文章编号:1000-5404(2014)15-1623-03

论著

# 重型颅脑损伤后外周血内皮祖细胞的变化及与预后的关系

冉 毅[1],陈琰琰[2],梅华锋[1],胡胜利[2],霍建宏[1],熊浩锋[1],程 强[1],冯 华[2] (401320 重庆,重庆市巴南区人民医院神经外科[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经外科研究所,全军神经创伤防治重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨重型颅脑外伤后,外周血中内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)的变化及与预后的关系。**方法** 选择2013年8月至2014年1月重庆市巴南区人民医院神经外科收治的10例重型颅脑损伤并行常规保守治疗且受伤时无肢体损伤(目的是为排除其他损伤导致的外周血EPCs变化)的患者作为病例组,其中男性为7例,女性为3例,年龄19~62(40.8±15.0)岁。选择同期10例健康者作为对照,年龄29~66(38.4±11.4)岁。分别在患者入院后1、4、7、14 d收集其外周血,通过流式细胞术检测其EPCs的百分率,分析EPCs的变化规律及与GCS评分改善的关系。**结果** 与对照组相比,重型颅脑损伤循环EPCs含量从第1~4天逐渐降低,从第4~7天逐渐升高,第14天逐渐恢复至正常水平($P<0.05$,$P<0.01$)。重型颅脑外伤患者外周血的EPCs含量分别在第7天($r=0.57$,$P<0.05$)和第14天与GCS评分差呈正相关性($r=0.68$,$P<0.05$)。**结论** 重型颅脑损伤后循环血中EPCs的含量与预后有关。

[关键词] 重型颅脑损伤;内皮祖细胞;GCS评分
[中图法分类号] R329.2; R446.113; R651.15 [文献标志码] A

# Correlation of percentage of endothelial progenitor cells in peripheral blood with prognosis in severe craniocerebral injury

Ran Yi[1], Chen Yanyan[2], Mei Huafeng[1], Hu Shengli[2], Huo Jianhong[1], Xiong Haofeng[1], Cheng Qiang[1], Feng Hua[2] ([1]Department of Neurosurgery, Banan District People's Hospital, Chongqing, 401320; [2]Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the change of endothelial progenitor cells (EPCs) in peripheral blood of patients with severe craniocerebral injury and its prognostic significance. **Methods** A total of 10 patients with severe craniocerebral injury admitted in Banan District People's Hospital were enrolled in this study. Their peripheral blood samples were harvested at the 1st, 4th, 7th and 14th days after admission. The percentage of EPCs was detected by flow cytometry. The relationship of change rule of EPCs percentage with Glasgow coma scale (GCS) score was analyzed. **Results** Compared with blank group, the percentage of EPCs in peripheral blood was reduced at the 1st and 4th days, and gradually increased at the 7th day, and then returned to normal level at the 14th day ($P<0.05$, $P<0.01$). There were positive correlation of the percentage of EPCs at the 7th day ($r=0.57$, $P<0.05$) and 14th day ($r=0.68$, $P<0.05$) with GCS score. **Conclusion** There is positive correlation between the percentage of EPCs and prognosis of severe craniocerebral injury.

[**Key words**] severe craniocerebral injury; endothelial progenitor cells; Glasgow coma scale

Supported by the General Program of Medical Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2013-2-219). Corresponding author: Cheng Qiang, E-mail: wai3chengqiang@126.com; Feng Hua, E-mail: fenghua8888@aliyun.com

重型颅脑外伤有较高的致残率和病死率。在强调颅脑外伤急诊救治的同时,脑外伤后脑组织再生和神经功能的恢复已成为神经外科的研究热点。脑外伤早期改善脑血供对减少神经元坏死、促进神经功能恢复至关重要。1997年Asahara等[1]首次从人外周血中发现内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs),其作为血管内皮细胞的前体参与了新生血管的形成,在缺血性疾病和创伤愈合中有重要的促进恢复作用,具有广阔的临床运用前景。本研究揭示了脑外伤患者外周血中EPCs的变化与预后的相关性,旨在为EPCs的临床运用提供进一步的理论依据。

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研项目面上项目(2013-2-219)
[通信作者] 程 强,E-mail: wai3chengqiang@126.com
冯 华,E-mail:fenghua8888@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140625.0937.004.html(2014-06-25)

## 1 资料与方法

### 1.1 主要材料

FITC标记的CD34抗体及其同型对照、PE标记的CD309(VEGFR-2/KDR)抗体及其同型对照(美国BD公司),APC标记的CD133抗体及其同型对照(德国美天旎公司),人外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋生物公司),流式细胞仪(美国BD公司)。

### 1.2 研究对象

选择2013年8月至2014年1月重庆市巴南区人民医院神经外科收治的10例重型颅脑损伤并行常规保守治疗且受伤时无肢体损伤(目的是为排除其他损伤导致的外周血EPCs变化)的患者作为病例组。损伤程度由格拉斯哥昏迷评分(Glasgow coma scale,GCS)决定,格拉斯哥昏迷指数从睁眼反应、语言反应和肢体运动3个方面评估,3个方面的分数之和即为昏迷指数。正常人的昏迷指数是满分15分,昏迷程度越重者的昏迷指数越低。轻度昏迷:13~14分,中度昏迷:9~12分,重度昏迷:3~8分。排除数据不全、脑死亡或系统性疾病的患者。患者年龄19~62(40.8±15.0)岁,其中男性7例,女性3例。选择同期10例健康者作为对照,年龄29~66(38.4±11.4)岁。两组在年龄方面差异无统计学意义($P>0.05$)。

### 1.3 方法

1.3.1 标本的采集 在患者入院后1、4、7、14 d分别采集外周血,同期采集10例健康对照组外周血。

1.3.2 分离外周血单个核细胞 将等体积的PBS与收集的血液样品混合,再缓慢加至等体积淋巴细胞分离液的上层,运用Ficoll梯度离心法得到中间层浑浊细胞悬液,采用红细胞裂解液裂解该层细胞悬液中混有的红细胞。最后得到的悬液为单个核细胞悬液。

1.3.3 EPCs的鉴定 运用流式细胞仪检测分离得到的单个核细胞悬液中EPCs的含量前,先运用抗体标记表面EPCs抗原,一般认为$CD34^+/CD133^+/CD309^+$是EPCs的表型特征[2],但是三者都为阳性的细胞数量十分稀少,在研究中多采用表面特征为$CD34^+/CD133^+$、$CD133^+/CD309^+$、$CD34^+/CD309^+$的双阳性细胞为EPCs。每份标本检测20万个细胞,圈出单个核细胞的区域,排除细胞碎片等杂质。对圈出的细胞进行流式计数分析得到双阳性细胞即为EPCs,最终获得流式细胞散点图和EPCs占单个核细胞的百分率。

1.3.4 GCS评分 患者入院后即进行GCS评分。GCS评分3~8分为重型颅脑损伤,即选定为实验对象。入院后28 d,再次进行GCS评分,对比入院时评分得出分数差作为评定病情改善情况的指标。

### 1.4 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,两组比较行$t$检验,EPCs的含量百分比与GCS评分差的相关性行Spearman相关分析。

## 2 结果

### 2.1 病例组与对照组EPCs比较

流式细胞术检测结果显示病例组相对对照组的外周血EPCs含量表现为前4 d逐渐下降,第4~7天表现为上升,并且大大超过对照组,随后逐渐下降,渐渐趋于对照组($P<0.05$,$P<0.01$,图1、2)。

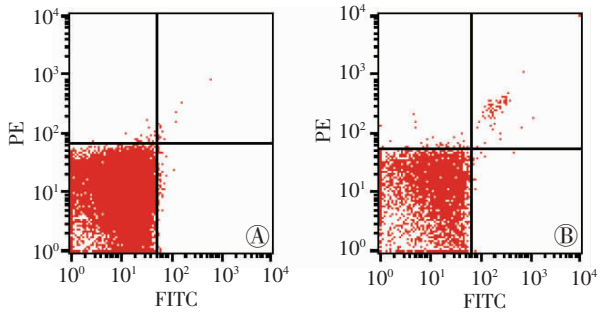
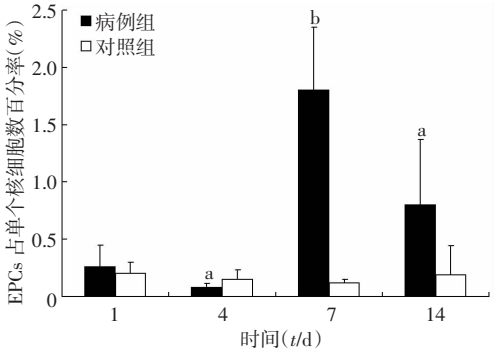



**图1 单个核细胞标记$CD34^-/CD133^-$(A)、$CD34^+/CD133^+$(B)流式细胞术检测结果**




a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,对照组比较

**图2 创伤后各时间点外周血中EPCs占单个核细胞数的百分率比较**

### 2.2 病例组外周血中EPCs百分率与GCS评分差的相关性分析

相关性统计分析结果显示,重型颅脑外伤患者外周血的EPCs含量分别在第7天($r=0.57$,$P<0.05$)和第14天与GCS评分差呈正相关($r=0.68$,$P<0.05$)。

## 3 讨论

在创伤性脑损伤中,神经细胞的损伤被认为是造成患者死残的主要原因,创伤性脑损伤造成的血管损伤,导致血流异常,神经细胞缺血、缺氧而坏死。脑缺血发生2 min将导致脑电活动消失,超过5 min即造成不可逆的损伤[3]。血管新生被认为是修复损伤的一个重要步骤,对神经细胞的损伤可能起到修复作用[4]。EPCs来源于骨髓,是血管内皮细胞的前体,在一些因素的诱导下,EPCs将归巢到损伤组织的新生血管床的区域[1]。它不仅在胚胎时期参与血管的形成,而且在新生血管中发挥极其重要的作用[5]。心肌梗死、骨骼或肌肉损伤的患者,其外周血中EPCs的含量前期并没有出现降低,在早期即开始明显升高[6-8]。本研究发现,在早期重型颅脑外伤患者外周血中EPCs含量降低。有研究证实在这种早期下降的现象也在脑梗死患者中出现[9]。在脑外伤中这种特殊的变化的机制目前尚不清楚,推测可能是大脑不同于其他器官

的某些特点从而导致急性期即出现外周血中大量 EPCs 定向迁移到创伤区域，而骨髓动员 EPCs 的能力尚未出现明显的增强，从而导致外周血中的 EPCs 含量暂时性降低。而在外伤后第 4～7 天，检测到外周血中的 EPCs 含量开始逐渐上升，并且超过对照组，可能是这时期骨髓动员 EPCs 的速度已经大大超过 EPCs 归巢到创伤区域的速度，导致外周血中 EPCs 的含量激增。第 7～14 天，外周血中的 EPCs 含量开始下降趋于正常，分析可能是这时期随着病情的好转，外周血中 EPCs 归巢到创伤区域的数量减少，从而骨髓动员 EPCs 的能力也逐渐较前减弱。

多项研究证实在冠心病及脑卒中患者外周血中 EPCs 水平与该疾病的预后密切相关[10-11]。本研究结果显示 EPCs 含量分别在第 7 天和第 14 天与 GCS 评分差呈正相关，提示颅脑外伤后期外周血中 EPCs 含量越高，预后越好，反之越差，可能原因是 EPCs 在外周血中含量高，归巢到损伤部位的 EPCs 数量也较多，促进损伤部位的血供的恢复的能力更强，预后较好。本研究结果表明 EPCs 作为检测血管新生和颅脑外伤预后的潜在生化指标是有一定的可能性，但还需要从更多层面验证其机制和可行性。接下来准备运用脑外伤动物模型进行验证，并探索 EPCs 从动员到归巢的可能机制。

## 参考文献：


[1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al*. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.

[2] Hirschi K K, Ingram D A, Yoder M C. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(9): 1584-1595.

[3] 贾建平. 神经病学[M]. 6 版. 北京：人民卫生出版社，2008：172.

[4] Zhu W, Fan Y, Hao Q, *et al*. Postischemic IGF-1 gene transfer promotes neurovascular regeneration after experimental stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(9): 1528-1537.

[5] Moubarik C, Guillet B, Youssef B, *et al*. Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke[J]. Stem Cell Rev, 2011, 7(1): 208-220.

[6] Massa M, Rosti V, Ferrario M, *et al*. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction[J]. Blood, 2005, 105(1): 199-206.

[7] Wojakowski W, Tendera M, Zebzda A, *et al*. Mobilization of CD34(+), CD117(+), CXCR4(+), c-met(+) stem cells is correlated with left ventricular ejection fraction and plasma NT-proBNP levels in patients with acute myocardial infarction[J]. Eur Heart J, 2006, 27(3): 283-289.

[8] Levy M M, Fink M P, Marshall J C, *et al*. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4): 1250-1256.

[9] Chen J, Chen S, Chen Y, *et al*. Circulating endothelial progenitor cells and cellular membrane microparticles in db/db diabetic mouse: possible implications in cerebral ischemic damage[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011, 301(1): E62-E71.

[10] Zhao Y H, Yuan B, Chen J, *et al*. Endothelial progenitor cells: therapeutic perspective for ischemic stroke[J]. CNS Neurosci Ther, 2013, 19(2): 67-75.

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


（收稿：2014-03-07；修回：2014-04-23）

（编辑　王小寒）

（上接 1622 页）

(97%)，从下至上以此递减，颅骨转移少见。国外仅见个案报道[1-2]，国内报道[3-4]亦少见。颅骨转移早期无明显临床不适，后期主要表现为颅神经麻痹症状，按发生率高低依次包括：颅中窝综合征(35%)、枕踝综合征(21%)、鞍区综合征(16%)、眶尖综合征(7%)等。其中眶尖综合征(orbit apex syndrome)是指由于某种病变侵犯眶尖，从而引起一系列眶尖组织功能损伤的临床表现的总称，主要是指经过眶上裂及视神经孔的神经、血管损伤后出现的征象，包括眼球突出、眼底改变等。

本例患者主因“左眼球突出 1 个月”入院。入院后先后请神经外科及神经内科会诊，均未考虑前列腺癌，眼科会诊亦未能明确突眼病因。后经进一步完善相关辅助检查，明确“前列腺癌伴全身骨转移”诊断；经过查阅相关资料，进一步明确患者“左眼球突出”系前列腺癌眶尖骨转移致眶尖综合征的临床表现之一。本例患者入院初期未能考虑前列腺癌，主要原因包括：①本例患者无典型前列腺癌临床表现，如排尿困难、肉眼血尿、全身或局部疼痛等；②前列腺癌颅骨转移发生率较低，入院后未能及时行头颅 CT 或 MRI 等相关辅助检查；③前列腺癌骨转移致眼球突出病例非常罕见，至今国内少见报道。

前列腺癌伴全身骨转移提示癌肿已进入晚期，目前主要采取内分泌疗法。主要治疗手段包括睾丸切除术、雌激素类药物以及类固醇类或非类固醇抗雄激素药物，其目的是减少雄激素对前列腺的作用。长期以来，睾丸切除术是前列腺癌内分泌治疗的金标准，但其术后可导致容易疲劳、贫血等，尤其是其所导致的心理障碍令许多患者难以接受。通过对本例患者的诊治，我们体会：①对于难以解释的孤立临床表现要注意考虑转移瘤可能；②对于老年男性原发灶不清的转移瘤，要注意排除前列腺癌可能；③尽管各种肿瘤转移灶均有其常见部位，但切忌主观臆断，要警惕少见部位转移瘤的存在。

## 参考文献：


[1] McAvoy C E, Kamalarajab S, Best R, *et al*. Bilateral third and unilateral sixth nerve palsies as early presenting signs of metastatic prostatic carcinoma[J]. Eye (Lond), 2002, 16(6): 749-753.

[2] Prashant R, Franks A. Collet-Sicard syndrome--a report and review[J]. Lancet Oncol, 2003, 4(6): 376-377.

[3] 周小娟，孙永先，谢萍. 前列腺癌斜坡转移 1 例报道并文献回顾[J]. 现代肿瘤医学，2011，19(9)：1807-1809.

[4] 王燕，李志平. 前列腺癌颅底转移 1 例[J]. 肿瘤预防与治疗，2013，26(5)：304-306.


（收稿：2014-04-04；修回：2014-06-03）

（编辑　龙　亮）