文章编号:1000-5404(2013)20-2187-04

论著

急性缺血性脑卒中患者外周血中内皮祖细胞的动态变化

王 妮[1],陈 慧[1],郭慧娟[1],王 健[1],郑 敏[2] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院神经内科[1];400016 重庆,重庆医科大学干细胞及组织工程实验室[2])

[摘要] **目的** 动态测定急性缺血性卒中(acute ischemic stroke,AIS)患者外周循环中内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)的数量,并探讨其可能的动员机制。**方法** 发病后12 h入院的71例AIS患者,采用流式细胞仪测定外周血EPCs含量,以CD133/KDR作为EPCs表面标记。时间点分别为病后第1、7、14、21天。同时采用酶联免疫吸附法测定血浆基质细胞衍生因子-1(serum stromal cell-derived factor-1,SDF-1)的浓度。对照组包括42例同期招募的健康志愿者。**结果** AIS患者基线EPCs水平低于对照组[(0.022±0.013) *vs* (0.051±0.020),$P<0.01$]。血压、甘油三酯、低密度脂蛋白和空腹血糖与EPCs水平呈负性相关($P<0.01$)。收缩压和低密度脂蛋白是EPCs基线水平的独立预测因素。AIS后第7天循环EPCs数量增加,第14天达高峰,第21天开始下降。血浆SDF-1浓度呈类似变化。此外,EPCs变化值($EPCs_{14d}$-$EPCs_{1d}$)与脑梗死体积($r=0.708$,$P<0.01$)或第14天的SDF-1浓度相关($r=0.774$,$P<0.01$)。**结论** AIS患者的EPCs基线水平可能反映累积的血管内皮损伤,而AIS后外周血EPCs数量增加来自于EPCs动员,其机制可能与SDF-1表达上调有关。

[关键词] 急性缺血性卒中;内皮祖细胞;动员;基质细胞衍生因子-1
[中图法分类号] R322.12;R446.11;R743.3 [文献标志码] A

Dynamic changes of endothelial progenitor cells in peripheral blood of patients with acute ischemic stroke

Wang Ni[1], Chen Hui[1], Guo Huijuan[1], Wang Jian[1], Zheng Min[2] ([1]Department of Neurology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Laboratorg of Stem cells and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To demonstrate the mobilization of endothelial progenitor cells (EPCs) after acute ischemic stroke (AIS) and investigate its possible mechanism. **Methods** A total of 71 patients with AIS were examined at days 1, 7, 14 and 21 after stroke onset. Forty-two healthy controls were also examined. Circulating EPCs were defined by the surface markers CD133/KDR and analyzed by flow cytometry. Serum stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) concentrations were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Baseline EPCs level was significantly lower in patients with AIS than in control subjects (0.022±0.013 *vs* 0.051±0.020, $P<0.01$). Blood pressure, triglyceride, low-density lipoprotein (LDL) and fasting blood sugar were negatively correlated with EPCs levels ($P<0.01$). Systolic blood pressure and LDL remained independent predictors of baseline EPCs levels. The number of circulating EPCs increased on day 7 after AIS, reached peak level on day 14 and started to decrease on day 21. The concentration of SDF-1 had similar changes. The increment of EPCs (absolute difference between the number of EPCs on day 14 and admission) was correlated with the infarct volume ($r=0.708$; $P<0.01$) and SDF-1 concentration on day 14 ($r=0.774$, $P<0.01$). **Conclusions** Baseline EPCs level in patients with AIS may reflect the cumulative vascular endothelial damage, while increase of circulating EPCs results from the mobilization of EPCs in response to stroke stress. The mechanism may be associated with up-regulation of SDF-1 expression.

[**Key words**] acute ischemic stroke; endothelial progenitor cells; mobilization; stromal cell-derived factor-1

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31100985) and a the Project of Corresponding author, Wang Jian, E-mail: jan. wx@163. com. Chongqing Municipal Health Bureau (2009-2-207).

[基金项目] 国家自然科学基金(31100985);重庆市卫生局课题(2009-2-207)
[通信作者] 王 健,E-mail:jian. wx@163. com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130428.0819.001.html(2013-04-28)

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)作为一组骨髓来源的干细胞,存在于外周血,可分化为内皮细胞,有助于修复损伤的血管内皮[1-2]。在正常的情况下,EPCs的数量相对较少并保持动态平衡。一些临床研究显示有血管危险因素者EPCs水平偏低[3-5]。但是,当组织损伤或缺血时,EPCs可从骨髓动员到外周血,从而促进受损血管内皮的修复[6-8]。有研究表明,组织缺血后基质细胞衍生因子-1(serum stromal cell-derived factor-1, SDF-1)的表达明显上调,而SDF-1-CXCR轴在干细胞归巢和新生血管形成中发挥重要作用[9-10]。目前有关急性缺血性卒中(acute ischemic stroke, AIS)患者循环中EPCs数量及SDF-1浓度的动态变化的研究较少[8]。在本研究中,我们同时测定了AIS患者循环EPCs数量以及血浆SDF-1浓度,并对两者间相关性进行了分析,旨在了解AIS后患者循环EPCs数量增加的机制是否与SDF-1表达上调有关。

1 资料与方法

1.1 研究对象

于2012年6月到12月连续纳入在重庆医科大学附属第二医院神经内科住院的AIS患者共106例,所有患者为首次发病,且位于大脑中动脉区域的非腔隙性脑梗死,发病时间<12 h。入院后均通过脑MRI扫描证实诊断。排除标准:外伤、炎症、溃疡、肝功能异常、血液系统疾病、肾功能不全、恶性肿瘤、冠状动脉综合征及心肌梗死病史;发病前2个月使用过他汀类药物或促红细胞生成素。共有20例患者被排除,另有15例失访,最后共有71例患者进入研究分析。对照组来源于通过院内公告周期招募的42例年龄和性别匹配的健康志愿者。本研究方案获重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准。所有患者或家属需签署知情同意书。

1.2 临床变量

根据中国脑血管病指南,所有的患者入住本院神经内科卒中单元接受治疗。收集患者脑血管疾病危险因素,包括年龄、吸烟、高血压、糖尿病、冠心病、血脂异常等。入院后的检查包括血常规、凝血功能、生化以及心电图、超声心动图、胸片、常规脑CT和MRI等影像学检查。根据TOAST卒中分型标准[11],71例AIS患者中,45例为大动脉粥样硬化型,16例为心源性脑卒中,10例病因不确定。所有患者未接受溶栓治疗。

1.3 外周血EPCs的测定

采用$CD133^+$/KDR^+作为循环EPCs的标记[12]。分别于第1天(9.4±2.8)h,7、14 d和21 d抽取2 mL肘前静脉血,加入含3.8%肝素缓冲液中。然后采用梯度离心分离单个核细胞,用磷酸盐缓冲溶液洗涤2次后,与1 mL封闭缓冲液在4 ℃孵育30 min。将单个核细胞与20 μL FITC标记的鼠抗人CD133 IgG1单克隆抗体(Biolegend公司,美国),以及10 μL PE标记的鼠抗人KDR IgG1单克隆抗体(R&D公司,美国)避光室温下孵育30 min。对照组加入10 μL FITC和10 μL PE标记的鼠抗人IgG1抗体。单核细胞在染色后,用1%的多聚甲醛固定。使用荧光激活细胞筛选器(FACS Calibur;贝克曼)进行双色流式细胞仪定量分析。每个样品中收集50 000个细胞。以$CD133^+$/KDR^+细胞的百分比来衡量循环EPCs的水平,EPCs变化值定义为第14天和入院时EPCs数量之间的差异。

1.4 酶联免疫吸附法测定外周循环的SDF-1浓度

抽取肘前静脉血2 mL(时间点同1.3),加入含3.8%肝素缓冲液中。离心(4 ℃, 3 000 r/min)15 min后,收集上清液,置于-70 ℃冰箱保存待测。严格按照SDF-1 ELISA试剂盒(R&D系统)说明书要求测定SDF-1浓度。该方法的灵敏度为20 pg/mL,在100~20 000 pg/mL范围呈良好线性关系。

1.5 脑梗死体积的计算

所有患者于发病后(39±16)h内行MRI检查。根据Pullicino[13]公式:脑梗死体积(mL)=长×宽×MRI扫描阳性层数×π/6手工计算脑梗死体积,运算3次求其平均值。所有梗死体积的计算由不了解患者临床及实验室检查结果的神经病学医师负责完成。

1.6 统计学分析

采用SPSS 11.5统计软件,用百分比来表示分类变量。根据是否符合正态分布使用$\bar{x}\pm s$或中位数来表示连续变量。t检验用于比较各组间的连续变量。两变量间相关性采用基于秩次的Spearman等级相关分析;主要影响因素的筛选采用多因素逐步回归分析。

2 结果

2.1 临床数据

患者的人口学及临床资料见表1。AIS组与对照组之间年龄、性别、高密度脂蛋白无统计学差异($P>0.05$);AIS组收缩压、舒张压、血糖、总胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白等均显著高于正常对照组($P<0.01$)。

2.2 循环EPCs的基线水平

AIS组循环EPCs基线水平明显低于对照组[(0.022±0.013) *vs* (0.051±0.020), $P<0.01$]。基于秩次的Spearman等级相关分析显示,AIS组EPCs的基线水平与血压(收缩压和舒张压)、甘油三酯、低密度脂蛋白、空腹血糖等危险因素呈负相关(r分别为-0.953、-0.864、-0.545、-0.623、-0.587)。多因素逐步回归分析显示,收缩压与低密度脂蛋白是AIS患者EPCs基线水平的独立影响因素($P<0.01$)。

2.3 AIS患者的循环EPCs的动态改变

AIS患者循环EPCs数量于发病后第7天增加(0.053±0.019),第14天达高峰(0.110±0.030),第21天呈下降趋势(0.095±0.021)。AIS患者第7、14、21天循环EPCs数量与第1天比较有统计学差异($P<0.05$)。第1天或第14天的梗死体积与EPCs数量之间缺乏相关性($r=0.147$, $P>0.05$),但梗死体积与EPCs变化值之间存在相关性($r=0.708$, $P<0.01$)。

表1 AIS组和健康对照组的基线特征

组别	n	年龄(岁)($岁,\bar{x}\pm s$)	男性[例(%)]	NIHSS评分($分,\bar{x}\pm s$)	卒中亚型[例(%)]		
					动脉粥样硬化型	心源性脑栓塞	病因不确定
AIS组	71	65.1±10.2	43(60.6)	12.2±3.7	45(63.4)	16(22.5)	10(14.1)
健康对照组	42	64.4±9.6	24(57.1)	–	–	–	–

组别	脑血管病的危险因素					
	吸烟[例(%)]	高血压[例(%)]	糖尿病[例(%)]	冠心病[例(%)]	高脂血症[例(%)]	体质量指数($\bar{x}\pm s$)
AIS组	28(39.4)	55(77.5)	39(54.9)	18(25.4)	18(25.4)	24.2±3.2[a]
健康对照组	14(19.7)	–	–	–	–	21.7 ± 2.7

组别	实验室检查及生命体征							
	总胆固醇(mmol/L,$\bar{x}\pm s$)	高密度脂蛋白(mmol/L,$\bar{x}\pm s$)	低密度脂蛋白(mmol/L,$\bar{x}\pm s$)	甘油三酯(mmol/L,$\bar{x}\pm s$)	空腹血糖(mmol/L,$\bar{x}\pm s$)	收缩压(mmHg,$\bar{x}\pm s$)	舒张压(mmHg,$\bar{x}\pm s$)	白细胞($\times10^9$/L,$\bar{x}\pm s$)
AIS组	6.58±1.08[a]	1.28±0.36	3.32±0.68[a]	1.97±0.26[a]	8.79±1.78[a]	149.0±13.53[a]	89.70±10.69[a]	5.7±1.4[a]
健康对照组	4.22±0.85	1.31±0.32	2.69±0.68	1.51±0.18	5.03±0.56	115.65±5.16	75.80±5.45	7.8±2.8

a: $P<0.01$,与健康对照组比较

2.4 AIS患者血浆中SDF-1的动态变化

AIS后第1天,AIS组和对照组血浆中的SDF-1水平之间的差异缺乏统计学意义[(2 804.35±290.20) *vs* (3 124.70±356.53),$P>0.05$]。AIS后第7天,血浆SDF-1水平明显增加(3 414.75±436.47),第14天到达高峰(4 822.95±726.40),第21天开始降低(4 276.8±476.03)。AIS患者第7、14、21天血浆SDF-1水平与第1天比较有统计学差异($P<0.05$)。进一步的分析显示,第14天的血浆SDF-1浓度与EPCs变化值之间存在相关性($r=0.774$,$P<0.01$)

3 讨论

本研究中,我们采用流式细胞仪测定AIS患者循环EPCs数量,结果发现,AIS患者循环基线EPCs水平明显低于健康对照组,然而,EPCs能被动员到外周循环中,其机制与SDF-1的表达上调相关。

单因素分析显示,循环EPCs的数量与收缩压、舒张压、甘油三酯、低密度脂蛋白及空腹血糖等呈负相关。多元逐步回归分析则显示,收缩压和低密度脂蛋白是AIS患者EPCs基线水平的独立影响因素,结果与文献[14-15]报道类似。一些研究发现心血管疾病、外周动脉粥样硬化及卒中患者的EPCs水平明显降低[7]。同时,一些心血管事件危险因素如高胆固醇血症、吸烟、糖尿病及高血压等均可引起EPCs数量减少,且循环EPCs水平与累积的心血管危险因素呈负性相关[16]。危险因素引起EPCs减少的机制目前不清楚,推测可能与内皮修复能力的"消耗性丢失"有关[17-18]。因此,循环EPCs水平是内皮功能的标志,低EPCs水平可独立预测心血管事件的风险。本研究中AIS患者基线EPCs水平明显低于对照组,也提示患者发生卒中前其动脉硬化病变和累积的血管内皮损伤。

对AIS患者EPCs水平的动态测定结果显示,AIS后第7天循环EPCs明显增加,第14天达到高峰,维持约3周后才出现下降趋势,提示AIS后大量EPCs从骨髓动员后进入外周循环中。我们同时对血浆SDF-1浓度进行了动态测定,结果发现SDF-1的动态变化与EPCs类似。而且,AIS后第14天血浆SDF-1水平与脑梗死体积相关。有趣的是,尽管AIS后第1天或第14天时的EPCs水平与AIS第14天时的SDF-1水平或梗死体积彼此缺乏相关性,但EPCs变化值($EPCs_{14d}-EPCs_{1d}$)与脑梗死体积或第14天的SDF-1浓度明显相关。SDF-1是一个属于CXCR趋化因子家族的化学小分子,SDF-1对表达CXCR4的骨髓间质干细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)具有强大的化学吸引作用,在外周循环与骨髓之间的BMSC转运(动员和归巢)中起重要作用[19]。研究发现,AIS后脑组织SDF-1的表达明显增加[9,20],大量SDF-1被释放到外周循环中,通过SDF-1-CXCR4轴吸引EPCs进入外周血,因此,我们的结果提示,AIS患者循环EPCs水平增加可能是对脑缺血的应激反应。梗死体积越大,SDF-1的表达和释放更多,EPCs从骨髓中动员则更多。

从骨髓动员的EPCs有助于受损血管的修复和神经功能改善[21],一些临床研究证实EPCs的水平影响缺血性脑损伤的严重性。一项研究发现,发病后第1天EPCs水平较高者其梗死体积较小,和程度较小的梗死体积扩大[22]。另一项临床研究发现,发病后48 h循环EPCs水平是预后的独立预测因子,较低的循环EPCs水平可独立预测严重的神经功能缺失[8]。最近,Fan等[23]的实验研究发现EPCs移植可显著降低缺血

性梗死体积,并促进神经血管修复,改善长期的神经行为学后果。这些研究表明,EPCs 对减少梗死体积和改善卒中预后有重要意义。从骨髓中动员更多的 EPCs 入外周循环,吸引更多的 EPCs 到缺血脑组织,可能为今后脑卒中的一个重要策略。

总之,本研究结果显示:一方面,AIS 患者基线循环 EPCs 水平降低,反映了总体或累积的血管内皮损害;另一方面,作为 AIS 后的应激反应,EPCs 从骨髓中大量动员,促进缺血脑组织中新生血管形成,其动员机制可能与 SDF-1 的表达上调有关。

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(5302): 964-967.

[2] Kaneko Y, Tajiri N, Shinozuka K, *et al*. Cell therapy for stroke: emphasis on optimizing safety and efficacy profile of endothelial progenitor cells[J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(25): 3731-3734.

[3] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, *et al*. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes[J]. N Engl J Med, 2005, 353(10): 999-1007.

[4] Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, *et al*. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair[J]. Circulation, 2005, 111(22): 2981-2987.

[5] Navarro-Sobrino M, Rosell A, Hernandez-Guillamon M, *et al*. Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of endothelial progenitor cells after ischemic stroke[J]. Microvasc Res, 2010, 80(3): 317-323.

[6] Griese D P, Ehsan A, Melo L G, *et al*. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy[J]. Circulation, 2003, 108(21): 2710-2715.

[7] 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.

[8] Yip H K, Chang L T, Chang W N, *et al*. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke[J]. Stroke, 2008, 39(1): 69-74.

[9] De-Falco E, Porcelli D, Torella A R, *et al*. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells[J]. Blood, 2004, 104(12): 3472-3482.

[10] Ratajczak M Z, Reca R, Wysoczynski M, *et al*. Modulation of the SDF-1-CXCR4 axis by the third complement component (C3)--implications for trafficking of $CXCR4^+$ stem cells[J]. Exp Hematol, 2006, 34(8): 986-995.

[11] Adams H P Jr, Bendixen B H, Kappelle L J, *et al*. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment[J]. Stroke, 1993, 24(1): 35-41.

[12] Khan S S, Solomon M A, McCoy J P Jr. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2005, 64(1): 1-8.

[13] Pullicino P, Nelson R F, Kendall B E, *et al*. Small deep infarcts diagnosed on computed tomography[J]. Neurology, 1980, 30(10): 1890-1896.

[14] Zhou W J, Zhu D L, Yang G Y, *et al*. Circulating endothelial progenitor cells in Chinese patients with acute stroke[J]. Hypertens Res, 2009, 32(4): 306-310.

[15] Roberts N, Jahangiri M, Xu Q. Progenitor cells in vascular disease[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(3): 583-591.

[16] 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-E7.

[17] Chen J Z, Zhang F R, Tao Q M, *et al*. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia[J]. Clin Sci (Lond), 2004, 107(3): 273-280.

[18] Umemura T, Soga J, Hidaka T, *et al*. Aging and hypertension are independent risk factors for reduced number of circulating endothelial progenitor cells[J]. Am J Hypentens, 2008, 21(11): 1203-1209.

[19] Hill W D, Hess D C, Martin-Studdard A, *et al*. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2004, 63(1): 84-96.

[20] Borlongan C V, Glover L E, Tajiri N, *et al*. The great migration of bone marrow-derived stem cells toward the ischemic brain: therapeutic implications for stroke and other neurological disorders[J]. Prog Neurobiol, 2011, 95(2): 213-228.

[21] Ding D C, Shyu W C, Lin S Z, *et al*. The role of endothelial progenitor cells in ischemic cerebral and heart diseases[J]. Cell Transplant, 2007, 16(3): 273-284.

[22] Bogoslovsky T, Chaudhry A, Latour L, *et al*. Endothelial progenitor cells correlate with lesion volume and growth in acute stroke[J]. Neurology, 2010, 75(23): 2059-2062.

[23] Fan Y, Shen F, Frenzel T, *et al*. Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice[J]. Ann Neurol, 2010, 67(4): 488-497.

(收稿:2013-03-25;修回:2013-04-16)

(编辑 王小宴)