

# 促血管新生研究进展

杨志明 综述, 萧传实 审校

(山西医科大学第二医院, 山西省太原市 030001)

[关键词] 血管新生; 内皮细胞生长因子; 骨髓移植; 内皮祖细胞

[摘要] 血管新生疗法是重症缺血性心脏病和闭塞性动脉硬化症的新治疗措施, 从应用血管生长因子和其基因导入到血管内皮祖细胞移植, 有关血管新生的概念发生了很大变化。本文回顾了血管内皮生长因子基因治疗的基础及临床研究, 对血管内皮祖细胞在血管新生疗法中的应用进行了展望。自体骨髓细胞有可能成为血管新生疗法中的新型材料。

[中图分类号] Q789

[文献标识码] A

血管新生(angiogenesis)是指从原有的血管内皮细胞增殖、游走, 形成新的血管网<sup>[1]</sup>。在正常机体, 只在随性周期变化的卵巢和子宫等特殊器官能够观察到。病理情况下, 在糖尿病视网膜病变及癌症时可以看到显著的血管新生。这种情况下的血管新生是一种病态的、在治疗上需要进行抑制的血管新生。与此相反, 由于动脉硬化或血栓形成等原因而使器官、组织陷于缺血状态, 其侧枝血管的形成, 被视为生理的血管新生, 这是一种在治疗上需要加以促进的血管新生。

血管新生生长因子(angiogenic growth factor)和其治疗应

用是由 Folkman 等<sup>[2]</sup>提出的。血管新生疗法, 就是通过应用血管生长因子或其基因, 促进缺血周围组织的血管新生和侧枝血管形成, 使缺血得到改善的新的治疗方法<sup>[3]</sup>。近年, 由于血管 EPC(endothelial progenitor cell, EPC)在末梢血中的发现, 对血管新生的概念有了新的认识, EPC 和骨髓细胞移植用于血管新生疗法的研究正在进行。

## 1 内皮细胞生长因子和血管新生

各种内皮细胞生长因子在血管新生过程中起很重要的作用。目前受到广泛关注的、具有血管新生活性的内皮细胞生长因子, 包括碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和肝细胞生长因子。1992 年 Yanagisawa 等<sup>[4]</sup>报告了在犬的心肌梗死模型从冠状动脉内给予 bFGF, 使心肌梗死治疗过程及心功能得到改善。1994 年 Takeshita

[收稿日期] 2001-10-15 [修回日期] 2002-02-10

[作者简介] 杨志明, 男, 1961 年出生, 副主任医师, 2000 年至 2001 年在日本关西医科大学从事冠心病介入治疗研究, 主要研究方向为冠心病介入诊断和治疗, 发表论文 20 余篇, 参编著作 2 部。萧传实, 男, 1955 年出生, 主任医师, 硕士研究生导师, 中华医学会山西心血管分会副主任委员, 山西省中青年学科带头人, 研究方向为冠心病的诊断与治疗, 在国内外医学杂志发表论文 46 篇, 主编专著 2 部。

等<sup>[5]</sup>报告了在兔下肢缺血模型,经髂动脉给予 VEGF,促进侧枝血管形成的实验研究。1999 年 Morishita 等<sup>[6]</sup>报告了用兔的单侧下肢缺血模型,经髂动脉给予肝细胞生长因子,侧枝循环得到了明显改善的实验研究。

在内皮生长因子中,用于血管新生疗法资料最多的生长因子为 VEGF,这是因为 VEGF 是血管内皮细胞特异的生长因子<sup>[7]</sup>。而 bFGF 虽然也具有强大的血管新生作用,但其作用是非特异的,它不仅促使内皮细胞增殖,同时也促进平滑肌细胞增殖,可能加重血管狭窄<sup>[8]</sup>。

## 2 血管内皮生长因子基因导入与血管新生

### 2.1 血管内皮生长因子基因治疗的基础研究

1996 年, Takeshita 等<sup>[9,10]</sup>报道了在家兔下肢缺血模型经髂动脉导入 VEGF 基因的实验研究。治疗 30 天后,无论从生理学或组织学检查,都可以看到在缺血部位的侧枝血管形成。聚合酶链反应检查证实,在治疗部位可监测到 VEGF mRNA。同期的 VEGF 末梢血浓度明显低于酶联免疫吸附法测定界限,但在如此低的 VEGF 血浓度下,取得了与重组 VEGF 蛋白动脉注射同等或更明显的侧枝血管形成效果。因此认为,一次的基因导入,能够在导入局部维持 2~3 周的生长因子蛋白分泌,但由于稀释效果,末梢血 VEGF 浓度并不增高,这既消除了低血压的危险性,也可减少全身性副作用的产生<sup>[9~11]</sup>。与此同时, Tsurumi 等<sup>[12]</sup>报道了家兔下肢动脉闭塞性缺血模型肌肉内直接导入 VEGF 基因的实验研究。在基因导入后 3 周内,局部组织有 VEGF 基因的存在及 VEGF 蛋白的分泌。下肢的缺血由于侧枝血管的形成得到改善,组织学检查可以看到大量的新生血管。

### 2.2 下肢闭塞性动脉硬化症的血管内皮生长因子基因治疗

Isner 等<sup>[13]</sup>进行了下肢闭塞性动脉硬化症的基因治疗。治疗对象为有静息疼痛及溃疡坏死而有可能进行截肢手术的下肢闭塞性动脉硬化症患者,通过球囊导管将单体 VEGF-DNA 质粒导入缺血部位,最初用 100~200  $\mu$ g 小剂量治疗,临床效果不显著,当剂量增加到 1 000~2 000  $\mu$ g 时,多数患者安静时疼痛明显减轻,4.8 周后血管造影和核磁共振造影显示出新的血管阴影,缺血部位的循环得到改善。止痛药物使用量减少或停止使用,半数以上患者的下肢溃疡得到治愈,避免了截肢手术<sup>[13~15]</sup>。

导管导入基因的方法,对于股动脉无法穿刺、血管高度钙化及易于形成夹层等无法插入导管的病例难于实施。于是尝试了直接肌肉注射导入基因的治疗方法<sup>[15]</sup>。该法每次肌注 2 000  $\mu$ g 单体 VEGF-DNA 质粒,间隔 4 周重复注射一次,70%~80% 患者造影显示侧枝血管明显增加,临床症状显著改善。与导管导入法一样,无重大副作用发生,只有下肢的一过性浮肿,而方法更为简单,在床旁即可实施。

### 2.3 缺血性心脏病的血管内皮生长因子基因治疗

在对下肢闭塞性动脉硬化症 VEGF 基因治疗的安全性和有效性得到确认的基础上,又开始了对缺血性心脏病 VEGF 基因治疗的临床研究<sup>[16]</sup>。最初选择的治疗对象为 5 例经皮腔内冠状动脉成形术或冠状动脉搭桥术后重症缺血

性心脏病患者,在微创不停跳直视下将 2 mg 单体 DNA 质粒直接注入心肌。术后 2 周心绞痛症状明显改善,服用硝酸甘油的数量由基因治疗前的  $53 \pm 10$  片/周减少到  $9.8 \pm 6.9$  片/周。1~2 月后,经放射性核素心肌显像检查发现,心肌正常血流区域扩大,充盈缺损部位明显减少,经冠状动脉造影亦发现侧枝血管明显增加。1999 年开始了经皮经导管直接将基因注入心肌的方法,较微创不停跳直视下注射更简便而安全<sup>[17]</sup>。

## 3 血管内皮祖细胞与血管新生

广义的血管新生包括二类,其一是在胚胎形成初期,由 EPC 完全形成新的血管的血管形成过程,其二是从原有的血管内皮细胞增殖、游走,形成新的血管,被称为狭义的血管新生<sup>[18]</sup>。过去一直认为,从胎儿期的后期到出生后的所有血管新生均为狭义的血管新生。Asahara 等<sup>[19]</sup>发现,在成人末梢血中也存在 EPC,经细胞培养能够分化为具有内皮细胞特征的细胞。把人的 EPC 标识后,经静脉注入下肢缺血动物模型,在缺血下肢的血管新生区域可以发现带有标识的细胞。提示,出生后成熟机体的血管新生,有可能有 EPC 参与的、象胚胎初期血管形成型的血管新生。

胚胎形成初期的血管形成,开始于以造血干细胞为中心、边缘部为 EPC 的血岛。位于边缘部的 EPC 分化为血管内皮细胞,进一步形成血管壁;位于中心部位的造血干细胞分化为血球系列,形成血液。从解剖学或/和发生学的类似特点上,有理由认为造血干细胞和 EPC 均从成血管细胞分化而来<sup>[20]</sup>。

在成年, EPC 是否亦来源于骨髓? Asahara 等<sup>[21]</sup>制作了转基因鼠的同种骨髓移植模型,该转基因鼠是由血管内皮细胞特异基因的启动基因诱导  $\beta$ -半乳糖苷酶的转基因鼠。在模型上分别制作了移植瘤、下肢缺血、心肌梗死、角膜血管新生、子宫内膜血管新生模型。结果发现,在各自的血管新生部位均发现了骨髓来源的内皮细胞。有作者认为,在成年机体的血管形成, EPC 是根据机体的需要,从骨髓动员到血管新生部位的<sup>[22]</sup>。现在还不清楚由 EPC 血管形成型的血管新生,且在成人的血管新生中占多大的比例。

### 3.1 骨髓细胞移植的血管新生疗法

造血干细胞和 EPC 发生于共同的干细胞,因而认为,成人 EPC 来源于唯一的造血器官骨髓。1996 年, Noishiki 等<sup>[23]</sup>报道了在犬的腹主动脉人工血管置换模型,移植自体骨髓全血后,在人工血管内侧有血管内皮形成。1998 年, Shi 等<sup>[24]</sup>报告了在犬的胸部降主动脉人工血管置换模型,经静脉异体骨髓移植后,用聚合酶链反应法对人工血管内侧再内皮化细胞的基因进行分析,表明移植的骨髓细胞参与了内皮的形成。在体外实验中, CD<sub>34</sub> 阳性细胞在 VEGF 及 bFGF 存在下,能够形成血管内皮细胞。CD<sub>34</sub> 阳性细胞在末梢血中只有骨髓的 0.2%<sup>[25]</sup>。最幼稚细胞—ITC-IC (culture initiating cell) 在 1 mL 末梢血中仅有 2.9 个,为骨髓的 1%<sup>[26]</sup>,提示骨髓细胞有可能提供更多的 EPC 用于血管新生疗法。

Shintani 等<sup>[27]</sup>对家兔单侧下肢缺血模型进行了自体骨髓

单核细胞移植。移植四周后,经血管造影、激光多普勒和缺血组织切片毛细血管密度的观察发现,骨髓细胞移植组侧枝血管及血管新生较生理盐水对照组均有明显增加<sup>[27]</sup>。日本已开始骨髓细胞移植治疗下肢闭塞性动脉硬化症的临床研究,疗效有待进一步观察。

### 3.2 人末梢血来源血管内皮祖细胞移植的血管新生疗法

Kalka 等<sup>[28]</sup>报道了对成人末梢血 EPC 经细胞培养扩增后,将其移植到小鼠下肢缺血模型,促进了小鼠下肢缺血区域的侧枝血管形成的实验结果。因为受到 EPC 数量的限制,为了使较少的细胞亦能维持有效的治疗效果,最近正在进行在 EPC 预先导入 VEGF 基因的实验研究<sup>[29]</sup>。

### 3.3 脐带血来源血管内皮祖细胞的移植

EPC 不仅存在于骨髓和末梢血中,亦有可能在富含未分化干细胞的脐带血中存在。Murohara 等<sup>[30]</sup>用流式细胞仪对脐带血的 CD<sub>34</sub> 阳性细胞进行定量分析后发现,脐带血中的 CD<sub>34</sub> 阳性细胞含量约为成人末梢血的 10 倍。从脐带血分离单核细胞,在内皮细胞培养条件下进行培养,形成无数细胞群落,荧光标识后的追踪观察表明,这些细胞均来源于 CD<sub>34</sub> 阳性细胞,并且发现有内皮细胞的表面抗原。进一步将这些细胞分离直接移植到无胸腺小鼠的缺血部位,可以发现侧枝血管的新生及血流的改善。上述结果表明,以脐带血分离、分化 EPC,有可能用于血管新生治疗。

## 4 结语

血管新生疗法用于缺血性疾病的临床试验已经 5 年,从内皮细胞生长因子基因导入的治疗性血管新生(therapeutic angiogenesis)到 EPC 移植的治疗性血管形成(therapeutic vasculogenesis),对血管新生概念的认识发生了明显变化。EPC 和骨髓细胞移植有可能成为重症缺血性心脏病和闭塞性动脉硬化症新的治疗措施之一<sup>[31]</sup>。

### [参考文献]

- [1] 青木元邦,森下 一. 血管新生を利用した遺伝子治療. 医学のあゆみ, 2000, **192**: 205-208
- [2] Folkman. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971, **285**: 1182-1196
- [3] 竹下 一. 内皮細胞増殖因子 VEGF による血管新生法. 内科, 2000, **85**: 886-892
- [4] Yanagisawa MA, Uchida Y, Nadamura F, et al. Salvage of infarct myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science*, 1992, **257**: 1401-1403
- [5] Takeshita S, Zheng L, Brogi E, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 662-670
- [6] Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, et al. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytotidine supplement therapy. *Hypertension*, 1999, **33**: 1379-1384
- [7] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 1989, **246**: 1306-1309
- [8] Lindner V, Lippi DA, Baird A, et al. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res*, 1991, **68**: 106-113
- [9] Takeshita S, Weir L, Chen D, et al. Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **227**: 628-635
- [10] Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinhal T, et al. Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab Invest*, 1996, **75**: 487-501
- [11] Takeshita S, Losordo DW, Kearney M, et al. Time course of recombinant protein secretion after liposome-mediated gene transfer in a rabbit arterial organ culture model. *Lab Invest*, 1994, **71**: 387-391
- [12] Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation*, 1996, **94**: 281-290
- [13] Isner JM, Investigator P, Walsh K, et al. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*, 1995, **91**: 2687-2692
- [14] Isner JM, Pieczek A, Manor O, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF<sub>165</sub> in patient with ischaemic limb. *Lancet*, 1996, **348**: 370-374
- [15] Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. Constitutive expression of phVEGF<sub>165</sub> after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, 1998, **97**: 1114-1123
- [16] Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial infusion of phVEGF<sub>165</sub> as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*, 1998, **98**: 2800-2804
- [17] Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, et al. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF<sub>165</sub> gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 2000, **102**: 965-974
- [18] 室原丰明. 細胞移植による血部位の... 細胞工学, 2000, **19**: 1172-1177
- [19] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964-967
- [20] Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*, 1992, **116**: 435-439
- [21] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999, **85**: 221-228
- [22] 室原丰明. 内皮前駆細胞と心血管病. 分子心血管病, 2000, **1**: 430-436
- [23] Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y, et al. Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nature Med*, 1996, **2**: 90-93
- [24] Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 1998, **92**: 362-367
- [25] Bender JG, Verzagt KL, Walker DE, et al. Identification and comparison of CD<sub>34</sub> positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood*, 1991, **77**: 2591-2596
- [26] Udomsadi C, Lansdorf PM, Hogge DE, et al. Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. *Blood*, 1992, **80**: 2513-2521
- [27] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 2001, **103**: 897-903
- [28] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 3422-3427
- [29] Asahara T, Iwaguro H, Kalka C, et al. Gene therapy of endothelial progenitor cell for vascular development in severe ischemic disease. *Circulation*, 1999, **100**: F481
- [30] Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 2000, **105**: 1527-1536
- [31] Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 1999, **103**: 1231-236

(此文編輯 文玉珊)