

[文章编号] 1007-3949(2011)19-09-0791-04

• 文献综述 •

性激素与内皮祖细胞的关系

刘睿^{1,2} 综述, 黄铁柱^{1,2} 审校

(1. 武汉大学医学院解剖学教研室, 湖北省武汉市 430071; 2. 湖北医药学院解剖学教研室, 湖北省十堰市 44200)

[关键词] 心血管疾病; 内皮祖细胞; 性激素

[摘要] 内皮祖细胞是内皮细胞的前体细胞, 主要来源于骨髓, 既有造血干细胞的特性, 又有分化为内皮细胞的潜能, 参与动脉粥样硬化的进程, 与心血管疾病关系密切。研究发现心血管疾病的发病率和死亡率存在着性别差异, 本文就雌激素、雄激素与内皮祖细胞的关系及其机制作一综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Review on the Relations Between Sex Hormones and Endothelial Progenitor Cells

LIU Rui^{1,2}, and HUANG Tie-Zhu^{1,2}

(1. Department of Anatomy, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China; 2. Department of Anatomy, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

[KEY WORDS] Cardiovascular Disease; Endothelial Progenitor Cells; Sex Hormones

[ABSTRACT] Endothelial progenitor cells (EPC) mainly derived from bone marrow are the precursor of mature endothelial cell, and have the characteristics of hematopoietic stem cells as well as the potential to differentiate into endothelial cells. EPC can participate in the process of atherosclerosis, and are closely related with cardiovascular disease. Recent studies have provided increasing evidence that gender differences exist in the morbidity and mortality of cardiovascular disease. This article tries to review the effects and mechanisms of estrogen and androgen on EPC.

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 具有循环、增殖并分化为成熟内皮细胞的能力, 但尚未表达成熟内皮细胞表面标志也未形成管腔^[1]。循环中的 EPC 在维持血管壁的完整性以及修复损伤血管的过程中发挥着重要作用, 在心血管疾病治疗领域中有巨大的潜力和应用价值。越来越多的证据表明, EPC 参与新生血管的形成, 促进损伤血管的修复, 减缓动脉粥样硬化的发展, 有益于心肌梗死后左心室功能的恢复^[1,2]。性别的差异可以对 EPC 参与缺血组织血管内皮的修复与再生的过程产生影响, 17 β -雌二醇可促进 EPC 增殖并迁移至血管新生部位, 加快缺血部位组织的修复^[3]; 雄激素对 EPC 的影响还存在争议, 但有研究表明雄激素可上调早期 EPC 的生物学功能^[4]。已有报道表明 EPC 内有雌激素、雄激素受体的存在, 这为性激素调节 EPC 生物学功能的可能性提供了物质基础^[4,5], 然而其具体机制尚不完全清楚, 有待于进一步探讨。

1 内皮祖细胞相关特性

1.1 内皮祖细胞的表面标记

早期研究认为 EPC 是共同表达造血干细胞标记 CD34 和内皮细胞标记 VEGFR2 的一类细胞。随后有研究发现成熟内皮细胞也同时表达 CD34 和 VEGFR2, 于是一种新的糖蛋白 CD133 被认为是不成熟干细胞/祖细胞更合适的表面标记^[6]。虽然, EPC 与内皮细胞及不同组织的干细胞/祖细胞存在着共同的表面标记, 目前仍习惯将 EPC 定义为表面标记物 AC133, CD34 和 VEGFR2 阳性的一类细胞。内皮细胞表型如 VE-cadherin、vWF、eNOS、CD31 等常被用来监测 EPC 分化情况, 是 EPC 定向分化的常用标记。

1.2 内皮祖细胞形态与分型

有学者认为成人外周血存在两种类型 EPC, 早期 EPC 和晚期 EPC。在体外培养过程中发现, 最初培养时细胞呈圆形, 培养 3~5 天, 细胞贴壁、拉长呈

[收稿日期] 2011-04-07

[基金项目] 湖北省教育厅重点项目 (D20092403), 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划 (T201008) 项目资助

[作者简介] 刘睿, 硕士研究生, 研究方向为医用生物力学, E-mail 为 vliurui@163.com。黄铁柱, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为医用生物力学, E-mail 为 HTZ0212@163.com。

纺锤状,并簇集生长,这类细胞为早期 EPC。晚期 EPC 在培养的 2~4 周出现,呈鹅卵石状,4~8 周其数量呈指数式增长,该类细胞可持续生长约 12 周。早晚期 EPC 的 VE-cadherin、Flt-1、KDR 及 CD45 表达水平有所不同,晚期比早期表达明显^[7]。

近期有学者发现,早期、晚期 EPC 基因表达标记明显不同。早期 EPC 高度表达与免疫系统相关的造血干细胞特异性转录物和炎性因子转录物;而与血管生长、新生血管形成信号通路相关的转录物则高表达于晚期 EPC^[8]。尽管早期、晚期 EPC 在体外培养时表面标记和功能存在差异,但研究发现早期、晚期 EPC 在体内对缺血部位新血管形成做出的贡献是相当的^[7]。

1.3 内皮祖细胞鉴定

由于 EPC 主要来源于骨髓,处于由不成熟干细胞向成熟内皮细胞分化的过渡阶段,所以其表面标记是一个动态变化的过程,给其鉴定带来了一定的困难。对 EPC 的鉴定,主要从 EPC 具有干细胞/祖细胞特性和分化为内皮细胞潜能两个角度进行,需将其表型、形态以及功能综合考虑。

EPC 具有与造血干细胞和内皮细胞相同的一些表面标记,至今还未发现能将三者完全区分的特异性表面标记,但目前习惯将 CD34⁺/CD133⁺/VEGFR2⁺ 作为 EPC 的表面鉴定标记。另外从形态学角度看,一般在二维培养体系中,大部分 EPC 迅速增殖,呈圆形或纺锤形,集簇生长;而内皮细胞在培养体系中呈单层细胞生长,细胞聚集会抑制其生长,表现为所谓的“鹅卵石”形态^[9]。然而,仅依据细胞形态来区分 EPC 与内皮细胞并不十分可靠。由于 EPC 能摄取活性染料 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(ac-LDL)并可结合 FITC 标记的荆豆凝集素 1(UEA-1),因此 ac-LDL 摄取及 UEA-1 结合荧光双染是目前 EPC 鉴定最常用、最经典的方法之一。

最近也有学者发现早期、晚期 EPC 均表达内皮一氧化氮合酶(eNOS)蛋白,且均可产生一氧化氮(NO),因此认为 eNOS 蛋白的表达、NO 的产生可作为两者共同的生物特性来鉴定 EPC^[10]。

1.4 内皮祖细胞功能

EPC 具有较强的增殖能力,且能够从骨髓释放入外周血,迁移、黏附至损伤内皮修复或新生血管形成的部位。愈来愈多的证据表明,心血管系统疾病,如动脉粥样硬化、血管损伤后狭窄、心肌梗死后再生等不仅依赖于受损血管及心肌组织周围的细胞发挥作用,也受到骨髓来源 EPC 的影响。EPC 从骨髓到

达损伤血管内皮处可分为三个阶段^[11]:首先,EPC 受到特殊物质(细胞因子、生长因子等)刺激后从骨髓释放入外周循环,这一过程称为动员;随后,在这些特殊因子的作用下优先迁移、黏附至损伤组织部位,这一过程称为归巢;最后,部分 EPC 分化为成熟内皮细胞通过对已存血管的延伸(称为 angiogenesis),或者在原位直接形成新血管(称为 vasculogenesis),参与缺血部位新生血管的形成。

2 雌激素与内皮祖细胞

2.1 雌激素对内皮祖细胞功能的影响

雌激素对心血管系统有显著的影响,研究表明,雌激素直接或间接通过对血管细胞的影响发挥其血管保护作用。最近研究发现雌激素可刺激 EPC 动员、增殖并迁移至血管新生部位,促进组织受损部位的血管新生^[3]。另有研究表明,从自发性高血压大鼠骨髓分离的 EPC,其分化及黏附能力均比正常 Wistar 大鼠低,而雌激素能促进自发性高血压大鼠骨髓来源 EPC 的分化、增强其黏附能力,且能延缓其衰老^[12]。从葡萄和虎杖等植物中提取的一种植物雌激素——白藜芦醇,能增加体外培养 EPC 的数量、增强其增殖、黏附和迁移能力,并且这种作用在一定范围内呈剂量依赖性和时间依赖性^[13]。

2.2 雌激素对内皮祖细胞功能影响的可能机制

纵观国内外研究结果,可见雌激素在 EPC 功能调节过程中发挥着重要作用,根据目前研究结果,其调控机制可能涉及以下几个方面。

2.2.1 雌激素通过雌激素受体及 PI3K/Akt 信号途径调控内皮祖细胞功能

雌激素对心血管的多方面影响是通过基因与非基因途径发挥作用的。基因途径是雌激素产生作用的经典模式,启动较缓慢,由雌激素受体(ER)介导。雌激素受体(ER)包括 ER α 、ER β ,属于类固醇/甲状腺激素核受体超家族成员,表达于多种细胞,包括造血干细胞、内皮祖细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞和心肌细胞等。

雌激素扩散穿过靶细胞膜,与胞内雌激素受体特异性、高亲和力结合,这种核雌激素受体复合物,又结合于细胞核内 DNA 雌激素效应元件的特定区域,调控靶基因的表达及蛋白质的合成。细胞内蛋白的改变将触发级联性的反应事件,影响代谢的进程从而影响细胞的生长和分化^[14]。研究表明,17 β -雌二醇可通过与内皮祖细胞雌激素受体结合,进而激活 PI3K/Akt 信号通路介导内皮祖细胞的增殖和

迁移^[15]。PI3K 即磷脂酰肌醇 3 激酶, Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 也称为蛋白激酶 B, 是 PI3K 的下游靶蛋白。在细胞的生长、代谢及功能调节过程中 PI3K/Akt 信号通路发挥着重要作用, 当 PI3K 被激活后, 继而催化 PIP2 (3,4-二磷酸磷脂酰肌醇) 产生 PIP3 (3,4,5-三羟甲基氨基甲烷磷酸磷脂酰肌醇), PIP3 与 Akt 的 PH 区结合后可将 Akt 招募至细胞质膜, 与质膜相连的激酶可进一步磷酸化 Akt 催化区的 Thr308 和调节区的 Ser473 位点, 从而使 Akt 具有活性。此时, 活化的 Akt 可以进一步磷酸化细胞膜、细胞质和细胞核中的底物, 从而继续向下游传递级联磷酸化信号, 影响细胞的生长、代谢和功能调节^[16]。最近 Imanishi 等^[17]报道, 雌激素可通过活化 PI3K/Akt 信号通路, 增强端粒酶活性从而延缓 EPC 的衰老。雌激素也可激活 PI3K/Akt 信号通路, 促进 NO 释放, NO 可激活细胞内的抗氧化系统, 进而上调 EPC 生物学功能; PI3K/Akt 特异性抑制剂 LY294002 可以减弱雌激素对 EPC 促进增殖、延缓衰老的作用, 这均表明 PI3K/Akt 信号通路在雌激素调节 EPC 功能的过程发挥着重要作用^[18-20]。

2.2.2 雌激素通过增加端粒酶活性调节内皮祖细胞功能 骨髓来源的 EPC 并不是多向分化性、自我更新性的干细胞, 而是定向谱系的祖细胞, 因此具有复制衰老的特性^[12]。老化或衰老构成潜在的影响因素, 限制 EPC 参与缺血组织、损伤血管修复的能力。

细胞的衰老受端粒的影响, 端粒是位于真核细胞染色体末端的特殊核蛋白结构, 可保护基因组的完整性与稳定性, 其长短与细胞衰老密切相关。端粒 DNA 的合成需要有端粒酶和其他相关蛋白的参与, 端粒酶有一个催化亚基 TERT (即端粒酶逆转录酶) 和 RNA 组分 TERC (即端粒酶 RNA 组分) 作为端粒 DNA 从头合成的模板, 因此端粒酶的活性影响着细胞的衰老进程^[17]。研究发现 17 β -雌二醇可显著增加端粒酶活性, 延缓 EPC 的衰老进程; 血管紧张素 II 明显降低端粒酶活性, 而经雌激素预处理后, 血管紧张素 II 的这种作用明显抑制^[17]。因此, 雌激素可通过影响增强端粒酶活性延缓 EPC 的衰老, 从而加强 EPC 生物学功能。

2.2.3 雌激素通过骨桥蛋白调节内皮祖细胞生物学功能 近期有研究表明雌激素受体 (ER α) 下游的骨桥蛋白在 EPC 归巢至受损血管区域过程中发挥了重要作用^[21]。研究者推测了雌激素介导的、骨桥蛋白依赖的 EPC 归巢可能机制, 即骨桥蛋白及其片段可通过与结合素类物质和 CD44 抗原相结

合, 作为 EPC 和血管内皮的连接体, 使 EPC 与受损血管壁紧密相连; 而 EPC、成骨细胞及血管细胞又可充当骨桥蛋白的来源地^[21]。雌激素可能通过修饰存在于骨髓小室中 EPC 的分化来刺激其归巢行为, 比如: 通过增加 VEGF-R2 的表达, 或刺激骨桥蛋白从成骨细胞释放; 雌激素也可能通过刺激基质金属蛋白酶 (MMP) 活性从而增加骨桥蛋白片段数量, 由此增强 EPC 与受损血管壁的结合能力^[21]。

3 雄激素与内皮祖细胞

3.1 雄激素对内皮祖细胞功能的影响

雄激素对 EPC 的影响仅有少数文献报道, 且存在争议。Foresta 等^[22]认为雄激素具有上调 EPC 生物学功能的作用, 他们发现性腺机能减退的男性患者体内循环 EPC 数量较少, 雄激素 (睾酮) 替代治疗后数量显著增加; 体外研究表明, 人工合成雄激素 (甲基三烯甘油酯酮, 简称 R1881) 可增强早期 EPC 的增殖、迁移和集落形成能力^[4]。但也有学者发现, 去势大鼠给予雄激素 (睾酮、双氢睾酮) 替代治疗后, EPC 数目不能恢复至正常水平, 且雄激素 (睾酮、双氢睾酮) 对体外培养晚期 EPC 的增殖、黏附和集落形成能力没有影响, 仅对早期 EPC 的数量有上调作用^[23]。

综合分析两者的研究过程和结果, 可发现研究结果中出现的差异, 除了与两者体外干预选择 EPC 的时期不同有关外, 与两者使用的雄激素不同也有一定的关系。此外, 体内研究所选用对象不同, 人和鼠来源的 EPC 生物学功能可能不完全一致, 也会导致研究结果产生差异。因此, 有必要使用统一的方法和路线来研究雄激素对 EPC 的影响, 以确定雄激素在心血管疾病中发挥的作用。

3.2 雄激素对内皮祖细胞功能影响的可能机制

雄激素通过何种机制影响 EPC 的生物学功能, 目前尚不清楚。研究发现, 人工合成雄激素 R1881 在一定浓度范围内可呈剂量依赖性促进 EPC 增殖、迁移以及集落的形成, 并可促使 EPC 内雄激素受体向核内转移^[4]。雄激素受体 (AR) 是核受体超家族成员, 作为配体依赖的转录因子来介导雄激素发挥生理效应, 当雄激素与其配体结合后引起受体发生二聚化作用形成二聚体, 并由细胞质转移至细胞核, 该二聚体在细胞核内结合基因启动子或调控区域中的特异 DNA 序列, 从而引起雄激素效应基因的转录调控^[4]。EPC 胞核与胞浆内有雄激素受体的存

在^[4,22], 这为雄激素调控 EPC 生物学功能的可能性提供了物质基础。

然而, 有关雄激素调节 EPC 生物学功能的具体下游机制, 目前尚不完全清楚, 有待于进一步探讨。另外, 目前有限的研究仅表明, 在正常男性及患有性腺机能减退的男性患者, 雄激素可能通过受体途径调节 EPC 的生物学功能, 那么在其他病理条件下, 雄激素能否依然发挥对 EPC 功能的调节作用也还需要进一步的研究来加以澄清。

4 结论与展望

EPC 在血管损伤的修复和新生血管的形成中发挥重要作用, 而不同性别之间, EPC 的生物学功能可能存在着差异, 了解雌激素、雄激素对 EPC 生物学功能的影响及其相关机制, 进一步探讨动脉粥样硬化进展的性别差异、衰老的机制、生殖系统肿瘤的发生发展机制, 对动脉粥样硬化和肿瘤的防治有着巨大的应用前景。

[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 (5 302): 964-967.
- [2] Pelliccia F, Pasceri V, Cianfrocca C, et al. Endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction [J]. *Coron Artery Dis*, 2009, 20 (5): 303-308.
- [3] Ruifrok WP, de Boer RA, Iwakura A, et al. Estradiol-induced, endothelial progenitor cell-mediated neovascularization in male mice with hind-limb ischemia [J]. *Vasc Med*, 2009, 14 (1): 29-36.
- [4] Foresta C, Zuccarello D, De Toni L, et al. Androgens stimulate endothelial progenitor cells through an androgen receptor-mediated pathway [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008, 68 (2): 284-289.
- [5] Baruscotti I, Barchiesi F, Jackson EK, et al. Estradiol stimulates capillary formation by human endothelial progenitor cells: role of estrogen receptor-(alpha) / (beta), heme oxygenase 1, and tyrosine kinase [J]. *Hypertension*, 2010, 56 (3): 397-404.
- [6] Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, et al. AC133/CD133/Prominin-1 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37 (4): 715-719.
- [7] Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (2): 288-293.
- [8] Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, et al. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities [J]. *BMC Med Genomics*, 2010, 3 (1): 18.
- [9] Smadja DM, Cornet A, Emmerich J, et al. Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2007, 23 (4): 223-239.
- [10] Qiao W, Niu L, Liu Z, et al. Endothelial nitric oxide synthase as a marker for human endothelial progenitor cells [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2010, 221 (1): 19-27.
- [11] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2004, 14 (8): 318-322.
- [12] 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]. *Hypertens Res*, 2005, 28 (9): 763-772.
- [13] Wang XB, Huang J, Zou JG, et al. Effects of resveratrol on number and activity of endothelial progenitor cells from human peripheral blood [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007, 34 (11): 1109-1115.
- [14] Xing D, Nozell S, Chen YF, et al. Estrogen and mechanisms of vascular protection [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29 (3): 289-295.
- [15] Zhao X, Huang L, Yin Y, et al. Estrogen induces endothelial progenitor cells proliferation and migration by estrogen receptors and PI3K-dependent pathways [J]. *Microvasc Res*, 2008, 75 (1): 45-52.
- [16] Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2004, 29 (5): 233-242.
- [17] Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces angiotensin II-induced acceleration of senescence in endothelial progenitor cells [J]. *Hypertens Res*, 2005, 28 (3): 263-271.
- [18] Imanishi T, Tsujioka H, Akasaka T. Endothelial progenitor cell senescence-is there a role for estrogen [J]. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2010, 4 (1): 55-69.
- [19] 张晓蕾, 王佐. 内皮祖细胞信号通路调控 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18 (10): 837-840.
- [20] 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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12 (2): 233-237.
- [21] Kuki S, Imanishi 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.
- [22] Foresta C, Caretta N, Lana A, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells in hypogonadal men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91 (11): 4599-602.
- [23] Fadini GP, Albiero M, Cignarella A, et al. Effects of androgens on endothelial progenitor cells in vitro and in vivo [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2009, 117 (10): 355-364.

(此文编辑 李小玲)