

高密度脂蛋白与血管内皮祖细胞

龚海荣 综述, 李向平 审校

(中南大学湘雅二医院心血管内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 高密度脂蛋白; 内皮祖细胞; 血管内皮功能

[摘要] 血管内皮祖细胞是血管内皮细胞的前体细胞。血管内皮祖细胞可在循环中增殖, 并能分化成为内皮细胞, 在胚胎血管发生和出生后血管生成中起重要作用。已知保护血管内皮功能是高密度脂蛋白抗动脉粥样硬化作用的重要机制之一。近年来的研究发现高密度脂蛋白对血管内皮祖细胞有调节作用, 本文主要将该方面的研究现状作一综述。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

High Density Lipoprotein And Endothelial Progenitor Cells

GONG HaiRong and LIXiang-Ping

(Department of Cardiology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

[KEY WORDS] High Density Lipoprotein; Endothelial Progenitor Cells; Cardiovascular Endothelial Function

[ABSTRACT] Vascular endothelial progenitor cell is the precursor cell of endothelial cell. Vascular endothelial progenitor cells can proliferate in the blood circulation, differentiate into endothelial cells and take part in the formation of human embryonic vasculogenesis and the promotion after birth. It is known that protecting vascular endothelial function is one of the important organism that high density lipoprotein prevent atherosclerosis. It is found that in recent study high density lipoprotein can regulate vascular endothelial progenitor cells. The article reviews the research status in this aspect.

自1997年Asahara等^[1]首次分离出内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)以来, 有关EPC与心血管疾病之间关系成为了心血管领域的研究热点。研究发现, EPC有利于损伤血管的再内皮化和缺血病变区的新生血管形成, 在动脉粥样硬化等心血管疾病中起重要作用^[2]。高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)具有抗动脉粥样硬化作用, 保护血管内皮功能是其主要作用机制之一^[3]。近年来的研究表明, HDL具有调节内皮祖细胞的动员、增殖、迁移、凋亡以及内皮修复的作用, 本文将上述内容综述如下。

1 内皮祖细胞

胚胎时期, EPC来源于胚外中胚层的卵黄囊的血岛, 由血管母细胞分化而来, 脐血中的EPC起源于胎儿的肝脏, 成人外周血EPC则来源于骨髓。目前已经从骨髓、外周血、脐血中成功地分离并培养出EPC^[4]。正常情况下, EPC的数量很少, 外周血中约为2 000~3 000个/L, 脐血中的数量约高3.5倍^[5]。在含有血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)等适合EPC生长的培养条件下, 可以大量增殖。

目前EPC的表面标志还缺乏精确的定义。Asahara等^[1]首次证明EPC为CD34⁺细胞, 但由于造血干细胞和成熟的内皮细胞也表达CD34⁺, 故对EPC无特异性。Peichev等^[4]的研究显示, 表达VEGFR-2及CD133的CD34⁺细胞组成一群表型及功能明确的EPC, 在血管新生中起重要作用。体外实验表明, 血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)-2及CD133⁺的CD34⁺细胞经血管内皮生长因子, FGF等诱导分化后, CD133和CD34的表达逐渐减弱, 故可用VEGFR-2、CD133和CD34作为相对特异的组合来富集纯度较高的EPC。有报道发现, 在新生血管有约25%的内皮细胞由EPC增殖分化而来^[6]。组织缺血能够动员EPC, 从而增加缺血组织中新血管的形成。

EPC动员、分化、凋亡的调节包括正调节及负调节两方面。Asahara等^[7]研究发现, 体内应用VEGF后循环EPC的数量增加, 并增加角膜中新血管的生成, 同时也证明其在体外能促进EPC的分化。Perlingeiro等^[8]发现, 血小板生成素(thrombopoietin, TPO)不仅有促进EPC向原始细胞集落形成细胞(blast colony-forming cell, BL-CFC)分化的作用, 而且在与VEGF及干细胞因子共同作用时, 可使BL-CFC的数量成倍增长。Yamamoto等^[9]实验发现, 血液流动或组织液流动造成的剪切力, 能加快EPC的增殖、分化和毛细血管的形成, 大量的EPC处于细胞周期的G₂期和M期。红细胞生成素、白细胞介素、基质细胞来源的因子、雌激素和某些病理状态如缺血、肿瘤等, 也能够刺激EPC的动员、增殖和分化。而血管内皮抑素, 转化生长因子- β , 维甲酸都可减少EPC数量进而导致血管重塑受损^[10]。Verna等^[11]的研究表明, C-

[收稿日期] 2009-10-09 [修回日期] 2010-01-07

[作者简介] 龚海荣, 硕士研究生, 研究方向为心血管内科与动脉粥样硬化。Email为 gonghairong26@sina.com。通讯作者李向平, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管内科与动脉粥样硬化, Email为 lixp@medmail.com.cn。

反应蛋白可导致 EPC 内一氧化氮合酶 (NO synthase NOS) mRNA 的表达下降,从而抑制 EPC 的分化与增殖。某些状态如肥胖,高龄,吸烟^[12],糖尿病、高脂血症、高半胱氨酸血症、尿毒症、阿尔茨海默病 EPC 的数量减少。

2 高密度脂蛋白

HDL 是一种小而致密的脂蛋白,密度在 1.063~1.125 kg/L 之间。HDL 中 50% 为蛋白质,其余为脂质。HDL 的主要蛋白质有载脂蛋白 (Apo) A_{iv} (70%) 和 ApoA_{II} (20%), 还含 ApoA_{IV}、ApoA_{III}、结合珠蛋白、 α_2 巨球蛋白以及磷脂酰胆碱胆固醇脂酰转移酶 (LCAT)。循环中的 HDL 颗粒外层为磷脂,中间包含胆固醇、蛋白质和少量甘油三酯。新生的 HDL 颗粒在磷脂双层结构中镶嵌了数个呈放射状排列的 ApoA_{iv},与 LCAT 相接触,使自由胆固醇转变为胆固醇酯,将肝外组织的胆固醇转运到肝脏即胆固醇的逆向转运。以往大量研究已证实,HDL 有多种抗动脉粥样硬化功能^[13],除逆向转运游离胆固醇外,还具有抗炎、抗氧化以及保护内皮细胞等作用。

3 高密度脂蛋白对内皮祖细胞的调节

已知 HDL 可通过 Ras 致丝裂酶原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 活化,还刺激其他激酶,如 Akt 等,影响内皮细胞的功能^[3]。近来发现,EPC 作为内皮细胞的前体细胞,也受到 HDL 的影响。HDL 对 EPC 的调节主要表现在以下几个方面。

3.1 加快内皮祖细胞的动员与分化

使骨髓中 EPC 尽可能多地出现在外周血中,这一过程称为 EPC 的动员。实验研究显示 HDL 能加快 EPC 的动员,但具体的机制还不是很清楚。Makoto 等^[14]在体外实验中发现重组 HDL (reconstituted HDL, rHDL) 能促使人单核细胞向 EPC 分化,但这种现象在 7 天后才明显。他们还研究了 HDL 调节 EPC 分化的机制。蛋白印迹法显示, HDL 激活了单核细胞 Akt 途径。磷酸肌醇 (PI)-3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt 或 PI3K/PKB) 途径抑制剂使 HDL 诱导分化 EPC 的能力减弱。这可能是由于 PI3K/Akt 途径的抑制剂降低了 NO 生物活性,进而减少 EPC 从骨髓中动员。而 MAPKK-1 对 EPC 的分化无明显影响。该研究结果表明, HDL 至少部分通过 PI3K/Akt 途径加强 EPC 的动员。逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 发现, HDL 能使 EPC 内皮源性一氧化氮合酶 (endothelial NOS, eNOS) mRNA 表达增加。Western blotting 也揭示, HDL 能增加 eNOS 蛋白的产生。由此可见 PI3K/Akt/eNOS 途径在 HDL 促 EPC 动员、分化过程中有重要作用。

3.2 促进内皮祖细胞的增殖

许多研究显示, HDL 能促使 EPC 的增殖。Pellegata 等^[15]采集了 24 位健康人群的外周血进行分离培养,用 CD34 和 CD133 双阳性鉴定 EPC,进行集落实验,发现内皮集落形成数与 HDL 有关。因此,他们认为人血浆中 HDL 水平

决定了循环 EPC 的数量。Van 等^[16]发现,无并发症的 2 型糖尿病患者注入 HDL 后,其血管 EPC 的数量较之前有明显增加。张秋华等^[17]在体外培养 EPC 时发现,加入 HDL 能提高 EPC 的数量,并随 HDL 浓度的增加, EPC 的数量亦增加。在 0~24 h 期间,随时间延长, HDL 促进 EPC 增生的作用相应增加。提示 HDL 能促进内皮祖细胞增殖,并具有浓度、时间依赖性。测定贴壁 EPC 经 HDL 刺激 24 h 后相关抗原, HDL 不影响 EPC 细胞特异性抗原 CD133、CD34、VEGFR2 的表达,却能增加其细胞周期调控蛋白 D1 (cyclin D1) 的表达。HDL 作用 24 h 后, EPC 的细胞周期发生明显的改变,促使细胞由 G₁ 期向 S 期的转化。

3.3 提高内皮祖细胞的迁移与粘附

最近研究发现, HDL 能提高 EPC 的迁移、粘附能力。2007 年 Makoto 等^[14]发现注入 HDL 的老鼠缺血区 CD31⁺ 和绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记阳性的骨髓来源细胞增多。Yingne 等^[18]发现细胞培养 7 天后,使用 HDL 相比对照组能提高 EPC 的迁移能力,而使用 PI3K/Akt 途径抑制剂渥曼青霉素后能削弱这种能力。这些实验表明, HDL 能增强 EPC 的迁移能力,并与 PI3K/Akt 信号传导途径有关。Petoumenos 等^[10]也发现,注入 HDL 的老鼠与对照组比较,其 EPC 有更强的跨内皮迁移能力。实验发现, HDL 预培养的 EPC 能加强冠状动脉内皮细胞的粘附作用,并能抑制炎症细胞的粘附。EPC 之所以能粘附在血管内皮,是依赖于整合素的作用。他们通过流式细胞仪发现, HDL 能上调 β_2 和 α_4 整合素的水平,增强 EPC 粘附能力。

3.4 延缓内皮祖细胞的衰老与凋亡

Noor 等^[19]发现在体外加入 HDL 与空白对照比较能提高 EPC 的数量,并发现增加了 eNOS 的表达,降低了前基质金属蛋白酶-9 (pro-MMP-9) 的水平。经过同型半胱氨酸处理后,天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶 (caspase)-3 的活性明显增加而 HDL 减少。提示 HDL 使 EPC 增加可能的机制是 HDL 通过抑制 caspase-3 活性防止 EPC 的凋亡。EPC 的数量和活力还与激活的端粒酶抑制 EPC 凋亡有关。Pu 等^[20]发现端粒酶亦可被 PI3K/Akt 信号途径所调节, PI3K/Akt 本身也有调节 eNOS 的作用。而 eNOS 产生的 NO 能减少氧化应激,并能激活端粒酶。于是研究者们认为, HDL 是通过 PI3K/Akt 途径增加 NO 数量和端粒酶活性,延缓 EPC 的衰老。还有实验表明作为 PI3K/Akt 下游激活物 mTOR (mammalian target of rapamycin) 的抑制剂可以诱导 EPC 凋亡^[21]。这些都说明 PI3K/Akt 信号传导通路对延缓 EPC 衰老与凋亡有重要意义。

3.5 促进内皮祖细胞介导的内皮修复

大量研究表明 EPC 可促进缺血组织的血管修复,参与新生血管形成^[22-23]。有研究观察到,在炎症状态下, EPC 被招募至动脉内皮。在 apoE 基因敲除鼠中亦可看到同样的现象。Tso 等^[24]发现给 apoE 基因敲除鼠注入 HDL 后,其 EPC 的数量增加,提示 HDL 在内皮祖细胞介导的内皮修复中起一定作用。HDL 通过 PI3K/Akt 途径产生 eNOS 能有助于恢复血运。Makoto 等^[14]发现对于血运严重受损的 eNOS 基因

敲除老鼠, 注入 HDL 后其血运无明显恢复。抗 CD31 的免疫荧光显示, 缺血处毛细血管的数量并没有增加。他们认为很有可能, HDL 通过增加循环 EPC 的数量, 产生 eNOS 促进缺血区血管再生。

HDL 亦可通过活化胞有丝分裂有关的蛋白质磷酸化途径激活原先存在的内皮细胞, 产生 eNOS 提高 NO 的生物活性从而抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的自由基损伤, 有利于内皮修复^[25]。

4 展望

上述基础研究显示, HDL 对 EPC 的动员、增殖、分化、迁移和凋亡有正性调节作用。临床上也观察到血浆低 HDL 水平与 EPC 的数量减少和血管内皮功能受损有关。目前认为血管内皮功能障碍是心血管疾病危险因素, 更是缺血性心血管疾病的关键始动因素。改善血管内皮功能已成为缺血性心血管疾病的治疗靶点和研究方向。近年的研究表明, 外源性 EPC 移植能促进血管生成和修复, 有可能成为缺血性心血管疾病理想的细胞补充治疗。Kawamoto 等^[26]对猪心肌缺血模型移植自体 EPC, 4 周后发现实验组的缺血心肌毛细血管密度较对照组明显增加, 左室射血分数也明显改善。另有研究发现 EPC 移植有助于血管再生手术的血管再生, 但血浆 HDL 降低的患者血管难以再生。有人用静脉容积描计法观察到血浆低 HDL 水平的 ABCA1 杂合子患者前臂血流减少, 注射 HDL 后上述情况改善。高胆固醇血症的患者给予注射 HDL 后可增加流量介导的血管舒张。这些研究提示 HDL 不但有改善血管内皮功能、增强血管反应性的作用, 而且可通过对 EPC 的正性调节作用促进血管的再生和修复。然而, HDL 对 EPC 的确切调节机制仍有待今后进一步研究。

[参考文献]

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, **275** (5302): 964-967.
- [2] 周晓峰, 王佐. 内皮祖细胞在动脉粥样硬化进程中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (12): 940-942.
- [3] Assmann G, Nofer JR. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins [J]. *Annu Rev Med*, 2003, **54**: 321-341.
- [4] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors [J]. *Blood*, 2000, **95** (3): 952-958.
- [5] Jeon O, Hwang KC, Yoo KJ, et al. Combined sustained delivery of basic fibroblast growth factor and administration of granulocyte colony-stimulating factor synergistic effect on angiogenesis in mouse ischemic limbs [J]. *Endovasc Ther*, 2006, **13** (2): 175-181.
- [6] Zeng L, Xiao Q, Margariti A, et al. HDAC3 is crucial in shear and VEGF-induced stem cell differentiation toward endothelial cells [J]. *Cell Biol*, 2006, **25** (174): 1059-069.
- [7] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. *EMBO*, 1999, **18** (14): 3964-3972.
- [8] Perlingeiro RC, Kyba M, Bodie S, et al. A role for thrombopoietin in hemangioblast development [J]. *Stem Cells*, 2003, **21** (3): 272-280.
- [9] Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, et al. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, **288** (4): 1915-924.
- [10] Suzuki Y, Kami Y, Ashino H, et al. Retinoic acid controls blood vessel formation by modulating endothelial and mural cell interaction via suppression of Tie2 signaling in vascular progenitor cells [J]. *Blood*, 2004, **104** (1): 166-169.
- [11] Verna S, Kuliszewski MA, Li SH, 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): 2058-067.
- [12] Jung C, Fischer N, Fritzenwanger M, et al. Endothelial progenitor cells in adolescents: impact of overweight, age, smoking, sport, and cytokines in younger age [J]. *Clin Res Cardiol*, 2009, **98** (3): 179-188.
- [13] 龙石银, 傅明德, 田英. 高密度脂蛋白抗动脉粥样硬化作用与细胞信号转导通路 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (6): 803-806.
- [14] Makoto Sumi, Masataka Sata, Shin-ichiro Mura, et al. Reconstituted high-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and enhances ischemia-induced angiogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, **27** (4): 813-818.
- [15] Pellegatta F, Braghieri M, Grigore L, et al. In vitro isolation of circulating endothelial progenitor cells is related to the high density lipoprotein plasma levels [J]. *Int J Mol Med*, 2006, **17** (2): 203-208.
- [16] Van Oostrom O, Nieuwdorp M, Westeel PE, et al. Reconstituted HDL increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, **27** (8): 1864-865.
- [17] 张秋华, 尹洪超, 张俊华, 等. 血浆高密度脂蛋白对内皮祖细胞生长特性的影响 [J]. *中华病理杂志*, 2006, **35** (11): 672-676.
- [18] Yingneifeng, Frank Jacobs. Human ApoA-I Transfer Attenuates Transplant Arteriosclerosis via Enhanced Incorporation of Bone marrow-derived Endothelial Progenitor Cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, **28** (2): 278-283.
- [19] Noor R, Shuaib U. High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis [J]. *Atherosclerosis*, 2007, **192** (1): 92-99.
- [20] Pu DR, Liu L. HDL slowing down endothelial progenitor cells senescence: a novel atheroprotective property of HDL [J]. *Med Hypotheses*, 2008, **70** (2): 338-342.
- [21] Miruka SG, Rao V, Peterson M, et al. mTOR inhibition induces endothelial progenitor cell death [J]. *Am J Transplant*, 2006, **6** (9): 2069-079.
- [22] Hu Y, Davison F, Zhang Z, et al. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells [J]. *Circulation*, 2003, **108** (25): 3122-127.
- [23] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2001, **103** (23): 2776-779.
- [24] Colin Tsao, Gary Martinic. High-Density Lipoproteins Enhance Progenitor-Mediated Endothelium Repair in Mouse Arteriosclerosis [J]. *Thromb Vasc Biol*, 2006, **26** (5): 1144-149.
- [25] Zhang Q, Liu L, Zheng XY. Protective roles of HDL, apoA-I and mimetic peptide on endothelial function through endothelial cells and endothelial progenitor cells [J]. *Int J Cardiol*, 2009, **133** (3): 286-292.
- [26] Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2003, **107** (3): 461-468.

(此文编辑 李小玲)