系统性红斑狼疮患者外周血内皮祖细胞的实验研究

陈小强 (解放军第161中心医院皮肤性病科,湖北 武汉 430052)

[摘 要] **目的** 探讨系统性红斑狼疮患者外周血内皮祖细胞(EPC)数量、功能是否改变。**方法** 连续选入33例系统性红斑狼疮(SLE)患者做为SLE组,33名门诊健康体检者为对照组。流式细胞分析计量外周血CD34和KDR双阳性细胞,同时原代培养EPC,培养7 d后MTT法检测增殖能力,改良boydon小室法检测迁移能力。**结果** SLE组外周血EPC数量较对照组显著减少,$P<0.01$;SLE组的增殖、迁移能力均较对照组减弱,$P<0.01$。**结论** 系统性红斑狼疮患者外周血EPC数量减少,增殖、迁移功能降低,可能是SLE促动脉粥样硬化发生的机制之一。

[关键词]系统性红斑狼疮;内皮祖细胞;实验研究

[中图分类号] R593.24 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2010)02-0096-02

The experimential study of peripheral endothelial progenitor cells in patients with systemic lupus erythematosus

CHEN Xiao-qiang (Department of Dermatovenereology, the 161st Hospital of PLA, Wuhan, Hubei 430052, China)

Abstract: Objective To determine whether the number and function of endothelial progentor EPC are altered in patients with cells systemic lupus erythematosus. **Methods** Thirty-three patients with SLE and 33 controls were analysed. Peripheral EPC was enumerated as CD34+/KDR+ cell via fluorescence-activated cell sorter analysis. Additionally, EPCs were isolated and cultured in vitro for 7 days, then EPCs proliferation activities were performed by MTT assay and migration activities were determined by modified Boyden chamber assay. **Results** CD34+/KDR+ cells were decreased in SLE($P<0.01$). In addition, EPCs from patients with SLE are significantly damaged in their proliferation($P<0.01$) and migration capacity compared with controls. **Conclusions** Our results suggest that the number and activities of peripheral EPCs were lower in patients with SLE. It may reduce the ability to repair vascular damage and thus may trigger the development of atherosclerosis in SLE.

Keywords: systemic lupus erythematosus; endothelial progenitor cells; experimental study

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种累及全身多系统的结缔组织病,心血管系统损害是SLE患者仅次于感染和肾功能衰竭的重要死亡原因之一[1]。研究认为SLE患者的全身炎症状态导致血管内皮功能紊乱是导致心血管疾病的主要病理生理机制[2]。近来研究发现内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)在修复内皮细胞中发挥着重要作用,与心血管疾病的发生、发展关系密切[3]。EPC是否在一定程度上介导SLE患者心血管疾病发生,目前尚不清楚,本文拟通过观察SLE患者外周血中EPC数量和功能探讨此问题。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2008年10月至2009年12月收治的初诊SLE患者,诊断符合1997年美国风湿病协会修订的SLE诊断标准[4]。其中女性31例,男性2例,年龄13~60岁,平均(32.02±16.26)岁。选取健康查体者33人作为对照组,其中女性31例,男性2例,年龄18~65岁,平均(33.21±15.79)岁,对照组女性比例及年龄与SLE组无统计学差异。

1.2 研究方法

1.2.1 外周血EPC数量测定 并取入选对象外周血1 mL,密度梯度离心法分离单个核细胞,收集1×10^6个细胞重悬于100 μl的PBS中,按说明书浓度加入FITC标记的CD34小鼠抗人单克隆IgG1抗体(Ancell公司)、PE标记的小鼠抗人KDR(血管内皮生长因子受体2)单克隆IgG1抗体(R&D公司),同型对照为FITC标记和PE标记的小鼠IgG1(R&D公司),避光4 ℃孵育30 min,PBS洗涤2次。采用FACSCalibur流式细胞仪(BD公司),以CellQuest软件进行流式细胞分析,对淋巴细胞群设门,以此群体统计CD34+/KDR+细胞千分率。

1.2.2 外周血EPC培养及鉴定 取入选对象抗凝外周血10 mL,密度梯度离心法分离、收集单个核细胞,PBS洗涤3次后接种于24孔培养板中,培养液为添加青霉素100 U/mL、链霉素100 μg/Mlegf 20 ng/mL(sigma公司)、20%优质胎牛血清(Gibco公司)的DMEM-L,2~3 d培养液1次,去除未贴壁细胞。培养7 d后,加入DiI-Ac-LDL(2.4 μg/mL, Molecular Probe公司)37 ℃避光孵育1 h,然后2%多聚甲醛固定10 min,固定后0.01 MPBS液洗3次,再加入FITC-UEA-I(lectin,10 μg/mL)37 ℃下孵育1 h,倒置荧光显微镜观察,双染色阳性细胞为

[作者简介] 陈小强(1969-),浙江省义乌市人,主治医师,医学硕士,主要从事系统性红斑狼疮的发病机制与治疗方面的研究。电话:(027)50169054

[收稿日期] 2009-12-28 [修回日期] 2010-01-12

EPCs。

1.2.3 EPC增殖能力检测 0.25%胰酶消化培养7 d的贴壁细胞,0.01 mol/L PBS离心洗涤3次,将细胞沉淀重悬于500 μl培养液中计数,再将等量细胞接种于人纤维连接蛋白包被的96孔培养板中,37 ℃、5% CO_2培养箱培养48 h后,每孔加入二苯基四氮唑溴盐(MTT)10 μl(5 g/L),室温孵育6 h后吸弃上清,每孔加入二甲亚砜(DMSO)150 μl,微量振荡器充分振荡10 min,置酶标仪于波长490 nm处测定吸光度值(OD值)。

1.2.4 EPC迁移能力检测 消化、收集并计数培养7 d的贴壁细胞。将100 μl DMEM-L和VEGF 20 μl(20 ng/mL)加入改良Boyden小室的下室,将2×10^4个细胞悬浮于100 μl DMEM-L注入上室,37 ℃、5% CO_2孵箱培养6 h,取出微孔滤膜,刮去滤膜上面未移动细胞,无水乙醇固定,苏木精染色,37 ℃烤膜过夜,二甲苯透明滤膜,随机选择3个显微镜视野(×400)计数迁移到低层的细胞。

1.3 统计学处理

数据以均值±标准差表示,临床资料两组间均数比较采用独立样本t检验,$P<0.05$认为差异有统计学意义。统计学处理采用SPSS13.0软件完成。

2 结果

以CD34+/KDR+细胞代表EPC。SLE组外周血EPC数量为(0.206±0.008)‰,明显少于对照组(0.387±0.009)‰,差异有统计学意义($P<0.01$)。外周血EPC培养第4天可以观察到椭圆形、短梭形细胞;第7天,梭形细胞逐渐增多并呈簇状生长;第14天可见细胞首尾相连形成索状或网状血管样结构;第21天,细胞相互融合呈"铺路石"状。培养第7天细胞行DiI-Ac-LDL摄取及FITC-UEA-I结合实验,通过荧光显微镜观察,黄色双染阳性细胞占(98.25±1.22)%。MTT分析显示,SLE组的OD值为0.31±0.09低于对照组0.52±0.08降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。SLE组迁移细胞数为18.8±5.5个,低于对照组34.7±6.3个,差异有统计学意义($P<0.01$)。SLE组外周血EPC增殖、迁移能力均受损。

3 讨论

EPC是血管内皮细胞的前体细胞,定居于成体骨髓,可以动员到外周血,通过自身分化和旁分泌内皮生长因子等途径修复内皮细胞,防止内皮细胞功能紊乱,而内皮功能紊乱是导致心血管疾病发生的重要始动因子[5]。心血管系统是SLE重要的靶器官,SLE被认为是心血管疾病危险因素之一。SLE患者机体处于慢性复发性炎症状态之中,超敏C反应蛋白、TNF-alpha等炎症因子明显升高,这些炎症因子可以通过增加内皮通透性、刺激平滑肌增殖等多种途径导致动脉粥样硬化的发生,近来研究发现炎症因子还可通过促进EPC凋亡和生物学功能下降,导致内源性内皮修复能力降低,促进动脉粥样硬化发生[6]。那么SLE心血管疾病发病率增高是否也与其EPC的损伤有一定关系,目前尚不清楚。Moonen等[7]报道SLE患者外周血中骨髓来源的CD34+/CD133+的循环祖细胞数量及功能下降,但CD34+和CD133+均主要是干祖细胞标志,其双阳性细胞群体并不能代表内皮前体细胞,在本研究中以人内皮细胞特异性标记KDR和干祖细胞标记CD34双阳性细胞代表EPC,发现SLE患者外周血EPC数量下降,同时增殖和迁移能力降低。新近研究表明CD34+/KDR+标记的EPC数量是冠脉病变严重程度的独立预测因子,在多种心血管疾病中其增殖、迁移、粘附能力下降,他汀类药物可以通过抗EPC凋亡、促进EPC增殖、迁移能力保护血管内皮功能预防动脉粥样硬化[8]。因此本研究结果提示SLE可能通过减少外周血中EPC数量和降低EPC增殖、迁移能力,导致损伤内皮功能修复不良,从而促进SLE患者动脉粥样硬化等心血管疾病发生。

[参考文献]

[1] Ostanek L, Plonska E, Peregud M, et al. Cardiovascular abnormalities in systemic lupus erythematosus patients in echocardio graphic assessment [J]. Pol Merkur Lekarski, 2006, 20(117): 305-308.

[2] Lee SS, Singh S, Link K, et al. High-sensitivity C-reactive protein as an associate of clinical subsets and organ damage in systemic lupus erythematosus [J]. Semin Arthritis Rheum, 2008, 38(1): 41-54.

[3] Gian Pi, Carlo A, Saverio S, et al. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2007, 200(10): 46-54.

[4] Stoll T, Stucki G, Malik J, et al. Association of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index with measures of disease activity and health status in patients with systemic lupus erythematosus[J]. J Rheumatol, 1997, 24(2): 309-313.

[5] Pompilio G, Capogrossi MC, Pesce M, et al. Endothelial progenitor cells and cardiovascular homeostasis: clinical implications[J]. Int J Cardiol, 2009, 131(2): 156-167.

[6] Tousoulis D, Andreou I, Antoniades C, et al. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases[J]. Atherosclerosis, 2008, 201(2): 236-247.

[7] Jan Renier AJ Moonen, Karina de Leeuw, Xavier J, et al. Reduced number and impaired function of circulating progenitor cells in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Research & Therapy, 2010 9(4): 1-10.

[8] Bao XM, Wu CF, Lu GP. Atorvastatin inhibits homocysteine-induced oxidative stress and apoptosis in endothelial progenitor cells involving Nox4 and p38MAPK[J]. Atherosclerosis, 2009, 202(3): 302-309.

(编辑:左艳芳)