

出國報告（出國類別：進修）

皮前驅細胞與動脈硬化之研究：
陰電性低密度膽固醇對血管內皮前
驅細胞的影響

服務機關：台中榮總

姓名職稱：主治醫師曹承榮

派赴國家：美國(德州, 休士頓)

出國期間：98-8-9 ~ 99-8-10

報告日期：99-9-9

摘要:

心血管疾病是我國以及西方已開發國家中，國民健康的一大威脅。心血管疾病的發生來自於多種危險因子，如：年齡、LDL-C 或 TC 濃度、HDL-C 濃度、血壓、糖尿病、吸菸等。各項危險因子的有不同的作用機轉，各種作用加成一起使具有多重危險因子患者的風險明顯增加，危險因子存在的情況越多，就越會增加心血管疾病風險和心血管事件的發生。

LDL-C 是動脈粥樣硬化和心腦血管疾病的重要危險因素，國內外血脂異常治療指南和建議均以 LDL-C 為降脂首要目標。自最早的 4S 研究以來，十幾個里程碑試驗均顯示，Statin 類藥物治療可使穩定性冠心病患者的主要心血管事件相對危險降低 30% 左右，但接受 Statin 類藥物的患者仍有 20% 左右發生心血管事件。

Statin 時代的 殘留心血管風險 (residual cardiovascular risk) 是目前一些學者提出的初步探索性概念，一般指患者已經接受了目前公認的強化降脂、規範控制血壓、目標降低血糖等治療，雖然可以明顯降低心血管事件發生率，但在不同個體中，仍然留有餘地，仍存在較大比例的心血管事件發生或發展風險，即所謂殘留風險。殘留風險可能受許多因素影響，進一步探索全面聯防、綜合、強化控制動脈粥樣硬化相關疾病的危險因素，更大限度地降低心血管事件的剩留風險，是提高現代治療學水準的理想途徑。

貝勒醫學院的陳珠璜教授與楊朝諭教授於 2003 年首度於人類的 LDL-C 中分離出來少量的陰電性低密度膽固醇 (L5)，也陸續地發表此類 LDL 的次族群對各種血管疾病可能的壞影響，因此本次出國進修即是著眼於此，整合過去於台灣的基礎研究成果，其中主要是內皮前驅細胞的研究，期能進一步探索動脈硬化的機轉與可能的治療方法。

目次

- 一、摘要 p. 1
- 二、本文 p. 3-9
- 三、附錄 無

本文

研究目的

膽固醇是肝臟所製造的一種軟性蠟狀物，對身體非常重要，但如果血液中流動太多膽固醇就會在血管壁上堆積成弊，增加心臟疾病與中風的危險。

現在美國一般人的膽固醇平均含量是每一〇〇公撮（milligram）的血清中有二一五公絲（milligram），比起二十年前的二四〇公絲雖然已經降低，但仍嫌過高。根據健康專家的意見，血清中膽固醇的含量應該低於二〇〇公絲，一五〇公絲最為理想。二〇〇至二三九屬於高邊緣，一超過二四〇就能有引發心臟病的高危險性。膽固醇量每增加百分之一，「心臟發作」的機會就增加百分之二。與其他因素——包括高血壓、肥胖、吸菸、糖尿病、家族中有心臟病傾向等現象——合併，更增加危險性，因此即使含量只在高邊緣的人也應該設法降低他們的膽固醇。一般而論，男人罹患心臟疾病的危險性比女人高。

膽固醇中某些成份的含量與膽固醇的總數量一樣重要，尤其是高密度脂蛋白（high-density lipoprotein）與低密度脂蛋白（low-density lipoprotein）。高密度脂蛋白即所謂「好的」膽固醇，能將膽固醇從身體組織中移開；低密度脂蛋白即所謂「壞的」膽固醇，是將膽固醇堆積在血管壁上的罪犯。低密度脂蛋白的含量最好保持每一〇〇公撮的血清中有一三〇至一〇〇公絲，一三〇至一五九屬高邊緣，超過一六〇就算高。

高密度脂蛋白的含量要高才算好，三五以下表示有得心臟疾病的危險。高密度脂蛋白與膽固醇總數量的比率越高越好。

貝勒醫學院陳珠璜教授的研究團隊已發表多篇論文於 *Circulation* 及 *Circulation Research*，證明低密度脂蛋白膽固醇中所含的相對陰電性成分(L5)是引起冠狀動脈疾病的主要原因。L5 的作用機制是經由抑制 fibroblast growth factor-2 之自動調節(autoregulation)與 Akt 訊息傳遞，而造成血管內皮細胞程式性死亡。L5 同時也促使內皮細胞釋放吸附分子，因而刺激單球細胞附著於內皮細胞，啟動血管的發炎反應。L5 抑制血管舒張因子一氧化氮(nitric oxide)的產生，並增加血管收縮因子內皮素(endothelin-1)的分泌，而干擾血管張力的平衡。也引起血管平滑肌細胞增生，因而導致內皮細胞功能失衡，血管結構重塑。L5 也抑制內皮前驅細胞(endothelial progenitor cell; EPC)的分化，限制內皮細胞與血管側枝的形成，因而加速老化。並且 L5 也能經由增加 MAPK 訊息傳導，而活化成熟的內皮前驅細胞之基質金屬蛋白酵素(Matrix metalloproteinases, MMPs) MMP-2 與 MMP-9。也因而更加速血管新生，並增加粥狀斑塊破裂的機率。

血液中內皮前驅幹細胞(endothelial progenitor cell/EPC)是近年來血管生物學上一項重大的發現，研究發現受損的內皮細胞層可以藉由骨髓釋放至血液中的內皮前驅幹細胞來修復，藉以維持血管內皮細胞層的功能性與完整性，而內皮前驅幹細胞在發生缺氧的組織亦被證實具有促進血管新生的作用（postnatal vasculogenesis），新生血管能提供缺氧組織所需要的血液循環，以減少因組織缺氧所造成的器官傷害，促進血管新生亦是近年來用來治療缺氧性心臟病或周邊血

管疾病相當受重視的治療方式之一。臨床研究也發現許多心血管疾病的危險因子，包括高血壓、糖尿病、高膽固醇血症、抽煙及老化等，都被證實會使血液中的內皮前驅細胞的數量與功能下降，此外血液中內皮前驅細胞和血管內皮細胞功能也有明顯的正相關，血液中內皮前驅細胞越少，代表血管內皮細胞功能越差。此外在已患有冠狀動脈疾病患者和 X 症候群病人，其血液中的內皮前驅細胞數目也會較健康人明顯減少，同時在已患有冠狀動脈疾病患者中若其血液中內皮前驅細胞數目越少，未來的預後也會越差。如何藉由提升內皮前驅細胞來減少血管動脈硬化與促進缺氧組織之血管新生，是目前研究之重要課題。

個人相關的前期研究發現早發型冠心病的病人內皮前驅細胞的數量並沒有減少但是有明顯地內皮前驅細胞的功能減損。在周邊動脈硬化疾病的病人內皮前驅細胞的數量以及功能都有明顯的減損。在急性心肌梗塞的病患，則是有明顯增加。若是能夠釐清低密度脂蛋白膽固醇中所含的相對陰電性成分(L5)如何影響內皮前驅幹細胞的功能或是數量，並且能夠找出藉由提升內皮前驅幹細胞來改善血管動脈硬化與增加缺氧組織之血管新生，是未來治療心臟血管疾病相當具有潛力的方向。

過程

針對冠狀動脈疾病高危險群患者，包括：高膽固醇症病患、第二型糖尿病、代謝症候群及長期抽煙者，將其血漿中低密度脂蛋白膽固醇以快速蛋白質液相層析法 (Fast protein liquid chromatography; FPLC) 依電性分離為 L1、L2、L3、L4、L5 五個部分。其中 L1 帶有相對正電性，沒有細胞毒性，是每位正常人血漿中低密度脂蛋白膽固醇均含有的大部分組成。而 L2 至 L5 的負電性則依序增加，L5 為帶有相對負電性最高之低密度脂蛋白膽固醇。正常人血液中偵測不到 L5，但在冠狀動脈疾病高危險群患者的血漿中 L5 的比例顯著增加。

(1) 前瞻性臨床實驗

本人於進修期間，參與了陳教授所主持的其中一項前瞻性臨床實驗：

Effectiveness of lipid-lowering agents on the modulation of atherogenic LDL，該研究利用不同的降血脂藥物的治療，去探討針對減少致病性 L5 最佳的治療方案。本人參與的部分，是臨床醫師的角色，也就使問診紀錄以及理學檢查紀錄，並且負責協調參與研究的臨床護理師以及營養師，收穫良多。該研究於本人回國的同一個月，已完成所有臨床案例的收案手續，後續追蹤的結果將會相當重要。

(2) 基礎實驗已完成部分：

密度梯度離心法獲得人類 EPCs，不同濃度 L5 (B 組 5 mg/L，C 組 10 mg/L，D 組 20 mg/L) 作用於 EPCs，MTT 法檢測 L5 對 EPCs 增殖能力的影響，流式細胞儀檢測 L5 對細胞的凋亡率的影響，硝酸還原酶法檢測細胞培養液中 NO 含

量的變化，觀察 L5 對細胞及其功能的影響。

結果：

(A) L5 對細胞增殖的影響：L5 作用 24 h 後，EPCs 的增殖能力與對照組 (0.260 ± 0.010) 相比，不同濃度的 L5 對 EPCs 增殖均有明顯抑製作用，B 組 (0.189 ± 0.007)，C 組 (0.112 ± 0.008)，D 組 (0.070 ± 0.008)，且隨濃度增加而抑製作用增強，兩兩之間比較差別均有統計學意義，P 均 < 0.001 (n=8)

(B) 流式細胞儀檢測 L5 對細胞凋亡的影響：有文獻報告 EPCs 本身就存在有自身凋亡的現象，在本實驗中觀察到 72 h 後對照組 EPCs 凋亡率為 12.68 ± 0.06 ，與對照組相比，不同組濃度的 L5 對 EPCs 均有促進凋亡作用，B 組 (18.35 ± 0.08)，D 組 (40.37 ± 0.13)，C 組介於 B, D 組之間 (24.22 ± 0.07)，以 D 組更為顯著，不同濃度的 L5 促進凋亡作用組間差異均有統計學意義 (P < 0.001)，且隨濃度增高而促凋亡作用增強 (n=6)

(C) NO 分泌量：NO 是一種有多種生物活性的物質，在心血管系統有許多重要的生理作用，其化學性質活潑，在體內代謝很快；NO 分泌量是內皮細胞功能的標誌，內皮功能障礙通常表現為 NO 分泌量的減少。與對照組 (176.33 ± 0.74) $\mu\text{mol/L}$ 相比，不同濃度的 L5 均可損傷 EPCs 的 NO 分泌量，隨 L5 濃度的增加，NO 分泌量呈不同程度的減少，B 組 (159.10 ± 0.19) $\mu\text{mol/L}$ ，C 組 (129.95 ± 0.11) $\mu\text{mol/L}$ ，D 組 (81.64 ± 0.07) $\mu\text{mol/L}$ 分別與對照組相比 P 值均 < 0.001 (n=6)，表明細胞功能也受到了不同程度的損害。

結論：L5 抑制 EPCs 的增殖，損傷細胞分泌功能，促進細胞凋亡，與臨床上觀察到的冠心患者 EPCs 數量減少可能有一定的關係

(3) 基礎實驗待完成部分：

Project 1

| | |
|-----------------------|--|
| Title | Essential Roles of Integrin in Endothelial Progenitor Cells Functionality |
| Objectives | Review of integrins in EPC functions |
| Approaches | Journal reading and summarizing |
| Major findings | Not many studies addressed specifically on EPC integrins and/or signaling pathways |
| % completion | 70% |
| To be done | To be submitted to ? |

Project 2

| | |
|-----------------------|--|
| Title | HDL prevents atherogenic LDL-mediated angiostasis by activating the Wnt and PI3K signaling pathways |
| Objectives | Non-efflux-relative functions of HDL (non-reverse-lipid-transport) |
| Approaches | <ol style="list-style-type: none"> 1. L5 inhibits EPC-mediated angiogenesis 2. HDL reversed L5's effects 3. Pathways involved in these processes |
| Major findings | <p>Basic proof-of-concept experiments done with good and expected results</p> <p>Need more data on "healthy H1"</p> |
| % completion | 20% |
| To be done | <ol style="list-style-type: none"> 1. Experiments with HDL(also H1~H5 and H1 vs H5) 2. Knock down or block wnt or pi3k/akt 3. HDL after knock down or block wnt or pi3k/akt |

Project 3

| | |
|-----------------------|---|
| Title | GTP cyclohydrolase I overexpression in endothelial cells prevents atherogenic LDL-induced inflammatory cytokines secretion |
| Objectives | GPTCH-1 in key player in eNOS coupling, esp. in EC |
| Approaches | <ol style="list-style-type: none"> 1. Make GNP 2. Conjugate GTPCH-1 plasmid DNA to GNP 3. Transfect ECs then add L5 4. Compare difference of IL-6/MCP-1/ICAM/VCAM |
| Major findings | <ol style="list-style-type: none"> 1. Amplification of target plasmid DNA done 2. GNP manufacturing done |
| % completion | 20% |
| To be done | <ol style="list-style-type: none"> 1. Cell studies 2. Check differences of cytokines after transfection |

Project 4

| | |
|-----------------------|--|
| Title | GTPCH I (or eNOS) overexpression in endothelial progenitor cells prevents atherogenic LDL-induced apoptosis |
| Objectives | eNOS in EPC is important in cell survival EPC armed with GTPCH-1 or eNOS could be a therapeutic agent |
| Approaches | <ol style="list-style-type: none"> 1. Make GNP 2. Conjugate GTPCH-1 plasmid DNA to GNP 3. Transfect EPCs then add L5 4. Compare difference of L5 induced apoptosis |
| Major findings | <ol style="list-style-type: none"> 1. Amplification of target plasmid DNA done 2. GNP manufacturing done |
| % completion | 20% |
| To be done | <ol style="list-style-type: none"> 1. Cell studies 2. Check differences of cytokines after transfection |

Project 5

| | |
|-----------------------|--|
| Title | GTPCH I overexpression in endothelial progenitor cells prevents and reverse MCT-induced pulmonary artery hypertension |
| Objectives | EPCs armed with GTPCH-1 could be a better therapeutic approach for PAH than EPCs alone |
| Approaches | <ol style="list-style-type: none"> 1. Transfect EPCs (source: homologous mice) with GTPCH-1 2. Treat the animal model of PAH with GTPCH1-overexpressed EPCs (prevention and reversal settings) |
| Major findings | <ol style="list-style-type: none"> 1. Amplification of target plasmid DNA done 2. GNP manufacturing done 3. L5 and MCT induced PAH in mice confirmed |
| % completion | 10% |
| To be done | <ol style="list-style-type: none"> 1. Mouse EPC to be cultured and transfected 2. Check differences with/without GTPCH1 transfection |

Project 6

| | |
|-----------------------|---|
| Title | Detection of negatively Charged LDL (L5) in Chronic Smokers the Effectiveness of Treatment with Lipid-Lowering Agents |
| Objectives | L5 is increased in chronic smokers |
| Approaches | Clinical, prospective and observational study |
| Major findings | <ol style="list-style-type: none"> 1. Clinical enrollment done 2. Atorvastatin effectively decreased L5 3. In non-compliant patients, rebound of L5 occurred |
| % completion | 50% |
| To be done | <ol style="list-style-type: none"> 1. Formation of good story and manuscript, try to submit to high impact journal |

Project 7

| | |
|-----------------------|---|
| Title | Detection of negatively Charged LDL (L5) in Patients with Metabolic Syndrome and the Effectiveness of Treatment with Lipid-Lowering Agents |
| Objectives | L5 is increased in patients with MS Treatment with statin, ezetamibe or both will effectively decrease L5 |
| Approaches | Clinical, randomized and placebo-controlled study |
| Major findings | <ol style="list-style-type: none"> 1. Clinical enrollment done 2. Most participants finished 1st blood sample donation 3. Some of the participants finished a 3-month treatment |
| % completion | 50% |
| To be done | <ol style="list-style-type: none"> 1. L5 isolation before and after treatment 2. Analysis of L5 and other parameters 3. Comparison of treatment effects between groups |

Project 8

| | |
|-----------------------|--|
| Title | CLINICAL CORRELATION BETWEEN L5 AND ST ELEVATION MYOCARDIAL INFARCTION: A PILOT STUDY |
| Objectives | L5 is increased in patients with STEMI (or all ACS) |
| Approaches | Clinical, prospective and observational study |
| Major findings | 1. Clinical work sheet formatted 2. Enrollment to be started |
| % completion | 10% |
| To be done | 1. L5 isolation before and after treatment with PCI 2. Analysis of L5 and other parameters 3. Additional analyses of other parameters such as adiponectin and Lp-PLA2 |

心得及建議事項

- (1) 語文的確很重要：在國際醫療會議的場合，可能不需要特別加強。但是進修一年期間，深覺慶幸有加強語文能力，所以可以每天跟實驗室，醫院的夥伴還有鄰居溝通無礙、閒話家常，也能夠進一步做真正的國民交流。
- (2) 〔合作型〕研究相當重要：在德州的醫學與基礎研究風氣相當興盛，科學研究成果也相當豐碩，我的感想是，很多成功的大師或是研究學者，心態都是相當的開明，並且樂於分享及合作，不管專精的領域是否相同，或是不同；是否競爭或是比賽的對象。陳教授常說，某些某些教授也要來尋求合作。當你的雙手伸出去的時候，你的心胸就自然開朗了起來。
- (3) 美國的臨床醫療，目前也是同樣受限於保險制度，因此有許多方面，其實臨床醫師並沒有比台灣的臨床醫師更優秀。甚至為了自我保護，有很多醫師其實是相當的『保守』，很多醫療行為都先想到不會被告，才去著手。讓我聯想到台灣醫師的未來，會不會也走上這一條路呢？
- (4) 進修一年的時間實在飛快，有許多剛剛想出的研究方向，只進行了一部分，建議可以開放某些領域的臨床或是基礎研究者申請一年以上的研究進修期間，這樣才不會中斷或是延後研究成果的完成。