

内皮祖细胞临床应用的研究进展

张美华, 张艳萍, 盖凌, 于建春 综述

(山东省计划生育科学技术研究所, 山东省优生技术重点实验室, 济南 250002)

[摘要] 内皮祖细胞是内皮细胞的前体细胞, 在某些生理、病理状态下, 可随血液流至相应组织, 分化为内皮细胞, 并进一步形成血管。内皮祖细胞参与血管新生的作用, 对于创伤修复、缺血性疾病的治疗以及肿瘤的靶向治疗具有重要意义, 在临床上具有广阔的应用前景。

[关键词] 内皮祖细胞; 血管新生; 缺血性疾病; 肿瘤

Clinical application of endothelial progenitor cells

ZHANG Meihua, ZHANG Yanping, GAI Ling, YU Jianchun

(Shandong Provincial Family Planning Institute of Science and Technology;
Key Laboratory for Improving Birth Outcome Technique, Jinan 250002, China)

Abstract Endothelial progenitor cells are the precursor cells of the endothelial cells. Under certain physiological and pathological conditions, they flow with the blood to an appropriate organization, where they differentiate into endothelial cells, and can form further blood vessels. The effect of endothelial progenitor cells' participating in angiogenesis, may have great significance for wound healing, the treatment of ischemic disease and cancer targeted therapy. It has prospects for broad application in clinical practice.

Key words endothelial progenitor cells; angiogenesis; ischemic disease; cancer

Int J Pathol Clin Med, 2012, 32(4): 356-360. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7347.2012.04.017

1997年, Asahara等^[1]首次发现人体外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞, 将其命名为血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)。研究发现EPCs不仅参与胚胎期的血管发生, 对于成人的血管新生也发挥重要作用。因而引起了学者的广泛关注。目前, 人们已经从胎肝、骨髓、脐带血、外周血、脂肪组织、心肌组织、骨骼肌、脾、小肠等分离出EPCs, 为EPCs的研究和应用提供了广泛的细胞来源。临床上通过移植EPCs治疗缺血性疾病已经获得成功。本文对近年来EPCs在临床治疗方面

的研究进展作一综述。

1 EPCs的来源和生物学特征

研究表明, EPCs和造血干细胞来自共同的中胚层前体细胞-成血管细胞(hemangioblast)。出生后的机体中EPCs主要定居于骨髓, 在某些生理、病理状态下, 可从骨髓释放出来进入外周血循环。未分化的EPCs呈圆形, 在形态上无法与其它细胞区别开来, 故主要依靠细胞表面标

收稿日期 (Date of reception): 2012-03-30

作者简介 (Biography): 张美华, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事内皮祖细胞的动员及其在病理妊娠中的作用研究。

通信作者 (Corresponding author): 张美华, Email: meihua2013@163.com

志识别。2000年Gehling等^[2]将同时具有CD34, CD133, 血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2)这三种表面标志的细胞称为早期的功能性血管EPCs。2003年Fujiyama等^[3]提出EPCs来源于单个核细胞或者CD14⁺的单核细胞。还有学者从CD34⁺/CD45⁻的细胞群中分离出EPCs^[4]。Fadini等^[5]最近的研究提出, CD34⁺/VEGFR-2⁺细胞群可以包括不同阶段的EPCs。EPCs还具有摄取乙酰化的低密度脂蛋白(acetylated low density lipoprotein, Dilac-LDL)和植物凝集素(ulex europaeus lectin 1, UEA-1)的特性, 因此, 应用Dilac-LDL和UEA-1双标记染色, 可鉴定EPCs。此外, 研究表明存在两种类型的EPCs, 即早期EPCs和晚期EPCs。早期EPCs既表达内皮特异性抗原, 又表达单核巨噬细胞相关抗原(如CD45, CD11b, CD14, CD68等), 增殖能力较弱, 主要通过分泌血管生成因子发挥促血管新生的作用; 晚期EPCs具有高增殖分化潜能, 可以通过分化为成熟内皮细胞的方式参与血管的新生^[6]。同时移植两种类型的EPCs可产生协同作用, 更好地发挥促进缺血区血管新生的作用。

2 EPCs临床应用研究

2.1 EPCs与心肌缺血性损伤

EPCs可以通过修复受损内皮、重建血管网络和新生心肌细胞等途径修复缺血的心肌组织。传统的心血管危险因素(如高血压、高血脂、糖尿病、吸烟等)都可不同程度影响EPCs数量和质量, 而多种治疗药物(如他汀类药物、罗格列酮等)均能增加EPCs的数量和质量。各种危险因素在造成内皮损伤、导致动脉粥样硬化的同时, 也损害EPCs的修复能力。EPCs的修复能力的降低又加速了心血管疾病的进程。一项前瞻性随机试验显示: 通过静脉给予10 mL的EPCs悬液治疗特发性肺动脉高压病人, 病人平均肺动脉血压得到了更好的改善, 肺血管阻力降低, 心输出量增加, 与较传统方法相比差别显著^[7]。Werner等^[8]对519名冠心病患者进行12个月随访调查, 发现高水平的EPCs能减低心血管病死亡风险、首次主要心血管事件发病风险和住院治疗风险, 因而证实EPCs的数量和功能变化能预测心血管病的发病率和病死率, 在心血管疾病的预测和缺血性疾病的治疗等方面具有广阔的应用前景。目前, 学者们通过

冠状动脉注射、心肌内注射和经外周血管注射等途径观察EPCs归巢到缺血心脏的情况。另有研究发现, 冠脉注射法移植EPCs效果最好, 而且可以避免EPCs到达非治疗部位, 提高靶向性, 显示了较好的应用前景^[9]。

2.2 EPCs与脑缺血性损伤

脑缺血部位新生血管的形成, 在脑组织修复中起重要作用。Hess等^[10]将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的小鼠骨髓移植给中脑动脉闭塞引起的脑梗死小鼠, 标记的骨髓细胞整合入缺血部位, 表现为内皮细胞表型。提示脑梗死组织中, 存在EPCs参与的血管发生。近期的研究发现: 缺血性脑卒中急性期循环EPCs的数量明显提高; 缺血性脑卒中48 h内循环EPCs的水平与脑卒中预后密切相关; 在缺血性脑卒中急性期注射EPCs能明显改善脑组织缺血, 减轻不良临床结局^[11]。Chen等^[12]将兔自体EPCs经静脉注入到永久性大脑中动脉栓塞模型的体内后发现: 在缺血边缘区域微血管密度增加, 凋亡细胞减少, 脑功能恢复得到改善, 表明补充外源性EPCs治疗脑梗死可行、有效。缺血性脑卒中后神经再生、神经功能的恢复与缺血部位新生血管形成、重塑密切相关。EPCs参与梗死后脑血管新生的作用, 对于脑卒中的预防、治疗以及预后评价具有重要意义。

2.3 EPCs与临床肢体缺血

肢体损伤后会释放血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和基质细胞衍生因子(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)等信号因子, 动员骨髓中的EPCs迁移到缺血部位, 参与缺血组织血管的再生和内皮的修复。Tateishi-Yuyama等^[13]发现: 将骨髓来源的EPCs自体移植于肢体血管闭塞性疾病的病人后, 可明显减轻病变肢体的静息性疼痛, 无痛步行时间延长。踝-肱指数和经皮氧分压检测结果表明: 肢体血流明显改善, 观察24周末发现严重并发症。临床上应用EPCs治疗糖尿病并发周围血管病的病人, 明显改善了糖尿病人外周血管形成的能力。

2.4 EPCs与病理妊娠

胚胎发育早期, EPCs参与血管发生, 形成血管网络, 维持胚胎发育。随着妊娠进展, EPCs

促进子宫胎盘小动脉增加, 促进胎儿器官分化和发育。最近研究^[14]发现: 妇女怀孕后外周血EPCs的数量增加, 且在怀孕早期增加更明显。因此, 妊娠过程中循环EPCs的数量和功能改变可能影响母体血管系统功能稳定以及子宫胎盘的形成功能。目前, 关于EPCs在病理妊娠中的研究, 主要集中在子痫前期和妊娠期糖尿病。子痫前期主要表现为妊娠20周后的高血压和蛋白尿, 是导致妊娠妇女和新生儿死亡的重要因素。血管内皮损伤是子痫前期的重要病理过程。研究^[15]发现子痫前期患者脐静脉血和胎盘组织以及外周血中的EPCs数量明显低于正常妊娠妇女。对子痫前期患者外周血EPCs进行体外培养, 集落形成数目明显低于对照组。妊娠EPCs数量不足和功能障碍可能与子痫的发生密切相关。2007年, Buemi等^[16]发现妊娠期糖尿病患者的外周血EPCs低于正常对照组, 且功能降低明显。近期有学者发现: 胎儿生长受限孕妇外周血EPCs数量减少, 新生儿脐带血EPCs的黏附、增殖功能也相应下降^[17]。关于EPCs在病理妊娠过程中发挥的作用及具体机制尚不明确。目前, 关于妊娠期EPCs的研究刚起步不久, 一些研究结果也尚存在争议。随着今后EPCs与病理妊娠关系研究的进一步深入, 其作用机制进一步明确, 将为病理妊娠的治疗提供更广阔的方向。

2.5 EPCs与肿瘤

研究^[18-20]表明: 胰腺癌、恶性胶质细胞瘤以及非小细胞肺癌等诸多癌症患者的外周血中EPCs水平增加。在一些肿瘤中, 外周血EPCs的数目也与肿瘤的体积、分化阶段、肿瘤类型相关。因此有人提出外周血EPCs可作为一个诊断标志物并预测肿瘤的发生。Hibe等^[21]检测63例非小细胞肺癌标本发现: 有43例患者肿瘤组织和毛细管中有EPCs。Vajkoczy等^[22]经静脉移植EPCs, 检测到这些EPCs聚集到肿瘤微血管, 并穿过内皮到达组织间隙, 形成多细胞群落, 然后分化和参与血管新生。以上研究结果表明, EPCs参与了肿瘤血管的新生。肿瘤的生长、浸润和转移依赖于肿瘤血管的新生。EPCs在肿瘤血管新生中的作用程度目前尚不清楚, SDF-1/趋化因子受体-4 (chemokine receptor-4, CXCR-4)信号途径, Notch信号通路以及磷脂酰肌醇3激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/Akt信号途径可能与EPCs参与的肿瘤血管新生密切相关。然而, EPCs是分化成内皮细胞后直接参与还是通过旁分泌途径参与肿瘤

血管新生仍没有定论, 其分子生物学机制有待于进一步探讨。随着对新生血管生成机制研究的不断深入, 靶向抗血管治疗抑制肿瘤生长的策略发展迅速。EPCs参与肿瘤血管新生的作用使其可能成为肿瘤基因药物治疗的最佳载体及抗血管生成治疗肿瘤的靶点。

2.6 EPCs与生物工程

应用组织工程构建血管的关键是使血管具有完整的内皮细胞层。EPCs具有再内皮化特性且能分泌一氧化氮、前列腺素1和组织型纤溶酶原活化因子等抗血栓生物活性物质, 为组织工程血管移入体内保持高通畅率提供了理论依据。研究发现: 将包被EPCs的血管植入体内的组织工程膀胱, 组织灌注良好达3 h, 而未包被EPCs的对照组在30 min内形成血栓^[23]。将EPCs种植在移植体、支架和生物工程血管的表面, 可产生生物活性的内皮层, 提高血管的舒张功能, 解决传统移植体易形成血栓、易被细菌污染和易引起假性内膜增生等问题, 为组织工程提供了广阔的应用前景。

3 EPCs的移植策略

EPCs因为取材方便, 来源广泛, 自体移植无免疫排斥反应等优点, 成为细胞移植治疗缺血性疾病的种子细胞。但是由于体内EPCs数量较少, 移植后的细胞仅有少数能迁徙到受损器官, 且在缺血组织受各种有害因子的影响很容易死亡, 给EPCs的临床应用带来了一定的限制。目前主要通过增加循环中EPCs的数量, 增强其增殖、迁移、分化的能力使EPCs更好地发挥治疗作用。研究发现: 将体外扩增的人EPCs移植入冠状动脉结扎的实验鼠体内, 可明显改善心肌功能。同时, 应用EPCs动员剂 (如他汀类药物) 可通过PI3K/Akt途径增加外周血中EPCs的数量和减缓EPCs的衰老, 对保持血管内皮的完整性、改善心肌梗死后的血液供应、减小梗死面积具有积极作用。此外, 将EPCs在体外经基因修饰后重输回体内, 使其到达病变组织后能表达特定的治疗药物分子并分泌细胞因子等生物活性物质, 可以在重建内皮的同时对损伤后的血管病理生理反应进行调节, 达到更好的治疗效果。Jiang等^[24]应用腺病毒介导的低氧诱导因子 α (hypoxia inducible factor-alpha, HIF- α) 修饰EPCs, 显示了更强的血管修复作用, 且可维持更长效果。Song等^[25]将转染肝细胞

生长因子的EPCs应用于高胆固醇血症的兔子, 结果显示EPCs促进毛细血管生成和再内皮化的能力增强, 与对照组相比差别有统计学意义。最近的研究^[26]发现EPCs联合细胞因子共同注射能显著改善心功能。EPCs在抗肿瘤治疗中的应用, 主要体现在对肿瘤血管生长的抑制方面。另有研究发现: 可溶性、截短形式的血管内皮生长因子受体fik-1是血管生成的抑制剂, 转染血管生成抑制剂的EPCs能趋化到肿瘤部位, 可有效抑制肿瘤血管的生成。此外, EPCs迁移至肿瘤组织的过程中需要VEGF和血小板来源生长因子等多种细胞因子的参与, 针对这些细胞因子或其受体进行干预, 也能抑制肿瘤血管的生长。

4 展望

EPCs的发现为临床缺血性疾病的治疗、肿瘤的靶向治疗以及组织工程的开展提供了新的方向, 意义重大。然而, 目前尚缺少大规模随机临床对照试验证实EPCs治疗的长期安全性和有效性, 临床治疗的致瘤性和基因治疗的安全性等问题尚待解决。相信随着研究的进一步深入, EPCs的应用前景必将更加广阔。

参考文献

- Asahara T, Murobara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967.
- Ghling UM, Ergün S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells[J]. *Blood*, 2000, 95(10): 3106-3112.
- Fujiyama S, Amano K, Uehira K, et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells[J]. *Circ Res*, 2003, 93(10): 980-989.
- Timmermans F, van Hauwermeiren F, de Smedt M, et al. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133⁺ cells or CD45⁺ hematopoietic precursors[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(7): 1572-1579.
- Fadini GP, Baesso I, Albiero M, et al. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 197(2): 496-503.
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(2): 288-293.
- Wang XX, Zhang FR, Shang YP, et al. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(10): 1566-1571.
- Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcome[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(10): 999-1007.
- Qian C, Tio RA, Roka AJ, et al. A promising technique for transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into rat heart[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2007, 16(3): 127-135.
- Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, et al. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN- expressing cells after stroke [J]. *Stroke*, 2002, 33(5): 1362-1368.
- Yip HK, Chang LT, Chang WN, et al. Level and value of circulation endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2008, 39(1): 69-74.
- Chen ZZ, Jiang XD, Zhang LL, et al. Beneficial effect of autologous transplantation of bone marrow stromal cells and endothelial progenitor cells on cerebral ischemia in rabbits[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 445(1): 36-41.
- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2002, 360(9331): 427-435.
- 张美华, 张红伟, 贾颐航, 等. 雌激素对孕妇外周血内皮祖细胞数量的影响[J]. *解剖学杂志*, 2011, 34(2): 180-182.
- ZHANG Meihua, ZHANG Hongwei, JIA Yifang, et al. The impact of estrogen on the number of endothelial progenitor cells in peripheral blood of pregnant women[J]. *Chinese Journal of Anatomy*, 2011, 34(2): 180-182.
- Hwang HS, Maeng YS, Park YW, et al. Increase senescence and reduced functional ability of fetal endothelial progenitor cells in pregnancies complicated by preeclampsia without intrauterine growth restriction [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2008, 199(3): 2591-2597.
- Buemi M, Allegra A, D'Anna R, et al. Concentration of circulating endothelial progenitor cells in normal pregnancy and in pregnant women with diabetes and hypertension [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2007, 196(1): 681-686.
- 项晶, 周春. 胎儿生长受限孕妇外周血及新生儿脐血中内皮祖细胞数量和功能的变化[J]. *武汉大学学报*, 2011, 31(1): 74-78.
- XIANG Jing, ZHOU Chun. Changes in the number and activity

- of endothelial progenitor cells in peripheral blood of grávida and umbilical cord blood of infant with fetal growth restriction [J]. *Medical Journal of Wuhan University*, 2011, 31(1): 74-78.
18. Vizio B, Novarino A, Giacobino A, et al. Pilot study to relate clinical outcome in pancreatic carcinoma and angiogenic plasma factors/circulating mature/progenitor endothelial cells: preliminary results [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(11): 2448-2454.
 19. Rafat N, Beck G, Schulte J, et al. Circulating endothelial progenitor cells in malignant gliomas [J]. *J Neurosurg*, 2010, 112(1): 43-49.
 20. Nowak K, Rafat N, Belle S, et al. Circulating endothelial progenitor cells are increased in human lung cancer and correlate with stage of disease [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2010, 37(4): 758-763.
 21. Hibe W, Diruhofer S, Oberwasserlechner F, et al. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumor vasculature in nonsmall cell lung cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57(9): 965-969.
 22. Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, et al. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis [J]. *J Exp Med*, 2003, 197(12): 1755-1765.
 23. Schultheiss D, Gabouev AI, Cebotari S, et al. Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model [J]. *J Urol*, 2005, 173(1): 276-280.
 24. Jiang M, Wang C, He B, et al. Angiogenesis by transplantation of HIF-1alpha modified EPCs into ischemic limbs [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103(1): 321-334.
 25. Song M, Yu X, Zhu G, et al. Transfection of HGF gene enhances endothelial progenitor cell (EPC) function and improves EPC transplant efficiency for balloon-induced arterial injury in hypercholesterolemic rats [J]. *Vasc Pharmacol*, 2009, 51(2): 205-213.
 26. Schuh A, Liehn EA, Sasse A, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model [J]. *Basic Res Cardiol*, 2008, 103(1): 69-77.

(本文编辑 傅希文)