

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.32.010

缺血性心脏病患者血清对血管内皮细胞增殖的影响*

李琳¹ 周倩倩² 顾焕¹ 李春岩¹ 黄力^{1△}

(1 中日友好医院中西医结合心内科 北京 100029; 2 山东省东营市第二人民医院 山东 东营 257335)

摘要 目的:探讨不同阶段缺血性心脏病患者血清对人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)增殖的影响。**方法:**采集正常健康人群组(A组)、缺血性心脏病高危人群组(B组)、缺血性心脏病急性期患者组(C组)、缺血性心脏病稳定期患者(D组)的血清,分别作用于人脐静脉血管内皮细胞不同时间,通过MTT比色法,检测细胞的生长抑制率,观察其对HUVEC增殖的影响。**结果:**四组血清处理HUVEC 24、48、72、96小时后,B组、C组和D组的细胞生长抑制率均显著低于A组($P<0.05$),且C组和D组24小时的生长抑制率显著低于B组($P<0.05$),D组48、96小时显著低于B组($P<0.05$),D组96小时显著低于C组($P<0.05$)。随着观察时间的延长,A、B、C组患者血清的促增殖作用逐渐增强,48 h、72 h和96 h的生长抑制率均显著低于同组24 h ($P<0.05$);A组患者血清培养至96 h,生长抑制率与同组48 h比较显著降低($P<0.05$)。**结论:**从高危患者发展到缺血性心脏病,以及心血管疾病在度过急性期后,随着病程和生存期的延长,其血清对细胞的促增殖作用逐渐增强。

关键词:缺血性心脏病;人脐静脉血管内皮细胞;血清;增殖

中图分类号:R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)32-6242-04

The Effect of Serum of Patients with Coronary Heart Disease at Different stages on the Proliferation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

LI Lin¹, ZHOU Qian-qian², GU Huan¹, LI Chun-yan¹, HUANG Li^{1△}

(1 China-Japan Friendship Hospital, Beijing, 100029, China;

2 The Second People's Hospital of Dongying, Dongying, Shandong, 257335, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of different Periods serum on the proliferation of HUVEC. **Methods:** Acquisition in normal healthy people group (group A), coronary heart disease, high-risk population groups (group B), a group of patients with acute coronary heart disease (group C), coronary heart disease patients with plateau group (group D) of serum, respectively, to act on human umbilical vein endothelial cells, cultivate to 24 h, 48 h, 72 hand 96 h to test absorbance value (OD value). MTT assay was used to determine the cell growth inhibitory rate in vitro. **Results:** The growth inhibition ratios of group B, C, D were significantly lower than that of group A after being treated by different kinds of serum for 24, 48, 72 and 96 h ($P<0.05$), the growth inhibition ratios of group C and D at 24 h were both significantly lower than that of group B at the same time points ($P<0.05$), the growth inhibition ratios of group D at 48, 96 h both significantly lower than that of group B at the same time points ($P<0.05$). With the extension of observation time, the proliferation promotion effect of serum from group A, B, C enhanced gradually, the growth inhibition ratios at 48, 72, and 96 h were significantly lower than that at 24 h of the same group ($P<0.05$), the growth inhibition ratios at 96 h of group A was significantly lower than that at 48h of the same group($P<0.05$). **Conclusion:** From the high-risk patients to ischemic heart disease, and cardiovascular disease after acute period, with the extension of progression and survival, the proliferation promotion effect of serum gradually enhanced.

Key words: Ischemic heart disease; HUVEC; Serum; Proliferation

Chinese Library Classification: R541.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)32-6242-04

前言

心血管疾病是当今世界上严重威胁人类健康的疾病之一,其发病率和病死率已超过肿瘤居世界第一位,每年用于心血管病的医疗费用达1100亿元人民币,为社会带来巨大的经济负担^[1]。然而,临床上对该类疾病的预警及预后判断仍缺乏足够的科学证据。目前,临床对心血管疾病的诊断治疗现状基本上是

疾病已经发生后的补救性措施,如介入治疗或冠脉搭桥等。若能通过血清学检测,找到能够预测缺血性心脏病发生发展的相关因子,将具有重要的意义。本研究选择了正常健康人群、缺血性心脏病高危人群、缺血性心脏病急性期患者和缺血性心脏病稳定期患者血清,初步探讨了其对体外培养的血管内皮细胞增殖的影响,以期对缺血性心脏病的预测和治疗提供更多的实验基础。

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(20775094)

作者简介:李琳(1979-),女,博士,主治医师,主要研究方向:中西医结合心血管病

△通讯作者:黄力,电话:010-84205041, E-mail: lihstrong@163.com

(收稿日期:2014-04-06 接受日期:2014-04-30)

1 材料和方法

1.1 材料

HUVEC 细胞购于上海生物技术公司,为胎儿脐带血管内皮细胞株。MTT、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、DEME 培养基干粉为美国 GIBCO 公司生产。

1.2 分组

缺血性心脏病中高危人群、急性期和稳定期患者均为 2011 年 1 月-2013 年 12 月中日友好医院中西医结合心内科门诊及住院患者,其中缺血性心脏病中、高危人群组 10 例,男 5 例,女 5 例,年龄(58.0±9.8)岁;缺血性心脏病急性期患者组 12 例,男 5 例,女 7 例,年龄(63.3±10.1)岁;缺血性心脏病稳定期患者组 10 例,男 6 例,女 4 例,年龄(69.9±7.6)岁。正常健康者 10 名,来自体检正常的健康志愿者,男 5 例,女 5 例,年龄(32.1±4.2)岁。

1.3 诊断标准及纳入标准

诊断标准参照 2002 年美国心脏病学会学会(american college of cardiology, ACC)和美国心脏协会(american heart association, AHA)联合发表的《SIHD 诊断和治疗指南》。具体分组如下:

(1)正常健康人群组(A 组):无心血管病的危险因素,无糖尿病、高血压、高脂血症、肾脏疾病及外周血管病变。

(2)缺血性心脏病中、高危人群组(B 组):中危人群具有 1~2 个危险因素,收缩压和舒张压水平<2 级高血压;高危人群具有≥3 个危险因素或靶器官损害或糖尿病或无其他危险因素仅 3 级高血压。

(3)缺血性心脏病急性期患者组(C 组):急性冠脉综合征(ACS)患者,包括不稳定型心绞痛(UA)、急性心肌梗死(AMI)。

(4)缺血性心脏病稳定期患者(D 组):以往发生心肌缺血而目前处于稳定期的患者,包括经冠脉造影证实的冠状动脉粥样硬化性心脏病或陈旧性心肌梗塞,或以前曾行 PCI 或冠脉搭桥术后患者。

1.4 排除标准

(1)不符合各组纳入标准者。

(2)不能合作者;肝功异常;严重慢性胃肠道疾病患者;心肌炎或心包炎;休克;严重失代偿的心力衰竭;血液动力学不稳定者;有明显血液系统疾病者;有精神疾患药物或其他药物滥用者等。

1.5 样本的采集和处理

血清样本采自中日友好医院中西医结合心内科门诊及病房住院患者。清晨空腹采集静脉血 5 毫升,4℃下 3000 rpm 离

心 10 分钟分离血清。

1.6 细胞培养和处理方法

(1)首先将冻存的脐静脉血管内皮细胞复苏,用 10%胎牛血清(FBS)培养基(10%FBS+100 u 抗生素+DMEM)于 37℃、5%CO₂ 浓度的温箱中培养;

(2)待细胞贴壁生长融合 80%以上,按 3000 个细胞/孔接种于 96 孔板中,接种 24 小时之后,将原培养基冲洗,给予换用 0.5%FBS 培养基再培养 24 h;

(3)将来自正常健康人组及缺血性心脏病中高危人群组、急性期组、陈旧期组的血清分别按比例与 DMEM 培养液混合,得到 5%正常人血清 DMEM 培养液(A 组),5%中高危人群组、急性期组及陈旧期组血清的 DMEM 培养液(B、C、D 组),对照组为 5%胎牛血清 DMEM 培养液,再培养 24 h 后将原培养基洗掉,分别将各组血清加入 96 孔板中,每组同时设 6 个复孔;

(4)分别在培养至 24、48、72、96 h 时,每孔加入 MTT(5 g/L)20 μL 继续温箱培养 4 h,然后丢弃掉培养基和 MTT,每孔加入 DMSO(二甲基亚砷)150 μL,振荡 10 分钟,使紫色结晶溶解,置于酶联免疫检测仪上检测波长 490 nm 处的吸光度值(OD 值)。计算细胞生长抑制率,细胞生长抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。每组实验至少重复 3 次。

1.7 统计学分析

运用 SPSS16.0 软件进行数据统计分析,实验获得的数据计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)分析,两组间的比较采用 SNK-q 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

四组血清处理 HUVEC 24 小时后,与 A 组比较,B 组、C 组和 D 组的细胞生长抑制率均显著降低(P<0.05),且 C 组和 D 组的生长抑制率显著低于 B 组(P<0.05)。在处理 48 小时、96 小时后,与 A 组比较,B 组、C 组和 D 组的细胞生长抑制率均显著降低(P<0.05),且 D 组显著低于 B 组(P<0.05)。在处理 72 小时后,B 组、C 组和 D 组的细胞生长抑制率均显著低于 A 组(P<0.05),但三组之间比较差异无统计学意义(P>0.05)。在处理 96 小时后,D 组的细胞生长抑制率显著低于 C 组(P<0.05)。

随着观察时间的延长,A、B、C 组患者血清的促增殖作用逐渐增强,48 h、72 h 和 96 h 的生长抑制率均显著低于同组 24 h(P<0.05);A 组患者血清培养至 96 h,生长抑制率与同组 48 h 比较显著降低(P<0.05)。

表 1 各组人血清处理不同时间对 HUVEC 细胞增殖的影响

Table 1 The effects of human serum from different groups on the HUVEC proliferation for different incubation time

Inhibition ratio ($\bar{x} \pm s$)%	Group			
	A	B	C	D
24h	52.96±5.65	39.95±2.58*	26.94±7.72**	18.27±8.20**
48h	41.38±4.44 [▽]	17.96±3.12* [▽]	13.75±6.33* [▽]	6.21±7.42**
72h	37.98±4.56 ^{▽▽}	16.71±3.79* [▽]	7.75±3.96* [▽]	7.64±7.11*
96h	29.52±4.26 ^{▽▲}	16.27±4.29* [▽]	12.86±5.07* [▽]	0.93±12.46* [△]

注:*P<0.05 与 A 组正常人血清比较;[▽]P<0.05 与 B 组中高危人群组血清比较;[△]P<0.05 与 C 组急性期人群组血清比较;[▽]P<0.05 与同组 24 h 比较;[▲]P<0.05 与同组 48 h 比较。

Note: *P<0.05 vs. group A, **P<0.05 vs. group B, [△]P<0.05 vs. group C, [▽]P<0.05 vs. 24h in the same group, [▲]P<0.05 vs. 48h in the same group.

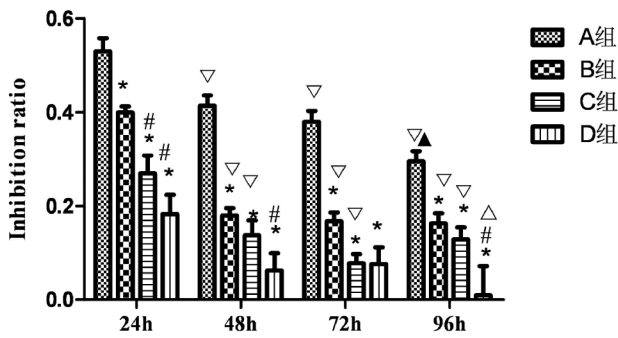


图1 各组人血清处理不同时间对 HUVEC 细胞增殖的影响

Fig. 1 The effects of human serum from different groups on the HUVEC proliferation for different incubation time

注: * $P<0.05$ 与 A 组正常人血清比较; # $P<0.05$ 与 B 组中高危人群组血清比较; ∇ $P<0.05$ 与 C 组急性期人群组血清比较; △ $P<0.05$ 与同组 24h 比较; * $P<0.05$ 与同组 48h 比较。

Note: * $P<0.05$ vs. group A, # $P<0.05$ vs. group B, ∇ $P<0.05$ vs. group C, △ $P<0.05$ vs. 24h in the same group, * $P<0.05$ vs. 48h in the same group.

3 讨论

有研究表明冠状动脉病变程度是侧枝循环的独立影响因素,也是侧枝循环形成程度的相关因素^[2],侧枝微血管的再生对减少梗死面积、恢复组织血供具有重要的意义。因此,促进心肌缺血区的侧支循环形成和血管新生在冠心病的治疗中显得非常重要,治疗性血管新生成为治疗冠心病的一个新靶点^[3]。本研究亦发现了随着缺血性心脏病的病程进展,其血清对血管内皮细胞的促增殖作用增强。

正常情况下,成年人的血管内皮细胞绝大部分都处于静止状态,只有在受到压力或其他病理性刺激如急性冠脉综合征时,血清中相关的血管调节因子改变,血管内皮细胞开始分裂增殖,参与新生血管的生成^[4,5]。有研究表明^[6,7]冠心病患者心肌缺血越严重,血清血管内皮生长因子与内抑素水平越高,而这两种因子在冠心病发展过程中均有重要意义。在诸多的参与因子中,促血管生长或凋亡的细胞因子无疑是重要的基因,缺血性心脏病中调节新生血管成熟的生长因子包括有血管内皮生长因子(VEGFs)^[8,9]、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)^[10,11]及其受体、血小板源性生长因子-BB(PDGF-BB)^[12]及其受体、转化生长因子 β (TGF- β)^[13]家族等。此外,还有低氧诱导因子(HIF)^[14]、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)^[15]、内皮型一氧化氮合酶^[16]以及一些炎症因子如单核细胞趋化蛋白-1、肿瘤坏死因子- α 、白介素-1 β 等也能够促进血管新生^[17]。

细胞移植基因治疗以及药物治疗等都是常用的促进治疗性血管新生的方法,如以血管内皮生长因子(VEGFs)进行治疗性血管新生是一种治疗缺血性心脏病很有前途的方法^[18]。诸多研究表明中药可以通过对血管内皮功能的多途径和多层次的调节,对血管生成的诱导因子和抑制因子的双向调控参与血管新生^[19,20]。但目前的研究大多都集中在观察缺血性心脏病疾病组与正常组之间血管新生的差异,缺少对疾病发生发展过程的动态性观察。本研究用临床不同阶段的缺血性心脏病患者的血清干预脐静脉血管内皮细胞,发现缺血性心脏病中高危人群、

急性期及陈旧期人群血清促进 HUVEC 增殖的作用呈逐渐增强的趋势,以缺血性心脏病陈旧期患者血清的促增殖作用最强,表明心血管疾病在度过危险期后,随着病程的延长,其血清对细胞的促增殖作用逐渐增强。在这部分患者血清中可能含有与促进血管内皮细胞生长相关的成分,从而促进侧枝微血管的生成、维持组织血供而延长生命。鉴于以上结果,我们认为早期检测缺血性心脏病患者的血清,捕获相关调节因子,可能可作为疾病预警或预后判断的依据,这为我们进一步寻找与血管生长与再生相关的细胞调节因子奠定了一定的基础。

参考文献 (References)

- [1] 王文, 朱曼璐, 王拥军, 等. 心血管病已成为我国重要的公共卫生问题——《中国心血管病报告 2011》概要[J]. 中国循环杂志, 2012,27(06):409-411
Wang Wen, Zhu Man-lu, Wang Yong-jun, et al. Cardiovascular disease has become an important public health problem in China—China reports of cardiovascular disease in 2011> [J]. Chinese Circulation Journal, 2012,27(06):409-411
- [2] 刘茜, 陈宋明, 李玉光. 冠心病危险因素与冠状动脉侧枝循环形成的相关性研究[J]. 汕头大学医学院学报, 2011,24(01):35-37
Liu Qian, Chen Song-ming, Li Yu-guang. Relationship between coronary collateral circulation and risk factors for coronary heart disease [J]. Journal of Shantou University Medical College, 2011,24(01):35-37
- [3] 张少言, 林赞霄, 陈浩, 等. 血管新生与冠心病治疗性血管生成[J]. 心血管病学进展, 2014,35(01):55-59
Zhang Shao-yan, Lin Yun-xiao, Chen Hao, et al. Angiogenesis and therapeutic angiogenesis of coronary heart disease[J]. Adv Cardiovasc Dis, 2014,35(01):55-59
- [4] Gui C, Li SK, Nong QL, et al. Changes of serum angiogenic factors concentrations in patients with diabetes and unstable angina pectoris [J]. Cardiovasc Diabetol, 2013,12:34
- [5] Lorier G, Tourino C, Kalil RA. Coronary angiogenesis as an endogenous response to myocardial ischemia in adults [J]. Arquivos brasileiros de cardiologia, 2011,97(6):e140-148
- [6] 蒋恒波, 贺正希, 杨红霞, 等. 冠心病患者血清血管内皮生长因子和内抑素水平变化的临床意义 [J]. 中南医学科学杂志, 2011,39(05):531-534
Jiang Heng-bo, He Zheng-xi, Yang Hong-xia, et al. Clinical significance of the serum vascular endothelial growth factor and endostatin in the patients with coronary heart disease [J]. Journal of Medical Science in Central South China, 2011,39(05):531-534
- [7] 孔菁, 毛威. 血管内皮生长因子、内皮抑素与冠心病的关系[J]. 实用心脑血管病杂志, 2010,18(04):524-526
Kong Jing, Mao Wei. Vascular endothelial growth factor endostatin and coronary heart disease[J]. PJCCPVD, 2010,18(04):524-526
- [8] Cui QT, Li Y, Duan CH, et al. Further evidence for the contribution of the vascular endothelial growth factor gene in coronary artery disease susceptibility[J]. Gene, 2013,521(2):217-221
- [9] Kendrew J, Eberlein C, Hedberg B, et al. An antibody targeted to VEGFR-2 Ig domains 4-7 inhibits VEGFR-2 activation and VEGFR-2-dependent angiogenesis without affecting ligand binding [J]. Mol Cancer Ther, 2011,10(5):770-783

- [10] Zimering MB, Anderson RJ, Ge L, et al. Increased plasma basic fibroblast growth factor is associated with coronary heart disease in adult type 2 diabetes mellitus[J]. *Metabolism*, 2011,60(2):284-291
- [11] Frontini MJ, Nong Z, Gros R, et al. Fibroblast growth factor 9 delivery during angiogenesis produces durable, vasoresponsive microvessels wrapped by smooth muscle cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2011,29(5):421-427
- [12] Zhu S, Xue R, Zhao P, et al. Targeted disruption of the prostaglandin E2 E-prostanoid 2 receptor exacerbates vascular neointimal formation in mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011,31(8):1739-1747
- [13] Morris DR, Moxon JV, Biros E, et al. Meta-analysis of the association between transforming growth factor-beta polymorphisms and complications of coronary heart disease[J]. *PLoS One*, 2012,7(5): e37878
- [14] Skuli N, Majmundar AJ, Krock BL, et al. Endothelial HIF-2alpha regulates murine pathological angiogenesis and revascularization processes[J]. *J Clin Invest*, 2012,122(4):1427-1443
- [15] Hynes B, Kumar AH, O'Sullivan J, et al. Potent endothelial progenitor cell-conditioned media-related anti-apoptotic, cardioprotective, and pro-angiogenic effects post-myocardial infarction are mediated by insulin-like growth factor-1[J]. *Eur Heart J*, 2013,34(10): 782-789
- [16] Bir SC, Xiong Y, Kevil CG, et al. Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases[J]. *Cardiovasc Res*, 2012,95(1):7-18
- [17] Roy A, Kolattukudy PE. Monocyte chemotactic protein-induced protein (MCP-1) promotes inflammatory angiogenesis via sequential induction of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and autophagy[J]. *Cell Signal*, 2012,24(11):2123-2131
- [18] Yla-Herttuala S. Cardiovascular gene therapy with vascular endothelial growth factors[J]. *Gene*, 2013,525(2):217-219
- [19] 王永刚, 石益, 于远望, 等. 中药复方对冠心病治疗性血管新生的研究进展[J]. *陕西中医学院学报*, 2012,35(06):109-111
- Wang Yong-gang, Shi Yi, Yu Yuan-wang, et al. Traditional Chinese medicine compound for therapeutic angiogenesis research progress of coronary heart disease [J]. *Journal of Shanxi College of Traditional Chinese Medicine*, 2012,35(06):109-111
- [20] 段练, 熊兴江, 王阶. 冠心病的治疗性血管新生与活血化瘀 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013,33(11):1561-1566
- Duan Lian, Xiong Xing-jiang, Wang Jie. Activating blood circulation to remove stasis and therapeutic angiogenesis of coronary heart disease[J]. *CJITWM*, 2013,33(11):1561-1566

(上接第 6236 页)

- [7] Sharma J, Mukherjee D, Rao SN, et al. Neuronatin-mediated aberrant calcium signaling and endoplasmic reticulum stress underlie neuropathology in Lafora disease [J]. *Biol Chem*, 2013, 288 (13): 9482-9490
- [8] Chen KH, Yang CH, Cheng JT, et al. Altered Neuronatin expression in the rat dorsal root ganglion after sciatic nerve transection [J]. *Biomed Sci*, 2010, 28: 17-41
- [9] Nino Mzhavia, Shuiqing Yu, Shota Ikeda, et al. Neuronatin: A New Inflammation Gene Expressed on the Aortic Endothelium of Diabetic Mice [J]. *Diabetes*, 2008, 57: 2774-2783
- [10] Joe MK, Lee HJ, Suh YH, et al. A Crucial roles of Neuronatin in insulin secretion and high glucose-induced apoptosis in pancreatic β -cells [J]. *Cellular Signalling*, 2008, 20(5): 907-915
- [11] Khoi Chu, Ming-Jer Tsa. Neuronatin, a Down-stream Target of BETA2/NeuroD1 in the Pancreas, Is Involved in Glucose-Mediated Insulin Secretion [J]. *Diabetes*, 2005, 54: 1064-1073
- [12] Scott WR, Gelegen C, Chandarana K, et al. Differential pre-mRNA splicing regulates Nnat isoforms in the hypothalamus after gastric bypass surgery in mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59407-e59407
- [13] Gburcik V, Cleasby ME, Timmons JA. Loss of neuronatin promotes "browning" of primary mouse adipocytes while reducing Glut1-mediated glucose disposal [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 304(8): E885-894
- [14] Vrang N, Meyre D, Froguel P, et al. The imprinted gene Neuronatin is regulated by metabolic status and associated with obesity [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2010, 18(7): 1289-1296
- [15] Dugu L, Nakahara T, Wu Z, et al. Neuronatin is related to keratinocyte differentiation by up-regulating involucrin [J]. *Dermatol Sci*, 2014, 73(3):225-231
- [16] Hubertus J, Zitzmann F, Trippel F, et al. Selective methylation of CpGs at regulatory binding sites controls NNAT expression in Wilms tumors [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67605-e67605
- [17] Xu DS, Yang C, Proescholdt M, et al. Neuronatin in a subset of glioblastoma multiforme tumor progenitor cells is associated with increased cell proliferation and shorter patient survival [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37811-e37811
- [18] 何世坤, 赵明威, 陈有信. 视网膜色素上皮基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 178-266
- He Shi-kun, Zhao Ming-wei, Chen You-xin. Basic and clinical in retinal pigment epithelium [M]. Bei Jing: Science Press, 2005: 178-266