

## 冠状动脉血和静脉血内皮细胞微粒研究\*

阿地里江·肉孜<sup>1</sup> 袁玉娟<sup>2</sup> 穆叶赛·尼加提<sup>3</sup>

**[摘要]** 目的:分析急性心肌梗死(AMI)患者冠状动脉(冠脉)血和外周血内皮细胞微粒(EMPs)水平,验证EMPs与急性心血管事件的相关性。**方法:**收集27例AMI患者和30例稳定性冠心病患者外周血,冠脉介入术中收集研究对象冠脉血标本。采用流式细胞技术对CD31<sup>+</sup>EMPs进行定性和定量分析。**结果:**AMI组患者冠脉血CD31<sup>+</sup>EMPs水平(11.93±5.13)%,外周静脉血(36.68±23.53)%,稳定性冠心病患者冠脉血CD31<sup>+</sup>EMPs水平(5.03±3.01)%,外周静脉血(17.84±12.78)%,两组差异具有统计学意义( $P<0.001$ )。通过ROC曲线发现AMI中的外周血CD31<sup>+</sup>EMPs的最佳临界值为29.7%,灵敏度为0.59,特异性为0.83,约登指数为0.426,ROC曲线下的面积为0.733(95%CI 0.598~0.868)( $P<0.05$ )。**结论:**AMI患者冠脉血及外周血EMPs水平均高于稳定性冠心病患者,提示血液中EMPs可能参与急性冠脉血栓事件,同时外周静脉血浆中EMPs水平可作为新的生物标志物之一。

**[关键词]** 急性心肌梗死;内皮细胞源微粒;冠状动脉血;血栓事件

**DOI:**10.13201/j.issn.1001-1439.2021.07.009

**[中图分类号]** R542.2 **[文献标志码]** A

## Analyzing the endothelial microparticles of coronary artery blood and venous blood

ADILIJANG Rouzi<sup>1</sup> YUAN Yujuan<sup>2</sup> MUYESAI Nijiati<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiology, The Eighth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, 830000, China; <sup>2</sup>Xinjiang Medical University; <sup>3</sup>Xinjiang Emergency Center, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region)

Corresponding author: MUYESAI Nijiati, E-mail: muyassar11@aliyun.com

**Abstract Objective:** To analyze endothelial microparticles(EMPs) levels in coronary and venous blood of patients with acute myocardial infarction(AMI). **Methods:** The 27 patients with AMI and 30 patients with stable coronary artery disease(SCAD) were collected. CD31<sup>+</sup>EMPs from venous and coronary blood were analyzed qualitatively and quantitatively by flow cytometry. **Results:** The CD31<sup>+</sup>EMPs level was(11.93±5.13)% in the coronary blood and(36.68±23.53)% in the venous blood in AMI group. The CD31<sup>+</sup>EMPs level was(5.03±3.01)% in the coronary blood and(17.84±12.78)% in the venous blood in SCAD group. The difference between the two groups was significant statistically( $P<0.001$ ). According to the ROC curve, the optimal critical value of EMPs CD31<sup>+</sup> in venous blood in AMI was 29.7%, the sensitivity was 0.59, the specificity was 0.83, the Yoden index was 0.426, and the area under the ROC curve was 0.733(95%CI 0.598-0.868)( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The EMPs levels of coronary and venous blood in patients with AMI are higher than patients with SCAD.

**Key words** AMI, EMPs, Coronary artery, Thrombus

随着全球经济发展,缺血性心脏病的总死亡人数从2007年的730万上升到2017年的893万<sup>[1]</sup>。2019年发布的中国心血管病报告中指出中国心血管病患者并处于持续上升阶段,我国心血管病现患人数为3亿,冠心病1100万,病死率居首位<sup>[2]</sup>。急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)患者因未能早期诊断,无法获得早期治疗而引发心肌梗死后并发症<sup>[3]</sup>。

随着AMI后分子生物学机制和免疫炎症机制

的深入研究,除了血小板等血液成分,发现循环血中细胞外囊泡在细胞迁移和增殖、调节免疫反应、信号传导等过程中具有重要的作用<sup>[4]</sup>。微粒(microparticles, MPs)作为细胞外囊泡家族的一种,由细胞内吞作用形成的管腔内磷脂囊泡,其直径在0.1~1μm,数量完全取决于细胞的激活或凋亡<sup>[5-6]</sup>。循环中MPs作为细胞与细胞之间的通讯递质,其通过与靶细胞表面蛋白特异识别并结合,激活靶细胞信号转导通路,或者通过进入靶细胞内释放其所携带的蛋白质、mRNA和代谢物来调控靶细胞的功能状态<sup>[7]</sup>。内皮细胞激活后释放内皮细胞微粒(endothelial microparticles, EMPs),是调节内皮细胞功能、炎症反应、氧化应激、血管生成和血管通透性的重要递质。EMPs能较好地反映动

\*基金项目:国家自然科学基金项目(No.81760068)

<sup>1</sup>新疆医科大学第八附属医院心血管内科(乌鲁木齐, 830000)

<sup>2</sup>新疆医科大学

<sup>3</sup>新疆维吾尔自治区人民医院急救中心

通信作者:穆叶赛·尼加提, E-mail: muyassar11@aliyun.com

脉斑块演变程度,并与冠状动脉高危斑块如多发性不规则斑块、偏心性脂质斑块等相关<sup>[8]</sup>。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

对象来自2018年6月—2020年1月在新疆维吾尔自治区人民医院急救中心和心血管内科住院的患者。最终共有27例AMI患者和30例稳定性冠心病(stable coronary artery disease, SCAD)患者纳入本研究。本研究通过新疆维吾尔自治区人民医院伦理委员会审批,所有纳入的研究对象均在住院时签署本研究知情同意书。

纳入标准:(1)AMI:测量升高的心脏生物标志物(首选肌钙蛋白)至少有1项超过参考上限值第99%百分位值以及至少包含以下1种情况:①心肌缺血症状;②新出现的明显的ST段改变或左束支传导阻滞;③心电图出现病理性Q波;

(2)SCAD:在冠状动脉固定性严重狭窄的基础上,由于心肌负荷的增加引起的短暂缺血缺氧临床综合征。选取冠状动脉造影术中诊断冠心病,同时需要行支架植入术患者纳入本研究(具体参考2018年中华心血管病杂志《稳定性冠心病诊断和治疗指南》)。

排除标准:①严重肝肾功能不全;②肿瘤性疾病;③造血系统疾病;④类风湿疾病、系统性红斑狼疮和干燥综合征;⑤脑梗死和肺栓塞;⑥冠状动脉痉挛。

### 1.2 标本收集

外周血标本:收集患者入院24h内空腹外周静脉血,于2000×g 10 min离心获得上清冷藏于-80℃冰箱,后续用于MPs定性定量检测。同时收集研究对象病历中记载的一般生化学指标。

冠状动脉血标本:研究对象行冠状动脉介入术时经桡动脉入路,术中导管进入冠状动脉,导丝到达病变部位,球囊进入病变斑块处,扩张球囊迅速排气后抽吸10 mL冠状动脉血,球囊从导丝中撤离。标本于2000×g 10 min离心获得上清,冷藏于含有EDTA的容器里储存,后续流式细胞学检测。

### 1.3 流式细胞仪定性定量分析

流式细胞仪上定性、定量分析AMI和SCAD患者冠状动脉血和外周静脉血浆EMPs水平。①提取MPs:室温下溶解上述离心获得的标本,取500 μL样本转移至新的EP管中,2700×g 4℃离心15 min后转移上清,后经2700×g 4℃离心5 min的上清转移至新的EP管中。最后20 000×g 4℃离心20 min,轻轻去除上清,加入100 μL PBS,使用移液器将MPs吹打均匀。

②EMPs的测定:提取的MPs在室温下加入CD31抗体(1:50稀释),4℃避光孵育30 min。加

入200 μL PBS后立刻上BD FACS AccuriC6流式细胞仪进行MPs定性定量检测,分析特异性抗体标记的细胞荧光百分率以进一步定性MPs的细胞来源。

### 1.4 统计学处理

使用SPSS 21.0软件。定量资料进行正态性检验,符合正态分布资料采用t检验,不符合正态分布资料进行秩和检验,定性资料行卡方检验。使用Graphpad 6软件作图。

## 2 结果

### 2.1 两组一般情况

两组低密度脂蛋白(LDL)有统计学差异。两组间其他基本资料和临床生化指标具有可比性(见表1)。

表1 两组一般情况比较  
Table 1 The clinical characteristic

项目	AMI(27例)	SCAD(30例)	Z/t/χ <sup>2</sup>	P
年龄/岁	58±12	62±8	1.402	0.166
男/女/例	21/6	20/10	0.869	0.351
BMI/(kg·m <sup>-2</sup> )	27.70 [24.54,31.14]	25.85 [23.88,28.17]	-0.703	0.482
高血压/%	52.0	53.0	0.013	0.911
2型糖尿病/%	37.0	23.0	1.275	0.259
吸烟/%	67.0	47.0	2.369	0.129
Cr/(μmol·L <sup>-1</sup> )	69.9 [60.00,78.05]	58.90 [54.03,73.58]	-1.730	0.084
TG/(mmol·L <sup>-1</sup> )	1.69±0.98	1.45±0.99	-0.925	0.359
TC/(mmol·L <sup>-1</sup> )	4.48±1.47	4.31±1.26	-0.458	0.649
HDL/(mmol·L <sup>-1</sup> )	0.97±0.31	0.88±0.04	-1.409	0.167
LDL/(mmol·L <sup>-1</sup> )	3.18±1.14	2.10±0.83	-4.071	0.000
LVEF/%	50[50,56]	55[49,59]	-1.21	0.226

Cr:肌酐;TG:甘油三脂;TC:胆固醇;HDL:高密度脂蛋白;LVEF:左室射血分数。

### 2.2 两组CD31<sup>+</sup>EMPs水平分析

AMI组患者冠状动脉血CD31<sup>+</sup>EMPs水平(11.93±5.13)%,外周静脉血(36.68±23.53)%,稳定性冠心病患者冠状动脉血CD31<sup>+</sup>EMPs水平(5.03±3.01)%,外周静脉血(17.84±12.78)%,两组差异具有统计学意义(P<0.001)。见表2和图1。

### 2.3 ROC曲线

为了进一步研究外周静脉血CD31<sup>+</sup>EMPs作为AMI潜在生物标志物的有效性,我们对AMI与SCAD患者进行ROC曲线分析。AMI中的外周血CD31<sup>+</sup>EMPs的最佳临界值为29.7%,灵敏度为0.59,特异性为0.83,约登指数为0.426。ROC曲线下的面积为0.733(95%CI 0.598~0.868)(P<0.05)。见图2。

表 2 两组冠状动脉血、外周血 CD31<sup>+</sup> EMPs 水平分析Table 2 The levels of CD31<sup>+</sup> EMPs in coronary or venous blood

	AMI 组	SCAD 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
冠脉血 CD31 <sup>+</sup> EMPs	11.93±5.13	5.03±3.01	-6.113	0.000
外周静脉血 CD31 <sup>+</sup> EMPs	36.68±23.53	17.84±12.78	-3.698	0.001
<i>t</i> 值	-5.346	-5.339	—	—
<i>P</i> 值	0.000	0.000	—	—

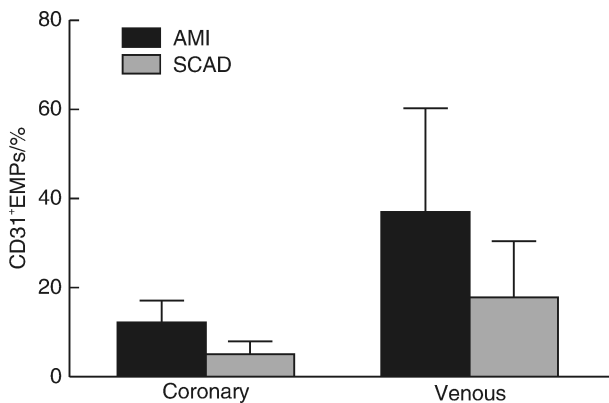
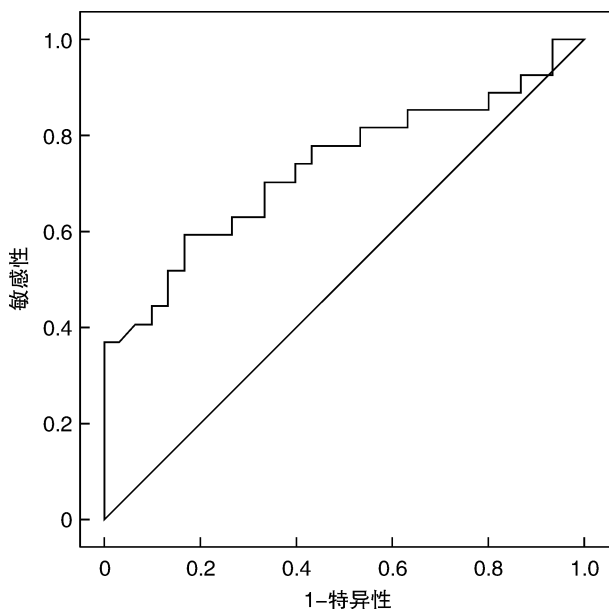
图 1 冠状动脉血和外周静脉血 CD31<sup>+</sup> EMPs 水平Figure 1 CD31<sup>+</sup> EMPs levels in coronary blood and peripheral venous blood

图 2 ROC 曲线

Figure 2 ROC curve

### 3 讨论

全国范围内胸痛中心的建设,显著提高了AMI救治成功率,并对预后产生积极影响<sup>[9]</sup>,但目前AMI的急性血栓形成的分子生物学机制仍不清楚。MPs向靶细胞传递细胞生物学信息并导致内

皮细胞功能障碍,包括炎症氧化应激、血管生成和血管通透性增加,这些有可能参与心血管疾病及相关并发症的发生<sup>[10-13]</sup>。目前很多研究提出MPs水平在冠心病及AMI患者中明显升高<sup>[14-16]</sup>。有研究指出,MPs水平急剧上升,与心肌损伤程度呈正相关<sup>[17]</sup>。

EMPs的释放是由多种刺激引发的,包括氧化应激、内源性分子和细胞凋亡等,随后通过各种途径可选择性促进血管生成,导致血管功能改变,最终导致动脉粥样硬化及其血栓的形成。有研究提示在急性冠状动脉综合征患者中,外周血EMPs浓度升高,可能参与AMI患者急性血栓的形成<sup>[18]</sup>,这与前期研究结果相一致<sup>[19-21]</sup>。

本研究中两组一般资料和生化指标无统计学差异,但LDL水平存在差异,AMI组高于SCAD组,可能与SCAD患者长期口服他汀类药物相关。本研究由于病历系统记载缺失,未能完成两组院外口服药物种类的分析。通过冠状动脉介入术中获取的冠状动脉血标本,测定冠状动脉局部血液成分更能体现AMI发病局部的分子生物学变化。本研究结果提示AMI组冠状动脉血和外周静脉血CD31<sup>+</sup> EMPs水平均高于SCAD组,这说明AMI组外周静脉血升高的CD31<sup>+</sup> EMPs水平与冠状动脉局部血升高的情况一致,说明外周静脉血升高的CD31<sup>+</sup> EMPs水平可一定程度上代表冠状动脉局部微粒水平的变化。外周静脉血水平高于冠状动脉血,这可能与患者采集样本时间存在差异有关,后续需进行同时时间点获取样本,进一步明确两组样本差异性的原因。本研究通过ROC曲线确定外周静脉血CD31<sup>+</sup> EMPs作为生物标志物有效性能,结果提示外周静脉血CD31<sup>+</sup> EMPs诊断AMI有一定准确性,并且确定诊断临界值29.7%。本研究需进一步扩大样本量,同时完善标本采取时间,需动态监测外周静脉血CD31<sup>+</sup> EMPs水平,比如患者胸痛1h、胸痛2h、术后等时间段分别采取样本进行分析。

### 参考文献

- [1] Global Burden Disease Study 2017[J]. Lancet, 2018, 392:1736-1788.
- [2] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3):209-220.
- [3] Aljakna A, Fracasso T, Sabatasso S. Molecular tissue changes in early myocardial ischemia: from pathophysiology to the identification of new diagnostic markers[J]. Int J Legal Med, 2018, 132(2):425-438.
- [4] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(7):6478-6485.
- [5] Tian J, Casella G, Zhang Y, et al. Potential roles of extracellular vesicles in the pathophysiology, diagnosis,

- and treatment of autoimmune diseases[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(4):620-632.
- [6] Xu R, Greening DW, Zhu HJ, et al. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4):1152-1162.
- [7] Nomura S, Shimizu M. Clinical significance of pro-coagulant microparticles[J]. *J Intensive Care*, 2015, 3(1):2.
- [8] Abbas M, Jesel L, Auger C, et al. Endothelial microparticles from acute coronary syndrome patients induce premature coronary artery endothelial cells ageing and thrombogenicity: role of the Ang II/AT1 Receptor/NADPH oxidase-mediated activation of MAPKs and PI3-kinase pathways[J]. *Circulation*, 2016, 135(3):280-295.
- [9] 林捷, 颜彦, 施鸿毓. 胸痛中心建设对急性心梗救治效率及预后影响的研究[J]. *临床急诊杂志*, 2019, 20(10):767-770.
- [10] Ma S, Tian XY, Zhang Y, et al. E-selectin-targeting delivery of microRNAs by microparticles ameliorates endothelial inflammation and atherosclerosis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:22910.
- [11] Vítková V, Živný J, Janota J. Endothelial cell-derived microvesicles: potential mediators and biomarkers of pathologic processes[J]. *Biomark Med*, 2018, 12(2):161-175.
- [12] Tual-Chalot S, Gagnadoux F, Trzepizur W, et al. Circulating microparticles from obstructive sleep apnea syndrome patients induce endothelin-mediated angiogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(2):202-207.
- [13] Edrissi H, Schock SC, Hakim AM, et al. Microparticles generated during chronic cerebral ischemia increase the permeability of microvascular endothelial barriers in vitro[J]. *Brain Res*, 2016, 1634:83-93.
- [14] Abbas M, Jesel L, Auger C, et al. Endothelial microparticles from acute coronary syndrome patients induce premature coronary artery endothelial cell aging and thrombogenicity: Role of the Ang II/AT1 Receptor/NADPH Oxidase-Mediated Activation of MAPKs and PI3-Kinase Pathways[J]. *Circulation*, 2017, 135(3):280-296.
- [15] van Es N, Bleker S, Sturk A, et al. Clinical significance of tissue factor-exposing microparticles in arterial and venous thrombosis[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2015, 41(7):718-727.
- [16] Chiva-Blanch G, Laake K, Myhre P, et al. Platelet-, monocyte-derived and tissue factor-carrying circulating microparticles are related to acute myocardial infarction severity [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2):e0172558.
- [17] Sionis A, Suades R, Sans-Roselló J, et al. Circulating microparticles are associated with clinical severity of persistent ST-segment elevation myocardial infarction complicated with cardiogenic shock[J]. *Int J Cardiol*, 2018, 258(1):249-256.
- [18] George M, Ganesh MR, Sridhar A, et al. Evaluation of endothelial and platelet derived microparticles in patients with acute coronary syndrome[J]. *J Clin Diagn Res*, 2015, 9(12):OC09-13.
- [19] 袁玉娟, 米日巴尼·买吐松, 祖力批亚·艾力, 等. 急性心肌梗死外周血内皮细胞源微粒研究[J]. *临床心血管病杂志*, 2019, 35(10):883-887.
- [20] Nijati M, Saidaming A, Guoqing L. In vitro study of the thrombogenic activity of platelet-derived microparticles from patients with acute coronary syndrome [J]. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2017, 2017(47):156-161.
- [21] Yuan Y, Maitusong M, Muyeisai N. Association of endothelial and red blood cell microparticles with acute myocardial infarction in Chinese: a retrospective study [J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(4):1564-1570.

(收稿日期:2020-12-22)