

下肢动脉硬化性闭塞症患者外周血内皮祖细胞数量和功能的变化

陈常军, 黎成金, 王冰, 李金海, 王烈

(福建医科大学福总临床医学院普通外科, 福建省福州市 350025)

[关键词] 下肢动脉硬化性闭塞症; 内皮祖细胞

[摘要] 目的 研究下肢动脉硬化性闭塞症患者外周血内皮祖细胞数量及其功能的改变。方法 入选对象 60 例分为实验组 ($n=30$) 和对照组 ($n=30$)。密度梯度法分离人外周血单个核细胞, 诱导分化培养 7 天后, 荧光染色和流式细胞术鉴定贴壁细胞为内皮祖细胞。采用吉姆萨染色法计算细胞个数、集落数目, MTT 比色法、改良 Boyden 小室及黏附能力实验测定内皮祖细胞增殖、迁移和黏附能力。结果 下肢动脉硬化性闭塞症患者外周血内皮祖细胞数量较对照组 (27.2 ± 3.6 : 52.6 ± 5.9 细胞/ $\times 200$ 倍视野, $P < 0.05$) 减少, 集落个数较对照组 (16.6 ± 4.8 : 22.3 ± 4.9 集落/ $\times 40$ 倍视野, $P < 0.05$) 也减少, 而且增殖能力 (0.193 ± 0.064 : 0.243 ± 0.078 , $P < 0.05$)、迁移能力 (12.1 ± 2.7 : 17.8 ± 4.2 细胞/ $\times 200$ 倍视野, $P < 0.05$)、黏附能力 (47.3 ± 4.3 : 51.9 ± 3.7 细胞/ $\times 200$ 倍视野, $P < 0.05$) 受损。结论 下肢动脉硬化性闭塞症患者外周血内皮祖细胞数量减少, 生物学功能减退。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Changes in the Number and Function of Endothelial Progenitor Cells from Peripheral Blood in the Patients with Low Extremity Arteriosclerosis Disease

CHEN Chang-Jun, LI Cheng-Jin, WANG Bing, LI Jin-Hai and WANG Lie

(Department of General Surgery, Fuzong Medical College, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350025, China)

[KEY WORDS] Low Extremity Arteriosclerosis Disease; Endothelial Progenitor Cells

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the changes in the number and function of endothelial progenitor cells (EPC) from peripheral blood in patients with low extremity arteriosclerosis disease (LEAD). **Methods** Sixty cases were divided into LEAD group ($n=30$) and control group ($n=30$). Mononuclear cells (MNC) were isolated from peripheral blood by density gradient centrifugation. After 7 days induced differentiation, the adherent cells were identified as EPC by fluorescein staining and flow cytometry. EPCs' s number, proliferation, migration and adhesion were assayed by Gimsa's staining, MTT chromometry, modified Boyden chamber assay and adhesion activity assay. **Results** The number of EPC was significantly reduced in patients with LEAD compared with control group (27.2 ± 3.6 : 52.6 ± 5.9 Cells/ $\times 200$ fields, $P < 0.05$) and the number of cell clusters was also reduced in patients with LEAD compared with control group (16.6 ± 4.8 : 22.3 ± 4.9 CFU/ $\times 40$ fields, $P < 0.05$). In addition, the proliferation (0.193 ± 0.064 : 0.243 ± 0.078 , $P < 0.05$), migration (12.1 ± 2.7 : 17.8 ± 4.2 Cells/ $\times 200$ fields, $P < 0.05$) and adhesion (47.3 ± 4.3 : 51.9 ± 3.7 Cells/ $\times 200$ fields, $P < 0.05$) in patients with low extremity arteriosclerosis disease were impaired respectively. **Conclusion** EPC number and function are abnormally decreased in patients with low extremity arteriosclerosis disease.

下肢动脉硬化性闭塞症 (low extremity arteriosclerosis disease, LEAD) 是外周动脉疾病 (peripheral arterial disease, PAD) 中最常见的一种, 其基本病理变化是由于周围动脉粥样硬化导致动脉狭窄、闭塞引起下肢缺血。动脉粥样硬化是导致 LEAD 发病和

致残的主要原因, 而血管内皮功能损伤是动脉粥样硬化的始动环节。近年研究表明, 内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 修复损伤的内皮细胞, 在血管新生和内皮功能的维持方面有重要的作用^[1]。本研究的目的旨在观察下肢动脉硬化性闭塞症患者外周血 EPC 数量和功能的变化。

[收稿日期] 2010-08-07 [修回日期] 2010-09-03

[基金项目] 福建省自然科学基金计划项目 (2009J01186)

[作者简介] 陈常军, 硕士研究生, 主要从事下肢动脉硬化性闭塞症的基础研究, Email 为 ccj267@163.com。黎成金, 博士, 副主任医师, 主要从事缺血性疾病的发病机制研究。通讯作者王烈, 博士, 教授, 主任医师, 主要从事腹主动脉瘤的微创治疗研究, Email 为 fptwk@21cn.com。

1 对象和方法

1.1 试剂和仪器

EndoCult™ 完全培养基、淋巴细胞分离液、青霉素、链霉素和磷酸盐缓冲液购自 Stel Cell 公司; 人

纤维连接蛋白 (HFN) 和 FITC 标记的荆豆凝 I (FITC-UEA-I) 购自 Sigma 公司; 0.25% 胰蛋白酶购自 Gibco 公司; 低密度脂蛋白 (Dil-acLDL) 购自 Molecular Probe 公司; 改良 Boyden 小室购置江苏海门麒麟医用仪器厂; PE 标记的 CD133 和 CD34 单克隆抗体购自 Peprotech 公司; EPICS XL 型流式细胞仪购自美国 Coulter 公司; IX51 型生物倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 研究对象

LEAD 患者 30 例, 符合 LEAD 诊断标准^[2], 且经动脉造影或血管多普勒检查证实, 踝肱指数 (ABI) ≤ 0.9 其中 IV 期 8 例, Ⅲ期 17 例, Ⅱ期 5 例。对照者 30 例, 为无 LEAD 的老年人。两组均排除外伤、溃疡、视网膜病、近期外科手术、炎症、肿瘤等影响 EPC 疾病者, 近 3 个月无急性心肌梗死发生。两组的临床资料见表 1。

表 1 临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	LEAD 组 (n = 30)	对照组 (n = 30)
年龄 (岁)	66.21 \pm 10.12	65.44 \pm 9.74
男/女 (例)	21/9	22/8
吸烟 (例)	11 (36.66%) ^a	8 (26.66%)
高血压 (例)	19 (63.33%) ^a	11 (36.66%)
冠心病 (例)	9 (30.00%) ^a	4 (13.33%)
体质指数 (kg/m ²)	22.81 \pm 2.07	22.13 \pm 2.66
空腹血糖 (mmol/L)	5.31 \pm 1.12	4.72 \pm 1.23
总胆固醇 (mmol/L)	4.90 \pm 1.18	4.69 \pm 0.77
低密度脂蛋白 (mmol/L)	2.43 \pm 1.08	2.37 \pm 1.21
高密度脂蛋白 (mmol/L)	0.84 \pm 0.25 ^a	1.21 \pm 0.26

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

1.3 内皮祖细胞的分离和培养

无菌环境下取患者外周静脉血 10 mL, 肝素钠抗凝, 4 h 内密度梯度离心法分离单个核细胞, 加入 EndoCultTM 完全培养基 (含青霉素 100 kU/L, 链霉素 100 kU/L), 调整细胞浓度为 5×10^9 个/L, 计算细胞总数并进行细胞活力鉴定, 将其接种于包被 HFN 的 6 孔培养板中, 置于 5% CO₂、37℃、饱和湿度培养箱中培养, 2 天后换液, 弃去贴壁细胞, 未贴壁细胞继续接种于 HFN 包被的 24 孔板中, 此后每隔 3 天更换培养液。

1.4 内皮祖细胞染色

取第 7 天贴壁细胞与 acLDL-Dil (2.4 mg/L) 37℃避光孵育 4 h, PBS 洗涤细胞, 2% 多聚甲醛固定

细胞 10 min, PBS 浸洗, 将 FITC-UEA-1 (10 mg/L) 加于上述标本, 37℃下避光孵育 1 h, PBS 浸洗。倒置显微镜下 acLDL-Dil 和 FITC-UEA-1 双染色阳性细胞为正在分化的 EPC。

1.5 内皮祖细胞表型检测

PBS 洗去杂质细胞, 0.25% 胰酶消化收集第 7 天的贴壁细胞, 完全培养液调整悬浮细胞浓度为 1×10^{10} 个/L, 分三管, 每管 100 μ L, 两管分别加入 PE 标记的 CD34 和 AC133 抗体 5 μ L, 第三管加入同型对照 5 μ L, 室温避光孵育 30 min, 1600 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次, 弃上清后添加 PBS 1 mL 进行流式细胞术鉴定。

1.6 内皮祖细胞计数

取第 7 天细胞, 吸弃培养液, PBS 洗去未贴壁细胞, 300 μ L 甲醇孵育 5 min, 吸弃甲醇, PBS 浸洗, 300 μ L Giemsa 染色 5 min, 三蒸水浸洗, 每孔选择 3 个视野计算细胞数量 ($\times 200$) 和细胞集落数 ($\times 40$)。

1.7 内皮祖细胞增殖能力检测

收集第 7 天贴壁细胞, 调整细胞浓度为 2×10^8 /L, 将细胞接种到包被有 HFN 的 96 孔培养板, 每孔 100 μ L。每孔加 10 μ L MTT (5 g/L), 培养 4 h 后加入二甲基亚砜 150 μ L, 微量震荡器震荡 10 min, 置于酶标仪上于波长 490 nm 处测 OD 值。

1.8 迁移能力检测

收集第 7 天贴壁细胞, 将培养液加入改良的 Boyden 小室的下室, 将 2×10^4 EPC 悬浮在培养液后注入上室, 5% CO₂、37℃、饱和湿度培养箱培养 24 h, 刮去滤膜上面未移动的细胞, 甲醇固定, Giemsa 染色, 显微镜下随机选择 3 个视野 ($\times 200$), 计算迁移到底层的细胞数。

1.9 内皮祖细胞黏附能力检测

收集第 7 天贴壁细胞, 取 2×10^4 悬浮于 500 μ L 培养液, 然后接种在包被有 HFN 的 24 孔培养板, 37℃培养 30 min, 洗掉非贴壁细胞后随机选择 3 个显微镜视野 ($\times 200$) 下计算贴壁细胞。

1.10 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内皮祖细胞培养情况

新分离的外周血单个核细胞呈圆形, 透亮, 悬浮于培养基, 台盼蓝染色死细胞 $< 0.5\%$; 培养第 4 天

可见贴壁细胞体积增大,梭形细胞增加;第 7 天可见贴壁细胞呈集落样生长(图 1A),大量的圆形细胞构成中间区域,周围是拉长的牙状细胞;培养第 10 天贴壁细胞大多呈梭形,并可见条索状结构;培养第 21 天可见贴壁细胞呈铺路石样。

2.2 内皮祖细胞表型鉴定

培养第 7 天的贴壁细胞吞噬 DiI-acLDL 后,在倒置显微镜下观察呈红色荧光(图 1B),结合 FITC-UEA-I 后呈绿色荧光(图 1C),双染色阳性细胞为黄色荧光(图 1D),目前认为双染色细胞为正在分化的 EPC。倒置显微镜下计数双染色阳性细胞 > 90%。流式细胞仪鉴定第 7 天贴壁细胞 CD34⁺、CD133⁺ 阳性率分别为 96.4% 和 94.2% (图 2 和 3),与荧光染色鉴定结果符合。

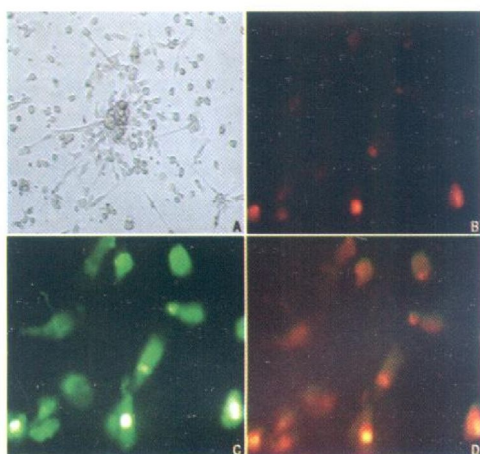


图 1 内皮祖细胞的鉴定 A 为体外培养第 7 天 EPC 成集落样生长 (×100), B 为 EPC 摄取 DiI-acLDL 后呈红色荧光 (×200), C 为 EPC 结合 FITC-UEA-I 后呈绿色荧光 (×200), D 为 EPC 同时摄取 DiI-acLDL 和结合 FITC-UEA-I 后呈黄色荧光 (×200)。

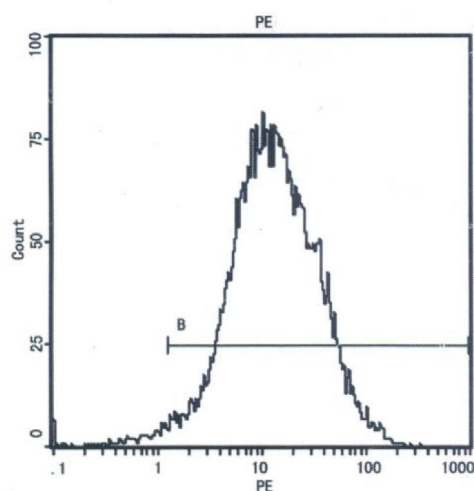


图 2 内皮祖细胞培养第 7 天 CD34⁺ 阳性细胞

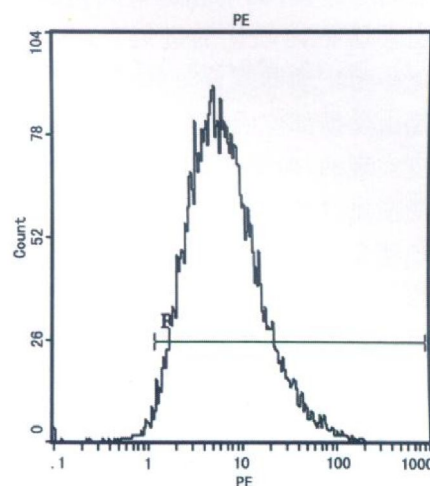


图 3 内皮祖细胞培养第 7 天 CD133⁺ 阳性细胞

2.3 内皮祖细胞集落计数及其功能改变

LEAD 患者 EPC 数量及集落个数较对照组明显减少,增殖、迁移和黏附能力显著下降 ($P < 0.05$ 表 2)。

表 2 EPC 数量和功能的比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	LEAD 组 ($n = 30$)	对照组 ($n = 30$)
细胞数量 (细胞 / ×200 倍视野)	27.2 ± 3.6 ^a	52.6 ± 5.9
集落数 (集落 / ×40 倍)	16.6 ± 4.8 ^a	22.3 ± 4.9
增殖能力	0.193 ± 0.064 ^a	0.243 ± 0.078
迁移能力 (细胞 / ×200 倍视野)	12.1 ± 2.7 ^a	17.8 ± 4.2
黏附能力 (细胞 / ×200 倍视野)	47.3 ± 4.3 ^a	51.9 ± 3.7

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

3 讨论

EPC 是血管内皮细胞的前体细胞,一般是指出生后机体中存在的能特异性归巢于血管新生组织并分化成内皮细胞的一群干细胞。EPC 不仅参与胚胎期的血管发育,也存在于成年机体的骨髓及外周血液中,对出生后的血管发育和血管损伤修复起重要作用。研究发现,25% 的新生血管内皮细胞由 EPC 分化而来。动脉粥样硬化性疾病是一种全身性疾病,冠心病、缺血性卒中、外周动脉病等都是其重要的表现形式,LEAD 是动脉粥样硬化性疾病中常见的一种。

动脉粥样硬化的发病机制学说甚多,多数学者认为内皮损伤是动脉粥样硬化的始动过程,多种危险因素通过对内皮细胞的损伤而启动或加重动脉粥

样硬化的病理过程,而动脉血管的损伤和修复平衡可能决定动脉粥样硬化的进展^[3]。内皮损伤时重新内皮化是防止动脉粥样硬化的重要过程,而重新内皮化是由受损部位周围邻近的内皮细胞迁移和整合到内皮实现的,但是成熟内皮细胞的增殖能力以及修复受损血管的能力十分有限。大量研究表明,EPC能加速受损血管的重新内皮化,在剥脱和受损血管的修复中发挥着重要作用。本研究采用密度梯度法收集外周血单个核细胞,诱导分化7天后荧光染色及流式细胞术分别鉴定贴壁细胞为EPC。研究观察到,LEAD患者外周血EPC数量及集落数与对照组相比显著降低,细胞的增殖、迁移和粘附能力也都明显受损。相关研究发现,几乎所有与动脉粥样硬化有关的疾病状态均伴随有EPC数量的减少和功能的下降,最可能归因于心血管危险因素聚集导致内皮细胞的修复能力下降^[4]。传统的动脉粥样硬化危险因素如高血压^[5]、高血脂^[6]、C反应蛋白^[7]、吸烟^[8]及糖尿病^[9]等都可不同程度影响EPC数量和活性,而多种治疗药物如他汀类^[10]、罗格列酮^[11]等均能增加EPC的数量和活性。本研究中,LEAD组较对照组高血压患者比例高,高密度脂蛋白水平低,吸烟者多,这些因素不仅已证实为LEAD发病的高危因素,也被证实对EPC的数量及功能产生影响^[12-13]。这些因素不但诱导动脉粥样硬化的发生从而使内皮损伤加重,而且通过各种途径减少EPC数量进而抑制内皮修复。LEAD是一个多因素联合致病疾病,各种高危因素共同导致LEAD的发生,但其发病的分子机制尚需进一步研究。

血管内皮功能不良的一个机制可能是EPC相对缺乏,不足以修复血管^[14],从而导致LEAD的发生。临床实践表明,给严重LEAD患者移植自体循

环EPC后其临床症状得到明显的改善^[15]。探寻如何提高LEAD患者外周血EPC数量和活性,以改善内皮损伤和功能障碍,有望成为预防和治疗LEAD的一种有效途径,具有广阔的开发和应用潜能。

[参考文献]

- [1] Vasa M, Fichtlscher S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factor for coronary artery disease [J]. *Circ Res* 2001; **89** (1): 311-312
- [2] 尚德俊,王嘉桔,王书贵. 中西医结合周围血管疾病学[M]. 海口:海南出版社,1995:119-223
- [3] Meng CQ. Atherosclerosis is an inflammatory disorder after all [J]. *Curr Top Med Chem*, 2006; **6** (2): 93-102
- [4] Boos CJ, Lip CY, Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease [J]. *J Am Coll Cardiol* 2006; **48** (8): 1538-547
- [5] Inanishi T, Moriaki C, Hana T, et al. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension [J]. *J Hypertens* 2005; **23** (10): 1831-837
- [6] Lavi R, Zhu XY, Chade AR, et al. Simvastatin decrease endothelial progenitor cell apoptosis in the kidney of hypertensive hypercholesterolemia pigs [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; **30** (5): 976-983
- [7] 陈晓彬,何晋,谢秀梅,等. C反应蛋白对外周血内皮祖细胞数量及功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **16** (8): 607-610
- [8] DiStefano R, Barsotti MC, Felice F, et al. Smoking and endothelial progenitor cells: A revision of literature [J]. *Curr Pharm Des* 2010; **15** (6): 221-227
- [9] Fadini GP, Pucci L, Vanacore R, et al. Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels [J]. *Diabetologia*, 2007; **50** (10): 2156-163
- [10] 苏晓叶,刘志忠,李小波,等. 不同剂量的阿托伐他汀对心肌损伤大鼠内皮祖细胞动员及血管内皮功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (4): 277-280
- [11] Wang CH, Ciliberti N, Li SH, et al. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: A new paradigm in glitazone pleiotropy [J]. *Circulation*, 2004; **109** (11): 1392-400
- [14] Erdbrugger U, Hubitz Z, Woywodt A. Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage [J]. *Clin Chim Acta* 2006; **373** (1-2): 17-26
- [15] Huang PP, Li SZ, Han MZ, et al. Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lower extremities [J]. *Thromb Haemost* 2004; **91** (3): 606-609

(此文编辑 文玉珊)