

· 临床研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2011)19-09-0756-05

内皮祖细胞与颈动脉粥样硬化斑块性质的关系

丁立¹, 李承晏², 何国厚¹, 王云甫¹, 刘勇¹, 李永霞¹

(1. 湖北医药学院附属太和医院神经内科, 湖北省十堰市 442000; 2. 武汉大学人民医院神经内科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 颈动脉粥样硬化; 内皮祖细胞; 斑块性质

[摘要] 目的 探讨外周血内皮祖细胞数量和功能的变化与颈动脉粥样硬化斑块性质的关系。方法 选择确诊有颈动脉粥样硬化的脑梗死患者以及无颈动脉粥样硬化的健康体检者。所有入组人员均行颈动脉彩色多普勒超声检查以及头颅计算机 X 射线断层扫描或磁共振成像检查。根据颈动脉超声病理改变结果分为 3 组: 软斑块组、硬斑块组和对照组。从肘静脉采血 10 mL, 用密度梯度离心法获取单个核细胞, 将其接种在人纤维连接蛋白包被的 24 孔培养板, 培养 4 天后, 洗去非贴壁细胞, 换液培养至 7 天。收集贴壁细胞, 采用激光共聚焦显微镜鉴定, FITC 标记荆豆凝集素 I 和 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白双染阳性细胞为正在分化的内皮祖细胞。采用黏附能力测定实验、MTT 法和改良的 Boyden 小室分别观察内皮祖细胞的黏附能力、增殖能力和迁移能力。结果 放大 200 倍视野下内皮祖细胞数量、黏附能力, 硬斑块组和软斑块组均高于对照组, 软斑块组高于硬斑块组, 差异均具有统计学意义。硬斑块组和软斑块组增殖能力均低于对照组, 软斑块组高于硬斑块组, 差异具有统计学意义。软斑块组迁移能力高于对照组, 差异具有统计学意义。结论 外周血内皮祖细胞的数量和功能可能与颈动脉粥样硬化斑块性质有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Clinical Study of the Association Between Endothelial Progenitor Cells and the Features of Carotid Atherosclerotic Plaque

DING Li¹, LI Chen-Yan², HE Guo-Hou¹, WANG Yun-Fu¹, LIU Yong¹, and LI Yong-Xia¹

(1. Department of Neurology, Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

[KEY WORDS] Carotid Atherosclerosis; Endothelial Progenitor Cells; Plaque Features

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the Association between endothelial progenitor cells (EPC) and the features of carotid atherosclerotic plaque. **Methods** Cerebral infarction patients with carotid atherosclerosis and healthy volunteers without carotid atherosclerosis were enrolled. Carotid color Doppler ultrasonography and head computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI) were applied in all persons enrolled. According to clinical symptoms of carotid color Doppler ultrasonography, they were divided into three groups: soft plaque group, hard plaque group and control group. Blood 10 mL were drawn from ulnar vein. Mononuclear cells were isolated from peripheral blood by density gradient centrifugation and cultured on the twenty-four well fibronectin-coated cell dishes. Nonadherent cells were discarded on day 4 and culture medium was then changed. Attached cells were collected. EPCs were characterized as double positive for Dil-acLDL and FITC-UEA-I by laser scanning confocal microscope (LSCM). EPCs adhesion, and proliferation and migration were assayed with adhesion assay, MTT assay and modified Boyden chamber assay, respectively. **Results** The numbers and adhesive capacity of EPCs in soft plaque group and hard plaque group were higher than those in control group. The numbers, adhesive capacity and migratory capacity of EPCs in soft plaque group were higher than those in hard plaque group. The proliferative capacity of EPCs in control group were higher than those in soft plaque group and hard plaque group. The proliferative capacity of EPCs in soft plaque group were higher than those in hard plaque group. The migratory capacity of EPCs in soft plaque group were higher than those in control group. **Conclusion** EPCs are associated with the features of carotid atherosclerotic plaque.

[收稿日期] 2011-02-07

[基金项目] 十堰市科技攻关项目(2008021D)

[作者简介] 丁立, 硕士, 主要从事脑血管疾病研究, E-mail 为 dlyymc@163.com。李承晏, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脑血管疾病研究。通讯作者何国厚, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事脑血管疾病研究, E-mail 为 taiheguo07@sina.com。

随着人口老龄化的增加,急性脑血管意外的发生率逐年升高,严重威胁着人们的生命与健康。动脉粥样硬化是急性脑血管意外的重要危险因素之一。动脉粥样硬化是一个复杂和缓慢发展的炎症性疾病^[1-3],始发于儿童时期而持续进展,通常在中年或者中老年才出现症状。大多数动脉粥样硬化斑块稳定而没有症状,往往被忽视。但是一旦斑块破裂,常常危及生命。因此,有关斑块稳定性的研究对临床具有重要的意义。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)是内皮细胞的前体细胞,可以分化为成熟的内皮细胞,参与血管损伤修复形成,与动脉粥样硬化斑块的形成和发展密切相关。本研究通过检测颈动脉易损的软斑块组、较稳定的硬斑块组和正常对照组外周血 EPC 数量和功能的变化,了解外周血 EPC 数量和功能的变化与颈动脉粥样硬化斑块性质的关系,探讨外周血 EPC 与颈动脉粥样硬化斑块性质的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

选择 2009~2010 年间在我院神经内科住院确诊有颈动脉粥样硬化斑块的脑梗死患者以及无颈动脉粥样硬化的健康体检者。脑梗死诊断符合 1995 年全国第 4 届脑血管病学术会议修订的诊断标准。有以下病史者予以排除:冠状动脉综合征、心房颤动、心力衰竭、心脏瓣膜病、恶性肿瘤、外周血管病、慢性肝肾疾病、自身免疫性疾病、近期(6 个月内)手术、严重外伤、严重感染、使用糖皮质激素及免疫抑制剂等。

1.2 材料与试剂

人淋巴细胞分离液、FITC 标记的荆豆凝集素 I (FITC-UEA-I) 购自 Sigma 公司;人纤维连接蛋白购自 Millipore 公司;EGM-2 培养基购自 Lonza 公司;Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-acLDL) 购自 Molecular Probe 公司;5 mL 肝素无菌抗凝管购自山东奥赛特医疗器械有限公司;水平低速离心机购自 Eppendorf 公司;超净工作台购自阿尔泰公司;37℃ 恒温细胞培养箱购自 Binder 公司;倒置相差显微镜购自 Olympus 公司;激光扫描共聚焦荧光显微镜购自 Zeiss 公司;酶标仪购自 Thermo 公司;24 孔培养板、96 孔培养板购自 Corning 公司;Boyden 小室购自麒麟医用仪器厂;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS) 粉剂、胰蛋白酶、多聚甲醛、二苯基四氮唑溴盐(MTT) 由湖北医药学院基础医学研究所

提供。

1.3 试验分组

所有入组人员均行颈动脉彩色多普勒超声检查以及头颅电子计算机 X 射线断层扫描(computed tomography, CT) 或磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI) 检查。根据颈动脉超声病理改变分为 3 组:硬斑块组、软斑块组和对照组。软斑块的超声特征为中、低回声,向腔内突出;硬斑块的超声特征为强回声,向腔内突出,可伴声影。对每一位纳入人员,详细记录性别、年龄、身高、体重、吸烟、饮酒、高血压病史、糖尿病病史、血脂异常病史、脑卒中病史、服药史等病史。所有入组人员均行血糖、血脂、肝肾功能等检查。

1.4 内皮祖细胞的分离、培养与鉴定

取肘静脉血 10 mL,密度梯度离心法获取单个核细胞。将单个核细胞接种在人纤维连接蛋白包被的 24 孔细胞培养板。EGM-2 培养基培养至 4 天,用 PBS 洗掉非贴壁细胞,换培养液至 7 天,用 FITC-UEA-I 和 Dil-acLDL 对细胞标记后,用激光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM) 进行鉴定, FITC-UEA-I 和 Dil-acLDL 双染色阳性细胞为正在分化的 EPC。计数 15 个随机选择的放大 200 倍视野的 EPC,取平均值。

1.5 黏附能力实验

消化收集贴壁细胞,将等量的 EPC 接种到包被有纤维连接蛋白的培养板,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 30 min。荧光显微镜下计数,随机选择 9 个视野(×200) 计数贴壁细胞,取平均值。

1.6 增殖能力实验

消化收集贴壁细胞,将等量的 EPC 接种到包被有人纤维连接蛋白 96 孔培养板中,每一标本做 3 个复孔,设空白对照;将培养板移入 CO₂ 培养箱中,在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下,培养 24 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5g/L) 20 μL,继续培养 4 h;吸弃上清液,再加入二甲基亚砷每孔 150 μL,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(absorbance, A) 值。

1.7 迁移能力实验

消化收集贴壁细胞。将 200 μL 培养液和 VEGF(50 μg/L) 加入 Boyden 小室的下室,将等量的 EPC 注入上室,在 37℃、5% CO₂ 温箱培养 24 h;刮去滤膜上面的未移动细胞,用甲醇固定 3~5 min,进行 DAPI 染色 10 min,用蒸馏水冲洗,干后镜检,随机选择 3 个显微镜视野(×200) 计数迁移到低层的细胞。

1.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以频数和百分比表示。两组均数比较用 t 检验,两组以上均数比较用单因素方差分析(组间两两比较用 q 检验);两样本计数资料比较用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法检验。采用 SPSS 13.0 软件包进行数据处理分析,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 3组受检者基线资料

3组受检者的性别、年龄、体质指数、嗜烟、嗜酒、高血压病史、糖尿病病史、血脂异常病史、脑卒中病史、服药史等病史,以及空腹血糖、甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白之间差异无统计学意义($P > 0.05$;表1),具有可比性。

表1. 3组受检者基线资料比较

Table 1. Comparison of the characteristics in the three groups

分 组	对照组 ($n = 12$)	软斑块组 ($n = 12$)	硬斑块组 ($n = 12$)	P 值
年龄(岁)	53.4 ± 8.2	55.7 ± 6.9	58.7 ± 7.0	0.234
男性(例)	2(16.7%)	6(50.0%)	4(33.3%)	0.223
体质指数(kg/m ²)	24.5 ± 1.8	25.3 ± 3.3	24.9 ± 1.3	0.731
嗜烟(例)	1(8.3%)	4(33.3%)	4(33.3%)	0.319
嗜酒(例)	3(27.3%)	4(33.3%)	6(50.0%)	0.569
收缩压(mmHg)	123.9 ± 8.5	156.7 ± 19.4	152.7 ± 21.9	0.640
舒张压(mmHg)	80.2 ± 9.8	99.8 ± 14.4	90.0 ± 20.0	0.182
高血压病史(例)	0	8(66.7%)	4(33.3%)	0.220
糖尿病病史(例)	0	2(16.7%)	2(16.7%)	1.000
血脂异常病史(例)	0	1(8.3%)	2(16.7%)	1.000
脑卒中病史(例)	0	6(50.0%)	2(16.7%)	0.193
他汀类药物服药史(例)	0	1(8.3%)	1(8.3%)	1.000
ACEI类药物服药史(例)	0	6(50.0%)	2(16.7%)	0.193
利尿剂类药物服药史(例)	0	6(50.0%)	3(27.3%)	0.400
钙离子拮抗剂类药物服药史(例)	0	2(8.3%)	1(8.3%)	1.000
降糖药物服药史(例)	0	1(8.3%)	2(16.7%)	1.000
NIHSS	-	2.2 ± 2.2	3.2 ± 2.7	0.331
急性期/恢复期	-	8/4	6/6	0.569
空腹血糖(mmol/L)	4.224 ± 0.823	6.498 ± 1.574	7.288 ± 2.051	0.302
甘油三酯(mmol/L)	0.868 ± 0.348	1.228 ± 0.425	0.978 ± 0.415	0.157
胆固醇(mmol/L)	3.836 ± 0.627	4.823 ± 1.262	4.523 ± 0.819	0.496
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.449 ± 0.286	1.373 ± 0.202	1.275 ± 0.255	0.306
低密度脂蛋白(mmol/L)	1.818 ± 0.387	2.955 ± 0.707	2.672 ± 0.434	0.253

2.2 内皮祖细胞激光共聚焦显微镜鉴定

从外周血分离获得的单个核细胞培养7天后,通过激光共聚焦显微镜对EPC进行鉴定。细胞摄取Dil-acLDL和结合FITC-UEA-I后,通过共聚焦显微镜进行鉴定,Dil-acLDL和FITC-UEA-I双染阳性

细胞,认为是正在分化的EPC(图1)。

2.3 3组受检者外周血内皮祖细胞计数比较

硬斑块组和软斑块组外周血EPC计数均高于对照组,软斑块组高于硬斑块组,3组之间差异具有统计学意义($P < 0.01$;图2)。

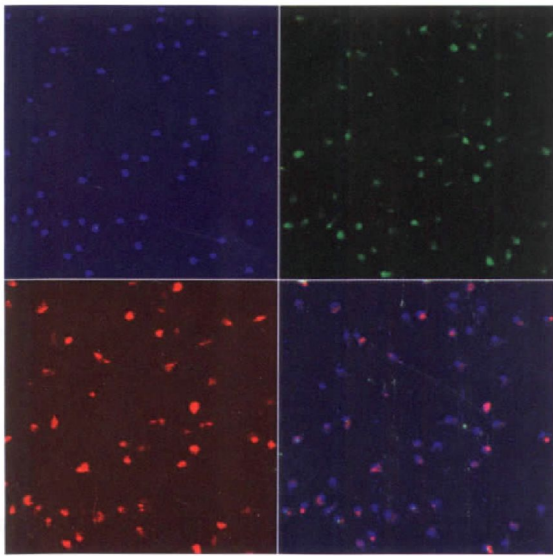


图 1. 内皮祖细胞激光共聚焦显微镜鉴定 (×200) Dil-acLDL(绿色, 激发波长 477 nm) 和 FITC-UEA-1(红色, 激发波长 543 nm) 双染阳性细胞, 认为是正在分化的 EPC, 占有贴壁细胞的 90% 以上。蓝色为 DAPI, 显示细胞核 (×200)。

Figure 1. Identification of endothelial progenitor cells with laser scanning confocal microscope

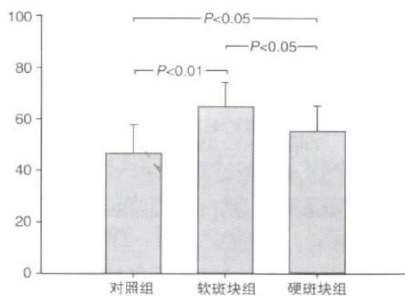


图 2. 3 组受检者放大 200 倍视野下血内皮祖细胞数量比较
Figure 2. Comparison of the numbers in the three groups

2.4 3 组受检者外周血内皮祖细胞黏附能力的变化

硬斑块组和软斑块组受检者外周血 EPC 黏附能力均高于对照组, 而软斑块组高于硬斑块组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$; 图 3)。

2.5 3 组受检者外周血内皮祖细胞增殖能力的变化

硬斑块组和软斑块组外周血 EPC 增殖能力均低于对照组, 软斑块组高于硬斑块组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$; 图 4)。

2.6 3 组受检者外周血内皮祖细胞迁移能力的变化

硬斑块组和软斑块组外周血 EPC 迁移能力均高于对照组, 而软斑块组高于硬斑块组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$; 图 5)。

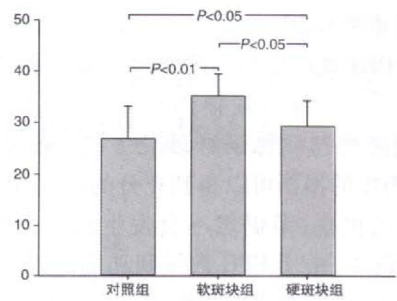


图 3. 3 组受检者内皮祖细胞黏附能力比较
Figure 3. Comparison of the adhesive capacity in the three groups

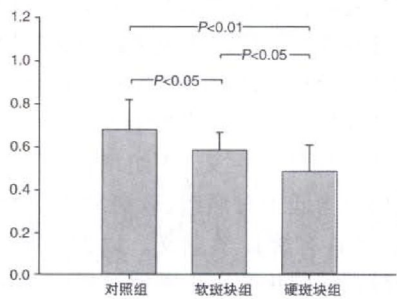


图 4. 3 组受检者内皮祖细胞增殖能力比较
Figure 4. Comparison of the proliferative capacity in the three groups

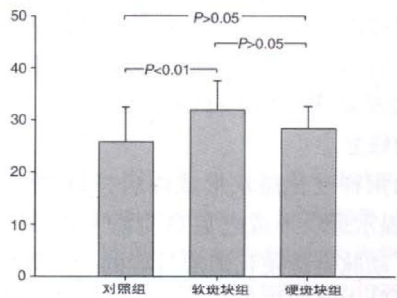


图 5. 3 组受检者内皮祖细胞迁移能力比较
Figure 5. Comparison of the migratory capacity in the three groups

3 讨论

动脉粥样硬化的危险因素造成了动脉内皮的损伤, EPC 参与了内皮损伤的修复^[4, 5]。动脉粥样硬化的危险因素造成内皮细胞的损伤和凋亡, 破坏了内皮的完整性。内皮功能障碍和损伤的修复, 首先是损伤周围内皮细胞的参与。在内皮损伤部位, 相邻的内皮细胞增殖, 参与修复裸露的管腔表面。此外, 外周血 EPC 也参与其中, 在血管再内皮化、新生

血管形成、血管内皮功能正常化和血流的回复过程中发挥着重要作用^[6]。EPC 还可以通过分泌血管生成生长因子促进损伤周围的内皮细胞参与血管损伤的修复^[7]。动脉内皮损伤和修复的失衡导致了内皮功能障碍与动脉粥样硬化^[8, 9]。在生理情况下,动脉内皮的损伤可以得到充分的修复,虽然存在动脉内皮的损伤,但仍然不会发生动脉粥样硬化。在病理情况下,由于 EPC 数量和功能的异常,和/或者其他原因,动脉内皮的损伤没有得到充分的修复,一部分损伤得到了修复,一部分损伤没有得到修复^[10]。没有得到修复的内皮损伤就会继续动脉粥样硬化的进程,在局部逐渐形成动脉粥样硬化斑块。

本研究发现,3 组放大 200 倍视野下 EPC 数量、黏附能力、迁移能力,硬斑块组和软斑块组均高于对照组,软斑块组高于硬斑块组,除硬斑块组与软斑块组和对照组迁移能力的差异没有统计学意义外,其余差异均具有统计学意义。3 组增殖能力,硬斑块组和软斑块组均低于对照组,软斑块组仍然高于硬斑块组,差异具有统计学意义。以前的研究认为,EPC 在动脉粥样硬化的发生发展过程中发挥着重要的作用,EPC 数量和功能的变化可能影响着动脉粥样硬化的发生发展进程。本研究发现,在颈动脉粥样硬化斑块形成以后,动脉内皮损伤的修复并没有停止。EPC 动员增多,黏附和迁移能力增强,这些都可能与动脉内皮损伤的修复有关。动脉粥样硬化斑块形成以后,斑块可能会释放一些炎症因子,刺激骨髓 EPC 动员增多,上调 EPC 的黏附和迁移能力,促进内皮的修复。

动脉粥样硬化斑块形成以后,EPC 增殖能力是下降的,提示斑块形成之后自身修复内皮损伤的能力下降。动脉粥样硬化形成过程的一系列事件开始于初期动脉内膜的损伤^[5, 6],如果动脉内皮的损伤可以得到充分的修复,虽然存在动脉内皮的损伤,但仍然不会发生动脉粥样硬化。由于 EPC 数量和功能的异常,和/或者其他原因,导致动脉内皮的损伤没有得到充分的修复,没有得到修复的内皮损伤就会继续动脉粥样硬化的进程,逐步形成动脉粥样硬化斑块。动脉粥样硬化斑块形成以前,自身修复内皮损伤的能力可能已经下降,但目前尚缺乏研究支持。

在 EPC 动员增多,黏附和迁移能力增强上,软斑块组均高于硬斑块组,说明与硬斑块相比,软斑块可能存在更为活跃的内皮修复,软斑块动员机体修复的能力更强。

近年来,使用非侵入性或微创技术诊断和描述

动脉粥样硬化成为一种趋势。将来判断病人发生急性动脉粥样硬化血栓的危险程度可能需要结合临床特征、影像检查和血液标志物检测。此外,影像检查和血液标志物检测也可以用来判断血管内介入后发生并发症的危险程度。迄今为止,哪一种生物标志物更适于诊断或预测斑块的稳定性,还没有达成一致。也许,生物标志物的组合更为合适^[11]。本研究发现,不同性质动脉粥样硬化斑块患者外周血 EPC 的数量和功能存在着差异,这可能提示外周血 EPC 在某种程度上可以反映颈动脉粥样硬化斑块的性质。

[参考文献]

- [1] Kips JG, Segers P, Van Bortel LM. Identifying the vulnerable plaque: A review of invasive and non-invasive imaging modalities [J]. *Artery Research*, 2008, 2(1): 21-34.
- [2] Hansson GK. Atherosclerosis—an immune disease: the anitschkov lecture 2007 [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(1): 2-40.
- [3] Song C, Shen Y, Yamen E, et al. Serum amyloid A may potentiate prothrombotic and proinflammatory events in acute coronary syndromes [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(2): 596-604.
- [4] Subramaniam V, Waller EK, Murrow JR, et al. Bone marrow mobilization with granulocyte macrophage colony-stimulating factor improves endothelial dysfunction and exercise capacity in patients with peripheral arterial disease [J]. *Am Heart J*, 2009, 158(1): 53-60 e51.
- [5] Zhang Q, Liu L, Zheng X-Y. Protective roles of HDL, apoA-I and mimetic peptide on endothelial function: Through endothelial cells and endothelial progenitor cells [J]. *International Journal of Cardiology*, 2009, 133(3): 286-292.
- [6] Jung C, Rafnsson A, Shemyakin A, et al. Different subpopulations of endothelial progenitor cells and circulating apoptotic progenitor cells in patients with vascular disease and diabetes [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 143(3): 368-372.
- [7] Javanmard SH, Gheisari Y, Soleimani M, et al. Effect of L-arginine on circulating endothelial progenitor cells in hypercholesterolemic rabbits [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 143(2): 213-216.
- [8] Yang X-F, Yin Y, Wang H. Vascular inflammation and atherogenesis are activated via receptors for PAMPs and suppressed by regulatory T cells [J]. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 2008, 5(2): 125-142.
- [9] Tan KT, Lip GYH. Imaging of the unstable plaque [J]. *International Journal of Cardiology*, 2008, 127(2): 157-165.
- [10] Liu P, Zhou B, Gu D, et al. Endothelial progenitor cell therapy in atherosclerosis: A double-edged sword? [J]. *Ageing Research Reviews*, 2009, 8(2): 83-93.
- [11] Zakynthinos E, Pappa N. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease [J]. *J Cardiol*, 2009, 53(3): 317-333.

(此文编辑 曾学清)