

内皮祖细胞的生物学特性及在缺血性疾病中的应用

崔 斌 综述, 黄 岚 审校

(第三军医大学新桥医院全军心血管内科中心, 重庆市 400037)

[关键词] 病理学与病理生理学; 内皮祖细胞; 综述; 生物学特性; 缺血性疾病

[摘要] 内皮祖细胞是血管内皮细胞的前体细胞。研究发现内皮祖细胞不仅参与胚胎期的血管生成, 也存在于成体骨髓、外周血及脐血中。内源性和外源性因素刺激可动员骨髓内皮祖细胞进入外周血, 参与缺血组织的血管重建和损伤血管的再内皮化过程。因此, 内皮祖细胞在缺血性疾病、血管修复中具有广阔的临床运用前景。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)是能直接分化为血管内皮细胞的前体细胞, 亦称血管母细胞。最近研究发现内皮祖细胞不仅参与胚胎期的血管生成, 而且也存在于成体骨髓、外周血及脐血中, 并参与出生后的血管新生过程。这一发现不仅开拓了干细胞的研究, 也为缺血性疾病的治疗提供了新的策略。

1 内皮祖细胞的来源

胚胎发育过程中的 EPC 起源于胚外中胚层的卵黄囊血岛。在小鼠胚胎发育模型上, 受精卵形成约第 7 天, 卵黄囊的胚外中胚层细胞聚集呈条索或团块状, 形成造血岛。这些细胞团结构进一步发生腔隙性变化, 血岛中心的细胞分化为球形, 成为原始的造血细胞; 位于周边的细胞分化为扁平的原始血管内皮细胞。多个血岛腔隙相互连接成管样结构, 形成原始血管床, 此过程称为血管生成(vasculogenesis)。由于 EPC 和造血干细胞在胚胎时期时的紧密联系, 以及两者之间具有许多共同的细胞表面标志(CD34、CD31、VEGFR-2、Tie-1 和 Tie-2), 因此推测 EPC 和造血干细胞可能共同来源于中胚层前体细胞——一种具有双重分化潜能的血液/血管母细胞^[1]。同一系列的体外培养实验证明, 胚胎小体单细胞克隆具有造血干细胞和血管内皮细胞的双系分化能力^[2]。

首先提示 EPC 存在于成人外周血中的证据为来源于健康人外周血的单个核细胞在体外可获得内皮细胞样表型, 并可在体内参与毛细血管的形成。1997 年 Asahara 等^[3]研究发现在脐带血、成人外周血和骨髓中的 CD34⁺ 细胞、Flk-1⁺ 细胞和 AC133⁺ 细胞离体培养两周后均能分化为内皮细胞, 从而证实成年个体中存在 EPC。体外的人鼠异种、鼠同种异体及兔自体移植证明这些细胞能够归巢并整合进入血管发生部位形成内皮细胞。异体骨髓移植模型研究发现, 成人外周

血中 EPC 来源于骨髓。

2 内皮祖细胞的表面标志

目前对于内皮祖细胞的研究尚处于早期阶段, 其特异性的细胞表面标志尚不十分明确。由于内皮祖细胞和造血干细胞来源于共同的祖先细胞, 两者之间共享许多细胞表面标志, 如 CD34 和 VEGFR-2, 这两个抗原也可被胚胎内皮前体细胞和造血祖细胞共同表达。进一步研究证实, 从骨髓或脐静脉血分离的 CD34⁺ 细胞也可分化为成熟内皮细胞。然而, CD34 和 VEGFR-2 在成熟内皮细胞上也可表达。因此需进一步研究找出 EPC 特有的表面标志。

新近发现的 CD133 是 120 kDa 五次跨膜的糖基化多肽^[4], 在造血组织和非造血组织中均有表达, 随着细胞的分化成熟, 其表达迅速减弱、消失。CD133 表达于早期造血祖细胞, 在分化后不表达, 且不表达于 CD34⁻ 群体^[5]。Peichev 等^[6]报道来源于人胎的肝、脐血和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员的 CD34⁺ 细胞中含有 0.2%~2% 的 VEGFR2⁺ CD133⁺ 细胞, 该细胞悬浮培养时, 在 VEGF、成纤维细胞生长因子(FGF-2)和胶原诱导后, 可增殖分化为成熟的 CD133-VEGFR2⁺ 内皮细胞, 提示 CD34⁺、VEGFR2⁺ 和 CD133⁺ 细胞可能是内皮前体细胞。更重要的是, CD34⁺ VEGFR-2⁺ 的 EPC 都表达 CD133, 而成熟血管内皮细胞上则不表达, 这使 CD133 可能成为有别于成熟内皮细胞的表面标志。CD34⁺ VEGFR-2⁺ CD133⁺ 细胞增殖分化成为 CD34⁺ VEGFR-2⁺ CD133⁻ 的成熟内皮细胞, 这一点从体外培养的结果中得到进一步证实。

近来研究发现, CD34⁻ 造血干细胞和 CD34⁻/VEGFR-2⁺/CD133⁺ 间充质干细胞也可分化成血管内皮祖细胞, 继而分化为成熟血管内皮细胞, 并参与创伤愈合和肿瘤的血管形成^[7]。

3 内皮祖细胞的分离、培养及鉴定

内皮祖细胞可以从骨髓、外周血、脐静脉血及胎肝中分离出来^[6,7]。目前常用的分离方法包括外周血单个核细胞贴壁分离法及包被 CD133 或 CD34 单抗的免疫磁珠吸附法。最

[收稿日期] 2004-06-22 [修回日期] 2005-01-10

[基金项目] 国家自然科学基金(30270568)资助

[作者简介] 崔 斌, 硕士, 医师, 研究方向为冠心病的诊治与预防, E-mail 为 cuibin_xqhospital@126.com。黄 岚, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事冠心病诊治与预防和血管损伤与修复的研究, E-mail 为 huanglans@21cn.com, 联系电话为 023-68755601。

近研究采用 CD133⁺ KDR⁺ 双荧光细胞分选法, 可得到纯度较高的 EPC, 但费用昂贵、分选难度较大。EPC 分离后以 $1 \sim 4 \times 10^6$ 密度接种在纤维连接素包被的培养板上, 用含牛血清的细胞培养基, 加入 VEGF、人成纤维生长因子 2 (FGF-2)、表皮生长因子 (EGF) 和胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 等因子培养。3 天后用 PBS 洗去非贴壁细胞, 换以新的培养基继续培养 7~10 天, 用少量胰蛋白酶消化收集贴壁的梭形细胞。

目前可通过以下方法鉴定 EPC。EPC 与 DiI-acLDL 在一定条件下孵育再与 FITC-UEA-1 反应。倒置荧光显微镜下 DiI-acLDL 呈红色荧光, FITC-UEA-1 呈绿色荧光, 出现双阳性的荧光细胞即被鉴定为 EPC^[8,9]。④应用流式细胞仪检测内皮细胞特异性分子标志, 如 KDR、VE-cadherin、CD31 和 VWF 等。⑤透射电镜观察内皮细胞特有的 Weibel palade 小体。

4 内皮祖细胞的动员、分化和归巢

大部分的内皮祖细胞存在于造血干细胞和骨髓基质细胞提供的造血微环境中^[10], 与骨髓移植过程中造血干细胞的动员和归巢相似, 骨髓中的 EPC 可被动员到外周血中, 并趋化至缺血部位。研究发现损伤性刺激、外源性细胞因子或药物治疗可以增强 EPC 的动员。Takahashi 等^[11] 观察发现, 在兔和鼠的局部缺血模型中, 随着组织缺血程度的加重外周血中 EPC 数量逐渐增加。同样, 在血管损伤、急性心梗、严重烧伤及冠状动脉旁路移植术等病理性刺激下循环中 EPC 数量明显增加。VEGF、GM-CSF、SDF-1、FGF、Ang-1 及 HMG-CoA 还原酶抑制剂均可动员骨髓 EPC 的释放^[11,12]。VEGF 作为血管内皮细胞特异性的有丝分裂原和趋化因子, 无论在胚胎发育过程中还是在出生后血管新生中均发挥重要调控作用, VEGF 能够促进 EPC 的增殖、迁移和趋化^[13]。在鼠缺血模型中, 经 VEGF 处理后发现 EPC 数量明显增加, 增殖和迁移活性大大加强^[14]。Kalka 等^[15] 在转 VEGF 基因治疗肢体缺血的研究中发现随着血清 VEGF 表达水平增高, 外周血 EPC 增加了 219%。这表明 VEGF 对骨髓来源的 EPC 具有很强的动员作用, 继而增加缺血组织的血管新生。

从骨髓动员 EPC 需要具有基质金属蛋白酶 (MMP-9) 的参与。MMP-9^{-/-} 小鼠的干细胞动员受抑制, 且 MMP-9 抑制剂可有效抑制 EPC 的动员。有活性的金属蛋白酶可引起能动员骨髓来源 EPC 的 SCF 释放。研究证明, 胎盘生长因子动员骨髓来源干细胞的机制为上调 MMP-9 的活性, 介导 SCF 的释放^[16]。

究竟何时体内的 EPC 分化为完全分化的、成熟的内皮细胞目前尚不清楚。一种可能是在 CD133 表达消失、内皮特异性表面标志出现的时候; 也可能分化过程始于 EPC 由骨髓迁移至循环系统, 结束于归巢之后。在细胞动员中发挥作用的细胞因子在 EPC 迁移及归巢中同样具有重要作用。

5 内皮祖细胞的应用研究

5.1 内皮祖细胞与内膜修复

内皮功能损伤易引起血管收缩、血栓和动脉粥样硬化。

EPC 参与血管新生和再内皮化对内皮修复具有重要作用。Shi 等^[17] 在移植了同种异基因骨髓犬的胸主动脉植入人工移植物, 3 个月后取出移植物发现存在供者来源的 CD34⁺ 内皮细胞。Dierthe 等^[18] 也得到相似结论。Walter 等^[19] 在颈动脉内膜损伤动物模型上证实骨髓来源的 EPC 可调节内皮损伤部位的再内皮化, 通过修复完整内皮以维持血管稳定的内环境。

5.2 内皮祖细胞与缺血性疾病

在动物后肢缺血模型和心肌梗死模型中证实移植 EPC 能够明显增加缺血组织血流量和毛细血管密度。Kalka 等^[15] 将体外扩增的人外周血单个核细胞移植给下肢缺血的无胸腺小鼠, 4 周后观察发现移植后缺血区域毛细血管密度和组织血流明显增加, 且小鼠的截肢率明显下降。Kawamoto 等^[20] 将体外扩增的 EPC 经静脉注射到冠状动脉前降支结扎的心肌缺血模型后, 发现 EPC 能够增加缺血心肌的血供, 减少缺血面积, 改善左心室功能。

5.3 内皮祖细胞与临床试验研究

近临床临床试验主要集中在研究移植同源自体祖细胞是否安全可行。Tateishi 等^[21] 将骨髓的单个核细胞注入下肢缺血性疾病患者的腓肠肌, 4 周后踝动脉的各项功能指标明显改善, 间歇性跛行明显减少。Assmus 等^[22] 将自体同源祖细胞灌注到急性心肌梗死患者的冠状动脉内以评估其安全可行性, 他们随机将骨髓来源或外周血来源的祖细胞注入到 20 个急性心肌梗死患者的梗死相关冠状动脉, 4 月后患者的左心室射血分数明显提高, 梗死区域室壁运动度增加, 左心室收缩末期容积减少, 梗死区心肌存活增加。外周血来源和骨髓来源的祖细胞组治疗效果无差别。Strauer 等^[23] 研究也得出相似结论。这为缺血性疾病的治疗提供了新的策略, 有关治疗效果的评估和治疗的途径尚待进一步临床试验证实。

6 结论和展望

内皮祖细胞存在于成人骨髓、外周血及脐血中, 参与出生后的血管新生过程。这不仅开拓了干细胞的研究, 也为缺血性疾病提供了新的治疗策略。根据 EPC 能够归巢至血管内皮损伤部位这一特性, 可将其作为靶细胞, 利用转基因技术将促血管生长因子转至 EPC 内, 携带有特定基因的 EPC 可特异的参与血管修复过程。因此 EPC 具有广阔的临床应用前景。但是将 EPC 用于临床之前, 需加强其基础研究, 如 EPC 特异性的细胞表面标志、体外扩增条件、动员、分化及归巢的调控机制、决定 EPC 数量及更新率的因素等。

[参考文献]

- [1] Suda T, Takakura N, Oike Y. Hematopoiesis and angiogenesis. *Int J Hematol*, 2000, **71** (2): 99-107
- [2] Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, 1998, **125**: 725-732
- [3] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Sliver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964-967
- [4] Shmelkov SV, Jun L, St Clair R, McGarrigle D, Derderian CA, Usenko JK, et

- al. Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood*, 2004, **103** (6): 2 055-061
- [5] Walter DH, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz*, 2002, **27**: 579-588
- [6] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000, **95**: 952-958
- [7] Juliane E, Stefanie K, Gergely J, Karin H, Ulrike MB, Klaus MD, et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovascular Research*, 2003, **58** (2): 478-486
- [8] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 2001, **89** (1): e1-e7
- [9] Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *Clin Invest*, 2000, **105** (11): 1 527-536
- [10] Hirschi KK, Goodell MA. Hematopoietic, vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells. *Gene Ther*, 2002, **9** (10): 648-652
- [11] Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 1999, **5**: 434-438
- [12] Mireille AM, Mark B, Todd G, Omar F, Linda M, Steve K, et al. GM-CSF and SDF treatment induces neovascularogenesis in a mouse ischemic hindlimb model. *J American College Surgeons*, 2004, **199** (3): 105
- [13] 周音频, 黄 岚. 血管内皮祖细胞动员在损伤血管修复中的作用及调控因素. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 233-234
- [14] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 1999, **18** (14): 964-972
- [15] Kalka C, Macuda H, Takahashi T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 3 422-427
- [16] Herssig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, 2002, **109**: 625-637
- [17] Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 1998, **92**: 362-367
- [18] D'Amico S, Christian B, Alberto W, Christina IG, Stefan N, Gregor Z, et al. Umbilical cord blood derived endothelial progenitor cells for tissue engineering of vascular grafts. *Annals Thoracic Surgery*, 2004, **78** (6): 2 094-098
- [19] Walter DH, Ritting K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow derived endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2002, **105**: 3 017-024
- [20] Kawamoto A, Heorcheol Gwon, Hideki I, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 2001, **103**: 634-637
- [21] Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomized control trial. *Lancet*, 2002, **360**: 427-435
- [22] Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. *Circulation*, 2002, **106** (24): 3 009-017
- [23] Strauer BE, Zeus T, Kosterling M, Hernandez A, Sorg RV. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 2002, **106** (15): 1 913-918

(此文编辑 朱雯霞)

•你知道吗•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-04-0528-01

将“动脉粥样硬化”简称为“动脉硬化”妥当吗？

目前,临床上有些大夫将“动脉粥样硬化”简称为“动脉硬化”,都用缩写 AS 来代替。这是极不妥当的,因为两者是两个完全不同的概念。

动脉粥样硬化(atherosclerosis,缩写为 As)是动脉硬化(arteriosclerosis,缩写为 AS)的一种。严格地说,前者是一个病理过程,后者才是一类疾病名称。因此说,动脉硬化是一个更大的概念,它可累及大、中、小三类动脉,在病理学上主要包括动脉粥样硬化、动脉中层钙化、老年退行性硬化和小动脉硬化四种类型。各型动脉硬化的共同特点是动脉发生了非炎症性、退行性和增生性病变,导致管壁增厚变硬,失去弹性和管腔缩小。从而导致外周血管阻力加大,舒张压升高。

在各类动脉硬化中,以动脉粥样硬化最为重要,其病理变化主要累及大、中型动脉,其中以冠状动脉、颈动脉和脑动脉罹患最多,肢体各动脉、肾动脉和肠系膜动脉次之,而肺循环动脉极少受累。冠状动脉粥样硬化时可导致心肌供血不足,引起心绞痛、心肌梗死以及猝死等;颈动脉和脑动脉粥样硬化可引起脑供血不足,导致头痛、头晕和短暂性脑缺血发作(TIA),严重者脑动脉内血栓形成或小动脉破裂出血而形成脑梗死或脑出血,出现意识丧失、偏瘫、失语等脑卒中表现,甚则危及生命,后期脑萎缩可出现精神变态、痴呆等;肾动脉粥样硬化可引起不稳定性高血压;肠系膜动脉粥样硬化可引起消化不良、便秘或腹痛等症状;下肢动脉粥样硬化可引起下肢发凉、麻木和间歇性跛行,严重时可形成坏疽。

动脉中层钙化常发生于老年人,多累及中型动脉,常见于四肢动脉,尤其是下肢动脉,引起管壁中层退行性变和钙质沉着,从而使血管变硬,虽然不影响血液供应,但可使舒张压升高,脉压加大。

小动脉硬化发生于末梢小动脉,小型动脉呈弥漫性增生性病变,管腔狭窄,这种病变多与高血压有关。小动脉硬化时脑和肾血液供应影响最大。

由此可见,动脉粥样硬化仅是动脉硬化的一种类型,因此,习惯上简称之为“动脉硬化”而将说明其特点的“粥样”二字去掉,或都缩写为 AS,是极不妥当的。

(胡必利编写)