1. Department of Clinical Laboratory, Harbin First Hospital, Harbin, Heilongjiang 150010, China;
2. Department of Clinical Laboratory, Heilongjiang Reclamation Bureau General Hospital, Harbin, Heilongjiang 150010, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: **Objective** To investigate alterations of endothelial microparticles(EMPs) levels in patients with coronary heart disease(CHD), and to evaluate the relationship between EMPs and interleukin-6(IL-6) and C-reactive protein(CRP). **Methods** A total of 38 patients with CHD were divided into myocardial infarction(MI) group(13 cases) and unstable angina(UA) group(13 cases) and stable angina(SA) group(12 cases), and 12 healthy subjects were enrolled as control group. Levels of EMPs were measured by using flow cytometry technique. Concentration of IL-6 and CRP were determined by using enzyme linked immunosorbent assay and special protein analysis respectively. **Results** Compared with SA group and control group, levels of EMPs were significantly increased in MI group and UA group($P<0.05$). Levels of EMPs in patients with CHD were significantly correlated with IL-6 and CRP, with correlation coefficient of 0.79 and 0.50 respectively($P<0.05$). **Conclusion** EMPs could contribute to monitoring and evaluating the degree of endothelial cells injury in patients with CHD as a laboratory indicator. EMPs might enhance the vascular inflammation in patients with CHD, and further accelerate the development of CHD.

Key words: endothelial microparticles; coronary heart disease; interleukin-6; C-reactive protein

冠状动脉粥样硬化性心脏病(CHD)是常见心血管疾病之一,内皮功能紊乱和炎性反应是CHD关键性的病理特征。有学者在急性冠脉综合征患者外周血中发现了高水平促凝微粒的存在^[1]。内皮微粒(EMPs)是因刺激因素作用下内皮细胞激活或凋亡时,从内皮细胞细胞膜上脱落的直径小于1 μm的微小膜性囊泡样结构,并携带了母细胞上重要的膜蛋白和磷脂^[2]。循环性EMPs水平检测可用于预测冠状动脉损伤的发生和评估其严重程度。系统性炎性标志物能够预测心血管疾病,例如白细胞介素-6(IL-6)和C反应蛋白(CRP)。有研究证实,外周血EMPs水平与IL-6具有相关性^[3]。目前,关于EMPs、IL-6和CRP在CHD患者中的相关性尚未完全明确。本研究采用流式细胞术检测了CHD患者外周血EMPs水平,并分析了其与IL-6、CRP水平的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010年9~12月于哈尔滨医科大学第二附属医院心内科住院的CHD确诊患者38例;按照世界卫生组织(WHO)制定的缺血性心脏病命名及诊断标准将患者分为3组,心肌梗死(MI)组13例,男8例、女5例,平均(66.9±13.7)岁,不稳定型心绞痛(UA)组13例。男9例、女4例,平均(62.2±12.1)岁,稳定性心绞痛(SA)组12例,男7例、女5例,平均(57.7±13.0)岁。同期体检健康者12例纳入对照组,男6例、女6例,平均(46.3±8.1)岁。所有研究对象均为非血缘关系个体,并排除急慢性炎症、创伤、脑梗死、周围动脉栓塞、恶性肿瘤及严重肝肾疾病等。

1.2 仪器与试剂 PE-CD144(美国 BioLegend 公司), 直径为3.0 μm 和 0.8 μm 标准乳胶微球(美国 Sigma 公司), 酶联免疫

吸附法(ELISA)人 IL-6 检测试剂盒(欣博盛生物科技有限公司),流式细胞分析仪(美国 BD 公司),BN II 型特定蛋白分析仪及配套 CRP 检测试剂(德国西门子公司),Multiskan MK3 型酶标仪(芬兰雷勃公司)。

1.3 方法

1.3.1 血液标本的制备 采用枸橼酸钠抗凝管和未加抗凝剂的试管采集研究对象清晨空腹静脉血。根据 Koga 等^[4]的研究方法,采用两步离心制备微粒悬液。枸橼酸钠抗凝血在室温条件下,350 r/min 离心 10 min,制备富血小板血浆(PRSP);取上 2/3 上清液注入 EP 管,室温条件下,3 000 r/min 离心 1 min,制备无血小板血浆(PFP),即为 EMPs 悬液。EMPs 悬液分装于 EP 管中,−80 ℃ 保存,检测前 0 ℃ 冰水融化 1 h^[5-6]。未加抗凝剂的血液标本室温条件下 2 000 r/min 离心 15 min,分离血清标本−20 ℃ 保存待测。

1.3.2 流式细胞术检测 采用已报道的流式细胞术检测方法进行 EMPs 检测^[5-6]。取 30 μL EMPs 悬液与 20 μL 藻红蛋白(PE)标记的抗 CD144 抗体混合,4 ℃ 避光孵育 30 min(阴性对照不加荧光抗体),加入 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)及直径为 3.0 μm 和 0.8 μm 标准微球各 1×10⁵ 个。每次标本检测前制备 1 个仅含 1.0 mL PBS 的试管,加入直径为 3.0 μm 和 0.8 μm 标准微球各 1×10⁵ 个,作为确定 EMPs 位置的对照品。3.0 μm 标准微球用于 EMPs 计数,0.8 μm 标准微球用于 EMPs 定位设门。建立前向角光散射-对侧向角光散射(FSC-SSC)双对数散点图,以标准微球作为定位对照,调整检测阈值,使每个标本管均在相同条件及程序设定下检测。根据 0.8 μm 标准微球的位置设门,EMPs 被定义为直径小于 1 μm 且荧光特异性抗体阳性的颗粒。当 3.0 μm 标准微球计数达 2×10⁴ 个时停止检测,通过荧光直方图计算位于 0.8 μm 标准微球区域内 EMPs 数量,绝对量以 C 表示。每毫升血浆中 EMPs 绝对量(N)根据以下公式计算: $N = C \times \frac{10^5}{2 \times 10^4} \times \frac{1000}{30} = 167 \times C$ 。

1.3.3 IL-6 和 CRP 水平检测 采用 ELISA 试剂盒进行血清 IL-6 水平检测,采用 BN II 型特定蛋白分析仪及配套试剂进行血清 CRP 水平检测。具体操作过程严格按仪器及试剂说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件进行数据处理和统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数的比较,根据数据是否满足方差齐性,分别采用单因素方差分析或非参数 Kruskal-Wallis 检验;两组间均数的比较采用 LSD 检验或 Mann-Whitney 检验;相关系数分析采用 Pearson 积差相关分析。采用双侧检验,α=0.05 为检验水准, $P < 0.05$ 为比较差异和分析参数有统计学意义。

2 结 果

2.1 各研究组 EMPs 水平比较 MI 组、UA 组、SA 组、对照组 EMPs 检测结果分别为: (2.03±0.47)×10⁵/mL、(1.86±0.43)×10⁵/mL、(0.52±0.29)×10⁵/mL、(0.45±0.37)×10⁵/mL。MI 组、UA 组、SA 组、对照组 EMPs 水平比较差异有统计学意义($F=56.24, P < 0.05$)。MI 组、UA 组 EMPs 水平高于 SA 组和对照组($P < 0.05$)。MI 组与 UA 组,以及 SA 组与对照组 EMPs 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各研究组 IL-6 和 CRP 水平比较 各研究组 IL-6、CRP 水平比较见表 1。MI 组和 UA 组 IL-6 和 CRP 水平高于 SA 组和对照组($P < 0.05$)。MI 组与 UA 组,以及 SA 组与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各研究组 IL-6 和 CRP 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6(pg/mL)	CRP(mg/L)
MI 组	13	42.29±0.40*#△	24.85±9.54*#△
UA 组	13	20.78±7.63*#	10.03±9.05*#
SA 组	12	4.32±2.56	3.79±5.19
对照组	12	3.27±1.59	1.56±1.31

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 SA 组比较; △: $P < 0.05$, 与 UA 组比较。

2.3 CHD 患者 EMPs 与 IL-6 和 CRP 相关性分析 相关性分析结果显示,CHD 组患者 EMPs 水平与 IL-6、CRP 呈正相关,相关系数分别为 0.79、0.50($P < 0.05$)。

3 讨 论

内皮细胞损伤或功能紊乱在动脉粥样硬化及其并发症的发病机制中起着关键作用。目前,内皮细胞损伤或功能紊乱的评估多通过测定内皮依赖性血管扩张程度或检测外周血中的可溶性标志物^[4];然而,前者缺少客观判断标准,主要依赖操作者经验进行判断,而后者又缺乏特异性。因此,目前尚缺乏可定量检测、具有可比性和特异性的内皮细胞损伤或功能紊乱标志物。有研究表明,血浆 EMPs 水平升高与心血管疾病患者内皮细胞功能障碍密切相关^[7]。体外研究表明,EMPs 可通过减少 NO 的生成或生物利用,直接影响内皮依赖性血管舒张功能,EMPs 水平升高可增加超过氧化物的生成,加重内皮细胞功能紊乱的程度,因此 EMPs 可作为内皮细胞功能紊乱的标志物^[8]。另有研究对糖尿病、高三酰甘油血症、慢性肾衰患者 EMPs 水平进行了检测,结果显示上述疾病患者外周血 EMPs 水平均升高,也证实 EMPs 可作为评价内皮细胞损伤或功能紊乱的特异性标志物^[9-11]。此外,具有不同表型的 EMPs 也可为判断内皮细胞病理改变提供有价值信息^[12]。本研究结果显示,MI、UA 患者外周血 EMPs 水平高于 SA 患者和健康者($P < 0.05$),提示 EMPs 水平升高能够反映 MI、UA 患者内皮细胞的严重损伤。因此,EMPs 定量检测可能有助于监测和评估 CHD 患者内皮细胞的损伤程度。

本研究中对 EMPs 免疫表型检测方法与既往研究有所不同。既往研究检测急性冠脉综合征患者 EMPs 水平,多采用 CD31⁺ 或 CD31⁺/CD42b⁻ 作为标记,但 CD31 可大量表达于血小板,因此 CD31⁺ 或 CD31⁺/CD42b⁻ EMPs 可能包含了血小板微粒(PMPs),不能准确反映内皮细胞功能紊乱或凋亡。本研究所采用的标记物 CD144(VE-钙粘连蛋白)仅特异性表达于内皮细胞,能维持内皮细胞粘连处的稳定性,抑制内皮细胞凋亡,因此 CD144⁺ EMPs 是内皮细胞特异性微粒^[4]。本研究以抗 CD144 抗体标记 EMPs,可精确反映 CHD 患者内皮细胞的损伤程度。既往研究已证实急性冠脉综合症患者外周血 CD31⁺ 或 CD31⁺/CD42b⁻ EMPs 水平升高^[1],而本研究进一步证实 CHD 患者外周血中存在高水平的 CD144⁺ EMPs。

IL-6 是具有促炎和促动脉粥样硬化作用的炎症因子,也是 CHD 的重要危险因子。IL-6 作用于血管壁,可引起血管壁

损伤,参与动脉粥样硬化的形成。Chirinos 等^[3]对健康人群的研究结果显示,EMPs 作为反映内皮细胞凋亡的标志物,与 IL-6 具有显著的相关性,提示内皮细胞凋亡可能通过亚临床炎性反应引起心血管疾病^[3]。在本研究中,MI 和 UA 患者 IL-6 水平高于 SA 患者和健康者($P < 0.05$),与既往研究结果相一致。同时,本研究对 CHD 患者外周血 EMPs 水平与 IL-6 的相关性进行了研究,结果显示 EMPs 与 IL-6 呈正相关。

CRP 是炎性反应和组织破坏的敏感标志物,也是心血管疾病的独立危险因素之一。此外,CRP 不仅是炎性反应标志物,也是心血管疾病的调节因子^[2]。CRP 可通过减少 NO 生成,损伤内皮细胞功能。有研究发现,CRP 刺激人脐静脉内皮细胞后,可使 EMPs 水平显著升高,说明 CRP 水平升高有可能损伤内皮细胞形态和功能,从而促进 EMPs 的大量释放^[2]。虽然 Chirinos 等^[3]对健康者体内 EMPs 和 CRP 相关性进行了研究,但并未发现二者间具有相关性。在本研究中,MI 和 UA 患者 CRP 水平高于 SA 患者和健康者($P < 0.05$),而且 CHD 患者体内 EMPs 和 CRP 具有显著的相关性。

本研究尚存在一定的局限性。本研究仅证实了 CHD 患者体内 EMPs 与 IL-6、CRP 存在相关性,但其间相关性的产生机制尚待进一步研究。这种相关性的产生可能是由于内皮细胞损伤或凋亡加重了动脉粥样硬化斑块内的炎性反应,也可能是由于炎症因子本身能够诱导内皮细胞损伤或凋亡,也有可能是上述两种因素共同作用的结果。综上所述,本研究证实 MI、UA 患者外周血 EMPs 水平升高,提示 EMPs 检测可用于监测和评估 CHD 患者内皮细胞损伤程度。CHD 患者体内 EMPs 与 IL-6、CRP 具有显著的相关性,联合检测 EMPs、IL-6、CRP 能够为 CHD 的诊断和预防提供新的方向。

参考文献

- [1] 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]. Am Heart Assoc, 2000, 101(8): 841-843.
- [2] Wang JM, Wang Y, Huang JY, et al. C-Reactive protein-induced endothelial microparticle generation in HUVECs is related to BH4-dependent NO formation[J]. J Vasc Res, 2007, 44(3): 241-248.
- [3] Chirinos JA, Zambrano JP, Virani SS, et al. Correlation between apoptotic endothelial microparticles and serum interleukin-6 and C-reactive protein in healthy men[J]. Am J Cardiol, 2005, 95(10): 1258-1260.
- [4] 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.
- [5] Dey-Hazra E, Hertel B, Kirsch T, et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing[J]. Vasc Health Risk Manag, 2010, 6(6): 1125-1133.
- [6] Sellam J, Proulle V, Jungel A, et al. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity[J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(5): 156-160.
- [7] Amabile N, Guerin AP, Tedgui A, et al. Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study[J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 29(10): 1210-1216.
- [8] Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, et al. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(5): 1910-1951.
- [9] Tramontano AF, Lyubarova R, Tsakos J, et al. Circulating endothelial microparticles in diabetes mellitus[J]. Mediators Inflamm, 2010, 21(6): 817-821.
- [10] Ferreira AC, Peter AA, Mendez AJ, et al. Postprandial hypertriglyceridemia increases circulating levels of endothelial cell microparticles[J]. Circulation, 2004, 110(23): 3599-3603.
- [11] Faure V, Dou L, Sabatier F, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure[J]. Thromb Haemost, 2006, 4(3): 566-573.
- [12] Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, et al. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia[J]. Haematologica, 2009, 94(7): 911-918.

(收稿日期:2015-06-01)

(上接第 3111 页)

的病情进展而逐渐升高, Ca^{2+} 和补体 C3、C4 水平则逐渐降低;上述 6 项指标联合检测的灵敏度及诊断符合率、正确诊断率高于各指标单独检测,联合检测的漏诊率则低于单独检测。因此,早期联合检测血清 Ca^{2+} 、CRP、UA、Hcy 及补体 C3、C4 浓度水平,对 HDPC 的早期诊治和病情评估具有重要意义。

参考文献

- [1] 柴新燕,邱丹,朱丹,等.妊娠期高血压疾病患者血清钙离子测定的意义及临床分析[J].中国实验诊断学,2012,16(5): 875-876.
- [2] 刘华平,张燕荷,杨礼,等.孕期妇女钙代谢及骨密度的变化及补钙的影响[J].空军总医院学报,2002,16(1): 8-10.
- [3] Herrera JA, Arevalo-Herrera M, Shahabuddin AK, et al. Calcium and conjugated linoleic acid reduces pregnancy-induced hypertension and decreases intracellular calcium in lymphocytes[J]. Am J

Hypertens, 2006, 19(4): 381-387.

- [4] 陈俊,胡必成,王羽,等. Hcy 及 hs-CRP 水平与妊娠高血压综合症患者的相关性探讨[J].标记免疫分析与临床,2012,19(1): 51-52.
- [5] 袁卓.妊娠期高血压疾病血清尿酸测定的临床意义[J].吉林医学,2010,28(31): 5013-5014.
- [6] Pierdomenico SD, Bucci A, Lapeuna D, et al. Circulating homocysteine levels in sustained and white coat hypertension[J]. J Hum Hypertens, 2003, 17(3): 165-170.
- [7] 张俊,李荣国,毛海婷.妊娠高血压综合症血清 C3、C4 及 CRP 水平变化和意义[J].山西医药,2009,15(49): 21-23.
- [8] Kilic-Okman T, Kucuk M, Ekuklu G. C-reactive protein and body mass index in women with pre-eclampsia[J]. Int J Gynaecol, 2004, 84(1): 75-76.

(收稿日期:2015-07-11)