

doi:10.3969/j.issn.0253-9896.2011.03.008

闭塞性周围动脉粥样硬化患者血管内皮损伤的研究

门剑龙 李刚 任静[△]

摘要 目的:观察闭塞性周围动脉粥样硬化(ASO)患者的凝血和纤溶系统功能的变化,探讨 ASO 患者的内皮损伤机制。**方法:**选择 ASO 患者 82 例(患者组)和健康对照 80 例(对照组),采用流式细胞仪测定循环内皮细胞(CEC)和内皮祖细胞(EPCs)数量。采用酶联免疫吸附法测定凝血酶-抗凝血酶复合物(TAT)。采用血液凝固仪测定凝血因子 VII 活性(FVII:A)、纤维蛋白原(FIB)、vW 因子抗原水平(vWF:Ag)、组织型纤溶酶原激活物活性(t-PA:A)及纤溶酶原活化抑制物活性(PAI:A)水平。以 vWF:Ag 参考范围上限(150%)作为医学决定水平,将患者组分为 vWF:Ag 正常组(38 例)和 vWF:Ag 增高组(44 例)。**结果:**患者组 PAI:A、FVII:A、FIB、vWF:Ag、TAT 和 CEC 高于对照组, EPCs 低于对照组, vWF:Ag 增高组的 PAI:A、FVII:A 和 TAT 均高于 vWF:Ag 正常组,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$);患者组 vWF:Ag 与 FVII:A、PAI:A、TAT 均呈正相关($P < 0.01$)。**结论:**ASO 患者存在较严重的血管内皮损伤,内皮细胞大量脱落,且损伤后的修复能力不足,其纤溶和凝血系统功能紊乱和血管内皮损伤程度相关。

关键词 动脉粥样硬化 内皮细胞 内皮,血管 血液凝固因子 纤溶酶 流式细胞术

Study on Endothelial Cells Damage in Patients with Peripheral Arteriosclerosis Obliterans

MEN Jianlong, LI Gang, REN Jing

Tianjin Key Laboratory of Biomedical Detection & Instruments, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract Objective: To observe the changes of function for the coagulation and fibrinolysis system in patients with peripheral arteriosclerosis obliterans (ASO), and the mechanism of the endothelial cell damage thereof. **Methods:** Eighty-two ASO patients and 80 controls were selected from our hospital. The flow cytometry was used to measure the circulating endothelial cell (CEC) and the endothelial progenitor cells (EPCs). Thrombin-antithrombin complex (TAT) was measured by ELISA. Using the blood coagulation instrument assay the factor VII activity (FVII:A), fibrinogen (FIB), von Willebrand factor (vWF), tissue plasminogen activator activity (t-PA:A) and plasminogen activator inhibitor activity (PAI:A). The upper limit of the reference range (150%) of vWF:Ag was admitted as the cut-off value to divide the patients into the normal level group (38 patients) and increased level group (44 patients). **Results:** Compared with control group, the values of PAI:A, FVII:A, FIB, vWF:Ag, TAT and the CEC were increased obviously ($P < 0.01$), and the level of the EPCs was decreased obviously ($P < 0.01$) in patients group. The levels of PAI:A, FVII:A and TAT were significantly higher in patients with increased vWF:Ag than those of patients with normal vWF:Ag ($P < 0.01$). There was a positive relationship between the vWF:Ag and FVII:A ($P < 0.01$), TAT and PAI:A in patients group. **Conclusion:** There was severe damage in blood vascular endothelial cells in patients with peripheral arteriosclerosis obliterans. The circulating endothelial cells shed off vascular wall, and it was weak for the repair ability after the endothelial injury. There was a relationship between the disorder and the severity of the endothelial cell damage.

Key words atherosclerosis endothelial cells endothelium, vascular blood coagulation factors plasmin flow cytometry

闭塞性周围动脉粥样硬化(peripheral arteriosclerosis obliterans, ASO)的病理机制是动脉壁慢性炎性紊乱、动脉管腔狭窄、血流涡流和粥样斑块内出血导致继发性血栓形成。近年来,国外研究已在抗凝治疗^[1]、自体干细胞移植修复损伤的外周血管^[2]等方面进行了探索。但尚缺乏对 ASO 患者血管损

伤及其对止凝血系统影响机制的深入观察,使得不同研究的结论差异较大^[3-4]。本研究通过观察 ASO 患者相关的凝血和纤溶系统功能的变化,并对 ASO

作者单位: 300072 天津大学,天津市生物医学检测技术与仪器重点实验室(门剑龙,李刚);天津医科大学总医院临床检验科(门剑龙,任静)

[△]通讯作者 E-mail: renjingzy@yahoo.cn

患者的内皮损伤机制进行探讨, 以为临床治疗提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择2009年2月—2010年2月在我院就诊的ASO患者82例, 男75例, 女7例, 平均(62.3±6.6)岁。选择本院健康管理中心的健康体检者80例为对照组, 男75例, 女5例, 平均(61.8±7.4)岁。2组间年龄($t = 0.72$)、性别($\chi^2 = 0.552$)差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。以vWF因子抗原水平(von Willebrand factor antigen, vWF:Ag)参考范围上限(150%)作为医学决定水平, 将患者组分为vWF:Ag正常组(38例)和vWF:Ag增高组(44例)。

1.2 方法

1.2.1 相关指标测定 采用IL ACL-9000型血液凝固仪测定凝血因子VII活性(factor VII activity, FVII:A)、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)、vWF:Ag、纤溶酶原活化抑制物活性(plasminogen activator inhibitor activity, PAI:A)及组织型纤溶酶原激活物活性(tissue plasminogen activator activity, t-PA:A)。采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定凝血酶-抗凝血酶复合物(thrombin-antithrombin complex, TAT)。

1.2.2 内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的分离和测定 将2 mL全血在4℃下进行密度梯度离心(300×g, 20 min), 将分离出的细胞用磷酸盐缓冲液(pH 7.2)洗涤, 用PE-CD133单克隆抗体和FITC-CD34单克隆抗体标记分离细胞。染色细胞用PBS/BSA洗涤, 用流式细胞仪(BD FACS Aris™, BD Bio-sciences, San Jose, CA)进行分析。计数每20万单核细胞中CD34⁺和CD133⁺双阳性细胞的数量。

1.2.3 循环内皮细胞(circulating endothelial cell, CEC)测定 测定方法参照文献[5]。用20 μL FcR和200 μL鼠血浆(Sigma-Aldrich)对分离出的细胞进行结合。采用CD45FITC(eBioscience, San Diego, CA, USA; clone H130)、CD146 PE(BD; clone P1H12)和CD34 Percp(BD; clone 8G12)标记分离出的细胞。染色细胞用PBS(含5%小牛血清和0.1%叠氮钠)洗涤。用流式细胞仪进行分析, 计数每毫升中CD34⁺、CD146⁺及CD45⁺细胞的数量。

1.3 统计学分析 计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用SPSS 12.0软件进行统计分析。2组比较采用 t 检验; 采用线性相关分别计算vWF:Ag、CEC、EPCs与各项指标之间的Pearson相关系数, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组纤溶、凝血和内皮系统指标比较 患者组PAI:A、FVII:A、FIB、TAT、vWF:Ag和CEC均高于对照组, EPCs低于对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$), 2组t-PA:A差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表1、2。

表1 2组纤溶和凝血系统指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	t-PA:A (U/L)	PAI:A (AU/L)	FVII:A (%)	FIB (mg/L)	TAT (μg/L)
对照组	80	450±200	520±310	103.2±36.4	2 834±967	2.86±0.60
患者组	82	420±170	1 790±830	165.1±53.9	3 365±1 258	4.52±1.97
t		1.43	14.11**	10.59**	3.82**	7.91**

** $P < 0.01$

表2 2组血管内皮指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	vWF:Ag(%)	CEC(×10 ³ /L)	EPCs ^Δ
对照组	80	112.8±34.5	115±33	85±40
患者组	82	196.5±80.7	176±62	51±28
t		9.42**	8.92**	8.31**

^ΔEPCs单位为每20万单核细胞中CD34⁺和CD133⁺双阳性细胞数量; ** $P < 0.01$

2.2 不同vWF:Ag水平ASO患者纤溶和凝血指标比较 vWF:Ag增高组的PAI:A、FVII:A和TAT均高于vWF:Ag正常组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 2组t-PA:A和FIB差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表3。

表3 vWF:Ag正常组和增高组ASO患者

纤溶和凝血系统指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	t-PA:A (U/L)	PAI:A (AU/L)	FVII:A (%)	FIB (mg/L)	TAT (μg/L)
正常组	38	380±180	1 310±350	135.2±24.3	3 305±1178	3.57±1.03
增高组	44	340±130	2 040±580	190.7±28.4	3 428±1012	5.43±2.90
t		1.97	10.11*	14.12*	1.67	4.26*

* $P < 0.05$

2.3 ASO患者组纤溶和凝血系统指标与内皮指标的相关分析 vWF:Ag与FVII:A、TAT及PAI:A呈正相关(均 $P < 0.01$); 而CEC、EPCs与各项纤溶和凝血系统指标均无相关性, 见表4。

表4 ASO患者组各项指标的相关性分析 (r)

因素	CEC	EPCs	vWF:Ag
FVII:A	0.412 5	-0.398 7	0.652 2*
FIB	0.204 5	-0.291 4	0.460 7
TAT	0.416 5	0.192 6	0.803 3**
t-PA:A	0.135 2	0.178 8	0.302 5
PAI:A	0.350 8	0.429 3	0.699 0**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

健康人外周循环中CEC数量很少, 在各类血管损伤性疾病时其数量显著增加^[4]。在动脉粥样硬化发展的最初阶段, 内皮细胞的损伤即已发生。本研究显示, ASO患者的CEC水平高于正常人群, 提示患者血管壁内皮细胞脱落进入血液循环。CEC水平

显著增高,与血流通过粥样硬化的血管时,血流的剪切应力对已经狭窄或阻塞的血管产生持续且强烈的刺激有关^[5]。刺激造成内皮细胞从血管壁持续大量的脱落,进而引发此后的血管内皮细胞功能紊乱和血栓倾向。EPCs 是 CEC 的前体细胞,表达 CD34 和 CD133,在生理和病理条件下可从骨髓转移至外周血并修复损伤的血管内皮。当 EPCs 数量减少时,机体修复血管内皮的能力减弱,从而导致血管壁的损伤持续存在。本研究 ASO 患者 EPCs 水平低于正常人群,提示其血管损伤后的修复能力明显不足。患者组的凝血、纤溶系统指标异常,与内皮损伤后所引发的止凝血系统功能失衡有关。ASO 患者内皮损伤和修复之间的异常状态可能是血管持续损伤后,新生内膜过度增生造成的 EPCs 消耗及内皮功能不全所致。

内皮细胞在发生功能紊乱、损伤或受到凝血酶刺激时释放 vW 因子(vWF),而血管内皮损伤诱发凝血酶激活后可反馈性促进内皮细胞活化,进一步促使 vWF 释放^[6],因此作为血管内皮损伤标志物,vWF:Ag 的显著增高是内皮损伤和凝血活化的结果。本研究结果显示 ASO 患者组 vWF:Ag、FⅦ:A、FIB、TAT 和 PAI:A 均显著高于对照组,表明血管内皮损伤引发的持续的功能紊乱和止凝血各系统异常同时存在。由于胆固醇对动脉硬化的影响是通过 FⅦ实现的^[7],PAI 是纤溶系统活性主要的抑制物,而 FIB 和 TAT 水平增高表明凝血途径活化,说明患者凝血和纤溶系统均存在有利于血栓形成的倾向。本研究表明患者凝血活性和纤溶抑制与持续的血管内皮损伤和功能紊乱密切相关,且血管内皮损伤严重的患者比损伤较轻的患者具有更大的血栓形成风险。ASO 患者凝血和纤溶各项指标与 CEC、EPCs 均不相关,表明内皮细胞脱落和血管内皮修复能力减弱可能只是导致止凝血系统功能紊乱复杂机制中

的一个方面,而患者血栓形成是由多系统相互作用的最终结果。

综上所述,ASO 患者存在较严重的血管内皮损伤,由于 EPCs 数量减少,其血管修复能力明显不足。血管内皮损伤和功能紊乱进一步成为凝血和纤溶系统活性异常的基础,使患者血栓发生风险显著增加。因此密切监测血管内皮损伤标志物,对于及时了解患者血管壁损伤程度和评估病程发展具有较积极的价值。

参考文献

- [1] Steffen LM, Duprez DA, Boucher L, et al. Management of peripheral artery disease[J]. Diabetes Spectrum, 2008,21(3): 171-177.
- [2] Amann B, Ludemann C, Ruckert R, et al. Design and rationale of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study for autologous bone marrow cell transplantation in critical limb ischemia: the BONE Marrow Outcomes Trial in Critical Limb Ischemia (BONMOT-CLI) [J]. VASA, 2008,37(4): 319-325.
- [3] Gyongyosi M, Lang I, Dettke M, et al. Combined delivery approach of bone marrow mononuclear stem cells early and late after myocardial infarction: the MYSTAR prospective, randomized study[J]. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2009, 6(1):70-81.
- [4] Lawall H, Bramlage P, Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal[J]. Thromb Haemost, 2010,103(4):696-709.
- [5] Pipp F, Boehm S, Cai WJ, et al. Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(9): 1664-1668.
- [6] Hristov M, Zernecke A, Liehn EA, et al. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury[J]. Thromb Haemost, 2007, 98(2): 274-277.
- [7] Lindman AS, Pedersen JI, Arnesen H, et al. Association between the factor VII haplotype containing the -402A allele and myocardial infarction in a population of elderly men at high risk for coronary heart disease[J]. Thromb Haemost, 2005,94(1):226-227.

(2010-06-10 收稿 2010-10-25 修回)

(本文编辑 闫娟)

消 息

欢迎使用远程投稿系统

本刊现已启动远程投稿系统,欢迎您登陆我们的网站(<http://www.tjybjb.ac.cn>),浏览相关信息,自行投稿。我们会尽快接收并回复您正式稿号,您收到正式稿号后,请将单位介绍信寄来,同时从邮局汇款审稿费 30 元,均注明稿号。

由于网站尚处于调试磨合阶段,欢迎您将使用过程中遇到的问题反馈给我们,以便及时解决。

《天津医药》编辑部