

冠心病患者 PCI 术前后循环内皮祖细胞变化

陈晓彬¹, 蒲晓群¹, 谢秀梅^{1,2}, 方叶青¹, 何晋¹, 李秀丽¹
(中南大学湘雅医院 1. 心血管内科; 2. 老干科, 长沙 410008)

[摘要] 目的:研究冠心病患者经皮冠脉内介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)术前后外周血中循环内皮祖细胞(endothelial progenitors cells, EPCs)形态、数量的变化。方法:选择冠心病患者65例和对照组30例,分别在PCI手术前、术后即刻和术后4d用密度梯度离心法从外周血获取单个核细胞,将其接种在人纤维连接蛋白包被培养板,用加入血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的RPMI-1640培养基培养细胞。用激光共聚焦显微镜初步鉴定DiL标记的乙酰化低密度脂蛋白和FITC标记的荆豆凝集素I双染色阳性细胞为EPCs,用流式细胞仪检测细胞表面抗原CD34和KDR;相差显微镜下分析细胞形态数量变化和集落形成单位的数量。结果:冠心病患者PCI术后EPCs数目较术前明显增加,术后4d开始下降;PCI术后即刻较术前有明显增强,术后4d有下降,但仍高于对照组,但PCI术前术后细胞集落形成单位的数量并无变化。结论:冠心病患者PCI手术可刺激EPCs数量的增加,在术后4d逐渐回到术前状态。

[关键词] 内皮祖细胞; 冠心病; 经皮冠脉内介入治疗; 细胞数量; 集落形成单位

[中图分类号] R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2008)05-0432-06

Change of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with coronary heart diseases before and after percutaneous coronary intervention

CHEN Xiao-bin¹, PU Xiao-qun¹, XIE Xiu-mei^{1,2}, FANG Ye-qing¹, HE Jin¹, LI Xiu-li¹

(1. Department of Cardiology; 2. Department of Geriatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the culture of endothelial progenitor cells (EPCs) from peripheral blood in patients with coronary heart diseases (CHD) before and after percutaneous coronary intervention (PCI), and to observe the cells shape and determine the cell number and proliferation activity. **Methods** Ninety-five patients were divided into a CHD group ($n = 65$) and a control group ($n = 30$). The mononuclear cells were isolated from peripheral blood of patients with CHD before, right after and 4 days after PCI by Ficoll-density centrifugation. The isolated cells were cultured in RPMI1640 medium supplemented with VEGF165 and bFGF. EPCs were characterized as adherent cells of double positive for DiL-acLDL uptake and FITC-UEA-I binding by direct fluorescent staining under a fluorescence microscope. The EPCs specific surface mark CD34 and KDR were assessed by fluorescence activated cell sorter analysis. The cell shapes were analysed and the number of colony-forming units (CFU) was counted by phase-contrast microscope. **Results** The number of EPCs reduced in patients with CHD before the PCI, but the cell number was significantly increased in patients

收稿日期 (Date of reception) 2007-08-07

作者简介 (Biography) 陈晓彬(1969-),男,湖南邵阳人,博士,主治医师,主要从事心血管介入诊疗。

通讯作者 (Corresponding author) 谢秀梅, E-mail: xyxiem@sina.com

基金项目 (Foundation items) 湖南省教育厅“十一五”重点学科资助项目。 This work was supported by Department of Education of Hunan Province of P. R China.

with CHD after the PCI, and the number reduced in patients with CHD 4 days after the PCI. However, the number of CFUs did not change in patients before and after the PCI. **Conclusion** PCI can increase endothelial progenitor cells in patients after the PCI; but 4 days after the PCI, this increase will not exist.

Key words: endothelial progenitor cells; coronary heart disease; number; colony form unit; percutaneous coronary intervention

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2008, 33(5):0432-06]

经皮冠脉内介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)已经成为治疗冠心病(coronary heart disease, CHD)的一种主要手段,尤其对急性心肌梗死的患者,早期、快速地进行 PCI 治疗,可以稳定有效的血运重建,减少心肌梗死面积及心脏泵功能损害、降低再梗死率和病死率。但是 PCI 术后再狭窄的问题仍未得到更好的解决。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是血管内皮细胞的前体细胞,是一群具有游走特征的、能够自我更新和增殖分化的细胞。EPCs 在血管新生和维持内皮功能的完整性方面有重要作用,并能影响内皮修复能力。通过 EPCs 来促进损伤血管的再内皮化,抑制内膜的过度增生成为防治 PCI 术后再狭窄的新思路,本研究针对行 PCI 术的 CHD 患者,观察 PCI 术前和术后外周血 EPCs 的变化。

1 对象与方法

1.1 对象 2006 年 7 月至 2006 年 12 月我院心内科收治的行选择性冠状动脉造影术的患者,经过筛选,CHD 组共 65 例纳入本研究,男性 44 例,女性 21 例,年龄 52 ~ 83 (60.3 ± 8.5) 岁,其中包括稳定性心绞痛 19 例,患者近 1 个月心绞痛发作特征无变化、无心电图动态改变、心肌酶 CK-MB 正常;不稳定性心绞痛 17 例;急性心肌梗死 18 例;陈旧性心肌梗死 11 例。另经冠状动脉造影排除 CHD 的人群作为对照组 30 例,其中男性 20 例,女性 10 例,年龄 50 ~ 76 (58.2 ± 7.8) 岁。所有采血者均排除近期外伤手术史、皮肤溃疡、炎症、肿瘤和血液系统疾病等影响 EPCs 的因素。

1.2 实验仪器 CO₂ 培养箱购自日本 ESPRC 公司;超净工作台购自美国 Forma Scientific 公司;倒置显微镜购自日本 Olympus 公司;低温高速离心机购自德国 Hermle 公司;流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司;酶标仪购自奥地利 Biocell

公司。

1.3 实验试剂 淋巴细胞分离液 Ficoll-Paque 购于天津灏洋生物公司。RPMI-1640 培养液购于广州 Invitrogen 公司。胎牛血清购于 Hyclone 公司。血管内皮生长因子(VEGF165)购于 R&D 公司。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购于 Peprotech 公司。人纤维连接蛋白购于 Chemicon 公司。DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-acLDL)购于 Molecular probes 公司。ADMA, FITC 标记荆豆凝集素 I (FITC-UEA-I), 四甲基偶氮唑蓝(MTT) 购于 Sigma 公司。PE-AC133, PE-KDR 购于德国 MACS; FITC-CD34, TRIZOL 购于晶美公司。

1.4 血标本采集 在患者知情同意后, CHD 患者行 PCI 手术前、术后即刻和术后 4 d 分别从外周采血 20 mL, 肝素钠抗凝, 4 h 内处理标本。

1.5 方法

1.5.1 临床资料 将对照组和 CHD 患者年龄、性别、吸烟情况、血压、血糖和血脂各项情况进行比较, CHD 患者的吸烟人数和高血压患者的数量和比例均较对照组高, 血脂单项比较中, 甘油三酯(TG)、胆固醇(CHO)、和低密度脂蛋白(LDL)与对照组比较均升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 CHD 患者及对照组基本临床资料

Tab. 1 Basic clinical data of patients with CHD and control subjects

项目	CHD 组 (n=65)	对照组 (n=30)
年龄(岁)	60.3 ± 8.5	58.2 ± 7.8
男性[例(%)]	44(68)	20(67)
吸烟[例(%)]	28(43)	12(40)
高血压[例(%)]	19(29)	11(18)
糖尿病[例(%)]	10(15)	7(11)
甘油三酯(mmol/L)	4.53 ± 0.95 *	3.16 ± 1.69
胆固醇(mmol/L)	1.77 ± 1.35 *	1.43 ± 1.02
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.76 ± 1.22 *	2.31 ± 0.94
高密度脂蛋白(mmol/L)	0.88 ± 0.42	0.94 ± 0.35

与对照组比较, * $P < 0.05$

1.5.2 细胞分离方法 取外周血 20 mL,注入已加肝素钠 500 U 的抗凝离心管,摇匀,4 h 内处理标本。采集到的外周血 20 mL 用 *D-Hank's* 液对倍稀释混匀。以 6:3 比例加入到淋巴细胞分离液。加入时小心与淋巴细胞分离液保持一界面,以 2 000 r/min 离心 20 min。离心后吸出灰白色的单个核细胞,小心吸取第二层乳白色液体于离心管中,并加以 *D-Hank's* 液洗细胞,再以 2 000 r/min 离心 3 次。用吸管吸取上清,加 RPMI-1640 培养基悬浮细胞,以 2×10^6 /mL 浓度接种在用已用 200 $\mu\text{g/L}$ 纤维连接蛋白包被的 6 孔板中。并加入含 10% 胎牛血清、VEGF 10 $\mu\text{g/L}$ 和 bFGF 2 $\mu\text{g/L}$ 培养细胞,第 4 天和第 7 天更换培养基及重新加入 VEGF 10 $\mu\text{g/L}$ 和 bFGF 2 $\mu\text{g/L}$ 。

1.5.3 细胞双荧光染色鉴定方法 取生长第 7 天的细胞,在培养的细胞中加入浓度为 2.4 mg/L DiI-acLDL,置于 5% CO_2 ,37 $^\circ\text{C}$ 孵育箱中孵育 12 h,然后用 2% 多聚甲醛固定细胞 30 min,*D-Hank's* 洗涤 2 次后,加入 FITC-UEA-I,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,荧光显微镜下观察。双染色阳性的细胞被认为是正在分化的 EPCs。在激光共聚焦显微镜下对每孔显微镜进行计数(计数 5 个随机选择的 200 倍视野的 EPC)。

1.5.4 流式细胞仪检测 EPCs 表面抗原表达

用 0.5% 胰酶消化培养 7 d 后的贴壁细胞 5 ~ 10 min,加入 10% 胎牛血清的 RPMI-1 640 培养基终

止消化,800 r/min 离心 5 min 后重悬细胞,台盼蓝计数,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 ~ 60 min,800 r/min 离心 5 min,PBS 洗涤后再离心 5 min 重悬于 EP 管,加入 FITC 标记的 CD34 抗体,阴性对照管不加一抗,室温孵育 20 min,或是加入 PE 标记的 KDR 抗体,4 $^\circ\text{C}$ 孵育 10 min,再离心 5 min 后洗涤 1 遍,加入 1% 多聚甲醛固定细胞、送流式细胞仪检测。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间计量资料比较用 *F* 检验,两组资料间比较用配对 *t* 检验,多组资料间比较用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 光镜下观察细胞形态 取 CHD 患者和对照组外周血 20 mL,分离后的单个核细胞接种于纤维连接蛋白包被的 6 孔板中,培养 7 d 后,细胞变大变圆,出现较多的小杆形细胞和梭形细胞(图 1)。图 1A 为对照组,细胞较大较圆,出现梭形细胞并连接成条索状;图 1B 为 CHD 组 PCI 手术前,细胞数目较对照组明显减少;图 1C 为 CHD 组 PCI 手术后,较 PCI 术前细胞数目明显增加,但以各种小细胞为主;图 1D 为 PCI 术后 4 d,细胞数目较 PCI 术后明显减少,但与术前比较,无明显差异。

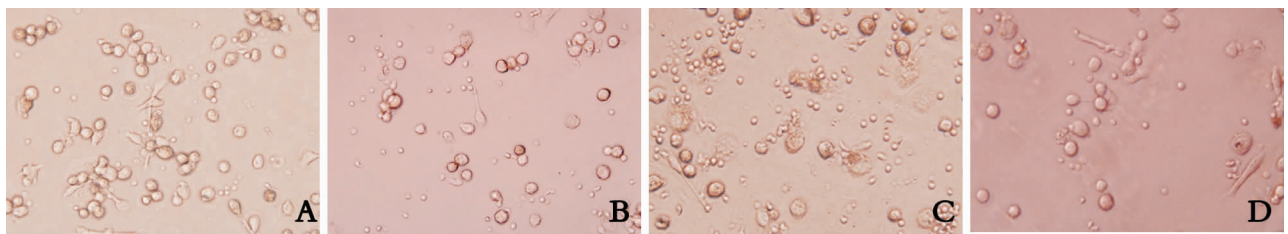


图 1 CHD 患者 PCI 治疗不同时期 EPCs 数量及形态的变化(200 \times)。A:正常对照组;B:CHD 患者 PCI 术前;C:CHD 患者 PCI 术后;D:CHD 患者 PCI 术后 4 d。

Fig. 1 Number and shape analysis of EPC before and after PCI in patients with CHD and control subjects(200 \times). A: Control group; B: CHD group before PCI; C: CHD group after PCI; D: CHD group 4 d after PCI.

2.2 荧光双染色细胞鉴定 分离获得的单个核细胞培养 7 d 后形成了梭形的内皮样细胞。用 acLDL-DiI 和 UEA-I 对细胞染色后,通过共聚焦显微镜鉴定,acLDL-DiI 和 UEA-I 双染色阳性细胞被认为是正在分化的 EPCs。图 2A 为对照组 EPCs,图 2B 为 CHD 患者 PCI 术前 EPCs,与对照组比较,双荧光染色阳性细胞明显减少;图 2C 为 CHD 患者 PCI 术后 EPCs,与术前比较,双荧光染

色阳性细胞明显增加;与对照组比较差别不明显;图 2D 为 CHD 患者 PCI 术后 4 d EPCs,较 PCI 术后已明显下降,与 PCI 术前比较差别不明显。

2.3 流式细胞仪检测细胞抗原表达 将分离获得的单个核细胞培养 7 d 后,消化贴壁细胞,用 FITC-CD34 和 PE-KDR 抗体标记细胞,用流式细胞仪分析,结果显示正常对照组表达 CD34 细胞占 $36.20\% \pm 1.72\%$,表达 KDR 占 $36.90\% \pm 2.53\%$,

CHD 患者 PCI 术前表达 CD34 细胞占 $18.7\% \pm 2.1\%$, 表达 KDR 占 $12.80\% \pm 4.18\%$, 与正常对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); PCI 术后表达 CD34 细胞占 $29.7\% \pm 3.4\%$, 表达 KDR 占 $29.40\% \pm 3.73\%$, 与术前比较差异有显著

性 ($P < 0.05$); PCI 术后 4 d 表达 CD34 细胞占 $21.1\% \pm 2.4\%$, 表达 KDR 占 $17.80\% \pm 3.61\%$, 与术前差异无统计学意义, 但与正常对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3)。

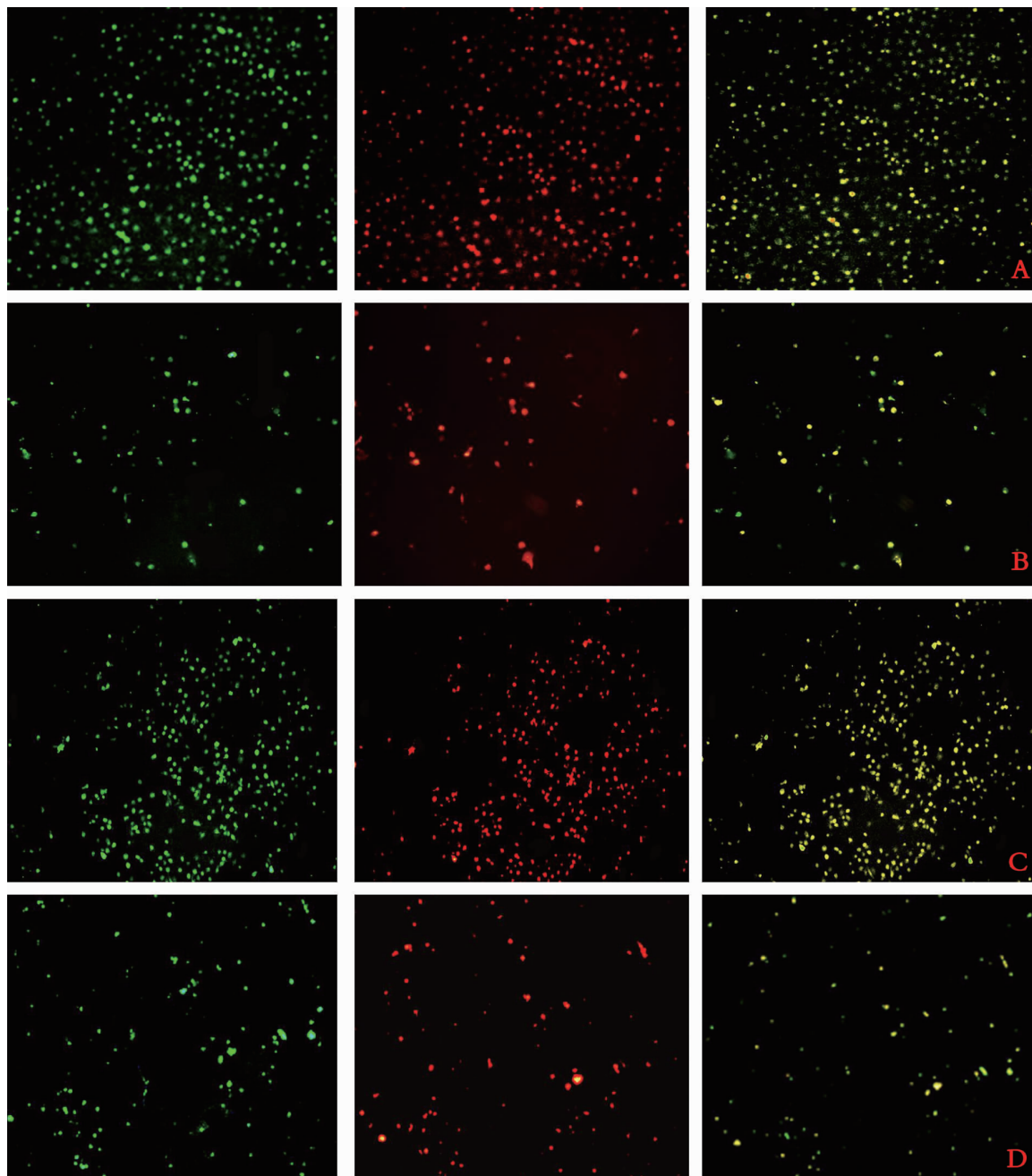


图 2 CHD 患者 PCI 治疗不同时期细胞荧光双染色细胞变化。A: 对照组; B: CHD 患者 PCI 术前; C: CHD 患者 PCI 术后; D: CHD 患者 PCI 术后 4 d。

Fig. 2 EPCs combined AcLDL/ UEA-I labeling before and after PCI in patients with CHD and control subjects. A: Control group; B: CHD group before PCI; C: CHD group after PCI; D: CHD group 4 d after PCI.

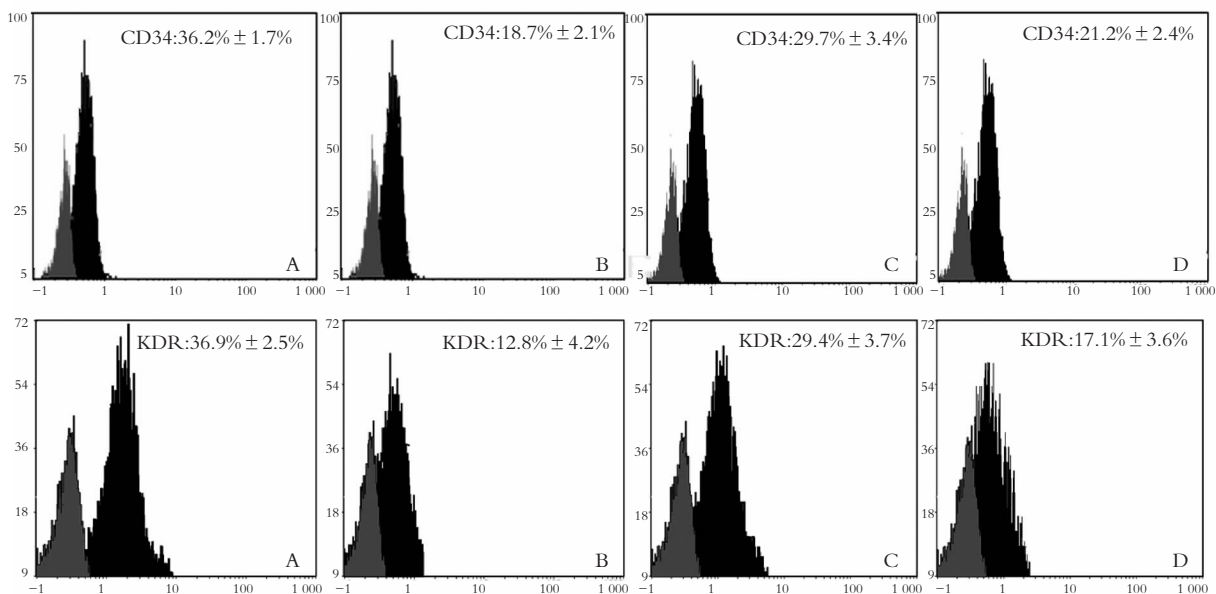


图3 CHD患者PCI治疗不同时期细胞表面抗原表达变化。A:对照组CD34和KDR表达;B:CHD患者PCI术前CD34和KDR表达;C:CHD患者PCI术后CD34和KDR表达;D:CHD患者PCI术后4d CD34和KDR表达。

Fig.3 Immunophenotype analysis of EPCs before and after PCI in patients with CHD and control subjects. A: Expression of CD34 and KDR in control group; B: Expression of CD34 and KDR in CHD group before PCI; C: Expression of CD34 and KDR in CHD group after PIC; D: Expression of CD34 and KDR in CHD group 4 d after PIC.

2.4 EPCs数量和集落形成单位数的比较

比较各组EPC数量,发现CHD患者PCI术前的EPCs数量与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$);在PCI术后,细胞数量明显增加,较术前相比差异有统计学意义($P < 0.05$),但与对照组比较数量差异不明显($P > 0.05$);PCI术后4d细胞数量开始下降,较PCI术前相比差异不明显但仍少于对照组($P < 0.05$)。集落形成单位数(CFU)计数结果显示,CHD患者PCI术前CFU数目少,而且细胞集落较小而稀疏,和对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$);PCI术后CFU有所增加,但与PCI术前相比差异无统计学意义($P > 0.05$),PCI术后4d,细胞CFU与术前相比无差异性,但仍少于对照组($P > 0.05$)(表2)。

表2 CHD患者PCI治疗不同时期EPCs数量及集落形成单位的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Number and CFU of EPC in patients with CHD before and after PCI ($\bar{x} \pm s$)

分组	EPCs数量	集落形成单位
对照组	56.7 ± 2.4	31.2 ± 1.7
PCI术前组	23.1 ± 1.8**	14.7 ± 2.5*
PCI术后组	49.1 ± 5.8#	21.6 ± 4.3
PCI术后4d组	30.7 ± 4.2*	16.1 ± 5.2*

与对照组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,** $P < 0.01$;与PCI术前比较,# $P < 0.05$

3 讨论

随着经皮冠状血管成形术(PCI)的发展,使各种血管狭窄及闭塞性病变的临床治疗有了新的突破,尤其在动脉硬化性狭窄及闭塞治疗方面发挥了巨大的作用。但是介入术后的再狭窄发生,进一步限制了闭塞性血管病变介入治疗的远期疗效,也是介入医学领域亟待研究解决的课题。PCI术中,随着冠脉内球囊扩张和/或支架植入,存在人为的球囊、支架破坏内皮细胞,冠脉内膜、中膜撕裂和粥样硬化斑块压缩、碎裂,导致胶原暴露和血小板聚集,致局部血栓形成,各种炎性因子的释放最终而导致血管重塑、内膜增厚而引起再狭窄^[1]。所以内皮损伤及功能失调是PCI术后再狭窄的一个重要病理生理步骤,逆转失调的内皮功能遂成为多种血管损伤性疾病防治的新趋势。

EPCs是一种多能干细胞,能循环、增殖并分化为血管内皮细胞,但尚未表达成熟血管内皮细胞的表面特征^[2]。EPCs不仅参与人胚胎血管生成,还可以分化为成熟内皮细胞参与出生后血管新生和内皮损伤后的修复过程^[3,4],EPC可以迁移到损伤局部分化成成熟的血管内皮细胞,还可以

通过旁分泌机制分泌出血管生成的物质^[5,6],如 VEGF(血管内皮生长因子), HGF(肝细胞生长因子), IGF-1(胰岛素样生长因子), bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)和 GSF(集落细胞刺激因子)等,从而促进 EPC 的增殖分化和促进血管新生。EPCs 定居于骨髓,它可以从骨髓释放,并在外周循环中运行,在损伤信号的诱导下迁移到损伤局部,分化为成熟内皮细胞,参与血管新生和修复。在本研究中发现,CHD 患者 PCI 手术前的 EPCs 数量和集落形成数较对照组明显降低,与 Vasa 等^[7]和 Hill 等^[8]研究一致,CHD 患者循环血中的 EPCs 数量下降了近 40%,迁移能力受损,并与 CHD 弗莱明翰(Framingham)危险因素积分成反向线性关系,而且高危者 EPCs 更易老化。但行 PCI 手术后,CHD 患者的 EPCs 数量明显的增加,通过双荧光染色和流式细胞仪都发现 EPCs 数量的增加,但在细胞的形态上主要表现为出现了较多的小细胞,而且这部分细胞变形和分化能力都较差,表现为较为幼稚的状态。同时由于 EPCs 的数量减少和黏附活性的降低,细胞的相互促进作用也减少,所以细胞集落数目明显减少,而且集落形成较少而稀疏,特别是 PCI 手术后虽然出现明显的数目增加,但集落形成的数目没有出现相应的增加,可能与 CHD 患者外周血 EPCs 的黏附和增殖活性低下有关。健康人外周 EPCs 含量是较少的,EPCs 主要定居于骨髓,且处于不同的分化阶段,当机体出现各种损伤信号时,由于 EPCs 能表达趋化因子受体 4(CXCR4),并相应于 SDF-1 或 VEGF 的信号传导,而从骨髓迁移到外周血,CXCR4 是基质细胞衍生因子-1(SDF-1)的特异性受体,促进 EPCs 归巢到缺血和损伤部位,从而促进缺血组织的血管新生和内膜修复。SDF-1/CXCR4 在内皮细胞形成血管的过程中发挥了非常重要的作用,同时还能受肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达,当机体出现血管内膜损伤时,TNF- α 的表达增加,能间接上调 CXCR4 的表达^[9],导致 EPCs 的趋化活性增加,数量增加。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)可通过促进细胞外基质重建动员 EPCs,促进干细胞因子(SCF)释放发挥作用^[10]。

血管内膜损伤后的修复和快速内皮化与抑制损伤血管的再狭窄是密切相关的,EPCs 在出生后血管新生和内皮损伤后的修复中具有重要意

义,但 CHD 患者 PCI 手术前后 EPCs 的变化及其机制还不是十分清楚,与 PCI 术后再狭窄形成的关系还有待更多的临床病例和更进一步的研究。

参考文献:

- [1] Jaster M, Schwimbeck P, Spencker S, et al. Randomized comparison of platelet-leukocyte aggregates and platelet in blood: heparin coated coiled wire stent implantation versus balloon angioplasty in acute myocardial infarction [J]. *Thromb Res*, 2003, 112(5-6): 285-289.
- [2] 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.
- [3] Walter D H, Rittig K, Bahlmann F H, et al. Statin therapy accelerate reendothelialization [J]. *Circulation*, 2002, 105(25): 3017-3024.
- [4] Suzuki T, Nishida M, Futami S, et al. Neendothelialization after peripheral blood stem cell transplantation in humans: a case report of a Tokaimura nuclear accident victim [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 58(2): 487-492.
- [5] Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines [J]. *Circulation*, 2001, 104(9): 1046-1052.
- [6] Rehman J, Li J, Orschell C M, et al. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte macrophages and secrete angiogenic growth factors [J]. *Circulation*, 2003, 107(8): 1164-1169.
- [7] 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]. *Circ Res*, 2001, 89(1): E1-7.
- [8] Hill J M, Zalos G, Halcox J P, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(7): 593-600.
- [9] Brühl H, Cohen C D, Linder S, et al. Post-translational and cell type-specific regulation of CXCR4 expression by cytokines [J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(11): 3028-3037.
- [10] Ohira S, Sasaki M, Harada K, et al. Possible regulation of migration of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by interaction of CXCR4 expressed in carcinoma cells with tumor necrosis factor-alpha and stromal-derived factor-1 released in stroma [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(4): 1155-1168.