

内皮祖细胞在治疗性血管新生中的应用

赵薇综述, 杨向红审校

(中国医科大学基础医学院实验病理学教研室, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 内皮祖细胞; 综述; 血管新生; 缺血性疾病; 组织工程

[摘要] 内皮祖细胞能循环、增殖并分化为血管内皮细胞, 但尚未表达成熟血管内皮细胞表型, 也未形成血管, 是胚胎干细胞分化过程中的一个过渡阶段。内皮祖细胞的发现更新了传统意义上的出生后血管再生修复机制, 并为缺血性疾病的治疗和组织工程的发展提供了新思路。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)又称为血管内皮干细胞, 是中胚层卵黄囊血岛的成血管细胞(hemangioblast)向内皮细胞分化过程中的一个过渡阶段。1997年, Asahara等^[1]首次从成人外周血中分离出EPC, 并证实了EPC能参与缺血组织生理性和病理性血管新生。治疗性血管新生(therapeutic angiogenesis)是指将外源性血管新生诱导因子转入组织中增强缺血区域的侧枝毛细血管新生。移植EPC进行血管新生治疗, 是利用成体EPC能够动员、归巢并在原位分化为成熟血管内皮细胞的特性, 通过外源性EPC移植、内源性药物EPC动员及EPC的基因修饰, 使局部参与侧枝毛细血管新生的EPC数量增多, 活性增强, 从而达到治疗缺血性疾病的目的。

1 内皮祖细胞参与缺血组织血管新生、治疗缺血性疾病

组织缺血所诱发的血管新生, 本质上是机体的一种自然防御反应。但是, 在某些情况下, 如心血管疾病危险因素等, 不仅机体内源性血管生长因子合成减少, 而且血管内皮细胞对血管生长因子的反应性也下降。近年来的研究表明, EPC能特异性归巢于缺血部位并分化为成熟血管内皮细胞参与血管新生, 为缺血性疾病治疗提供了新思路。通过补充高增殖活性的EPC促进旁路血管新生来代偿缺血部位的血供以达到治疗的目的, 称为“supply side”策略^[2]。

Kalka等^[2]首次报道, 对肢体缺血动物模型进行EPC移植治疗28天后, 缺血肢体的血流较对照组增加42%, 毛细血管数目增加100%, 而肢体坏死和自身离断率则分别降低了50%。另有研究表明, 人外周血EPC经胸腔注入股动脉结扎的小鼠体内28天后, 缺血肢体的血流量恢复至手术前的70%, 而注入等量人微血管内皮细胞和EPC培养液的对照组

只分别恢复了27%和34%。EPC组肢体存活率为10/17, 而对照组仅为1/14和1/12^[2]。Kawamoto等^[3]将人外周血EPC经静脉注入左冠状动脉前降支结扎的裸鼠体内, 发现移植的EPC聚集在裸鼠心肌缺血部位参与血管新生, 结果缺血心肌的毛细血管密度增加, 心肌凋亡、胶原沉积和瘢痕形成减少, 左心室功能改善。Kocher等^[3]将人EPC移植至无胸腺心肌梗死鼠体内, 在非梗死区几乎未发现人EPC, 而在梗死区有大量人EPC参与的新生血管, 占整个心肌毛细血管数的20%~25%, 并且绝大部分位于梗死部位中央无血管或少血管的胶原沉积区。在脑中风动物模型中, 移植的EPC也参与了缺血脑组织血管新生^[4]。

在动物实验的基础上, 初步的临床研究正在开展。评价自体骨髓细胞移植促进血管新生的安全性、可行性的人体实验首先用于外周动脉闭塞导致下肢缺血的患者。将骨髓单个核细胞注入患者的腓肠肌, 四周后踝-臂指数、跨皮肤氧分压、无痛步行时间明显延长, 静息痛减轻^[5]。Kudo等^[6]用粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)动员严重肢体缺血患者的骨髓干细胞至外周血, 然后分离出CD34⁺EPC进行自体移植, 两周后缺血肢体侧支循环形成增加、氧分压升高。Assmus等^[7]将EPC注入急性心肌梗死患者冠状动脉内, 左室射血分数增加, 左室收缩末期容积减少, 梗死区局部心室壁运动改善。Stamm等^[8]给心肌梗死后六周的患者进行冠脉搭桥手术时, 将AC133⁺EPC直接注入梗死区周边, 术后6~9个月时, 射血分数从37%提高到48%, 心功能均达到NYHA分级I级, 未发生室性心律失常。有关EPC移植治疗潜力的小规模临床研究取得了另人鼓舞的结果^[9-12]。但是, EPC移植治疗的效果仍需长期、随机、大规模的临床研究来评价。

2 内皮祖细胞加速损伤血管再内皮化、构建组织工程血管

大量的研究表明, 内皮损伤后的修复过程除了原先存在的邻近成熟内皮细胞迁移, 具有高增殖潜能的EPC也能通过分化为成熟血管内皮细胞同样参与再内皮化过程, 有效地抑制了平滑肌细胞增殖和新内膜形成。因此如何将其应用

[收稿日期] 2006-07-19

[修回日期] 2006-12-01

[作者简介] 赵薇, 博士研究生, 研究方向为心血管疾病的发病机制, 联系电话为024-23256666-5322, E-mail为zhaowei01_2000@126.com。通讯作者杨向红, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的发病机制, 联系电话为024-23256666-5322, E-mail为xhyang4933@vip.sina.com.cn。

于血管支架术后再狭窄(发生率高达 32%~57%)的防治引起了研究人员的关注。Werner 等^[13]将自体脾源性 EPC 经静脉注入颈动脉内膜剥离的大鼠体内 14 天,移植组再内皮化面积增加 15%,反映内膜增生程度的内/中膜比值下降 62%,内皮依赖的血管舒张功能得到改善。并且观察到脾源性单核细胞的作用明显强于纯化的 EPC,可能是单核细胞在血管损伤部位粘附归巢能力强于纯化的 EPC。此后 Werner 等^[14]建立大鼠颈动脉球囊损伤模型,应用粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)动员 EPC。结果表明,与对照组相比,新内膜形成降低了 39%,再内皮化增加 1.8 倍。另有研究表明,促红细胞生成素、雌激素、他汀类药物、运动都能加速损伤血管再内皮化^[15-17]。

组织工程血管是应用自体来源的细胞作为种子细胞,种植在可吸收材料或脱细胞基质等生物材料上构建血管。由于从成年动物或人体大血管消化得到的成熟血管内皮细胞,不仅造成机体创伤,而且体外培养过程影响细胞扩增数量和活性。因此,寻找新的内皮种子细胞来源已成为构建组织工程血管的关键。用 EPC 构建组织工程血管可以改善血管的生物学特性,使其更接近于生理状态,减少凝血和血栓形成。

Kaushal 等^[18]将外周血 EPC 种植于脱细胞基质构建组织工程血管,然后移植至羔羊体内,4 例未移植的对照组中有 3 例于术后 5 天堵塞,1 例于 15 天时堵塞 50%。而 7 例移植组,分别于 15~130 天取出,所有血管均保持通畅。Kutryk 等^[19]将一种表面覆盖有 CD34 抗体涂层的支架置入猪的冠状动脉,外周血 EPC 随血流经过时与支架上的抗体结合,随之在支架表面增殖、分化,形成内皮细胞层。1 小时后, EPC 覆盖包被抗体的支架表面的 70%,而未包被抗体的支架表面几乎没有细胞覆盖。48 小时后,包被抗体的支架表面形成了完整的内皮细胞层。Aoki 等^[15]应用这种 CD34 抗体捕获涂层支架治疗冠心病病人,6~9 个月后管腔狭窄得以改善,心血管和脑血管事件发生率显著降低。这种 EPC 种植支架和 EPC 捕获涂层有效地防止了支架置入后内皮损伤造成的内膜增生和再狭窄,为这些并发症的防治开辟了新途径。进一步的研究将对其临床应用的安全性和远期疗效作出评价。

3 内皮祖细胞的基因修饰

内皮祖细胞作为转染血管生长因子基因的靶细胞,能将所载基因定向运送到体内缺血部位并合成行使功能的蛋白质。同时,内皮细胞是最接近于血流的一层细胞,分泌的蛋白质易通过血流扩散到全身而发挥广泛的作用,因此 EPC 是基因治疗理想的导向载体。不仅能给予受体 EPC,同时还能传递血管生长因子,使血管发生和血管新生相互协同,此谓基因修饰 EPC 的双重作用。一方面可以提高 EPC 的“利用率”。另一方面,为基因进入体内找到合适“载体”,以最少的数量达到最强的治疗效果。

Ikeda 等^[20]将转染了人 VEGF 基因的脐带血源性 EPC 移植到大鼠肢体缺血模型,结果显示转染组的肢体血流比未转

染的对照组显著增加。有研究表明,移植用腺病毒编码的 VEGF165 基因转染的异源性 EPC 与未转染的对照相比,只需 1/30 的细胞数量就可得到同样效果。Daniel 等^[21]报道了用逆转录病毒转染 EPC。Kong 等^[22]用逆转录病毒作为载体分别将全长人一氧化氮合酶(eNOS) cDNA、绿色荧光蛋白(GFP)基因转染至体外培养扩增的鼠 EPC。将 eNOS-EPC、GFP-EPC、生理盐水分别注入鼠颈动脉损伤模型两周后,在注射 eNOS-EPC 鼠的血管内能检测到 eNOS 的 mRNA 和蛋白质。与生理盐水组相比, eNOS-EPC、GFP-EPC 组的损伤血管再内皮化显著增加,分别为 53%、46%;内/中膜比值分别降低 72.1%、48.3%,无血栓形成,而生理盐水组约 50%有血栓形成。另有研究表明,用人端粒酶逆转录酶活性亚单位(hTERT)转染人 EPC,其增殖、存活、迁移能力均强于未进行基因修饰的对照组 EPC。将其经静脉注入肢体缺血的无胸腺小鼠体内,与对照组相比,转染 hTERT 基因组肢体血流和毛细血管密度均显著增加,避免截肢率提高了 4 倍。hTERT 拮抗细胞老化和凋亡,增加生长因子的分泌^[23]。Nagaya 等^[24]从人脐带血中提取了一种血管舒张肽的质粒 DNA——肾上腺髓质素(AM),用阳离子凝胶构建 AMDNA 凝胶复合体,转染脐带血来源的 EPC,移植到肺动脉高压裸鼠体内。与未移植的对照组相比,AM-EPC 组、EPC 组肺血管阻力分别降低 39%、16%,平均肺动脉压分别降低 29%、14%。

4 问题与展望

综上所述,一系列动物实验和初步临床研究为治疗性血管重建提供了新思路,也为组织工程提供了新手段,展示了 EPC 美好的应用前景。但是随着研究的深入,不断出现的新问题亟待解决: EPC 的来源,不同来源的 EPC 是否具有相同的治疗潜能。④有关 EPC 的确切定义和表面标记仍未有定论,这对于统一 EPC 分离纯化标准具有重要意义。⑤调节 EPC 动员、归巢和分化的细胞因子及信号转导途径。EPC 参与血管再生修复的确切机制。病理微环境对 EPC 的影响。EPC 的增殖潜能和发育分化中的基因调控机制,寻求最佳体外扩增体系,为治疗提供足量的有活力的细胞源。⑧EPC 来源的细胞是否具有正常的功能。⑨外周血 EPC 移植的前景相对较好,主要是操作简单、创伤小,但细胞数量少。而骨髓提取 EPC 虽然细胞数量较多,但操作复杂、创伤大、费用高,并且含有成骨细胞、纤维母细胞等多种细胞系,影响治疗的安全性。而脐带血提取 EPC 虽然细胞数量较多、创伤小,但涉及伦理问题。且 EPC 移植是一种个体化治疗,细胞数量少,需进行体外培养扩增。因此,如何更有效地利用有限的 EPC 是当前研究的热点。

尤其值得注意的是,应用 EPC 进行治疗的同时可能产生各种副作用。如 EPC 可能参与动脉粥样硬化斑块内血管新生,因此促进斑块生长和不稳定性增加直至斑块破裂^[15]; EPC 可能归巢至肿瘤血管床,从而促进潜在肿瘤的生长^[25]。这些都对治疗产生不利的影响。目前 EPC 治疗大多局限于动物实验,更多地进行人体研究,将对治疗的可行性、安全性和靶向性作出长期的观察和评价。相信随着基础研究的深

入,这些问题的解决将为 EPC 更广阔的临床应用前景带来新的希望。

参考文献

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Van der Zee Re, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cell for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, **275** (14): 964-967
- [2] Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamauchi JI, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cell for myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2001, **103** (5): 634-637
- [3] Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function [J]. *Nat Med*, 2001, **7** (4): 430-436
- [4] Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cell participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse [J]. *Circ Res*, 2002, **90** (3): 284-288
- [5] 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 cell: a pilot study and a randomized controlled trial [J]. *Lancet*, 2002, **360** (9331): 427-435
- [6] Kudo FA, Nishibe T, Nishibe M. Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cell (CD34⁺) for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia [J]. *Int Angiol*, 2003, **22** (4): 344-348
- [7] Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of progenitor cell and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI) [J]. *Circulation*, 2002, **106** (24): 3009-017
- [8] Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, et al. Autologous bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration [J]. *Lancet*, 2003, **361** (9351): 45-46
- [9] Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem cell mobilised with granulocyte colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial [J]. *Lancet*, 2004, **363** (9411): 751-756
- [10] Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging [J]. *Circulation*, 2003, **108** (18): 2212-218
- [11] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial [J]. *Lancet*, 2004, **364** (9429): 141-148
- [12] Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cell for the heart [J]. *Circ Res*, 2005, **96** (2): 151-163
- [13] Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cell reduces neointima formation after vascular injury [J]. *Circ Res*, 2003, **93** (2): e17-24
- [14] Cho HJ, Kim HS, Lee MM, Kim DH, Yang HJ, Hur J, et al. Mobilized endothelial progenitor cell by granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation [J]. *Circulation*, 2003, **108** (23): 2918-925
- [15] Werner N, Nickenig G. Clinical and therapeutic implication of EPC biology in atherosclerosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2006, **10** (2): 318-332
- [16] Takamiya M, Okigaki M, Jin D, Takai S, Nozawa Y, Adachi Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized circulating c-Kit⁺/Flk-1⁺ progenitor cell regenerate endothelium and inhibit neointimal hyperplasia after vascular injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26** (4): 751-757
- [17] Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cell [J]. *Hypertension*, 2005, **45** (3): 321-325
- [18] Akita T, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shimada T, Egami K, et al. Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cell for therapeutic neovascularization [J]. *Lab Invest*, 2003, **83** (1): 65-73
- [19] Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, Moses J, Leon MB, Kutryk M, et al. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: atherosclerotic approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, **44** (4): 733-739
- [20] Ikeda Y, Fukuda N, Wada M, Matsumoto T, Satomi A, Yokoyama S, et al. Development of angiogenic cell and gene therapy by transplantation of umbilical cord blood with vascular endothelial growth factor gene [J]. *Hypertens Res*, 2004, **27** (2): 119-128
- [21] Giese DP, Achatz S, Batzlsperger CA, Strauch UG, Grumbec B, Weil J, et al. Vascular gene delivery of anticoagulants by transplantation of retrovirally transduced endothelial progenitor cell [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, **58** (2): 469-477
- [22] Kong D, Melo LG, Mangi AA, Zhang L, Lopez-Illasaca M, Perrella MA, et al. Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cell [J]. *Circulation*, 2004, **109** (14): 1769-1775
- [23] Murasawa S, Llevadot J, Silver M, Isner JM, Losordo DW, Asahara T, et al. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cell [J]. *Circulation*, 2002, **106** (9): 1133-139
- [24] Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, et al. Hybrid cell gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cell [J]. *Circulation*, 2003, **108** (7): 889-895
- [25] Zhang H, Vakil V, Braunstein M, Smith EL, Maroney J, Chen L, et al. Circulating endothelial progenitor cell in multiple myeloma: implications and significance [J]. *Blood*, 2005, **105** (8): 286-294

(此文编辑 朱雯霞, 李小玲)