

• 综 述 •

内皮祖细胞的生物学特性与下肢缺血性疾病

卞剑 综述 胡何节 审核

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是内皮细胞的前体细胞,具有持续的自我更新功能以及多向分化潜能。研究发现,EPCs不仅参与胚胎期的血管发生,也存在于成体骨髓、外周血及脐血中,而且它在血管内皮的修复机制中以及在动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)病变发生发展中起着举足轻重的作用。周围血管病变是导致下肢缺血的主要原因,而下肢动脉硬化性闭塞则随着人口老龄化已经成为周围血管疾病的重要组成部分。对于传统手术治疗和介入治疗不能处理的下肢远端动脉广泛病变,EPCs由于其独特的生物学特性逐渐成为治疗这一病变的新方向和新热点。近年来,国内外已经有很多针对EPCs治疗缺血性疾病的报道。本文着重综述EPCs治疗下肢缺血性病变的理论基础和研究进展。

1 EPCs的生物学特性

1.1 EPCs的定义及其表面标志物 EPCs是一类具有持续增殖和多向分化能力的内皮细胞(endothelial cells, ECs)前体细胞,EPCs参与损伤血管的再生和修复。1997年由Asahara等^[1]首次证实人类出生后的外周血中存在能分化为血管ECs的EPCs,随后在人的骨髓中以及胎儿的肝脏和脐带血中也陆续分离出了EPCs。Asahara等首次证明的EPCs为CD34⁺细胞,由于造血干细胞(haemopoietic stem cells, HSCs)及成熟ECs也表达CD34,因此它对于EPCs没有特异性。追溯到代表更早期的HSCs表面标志CD133。实验结果表明,纯化的CD133⁺细胞在体外能分化为ECs。在分化过程中,EPCs明显失去CD133,并开始表达成熟ECs特有的表面标志,如CD31、血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2)和血管性假血友病因子。因此,CD34、

CD133细胞可能是循环中最原始的祖细胞群,而CD34、VEGFR-2可能代表血管壁脱落的成熟ECs。目前一般认为,表达CD34、VEGFR-2及CD133的细胞为EPCs。

1.2 EPCs的分化特性 有很多因素可以诱导EPCs向ECs分化,其中最重要的是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。除了向ECs分化以外,研究提示在不同的诱导环境下EPCs可以横向分化。Miyata等^[2]对骨髓源EPCs研究发现,EPCs经血小板源性生长因子可诱导分化形成平滑肌细胞。Koyanagi等^[3]将新生大鼠心室肌细胞和外周血EPCs混合培养,数天后发现EPCs呈心肌细胞样形态并表达其表面标志。Sales等^[4]研究也发现,体外培养的EPCs经转化生长因子- β 1诱导后,可以由最初的内皮表型(CD31⁺、 α SMA⁻)转变为间充质细胞表型(CD31⁺、 α SMA⁺)并显示间充质细胞特性,提示EPCs可能分化为间充质细胞。但是要证实以上说法必须寻找EPCs新的特异性标志,排除这些EPCs中混杂有其他的干(祖)细胞,只有排除其他干(祖)细胞的存在,最终实现单个细胞培养的模式才能充分证实EPCs的多向分化能力。

2 EPCs与血管形成

血管形成是一个极其复杂的过程,需要多重因素下的协同作用。血管形成包括两种形式:一种称为血管生成(angiogenesis),由原先存在的血管内皮以出芽、分裂、增殖等方式最终形成毛细血管丛。另一种称为血管发生(vasculogenesis),这主要存在于胚胎时期,是在原来没有血管系统的情况下,由EPCs在原位形成新生血管。EPCs促进新生血管形成的机制是通过EPCs自身的增殖、分化而形成新生血管,无需依赖原有的血管系统,它与血管生成

收稿日期:2008-09-08

项目基金:安徽省卫生厅医学科项目(No. 05A027)

作者单位:230001 合肥市,安徽医科大学附属医院血管外科

作者简介:卞剑,男,1981年3月生,江苏省镇江市人,在读硕士研究生,住院医师。E-mail:bianjian2005@tom.com

通讯作者:胡何节, E-mail: huhejie@hotmail.com

有本质区别。EPCs 不仅在胚胎时期参与血管发生,在出生后的缺血下肢、缺血心肌、受伤角膜、损伤皮肤以及肿瘤血管形成处,EPCs 也帮助血管新生。Asahara 等^[5]发现,在动物模型中 EPCs 可定向结合到体内活跃的血管再生部位,参与血管新生;无论是骨髓还是外周血的 EPCs 均能增加毛细血管密度及局部缺血部位的血管再生作用。在实验性颅脑疾病的研究中,研究结果证实^[6],移植 EPCs 对缺血脑组织内的新生血管形成也具有重要的作用。在老年、糖尿病、高脂血症、严重 AS 等情况下往往存在 ECs 的功能受损。因此,ECs 介导的血管生成在临床应用方面受到很大的限制,而 EPCs 介导的血管发生则不受原有血管和 ECs 功能的影响。同时,EPCs 本身可以分泌 VEGF 等细胞因子,它们可以通过自分泌或旁分泌效应促进血管的新生。这为治疗下肢缺血性疾病提供了新的理论支持和指导方向。

3 EPCs 与 AS

血管内皮的损伤和修复保持着动态平衡,维持血管内皮结构以及功能的完整。若血管内皮老化或遭受多重危险因素袭击而打破了平衡,则出现局部修复不全以及炎症反应和细胞浸润,尤其是巨噬细胞在内皮下聚集,吞噬大量脂质形成泡沫细胞,进而粥样斑块形成。生理条件下,轻微受损的血管 ECs 可以通过邻近 ECs 的增殖得到修复,而强烈内膜损害要通过循环中 EPCs 归巢到损伤部位来修复。有研究发现^[7],循环 EPCs 可以归巢到球囊拉伤后的动脉剥脱部位。国内外的许多文献^[8]都详细阐述了 AS 的危险因素会影响人体内 EPCs 的水平,这些危险因素有高血压、血管紧张素 II 增多、高血糖、高胆固醇等,它们均会使 EPCs 的数目及体外血管生成能力下降。值得一提的是近期对尼古丁的研究^[9]发现,低浓度尼古丁可升高 EPCs 水平,而高浓度尼古丁则出现细胞毒性反应,降低 EPCs 水平;吸烟者 EPCs 数量明显低于不吸烟者,戒烟 4 周后 EPCs 水平能恢复至正常。而且,间接吸烟也会损害人体 EPCs 的数量和功能^[10]。对于存在各种危险因素的患者来说,EPCs 的数量和功能均遭到不同程度的破坏,阻碍了血管的修复,为 AS 病变的进展创造了前提条件。由此可以看出,EPCs 对 AS 性疾病的发展起到非常重要的作用:一方面循环中 EPCs 可能参与血管壁内膜的修复,可以阻止 AS 的形成和发展;另一方面,AS 患者的危险因素可能引起 EPCs

数量和功能的下降,影响受损动脉内膜的修复。AS 斑块的不稳定可增加心血管疾病的风险,导致临床事件发生,而斑块基底部微血管会促进斑块破裂,所以抑制斑块内的血管新生对斑块生长和稳定都有利。既然 EPCs 在血管新生中具有重要作用,那么 EPCs 就可能通过促进斑块内部的血管新生,从而促进斑块发展和破裂。在 Hu 等^[11]的研究中发现,移植器官发生 AS 的血管处有来源于循环 EPCs 分化的 ECs,这说明 EPCs 在移植器官 AS 的发生中起作用。所以对于已经发生 AS 患者的 EPCs 的研究还需进一步深入。

4 EPCs 与下肢缺血性疾病

下肢缺血性疾病是血管外科常见的致残性疾病,通常的治疗方法有手术治疗和介入治疗。但对于严重的下肢远端血运不良导致的肢体缺血,上述方法往往无能为力。近年来,基于 EPCs 的细胞移植已成为治疗性血管新生的新方向。细胞移植治疗此类疾病有以下几种方法:(1)单纯补充 EPCs,此类方法费时费力,目前仅有少部分科研应用此方法。(2)单个核细胞(mononuclear cells, MNCs)移植:MNCs 移植是由 EPCs 移植衍生出来的一种血管新生疗法。相对于单纯补充 EPCs,MNCs 移植更加方便、安全、而且同样有效。(3)经体外扩增、转染细胞因子基因后的 EPCs 移植:缺血肢体注射转染 VEGF 的 EPCs 比单纯输注 EPCs 能更有效地促进血管发生,恢复肢体功能。经体外扩增、转染血管基因后的 EPCs 移植可同时进行基因治疗和细胞补充治疗。

4.1 骨髓来源 EPCs 的相关移植研究 目前,MNCs 移植是开展较早、较为广泛的一种方法,而且 MNCs 移植也是现在惟一可以应用于临床治疗的方法。MNCs 的来源可以是骨髓血、外周血或者脐血。成年个体的骨髓 MNCs (bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs)中含有多种干细胞成分,其中 EPCs 含量约占 BM-MNCs 总数的 3%。同时 MNCs 移植还可以提供多种促血管生长因子,因此 BM-MNCs 移植兼具 EPCs 和细胞生长因子的作用。Tateishi-Yuyama 等^[12]首次报道了应用骨髓干细胞移植治疗人的下肢缺血性疾病的临床研究。后来,Miyamoto 等^[13]和 Hasebe 等^[14]也证实骨髓 MNCs 自体移植在肢体缺血治疗中的安全性和有效性。我国宣武医院的谷涌泉等应用相似的方法对下肢严重缺血性疾病进行临床研究,结果也显示出

积极的效果。随后,此项技术逐步开展起来,为部分不能进行手术或者介入治疗的患者带来了福音。BM-MNCs 移植虽然简单易行,但细胞成分复杂,移植这类细胞的作用机制尚需进一步研究。

4.2 外周血来源 EPCs 的相关移植研究 早在2000年,就有研究显示用人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)用于治疗性血管新生。但是由于外周血所含 EPCs 数量有限,它的应用受到限制。近年来,随着干细胞动员药物及血液细胞分离机的广泛应用,使动员骨髓中的干细胞进入外周血循环并进行分离纯化成为可能。常用的动员药物有:粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)。Huang 等^[15]对28例下肢缺血的糖尿病患者应用 G-CSF 动员后进行 PBMCs 的分离和移植,结果显示大部分患者的溃疡、静息痛等症状得到明显缓解,而且多普勒超声检查也显示患肢血流增加,踝肱指数改善,未发现明显不良反应。PBMCs 移植同骨髓 BM-MNCs 移植相比,无多部位骨髓穿刺抽髓的痛苦和不便,患者易于接受,尤其适合高龄、合并症多或不愿抽髓的患者。目前,这种方法已经越来越多的被应用到临床。但是用 G-CSF 动员可出现白细胞增多或血液高凝状态而有可能诱发心绞痛或急性动脉血栓形成,所以可以在动员过程中使用肝素抗凝,减少此类不良反应的发生。

4.3 脐血来源的 EPCs 的相关移植研究 脐带血(umbilical cord blood, UCB)因其来源丰富且制备便利,可以成为可供临床移植用造血干(祖)细胞的重要替代来源,正日益受到国内外学者的高度重视。研究表明,UCB 和骨髓中所含 CD34⁺ 细胞的数量无明显差别,且脐血 CD34⁺ 细胞的增殖分化能力高于骨髓,尤其加入各种细胞因子后,混合集落形成单位、红系造血祖细胞集落数都明显高于骨髓,也高于成人外周血。杨晨等^[16]分离出脐血 CD133⁺ 细胞并将其诱导成 EPCs,再将脐血 EPCs 移植到裸鼠肢体缺血模型,结果显示移植后能促进肢体缺血的恢复,而缺血局部上调的 VEGF 表达可能是 EPCs 定向整合到缺血局部的关键因素。目前,尚无报道 UCB 中分离 EPCs 用于治疗人的缺血性疾病,主要因为目前使用的 UCB 基本都是异体的,移植到别的患者会导致免疫性移植排斥反应。

4.4 EPCs 与基因技术结合的相关研究 用来移

植的 EPCs 数量有限,如何利用有限的 EPCs 更好地促进下肢血管新生,人们进行了祖细胞与细胞因子基因联合应用的研究。VEGF 是目前已发现的促血管生成效应最强的生长因子。Iwaguro 等^[17]将编码 VEGF 的基因转入 EPCs,再用于动物模型当中,结果发现转基因的 EPCs 展示出更强大的增殖、黏附、分泌及整合能力,其血管新生效率比非转染的 EPCs 高出 30 倍。其他学者^[18]进行的研究同样证实了上述观点。最近有学者将碱性成纤维生长因子基因和血管生长素 1 基因转染到 EPCs 的研究^[19],结果显示能进一步促进下肢血管新生,提高组织的血流供应。此外, Jiang 等^[20]报道,人的 EPCs 经过缺氧诱导因子 1 基因转染后,可以诱导细胞内 VEGF 的 mRNA 基因表达,进而促进 EPCs 分泌 VEGF;在体外实验中显示,经转染的 EPCs 可以显著改善大鼠肢体缺血的血流情况。目前,还没有报道人的 EPCs 经过基因修饰后回输人体进行治疗的研究。虽然 VEGF 基因治疗在动物实验阶段中迄今未发现任何危害,但是在理论上仍存在潜在的副作用,例如,其促进血管形成的生物学功能有可能加速潜在的恶性病灶的生长和加速糖尿病患者的视力恶化等。

5 问题与展望

干细胞移植方法给肢体缺血性疾病的治疗带来了很大的希望,但由于这些技术开展的时间不长,基础和临床研究仍存在很多问题,如 EPCs 的纯化和检测;已参与临床试验患者的人数不多,尚缺乏细胞移植的长期安全性的资料;移植细胞的数量与疗效的关系,细胞移植的最佳途径;移植后功能改善的机制等。EPCs 移植的治疗性血管生成已向人们展示出巨大的应用潜能,虽然有许多问题尚需解决,但该手段较传统的治疗方法有着无可比拟的优越性。在不久的将来,采用干(祖)细胞的基因修饰以及细胞因子的联合运用等多种治疗手段,将会为治疗性血管生成带来更加广阔的发展空间。

参考文献

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275: 964-967.
- [2] Miyata T, Iizasa H, Sai Y, et al. Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) induces differentiation of bone marrow endothelial progenitor cells-derived cell line TR-BME2 into mural cells, and changes the

- phenotype. *Cel Physiol*, 2005,204: 948-955.
- [3] Koyanagi M, Urbieh C, Chavakis E, et al. Differentiation of circulating endothelial progenitor cells to a cardiomyogenic phenotype depends on E-cadherin. *FEBS Lett*, 2005,579: 6060-6066.
- [4] Sales VL, Engelmayr GC Jr, Mettler BA, et al. Transforming growth factor-beta1 modulates extracellular matrix production, proliferation, and apoptosis of endothelial progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Circulation*, 2006,114(1 Suppl): 1193-1199.
- [5] Asahara T, Murasawa S. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology*, 2005,20: 36-42.
- [6] Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Endothelial progenitor cells in cerebrovascular disease. *Stroke*, 2005, 36: 1112-1113.
- [7] Werner N, Junk S, Laufs U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res*, 2003, 93: e17-e24.
- [8] Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells; limitations for therapy? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 257-266.
- [9] Wang X, Zhu J, Chen J, et al. Effects of nicotine on the number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *Clin Pharmacol*, 2004,44: 881-889.
- [10] Heiss C, Amabile N, Lee AC, et al. Brief second-hand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function; sustained vascular injury and blunted nitric oxide production. *Am Coll Cardiol*, 2008,51: 1760-1771.
- [11] Hu Y, Davison F, Zhang Z, et al. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation*, 2003,108: 3122-3127.
- [12] Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone marrow cells; a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002,360: 427-435.
- [13] Miyamoto M, Yasutake M, Takano H, et al. Therapeutic angiogenesis by autologous bone-marrow cell implantation for refractory chronic peripheral arterial disease using assessment of neovascularization by ^{99m}Tc -tetrofosmin (TF) perfusion scintigraphy. *Cell Transplant*, 2004,13: 429-437.
- [14] Hasebe H, Osada M, Kodama Y, et al. Therapeutic angiogenesis by autologous transplantation of bone-marrow cells in a patient with progressive limb ischemia due to arteriosclerosis obliterans; a case report. *Cardiology*, 2004,43: 179-183.
- [15] Huang P, Li S, Han M, et al. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care*, 2005,28: 2155-2160.
- [16] 杨晨,张志华,卢士红,等. 脐血内皮祖细胞移植改善肢体缺血的研究. *中华医学杂志*, 2003, 13: 1437-1441.
- [17] Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*, 2002, 105: 732-738.
- [18] Ikeda Y, Fukuda N, Wada M, et al. Development of angiogenic cell and gene therapy by transplantation of umbilical cord blood with vascular endothelial growth factor gene. *Hypertens Res*, 2004,27: 119-128.
- [19] Chen F, Tan Z, Dong CY, et al. Combination of VEGF(165)/angiopoietin-1 gene and endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Eur J Pharmacol*, 2007, 568: 222-230.
- [20] Jiang M, Wang B, Wang C, et al. Angiogenesis by transplantation of HIF-1 alpha modified EPCs into ischemic limbs. *Cell Biochem*, 2008,103: 321-334.

• 启 事 •

2008 年度《中华老年多器官疾病杂志》优秀编委及优秀审稿人

优秀编委:

刘国树 赵玉生 卢才义 曹雪滨 华 琦 方唯一 李文歌 沈路华 唐朝枢 许樟荣 钱方毅
叶大训 魏 盟 鲍云华 黄从新

优秀审稿人:

胡桃红 张新超 谢院生 李菊香 高 伟 张玉霄 高 炜 裴雪涛 龙超良 贺建华