

## • 论著 •

## 内皮祖细胞在创伤后多器官功能障碍中的变化及意义

付文政 毛岸荣 罗天航 方国恩

**【摘要】** 目的 探讨骨髓内皮祖细胞(EPCs)在创伤后多器官功能障碍中的变化特点及意义。方法 18头小型家猪按随机数字表法分为实验组(9头)和对照组(9头)。实验组动物采用失血性休克-内毒素二次打击方法制备多器官功能障碍综合征(MODS)模型。设伤后正常状态( $T_1$ )以及注射脂多糖(LPS)前( $T_2$ )和注射后即刻( $T_3$ )、24 h( $T_4$ )、48 h( $T_5$ )5个时间点抽取骨髓和外周血,加入红细胞裂解液,显微镜下计算有核细胞数;用流式细胞仪测定骨髓和外周血中EPCs含量,并计算EPCs绝对数值,对结果进行统计学分析。结果 对照组  $T_1$ 、 $T_2$ 、 $T_3$ 、 $T_4$ 、 $T_5$ 时骨髓中EPCs( $\times 10^6/L$ )分别为  $7.64 \pm 0.68$ 、 $7.32 \pm 0.55$ 、 $7.58 \pm 1.13$ 、 $7.77 \pm 0.70$ 、 $7.88 \pm 0.84$ ,外周血中EPCs( $\times 10^6/L$ )分别为  $3.54 \pm 0.26$ 、 $4.06 \pm 0.64$ 、 $3.74 \pm 0.55$ 、 $3.61 \pm 0.37$ 、 $3.98 \pm 0.63$ ;实验组骨髓中EPCs( $\times 10^6/L$ )分别为  $7.45 \pm 1.55$ 、 $6.58 \pm 0.80$ 、 $11.27 \pm 1.20$ 、 $10.88 \pm 1.15$ 、 $8.36 \pm 2.88$ ,外周血中EPCs( $\times 10^6/L$ )分别为  $3.21 \pm 0.48$ 、 $8.71 \pm 2.04$ 、 $5.98 \pm 0.77$ 、 $1.27 \pm 0.91$ 、 $2.14 \pm 0.96$ 。实验组  $T_3$ 、 $T_4$ 、 $T_5$ 时骨髓中EPCs明显高于对照组; $T_2$ 、 $T_3$ 、 $T_4$ 、 $T_5$ 时外周血中EPCs与对照组有明显差异,且各时间点骨髓中EPCs明显高于外周血中(均  $P < 0.05$ )。结论 失血性休克后MODS发生发展过程中外周血EPCs先出现明显升高,然后迅速下降;而骨髓EPCs先略有下降,后明显升高,出现MODS后下降。EPCs的变化在MODS的转归中起重要作用。

**【关键词】** 内皮祖细胞; 多器官功能障碍综合征; 骨髓; 血液; 流式细胞仪

**Changes in endothelial progenitor cells and their implications in multiple organ dysfunction syndrome caused by trauma in pigs** FU Wen-zheng, MAO An-rong, LUO Tian-hang, FANG Guo-en. Department of General Surgery, Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Corresponding author: FANG Guo-en

**【Abstract】** **Objective** To investigate characteristics of changes in bone marrow endothelial progenitor cells (EPCs) and implications on multiple organ dysfunction syndrome (MODS) as a result of trauma. **Methods** Eighteen mini-pigs were randomized into two groups: MODS group ( $n=9$ ) and control group ( $n=9$ ). The animal models of MODS were reproduced by "two-hit" injury with hemorrhagic shock and lipopolysaccharide (LPS) injection. Bone marrow and peripheral blood of them were collected at five time points: normal condition ( $T_1$ ), before injection of LPS ( $T_2$ ), and 0 ( $T_3$ ), 24 ( $T_4$ ) and 48 hours ( $T_5$ ) after injection of LPS. Erythrocytic lysate was added to the samples, and the number of leucocytes in every sample was counted. The rate of EPCs in each sample was determined by flow cytometry. Number of EPCs in bone marrow and peripheral blood were calculated, and the results were analyzed statistically. **Results** The number of EPCs ( $\times 10^6/L$ ) in bone marrow of control group at  $T_{1-5}$  was  $7.64 \pm 0.68$ ,  $7.32 \pm 0.55$ ,  $7.58 \pm 1.13$ ,  $7.77 \pm 0.70$ , and  $7.88 \pm 0.84$ , respectively, and in peripheral blood control group was  $3.54 \pm 0.26$ ,  $4.06 \pm 0.64$ ,  $3.74 \pm 0.55$ ,  $3.61 \pm 0.37$ , and  $3.98 \pm 0.63$ , respectively. The number of EPCs ( $\times 10^6/L$ ) in bone marrow in the experimental group was  $7.45 \pm 1.55$ ,  $6.58 \pm 0.80$ ,  $11.27 \pm 1.20$ ,  $10.88 \pm 1.15$ , and  $8.36 \pm 2.88$ , respectively. The number of EPCs ( $\times 10^6/L$ ) in peripheral blood in the experimental group was  $3.21 \pm 0.48$ ,  $8.71 \pm 2.04$ ,  $5.98 \pm 0.77$ ,  $1.27 \pm 0.91$ , and  $2.14 \pm 0.96$ , respectively. The number of EPCs in bone marrow of experimental group was larger than that of control group at  $T_3$ ,  $T_4$ ,  $T_5$ . The number of EPCs in the experimental group in peripheral blood was larger than that of control group at  $T_2$ ,  $T_3$ ,  $T_4$ ,  $T_5$ . The number of EPCs in bone marrow was larger than that in peripheral blood at every time point (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The number of EPCs in peripheral blood elevates sharply in the earlier period, then plummets quickly during MODS after a trauma. While the number of EPCs in bone marrow descends mildly at first, then rises obviously. Along with the aggravation of MODS, a declination of EPCs in bone marrow emerges. The change in bone marrow EPCs plays an important role in recovery of MODS.

**【Key words】** Endothelial progenitor cell; Multiple organ dysfunction syndrome; Bone marrow; Blood; Flow cytometry

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.06.008

基金项目:国家自然科学基金项目(30672170)

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院普外科

通信作者:方国恩

多器官功能障碍综合征(MODS)在临床危重病患者中经常出现,虽然对其病理研究和临床治疗已经有了很大提高,但是关于其发生发展机制目前尚未完全阐明。本课题组前期研究表明,在MODS发

生发展过程中,外周血单核细胞 p38 丝裂素活化蛋白激酶 (p38MAPK) 磷酸化可使肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 表达与合成增加,抑制 p38MAPK 磷酸化可能是 MODS 治疗中降低脓毒症的治疗靶点<sup>[1]</sup>。内皮祖细胞 (EPCs) 参与生理性及病理性血管形成,有关 EPCs 与冠心病、脑血管病、糖尿病、创伤等疾病的关系已经有较多的研究<sup>[2-3]</sup>,但在由创伤引起的 MODS 过程中变化如何目前尚无报道。本实验中采用二次打击法制备小型家猪 MODS 模型<sup>[4]</sup>,研究骨髓和外周血 EPCs 在创伤或严重感染导致 MODS 各阶段中的变化趋势,从自身修复障碍角度出发探讨 MODS 的发病机制,同时为进一步研究 EPCs 与 MODS 的联系提供实验依据。

## 1 材料与与方法

**1.1 主要试剂和仪器:**羊抗猪 CD133 抗体(美国 Santa Cruz 公司),异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的鼠抗羊 IgG(丹麦 DAKO 公司),藻红蛋白 (PE) 标记的羊抗鼠 IgG(美国 KPL 公司),鼠抗猪血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR-2/KDR) 抗体(美国 Upstate 公司),大肠杆菌脂多糖 (LPS, 美国 Sigma 公司),M1106C 多功能监护仪(美国 HP 公司),普通光学显微镜(日本 Olympus 公司),FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

**1.2 实验动物分组与模型制备:**清洁级(二级)健康雄性猪 19 头由第二军医大学实验动物中心提供,动物合格证号:Syxk(沪)2007-003,体重 21~30 kg,平均(25.22±3.17) kg。按随机数字表法分为两组,实验组 10 头,实施麻醉和有创动、静脉置管后,制备失血性休克+大肠杆菌 LPS 复合因素二次打击 MODS 模型<sup>[3]</sup>,最终有 1 头未形成 MODS,未计入该统计资料;对照组 9 头,只施行麻醉和有创动、静脉置管,不实施失血及 LPS 注射。在术后不同时间点交替取两侧髂骨后嵴骨髓血 3 ml,同时取静脉血 3 ml 备检。T<sub>1</sub>:正常状态下(第 1 日 08:00 至 09:00),T<sub>2</sub>:注射 LPS 前(第 2 日 08:00 至 09:00),T<sub>3</sub>:注射 LPS 后即刻(第 3 日 08:00 至 09:00),T<sub>4</sub>:注射 LPS 后 24 h(第 4 日 08:00 至 09:00),T<sub>5</sub>:注射 LPS 后 48 h(第 5 日 08:00 至 09:00);对照组相同时间点取标本。本实验符合动物伦理学标准。

### 1.3 检测指标及方法

**1.3.1 骨髓及外周血中有核细胞计数:**按以上时间点取骨髓和外周血各 1 ml,加磷酸盐缓冲液 (PBS) 1:1 混匀后离心,去上清液;取白细胞层,再加 PBS 1 ml 混匀;取 20  $\mu$ l 混匀液,加入 380  $\mu$ l 红细胞裂解

液(3%冰醋酸)并混匀;显微镜下计数有核细胞总数(主要为白细胞,还包括造血干细胞、EPCs、间充质干细胞等)。

**1.3.2 流式细胞仪检测骨髓及外周血 EPCs 含量:**取 6 支试管,各加入骨髓血 50  $\mu$ l,1 号管作为空白对照不加任何抗体,2 号管加入 1  $\mu$ l 的 CD133 抗体,3 号管加 1  $\mu$ l 的 KDR 抗体,4 号管单加二抗,5 号管和 6 号管加同样的 CD133 抗体和 KDR 抗体。每管避光保存 30 min,加入 1 ml 的 PBS 并混匀,离心后去上清液;2 号管加入 1  $\mu$ l FITC 标记的 CD133 二抗,3 号管加 2  $\mu$ l PE 标记的 KDR 二抗,5 号管和 6 号管各加 1  $\mu$ l FITC 标记的 CD133 二抗和 2  $\mu$ l PE 标记的 KDR 二抗,避光保存 30 min;每管中再加入 1 ml PBS,离心后去上清液,加入 150  $\mu$ l PBS。用同法操作同一时间点的外周血。流式细胞仪检测每份标本的 EPCs 含量。

**1.3.3 EPCs 绝对数值的计算:**EPCs 绝对数值=细胞计数所得有核细胞数值 $\times$ 流式细胞仪计数所得 EPCs 的含量。

**1.4 统计学处理,**采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组均数比较采用  $t$  检验,计数资料采用  $\chi^2$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组动物总体转归:**对照组 MODS 发生率为 0(0/9),显著低于实验组的 90%(9/10);对照组的死亡率为 0(0/9),而实验组动物的死亡率为 80%(8/10)。

### 2.2 两组动物 EPCs 动态变化

**2.2.1 有核细胞数的变化(表 1):**第一次打击后(T<sub>2</sub>)实验组动物骨髓和外周血中有核细胞数量明显下降,之后迅速升高,并保持高水平;且与对照组比较差异有统计学意义(均  $P<0.05$ )。

**2.2.2 EPCs 含量的变化(表 1;图 1~2):**对照组骨髓中 EPCs 含量高于外周血(均  $P<0.05$ )。实验组和对照组骨髓中 EPCs 含量基本维持在 0.022%~0.026%,同时在各个时间点的波动不明显。实验组外周血中 EPCs 含量变化较大,维持在 0.017%~0.064%,且在各个时间点的波动明显,于 T<sub>2</sub>、T<sub>4</sub>、T<sub>5</sub> 时与对照组相比有显著差异(均  $P<0.05$ )。

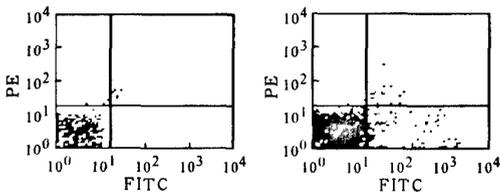
**2.2.3 EPCs 的绝对数值变化(表 1):**实验组动物骨髓中 EPCs 绝对数值在第一次打击后(T<sub>2</sub>)略有下降,随后持续升高,且于 T<sub>3</sub>~T<sub>5</sub> 显著高于对照组(均  $P<0.05$ );外周血中 EPCs 绝对数值在 T<sub>2</sub> 时较

表 1 创伤后多器官功能障碍猪骨髓和外周血有核细胞计数、EPCs 含量、EPCs 绝对数值变化( $\bar{x} \pm s$ )

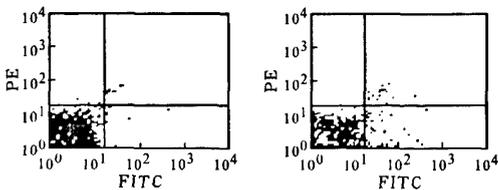
| 组别  | 时间             | 动物数 | 有核细胞数( $\times 10^{12}/L$ )     |                                  | EPCs 含量(%)        |                                   | EPCs 绝对数值( $\times 10^6/L$ )    |                                 |
|-----|----------------|-----|---------------------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|     |                |     | 骨髓                              | 外周血                              | 骨髓                | 外周血                               | 骨髓                              | 外周血                             |
| 对照组 | T <sub>1</sub> | 9   | 28.71 $\pm$ 3.41                | 19.67 $\pm$ 1.32 <sup>d</sup>    | 0.026 $\pm$ 0.002 | 0.018 $\pm$ 0.002 <sup>d</sup>    | 7.64 $\pm$ 0.68                 | 3.54 $\pm$ 0.26 <sup>d</sup>    |
|     | T <sub>2</sub> | 9   | 29.85 $\pm$ 5.53 <sup>a</sup>   | 19.87 $\pm$ 6.42 <sup>d</sup>    | 0.025 $\pm$ 0.001 | 0.020 $\pm$ 0.001 <sup>d</sup>    | 7.32 $\pm$ 0.55                 | 4.06 $\pm$ 0.64 <sup>d</sup>    |
|     | T <sub>3</sub> | 9   | 30.23 $\pm$ 5.66 <sup>a</sup>   | 20.31 $\pm$ 5.53 <sup>d</sup>    | 0.025 $\pm$ 0.002 | 0.018 $\pm$ 0.001 <sup>d</sup>    | 7.58 $\pm$ 1.13                 | 3.74 $\pm$ 0.55 <sup>d</sup>    |
|     | T <sub>4</sub> | 9   | 29.54 $\pm$ 7.03 <sup>a</sup>   | 19.22 $\pm$ 3.66 <sup>d</sup>    | 0.026 $\pm$ 0.001 | 0.019 $\pm$ 0.001 <sup>d</sup>    | 7.77 $\pm$ 0.70                 | 3.61 $\pm$ 0.37 <sup>d</sup>    |
|     | T <sub>5</sub> | 9   | 31.02 $\pm$ 4.21 <sup>a</sup>   | 19.88 $\pm$ 6.32 <sup>d</sup>    | 0.025 $\pm$ 0.002 | 0.020 $\pm$ 0.001 <sup>d</sup>    | 7.88 $\pm$ 0.84                 | 3.98 $\pm$ 0.63 <sup>d</sup>    |
| 实验组 | T <sub>1</sub> | 9   | 29.20 $\pm$ 3.41                | 18.70 $\pm$ 2.24 <sup>d</sup>    | 0.026 $\pm$ 0.005 | 0.017 $\pm$ 0.002 <sup>d</sup>    | 7.45 $\pm$ 1.55                 | 3.21 $\pm$ 0.48 <sup>d</sup>    |
|     | T <sub>2</sub> | 9   | 25.91 $\pm$ 4.67 <sup>a</sup>   | 13.57 $\pm$ 2.04 <sup>acd</sup>  | 0.025 $\pm$ 0.002 | 0.064 $\pm$ 0.010 <sup>acd</sup>  | 6.58 $\pm$ 0.80                 | 8.71 $\pm$ 2.04 <sup>acd</sup>  |
|     | T <sub>3</sub> | 9   | 43.35 $\pm$ 5.32 <sup>abc</sup> | 31.05 $\pm$ 7.70 <sup>abcd</sup> | 0.026 $\pm$ 0.002 | 0.019 $\pm$ 0.001 <sup>bd</sup>   | 11.27 $\pm$ 1.20 <sup>abc</sup> | 5.98 $\pm$ 0.77 <sup>abcd</sup> |
|     | T <sub>4</sub> | 9   | 41.66 $\pm$ 4.01 <sup>abc</sup> | 20.98 $\pm$ 4.46 <sup>bd</sup>   | 0.026 $\pm$ 0.003 | 0.006 $\pm$ 0.002 <sup>abcd</sup> | 10.88 $\pm$ 1.15 <sup>abc</sup> | 1.27 $\pm$ 0.91 <sup>abcd</sup> |
|     | T <sub>5</sub> | 9   | 38.02 $\pm$ 6.86 <sup>abc</sup> | 22.96 $\pm$ 5.48 <sup>bd</sup>   | 0.022 $\pm$ 0.004 | 0.009 $\pm$ 0.002 <sup>abcd</sup> | 8.36 $\pm$ 2.88 <sup>bc</sup>   | 2.14 $\pm$ 0.96 <sup>abcd</sup> |

注: EPCs: 内皮祖细胞, T<sub>1</sub>: 正常状态, T<sub>2</sub>: 注射脂多糖(LPS)前, T<sub>3</sub>: 注射 LPS 后即刻, T<sub>4</sub>: 注射 LPS 后 24 h, T<sub>5</sub>: 注射 LPS 后 48 h; 与本组 T<sub>1</sub> 比较, <sup>a</sup>P<0.05; 与本组 T<sub>2</sub> 比较, <sup>b</sup>P<0.05; 与对照组同期比较, <sup>c</sup>P<0.05; 与本组同期骨髓比较, <sup>d</sup>P<0.05

T<sub>1</sub> 时大幅升高(P<0.05), 之后迅速下降, 后期仍低于 T<sub>1</sub> 时(均 P<0.05)。对照组骨髓中 EPCs 绝对数值无显著变化; 外周血 EPCs 在创伤早期短暂上升后逐渐回归到正常水平。



注: EPCs: 内皮祖细胞, FITC: 异硫氰酸荧光素, PE: 藻红蛋白  
图 1 创伤后多器官功能障碍猪正常状态下(左)和注射脂多糖前(右)外周血 EPCs 的流式细胞仪散点图



注: EPCs: 内皮祖细胞, FITC: 异硫氰酸荧光素, PE: 藻红蛋白  
图 2 创伤后多器官功能障碍猪正常状态下(左)和注射脂多糖后 24 h(右)骨髓中 EPCs 流式细胞仪散点图

### 3 讨论

1997 年 Asahara 等<sup>[5]</sup>首先从外周血单个核细胞里分离出一种被称为 EPCs 的祖细胞亚群, 这些细胞具有在体内外增殖、迁徙和分化为成熟内皮细胞的能力。EPCs 在外周血中的含量非常少, 具体数量各家报道不一。在胚胎期, 内皮细胞系与造血细胞系来源于血岛内共同的祖先细胞; 出生后 EPCs 存在于骨髓, 并可被转移至外周血参与缺血组织的血管重建和血管的内膜化。近几年的动物实验和临床

研究均显示, EPCs 在体内受到多种因素如药物、血流动力学以及炎症过程中各种细胞因子的影响<sup>[6-8]</sup>。

目前研究的 EPCs 主要有两类: 一类是来源于骨髓和刚刚被动员进入外周中的早期 EPCs, 它们都表达 3 种祖细胞分子标志, 即 CD133(AC133)、CD34 和 VEGFR-2/KDR, 而不表达 VE-钙黏素和血管性血友病因子(vWF); 另一类是晚期 EPCs, 即早期 EPCs 释放入外周血后或经体外培养后逐渐失去 CD133 表型等祖细胞特性, 并开始表达内皮系特征性分子标志的 EPCs, 如血小板内皮细胞黏附分子-1(CD31)、vWF、KDR、VE-钙黏素和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)等, 同时可吞噬乙酰化低密度脂蛋白(Ac-LDL)和荆豆凝集素(UEA-1)<sup>[9]</sup>。CD34 是造血干细胞的重要标志, 在胚胎早期血管也有表达, 因而通常被认为是识别 EPCs 的主要标志之一, 既往的实验均利用 CD34<sup>+</sup> 的免疫磁珠或免疫荧光进行 EPCs 的分选。但 2001 年 George 等提出了 CD34<sup>-</sup> EPCs 的概念。He 等<sup>[10]</sup>从成体骨髓中分离出一种 CD133<sup>+</sup>、KDR<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、VE-钙黏素<sup>+</sup> 的多潜能祖细胞, 这些细胞在体外经过促血管表皮生长因子(VEGF)诱导培养可增殖分化为 CD31<sup>+</sup>、KDR<sup>+</sup> 的成熟 EPCs, 证实这些细胞也属于 EPCs 的范畴。因此, 如果利用 CD34 进行 EPCs 的分选, 将会损失很多 CD34<sup>-</sup> 的 EPCs。有三方面的证据表明 CD133<sup>+</sup> 和 KDR<sup>+</sup> 细胞主要是 EPCs<sup>[6-8]</sup>。因此我们选择 CD133 和 KDR 对本标本中的单个核细胞进行了流式细胞仪的双标检测, 表达双阳性的细胞即为 EPCs。

EPCs 从骨髓到外周血并参与血管损伤处或缺血区域新生血管形成发挥修复作用一般分为动员、归巢和分化等步骤。EPCs 的动员和归巢是指 EPCs 从骨髓释放到外周血并迁移到组织缺血或内皮损伤

部位,黏附、结合到病灶部位的过程。EPCs的动员主要在骨髓的微环境中进行,某些细胞因子、趋化因子如 VEGF、血小板源性生长因子(PDGF)、血管生成素-1、成纤维细胞生长因子(FGF)和干细胞因子(SCF)等在EPCs动员中发挥促进作用<sup>[11]</sup>。研究显示:当机体创伤后出现局部组织或器官缺血、缺氧时,血管壁损伤或冠状动脉形成血栓等均可导致低氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )表达增加,HIF-1 $\alpha$ 可对其下游基因,如促红细胞生成素(EPO)、VEGF等转录进行调节<sup>[11-13]</sup>,而VEGF通过作用于EPCs表面的VEGFR-1、VEGFR-2,诱导EPCs动员、增殖并调节黏附分子表达<sup>[13]</sup>。最近,Smadja等<sup>[11]</sup>研究证明VEGF先诱导骨髓CD133<sup>+</sup>细胞表达酪氨酸激酶受体,随后激活VEGFR-2/I型跨膜糖蛋白(NRP-1)依赖性信号通路,通过该信号通路促进骨髓CD133<sup>+</sup>细胞增殖和分化。有研究发现,创伤后细胞外基质(ECM)的重建是EPCs动员的关键步骤,该过程由基质金属蛋白酶9(MMP-9)介导,活化MMP-9使骨髓间质细胞膜结合配体(mKitL)脱离细胞成为可溶性配体(SCF),动员至外周血活化增殖。MMP-9的释放和激活为血管新生过程中ECM重建所必需。MMP-9不但通过促进ECM重建动员EPCs,还可以通过促进SCF释放来发挥作用。

创伤后体内某些细胞因子和趋化因子参与了EPCs归巢,如基质细胞衍生因子-1 $\alpha$ (SDF-1 $\alpha$ )、VEGF等<sup>[14]</sup>。Murayama等<sup>[14]</sup>将含有VEGF的填充物移植到缺血部位,发现可引起移植部位EPCs聚集,促进血管新生,提示VEGF有促进EPCs归巢的作用。此外,SDF-1 $\alpha$ 可通过与EPCs表面的基质细胞源性因子-1(SDF-1)的受体CXCR-4结合,促进EPCs归巢到缺血部位,从而促进缺血组织的血管新生。有研究表明,几乎所有的EPCs都能表达CXCR-4,CXCR-4基因剔除的鼠有很多缺陷,包括不能进行血管新生,说明该受体在血管重建中发挥重要作用<sup>[15]</sup>。当创伤发生时,病变组织SDF-1 $\alpha$ 释放增多,借助这些因子的趋化作用,EPCs归巢至病变部位。单核细胞趋化因子-1(MCP-1)则通过上调整合素的表达来实现EPCs向血管损伤内皮的归巢过程<sup>[16]</sup>。Walter等<sup>[17]</sup>的研究表明,整合素能加快EPCs黏附至血管损伤处;还有P-、E-、L-选择素也参与EPCs的归巢;在使用相应选择素抗体后,EPCs的黏附数量明显减少<sup>[18]</sup>。

本研究结果提示:在MODS的形成过程中,外周循环中EPCs较对照组外周循环中EPCs数量减

少,说明MODS发生发展过程中某些因素对EPCs数量及功能具有影响。结合MODS动物各个时间点的重要器官功能变化以及体内细胞因子的变化,我们推测MODS导致外周循环中EPCs数量改变的机制可能包括以下几种途径:①MODS形成的危险因素可增强氧化应激,直接影响EPCs的动员或生存时间。氧化应激是公认的细胞凋亡促进因素,有研究表明EPCs对诱导凋亡非常敏感,增加了EPCs的凋亡;他汀类药物可提高循环EPCs数量并改善EPCs功能。②由于EPCs参与机体损伤后的修复过程,持续及不断加重的组织、内皮损伤和内皮增生,以及功能障碍可导致EPCs过量消耗甚至衰竭。③在MODS过程中,可能通过减少细胞因子如粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、VEGF等对骨髓EPCs的动员作用,而间接减少EPCs的数量。④在MODS后期外周血中EPCs显著下降,而骨髓中EPCs持续升高可能与某些毒素和细胞因子抑制EPCs释放有关。

#### 参考文献

- [1] 毛岸荣,黄河,方国恩,等.p38丝裂素活化蛋白激酶磷酸化对多器官功能障碍综合征肿瘤坏死因子- $\alpha$ 基因表达调控的影响.中国危重病急救医学,2009,21:518-520.
- [2] Langer H,May AE,Daub K,et al. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. Circ Res, 2006,98:e2-10.
- [3] Pèbay A, Bonder CS, Pitson SM. Stem cell regulation by lysophospholipids. Prostaglandins Other Lipid Media, 2007, 84:83-97.
- [4] 姚宁,方国恩,杜成辉,等.猪多器官功能障碍模型的建立.中华实验外科杂志,2005,22:108-109.
- [5] Asahara T,Murohara T,Sullivan A,et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science, 1997, 275:964-967.
- [6] Wang HY,Gao PJ, Ji KD,et al. Circulating endothelial progenitor cells,C-reactive protein and severity of coronary stenosis in Chinese patients with coronary artery disease. Hypertens Res,2007,30:133-141.
- [7] Moonen JR,de Leeuw K,van Seijen XJ,et al. Reduced number and impaired function of circulating progenitor cells in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther,2007, 9:R84.
- [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. Circulation, 2005, 111:2981-2987.
- [9] Fan CL, Li Y, Gao PJ, et al. Differentiation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> cells in vitro. Acta Pharmacol Sin,2003,24:212-218.
- [10] He T,Peterson TE,Holmuhamedov EL,et al. Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically

- high expression of manganese superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 2021-2027.
- [11] Smadja DM, Bièche I, Helley D, et al. Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with up-regulation of integrin alpha(6). *J Cell Mol Med*, 2007, 11: 1149-1161.
- [12] Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 2004, 110: 1933-1939.
- [13] Capetandes A, Zhuang M, Haque FN, et al. Vascular endothelial growth factor is increased by human pulmonary cells stimulated with *Dermatophagoides* sp. extract. *Allergy Asthma Proc*, 2007, 28: 324-330.
- [14] Murayama T, Tepper OM, Silver M, et al. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol*, 2002, 30: 967-972.
- [15] Sengenès C, Miranville A, Maumus M, et al. Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> progenitor cells; role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells. *Stem Cells*, 2007, 25: 2269-2276.
- [16] Li XQ, Meng QY, Wu HR. Effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cell transplantation on vein microenvironment in a rat model of chronic thrombosis. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120: 2245-2249.
- [17] Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization; a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2002, 105: 3017-3024.
- [18] Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells; a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet*, 2002, 360: 427-435.

(收稿日期: 2010-03-31)

(本文编辑: 李银平)

## • 科研新闻速递 •

### 美托咪定-氯胺酮麻醉可有效稳定失血性休克时的血流动力学指标

失血性休克(HS)是一种病死率很高的急性病症,至今尚无一种能够在手术时有效防止患者心血管系统衰竭的麻醉方法。捷克的科学家最近对用美托咪定-氯胺酮麻醉(MK组,  $n=10$ )和异丙酚-雷米芬太尼麻醉(PR组,  $n=10$ )的HS动物稳定血流动力学指标的效果进行了比较。研究人员将小型实验猪的平均动脉压(MAP)降至 40 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa)并维持 120 min 来建立 HS 模型,结果所有动物存活。HS 早期(30~90 min)MK 组的 MAP 明显高于 PR 组 ( $P<0.05$ ), HS 晚期(60~120 min)MK 组的心率明显低于 PR 组 ( $P<0.05$ )。MK 组的肢体远端血液总量为(1 321±133) ml, 明显大于 PR 组(1 111±246) ml ( $P<0.05$ )。HS 120 min 时所有动物心排量较基础值下降约 50% ( $P<0.01$ ), 但两组间差异无统计学意义。研究人员认为,在猪 HS 模型中,美托咪定-氯胺酮麻醉比异丙酚-雷米芬太尼麻醉能更有效地稳定血流动力学指标,更适合临床应用。

杨明星,编译自《Physiol Res》,2010-04-20(电子版);胡森,审校

### 脓毒症时抑制补体可降低凝血活性从而保护器官功能

严重脓毒症时补体的级联反应和凝血活性升高会引起多器官功能衰竭(MOF)甚至死亡。最近,美国学者应用狒狒脓毒症模型,通过在早期和晚期分别给予补体抑制剂 Compstatin,研究了补体及相关物质对凝血系统和脓毒症治疗的影响。结果显示,Compstatin 可降低脓毒症血浆和组织中补体活性,减少巨噬细胞和血小板在器官中的积蓄;并通过向下调节凝血因子Ⅲ和纤溶酶原激活物抑制剂-1 降低凝血活性,减少凝血标志物,保护血管内皮抗凝血功能。重要器官组织学分析,可见微血管血栓形成减少,血管屏障功能改善,白细胞浸润和细胞死亡更少,表明 Compstatin 还能改善心脏、肝脏和肾脏的功能。研究人员认为,严重脓毒症时补体与凝血系统相互作用促进病情发展,所以抑制补体系统活性、保护重要器官功能可能是一种重要治疗手段。

杨明星,编译自《Blood》,2010-05-13(电子版);胡森,审校

### β-抑制蛋白 2 能够抑制脓毒症性炎症

β-抑制蛋白 2 能够通过 G 蛋白耦联受体改变生物信号,在细胞炎症反应中发挥着重要作用。美国的研究人员选择 β-抑制蛋白 2 阴性小鼠和野生小鼠(WT)采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备动物模型,发现前者的存活率(13%)远低于 WT 小鼠(53%),  $P<0.05$ 。另一组实验小鼠在 CLP 18 h 后收集血液、腹腔灌洗液和组织样本并处死,β-抑制蛋白 2 阴性小鼠的血浆白介素-6(IL-6)和盲肠髓过氧化物酶(MPO)分别比 WT 小鼠高出(25±12)倍和(2.4±0.3)倍。组织病理学和集落形成单位计数检测结果显示,与 WT 小鼠相比,CLP 后 β-抑制蛋白 2 阴性小鼠肺损伤更严重,细菌数量更多。分离、培养两种小鼠的脾细胞、腹膜巨噬细胞和骨髓源性巨噬细胞(BMDMs),并在体外用脂多糖(LPS)进行刺激。结果显示,与 WT 小鼠相比,β-抑制蛋白 2 阴性小鼠脾细胞中的肿瘤坏死因子(TNF-α)、IL-6 和 IL-10 分别高出(2.2±0.2)倍、(1.8±0.1)倍和(2.2±0.4)倍(均  $P<0.05$ )。研究人员相信,β-抑制蛋白 2 能够部分抑制多细菌脓毒症中的炎症反应。

杨明星,编译自《Immunology》,2010-05-04(电子版);胡森,审校

# 内皮祖细胞在创伤后多器官功能障碍中的变化及意义

作者: [付文政](#), [毛岸荣](#), [罗天航](#), [方国恩](#), [FU Wen-zheng](#), [MAO An-rong](#), [LUO Tian-hang](#),  
[FANG Guo-en](#)  
作者单位: [第二军医大学长海医院普外科, 上海, 200433](#)  
刊名: [中国危重病急救医学](#) [ISTIC](#) [PKU](#)  
英文刊名: [CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE](#)  
年, 卷(期): 2010, 22(6)  
被引用次数: 1次

## 参考文献(18条)

1. [Moonen JR;de Leeuw K;van Seijen XJ](#) [Reduced number and impaired function of circulating progenitor cells in patients with systemic lupus erythematosus](#) 2007
2. [Wang HY;Gao PJ;Ji KD](#) [Circulating endothelial progenitor cells,C-reactive protein and severity of coronary stenosis in Chinese patients with coronary artery disease](#) 2007
3. [Asahara T;Murohara T;Sullivan A](#) [Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis](#) 1997(5302)
4. [姚宁;方国恩;杜成辉](#) [猪多器官功能障碍模型的建立](#)[期刊论文]-[中华实验外科杂志](#), 2005(1)
5. [Pébay A;Bonder CS;Pitson SM](#) [Stem cell regulation by lysophospholipids](#) 2007
6. [Langer H;May AE;Daub K](#) [Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro](#) 2006
7. [Tateishi-Yuyama E;Matsubara H;Murohara T](#) [Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells:a pilot study and a randomized controlled trial](#) 2002
8. [Walter DH;Rittig K;Bahlmann FH](#) [Statin therapy accelerates reendothelialization:a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells](#) 2002(25)
9. [Li XQ;Meng QY;Wu HR](#) [Effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cell transplantation on vein microenvironment in a rat model of chronic thrombosis](#) 2007
10. [Sengenès C;Miranville A;Maumus M](#) [Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31-progenitor cells:role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells](#) 2007
11. [Smadja DM;Bièche I;Helley D](#) [Increased VEGFR2expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with up-regulation of integrin alpha\(6\)](#) 2007
12. [He T;Peterson TE;Holmuhamedov EL](#) [Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase](#) 2004
13. [Fan CL;Li Y;Gao PJ](#) [Differentiation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood CD34+ cells in vitro](#) 2003
14. [Schmidt-Lucke C;R\(ossig L;Fichtlscherer S](#) [Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events:proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair](#) 2005

15. [Murayama T;Tepper OM;Silver M Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo 2002](#)
16. [Capetandes A;Zhuang M;Haque FN Vascular endothelial growth factor is increased by human pulmonary cells stimulated with Dermatophagoides sp 2007\(3\)](#)
17. [Landmesser U;Engberding N;Bahlmann FH Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase 2004](#)
18. [毛岸荣;黄河;方国恩 p38丝裂素活化蛋白激酶磷酸化对多器官功能障碍综合征肿瘤坏死因子-α 基因表达调控的影响\[期刊论文\]-中国危重病急救医学 2009\(9\)](#)

## 相似文献(6条)

### 1. 学位论文 [杨俊驰 转染hVEGF165-GFP基因的内皮祖细胞对兔MODS模型微血栓形成影响的实验性研究 2010](#)

内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)是存在于外周血、骨髓及组织中,具备定向分化为成熟血管内皮潜能的前体细胞,是一类干细胞群体的总称。在创伤、炎症及失血所导致的组织损伤过程中,骨髓中的EPC可被大量动员,释放入外周血,在VEGF、SDF-1等趋化因子的作用下富集于损伤部位,修复血管内皮,改善局部血供,对组织的修复有着重要的意义。近年来,体外培养EPC用于治疗缺血性疾病及炎症损伤已得到广泛的研究。

<br>

多器官功能障碍综合征(MODS)是指机体遭受严重创伤、休克或感染24h后同时或序贯出现2个或2个以上的系统或器官的功能障碍,是多种疾病最严重的并发症并最终结局。创伤及感染是发生MODS的两个重要诱因,两者均可激活炎症细胞及因子,使机体产生过度的应激及炎症反应,内皮细胞是炎症介质首先打击的靶细胞,其损伤和功能紊乱,导致炎症反应的放大,内环境无法保持稳态,导致MODS的发生。<br>

本实验通过以慢病毒载体介导hVEGF165-GFP基因转染EPC,并观察其对双相迟发MODS动物模型脏器功能、微循环改变的影响,研究异体移植EPC对MODS的治疗作用及相关机制,并探寻其更优方案。<br>

本实验共分为三个部分:一、体外分离、培养及鉴定兔骨髓来源的EPC,检测其增殖、分化及成血管能力,为异体移植提供可靠的技术平台和细胞来源;二、构建慢病毒载体,将VEGF-GFP目的基因转染入EPC,监测细胞增殖功能变化;三、异体移植EPC用于治疗MODS动物,观察移植后重要脏器功能改变、微循环中血栓形成情况以及内皮祖细胞相关细胞因子(MCP-1, ANG-1)的表达情况,评价转染hVEGF-GFP双表达基因的EPC对MODS的治疗效果。<br>

第一部分兔骨髓来源内皮祖细胞的培养及鉴定<br>

本部分旨在建立起兔骨髓来源的EPC的标准化分离、培养、扩增及鉴定的方法,为下一步病毒转染及EPC移植治疗MODS的研究提供技术平台及细胞来源。<br>

密度梯度离心法分离兔骨髓,提取、纯化单个核细胞,按照 $1 \times 10^5/cm^2$ 的密度接种于培养皿内,以含有多种促生长因子(VEGF、bFGF)及胎牛血清的内皮祖细胞专用培养液培养及诱导分化,观察细胞形态、数量变化,并进行传代扩增。对培养的P3代EPC进行形态学特征、超微结构、表面抗原(CD133、CD31、KDR)及吞噬实验(FITC-UEA-1、DiI-ac-LDL)、体外血管生成功能等检测及鉴定,以确认培养的细胞即是EPC,为后文的移植治疗做好准备工作。<br>

结果显示:培养24-48小时后即出现梭形贴壁细胞,培养6-8天为细胞增殖高峰,可观察到集落形成。消化传代后,检测P3代细胞,电镜下可见内皮细胞特异性标志Weibel-Palade小体;细胞表面抗原检测表明CD133阳性率为4%,CD31及KDR阳性率超过90%;贴壁细胞可特异性摄取了DiI-ac-LDL和FITC-UEA-1,表现出内皮细胞的特征。P3代细胞体外生成血管功能检测提示细胞间可相互连接,生成毛细血管网状结构。本部分实验从兔骨髓中分离出单个核细胞,并成功诱导分化出带有干细胞表型及血管内皮细胞特征,能有效形成毛细血管结构的EPC。<br>

第二部分慢病毒载体的构建和内皮祖细胞的转染<br>

本实验部分构建hVEGF/GFP双表达基因慢病毒载体,并转染体外培养的内皮祖细胞,为下一步的细胞移植治疗MODS提供相关的细胞来源。<br>

将预先构建的hVEGF165-GFP双表达盒连接至穿梭质粒pDC315的多克隆位点上。得到重组穿梭质粒pDC315-hVEGF165-GFP。利用酶切技术,将hVEGF165-GFP目的片段连接于慢病毒载体的转移质粒上,构建FUGW/hVEGF165-GFP转移质粒,将慢病毒转移质粒FUGW/hVEGF165-GFP,包装质粒pCMV-del $\Delta$ 8.9及包膜质粒VSVG通过磷酸钙法三质粒瞬时共转染293 FT细胞,得到LV/hVEGF165-GFP,将LV/hVEGF165-GFP与EPC共培养以感染EPC。检测转染后细胞增殖能力。结果表明,目的基因插入慢病毒过表达载体pWXL-MOD后PCR扩增载体片段与目的片段均可表达;EPC经转染hVEGF-GFP双表达基因后均能稳定表达VEGF及GFP,且细胞增殖能力较未转染前显著提高。<br>

第三部分转染hVEGF165-GFP基因内皮祖细胞对兔MODS模型微血栓形成的影响<br>

本部分实验在构建MODS动物模型的基础上,予异体移植体外培养的EPC及转染hVEGF-GFP双表达基因的EPC,观察重要脏器的功能变化及微循环中血栓的形成情况,并检测EPC旁分泌功能相关细胞因子,以了解EPC移植对MODS的治疗作用及相关机制,并探索其更优方案。<br>

健康家兔36只,随机分为三组,予失血性休克及内毒素打击,构建MODS模型;未治疗动物12只作为对照组(0组);12只动物行单纯EPC移植(ET组);12只动物予转染hVEGF-GFP双表达基因内皮祖细胞。移植时间点为内毒素打击后1小时,移植数量为 $1 \times 10^7$ /公斤体重,监测脏器功能变化,动物死亡或观察96h后处死,取脏器行病理学检查,Masson及HE染色后对组织中微血栓进行计数,并采用ELISA法检测组织中MCP-1及ANG-1水平差异。<br>

实验结果提示:移植EPC均能有效改善动物各重要脏器功能,减少微循环中血栓形成,并通过旁分泌机制,促进组织修复,降低MODS发生率及动物死亡率,对MODS有积极的治疗效果。

### 2. 学位论文 [吴波 慢病毒介导hVEGF165-GFP基因转染内皮祖细胞移植治疗MODS后器官微血管密度变化的研究 2010](#)

多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome MODS)是临床重症患者死亡的主要原因之一。其发病机制尚未明确,最新研究认为全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)使得自体修复功能障碍,并进一步造成微血管损伤、微循环障碍,从而引起MODS,同时这可能就是MODS的始发环节。<br>

内皮祖细胞(Endothelial progenitor cell, EPC)是成熟血管内皮细胞的前体细胞,属于干细胞群体,既可不断增殖又能定向分化为成熟的内皮细胞。EPC不仅参与人胚胎血管生成,同时也参与出生后血管新生和血管内皮损伤后的修复过程,是目前研究损伤血管修复的热点之一。<br>

大量的动物和临床实验都已经证明:当组织受到一定程度的损伤时,循环及组织中EPC可以在组织内分化为内皮细胞替换功能受损的内皮细胞、修补裸露的血管内皮损伤区,并参与缺血或损伤组织内新血管生成,从而改善缺血器官的功能;然而,当机体受到过度的损伤刺激时,EPC的分化、迁徙功能也会发生严重障碍,则会导致损伤部位微循环严重损害而无法得到修复,从而发生器官功能障碍。<br>

研究显示,VEGF基因修饰的EPC移植治疗创伤后缺血性疾病,将可能最大程度的发挥两者促血管再生作用,移植VEGF基因修饰的EPC可以显著降低MODS的发生率,并改善MODS的预后。为此,本文从EPC对自体修复的角度出发,探讨携带VEGF-绿荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)双表达基因慢病毒转染EPC后的细胞特性及移植慢病毒介导hVEGF165-GFP基因转染的内皮祖细胞预防和治疗MODS的理论依据。<br>

本研究共分为四部分,首先通过内毒素+失血性休克制造出MODS的家兔动物模型,同时在体外建立起EPC培养和鉴定体系,由慢病毒(LV)转染VEGF-GFP双表达基因的EPC,将体外培养增殖转染EPC移植入MODS的动物,观察移植后MODS的发生率和重要脏器的微血管密度改变情况,评价移植转染VEGF-GFP双表

达基因的EPC防治MODS的效果, 并对其作用机制进行初步探讨。<br>

第一部分多器官功能障碍动物模型的建立<br>

在本研究的第一部分我们首先成功地复制了双相迟发型的家兔MODS模型, 为创伤后多器官功能障碍的相关研究提供了实验基础。<br>

将体重 $2.52 \pm 0.27$ kg健康雄性家兔随机分为2组: 实验组(MODS)12只, 施行失血性休克+内毒素血症复合因素; 对照组(C)12只, 施行假手术, 予以颈动静脉置管, 不实施失血及内毒素注射。监测各重要器官功能变化, 并行主要器官病理形态学检查(大体、光镜)。结果显示各重要器官功能下降或衰竭。病理学改变主要表现为炎症为主的非特异性改变。实验组MODS发生率为83.3%, 死亡率为75.0%, 显著高于对照组。本实验采用二次打击, 与临床实际相符, 且MODS的发生率及死亡率均高, 操作简单, 容易复制, 是一个较成功的动物模型。<br>

第二部分携带VEGF-GFP双表达基因慢病毒载体的建立及体外转染内皮祖细胞<br>

本部分通过建立可稳定携带VEGF-GFP的双表达基因的慢病毒载体, 并转染体外培养的内皮祖细胞, 为下一步的回输治疗提供充足的细胞源。<br>

hVEGF165的PCR引物并扩增, 经酶切、连接转化至含GFP的慢病毒表达载体: pWPXL-MOD后挑取阳性克隆, 利用限制性内切酶BamH1、Mlu1双酶切后经电泳鉴定并测序。含VDGF-GFP的表达载体pWPXL-MOD与慢病毒包装质粒: pRsv-REV, pMD1g-pRRE, 及包膜质粒pMD2G共同组成四质粒系统, 通过磷酸钙法共转染293T细胞后获得慢病毒颗粒, 经浓缩后可获得高滴度的LV-VEGF-GFP。在MOI值=50的条件下与EPC共培养以感染EPC。对LV/hVEGF165-GFP-EPC进行增殖功能进行检测。结果表明, 目的基因插入慢病毒过表达载体pWPXL-MOD后经PCR扩增, 证实载体片段与目的片段均可表达, 并且基因测序报告显示: 重组质粒的插入片段序列与目的基因VEGF的CDS序列一致, 成功构建并包装了慢病毒载体, 并证实EPC经LV/hVEGF165-GFP转染后其增殖功能较未转染EPC提高。<br>

第三部分慢病毒介导hVEGF165-GFP基因转染内皮祖细胞移植治疗MODS后器官微血管密度变化及意义<br>

本部分旨在探讨移植慢病毒介导hVEGF165-GFP基因转染的内皮祖细胞对家兔创伤后多器官功能障碍治疗的有效性和安全性的研究, 同时比较单纯移植EPC治疗MODS的疗效差异。<br>

构建动物模型, 将达到MODS的动物随机分为三组, 单纯EPC移植组(ET)12只和转染内皮祖细胞移植组(VT)12只, 在固定时间点, 分别以 $1 \times 10^7$ 个细胞/kg(体重)的剂量进行移植治疗。同时以未行任何干预的MODS(M组, 12只)作为对照组。<br>

结果显示: 慢病毒介导hVEGF165-GFP基因转染内皮祖细胞移植组(VT)的MODS发生率和动物死亡率均低于单纯移植EPC组(ET)和对照组, 各重要器官的免疫学检测显示微血管密度明显高于单纯移植EPC组(ET)和对照组, 提示移植VEGF修饰的内皮祖细胞可以有有效的促进创伤后的修复, 防止MODS的发生和发展, 同时可改善MODS动物的预后以及延长生存时间。

### 3. 期刊论文 [毛岸荣, 方国恩, 周虹, 马立业, 毕建威, 罗天航, 付文政, 华积德, MAO An-rong, FANG Guo-en, ZHOU Hong,](#)

#### [MA Li-ye, BI Jian-wei, LUO Tian-hang, FU Wen-zheng, HUA Ji-de](#) [白介素-1 \$\beta\$ 在猪多器官功能障碍综合征中对内皮祖细胞的调控](#) -中华急诊医学杂志2009, 18(6)

目的 探讨猪多器官功能障碍综合征(MODS)中p38MAPK介导的白介素(IL)-1 $\beta$ 对内皮祖细胞(EPC)的数量与功能的调控, 从血管内皮祖细胞分化障碍来研究创伤后MODS的发病机制。方法 将30头家猪随机分为MODS组(n=15, M组)、对照组(n=15, C组), 采用失血性休克+内毒素血症的“二次打击法”建立猪MODS模型, 在体内Western-blot法检测外周血单核细胞p38MAPK的磷酸化变化; ELISA法测定外周血血浆IL-1 $\beta$ 的浓度变化; 流式细胞仪检测外周血EPC数量的变化; 采用x2检验比较M组与C组的MODS发生率, 采用成组t检验比较M组与C组的p38MAPK的磷酸化变化、外周血血浆IL-1 $\beta$ 的浓度变化与外周血EPC数量的变化。结果 在MODS中外周血单核细胞p38MAPK的磷酸化增强, 导致其外周血IL-1 $\beta$ 浓度升高, 从而使得外周血EPC数量下降, M组MODS的发生率均明显高于C组(P<0.01); M组的外周血单核细胞p38MAPK的磷酸化与外周血血浆IL-1 $\beta$ 的浓度明显高于C组(P<0.01); M组外周血EPC数量明显低于C组(P<0.01)。结论 在猪MODS的发病机制中, 外周血单核细胞内的p38MAPK的磷酸化使血浆IL-1 $\beta$ 浓度升高, 使EPC的数量下降, 致使MODS的炎症反应加重。

### 4. 学位论文 [付文政](#) [内皮祖细胞在小型猪创伤后多脏器功能障碍的变化及意义](#) 2008

1997年Asahara等首先从外周血单个核细胞(peripheral mononuclear cells PMCs)里分离出一种被称为内皮祖细胞(endothelial progenitor cells EPCs)的祖细胞亚群, 这些细胞可以在体内外增殖、迁徙, 并能分化为成熟内皮细胞。多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome MODS)是临床危重患者死亡的主要原因之一。目前其发病机制尚不完全明确, 临床上尚缺乏令人欣喜的治疗措施。随着干/祖细胞研究的不断深入, 多器官功能障碍综合征的发病机制研究和临床治疗面临着新的契机。有研究表明, 机体损伤后血循环中具有多向分化潜能的祖细胞一方面可以在某些细胞因子作用下动员、增殖、迁徙入损伤器官, 分化为相应的内皮细胞进行损伤修复; 另一方面内皮细胞不仅是炎症反应的参与者, 还是首先受损的靶细胞, 并进而造成微血管损伤、微循环障碍, 这可能是器官功能障碍的始发环节。大量的动物和临床实验都已经证明: 当组织受到损伤时, 尤其是缺血性损伤时, 循环及组织中EPCs动员和增殖能力增强, 并可以在组织内分化为内皮细胞替换功能障碍的内皮细胞、修补裸露的血管内皮损伤区, 并参与缺血或损伤组织内新血管生成, 从而改善缺血器官的功能; 而如果创伤后EPCs的分化、迁徙功能发生严重障碍, 则会导致损伤微循环严重损害而无法得到修复, 甚至发生器官功能衰竭。

本实验利用猪骨髓体外培养出EPCs并传代扩增, 探讨它的培养条件增殖规律, 并对培养的EPCs进行鉴定。利用“二次”打击法建立小型猪MODS动物模型。用流式细胞仪测定外周血和骨髓中内皮祖细胞的数量, 找出外周血和骨髓中内皮祖细胞在打击后出现MODS过程中升高和降低的规律。整个实验分三部分论述:

第一部分 研究小型猪骨髓EPCs的体外分离、定向分化、扩增培养方法, 为EPCs移植应用临床提供实验依据。

方法: 抽取小型猪新鲜骨髓20ml, 用密度梯度离心法从中分离单个核细胞, 将单核细胞悬液按 $1 \times 10^6$ /ml密度接种于直径10厘米含血管内皮生长因子等各种添加剂的内皮细胞系列专用培养液培养皿中培养, 诱导其向内皮细胞分化, 观察经过不同时间培养后的细胞生长情况并进行EPCs诱导分化后的生物学鉴定, 包括细胞免疫组化鉴定、流式细胞仪检测细胞表面、Di1标记的乙酰化低密度脂蛋白(Di1-acLDL)摄取试验、超微结构鉴定、体外血管生成实验。

结果: 培养2天可出现贴壁细胞增大变形, 6天后梭形细胞数明显增多, 部分成鹅卵石状贴壁生长, 进而形成细胞网或者管腔样结构。培养后的细胞传至第3代后, 用CD133、CD34和VEGFR-2单抗免疫组化化学检测为阳性, FITC-UEA-1和Di1-acLDL双吞噬实验为阳性, 血管生成实验为阳性, FCM检测贴壁细胞高表达VEGFR-2(76.6±21.4%), CD34(26.4±5.39%), 和CD133(16.4±2.25%), 鉴定为EPCs。10d后出现多个细胞簇, 呈集落样生长, 14d左右可观察到条索状、网状血管样结构, 原代细胞培养21d左右接近融合并且呈典型的鹅卵石样排列。第7-14d有大于98%的细胞Flk-1, vWF, CD31表达阳性, CD34+细胞为(26.0±2.82)%, 有95%以上的细胞Di1-acLDL摄取试验阳性, 在血管生成实验中, 血管内皮生长因子显著促进EPCs形成小管的数量与复杂程度, 呈一定的量效关系。

结论: 密度梯度离心法体外分离骨髓中单个核细胞可以用于进行EPCs培养实验研究, 单个核细胞在一定的诱导培养条件下能分化成为血管内皮细胞。贴壁因子、血管内皮生长因子等对于体外培养EPCs有很重要的作用。

第二部分 利用改良Wiggers方法复制失血性休克模型, 再次打击(失血性休克+复苏再灌注+二次打击(内毒素)复合因素成功建立猪MODS模型。

方法: 19头猪随机分为实验组(M组, 失血性休克+复苏再灌注+内毒素组, n=10); 正常对照组(C组, n=9), 通过给猪放血使平均动脉压50±5mmHg, 维持1.5-2h, 然后回输60%所失血液和两倍平衡液复苏, 12h后由静脉持续滴入内毒素( $\sigma$ ), 剂量1mg/kg, 24小时滴完。连续动态监测心、肺、肾、肝、胃肠等功能, 七天处死存活动物。用自动分析仪检测各时间点ALT、AST、Cr、BUN、CO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>等指标, 观察主要器官病理形态学变化。

结果: M组外周血ALT、AST、Cr、BUN均明显升高, 动物死亡前显著高于正常值(P<0.01), CO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>明显下降(P<0.01); 病理学改变主要以非特异性炎症改变为主。M组各器官的衰竭率: 肺80.0%(8例), 胃肠道70.0%(7例), 肝50.0%(5例), 肾30.0%(3例), 心功能障碍(2例)20.0%, MODS发生率90.0%(9例), 死亡率达80.0%(8例), 显著高于对照组。

结论: 利用二次打击方法, 可以成功复制出动物MODS模型, 且模型MODS发生率高, 死亡率高, 与临床典型的双相迟发MODS相似重复性好。

第三部分 观察小型猪骨髓内皮祖细胞在创伤后多器官功能障碍的变化及意义, 找出外周血和骨髓中内皮祖细胞在打击后出现MODS过程中升高和降低的规律。

方法: 在整个动物实验过程中的不同时间点(设五个时间点T1、T2、T3、T4、T5)抽取骨髓和外周血各3ml, 取1ml加入红细胞裂解液后在显微镜下行“四格法”计数, 计算出每毫升标本中自细胞的数量, 取出流式试管加入标本和CD133、KDR的一抗和二抗, 用流式细胞仪测定外周血和骨髓中内皮祖细胞的数量, 以计数所得白细胞的数量乘以流式所得百分含量, 得出EPCs数值, 对结果进行统计学分析。

结果: 正常骨髓和外周血EPCs数量为7.64±0.68×10<sup>6</sup>/L, 3.54±0.26×10<sup>6</sup>/L。骨髓白细胞和外周血白细胞先有明显下降之后明显升高(P<0.05), 但是外周血白细胞上升不如骨髓中白细胞上升幅度大(P<0.05)。流式细胞仪结果显示骨髓中EPCs的含量在受到创伤后明显升高(P<0.05)。外周血中EPCs的

含量在创伤早期(T2、T3)显著升高( $P < 0.01$ ),之后下降。特别在出现MODS后持续下降,病情越重下降幅度越大( $P < 0.05$ )。

结论: 小型猪正常骨髓EPCs数量外周血中的数量; 创伤后MODS过程中血液中的内皮祖细胞先出现明显升高,然后迅速下降; 创伤后骨髓EPCs略有下降,后明显升高,出现MODS后下降,死亡前明显下降。结论: 利用密度梯度离心法体外分离骨髓中单个核细胞可以用于进行EPCs培养研究, 体外培养EPCs可以成功传代扩增。单个核细胞在一定的诱导培养条件下能分化成为血管内皮细胞, 贴壁因子、血管内皮生长因子等对于体外培养EPCs有很重要的作用。利用“二次”打击法可以成功复制出动物MODS模型, 且模型MODS发生率高, 死亡率高, 与临床典型的双相迟发MODS相似重复性好。在此基础上用流式细胞仪测定外周血和骨髓中内皮祖细胞的数量, 找出外周血和骨髓中内皮祖细胞在打击后出现MODS过程中升高和降低的规律。小型猪正常骨髓EPCs数量高于外周血中的数量; 创伤后MODS过程中血液中的EPCs先出现明显升高, 然后迅速下降; 创伤后骨髓EPCs先略有下降, 后明显升高, 出现MODS后下降, 死亡前明显下降。

## 5. 学位论文 毛岸荣 p38丝裂原活化蛋白激酶在猪MODS中对内皮祖细胞的调控机制的研究 2008

多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome MODS)是临床危重患者死亡的主要原因之一。目前其发病机制尚不明确, 临床治疗上缺乏有效的手段。1997年, Asahara等首先从外周血单个核细胞(PBMCs)里分离出一种被称为内皮祖细胞(EPC)的祖细胞亚群, 这些细胞具有在体内外增殖、迁徙和分化为成熟内皮细胞的能力以来, 干/祖细胞技术和理论得到了迅猛发展, 多器官功能障碍综合征的发病机制研究和临床治疗也面临着新的契机。有研究表明, 机体损伤后, 血循环中具有多向分化潜能的祖细胞一方面可以在VEGF等生长因子作用下动员、增殖、迁徙入损伤器官, 分化为相应的内皮细胞进行损伤修复; 另一方面内皮祖细胞不仅是炎症反应的参与者, 还是首先受损的靶细胞, 并进而造成微血管损伤、微循环障碍, 这可能是器官功能障碍的始发环节。大量的动物和临床实验都已经证明: 当组织受到损伤时, 尤其是缺血性损伤时, 循环及组织中EPC动员和增殖能力增强, 并可以在组织内分化为内皮细胞替换功能障碍的内皮细胞、修补裸露的血管内皮损伤区, 并参与缺血或损伤组织内新血管生成, 从而改善缺血器官的功能; 而如果创伤后EPC的分化、迁徙功能发生严重障碍, 则会导致损伤微循环严重损害而无法得到修复, 甚至发生器官功能衰竭。

近年来, 人们已逐渐认识到MODS是机体对于多种严重创伤的一种过度的、全身性炎症反应的最终结果, 以大量促炎因子(例如: TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等)的过度释放或者抗炎因子(如IL-4、IL-10等)出现释放延迟为标志的过度炎症反应综合征或抗炎反应综合征, 最终导致机体免疫失衡和MODS的发生, 和各种免疫细胞一样, EPC也受到了细胞因子网络的调控。在MODS中, 内毒素与缺血等可以使外周血单核细胞内的p38丝裂原活化蛋白激酶磷酸化, 活化转录因子AP-1, 进而引起TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 基因转录增强, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 产生增多, 进而导致EPC下降, MODS加重。

本研究拟在建立猪MODS动物模型和EPC体外培养和鉴定实验体系基础上, 研究观察猪各主要脏器功能变化与外周血单核细胞p38MAPK磷酸化变化与TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ mRNA的表达变化和与外周血血浆TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 浓度及EPC数量与功能的变化, 以及在体外用不同浓度的TNF- $\alpha$ 与IL-1 $\beta$ 培养EPC, 观察其数量与功能的变化与EPC内的p38MAPK的变化; 并探讨在MODS中p38MAPK介导的信号传导通路对EPC的调控作用, 从内皮祖细胞分化障碍的角度进一步研究创伤后MODS的发病机制。

全文共分三部分:

第一部分 EPC的体外培养与生物学特性研究。方法: 抽取猪骨髓20ml, 用密度梯度离心法得到单核细胞, 将单核细胞悬液按 $2 \times 10^6$ /ml密度接种于直径10厘米的含有各种细胞因子的培养液中的培养皿中培养, 培养2天可出现梭形细胞, 6天后梭形细胞数目增多, 部分成鹅卵石状贴壁生长, 进而形成细胞网或者管腔样结构。培养后的细胞传至第3代后, 在免疫组化鉴定: CD133(+), CD34(+), KDR(+), FITC-UEA-1和DiI-11-acLDL双吞噬实验为阳性, 血管生成实验为阳性, FCM检测贴壁细胞CD133的阳性率: 18.23 $\pm$ 7.12%; CD34的阳性率: 47.71 $\pm$ 14.85%; CD31的阳性率: 71.61 $\pm$ 13.51%; KDR的阳性率: 87.24 $\pm$ 11.40%, 鉴定为EPC。在体外将TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的标准品分别加入第3代EPC, 观察其对EPC的数量、增殖、迁移、贴壁、血管新生功能的影响。结果: 发现其数量与功能与TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 有浓度与时间依赖性下降, 并且有显著的差异( $P < 0.01$ ), 并且与p38MAPK的磷酸化密切相关, 用p38MAPK的特异性抑制剂SB203580(1 $\mu$ mol/L)能减轻EPC的数量与功能下降。结论: 体外TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 通过p38MAPK的磷酸化使EPC数量与功能下降, SB203580能防止EPC数量与功能下降。

第二部分 利用改良Wiggers方法复制失血性休克模型, 首次打击(失血性休克+复苏再灌注)和二次打击(内毒素)复合因素成功建立猪MODS模型。方法: 20头猪随机分为: 正常对照组(C组, n=10), 失血性休克+复苏再灌注+内毒素组(M组, n=10); 通过给猪放血致平均动脉压 $50 \pm 5$ mmHg, 维持1.5-2h, 然后回输60%所失血液和两倍平衡液复苏, 12h后由静脉持续滴入内毒素(sigma, 剂量0.5mg/Kg), 24小时滴完。连续动态监测心、肺、肾、肝、胃肠等功能, 7天后处死存活动物。用自动分析仪检测各时间点ALT、AST、Cr、BUN、CO、PaO<sub>2</sub>等指标, 观察主要器官病理形态学变化。结果: M组外周血ALT、AST、Cr、BUN均明显升高, 动物死亡前显著高于正常值( $P < 0.01$ ), CO、PaO<sub>2</sub>明显下降( $P < 0.01$ ); 病理学改变主要以非特异性炎症改变为主。M组各器官的衰竭率: 肺80.0%(8例), 胃肠道70.0%(7例), 肝50.0%(5例), 肾30.0%(3例), 心功能障碍(2例)20.0%, MODS发生率90.0%(9例), 死亡率达80.0%(8例), 显著高于对照组。结论: 利用二次打击方法, 可以成功复制出动物MODS模型, 且模型MODS发生率高, 死亡率高, 与临床典型的双相迟发MODS相似重复性好。

第三部分 MODS体内单核细胞内p38MAPK的磷酸化对TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 合成、分泌及外周血EPC的数量与功能的影响。方法: 在体内Western-blot法检测外周血单核细胞p38MAPK磷酸化变化与RealTime-PCR法测定TNF- $\alpha$ mRNA、IL-1 $\beta$ mRNA的表达变化和ELISA法测定外周血血浆TNF- $\alpha$ 与IL-1 $\beta$ 浓度变化及FCM检测外周血EPC数量的变化。结果: MODS中外周血单核细胞p38MAPK的磷酸化明显增强( $P < 0.01$ ), TNF- $\alpha$ 与IL-1 $\beta$ 合成与分泌明显增加( $P < 0.01$ )。外周血EPC数量与功能下降( $P < 0.05$ ); 体外TNF- $\alpha$ 与IL-1 $\beta$ 通过EPC内的p38MAPK的磷酸化使EPC的数量与功能下降。结论: 在MODS的发病机制中, 外周血单核细胞p38MAPK的磷酸化使TNF- $\alpha$ 与IL-1 $\beta$ 等炎性因子的转录、合成增加, 血浆TNF- $\alpha$ 与IL-1 $\beta$ 升高, 再次通过EPC内p38MAPK的磷酸化使其数量与功能下降, MODS的炎症病理反应加重。

全文结论: 机体在失血再灌注、LPS等因素刺激下, 引起外周血单核细胞内p38MAPK磷酸化增强, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等细胞因子的合成与分泌增加, 引起EPC内的p38MAPK磷酸化增强, 导致EPC数量与功能下降, 各器官组织的微血管损伤修复能力减弱, 使MODS加重。

## 6. 学位论文 王尧 细胞凋亡在慢病毒介导hVEGF165-GFP基因转染内皮祖细胞移植治疗MODS中变化的研究 2010

多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)是重症监护病房患者的最常见死亡原因。严重的感染和感染性休克是其主要诱因。感染所致的脓毒症及非感染所致的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory responsesyndrome, SIRS)相互作用, 构成了一个复杂的网络。目前其发病机制尚不完全明确, 临床上尚缺乏满意的治疗措施。随着干/祖细胞研究的不断深入, 多器官功能障碍综合征的发病机制研究和临床治疗面临着新的契机。<br>

近年来研究发现: 骨髓中有一群能够在生理性或病理性因素的刺激下, 动员到外周血并分化为成熟内皮细胞(Endothelium cell, EC)以促进血管新生, 并可以分化为相应的组织细胞进行损伤修复的祖细胞, 这些细胞被称为内皮祖细胞(Endothelialprogenitor cells, EPCs)。EPC过去被认为是胚胎时期血管新生最主要的细胞, 而越来越多的证据显示EPCs也是出生后生理性及病理性血管形成最主要的细胞, 并参与心、肝、肺、肾等单个器官障碍时的修复; 同时迁徙到损伤部位的EPC还可以对不同的局部刺激(包括缺氧或缺血)作出生理反应, 依次释放血管活性物质、生长因子以及参与免疫调节的细胞因子和趋化因子, 参与创伤后的炎症反应。<br>

同时研究发现内皮祖细胞不仅是炎症反应的参与者, 还是首先受损的靶细胞, 并进而造成微血管损伤、微循环障碍, 这可能是器官功能障碍的始发环节。大量的动物和临床实验都已经证明: 当组织受到损伤时, 尤其是缺血性损伤时, 循环及组织中EPCs动员和增殖能力增强, 并可以在组织内分化为内皮细胞替换功能障碍的内皮细胞、修补裸露的血管内皮损伤区, 并参与缺血或损伤组织内新血管生成, 从而改善缺血器官的功能; 而如果创伤后EPCs的分化、迁徙功能发生严重障碍, 则会导致损伤微循环严重损害而无法得到修复, 甚至发生器官功能衰竭。<br>

既往研究发现与MODS有关的细胞因子有白介素(IL-1, IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)、血管内皮生长因子(VEGF)、糖皮质激素和细菌产物如内毒素等, 它们在导致SIRS/MODS细胞凋亡中具有潜在作用。通过对某些重要器官的细胞凋亡机制及其影响因素的研究可以更深入的了解MODS的机理, 为临床更好的防治MODS提供实验依据。<br>

本研究通过内毒素+失血性休克制造出MODS的动物模型, 在此基础上进行慢病毒介导VEGF-GFP基因转染EPCs移植治疗, 动态观察移植前后动物生命体征的变化, 血浆中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等炎性因子表达的变化, 以及主要脏器的细胞凋亡情况, 评价移植EPC防治MODS的效果, 并对其作用机制进行初步探讨。全文共分四部分: <br>

第一部分目的: 复制双相迟发型的兔MODS模型, 为研究移植内皮祖细胞防治创伤后多器官功能障碍的研究提供实验基础。方法: 将体重 $2.52 \pm 0.27$ Kg健康雄性家兔随机分为2组: 实验组(M组)12只, 施行失血性休克+内毒素血症复合因素; 对照组(C)12只, 施行假手术, 予以股动静脉置管, 不实施失血及内毒素注射。用自动分析仪检测WBC、GRAN、SALT、SAST、Cr、BUN、动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>), 以判断器官功能, 7天后处死存活动物, 观察主要脏器的病理改变。结果: 实验组(M组)WBC、GRAN、SALT、SAST、Cr、BUN均明显升高, 动物死亡前显著高于正常值, PaO<sub>2</sub>明显下降。病理学改变主要表现为衰竭器官呈以炎症为主的非特异性改变。实验组MODS发生率为83.3%, 死亡率为75%, 显著高于对照组。结论: 本实验采用二次打击方法, 与临床实际相符, 并且MODS的发生率及死亡率均高, 操作简单, 容易复制, 是一个较成功的动物模型。<br>

第二部分目的：制备携带hVEGF165-GFPs双表达基因的慢病毒载体，体外转染内皮祖细胞，为EPC移植治疗做准备。方法：将目的基因VEGF165插入慢病毒过表达载体pWPXL-MOD，慢病毒包装质粒转染293T细胞，得到LV/hVEGF165-GFP，将LV/hVEGF165-GFP与EPCs共培养以转染EPCs。对LV/hVEGF165-GFP-EPCs进行其黏附、迁徙、增殖和血管生成功能进行检测。结果：慢病毒载体能表达目的基因VEGF，成功构建和包装了慢病毒载体；并证实EPCs经LV/hVEGF165-GFP转染后转染率达99%。其迁徙、增殖和血管生成等功能较未转染EPCs提高， $P < 0.05$ 。结论：LV/hVEGF165-GFP对细胞无毒性，且能提高EPCs的粘附、迁徙及增殖能力。<br>

第三部分目的：研究细胞凋亡在慢病毒介导VEGF165-GFP基因转染EPCs移植治疗MODS中的变化及意义。方法：将体重 $2.52 \pm 0.27$  Kg健康雄性家兔随机分为3组：单纯MODS组(M)12只，施行失血性休克+内毒素复合因素；单纯内皮祖细胞移植组(ET)12只和慢病毒介导VEGF165-GFP基因转染内皮祖细胞移植组(VT)12只，在固定时间点，分别以 $1 \times 10^7$ 个细胞/Kg(体重)和 $1 \times 10^7$ 个转染后细胞/Kg(体重)的剂量进行移植治疗。用自动分析仪检测WBC、GRAN、SALT、SAST、Cr、BUN、动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)，以判断器官功能，7天后处死存活动物，观察主要脏器的病理改变。原位末端(TUNEL)法检测主要脏器细胞凋亡情况。RT-PCR法检测主要脏器caspase3mRNA表达情况。结果：VT组WBC、GRAN、GOT、GPT、Cr、BUN等指标在移植治疗后较M组及ET组均有明显改善，比较有统计学意义。VT组主要脏器细胞凋亡及caspase3mRNA表达均低于M组及ET组， $P < 0.01$ 。VT组动物的MODS发生率和死亡率较M组及ET组明显减少， $P < 0.05$ 。结论：移植慢病毒介导VEGF165-GFP基因转染EPCs治疗MODS，能减少MODS动物的细胞凋亡，明显的改善各个重要脏器的功能，降低动物的死亡率。

## 引证文献(1条)

1. 黄河. 张泓. 瞿颖. 武钧. 李磊. 汤耀卿. 脓毒症大鼠循环内皮祖细胞的数量变化及其意义[期刊论文]-中国危重病急救医学 2011(2)

本文链接：[http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zgwzbjyxx201106008.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwzbjyxx201106008.aspx)

授权使用：qkzgz16(qkzgz16)，授权号：e3b1745c-6f09-491b-b3e7-9ede016c13f8

下载时间：2011年5月9日