

## • 文献综述 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-12-0940-03

## 内皮祖细胞在动脉粥样硬化进程中的作用

周晓峰 综述, 王佐 审校

(南华大学心血管病研究所, 湖南省动脉粥样硬化化学重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 内皮祖细胞; 动脉粥样硬化; 危险因素; 治疗作用

[摘要] 内皮祖细胞因参与再内皮化和血管新生, 在动脉粥样硬化病变发生发展中可能起着举足轻重的作用, 包括参与内皮损伤后修复与内膜增生, 影响斑块发展与稳定以及对动脉粥样硬化性疾病严重程度的预测。动脉粥样硬化病变过程中若干危险因素影响了内皮祖细胞的数量和功能, 从而削弱内皮祖细胞可能的血管保护作用并影响动脉粥样硬化进程, 因而提出内皮祖细胞潜在的治疗作用。本文从再内皮化、斑块发展和血管新生、动脉粥样硬化的若干危险因素及内皮祖细胞的预测价值和治疗作用等方面对内皮祖细胞在动脉粥样硬化进程中的作用作一综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Asahara 等<sup>[1]</sup>首次发现人外周血 CD34<sup>+</sup> 造血干细胞 (hemopoietic stem cell, HSC) 在一定条件下可定向分化为成熟的内皮细胞, 促进缺血组织的血管新生, 称之为内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC)。近来认为, EPC 是一类具有高增殖潜能的前体细胞, 代表一类多起源和表型不同的可产生内皮细胞的非均质细胞群。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 病变的形成是复杂的动脉壁慢性炎症反应过程, 诸多危险因素造成的动脉内皮细胞损伤和功能失调被认为是 As 发生的始动环节。周缘组织如骨髓中的内皮祖细胞被血管壁受损组织分泌的一些细胞因子和趋化因子动员并整合到受损部位启动修复过程。一些证据显示, 受损血管的修复反映损害正在进行, 血管受损程度和修复能力的不平衡导致动脉粥样硬化形成。最近提出的 As 新学说即以损伤反应和炎症学说为中心, 认为 EPC 介导的损伤和修复反应是 As 的始动因素和重要环节。

## 1 内皮祖细胞的标志及特征

骨髓中的 EPC 为 CD133<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>、VEGFR-2<sup>+</sup> (或 KDR<sup>+</sup>, 人; flk-1<sup>+</sup>, 小鼠) 细胞, 进入循环血液以后其表面逐渐失去 CD133 表达并出现内皮细胞系的一些表面标志。即早期循环 EPC 的表面标志为 CD133<sup>+/+</sup>、CD34<sup>+</sup>、VEGFR2<sup>+</sup>、CD31<sup>+</sup>、VE-钙粘蛋白<sup>+</sup>、vWF<sup>+</sup>。循环 EPC 与早期循环 EPC 表面标志的区别是完全失去了 CD133 的表达并高度表达内皮系标记如 VE-钙粘素、Flt-1、内皮型一氧化氮合成酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 和 CD31 等。即 EPC 的不同表面标志反映了骨髓细胞向内皮细胞分化的不同发展阶段。外周血来

源的 EPC 体外培养时具有吞噬乙酰化低密度脂蛋白 (acetylated low density lipoprotein, acLDL) 和连接荆豆凝集素-1 (ulex europaeus agglutinin 1, UEA-1) 的能力, 大多学者认为 UEA-1 和 DiI-acLDL 双阳性细胞为正在分化的 EPC。外周血 EPC 形成晚期内皮细胞克隆形成单位 (endothelial cell colony-forming units, CFU-EC) 的能力是体外培养 EPC 的特征, 也是祖细胞具有克隆形成能力的标志。有趣的是不同发育阶段的 EPC 有不同功能特性。如 CD133<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup> EPC 比 CD133<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup> EPC 更具有促受损内皮再生和生成血管潜能<sup>[2]</sup>。由于 EPC 的不均一性, 本综述涉及的 EPC 为流式细胞仪检测的 CD34/KDR 双阳性或 CD133 阳性细胞。

## 2 内皮祖细胞与再内皮化

各种危险因素引起内皮衰老和凋亡所致的内皮功能障碍是动脉粥样硬化性疾病的标志。受损内皮单层的恢复和重建是预防动脉粥样硬化斑块形成的必要条件。受损部位临近内皮细胞因失去接触抑制作用而增生并向损伤中心迁移, 进而修复部分内皮功能。然而, 成人内皮细胞的半衰期约为 3.1 年, 生理条件下的成人血管只能适度再生, 其增殖率较低。若内皮已老或遭受更多危险因素袭击, 则局部修复不全并启动炎症反应, 巨噬细胞聚集并泡沫化导致斑块形成。血管内皮不仅是个屏障也是体内最大的内分泌器官, 血管损伤时内皮分泌的一些细胞因子促进骨髓 EPC 动员, 募集到受损部位分化为成熟内皮细胞, 如基质细胞衍生因子 1 (stromal cell derived factor 1, SDF-1) 通过促进 EPC 迁移减少新生内膜的形成<sup>[3,4]</sup>。内皮细胞凋亡小体也可诱导 EPC 增殖。鼠局部内皮细胞损伤模型输注体外扩增的 EPC 促进再内皮化。Walter 等<sup>[5]</sup>发现循环内皮前体细胞可以归巢到球囊拉伤后的动脉剥脱部位。经静脉注射的 EPC 向小鼠颈动脉损伤处归巢, 促进剥脱内皮的修复和减少新生内膜形成。脾切除 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠高脂饮食 5 周后连续静脉输注野生鼠脾脏来源的单个核细胞及其分化产物 EPC 3 天, 一周后发现内皮依

[收稿日期] 2007-01-23 [修回日期] 2007-12-15

[基金项目] 中国博士后基金资助项目 (2005038472)

[作者简介] 周晓峰, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病的机制, 联系电话为 13974771340, E-mail 为 zhouxif\_1981824@yahoo.com.cn。通讯作者王佐, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化分子标记及药物筛选工作。联系电话为 0734-8281277, 13875765306, E-mail 为 nb1211@56.com。

赖性血管舒张功能明显改善,一氧化氮合酶(NOS)活性升高<sup>[6]</sup>。动员内源性 EPC 增加再内皮化。如兔颈动脉泡沫化损伤模型,给予人重组粒细胞集落刺激因子(*granulocyte colony-stimulating factor*, GCSF)后,再内皮化程度是对照组的 2.8 倍,新生内膜比对照组减少了 39%<sup>[7]</sup>。他汀类药物对干细胞和祖细胞的动员也获得相似结果。George 等发现植入支架弥漫性再狭窄病人的循环 EPC 减少,提示具有捕获 EPC 能力或直接播种 EPC 的支架可预防再狭窄和早期的血栓形成。由于 As 中的 EPC 受损,目前,尚缺乏内源性干/祖细胞在不依赖促动员治疗时促进内皮单层修复的直接证据。

### 3 内皮祖细胞与斑块发展和血管新生

内皮损伤后大量炎症因子和细胞浸润,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。血管平滑肌细胞(*vascular smooth muscle cell*, VSMC)的迁移、增殖和基质合成对动脉粥样硬化形成也有重要影响。高脂饲养 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化斑块中存在一定数量骨髓来源 VSMC。研究发现颈内静脉输注骨髓来源干细胞通过促进内皮修复延缓 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化进程并减少其动脉粥样斑块大小<sup>[8]</sup>。然而, EPC 是具有多分化潜能的前体细胞,在一定环境下可向平滑肌细胞(*smooth muscle cell*, SMC)分化。归巢到血管损伤部位的骨髓源性 EPC 如分化为 SMC,促进其增殖及表型转换,内膜过度增生则加速 AS 斑块形成。最近报道 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠在给予干细胞和 EPC 处理后,其斑块增大<sup>[9]</sup>,这可能是斑块内平滑肌细胞增殖的结果。

动脉粥样硬化(As)粥样斑块的不稳定可增加心血管病的风险,导致临床事件发生。组织病理学显示,不稳定斑块以覆盖在脂质核心上的纤维帽颈部变窄和断裂为特征。纤维帽厚度是环管周应力峰值增加的重要因素,纤维帽越薄,环管周应力峰值增加越明显,斑块越易破裂。粥样斑块处 EPC 和平滑肌祖细胞分化为 SMC,使细胞外基质蛋白生成增多,有可能促进斑块稳定。但目前还缺少这方面证据。

抑制斑块内的血管新生对斑块生长和稳定都有利。Moulton 等<sup>[10]</sup>证明 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠滋养血管密度与炎症细胞浸润程度有关,而与粥样瘤大小无关。斑块基底部的微血管与斑块破裂的高危性相关。因 EPC 在血管发生和血管新生方面起重要作用,有可能促进斑块血管新生而不利于斑块稳定。但 EPC 对斑块血管新生的作用尚未得到令人信服的证据,且在同一疾病中血管新生本身也是一把双刃剑,如糖尿病者视网膜血管新生加速,而其局部缺血后组织的血管新生则受损。鉴于 EPC 具有强大的内皮修复作用,其对斑块血管新生的作用仍需进一步确定。

### 4 内皮祖细胞与动脉粥样硬化的若干危险因素

几乎 As 的所有传统危险因素都对 EPC 数目和功能有不利影响。近来认为 EPC 的负性调节是危险因素恶化心血管健康的机制之一。临床调查<sup>[11]</sup>表明循环 CD34<sup>+</sup>、KDR<sup>+</sup> EPC 细胞数量维持在高水平可减弱多重危险因素的致颈动脉粥

样硬化作用。如 2 型糖尿病患者 EPC 增殖能力和黏附于活化的人内皮细胞上的能力降低,其在体外形成的毛细血管样结构减少,高血糖通过降低一氧化氮生成和基质金属蛋白酶 9 活性损害 EPC 功能<sup>[12]</sup>。新近研究<sup>[13]</sup> EPC 与 12.5 mmol/L 葡萄糖共孵育 10 天后, EPC 凋亡率大大增加,其磷酸化的 p38 MAPK 水平也随葡萄糖浓度增加而增加。高血压患者 EPC 衰老加速,端粒酶活性降低,高血压引起的器官损坏与端粒酶活性负相关,与 EPC 衰老呈正相关。稳定型冠心病患者给予血管紧张素转换酶抑制剂雷米普利(5 mg/d)治疗 4 周, EPC 数量持续稳定增加,最大增加了近 2.5 倍, EPC 增殖、迁移、黏附及体外血管新生等能力皆有增加<sup>[14]</sup>。研究<sup>[15]</sup>表明 EPC 的生长能力受到氧化低密度脂蛋白(*oxidized low density lipoprotein*, ox-LDL)的严重抑制。ox-LDL(10 g/L)处理 EPC 20 天,端粒酶活性减少 50%, EPC 衰老率显著增加,其增殖和毛细血管样结构形成受抑制。Ma 等<sup>[16]</sup>研究表明 ox-LDL 呈剂量依赖性减弱丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt)磷酸化和 eNOS mRNA 及蛋白表达,增加凝集素氧化修饰低密度脂蛋白受体 1(*lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1*, LOX-1) mRNA 和蛋白表达, LOX-1 单克隆抗体或 L-精氨酸预处理 EPC 减弱 ox-LDL 的有害作用。然而, ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠在静脉注射高密度脂蛋白胆固醇(*high density lipoprotein cholesterol*, HDLC)后其主动脉内皮处的 EPC 数量增加 1 倍,提示 HDL 促进祖细胞调节的内皮修复或 HDL 调节 EPC 的部分血管保护作用。用浓度为 50g/L 的 HDL 处理 EPC 集落 24h 后, EPC 的 eNOS 蛋白表达显著增加, MMP9 前体蛋白水平明显降低, HDL 通过抑制 caspase-3 活性来防止 EPC 凋亡<sup>[17]</sup>。临床研究<sup>[18]</sup>, 20 位诊断有冠心病或伴有心血管危险因素病人经跑步训练 12 周,流式细胞计数循环 EPC 比训练前增加约 3 倍,血管功能改善。C-反应蛋白(*C-reactive protein*, CRP)促进 EPC 凋亡并抑制其血管新生。如健康男性外周静脉血的 EPC 与 CRP(> 15 mg/L)体外孵育 3 天,一周后, EPC 数量明显减少,内皮标志如 Tie-2、EC-凝集素、VE-钙粘蛋白消失<sup>[19]</sup>。其机制可能是 CRP 通过损害 EPC 的抗氧化能力,促进 EPC 发生由氧化剂介导的凋亡和端粒酶活性丧失。

### 5 内皮祖细胞的预测价值

内皮祖细胞(EPC)水平下降伴随着危险因素的存在,多重危险因素协同作用降低 EPC 数量。Werner 等<sup>[20]</sup>研究发现 EPC 对于动脉粥样硬化性疾病有独立的预测价值和血管保护作用。测量 519 名经血管造影确诊的冠心病病人的 CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> EPC 水平,记录此病人 1 年内的心血管病结果,包括心血管死亡率和主要心血管事件发生率(心肌梗死、住院治疗、血管再通和心血管死亡)。调整危险因素、药物治疗和夹杂症后, EPC 水平与心血管死亡、主要心血管事件、再通和住院治疗都独立负相关。测量 CD133<sup>+</sup> EPC 或 CFU-EC 数目也得到相似结果。与此同时 Schmidt 等<sup>[21]</sup>也发现循环 EPC 水平下降预告了动脉粥样硬化疾病进程。循环 EPC 数减少是骨髓祖细胞衰竭和动员、存活和分化降低的结果。颈动脉内膜一中膜厚度增加的亚临床动脉粥样硬化患者 EPC 池中

细胞数比无 As 体征的受试者低,且独立于危险因素和 G-反应蛋白的影响。已有研究证实 EPC 数与疾病严重性之间存在线性关系。循环 CD34<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> 细胞数参与临床前无症状 As 受试者的早期病变发展过程,且此细胞数减少与 As 严重性相关<sup>[11]</sup>。遗憾的是没有检测这些 EPC 的功能特性。最近, Werner 等<sup>[22]</sup>经单变量分析发现冠心病患者的冠状动脉内皮功能障碍与 EPC 低水平及其内皮克隆能力受损有关,而多变量分析显示只有 EPC 水平可以独立预测内皮功能障碍的严重性,可能是体外培养 EPC 的内皮克隆形成能力只能暂时反应 EPC 功能。这些数据提示循环 EPC 水平是 As 负荷的直接指示物。临床上检测患者外周血中 EPC 数量可以评估冠心病的危险度。

## 6 潜在的治疗作用

目前已知多种途径可增加循环 EPC 数和改善其功能。

(1) 积极处理可控制的危险因素,如戒烟、降血压、降血糖和血脂可升高外周血中 EPC 水平。尽管年龄不能改变,但给予绝经后女性雌激素治疗可恢复 EPC 池,并通过募集 EPC 促进心肌梗死后恢复<sup>[23]</sup>。(2) 通过基因转导内源性 EPC 动员因素,如粒-巨噬细胞集落刺激因子、粒细胞集落刺激因子、血管内皮生长因子、SDF-1 $\alpha$ 、血管形成素 1、促红细胞生成素等提高 EPC 循环水平。但不能确保这些被动员来的 EPC 功能完整。(3) 临床试验显示自体 EPC 移植对于冠状动脉粥样硬化疾病都是可行的。急性心肌梗死病人自体 EPC 移植一年后的左室射血分数提高和收缩末期容量下降<sup>[24]</sup>。移植了骨髓细胞的慢性缺血性心脏病患者的左室射血分数比对照组增加<sup>[25]</sup>。尽管最佳细胞来源和最适合病人选择还存在疑问,但是严格的实验数据和临床试验已提示自体 EPC 治疗具有潜在的减缓 As 自然进程的作用。

EPC 因其独特的内皮再生和血管新生功能在 As 病变的发生、发展中扮演着重要角色,探明其在 As 中的作用对于防治 As 来说意义重大。As 病变复杂漫长和 EPC 的来源多样表型不一使得 EPC 对 As 的具体作用有待进一步研究。

### [参考文献]

[1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, **275** (14): 964-967.

[2] Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N. CD34/CD133<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup> endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities [J]. *Circ Res*, 2006, **98** (3): e20-e25.

[3] 童中艺, 王佐, 姜志胜, 宋砚明, 周晓峰, 田永凤. 基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  对大鼠骨髓源内皮祖细胞迁移的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (7): 491-493.

[4] 尹扬光, 黄岚, 赵晓辉, 于世勇, 方玉强, 赵景红, 等. 基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  介导小鼠内皮祖细胞修复损伤血管内皮 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (1): 6-10.

[5] Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury [J]. *Circ Res*, 2003, **93** (2): 17-24.

[6] Wassmann S, Werner N, Czech T, Nickenig G. Improvement of Endothelial Function by Systemic Transfusion of Vascular Progenitor Cells [J]. *Circ Res*, 2006, **99** (8): E74-E83.

[7] Kong D, Melo LG, Gnechi M, Zhang L, Mostoslavsky G, Liew CC, et al. Cytokine induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries [J]. *Circulation*, 2004, **110** (14): 2 039-046.

[8] Rauscher FM, Goldschmidt-Clemons PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2003, **108** (4): 457-63.

[9] George J, Afek A, Abashidze A, Shmilovich H, Deutsch V, Koplovich J, et al. Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein e knockout mice [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005, **25** (12): 2 636-641.

[10] Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczynska H, Sharma SK, et al. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability [J]. *Circulation*, 2004, **110** (14): 2 032-038.

[11] Chironi G, Walch L, Pemollet MG, Gariépy J, Levenson J, Rendub F, et al. Decreased number of circulating CD34<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2007, **191** (1): 115-120.

[12] Kränkel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, et al. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (4): 698-703.

[13] Kuki S, Imanishi T, Kobayashi K. Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *Circ J*, 2006, **70** (8): 1 076-081.

[14] Min TQ, Zhu CJ, Xiang WX, Hui ZJ, Peng SY. Improvement in endothelial progenitor cells from peripheral blood by ramipril therapy in patients with stable coronary artery disease [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2004, **18** (3): 203-209.

[15] 朱军慧, 陈君柱, 王兴祥, 朱建华, 尚云鹏, 郭晓纲, 等. 氧化低密度脂蛋白对外周血内皮祖细胞数量和功能的影响 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2005, **21** (1): 13-17.

[16] Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, **31** (7): 407-413.

[17] Noor R, Shuaib U, Wang CX, Todd K, Ghani U, Schwandt B, et al. High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis [J]. *Atherosclerosis*, 2007, **192** (1): 92-99.

[18] Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, et al. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease [J]. *Atherosclerosis*, 2005, **181** (2): 305-310.

[19] Verma S, Kuliszewski M A, ShurHong Li, Szmitko PE, Zucco L, Wang CH, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2004, **109** (17): 2 058-067.

[20] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes [J]. *N Engl J Med*, 2005, **353** (10): 999-1 007.

[21] Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kempner U, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair [J]. *Circulation*, 2005, **111** (22): 2 981-987.

[22] Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Schiegl T, Kosiol S, Link A, et al. Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease [J]. *Basic Res Cardiol*, 2007, **102** (6): 565-571.

[23] Kunz GA, Liang G, Cuculi F, Gregg D, Vata KC, Shaw LK, et al. Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity [J]. *Am Heart J*, 2006, **152** (1): 190-195.

[24] Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction final one-year results of the TOPCARE-AMI trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, **44** (8): 1 690-699.

[25] Rosenzweig A. Cardiac cell therapy-mixed results from mixed cells [J]. *N Engl J Med*, 2006, **355** (12): 1 274-277.

(此文编辑 李小玲)