

颈内动脉粥样硬化性脑梗死患者外周血内皮祖细胞的变化趋势

牛荣东 刘丽 周广喜 张建宁

【摘要】 目的 观察急性颈内动脉粥样硬化性脑梗死患者外周血内皮祖细胞数目的变化趋势。**方法** 分别于发病 24 h, 以及第 4、7、14 和 21 天时提取 30 例成年急性脑梗死患者外周血单个核细胞, 流式细胞术检测 CD34 和 CD133 表达水平, 计数内皮祖细胞数目。**结果** 不同处理组患者各观察时间点外周血内皮祖细胞数目比较, 差异均有统计学意义 ($P = 0.000$)。脑梗死后 24 h, 脑梗死组和颈动脉硬化组患者外周血内皮祖细胞数目均低于对照组 ($P = 0.000$); 脑梗死后第 7 天, 外周血内皮祖细胞数目减少至最低水平 ($P = 0.001$), 至第 21 天外周血内皮祖细胞数目接近颈动脉硬化组水平 ($P = 0.901$), 但仍低于正常值范围 ($P = 0.000$)。内皮祖细胞数目的变化与血小板计数之间不具有相关性 ($R^2 = 0.852, P = 0.895$)。**结论** 颈内动脉系统粥样硬化所致脑梗死患者外周血内皮祖细胞数目低于正常值范围, 且于急性期可能存在骨髓动员抑制, 同时需要消耗大量内皮祖细胞以进行损伤内皮的修复, 使得患者在急性期出现短暂性内皮祖细胞数目减少。

【关键词】 干细胞; 内皮细胞; 脑梗死; 动脉硬化; 颈内动脉; 流式细胞术

DOI: 10.3969/j.issn.1672-6731.2010.06.015

The trend in the changing of human peripheral blood endothelial progenitor cells after brain infarction due to carotid atherosclerosis NIU Rong-dong, LIU Li, ZHOU Guang-xi, ZHANG Jian-ning. Department of Neurology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin Neurological Institute, Tianjin 300052, China

Corresponding authors: ZHOU Guang-xi (Email: zhougx8888@126.com); ZHANG Jian-ning (Email: jianningzhang@hotmail.com)

【Abstract】 Objective To investigate the trend in the changing of peripheral blood endothelial progenitor cells (EPCs) in patients with acute brain infarction due to atherosclerosis of internal carotid artery. **Methods** Peripheral blood samples of 30 adults were collected on the first 24 h, and 4, 7, 14 and 21 d after acute brain infarction. Mononuclear cells were collected. The expressions of CD34 and CD133 were detected by flow cytometry, and the number of EPCs was counted. **Results** There was significant difference in the number of peripheral blood EPCs among 3 groups at different time points ($P = 0.000$, for all). The number of peripheral blood EPCs was significantly lower in brain infarction group and carotid atherosclerosis group at 24 h than that in normal control group ($P = 0.000$, for all). The number of peripheral blood EPCs reduced to the lowest level at 7 d in brain infarction group ($P = 0.001$) and nearly approached to the level of that in carotid atherosclerosis group at 21 d ($P = 0.901$), but was still lower than normal range ($P = 0.000$). There was no relationship between the number changes of EPCs with platelet count ($R^2 = 0.852, P = 0.895$) in the follow-up period. **Conclusion** Peripheral blood EPCs in patients with brain infarction due to carotid atherosclerosis is lower than normal level. At the acute stage of brain infarction, the bone marrow can be depressed, and amount of EPCs is consumed for repairing the injured endothelium. Therefore, transient decrease of EPCs is observed at acute stage of brain infarction.

【Key words】 Stem cells; Endothelial cells; Brain infarction; Arteriosclerosis; Carotid artery, internal; Flow cytometry

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(项目编号: 30772229)

作者单位: 300052 天津医科大学总医院, 天津市神经病学研究所, 教育部“中枢神经系统创伤修复与再生”重点实验室, 天津市“神经损伤变异与再生”重点实验室

通信作者: 周广喜 (Email: zhougx8888@126.com); 张建宁 (Email: jianningzhang@hotmail.com)

存在于循环血中的内皮祖细胞(EPCs)亚群,在体内外环境下均可分化为成熟的内皮细胞。越来越多的研究证据显示,内皮祖细胞有利于内皮损伤后的修复和血管新生,一旦释放至外周血可特征性地表达3种祖细胞分子标志物,分别为CD133、CD34和血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)^[1]。CD133主要表达于早期的内皮祖细胞,而且可以增强CD34的表达和修复能力。本研究旨在探讨急性期颈内动脉粥样硬化性脑梗死患者内皮祖细胞数目变化之趋势,以为临床早期修复血管内皮损伤提供实验基础。

对象与方法

一、观察对象

1. 纳入与排除标准 (1)颈部血管超声检查提示单侧颈内动脉存在2处及2处以上粥样硬化斑块。(2)首次缺血性卒中发作,而且发病24 h内经头部MRA检查证实同侧颈内动脉系统血管呈“串珠”样动脉粥样硬化表现,同时头部MRI和扩散加权成像(DWI)检查证实相应血管供血区呈高信号,即可诊断为急性期脑梗死。(3)经超声心动图检查排除心源性脑栓塞,经头部MRI检查排除皮质下白质病变。(4)实验室血常规检查排除感染性病变。(5)患者或家属签署知情同意书。

2. 一般资料 (1)脑梗死组:选择天津医科大学总医院神经内科2007年6-11月住院治疗且符合入组标准的颈内动脉粥样硬化性脑梗死患者30例,男性23例,女性7例;年龄44~85岁,平均(62.36±3.47)岁;病程14~28 d,平均(21±2) d;病变部位均位于一侧颈内动脉供血区。(2)颈内动脉粥样硬化组(颈动脉硬化组):30例入选者均为我院体格检查志愿者,经颈部血管超声检查提示存在颈内动脉系统粥样硬化,但头部MRI扫描未显示脑梗死和皮质

下白质脑病,且无他汀类药物治疗史及近期感染史。男性13例,女性17例;年龄45~80岁,平均(64.29±4.06)岁;均为长期慢性动脉粥样硬化患者。(3)正常对照组(对照组):30例志愿者均为我院同期接受体格检查者,男性19例,女性11例;年龄40~72岁,平均(57.47±4.87)岁。排除高血压、糖尿病病史及他汀类药物治疗史;否认近期感染史;颈部血管超声检查未发现颈内动脉粥样硬化性病变。由表1可见,3组受试者性别、年龄、既往史等资料,差异无统计学意义(均 $P>0.05$),均衡可比。

二、研究方法

1. 标本收集及细胞分离 据参考文献[2]所示方法,分别于患者发病24 h,以及第4、7、14和21天收集外周血标本2 ml,置含0.50 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝试管中,与等量0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH值7.20)混匀,缓慢加至淋巴细胞分离液(2:3)中,室温下密度梯度离心,离心半径15 cm、2400 r/min 高速离心20 min,分离、收集单个核细胞层(淋巴细胞分离液与血浆间的灰白色细胞层);加入2 ml 0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液混匀,室温下密度梯度离心10 min,弃上清液,重复2次即可获得单个核细胞。

2. 细胞标志物检测 (1)内皮祖细胞免疫荧光标记:取100 μl 单个核细胞滴至10 μl 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗体CD133、CD34(美国Sigma公司),同型抗体作为阴性对照,低速振荡30 s,避光反应10 min,加入2 ml 质量分数为0.5%胎牛血清缓冲液,室温下密度梯度法以离心半径15 cm、1500 r/min 离心10 min,弃上清液,滴加400 μl 质量分数为0.5%胎牛血清缓冲液混匀、过滤,制成单个核细胞悬液。(2)流式细胞术检测:依据文献[3]的方法,采用美国BD公司生产的流式细胞仪对经荧光抗体标记的单个核细胞悬液进行检测,每份标本共检测

表1 不同处理组受试者临床资料的比较

组别	样本例数	性别 例(%)		年龄 ($\bar{x}\pm s$, 岁)	高血压 例(%)	糖尿病 例(%)	他汀类药物治疗 例(%)	白细胞计数 ($\bar{x}\pm s, \times 10^9/L$)
		男	女					
对照组	30	19(63.33)	11(36.67)	57.47±4.87	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	7.71±2.33
脑梗死组	30	23(76.67)	7(23.33)	62.36±3.47	27(90.00)	25(83.33)	0(0.00)	8.76±2.24
颈动脉硬化组	30	13(43.33)	17(56.67)	64.29±4.07	26(86.67)	24(80.00)	0(0.00)	7.92±1.91
χ^2 或F值		2.194		0.423	7.800	0.144	4.775	209.000
P值		0.503		0.521	0.020	0.024	1.000	0.895

200 × 10³ 个细胞, 获得流式细胞散点图, 从中圈选单个核细胞散点区, 对所圈选的单个核细胞进行分析, 计数 CD34-FITC 和 CD133-FITC 双阳性细胞数目, 即为内皮祖细胞数目。

3. 其他实验室检查 采用日本 Sysmex 公司生产的 Sysmex-K4500 型血细胞计数仪进行常规白细胞和血小板计数。

4. 统计分析方法 本研究所得参数采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计数资料以相对数构成比 (%) 或率 (%) 表示, 采用 χ^2 检验。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 临床资料的比较行单因素方差分析; 不同处理组各时间点外周血内皮祖细胞数目的比较采用重复测量资料的方差分析, 两两比较行 q 检验或 LSD- t 检验; 两变量之间的关联性行偏相关分析。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、不同处理因素和测量时间对内皮祖细胞数目的作用及二者之间的交互作用

表 2 ~ 5 显示, 不同处理组受试者各时间点外周血内皮祖细胞数目比较, 差异均有统计学意义 ($P = 0.000$), 而且不同处理组与测量时间之间存在交互

作用 ($P = 0.000$)。表明, 不同处理组受试者外周血内皮祖细胞数目随测量时间的变化而改变, 且测量时间对外周血内皮祖细胞数目的影响亦随处理因素的不同而变化。脑梗死组和颈动脉硬化组患者发病 24 h, 外周血内皮祖细胞数目均低于对照组 (均 $P = 0.000$), 其中以脑梗死组患者内皮祖细胞数目减少最为显著 ($P = 0.001$); 发病第 14 天, 脑梗死组患者外周血内皮祖细胞数目逐渐增加并基本接近正常值范围 ($P = 0.774$), 而颈动脉硬化组患者仍低于对照组 ($P = 0.000$); 至发病第 21 天, 脑梗死组患者外周血内皮祖细胞数目与颈动脉硬化组基本一致, 组间差异无统计学意义 ($P = 0.901$)。颈动脉硬化组和对照组受试者各时间点外周血内皮祖细胞数目差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。脑梗死组患者外周血内皮祖细胞数目逐渐减少, 与发病 24 h 比较, 发病第 7 天降至最低水平 ($P = 0.001$), 至发病第 21 天时仍高于发病 24 h ($P = 0.001$)。

二、两变量之间关联性的偏相关分析

对内皮祖细胞与血小板计数进行相关分析显示, 急性脑梗死后血小板计数与内皮祖细胞数目之间呈现相同变化趋势, 但无显著相关关系 ($R^2 = 0.852, P = 0.895$)。

表 2 不同处理组各时间点外周血内皮祖细胞数目的比较 ($\bar{x} \pm s$, 个/200 × 10³ 个细胞)

组 别	样本例数	24 h	4 d	7 d	14 d	21 d
对照组(1)	30	77.39 ± 7.88	77.39 ± 7.88	77.39 ± 1.88	77.39 ± 7.88	77.39 ± 7.88
脑梗死组(2)	30	54.77 ± 8.00	54.21 ± 4.41	43.14 ± 3.55	73.00 ± 4.57	58.17 ± 5.33
颈动脉硬化组(3)	30	57.87 ± 7.09	57.87 ± 7.09	57.87 ± 7.09	57.87 ± 7.09	57.87 ± 7.09

表 3 不同处理组各时间点外周血内皮祖细胞数目比较的重复测量资料方差分析表

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
处理	3015.144	2	1507.557	142.109	0.000
测量时间	3387.257	5	564.543	96.435	0.000
处理 × 测量时间	3176.068	10	264.674	45.211	0.000
组间误差	286.429	27	10.608		
组内误差	948.371	162	5.854		

表 4 同一处理组不同时间点外周血内皮祖细胞数目的两两比较

组内 两两比	对照组		脑梗死组		颈动脉硬化组	
	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值
24 h : 4 d	0.673	1.000	0.986	0.837	2.179	1.000
24 h : 7 d	0.673	1.000	0.762	0.001	2.179	1.000
24 h : 14 d	0.673	1.000	0.891	0.945	2.179	1.000
24 h : 21 d	0.673	1.000	2.216	0.001	2.179	1.000

表 5 同一时间点不同处理组外周血内皮祖细胞数目的两两比较

组间 两两比	24 h		4 d		7 d		14 d		21 d	
	q 值	P 值	q 值	P 值	q 值	P 值	q 值	P 值	q 值	P 值
(1) : (2)	0.473	0.000	0.812	0.000	5.027	0.000	3.368	0.774	0.673	0.000
(1) : (3)	0.673	0.000	0.673	0.000	0.673	0.000	0.673	0.000	0.673	0.000
(2) : (3)	0.985	0.001	0.971	0.000	0.486	0.000	2.314	0.000	1.674	0.901

讨 论

颈内动脉是供应大脑的主要动脉,颈内动脉粥样硬化是缺血性脑血管病的主要病因之一。血管内皮功能异常是动脉粥样硬化的早期病理改变,且由于内皮功能受损可启动并加速颈内动脉粥样硬化的进程。然而,形成颈内动脉粥样硬化的危险因素如高血压、高脂血症及糖尿病等可通过释放炎症因子^[4-7],例如肿瘤坏死因子(TNF)、C-反应蛋白(CRP)等对内皮祖细胞的生物学功能产生影响,从而降低内皮祖细胞的储备能力。因此,本研究结果显示,在急性脑梗死发病初期内皮祖细胞数目明显低于正常值,可能即与上述影响因素有关。

脑梗死发生后即可在缺血区域形成新生血管,而这一过程需要内皮祖细胞分化成为内皮细胞。根据 Hess 等^[8]报告,骨髓可以释放内皮祖细胞至外周血以修复损伤的血管内皮,并参与血管新生。在正常情况下,内皮祖细胞在骨髓组织中处于休眠状态,经损伤等刺激因素的作用即动员进入体循环,到达需要的位置,并在该部位分化、增殖形成内皮细胞和新生血管^[9-16]。在本项研究中,我们发现在脑梗死急性期循环血中的内皮祖细胞数目持续减少并于发病第 7 天达最低值,表明这段时间内皮祖细胞被严重消耗,远远超过了骨髓对其的动员,减少的内皮祖细胞可能在血管内皮生长因子(VEGF)等细胞因子的作用下转化为内皮细胞^[17],参与缺血区及周围组织的微血管生成及侧支循环的建立。但本研究结果与 Yip 等^[18]的报告恰好相反,其原因难以解释,需通过进一步的动物实验或临床研究加以验证。内皮祖细胞在修复血管方面可能也受到另外一些细胞因子的调节。经过活化的血小板可以释放一些生长因子,例如纤维母细胞生长因子-2(FGF-2)、血管内皮生长因子和转化生长因子- β 1(TGF- β 1)^[19,20],这些细胞因子均可对损伤血管的内皮祖细胞提供营养^[21,22]。统计结果显示,急性脑梗死后内皮祖细胞水平与血小板计数呈现平行的动态变化,但未达到统计学意义,推测这一现象可能与脑梗死后应用抗血小板聚集药物使得血小板应激机制受到抑制有关。

本项研究结果提示:颈内动脉系统粥样硬化所致脑梗死时外周血内皮祖细胞数目低于正常值,且急性期可能存在骨髓动员受抑制而需消耗大量内

皮祖细胞进行损伤内皮的修复,使得患者在脑梗死急性期出现短暂性内皮祖细胞数目减少。

参 考 文 献

- [1] Xu QB. Endothelial progenitor cells in angiogenesis. *Sheng Li Xue Bao*, 2005, 57:1-6.
- [2] Hildbrand P, Cirulli V, Prinsen RC, et al. The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34+ progenitors. *Blood*, 2004, 104:2010-2019.
- [3] 郭新宾, 崔维韵, 刘庆国, 等. 人外周血内皮祖细胞分离培养与鉴定. *中国现代神经疾病杂志*, 2009, 9:159-163.
- [4] Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*, 2002, 105:546-549.
- [5] 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. *Circ Res*, 2001, 89:E1-7.
- [6] Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion incorporation into vascular structures. *Circulation*, 2002, 106:2781-2786.
- [7] Foresta C, Caretta N, Lana A, et al. Circulating endothelial progenitor cells in subjects with erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 2005, 17:288-290.
- [8] Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, et al. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke*, 2002, 33:1362-1368.
- [9] Hu Y, Davison F, Zhang Z, et al. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation*, 2003, 108:3122-3127.
- [10] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*, 2002, 109:337-346.
- [11] George J, Goldstein E, Abashidze S, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J*, 2004, 25:1003-1008.
- [12] Leone AM, Rutella S, Bonanno G, et al. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. *Eur Heart J*, 2005, 26:1196-1204.
- [13] Bonello P, Basire A, Sabatier F, et al. Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *J Thromb Haemost*, 2006, 4:979-981.
- [14] Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, et al. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation*, 2004, 109:2972-2975.
- [15] 胡湘蜀, 周东, 罗祖明. 内皮祖细胞对局灶性脑缺血大鼠血管内皮修复作用的实验研究. *中国现代神经疾病杂志*, 2009, 9:164-167.
- [16] 路敬叶, 周广喜, 牛荣东. 急性脑缺血大鼠外周血内皮祖细胞研究. *中国现代神经疾病杂志*, 2009, 9:280-283.
- [17] Kalka C, Tehrani H, Lundenberg B, et al. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70:829-834.
- [18] Yip HK, Chang LT, Chang WN, et al. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke*, 2008, 39:69-74.
- [19] Pintucci G, Froum S, Pinnell J, et al. Trophic effects of

platelets on cultured endothelial cells are mediated by platelet-associated fibroblast growth factor - 2 (FGF - 2) and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Thromb Haemost*, 2002, 88: 834-842.

[20] Pihusch V, Pihusch M, Penovici M, et al. Transforming growth factor beta - 1 released from platelets contributes to hypercoagulability in veno - occlusive disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Thromb Res*, 2005, 116: 233-240.

[21] Zhu C, Ying D, Zhou D, et al. Expression of TGF - beta1 in smooth muscle cells regulates endothelial progenitor cells migration and differentiation. *J Surg Res*, 2005, 125:151-156.

[22] Dimmeler S. Platelet - derived growth factor CC: a clinically useful angiogenic factor at last? *N Engl J Med*, 2005, 352:1815-1816.

(收稿日期:2010-08-25)

2011 年神经内科学术活动信息

日期	会议名称	重点内容	地点	联系单位或网址	联系人	邮政编码
2011 年 4 月 21-25 日	中华医学会第八次全国脑电图与癫痫诊治进展高级讲授班暨学术研讨会	(1) 脑电图与神经电生理学研究。(2) 癫痫基础与临床研究	济南	山东省济南市文化西路 107 号山东大学齐鲁医院神经内科	刘学伍	250012
2011 年 4 月下旬	第六届全国解剖与临床学术研讨会(头颈部专题)	(1) 颅脑部:与神经内外科有关的临床与解剖学研究。(2) 颅面部:与眼科和耳鼻喉咽喉头颈外科有关的临床与解剖学研究。(3) 颌面部:与口腔颌面外科和整形外科有关的临床与解剖学研究。(4) 颅底部:与颅底外科有关的前颅底、鞍区、中颅底、侧颅底及颅颈交界区的临床与解剖学研究。(5) 颅颈交界区结构及病变的断层解剖学和影像学	青岛	安徽省蚌埠市长淮路 287 号《解剖与临床》编辑部	张萍	233004
2011 年 5 月 25-27 日	炎性脱髓鞘性周围神经病与包涵体肌炎(病)诊治新进展学习班暨学术研讨会	炎性脱髓鞘性周围神经病和包涵体肌炎(病)的基础与临床研究新进展及临床诊治应用技巧	太原	北京市东城区东四西大街 42 号《中华神经科杂志》编辑部	郑晴	100710
2011 年 6 月 3-5 日	2011 年天坛·国际神经外科麻醉论坛	颅脑创伤与麻醉、脑血管病与麻醉、神经功能监测与麻醉、唤醒麻醉技术、神经外科麻醉恢复期管理,以及脑保护等专题	北京	北京市朝阳区小营路 25 号 房地产业大厦 606 室	董老师	100101
2011 年 6 月 23-26 日	第九届全国神经心理学与行为神经病学高级讲授班暨学术研讨会	记忆障碍、轻度认知损害和痴呆的神经心理学研究;言语障碍;神经系统疾病伴发抑郁、焦虑和精神障碍;失用、失认和失计算;空间障碍;大脑半球功能不对称性研究;各种神经心理学测验、量表及其评价;言语障碍和认知损害的康复、治疗、评价;认知功能的 fMRI 研究;其他相关神经心理学与行为神经病学研究等	昆明	北京市东城区东四西大街 42 号《中华神经科杂志》编辑部	高蓓蕾	100710
2011 年 6 月 24-26 日	天坛国际脑血管病会议 2011'	脑卒中相关的基础与临床研究;关于脑卒中急性期治疗和二级预防研究、神经影像学、脑卒中后抑郁及认知功能障碍的管理等	北京	http://www.rhammer.cn	刘丽萍 秦海强	
2011 年 7 月 15-17 日	第二届全国睡眠科学技术大会	睡眠基础研究及其关键技术新进展;睡眠临床诊治新进展及趋势;睡眠疾病与神经科学、呼吸、精神心理、心身医学、行为医学、流行病学、传统中医药;生物医学工程、睡眠中心规范化建设与临床质量控制、睡眠类药物器械的安全和技术评价等	北京	北京市海淀区阜成路 28 号 航医大厦 613 室	吴苏伟 王燕	100038