

# 冠心病患者外周血晚期内皮祖细胞集落数量与功能的变化

汪奕斌, 任国庆, 张浩, 孙文文, 严金川

(江苏大学附属医院, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] 冠心病; 内皮祖细胞; 集落; 危险因素

[摘要] 目的 探讨冠心病患者外周血晚期内皮祖细胞集落数量和功能的变化。方法 入选研究对象 54例, 分成冠心病组 ( $n=27$ ) 和对照组 ( $n=27$ )。密度梯度离心法从外周血中获得单个核细胞, 体外培养扩增 21 天后鉴定内皮祖细胞, 计数晚期集落数量, 分别用 MTT 比色法、改良的 Boyden 小室法和 HFN 培养板测定晚期内皮祖细胞的增殖、迁移和黏附功能。结果 冠心病组内皮祖细胞晚期集落数量 ( $2.5 \pm 1.2$ ) 与对照组 ( $3.8 \pm 1.6$ ) 相比, 明显减少 ( $P < 0.05$ ); 增殖、迁移和黏附能力与对照组比较 (分别为  $0.324 \pm 0.024$  比  $0.433 \pm 0.064$ ,  $9.9 \pm 2.5$  比  $13.9 \pm 4.1$ ,  $21.3 \pm 5.1$  比  $31.0 \pm 7.1$ ) 显著降低 ( $P < 0.05$ )。结论 冠心病患者晚期内皮祖细胞的数量减少, 功能受损。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Changes in the Amount and Function of the Late Endothelial Progenitor Cells Colonies Derived from Peripheral Blood in Patients with Coronary Heart Disease

WANG Yi-Bin, REN Guo-Qing, ZHANG Hao, SUN Wen-Wen, and YAN Jin-Chuan

(Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] Coronary Heart Disease; Endothelial Progenitor Cells Colonies; Risk Factors

[ABSTRACT] **Aim** To explore changes in the amount and function of the late endothelial progenitor cells (EPC) colonies derived from peripheral blood in patients with coronary heart disease (CHD). **Methods** Fifty four cases were divided into CHD group ( $n=27$ ) and control group ( $n=27$ ). Mononuclear cells were isolated from peripheral venous blood with density-gradient centrifugation and were cultured. After 21 days the late EPC were identified and the late EPC colonies were counted. The late EPC proliferation and migration were assayed by MTT assay and modified Boyden chamber assay, respectively. The late EPC adhesion assay was performed by replating those on fibronectin-coated dishes, then adherent cells were counted. **Results** The amount of the late EPC colonies ( $2.5 \pm 1.2$ ) were significantly reduced in patients with CHD compared with control subjects ( $3.8 \pm 1.6$ ) ( $P < 0.05$ ). The function of proliferation, migration and adhesion of the late EPC in CHD group were significantly lower than control group ( $0.324 \pm 0.024$  vs  $0.433 \pm 0.064$ ,  $9.9 \pm 2.5$  vs  $13.9 \pm 4.1$ ,  $21.3 \pm 5.1$  vs  $31.0 \pm 7.1$ ) ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Decreased late colonies amount can be observed in CHD group and impaired function can be observed

1997年, Asahara等<sup>[1]</sup>首次证明循环外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞, 并将其命名为血管内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC), 在生理或病理因素刺激下可以从骨髓动员到外周血, 参与血管内皮的修复和新血管的形成。近年来的研究显示, EPC与冠心病 (coronary heart disease, CHD) 关系密切。有关冠心病患者早期 EPC 数量和功能的研究已有很多, 而对晚期 EPC 数量和功能的研究较少。因此, 本研究以冠心病患者为研究对象, 探讨晚期 EPC 数量、增殖及迁移和黏附功能

的变化。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

2008年 12月至 2009年 8月心内科住院患者 54例, 分成冠心病组 (27例, 临床表现和心电图怀疑冠心病, 选择性冠状动脉造影提示至少有一支血管狭窄程度  $\geq 50\%$ , 证实冠心病诊断) 和对照组 (27例, 临床表现和心电图怀疑冠心病, 选择性冠状动脉造影证实无冠状动脉狭窄, 排除冠心病)。所有对象均排除心包炎、心肌炎、心肌病、肝肾功能不全、甲亢、自身免疫性疾病、感染、肿瘤、6个月内外伤或手术等。

### 1.2 试剂与仪器

EGM-2MV 培养液购于 Clonetics 公司, PE-

[收稿日期] 2009-10-22

[修回日期] 2010-01-20

[基金项目] 江苏大学临床医学科技发展基金资助项目 (JLY20080035)

[作者简介] 汪奕斌, 主治医师, 研究方向为缺血性心脏病与循环内皮祖细胞, Email为 chunaxian@126.com。通讯作者任国庆, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为缺血性心脏病的临床与基础, Email为 doctorgq@sohu.com。张浩, 硕士研究生, 研究方向为缺血性心脏病与炎症。

CD34、FITC-VEGF (KDR)、FITC-CD133、FITC-CD14均购自 eBioscience 公司,三色流式细胞仪为美国 BD 公司产品,胎牛血清购于 Gibco 公司, FITC-UEA-1 明胶均购自 Signa 公司, DiI-ac-LDL 购自 Invitrogen 公司,人纤维连接蛋白 (HFN) 购自 Chemicon 公司,改良的 Boyden 小室购自江苏海门麒麟医用仪器厂,人淋巴细胞分离液购自天津灏洋公司,二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 购自华美生物工程公司,1:250 胰蛋白酶购自上海生物工程技术有限公司。

### 1.3 单个核细胞分离和培养

所有对象均在入选 24 h 内抽取肘静脉血 20 mL, EDTA 抗凝,加缓冲液 1:1 稀释,2:1 缓慢沿壁滴加在淋巴细胞分离液斜面上,经密度梯度离心法获得单个核细胞 (mononuclear cells MNC),悬浮于 EGM-2MV 培养液,调整细胞密度为  $5 \times 10^5$  /L,接种于人纤维连接蛋白包埋的 24 孔培养板,每隔 2 h 去除 1 次未黏附细胞,共 2 次,以除去混杂的 T 淋巴细胞,然后加入培养液 (EGM-2MV) 放入培养箱培养 (37℃、5% CO<sub>2</sub>、湿度 95%),4 天后更换培养液,此后隔天更换 1 次,细胞汇合约 80% 时进行传代。

### 1.4 晚期内皮祖细胞鉴定

形态:培养第 21 天后在 40 倍倒置显微镜下直接观察培养板上形成的细胞集落形态。④荧光显微镜法:将培养的细胞在含有 DiI-ac-LDL 的培养液中孵育 24 h 然后用 4% 中性甲醛 4℃ 固定 10 min, PBS 漂洗后加 FITC-UEA-1 (10 mg/L) 1 h 在激光共聚焦显微镜下同时显示双荧光阳性的细胞定义为 EPC。不加 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 的同批培养细胞作空白对照。阴性对照采用 GSC7901 (胃癌细胞株)。④流式细胞技术:细胞以 0.25% 胰酶消化后,制成  $1 \times 10^6$  个/L 的单个细胞悬液,加入 PE-CD34、FITC-VEGF-2 (KDR)、FITC-CD133、FITC-CD14 及同型对照抗体,4℃ 避光孵育 30 min,流式细胞仪分析细胞 CD34、VEGFR-2 (KDR)、CD133 和 CD14 的表达。

### 1.5 细胞集落计数

培养第 21 天后在 40 倍倒置显微镜下随机选取 3 个视野进行细胞集落计数,求其平均值。

### 1.6 黏附能力检测

晚期集落出现时用 0.25% 胰蛋白酶消化搜集贴壁细胞,悬浮于 500 μL 培养液,计数,然后将同等数目的 EPC 铺在包被有 HFN 培养板,在 37℃ 培养 30 min 在 200 倍视野下计数贴壁细胞。

### 1.7 迁移能力检测

如上搜集贴壁细胞并计数。将 25 μL 培养液和

血管内皮生长因子 (VEGF, 50 μg/L) 加入改良的 Boyden 小室的下室,将  $2 \times 10^4$  EPC 悬浮在 50 μL 培养液注入上室,培养 24 h 刮去滤膜上面的未移动细胞,用甲醇固定,Giensa 染色,随机选择 3 个显微镜视野 ( $\times 400$ ) 计数迁移到低层的细胞。

### 1.8 增殖能力检测

如上搜集贴壁细胞并计数。再将等量 EPC 接种到包被有 HFN 96 孔培养板,每孔加 10 μL MTT (5 g/L),培养 4 h 后,吸弃上清液,再加入二甲基亚砜 (150 μL/孔),于微量振荡器充分振荡 10 min 置酶标仪于波长 490 nm 处测吸光度值。

### 1.9 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,均数间比较采用 *t* 检验,率的比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 基线资料

冠心病组吸烟、高血压、糖尿病、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白明显高于对照组 ( $P < 0.05$ );年龄、性别、高密度脂蛋白、冠心病家族史与对照组比较,差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 冠心病组和对照组临床资料比较

临床资料	对照组 ( <i>n</i> = 27)	冠心病组 ( <i>n</i> = 27)
年龄 (岁)	58.4 ± 8.2	59.2 ± 9.2
男性 (例)	17 (62.96%)	18 (66.67%)
吸烟 (例)	8 (29.63%)	17 (62.96%) <sup>a</sup>
高血压 (例)	7 (25.93%)	15 (55.56%) <sup>a</sup>
糖尿病 (例)	3 (11.11%)	10 (37.04%) <sup>a</sup>
甘油三酯 (mmol/L)	1.80 ± 0.58	2.16 ± 0.70 <sup>a</sup>
总胆固醇 (mmol/L)	4.29 ± 0.95	4.98 ± 1.31 <sup>a</sup>
低密度脂蛋白 (mmol/L)	2.29 ± 0.84	2.91 ± 1.21 <sup>a</sup>
高密度脂蛋白 (mmol/L)	0.87 ± 0.20	0.79 ± 0.14
冠心病家族史 (例)	6 (22.22%)	9 (33.33%)

a 为  $P < 0.05$  与对照组比较。

### 2.2 晚期内皮祖细胞的鉴定

形态:培养第 21 天后倒置显微镜下可观察到晚期集落,细胞紧密贴壁,聚集向外生长,细胞呈多角形或纺锤形,集落可以传代,呈现内皮细胞典型的铺路石样外观 (图 1)。④荧光显微镜法:集落在激光共聚焦显微镜下 DiI-ac-LDL、FITC-UEA-1 呈双染

色阳性(图 1)。(四)流式细胞技术:细胞表达高水平的 CD34和 VEGFR-2 微量表达 CD133和 CD14(图 2)。

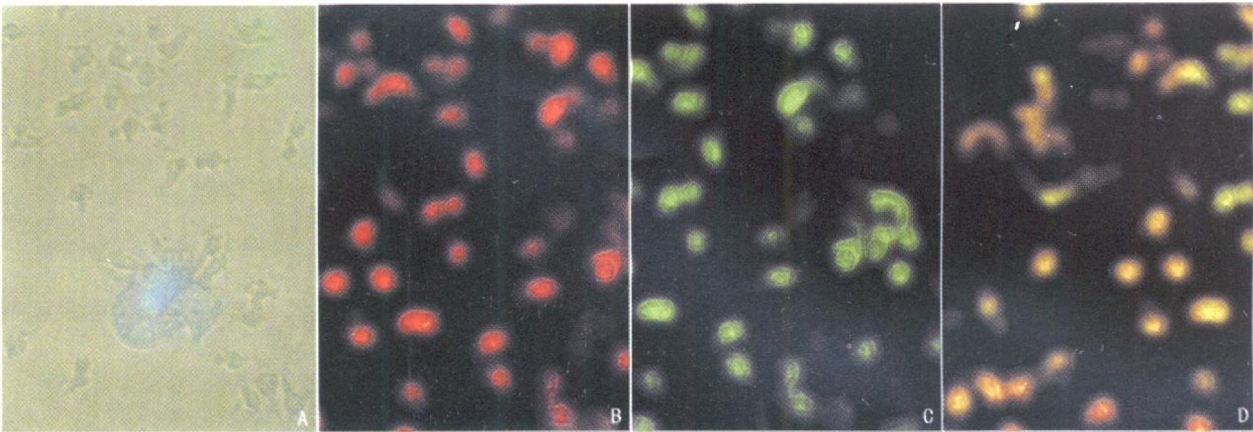


图 1 晚期内皮祖细胞的鉴定结果 A 为细胞集落形态 ( ×200), B 为 EPC 吸附 DiI-ac-LDL(呈红色 ), C 为 EPC 吸附 FITC-UEA-1(呈绿色 ), D 为 EPC 同时吸附 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-1(呈黄色 )。

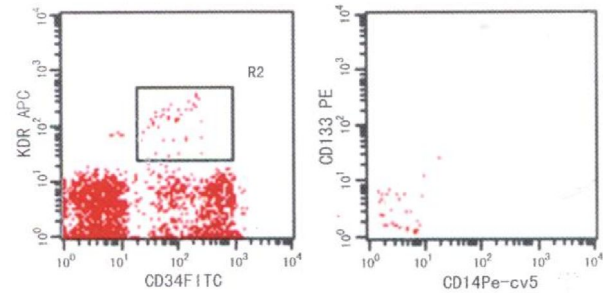


图 2 晚期内皮祖细胞流式鉴定结果

2 3 集落数量及增殖、迁移和黏附能力

冠心病组集落数及增殖、迁移和黏附能力显著低于对照组 ( $P < 0.05$ , 表 2)。

表 2 冠心病组和对照组晚期集落数目及功能的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	对照组 (n = 27)	冠心病组 (n = 27)
晚期集落数	3.8 ± 1.6	2.5 ± 1.2 <sup>a</sup>
增殖 (A <sub>490 nm</sub> )	0.433 ± 0.064	0.324 ± 0.024 <sup>a</sup>
迁移细胞	13.9 ± 4.1	9.9 ± 2.5 <sup>a</sup>
贴壁细胞	31.0 ± 7.1	21.3 ± 5.1 <sup>a</sup>

a为  $P < 0.05$  与对照组比较。

3 讨论

血管内皮祖细胞 (EPC)是血管内皮细胞的前体细胞, 包含一组从成血—血管干细胞到向内皮细胞分化的各阶段的细胞群, 在整个分化过程中经历连续的祖细胞阶段, 有着一系列完整的分化等级, 最终分化为成熟的血管内皮细胞。可见, 外周血的 EPC

实际上是不同分化阶段祖细胞的集合, 它们表面标记也有所不同<sup>[2]</sup>, 因此, 目前还很难准确地定义 EPC。

根据体外培养出现的时间、增殖能力和表面分子标志, 外周血 EPC 可以分成早期 EPC 和晚期 EPC 两种<sup>[3]</sup>。早期 EPC 体外培养 4~ 7 天形成典型放射状细胞集落, 增殖能力弱, 表达 CD34<sup>+</sup>、VEGFR-2<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup> 和 CD14<sup>+</sup>; 晚期 EPC 体外培养 2~ 3 周出现鹅卵石样集落, 增殖能力旺盛, 表达 CD34<sup>+</sup>、VEGFR-2<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup> 和 CD14<sup>-</sup>。早期集落的 EPC 增殖能力弱, 不能分化为成熟的内皮细胞直接进行细胞替代修复血管或形成新血管, 但具有很多旁分泌和自分泌功能, 通过分泌血管内皮生长因子、白细胞介素 8、基质细胞衍生因子 1、凝血酶原激酶<sup>[4]</sup>等, 增加血管渗透性和趋化梯度, 促进 EPC 的黏附和迁移, 降解基质形成毛细血管样管道; 晚期集落增殖能力旺盛, 体外培养能产生血管结构<sup>[5]</sup>, 可在损伤局部分化为成熟的内皮细胞进行血管修复和新血管形成, 直接参与血管修复。最近 Foteinos 等<sup>[6]</sup>研究表明载脂蛋白 E 基因缺陷 (ApoE<sup>-/-</sup>) 鼠在动脉粥样硬化发展过程中内皮的更新和修复至少有一部分来自骨髓。血管修复和新血管形成的开始可能主要是由早期 EPC 参与, 在后期阶段晚期 EPC 代替了早期 EPC, 最终完成血管修复和新血管形成。早期 EPC 分泌的各种趋化因子和生长因子可能在整个过程中都起着重要作用, 但最终增殖、分化为成熟的血管内皮细胞进行细胞替代作用的是晚期 EPC。可见一定数量和功能的晚期 EPC 对于血管修复和新血管形

成具有决定性作用。

我们从外周血分离单个核细胞体外培养 21 天后出现的集落, 根据鉴定结果提示为晚期 EPC。两组中, 冠心病组的晚期 EPC 集落数量明显下降, 与张菲斐等<sup>[7]</sup>的研究结果一致。本研究冠心病组的吸烟、高血压、糖尿病、总胆固醇、低密度脂蛋白等心血管危险因素明显增高, 推测晚期 EPC 数量下降可能与心血管危险因素有关。Vasa 等<sup>[8]</sup>也在研究中发现冠心病患者 EPC 数量较正常人减少, 并且与心血管危险因素相关。心血管危险因素使 EPC 数量减少的原因目前尚不清楚, 可能与干扰调节 EPC 分化动员的信号通路、促使骨髓 EPC 的衰竭和耗尽及促使 EPC 的凋亡有关。各种心血管危险因素之间还具有协同作用, 对 EPC 数量的影响取决于各种心血管危险因素共同作用的最终结果。

冠心病组晚期 EPC 的增殖、迁移和黏附能力也显著降低。目前相关的研究不多, Hill 等<sup>[9]</sup>报道不但 EPC 数量与冠心病 Framingham 危险因素积分成反向线性关系, 而且高危者 EPC 更易老化, 晚期 EPC 的增殖、迁移和黏附功能降低可能是 EPC 老化导致。方叶青等<sup>[10]</sup>研究发现相关的多种心血管危险因素使早期 EPC 的数量和活性下降, 我们的前期研究提示早期 EPC 对晚期 EPC 的功能有促进作用, 早期 EPC 数量和功能的下降可能是晚期 EPC 数量

和功能降低的另一个原因, 最终影响血管内皮修复和新血管的形成。

#### [参考文献]

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative endothelial progenitor cells for angiogenesis [J]. *Science* 1997; **275**: 964-967.
- [2] Ingram DA, Caplice NM, Mervin C, et al. Unresolved questions: changing definitions and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells [J]. *Blood* 2005; **106** (5): 1 525-531.
- [3] Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 288-293.
- [4] Stefano RD, Barsotti MC, Amani C, et al. Human peripheral blood endothelial progenitor cells synthesize and express functionally active tissue factor [J]. *Thromb Res* 2009; **123** (6): 925-930.
- [5] Mukai N, Akahori T, Komaki M, et al. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells [J]. *Exp Cell Res* 2008; **314** (3): 430-440.
- [6] Fotinos G, Hu Y, Xiao Q, et al. Rapid endothelial turnover in atherosclerosis-prone areas coincides with stem cell repair in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation* 2008; **117**: 1 856-863.
- [7] 张菲斐, 杨海波, 韩战营, 等. 急性心肌梗死患者循环内皮祖细胞不同集落成分数目及功能的变化 [J]. *中国心血管病研究*, 2008; **6** (5): 324-327.
- [8] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. *Cir Res* 2001; **89** (3): E1-7.
- [9] Hill JM, Zalos G, Halcox JR, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. *N Engl J Med* 2003; **348**: 593-600.
- [10] 方叶青, 谢秀梅, 何晋, 等. 冠心病患者外周血内皮祖细胞的数量和活性 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **16** (5): 381-384.

(此文编辑 许雪梅)