

粒细胞集落刺激因子动员骨髓内皮祖细胞 促进损伤血管内皮修复

周音频, 黄 岚, 宋耀明, 武晓静, 晋 军, 张 坡, 宋明宝

(中国人民解放军第三军医大学新桥医院全军心血管研究所, 重庆市 400037)

[关键词] 病理学和病理生理学; 粒细胞集落刺激因子; 内皮祖细胞; 血管内皮

[摘要] 目的 探讨大鼠颈动脉球囊损伤后粒细胞集落刺激因子动员对损伤血管内膜增殖和内皮修复的影响及其相关机制。方法 36 只雄性 Wistar 大鼠随机分为假手术组($n=12$)、损伤+ 细胞因子组($n=12$)和损伤+ 安慰剂组($n=12$)。损伤+ 细胞因子组在球囊损伤后即刻腹腔注射粒细胞集落刺激因子[$100 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]直至术后 2 周, 损伤+ 安慰剂组给予等量生理盐水注射, 术后 2 周取血管段 HE 染色计算内膜/中膜面积比, 免疫组织化学观察并计算增殖细胞核抗原阳性细胞比例, 通过伊文氏蓝染色计算内皮修复率, 血管匀浆检测一氧化氮释放量, 用流式细胞术检测外周血 $\text{CD}34^+ \text{VEGFR}-2^+$ 双阳性细胞比例。结果 与假手术组比较, 损伤+ 安慰剂组血管内膜增殖明显, 有较多增殖细胞核抗原阳性细胞, 内皮修复不全, 血管匀浆中一氧化氮释放量减少; 与损伤+ 安慰剂组相比, 损伤+ 细胞因子组内膜/中膜面积比和增殖细胞核抗原阳性细胞比例降低(分别为 1.04 ± 0.05 比 1.67 ± 0.07 和 $21.3\% \pm 5.1\%$ 比 $34.4\% \pm 6.1\%$, $P < 0.05$), 内皮修复率和一氧化氮释放量增加(分别为 $70.1\% \pm 4.6\%$ 比 $53.2\% \pm 3.8\%$ 和 $71.3 \pm 12.9 \mu\text{mol/L}$ 比 $56.7 \pm 10.8 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$); 损伤+ 细胞因子组外周血 $\text{CD}34^+ \text{VEGFR}-2^+$ 双阳性细胞比例较损伤+ 安慰剂组明显上升($0.954\% \pm 0.076\%$ 比 $0.379\% \pm 0.052\%$, $P < 0.05$)。结论 粒细胞集落刺激因子明显增强血管损伤后内皮修复并减轻新生内膜增生。其机制可能涉及骨髓动员增加外周血内皮祖细胞比例。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Granulocyte Colony-Stimulating Factor Mobilize Marrow and Promote the Injured Endothelium Repair

ZHOU Yin-Pin, HUANG Lan, SONG Yao-Ming, WU Xiao-Jing, JIN Jun, ZHANG Po, and SONG Ming-Bao

(Institute of Cardiovascular Disease of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Granulocyte Colony-Stimulating Factor; Endothelial Progenitor Cell; Vascular Endothelium

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on reendothelialization and neointimal hyperplasia in balloon injured carotid of rat, and explore its potential mechanism. **Methods** 36 Wistar rats were randomly divided into three groups: sham operation group ($n=12$), G-CSF group ($n=12$) and placebo group ($n=12$). The balloon-injured carotid model was established in G-CSF group and placebo group, G-CSF [$100 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$] was intraperitoneal injected in G-CSF group from the point at operation to 2 weeks after operation, saline was administrated in placebo group. After two weeks, the neointima/media area ratio (IA/MA), repair rate of injured endothelium, the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive cell ratio and nitric oxide (NO) release in vessel homogenate were detected in three groups. In addition, the ratio of $\text{CD}34^+ \text{VEGFR}-2^+$ double positive cell was detected by FACS. **Results** Compared with the placebo group, the IA/MA and PCNA positive cell ratio were reduced (1.04 ± 0.05 vs 1.67 ± 0.07 , $21.3\% \pm 5.1\%$ vs $34.4\% \pm 6.1\%$, respectively, $P < 0.05$); repair rate of injured endothelium and NO release increased ($70.1\% \pm 4.6\%$ vs $53.2\% \pm 3.8\%$, $71.3 \pm 12.9 \mu\text{mol/L}$ vs $56.7 \pm 10.8 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$) in G-CSF group. The ratio of $\text{CD}34^+ \text{VEGFR}-2^+$ double positive cell of G-CSF group was higher than that of placebo group ($0.954\% \pm 0.076\%$ vs $0.379\% \pm 0.052\%$, $P < 0.05$). **Conclusions** The results suggested that G-CSF may increase the ratio of EPC in peripheral blood by mobilizing the bone marrow, then improve the effect of repair rate of injured endothelium and inhibit neointimal hyperplasia.

血管内皮损伤是动脉粥样硬化性血管病变的

始动和关键因素, 经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)后置入支架, 可改善血管弹性回缩和负性重构, 减少血管再狭窄, 但支架内仍可发生血管内膜过度增生。通过促进损伤后内皮功能恢复的措施, 可以抑制血管内膜过度增生^[1]。血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)是来源于骨髓的一类前体细胞, 目前发现在外周血中

[收稿日期] 2007-09-14 [修回日期] 2008-03-02

[基金项目] 国家自然科学基金(30470729)

[作者简介] 周音频, 博士, 主治医师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 zhouyinp@163.com。宋耀明, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病介入治疗。通讯作者黄岚, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病介入治疗, E-mail 为 huanglan260@yaho.com.cn。

也存在,能分化为成熟血管内皮细胞。近年研究发现EPC参与血管损伤后的血管再内皮化过程^[2]。本研究应用大鼠颈动脉球囊损伤模型,观察注射粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)对球囊损伤后血管内膜增生和再内皮化的影响,并探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

FITC标记抗大鼠CD34单抗和IgG1同型对照抗体购自Santa公司;PE标记抗大鼠血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2)单抗和IgG2a同型对照抗体购自EB公司;重组G-CSF购自深圳新鹏生物工程公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德公司;红细胞裂解液和流式细胞仪购自BD公司;伊文氏蓝染料购自Sigma公司。直径2F Fogarty球囊导管购自美国Baxter公司;752型分光光度计购自上海第三分析仪器厂;Image Pro Plus 4.5计算机图像分析系统购自Media Cybernetics公司。

1.2 动物分组

健康雄性Wistar大鼠36只,体重350~450 g,购于第三军医大学大坪医院实验动物中心,随机分为三组,每组12只:假手术组仅切开皮肤和皮下组织,不损伤血管;损伤+细胞因子组球囊损伤颈动脉,术后腹腔注射G-CSF[100 μ g/(kg·d)],每天1次,直到术后2周;损伤+安慰剂组球囊损伤颈动脉,给予等剂量生理盐水腹腔注射。颈动脉球囊损伤按文献[3]进行。术后2周处死动物。

1.3 血管内膜和中膜增生程度检测

取球囊损伤处颈总动脉约0.5 cm,石蜡包埋切片,HE和弹力纤维染色,普通光镜观察。以计算机图像分析仪分析内膜面积和中膜面积,计算内膜/中膜面积比。

1.4 免疫组织化学检测增生细胞核抗原

切片常规脱蜡、水化,3% H_2O_2 孵育,微波抗原修复5 min, PBS冲洗后加增生细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单抗,室温60 min, PBS冲洗10 min \times 3,滴加鼠抗兔IgG抗体—辣根过氧化物酶多聚体,孵育30 min, DAB显色,苏木素轻度复染,脱水、封片。在200倍光镜下,每张随机选择8个视野,分别计数内膜和中膜PCNA阳性细胞数和观察的细胞总数,计算阳性细胞百分率,取平均值。

1.5 损伤内皮修复程度测定

经静脉注入2%伊文氏蓝染液0.5 mL, 30 min后处死动物,取损伤的颈动脉段约0.5 cm纵向剖开,平铺固定,照相后在计算机图像分析系统下测量颜色深染损伤区域面积,计算损伤区域面积与总面积比值,计算内皮修复率。

1.6 血管匀浆中一氧化氮释放量

取损伤血管段约1.0 cm制成匀浆(假手术组取同侧对照血管)。以硝酸还原酶法检测NO释放量,按试剂盒说明操作。

1.7 外周血内皮祖细胞比例

用全血流式细胞法检测双色荧光标记CD34⁺ VEGFR-2⁺细胞比例。测定管和对照管分别加入上述二种流式荧光标记的单抗和相应同型对照抗体,加红细胞裂解液后离心、洗涤,多聚甲醛固定,上机检测。以配套的Cellquest软件分析,测定管双色荧光标记阳性细胞比例减去同型对照管所测定的双色荧光标记阳性细胞比例(即非特异性背景染色)作为该标本中实际的双色荧光标记阳性细胞比例,其值以百分比表示。

1.8 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,两组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用SPSS10.0统计软件。

2 结果

2.1 血管内膜和中膜增生程度

假手术组血管腔没有新生内膜增生,血管腔内表面隐约可见一层扁平的内皮覆盖,血管层次清楚;损伤+细胞因子组和损伤+安慰剂组血管腔可见较明显的新生血管内膜增生。与假手术组比较,损伤+细胞因子组和损伤+安慰剂组内膜/中膜面积比值增加(分别为 1.04 ± 0.05 和 1.67 ± 0.07 比 0.08 ± 0.02 , $P < 0.05$);经G-CSF处理的损伤+细胞因子组颈动脉新生内膜增生程度较损伤+安慰剂组轻($P < 0.05$)。

2.2 内膜和中膜增生细胞核抗原阳性细胞比例

假手术组极少数细胞PCNA表达阳性;损伤+细胞因子组和损伤+安慰剂组除可见新生内膜增生外,新生内膜和中膜均可见较多PCNA阳性细胞;损伤+细胞因子组颈动脉新生内膜和中膜表达的PCNA阳性细胞较损伤+安慰剂组减少($P < 0.05$;表1和图1)。



图 1. 术后 2 周血管横截面增生细胞核抗原免疫组织化学染色 ($\times 200$ 倍) A 为假手术组, B 为损伤+ 细胞因子组, C 为损伤+ 安慰剂组。

表 1. 术后 2 周增生细胞核抗原阳性细胞比例、损伤内皮修复程度和一氧化氮释放量 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	PCNA 阳性 细胞比例	损伤内皮 修复程度	NO 释放量 ($\mu\text{mol/L}$)
假手术组	1.8% \pm 0.6%	98.2% \pm 1.5%	101.6 \pm 16.2
损伤+ 细胞因子组	21.3% \pm 5.1% ^{ab}	70.1% \pm 4.6% ^{ab}	71.3 \pm 12.9 ^{ab}
损伤+ 安慰剂组	34.4% \pm 6.1% ^a	3.6% \pm 3.8% ^a	56.7 \pm 10.8 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与损伤+ 安慰剂组比较。

2.3 损伤内皮修复程度

假手术组血管腔对伊文氏蓝不着色或极淡染, 损伤+ 安慰剂组内皮损伤后因内皮修复不全腔面较多部分深染成蓝色, 损伤+ 细胞因子组血管腔深染面积较损伤+ 安慰剂组明显减少 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.4 血管匀浆中一氧化氮释放量

损伤+ 细胞因子组和损伤+ 安慰剂组血管匀浆中 NO 含量与假手术组比较明显减少, 损伤+ 细胞因子组与损伤+ 安慰剂组相比 NO 释放量有所恢复 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.5 外周血内皮祖细胞比例

损伤+ 细胞因子组和损伤+ 安慰剂组 CD34^+ VEGFR-2⁺ 双阳性细胞比例与假手术组比较明显增加, 损伤+ 细胞因子组 CD34^+ VEGFR-2⁺ 双阳性细胞比例高于损伤+ 安慰剂组 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 2. 术后 2 周外周血双色荧光标记 CD34^+ VEGFR-2⁺ 阳性细胞比例 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	CD34^+ VEGFR-2 ⁺ 阳性细胞比例
假手术组	0.028% \pm 0.003%
损伤+ 细胞因子组	0.954% \pm 0.076% ^{ab}
损伤+ 安慰剂组	0.379% \pm 0.052% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与损伤+ 安慰剂组比较。

3 讨论

研究发现出生后的个体骨髓中含有 EPC^[4], 后来从外周血中也成功分离出 EPC, 且发现其不但具

有增强血管新生和促进梗死心肌侧枝循环形成的作用, 而且还能加快血管损伤后内皮修复。直接将外源性 EPC 移植进入血管内皮损伤的动物模型也能促进血管内皮修复和抑制血管内膜过度增生^[3]。他汀类药物具有调节血脂以外的多种效应, 有研究发现他汀类药物治疗可促进损伤血管的内皮功能修复, 抑制损伤血管新生内膜过度增生, 其中一个重要机制可能是增加 EPC 由骨髓向外周血的动员^[5]。

本研究以大鼠颈动脉球囊损伤为研究对象, 观察了腹腔注射 G-CSF 对血管内皮损伤后新生内膜过度增生的抑制效应, 特别研究了其促进损伤血管内皮修复的作用。结果发现, 损伤+ 细胞因子组与损伤+ 安慰剂组相比, 内膜/中膜面积比、PCNA 阳性细胞比例得到明显抑制, 内皮修复率和 NO 释放量有明显改善, 提示 G-CSF 使损伤血管内皮修复程度增强。为进一步探讨其作用机制, 本研究使用流式细胞检测技术观察了不同处理条件下外周血双色荧光标记 CD34^+ VEGFR-2⁺ 阳性细胞比例, 发现通过 G-CSF 注射动员以后, 外周血中代表 EPC 水平的 CD34^+ VEGFR-2⁺ 阳性细胞比例明显增加, 与有关文献[6]报道相符。外周循环中的 EPC 不但对内源性因素的动员表现正相效应, 而且外源性的细胞因子也明显对这种正相效应有促进作用。除 G-CSF 外, 血管内皮生长因子、基质细胞衍生因子 1、转化生长因子和促红细胞生成素等均具有动员骨髓、增加外周血 EPC 的作用^[7], 证实外周血循环中的 EPC 可同时受内源性和外源性因素的调控。人内皮祖细胞表面标志目前常用的有 CD34 、VEGFR-2 和造血干细胞抗原 (AC133) 等, 几乎所有的 CD34^+ VEGFR-2⁺ 细胞均表达 AC133, 体外培养时 CD34^+ VEGFR-2⁺ AC133⁺ 细胞逐渐分化为 CD34^+ VEGFR-2⁺ AC133⁻ 细胞, 后者具有一些成熟内皮细胞的特征, 提示 CD34^+ VEGFR-2⁺ 可代表 EPC 水平的变化^[8]。

通过增强骨髓动员的方法能增加 EPC 由骨髓向外周血转移, 进而“归巢”到损伤部位分化为血管壁成熟内皮细胞, 更有效地促进损伤血管内皮的修

复。如何将骨髓动员的效果优化组合、更好地使EPC有针对性地“归巢”到血管损伤部位,以及在动员、分化和靶向目的方面的信号机制研究应该是以后研究的重点问题。

目前药物洗脱支架应用日益广泛,良好地改善了病情和冠心病患者生活质量,与金属裸支架比较最特别的优势是显著降低血管的再狭窄率。但是有研究发现在置入支架1年以后血栓发生率方面(极晚期支架内血栓),药物洗脱支架发生率略高,可能与靶血管内皮化不全有关^[9]。所以加强对血管内皮修复机制的研究,在药物洗脱支架时代对更好降低再狭窄率和增强血管内皮修复过程的生物学特性具有重大的意义。令人鼓舞的是,已经有相关的临床试验研究了EPC捕获支架对促进内皮修复和抑制新生内膜增生的作用^[10],初步证明了EPC捕获支架对冠状动脉新发病变治疗的安全性和可行性,更确切的效果还有赖于更大规模的试验来证实。

[参考文献]

[1] Losordo DW, Isner JM, Diaz-Sandoval LJ. Endothelial recovery: the next target

in restenosis prevention [J]. *Circulation*, 2003, **107** (21): 2 635-637.

- [2] Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance [J]. *J Cell Mol Med*, 2004, **8** (4): 498-508.
- [3] Werner N, Junk S, Laufs U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury [J]. *Circ Res*, 2003, **93** (2): e17-e24.
- [4] Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (7): 1 185-189.
- [5] Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin therapy accelerate reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. *Circulation*, 2002, **105** (25): 3 017-024.
- [6] Powell TM, Paul JD, Hill JM, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (2): 296-301.
- [7] 宋筱筱, 傅国胜. 内皮祖细胞与经皮冠状动脉介入治疗后再内皮化治疗研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (2): 175-178.
- [8] 周音频, 黄岚. 血管内皮祖细胞动员在损伤血管修复中的作用及调控因素[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 233-237.
- [9] Stone GW, Moses JW, Ellis SG, et al. Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents [J]. *N Engl J Med*, 2007, **356** (10): 998-1 008.
- [10] Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth First In Man) Registry [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, **45** (10): 1 574-579.

(此文编辑 文玉珊)