

# 原发性高血压患者内皮祖细胞功能变化及与FMD的相关性

姬炳焕\*, 王祖棣, 黄芝团, 刘文辉#

罗定市中医院, 广东 云浮

收稿日期: 2021年11月27日; 录用日期: 2021年12月17日; 发布日期: 2021年12月30日

## 摘要

目的: 探究原发性高血压患者内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)功能的变化及与内皮依赖血管舒张功能(FMD)的相关性。方法: 实验组为15例原发性高血压3级患者和对照组为同期健康体检者20人。取研究对象的外周血20 ml, CCK8法和Transwell小室检测EPCs功能(增殖、迁移)。结果: 与对照组比较, 高血压患者的EPCs的迁移、增殖功能明显较低( $p < 0.05$ ); 原发性高血压患者FMD明显低于正常对照组( $p < 0.05$ ), 同时我们发现循环内皮祖细胞迁移和增殖分别与FMD强正相关(分别为 $r = 0.56$ ,  $0.41$ ,  $p < 0.05$ )。结论: 原发性高血压EPC的功能下降, 可能与FMD损伤有关。

## 关键词

原发性高血压, 内皮祖细胞, 功能, 内皮功能

# Change of the Functional Activity of Endothelial Progenitor Cells and Their Correlation with FMD in Primary Hypertension Patients

Binghuan Ji\*, Zudi Wang, Zhituan Huang, Wenhui Liu#

Luoding City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yunfu Guangdong

Received: Nov. 27<sup>th</sup>, 2021; accepted: Dec. 17<sup>th</sup>, 2021; published: Dec. 30<sup>th</sup>, 2021

\*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 姬炳焕, 王祖棣, 黄芝团, 刘文辉. 原发性高血压患者内皮祖细胞功能变化及与 FMD 的相关性[J]. 临床医学进展, 2021, 11(12): 6143-6149. DOI: 10.12677/acm.2021.1112912

## Abstract

**Objective:** To investigate change of the function of endothelial progenitor cells (EPCs) and their correlation with flow-mediated dilation (FMD) in patients with primary hypertension. **Methods:** 15 patients with grade 3 primary hypertension as experimental group and 20 healthy persons as control group. The function (proliferation and migration) of EPCs were analyzed by CCK8 and Transwell chambers. **Results:** Compared with the control group, the migration and proliferation function of EPCs in primary hypertension patients were significantly lower ( $p < 0.05$ ). FMD in primary hypertension group was lower than that in healthy group ( $p < 0.05$ ), and we found a strong unilate correlation between the migratory and proliferatory of circulating EPCs and FMD ( $r = 0.56, 0.41, p < 0.05$ , respectively). **Conclusion:** The function of EPCs decreased may be related with FMD injury.

## Keywords

Primary Hypertension, Endothelial Progenitor Cells, Function, Endothelial Activity

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 前言

高血压流行病学调查显示, 截止 2018 年我国成人高血压患病率高达 25.2%, 预测人数为 2.7 亿, 对我国人民的生命健康及经济造成了极大的负担[1]。高血压及心血管病已成为危害人类最主要的疾病, 且研究发现高血压患者随着收缩压升高 20 mmHg 或舒张压升高 10 mmHg, 心血管不良事件发生率将成倍增加[2]。通过血流动力学的改变, 高血压能引起血管内皮功能紊乱, 从而导致人体多种器官功能的损害, 严重影响患者的生命质量[3]。内皮损害与内皮修复之间的平衡失调而导致的内皮功能紊乱是高血压致病的重要病理机制, 故而治疗高血压等心血管疾病的重要策略之一是维持血管内皮功能的稳定。

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)最早在 1997 年由 Asahara [4]分离培养发现, 由骨髓产生释放到外周血, 是血管内皮细胞的前体细胞, 具有维持修复血管内皮损伤的功能, 同时具有阻止正常血管内膜转变成病理性新生内膜的作用[5]。在高血压患者中, 循环 EPCs 的功能均受到不同程度损害, 血管内膜功能紊乱; 提高患者体内 EPCs 的功能具有抵抗高血压进展的作用。

肱动脉内皮依赖血管舒张功能(FMD)如实反映心血管的内皮功能紊乱, 是一种无创、可重复的检测血管功能的新技术[6] [7]。原发性高血压(primary hypertension)是以体循环动脉压升高为主要临床表现的心血管综合症, 通常简称为高血压。高血压常与其他心血管疾病危险因素共存, 是重要心脑血管疾病危险因素, 可损伤重要脏器, 如心、脑、肾结构和功能, 最重导致脏器的功能衰竭。目前尚不清楚原发性高血压内皮祖功能变化及与 FMD 之间关系。因此, 本研究探讨原发性高血压患者内皮祖细胞功能变化及与 FMD 相关性。

## 2. 临床资料

### 2.1. 研究对象

根据《中国高血压防治指南》(2018 版)诊断标准[8], 纳入原发性高血压患者 15 例, 正常对照组 20

例。年龄 36~72 岁, 平均(57.3 ± 11.2)岁。其中男性 9 例, 女性 6 例。排除标准: 年龄 ≥ 80 岁; 合并糖尿病、冠心病、高脂血症等患者、肿瘤、全身免疫性疾病。同时选取年龄、性别匹配的正常人为正常对照 20 例。

## 2.2. 材料

内皮细胞基础培养基 2 购自美国 Clonetics, ac-LDL 购于 Molecular Probes 公司, lectin 购于 Sigma 公司, Tran-swell 迁移小室 24 孔购自美国 Corning 公司, 纤维连接蛋白购自 Hematologic Technologies 公司, MTT 购自 Fluka 公司, 红细胞裂解液购自美国 Stem Cell Technologies 公司, Ficoll-Paque 人淋巴细胞分离液。

## 2.3. 循环 EPC 的分离与培养

如前所述, 抽取静脉外周血 50 ml 于肝素抗凝管中, 用等体积预冷 PBS 稀释混匀, 沿管壁加入含有 Ficoll-Paque 人淋巴细胞分离液的离心管上层, 保持两层界面清晰; 4℃, 2200 rpm 离心 25 分钟, 用毛细吸管吸取第二层云雾状的单核细胞层, 加入 5 ml 红细胞裂解液, 4℃静置裂解 10 分钟, 再加入预冷 PBS 混匀, 4℃, 1500 rpm 离心 10 分钟, 弃上清液, 重复洗涤 2~3 次后提取单个核细胞。

将分离所得单个核细胞重悬于含有 20%胎牛血清、VEGF 50 ng/ml 的 EGM-2 培养基中, 接种至预先包被好人纤维连接蛋白(1 ng/L)的六孔板中, 置于 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度、37℃培养箱中培养, 3 天后换液除去未贴壁细胞, 贴壁细胞继续培养, 以后每 3 天进行换液, 培养至 7 天后的贴壁细胞即为实验所用 EPC。

## 2.4. 循环 EPC 的鉴定

本研究使用 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-acLDL)和 FITC 标记的荆豆凝集素 I (FITC-BS-I)双重染色免疫荧光鉴定 EPC, 如前所述, 原代内皮祖细胞经诱导分化培养至第七天后, 弃去原有培养基, 用 PBS 缓冲液清洗 2 次; 加入 Dil-acLDL 溶液(20 ng/ml), 37℃孵育 2 小时, 用 PBS 冲洗 2 次; 加入 4%多聚甲醛溶液固定细胞 15 分钟, 再次用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后加入 FITC-BS-I lectin 溶液(10 ng/ml), 37℃孵育 1 小时, 吸出溶液后同样用 PBS 缓冲液清洗 2 次; 最后加入 DAPI 溶液(10 μg/ml), 37℃孵育 5 分钟, 经 PBS 缓冲液洗涤 2 次后将贴壁细胞置于荧光倒置显微镜下观察, Dil-acLDL (红色)和 FITC-BS-Lectin (绿色) 双染色阳性细胞即为内皮祖细胞。

## 2.5. EPC 增殖能力测定

原代内皮祖细胞培养 7 d 后, 用 0.25%胰酶消化贴壁细胞, 重悬于 DMEM 培养液中。将相同数量的内皮祖细胞接种到包被有人纤维连接蛋白 96 孔培养板, 每孔加入 10 μL MTT (5 g/L), 培养 4 h 后弃去上清液, 再加入二甲基亚砷(150 μL/孔)充分振荡 10 min 后, 在酶标仪下于波长 450 nm 处测 OD 值。

## 2.6. EPC 迁移能力测定

用 PBS 溶液将诱导分化培养至 7 天后的原代内皮祖细胞清洗 2 次, 加入 1 ml 0.25%胰酶消化, 重悬于用不含胎牛血清的 EBM-2 培养基, 调整细胞密度至  $2 \times 10^5$ /ml; 向 24 孔板中加入 500 μl EBM-2 培养基及 100 ng/ml SDF-1, 置入 Transwell 小室, 取上述细胞悬液 250 μl 置于上室, 放于 5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中。24 小时后取出小室, 小心弃去上层液体, 并轻轻刮去滤膜上面的未迁移细胞, 用 4%多聚甲醛溶液固定 10 分钟, 以 DAPI 染色, 置于荧光显微镜下观察, 选择 3 个随机视野计数迁移入下室的细胞。

## 2.7. 肱动脉血流介导的内皮依赖性舒张功能测定(FMD)

受试者取仰卧位, 左上臂充分暴露, 测量血压和心率。将 7.5 MHz 的超声探头(HPsonos2500 超声心

动图仪)置于肘窝上方 3~7 cm 处, 显示肱动脉长轴二维图像, 取得最大的肱动脉内径和最佳的直线状动脉壁血液界面。在随后的检查过程中, 仪器条件保持不变。脉冲多普勒取样点门距 1.5 mm, 置于血管腔中央, 入射角保持 60°, 探取最大层流频谱图像。记录基础肱动脉二维图像及其多普勒血流频谱, 然后给袖带充气至 250 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 完全阻断血流 5 min 后迅速放气, 记录放气后即刻血流频谱及 30 s 至 1 min 内肱动脉二维图像。血管内皮依赖舒张功能以血流介导的血管舒张功能百分率表示, 即: 肱动脉血流介导的内皮依赖性舒张功能(flow-mediated dilatation, FMD) = (充血后内径 - 基础内径)/基础内径 × 100%。

## 2.8. 统计分析

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本 T 检验; 计数资料以频数或率等指标来表示, 组间差异性运用  $\chi^2$  检验; EPC 功能与 FMD 之间的关系采用单因素相关分析。使用统计软件 SPSS 25.0 进行数据分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. 各组一般资料比较

见表 1: 原发性高血压组与正常对照组的年龄和 BMI 相近, 原发性高血压组收缩压和舒张压均高于健康对照组( $P < 0.05$ ), 心率、谷草转氨酶 AST、谷丙转氨酶 ALT、血尿素氮 BUN、血肌酐 Cr 水平均无统计学差异( $P > 0.05$ )。

**Table 1.** Comparison of general clinical data and biochemical indexes among groups

**表 1.** 各组间一般临床资料及生化指标比较

项目	正常对照组 (n = 20)	原发性高血压组 (n = 15)
年龄(岁)	65.1 ± 8.2	60.9 ± 8.3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.5 ± 3.0	24.0 ± 3.6
收缩压(mmHg)	119.5 ± 10.3	154.1 ± 12.1 <sup>*</sup>
舒张压(mmHg)	74.4 ± 5.8	81.0 ± 7.6 <sup>*</sup>
心率(beats/min)	70.5 ± 10.1	68.6 ± 7.7
AST (mmol/L)	26.9 ± 21.2	27.6 ± 10.2
ALT (mmol/L)	31.9 ± 36.2	30.0 ± 19.1
BUN (mmol/L)	5.0 ± 1.5	5.7 ± 2.5
Cr (mmol/L)	80.0 ± 15.2	74.2 ± 19.6

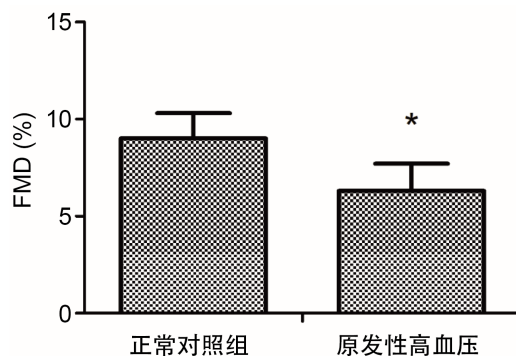
注: 与健康对照组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

### 3.2. 肱动脉血流介导的内皮依赖性舒张功能(FMD)比较

如图 1 所示, 原发性高血压 FMD 明显小于正常对照组( $P < 0.05$ ), 提示原发性高血压患者肱动脉内皮依赖性舒张功能明显减退。

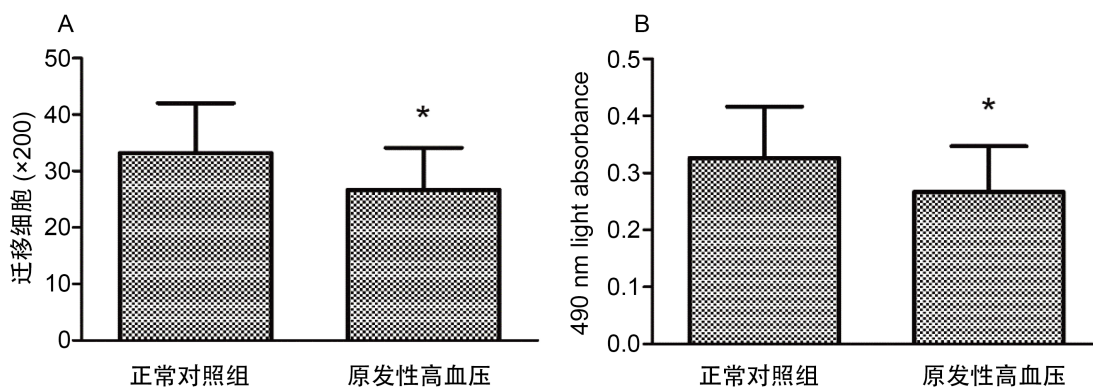
### 3.3. 原发性高血压患者内皮祖细胞功能变化

如图 2 所示, 与健康受试者相比, 原发性高血压患者的循环 EPC 迁移和增殖能力均明显下降(A-B) ( $P < 0.05$ )。



**Figure 1.** The FMD of each group was compared with each other, \* was  $p < 0.05$ , compared with the normal control group

**图 1.** 各组 FMD 相互比较, \*为  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较

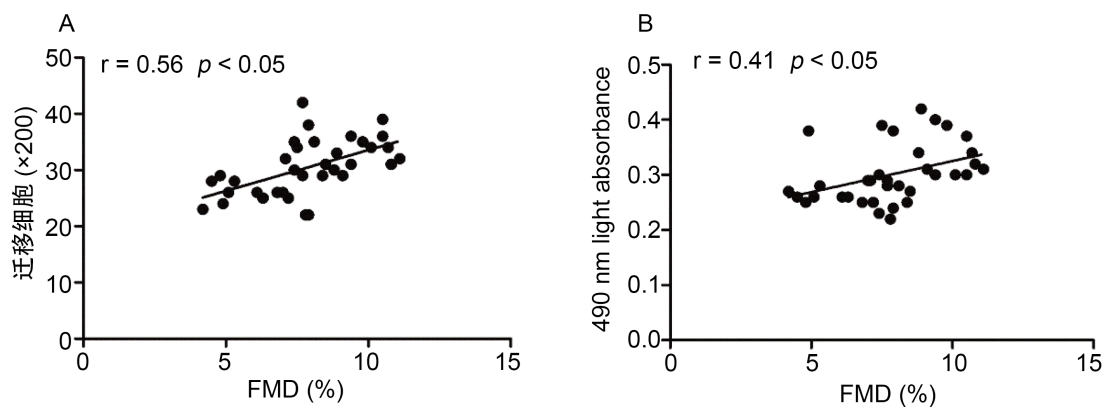


**Figure 2.** The functions of EPCs in each group were compared with each other \* Represents  $P < 0.05$

**图 2.** 各组 EPCs 功能相互比较。\*代表  $P < 0.05$

### 3.4. 循环 EPC 功能与 FMD 的相关性

如图 3 所示, 将两组 FMD 水平与循环 EPC 功能进行直线相关回归分析, 结果发现, 循环 EPC 迁移和增殖能力也与 FMD 水平呈明显正相关( $r = 0.56, 0.41$ , 分别,  $P < 0.05$ ) (A-B)。



**Figure 3.** Correlation between circulating EPC function and FMD in each group

**图 3.** 各组循环 EPC 功能与 FMD 之间相关性

## 4. 讨论

目前高血压已经成为危害人类健康的首要危险因素,其中高血压3级对于人类健康危害更为严重,预防及控制高血压是全球急需解决的卫生问题。随着对高血压研究的深入,发现内皮祖细胞与高血压关系密切,已成为了研究高血压的重要生理病理机制[9]。EPCs在“内皮祖细胞-内皮细胞-高血压-心血管事件”处于始动环节,在高血压患者中,EPCs受到了不同程度的损害,血管内皮的完整性及功能也受到损伤[10]。EPCs具有分化为血管内皮细胞的能力,能加快损伤血管内皮的再内皮化,抑制病理性血管内膜的形成[11]。而血管内膜的损伤可以通过提高EPCs的功能有效修复,同时改善血管内膜的舒张能力,降低心血管事件的发生[12]。

EPCs是预测高血压患者冠心病事件最重要的一个独立因素[13]。这一结论也得到了其他研究者的证实[14][15]。目前大量研究表明血压与EPCs存在负相关的关系,随着血压的升高,EPC功能不断下降,心血管事件发生率逐渐增加[14][16]。因此提高EPCs的功能对于维持血管内皮功能稳定及降低心血管疾病发生率具有至关重要的作用。而本研究结果表明,与正常血压组相比,高血压组的EPCs的功能均下降明显,这与既往国内外研究主流结论一致。

对于高血压患者,目前2014年的JNC8及2017年最新的美国高血压指南推荐使用的药物包含ACEI、ARB及钙离子通道阻滞剂等药物[2][16],大量研究显示ACEI、ARB及钙离子通道阻滞剂等抗高血压药物在控制血压的同时还具有改善EPCs的功能的作用[17]。其中,在Zhang[18]的研究表明:CXCR7的下调引起内皮祖细胞的功能障碍,而乐卡地平等CCB的使用具有上调CXCR7的作用。在Suzuki[19]和Georgescu[20]的实验中,分别使用氯沙坦及厄贝沙坦处理高血压大鼠,发现血管紧张素II受体拮抗剂能明显改善受损的内皮祖细胞功能。而Li[21]通过苯那普利等ACEI治疗高血压患者,发现内皮祖细胞功能得到改善。因此,降压药中的钙通道拮抗剂、血管紧张素II受体拮抗剂、血管紧张素转换酶抑制剂具有改善内皮祖细胞的功能的作用。

维持内皮功能平衡,以提高高血压患者预后,同时也提示我们EPCs的损害与长期基础血压关系密切。本研究发现FMD在原发性高血压中严重下降,并与内皮祖细胞功能正相关,说明原发性高血压患者内皮祖细胞功能下降可能是内皮损伤的关键因素。

综上所述,与正常对照组比较,原发性高血压组的EPCs的功能明显较低,可能与FMD相关。

## 5. 不足与展望

由于目前中国高血压患者的依从性较差,绝大多数高血压患者缺乏监测长期的血压变化以及较好地控制血压在目标值,未记录高血压患者的患高血压的病程时间,及患者血压控制良好的具体时间缺乏,使得我们对于患者评估缺乏足够的信息。接下来研究中,我们将进一步增加样本量,提高样本信息,于得到更充足的证据研究原发性高血压与EPCs的关系,进一步研究其中机制。

## 基金项目

云浮市科技计划项目:WS202001。

## 参考文献

- [1] Campbell, N.R.C. and Zhang, X. (2018) Hypertension in China. *Circulation*, **137**, 2357-2359. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034028>
- [2] Rapsomaniki, E., Timmis, A., George, J., et al. (2014) Blood Pressure and Incidence of Twelve Cardiovascular Diseases: Lifetime Risks, Healthy Life-Years Lost, and Age-Specific Associations in 1.25 Million People. *The Lancet*, **383**, 1899-1911. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60685-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60685-1)

- [3] Agita, A. and Alsagaff, M.T. (2017) Inflammation, Immunity, and Hypertension. *Acta Medica Indonesiana*, **49**, 158-165.
- [4] Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., *et al.* (1997) Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science*, **275**, 964-967. <https://doi.org/10.1126/science.275.5302.964>
- [5] Tesfamariam, B. (2016) Endothelial Repair and Regeneration Following Intimal Injury. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, **9**, 91-101. <https://doi.org/10.1007/s12265-016-9677-1>
- [6] Liu, X., Zhang, G., Zhang, X., *et al.* (2013) Lacidipine Improves Endothelial Repair Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Essential Hypertension. *International Journal of Cardiology*, **168**, 3317-3326. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.04.041>
- [7] Sabatier, F., Camoin-Jau, L., Anfosso, F., *et al.* (2009) Circulating Endothelial Cells, Microparticles and Progenitors: Key Players towards the Definition of Vascular Competence. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **13**, 454-471. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00639.x>
- [8] 中国高血压防治指南发布, 继续沿用 140/90 mmHg 的诊断标准[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2018, 10(9): 1098.
- [9] Luo, S., Xia, W., Chen, C., *et al.* (2016) Endothelial Progenitor Cells and Hypertension: Current Concepts and Future Implications. *Clinical Science (London, England: 1979)*, **130**, 2029-2042. <https://doi.org/10.1042/CS20160587>
- [10] Chao, T.H., Chen, I.C., Lee, C.H., *et al.* (2016) Cilostazol Enhances Mobilization of Circulating Endothelial Progenitor Cells and Improves Endothelium-Dependent Function in Patients at High Risk of Cardiovascular Disease. *Angiology*, **67**, 638-646. <https://doi.org/10.1177/0003319715606249>
- [11] Werner, N. (2005) Influence of Cardiovascular Risk Factors on Endothelial Progenitor Cells: Limitations for Therapy? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **26**, 257-266. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000198239.41189.5d>
- [12] Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., *et al.* (2001) Number and Migratory Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells Inversely Correlate with Risk Factors for Coronary Artery Disease. *Circulation Research*, **89**, E1-E7. <https://doi.org/10.1161/hh1301.093953>
- [13] Hill, J.M., Zalos, G., Halcox, J.P., *et al.* (2003) Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *The New England Journal of Medicine*, **348**, 593-600. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022287>
- [14] Imanishi, T., Moriwaki, C., Hano, T., *et al.* (2005) Endothelial Progenitor Cell Senescence Is Accelerated in Both Experimental Hypertensive Rats and Patients with Essential Hypertension. *Journal of Hypertension*, **23**, 1831-1837. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000183524.73746.1b>
- [15] 鲁力, 周建中, 张铁须, 等. 原发性高血压对循环内皮祖细胞的影响[J]. 中国全科医学, 2008(9): 744-746.
- [16] Muntner, P. (2018) Response to Letter to Editor “2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults”. *Journal of the American Society of Hypertension*, **12**, 239. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2018.01.011>
- [17] Marumo, T., Uchimura, H., Hayashi, M., *et al.* (2006) Aldosterone Impairs Bone Marrow-Derived Progenitor Cell Formation. *Hypertension*, **48**, 490-496. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000235681.25685.cf>
- [18] Zhang, X.Y., Su, C., Cao, Z., *et al.* (2014) CXCR7 Upregulation Is Required for Early Endothelial Progenitor Cell-Mediated Endothelial Repair in Patients with Hypertension. *Hypertension*, **63**, 383-389. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02273>
- [19] Suzuki, R., Fukuda, N., Katakawa, M., *et al.* (2014) Effects of an Angiotensin II Receptor Blocker on the Impaired Function of Endothelial Progenitor Cells in Patients with Essential Hypertension. *American Journal of Hypertension*, **27**, 695-701. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpt208>
- [20] Georgescu, A., Alexandru, N. andrei, E., *et al.* (2012) Circulating Microparticles and Endothelial Progenitor Cells in Atherosclerosis: Pharmacological Effects of Irbesartan. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **10**, 680-691. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04650.x>
- [21] Li, Y., Alatan, G., Ge, Z., *et al.* (2014) Effects of Benazepril on Functional Activity of Endothelial Progenitor Cells from Hypertension Patients. *Clinical and Experimental Hypertension*, **36**, 545-549. <https://doi.org/10.3109/10641963.2014.881840>