

· 论 著 ·

# 系统性硬皮病患者循环内皮祖细胞数量变化的初步研究\*

周培媚<sup>1</sup>, 路永红<sup>1</sup>, 熊霞<sup>2</sup>, 姚丽萍<sup>2</sup>, 顾兰秋<sup>1</sup>, 树瑜<sup>1</sup>, 陈前明<sup>1</sup>, 吴波<sup>1</sup>

(1. 成都市第二人民医院皮肤科 610017; 2. 泸州医学院附属医院皮肤科 646000)

**摘要:**目的 分析系统性硬皮病患者外周血内皮祖细胞数量的变化。方法 选择 2010 年 11 月至 2011 年 6 月该院风湿免疫科就诊的女性系统性硬皮病(SSc)患者 20 例作为实验组, 同期健康体检者 20 例为对照组, 取外周血 20 mL, 密度梯度离心法分离单个核细胞, 以 CD133/CD34、CD133/血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR2) 双荧光标记鉴定细胞, CD34/CD133/VEGFR2 三荧光标记流式检测内皮祖细胞数量。结果 实验组患者外周血内皮祖细胞表达阳性率(3.18±1.97)% 较对照组(20.56±4.37)% 低( $P<0.05$ )。结论 系统性硬皮病患者外周血内皮祖细胞数量减少。

**关键词:** 系统性硬皮病; 内皮祖细胞; 数量

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.15.006

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)15-1471-02

## Preliminary study on change in number of endothelial progenitor cells in peripheral blood of systemic scleroderma patients\*

Zhou Peimei<sup>1</sup>, Lu Yonghong<sup>1</sup>, Xiong Xia<sup>2</sup>, Yao Liping<sup>2</sup>, Gu Lanqiu<sup>1</sup>, Shu Yu<sup>1</sup>, Chen Qianming<sup>1</sup>, Wu Bo<sup>1</sup>

(1. Department of Dermatology, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610017, China;

2. Department of Dermatology, Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract:** **Objective** To analyze the change of number of the endothelial progenitor cells(EPCs) from peripheral blood (PB) in systemic scleroderma(SSc) patients. **Methods** 20 female patients with SSc in the rheumatism and immunology department of our hospital from November 2010 to June 2011 were selected as the experimental group and 20 healthy females with physical examination were as the control. 20 mL PB was collected for isolating mononuclear cells(MNCs) by the density gradient centrifugation method, and EPCs were identified by analysis of both the fluorescence expression of CD34 and CD133, or both CD133 and VEGFR2. The number of EPCs was flow-cytometrically determined. **Results** Compared with the control group, the positive expression rate of EPCs was significantly reduced in the patients of the experimental group (3.18±1.97)% vs. (20.56±4.37)%,  $P<0.05$ . **Conclusion** The number of EPCs is significantly reduced in SSc patients.

**Key words:** systemic scleroderma; endothelial progenitors cells; number

系统性硬皮病(systemic scleroderma, SSc)是一种以皮肤和内脏组织胶原进行性硬化为特征的结缔组织疾病, 血管炎是 SSc 的主要病理表现。内皮祖细胞(endothelial progenitors cells, EPCs)是一种祖细胞, 在特定的条件下可分化成血管内皮细胞(endothelial cells, ECs), 它在胚胎时期参与血管发生, 在出生后参与内皮损伤的修复以及在血管新生中也发挥着重要的作用。近年来, 国内有报道系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者血液循环中 EPCs 数量较正常低, 其增殖、迁移、黏附等功能也受损<sup>[1-2]</sup>, SSc 患者外周血 EPCs 数量是否存在异常, 国内未见报道。现将本研究 SSc 患者 20 例外周血 EPCs 数量变化报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2010 年 11 月至 2011 年 6 月本院风湿免疫科就诊的女性 SSc 患者 20 例作为实验组, 平均年龄(35.80±11.53)岁, 平均病程(8.35±9.58)年; 选择同期健康体检者 20 例为对照组, 平均年龄(30.20±12.93)岁。诊断标准参照文献<sup>[3]</sup>; 排除吸烟、高胆固醇血症、糖尿病、高血压、肿瘤、原发造血系统疾病以及近期创伤、外科手术患者。

**1.2 设备材料和试剂** 离心机(德国 Eppendorf 公司)、微量移液器(德国 Eppendorf 公司)、流式细胞检测仪(美国 BD 公司)、荧光显微镜、光学显微镜及光学摄像系统(日本 OLYMPUS)等。

淋巴细胞分离液(天津颀洋公司)、M199 培养基(美国 Hyclone 公司)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor

1, IGF-1; 美国 Peprotech 公司)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF; 美国 Peprotech 公司)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF; 美国 Peprotech 公司)、硫酸化藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的抗人 CD34 单克隆抗体及同型对照(eBioscience 公司)、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的抗人 CD133 多克隆抗体及同型对照(eBioscience 公司)、PerCP/Cy5.5 标记的抗人血管内皮细胞生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)及其同型对照(BioLegend 公司)、胎牛血清(美国 Hyclone 公司)、鼠尾胶(杭州生友)。

### 1.3 方法

**1.3.1 单个核细胞分离** 取抗凝受试者外周血 20 mL, 将其用无血清培养基稀释, 然后仔细铺在体积相等的淋巴细胞分离液液面上, 水平离心机离心 30 min(室温, 400×g), 小心吸取中间层白色浑浊的细胞层(即单个核细胞), 以 1 500 r/min 离心 10 min、1 000 r/min 离心 8 min, 弃掉上清液。

**1.3.2 EPCs 的培养** 用鼠尾胶包被培养瓶, 计数分离的单个核细胞, 按  $2 \times 10^6$ /L 的密度接种于培养瓶, 48 h 后换液 1 次, 然后加入 VEGF(10 ng/mL)以诱导贴壁的单个核细胞分化和生长; 在倒置相差显微镜下观察细胞的生长情况, 拍照记录。

**1.3.3 EPCs 的鉴定** 用鼠尾胶爬片包被 6 孔培养板, 将分离的单个核细胞接种于该 6 孔培养板上, 培养 7 d, 取出爬片, 磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)清洗, 4% 多聚甲醛

\* 基金项目: 四川省卫生厅科研课题基金资助项目(090027)。

固定细胞 10 min。分别加入 PerCP/Cy5.5-VEGFR2 单克隆抗体和 FITC-CD133 抗体各 5  $\mu$ L 或 FITC-CD133 抗体和 PE-CD34 抗体各 5  $\mu$ L;在避光、4  $^{\circ}$ C 的环境下孵育 30 min,然后用 PBS 漂洗,于荧光显微镜下观察。

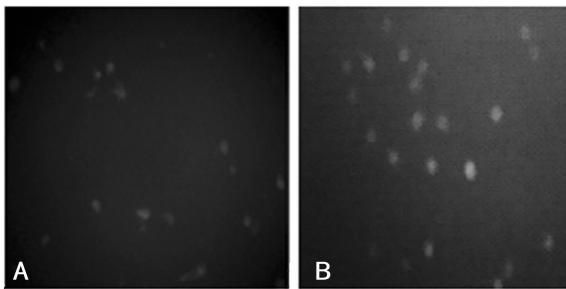
**1.3.4 EPCs 数量变化的检测** 取分离的单个核细胞(计数细胞密度为  $1 \times 10^6$ /L)悬液于流式管中,每个标本均设置 1 个实验管、1 个同型 IgG 抗体对照管及 1 个空白对照管;前两者加入 PE-CD34 单克隆抗体 10  $\mu$ L, PerCP/Cy5.5-VEGFR2 单克隆抗体 20  $\mu$ L 和 FITC-CD133 抗体 20  $\mu$ L,空白对照管则加入等量的 PBS 液。在避光、4  $^{\circ}$ C 的环境下孵育 30 min;流式细胞仪上机进行检测,用 Cellquest 软件分析 CD34/VEGFR2/CD133 三阳性细胞所占的比例。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS13.0 软件进行数据的处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间的比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 EPCs 的培养** 新鲜分离的单个核细胞似圆形,细胞的体积较小。培养 48 h 后出现贴壁,且细胞体积逐渐增大。培养 4 d 后,可见部分集落的形成,集落的中心为圆形细胞,集落的周围为长梭形细胞,似放射状排列(封 3 图 1),这个时期细胞增殖最明显;培养 7 d 时,细胞似线状或网格样生长,这个时期梭形细胞数量增多(封 3 图 1)。

**2.2 荧光鉴定** EPCs 培养 7 d 后加入 PE-CD34、FITC-CD133 和 PerCP/Cy5.5-VEGFR2,于荧光显微镜下观察,PerCP/Cy5.5-VEGFR2 阳性细胞和 PE-CD34 阳性细胞的胞膜均呈现红色荧光,而 FITC-CD133 阳性细胞的胞膜呈现绿色荧光,PE-CD34 和 FITC-CD133 表达双阳性的细胞,或 FITC-CD133 和 PerCP/Cy5.5-VEGFR2 表达双阳性的细胞则显示橘黄色的荧光(图 2)。



A: 实验组; B: 对照组。

图 2 CD34/CD133 或 VEGFR2/CD133 双阳性细胞表达(荧光显微镜  $\times 200$ )

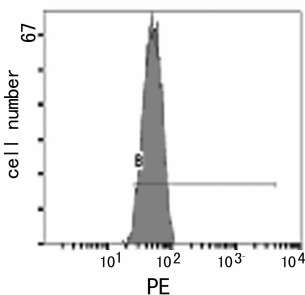


图 3 实验组某患者 CD34<sup>+</sup> 表达细胞数

**2.3 EPCs 数量检测** 三荧光标记下流式细胞仪进行检测,实验组同时表达 CD34、VEGFR2、CD133 的细胞计数为  $(3.18 \pm 1.97)\%$ (图 3、4),与对照组  $(20.56 \pm 4.37)\%$  相比,差异有统计学意义,  $P < 0.05$ 。

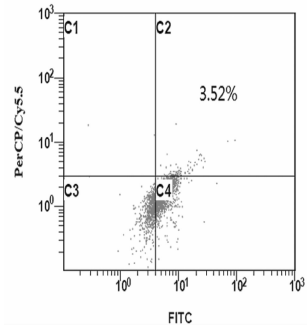


图 4 实验组某患者 CD34<sup>+</sup> 通道中 CD133<sup>+</sup>/VEGFR2<sup>+</sup> 细胞表达百分率

## 3 讨 论

EPCs 亦称成血管细胞,外周血中含量极低,在一定条件下,具多分化潜能的外周血单个核细胞经诱导可分化形成 EPCs,以补充循环血液中 EPCs 的数量。1997 年,Asahara 等<sup>[4]</sup>在从成人循环血液中分离出可分化为 ECs 的血管祖细胞,即 EPCs,首次证实了 EPCs 在外周血中的存在。EPCs 可表达各种表面标记<sup>[5]</sup>,如 CD31、CD34、CD133、CD146、VEGFR2、内皮一氧化氮合酶Ⅷ因子等,而目前普遍认为能共同表达 CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/VEGFR2<sup>+</sup> 者为功能明确的 EPCs<sup>[6]</sup>,故本研究选择该 3 种表面分子阳性作为计数 EPCs 的标准。EPCs 可参与各种血管内皮损伤的修复及其稳态的维持,在血管内皮损伤的修复中发挥着极其重要的作用。目前,在关于 SLE、冠心病、高血压等的研究中均相继发现存在外周血 EPCs 数量和功能的异常<sup>[7-9]</sup>。

SSc 是一种常见的自身免疫性疾病,其发病机制尚不清楚,但普遍认为血管变化是发病的基础环节,而血管内皮的损害和功能失调又是其血管病变的中心环节。故 SSc 患者体内是否有足够数量的 EPCs,对 SS 患者血管损伤的修复极为重要。近年来,国外相继出现有关 SS 患者外周血 EPCs 的研究,但就其数量变化的结果报道不一<sup>[10-14]</sup>,国内还未见该方面研究。本研究从 SSc 患者外周血分离单个核细胞,经培养后流式细胞仪检测表达 CD34、CD133、VEGFR2 的细胞数明显低于正常对照组 ( $P < 0.05$ ),说明 SS 患者外周血 EPCs 数量降低,可能导致外周血 EPCs 不能够及时分化为内皮细胞参与血管损伤的修复。

SSc 患者 EPCs 数量减少的原因,考虑与 SSc 患者血清中持续存在的内皮细胞特异性细胞毒因子(如抗血管内皮细胞抗体、酸性溶酶体水解酶等)对内皮细胞的损伤以及一些可溶性介质(如 IL-1、IL-2、TNF 等)对内皮细胞超微结构的破坏有关,这种持续的内皮损伤将导致数量有限的外周血 EPCs 的耗尽或衰竭。此外,EPCs 的动员或生存期也可能因机体 NO 活性、氧化应激水平的调节、细胞因子水平及其他生理过程而受到影响,由此而导致其数量的变化<sup>[15]</sup>。以上结果提示,SSc 患者外周血的 EPCs 数量减少在 SSc 患者血管炎的发病中起着重要的作用。

## 参考文献:

- [1] 周培媚,路永红,熊霞,等. SLE 患者外周血内皮祖细胞数量及生物学功能的研究[J]. 中华皮肤科杂志,2010,43(10):698-701.
- [2] 周培媚,路永红,程晓云,等. 系统性红斑狼疮患者内皮祖细胞数量及功能变化与病情的相关性研究[J]. 中国皮肤性病学杂志,2011,25(2):83-86. (下转第 1475 页)

小仅轻度相关( $r=0.274$ ),这可能与标本来源以及测定方法不同有关。但是,肥大细胞与肠神经系统如何共同作用导致 HD 的发生,肥大细胞数量增多与肠神经节细胞缺失之间的相互联系及作用机制都有待于进一步研究。

HD 是多因素、多机制综合作用的结果,本研究从神经免疫学方面入手,证实肥大细胞可能在 HD 中扮演重要角色,其机制可能与肥大细胞和肠神经系统的双向调节作用有关,这为临床诊断和治疗 HD 提供参考。但是,肥大细胞是否是 HD 形成中的关键因素,应用肥大细胞抑制剂是否可以改善和治疗 HD,还需要通过大量实验来进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Kobayashi H, Yamataka A, Fujimoto T, et al. Mast cells and gut nerve development: implications for Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia[J]. *J Pediatr Surg*, 1999, 34(4): 543-548.
- [2] 杨希林, 方秀才, 刘晓红. 胃肠道肥大细胞与肠神经系统的相互作用[J]. *胃肠病学*, 2010, 15(4): 243-245.
- [3] Wang LH, Fang XC, Pan GZ. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis[J]. *Gut*, 2004, 53(8): 1096-1101.
- [4] Borrelli O, Barbara G, Di Nardo G, et al. Neuroimmune interaction and anorectal motility in children with food allergy-related chronic constipation[J]. *Am J Gastroenterol*, 2009, 104(2): 454-463.
- [5] 朱进, 金先庆. Bcl-2, 钙视网膜蛋白在发育异常肠壁神经节细胞中的表达[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(1): 60-62.
- [6] Hermanowicz A, Debek W, Dzienis-Koronkiewicz E, et al. Topography and morphometry of intestinal mast cells in children with Hirschsprung's disease[J]. *Folia Histochem*

*Cytobiol*, 2008, 46(1): 65-68.

- [7] He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(3): 309-318.
- [8] Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Russo C, et al. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases[J]. *Dig Dis Sci*, 2006, 51(12): 2248-2256.
- [9] Krammer HJ, Karahan ST, Sigge W, et al. Immunohistochemistry of markers of the enteric nervous system in whole-mount preparations of the human colon[J]. *Eur J Pediatr Surg*, 1994, 4(5): 274-278.
- [10] Greenwood-Van Meerveld B, Venkova K, Hicks G, et al. Activation of peripheral 5-HT receptors attenuates colonic sensitivity to intraluminal distension[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2006, 18(1): 76-86.
- [11] De Jonge F, De Laet A, Van Nassauw L, et al. In vitro activation of murine DRG neurons by CGRP-mediated mucosal mast cell degranulation[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 287(1): 178-191.
- [12] Van Op den Bosch J, van Nassauw L, Lantermann K, et al. Effect of intestinal inflammation on the cell-specific expression of somatostatin receptor subtypes in the murine ileum[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2007, 19(7): 596-606.
- [13] Yadav AK, Mishra K, Mohta A, et al. Hirschsprung's disease: is there a relationship between mast cells and nerve fibers[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(12): 493-498.

(收稿日期: 2011-11-09 修回日期: 2012-01-22)

(上接第 1472 页)

- [3] 赵辨. 临床皮肤病学[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2001.
- [4] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967.
- [5] Quirici N, Soligo D, Caneva L, et al. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133 cells[J]. *Br J Haematol*, 2001, 115(1): 186-194.
- [6] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34<sup>+</sup> cells identifies a population of functional endothelial precursors[J]. *Blood*, 2000, 95(3): 952-958.
- [7] Ebner P, Picard F, Richter J, et al. Accumulation of VEGFR-2<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> cells and decreased number and impaired functionality of CD34<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup> cells in patients with SLE[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2010, 49(1): 63-72.
- [8] Schmidt-Lucke C, Rössig 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.
- [9] Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, et al. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental

hypertensive rats and patients with essential hypertension[J]. *Hypertens*, 2005, 23(10): 1831-1837.

- [10] Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, et al. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis[J]. *Lancet*, 2004, 364(9434): 561-512.
- [11] Del Papa N, Colombo G, Fracchiolla N, et al. Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(4): 1296-1304.
- [12] Allanore Y, Batteux F, Avouac J, et al. Levels of circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2007, 25(1): 60-66.
- [13] Gomer RH. Circulating progenitor cells and scleroderma[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2008, 10(3): 183-188.
- [14] Del Papa N, Cortiana M, Cominal DP, et al. Endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: their possible role in angiogenesis[J]. *Reumatismo*, 2005, 57(3): 174-179.
- [15] Zhou Y, Zhu J, Zou L, et al. Changes in number and biological function of endothelial progenitor cells in hypertension disorder complicating pregnancy[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2008, 28(6): 670-673.

(收稿日期: 2011-12-20 修回日期: 2012-03-08)