

# 内皮祖细胞信号通路调控

张晓蕾 综述, 王佐 审校

(南华大学心血管病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 内皮祖细胞; 信号通路; 生物学特性

[摘要] 血管内皮受到损伤后, 骨髓来源的内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 能够被动员到外周循环血液中, 归巢到缺血区域或者血管损伤部位, 诱导内皮细胞增殖、迁移或者自己分化为功能性内皮细胞, 促进受损血管的再内皮化。因此其有望成为治疗心血管疾病的一种新的工具。然而, 调控内皮祖细胞增殖、迁移、分化等生物学特性的信号通路的研究还有待深入, 它既是该领域的难点, 也是热点, 文章就调控内皮祖细胞信号通路的研究做一综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Regulation of Endothelial Progenitor Cell Signaling Pathway

ZHANG Xiao-Lei and WANG Zuo

(Institute of Cardiovascular Diseases & Key Lab for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cells; Signaling Pathway; Biological Characteristics

[ABSTRACT] After the injury of vascular endothelial, bone marrow-derived endothelial progenitor cell can be mobilized into the peripheral circulation, home to ischemic areas or sites of vascular damage, inducing endothelial cell proliferation, migration or differentiating into functional mature endothelial cell to promote the reendothelization of the damaged vessels. So it may become a new tool for treatment of cardiovascular disease. However, the signaling pathway that regulates endothelial progenitor cell proliferation, migration, differentiation and other biological characteristics needs to be thoroughly researched, which is not only difficult but also hot in this area. This review will focus on the research regulation of endothelial progenitor cell signaling pathway.

血管内皮是循环血液和血管壁组织间的一层天然屏障, 在维持血管的正常形态和功能中起重要作用, 包括在血流和血管平滑肌细胞之间提供一个渗透性屏障、维持一个抗凝血的表面、参与调节血管紧张度和控制局部炎症反应等。内皮损伤是心血管疾病发生和发展的始动环节。内皮受损后可引起炎症反应、单核细胞浸润和血管平滑肌细胞增殖, 促发动脉粥样硬化和再狭窄。因此, 直接修复受损血管内皮, 促使血管重新内皮化已成为防止动脉粥样硬化及再狭窄领域的重要课题。大量研究表明, 内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 能加速受损血管重新内皮化, EPC 治疗受损血管是一个十分诱人的细胞治疗新领域。本文就调控内皮祖细胞增殖、迁移、分化等生物学特性的信号通路做一综述。

### 1 内皮祖细胞的募集、动员与迁移

出生后的骨髓中含有一类祖细胞, 它们具有分化成为内皮细胞的潜能, 因此被定义为内皮祖细胞 (endothelial pro-

genitor cells, EPC)。EPC 从骨髓中释放受多种生长因子、酶、配体和受体的调节。组织损伤、缺血和缺氧等多种刺激都能够促进 EPC 的动员, 这些刺激一般可致组织坏死, 从而反馈性地引起碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, FGF-2) 等因子释放, 促进血管生长。骨髓来源的 EPC 除了促进新生血管形成, 还能以旁分泌的方式释放一些因子, 这些因子能够减少炎症、促进干/祖细胞增殖和存活, 从而使受损组织得到修复<sup>[1]</sup>。

组织损伤会导致缺血, 缺血组织中低氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 表达上调, HIF-1 $\alpha$  诱导缺血组织产生基质细胞衍生因子 (stromal cell-derived factor, SDF-1) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF), SDF-1 增加 EPC 黏附、迁移、归巢到缺血区域, VEGF 通过 AKT 依赖性的内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 磷酸化激活骨髓基质细胞中的 eNOS 产生一氧化氮 (nitric oxide, NO), NO 激活骨髓中基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9), 活化的 MMP-9 促进膜结合 Kit 配体 (mKitL) 转变为可溶性 Kit 配体 (sKitL)<sup>[2]</sup>, sKitL 与干/祖细胞 (cKit<sup>+</sup>) 上相应的受体结合后使 cKit<sup>+</sup> 细胞迁移到骨髓微环境中的血管区域, 这种移位使细胞从静止状态转变为增殖状态, 并且把它们动员到外周循环中。

最近研究发现, eNOS 在介导多种因素促进骨髓 EPC 的

[收稿日期] 2010-05-10 [修回日期] 2010-08-05

[作者简介] 张晓蕾, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化分子靶标及筛药平台, E-mail 为 zxl8008@126.com。通讯作者王佐, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化分子靶标及筛药平台, E-mail 为 nb12111@126.com。

动员中起重要作用。Aicher等<sup>[2]</sup>以缺乏 eNOS 的 NOS3<sup>(-/-)</sup> 小鼠为模型,发现骨髓中的 MMP-9 含量明显减少,由 mK iL 转化而来的 sK iL 也相应减少,依赖 MMP-9 的干/祖细胞动员明显减弱;而在重新注入 sK iL 后,这种动员又可以恢复。由此他们推测由骨髓基质细胞表达的 eNOS 活性与依赖 MMP-9 介导的祖细胞动员有关,从而在 VEGF 刺激骨髓 EPC 动员机制上与 MMP-9 之间建立一种新的联系。

## 2 内皮祖细胞与 Notch 信号传导通路

### 2.1 Notch 信号与血管生物学

Notch 通路是广泛存在于脊椎和非脊椎动物中的重要信号传导通路,与其它多个高度保守的细胞传导通路一起构筑起发育的信号骨架,决定细胞的最终命运,影响器官形成及形态发生。EPC 表面存在 Notch 受体,与相应配体结合后促进 EPC 增殖、分化及动静脉转化并维持干细胞的未分化状态,在血管生成中起重要的调控作用<sup>[3]</sup>。已有证据表明干扰 Notch 信号通路能导致血管系统的异常发育。Jagged-1 配体突变可导致 A lagille 综合征、主动脉瓣疾病、心瓣膜钙化和室间隔缺损等<sup>[4]</sup>。Notch-3 基因突变导致严重的退行性血管疾病伴皮质下梗死和白质脑病的常染色体显性遗传性脑动脉病 (CADASIL)。经遗传性分析发现小鼠缺少 Notch 受体或配体后可导致血管形成异常,且内皮细胞增殖和迁移受损<sup>[5]</sup>。Notch-1、Notch-2、Notch-3 和 Delta 样配体 4 (Dll4) 或者 Jagged-1 配体的缺失都导致血管形成障碍。同样,Notch 信号下游作用靶标 Hey1 和 Hey2 的敲除也损伤血管发育。

### 2.2 Notch 信号、内皮祖细胞和骨髓环境

在骨髓微环境中,Notch 配体,特别是 Jagged-1 和 Dll4 主要在成骨细胞、间质细胞和内皮细胞上表达。表达 Notch 配体的成骨细胞与表达 Notch 受体的造血干细胞 (HSC) 之间的相互作用是调节骨髓微环境中 HSC 功能的重要分子机制之一。Notch 配体诱导 Notch 受体的蛋白水解,产生 Notch 受体的胞内段,然后胞内段转位到核内与 DNA 结合蛋白 CSL [CBF1/RBP-jk, Su(H), Lag-1] 结合,最终激活转录过程<sup>[6]</sup>。另外,最近有证据表明,每个 Notch 配体能够单独与受体结合,所以即使在同一个细胞中也可以激活不同的信号级联反应<sup>[7]</sup>。但是,出生后成人血管发育过程中配体特异性的 Notch 信号迄今为止还没有被完全阐明。因为造血祖细胞与 EPC 的起源和空间分布相似,所以推测 EPC 的增殖、分化、迁移以及形成新的血管可能是由 EPC 和骨髓微环境之间特定的 Notch 受体/配体的相互作用介导的。在骨髓微环境中,Jagged-1 在基质细胞上表达,它能够调节相应配体的发展和功能动力学,这种相互作用影响 EPC 的增殖、分化与动员,并且最终在缺血部位激活 EPC 介导的新生血管生成。

### 2.3 Notch 信号与内皮祖细胞生物学

在内皮祖细胞增殖分化过程中,尽管有粒细胞集落刺激因子、粒-巨噬细胞集落刺激因子、血管内皮生长因子、红细胞生成素、白细胞介素 18 等细胞因子的作用,Nakagami 等<sup>[8]</sup>用特异的中和抗体抑制粒-巨噬细胞集落刺激因子、粒细胞集落刺激因子、红细胞生成素等并没有阻止 EPC 的分

化,且研究发现 Notch/Jagged-1 是一种新型的血管生长因子,它在血管发生、分化和成熟过程中发挥重要调节作用。虽然缺乏直接对 EPC 增殖分化的研究,但实验表明,在肝 2/3 切除术后 4 h 内,用 PCR 法可检测到肝内的内皮细胞大量表达 Notch 配体、受体和相关基因,从而促进细胞再生<sup>[9]</sup>。Jagged-1 配体表达和功能的缺失导致骨髓细胞中内皮系基因表达下调,EPC 的克隆形成能力、增殖、迁移和存活能力都下降。缺血组织中,EPC 形成血管和血管再生能力也均受到损伤。干扰 Jagged-1 的功能导致 EPC 数量减少、生物学活性和再生能力受损,都证明了骨髓微环境中 Jagged-1 对 EPC 的动员和分化都起到非常重要的调节作用。生理性刺激或过量表达 Jagged-1 配体能够使内皮特定基因表达增加,EPC 克隆形成能力、VEGF 依赖性的增殖和迁移能力都增强,细胞存活率增加,血管新生能力也增强,这些都说明了 Jagged-1 能够促使未成熟的骨髓细胞分化为功能性的 EPC。

## 3 内皮祖细胞与 PI3K/Akt 信号传导通路

### 3.1 PI3K/Akt 信号传导途径对内皮祖细胞凋亡、衰老和分化的影响

实验表明过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma PPAR $\gamma$ ) 激动剂匹格列酮可防护 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的内皮祖细胞凋亡,而 PI3K/Akt 信号传导通路阻断剂 Wortmannin 可以阻断这一作用<sup>[10]</sup>。阿托伐他汀、美伐他汀和血管内皮生长因子可以阻止 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 EPC 凋亡,且 PI3K/Akt 途径的抑制能逆转这种抗凋亡作用<sup>[11]</sup>。还有实验表明作为 PI3K/Akt 下游激活物的 mTOR 抑制剂可以诱导 EPC 凋亡<sup>[12]</sup>。这些都说明 PI3K/Akt 信号传导通路在抗 EPC 凋亡上具有重要意义。已证实,PI3K/Akt 抗凋亡可通过以下机制: ①阻碍凋亡信号通路; ②阻碍凋亡相关基因的表达; ③激活抗凋亡通路。Imanishi 等<sup>[13]</sup>发现雌激素 E2 能明显延迟原发性高血压鼠骨髓来源的 EPC 衰老的发生,并提高其分化能力。雌激素 E2 通过 PI3K/Akt 途径提高端粒酶的活性,从而延迟 EPC 的衰老。17 $\beta$ -雌二醇 E2 可以显著增加黏附的 BM-EPC 数量,且 Akt 磷酸化增高,这个作用可被 PI3K 阻断剂抑制。

### 3.2 PI3K/Akt 信号传导途径对内皮祖细胞动员、迁移和归巢的影响

有研究显示 PI3K 基因敲除鼠的 Akt 磷酸化降低,单侧肢体缺血后的新生血管形成减少,内皮祖细胞整合到内皮网络以及迁移的能力均下降<sup>[14]</sup>。故认为 PI3K/Akt 信号传导通路在 EPC 动员、迁移和归巢上有重要作用。与成熟内皮细胞相比,Akt 对 EPC 生物学功能的调节还了解甚少。他汀类可刺激 EPC 从骨髓中动员,然后通过 PI3K/Akt 途径促进 EPC 增殖、迁移和分化<sup>[15]</sup>,且这种作用依赖于 eNOS 而高剂量或者长期服用他汀则可能起到相反的作用。PPAR $\gamma$  激动剂匹格列酮能够增加冠状动脉疾病 (CAD) 病人循环 EPC 的数量和功能,这种作用也是 PI3K 依赖性的。胰岛素除了对 EPC 的代谢、生长和分化起作用外,对内皮也有一定的作用,它通过 Akt 磷酸化 eNOS 产生 NO,引起血管扩张,降低黏附

分子的表达,具有抗动脉粥样硬化和抗炎作用,而高胰岛素血症则对 EPC 具有一定的损伤作用<sup>[16]</sup>。SDF-1 $\alpha$  能够调节 EPC 的动员,使它们归巢到损伤组织并整合成血管结构,最近已证实 SDF-1 $\alpha$  对 EPC 的动员作用依赖于 PI3K/Akt/eNOS 这一通路的激活<sup>[17]</sup>。促红细胞生成素 (EPO) 增加 EPC 的活性,激活 EPC 内的 Akt 途径,说明 EPO 通过 Akt 信号通路调节 EPC 的增殖和分化<sup>[18]</sup>。白细胞介素 18 结合蛋白 (IL-18BP) 是一种重要的抗炎蛋白,它能够激活 VEGF/Akt 信号,增加 EPC 动员和诱导其分化,刺激缺血组织的血管新生<sup>[19]</sup>。还有研究表明,在病理状态下,雌激素能够使 EPC 动员到新生血管形成部位。Imanishi 等<sup>[20]</sup>证实氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 使 Akt 去磷酸化而抑制 VEGF 诱导的 EPC 分化。

在 PI3K/Akt/eNOS 这条通路中,NO 起作用的下游底物还不清楚,可能涉及到 cGMP 和与整联蛋白相关的信号转导过程。因此,进一步研究 Akt 通路,阐明 NO 的下游调节分子有利于人们更好地了解血管的生长,并且为心血管疾病的干预治疗提供新的方法。

#### 4 内皮祖细胞与 MAPK 信号传导通路

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。MAPK 信号传导通路存在于大多数细胞内,在将胞外刺激信号传导至胞内并引起细胞生物学反应的过程中具有至关重要的作用,如细胞生长、迁移、增殖、分化及凋亡等。在哺乳类动物细胞中目前已发现存在着三条并行的 MAPK 信号通路,即 ERK 信号通路、JNK/SAPK 通路和 p38MAPK 通路。MAPK 家族成员的表达和磷酸化控制多种类型细胞的应激反应、炎症和凋亡。到目前为止,MAPK 影响 EPC 生物学功能的具体机制还不清楚,相关性的研究也很少。

Seeger 等<sup>[21]</sup>证实肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和葡萄糖呈时间和浓度依赖性地激活 p38MAPK 及其下游的有丝分裂原和应急反应激活的蛋白质激酶 (MSK1) 以及转录因子 cAMP 应答元件结合蛋白 (CREB),从而抑制 EPC 的增殖。CAD 病人 EPC 的 p38 磷酸化水平比正常人明显增高。p38MAPK 激酶抑制剂 SB203580 或者转染显性负性 p38 激酶腺病毒能够明显增加 EPC 的数量。用 SB203580 体外处理 CAD 病人的 EPC,发现 EPC 的数量显著增加且血管形成能力也得到改善。SB203580 能够增加 EPC 的数量与它的增殖能力增强以及单核细胞系标志 CD14、CD64 的减少有关,这说明 p38MAPK 调节 EPC 的增殖,它的抑制剂能够阻止 EPC 向单核细胞系分化,加速向内皮细胞系分化。而这些作用与 ERK1/2 没有直接的关系。Sun 等<sup>[22]</sup>证实,糖基化终产物 (AGE) 能够上调 AGE 受体 (RAGE) 的表达,这种作用能够被 p38MAPK 抑制剂 SB203580 以及 ERK MAPK 抑制剂 PD98059 所抑制,但是 JNK MAPK 抑制剂 SP600125 对其不起作用。AGE 呈时间和浓度依赖性地促进 EPC 凋亡,抑制 EPC 迁移,且能增加核因子  $\kappa$ B 活性,但是 AGE 引起 EPC 凋亡的确切机制还需要进一步探讨。Jiang 等<sup>[23]</sup>证实棕榈酸

(PA) 能够上调磷酸化的 p38MAPK 和 JNK,促进 EPC 凋亡,其间 Caspase-3 的表达也增加,而 ERK 的表达不受影响。棕榈酸诱导 EPC 的凋亡能够被 p38MAPK 抑制剂 SB203580 和 JNK 抑制剂 SP600125 所改善,而 ERK1/2 抑制剂 PD98059 对其不起作用。这些结果都表明棕榈酸主要是通过 p38MAPK 和 JNK 途径来促进 EPC 凋亡。Kuki 等<sup>[24]</sup>证实高糖血症导致 EPC 数目减少,抑制 p38MAPK 可以缓解高糖引起的抗血管生成作用。

#### 5 结束语

尽管本文试图总结过去几年里描述与内皮祖细胞相关的信号通路,但是仍然有许多问题还没有完全明白。比如,这些信号通路是如何协调起作用的,因为阻断其中的任何一条都能够影响 EPC 的功能。PI3K/AKT 通路和 MAPK 通路是相拮抗的两条通路,其中的一条是否是通过抑制另外一条而起作用的? 两条通路之间有什么样的关系? 是否有一条关键的途径,激活它或者阻断它足以修复受损的血管或者完全阻止 EPC 的功能? 这些问题都是以后研究中需要解决的问题,这些问题一旦得到解决,将在分子机制上为动脉粥样硬化的防治提供新的靶标。

#### [参考文献]

- [1] Hess D, Li L, Martin M, et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21 (7): 763-770
- [2] Aicher A, Heeschen C, Mikhler R, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells [J]. *Nat Med*, 2003, 9 (11): 1370-1376
- [3] 骆志清, 王毅, 罗志刚. Notch 信号通路在诱导免疫耐受作用中的研究进展 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2008, 7 (1): 139-141
- [4] Niessen K, Karsan A. Notch signaling in cardiac development [J]. *Circulation Res*, 2008, 102 (10): 1169-1181
- [5] You LR, Lin FJ, Lee CT, et al. Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity [J]. *Nature*, 2005, 435 (7038): 98-104
- [6] Kopan R, Ijagan MX. The canonical Notch signaling pathway unfolding the activation mechanism [J]. *Cell*, 2009, 137 (2): 216-233
- [7] Brooker R, Hozumik, Lewis J. Notch ligands with contrasting functions Jagged1 and Delta1 in the mouse inner ear [J]. *Development*, 2006, 133 (7): 1277-286
- [8] Nakagami H, Nakagawa N, Takeya Y, et al. Model of vasculogenesis from embryonic stem cells for vascular research and regenerative medicine [J]. *Hypertension*, 2006, 48 (1): 112-119
- [9] Kohler C, Bellaw, Bower W C, et al. Expression of Notch and its ligand Jagged1 in rat liver during liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2004, 39 (4): 1056-1065
- [10] Gensch C, Clever YP, Wemer C, et al. The PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 192 (1): 67-74
- [11] Urbich C, Knau A, Fichtlscherer S, et al. FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells [J]. *FASEB*, 2005, 19 (8): 974-976
- [12] Mirinka SG, Rao V, Peterson M, et al. mTOR inhibition induces endothelial progenitor cell death [J]. *Am J Transplant*, 2006, 6 (9): 2069-2079
- [13] Imanishi T, Kobayashi K, Hano T, et al. Effect of estrogen on differentiation and senescence in endothelial progenitor cells derived from bone marrow in spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 2005, 28 (9): 763-772
- [14] Madeddu P, Kraenkel N, Barcelos LS, et al. Phosphoinositide 3-kinase

- gamma gene knockout impairs postischemic neovascularization and endothelial progenitor cell functions [ J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 **28** (1): 68-76
- [ 15] Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors ( statins) increase endothelial progenitor cells via the PI3-kinase/Akt pathway [ J]. *J Clin Invest* 2001, **108** (3): 391-397.
- [ 16] Dandona P, Aljada A, Mohanty P. The anti-inflammatory and potential antiatherogenic effect of insulin: a new paradigm [ J]. *Diabetologia*, 2002, **45** (6): 924-930
- [ 17] Zheng H, Fu G, Dai T, et al. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway [ J]. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007, **50** (3): 274-280
- [ 18] Bahmann FH, DeGroot K, Duckert T, et al. Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin [ J]. *Kidney Int* 2003, **64** (5): 1648-652
- [ 19] Mallat Z, Silvestre JS, LeRicousse-Roussanne S, et al. Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates ischemia-induced neovascularization in mice hindlimb [ J]. *Circ Res* 2002, **91** (5): 441-448
- [ 20] Inanishi T, Hano T, Matsuo Y, et al. Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial progenitor cell differentiation [ J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003, **30** (9): 665-670
- [ 21] Seeger FH, Judith Haendeler, Walter DH, et al. p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells [ J]. *Circulation*, 2005, **111** (9): 1184-191
- [ 22] Sun CB, Liang C, Ren YS, et al. Advanced glycation end products depress function of endothelial progenitor cells via p38 and ERK 1/2 mitogen-activated protein kinase pathways [ J]. *Basic Res Cardiol* 2009, **104** (1): 42-49
- [ 23] Jiang H, Liang C, Liu X, et al. Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways [ J]. *Atherosclerosis* 2010, **210** (1): 71-77.
- [ 24] Kuki S, Inanishi T, Kobayashi K, et al. Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase [ J]. *Circ J*, 2006, **70** (8): 1076-081.

(此文编辑 许雪梅)