

- [19] 李秀艳,王玉良,杨瑞贞,等. 脑电超慢涨落图技术在癫痫研究中的应用. 中国应用生理学杂志, 2000, 16(3): 286-288.
- [20] 余巨明,陈志群,张丽兰,等. 药物控制良好与不良的癫痫大发作患者脑内神经递质活动的超慢涨落图特征. 川北医学院学报, 2005, 20(4): 361-363.
- [21] 李绍旦,杨明会,王振福,等. 亚健康失眠人群脑内神经递质水平分析. 中国全科医学, 2008, 11(1): 24-26.
- [22] 曾远明,李长清,胡长林. 慢性失眠病人脑内神经递质活动的超慢涨落图表现. 临床神经电生理学杂志, 2005, 14(2): 85-87.
- [23] 毛庆祥,闫红,颜娅,等. 丙泊酚对顽固性失眠患者的脑电超慢涨落图的影响. 广东医学, 2009, 30(7): 1100-1101.
- [24] 孔繁一,刘诗翔,张皓,等. 脑内谷氨酸和5-羟色胺增高是高原睡眠障碍的独立预测因素. 疑难病杂志, 2013, 12(11): 843-846.
- [25] 李佳,李雷俊,张晋碚. 抑郁症中枢神经递质功能的脑涨落图分析. 中国神经精神疾病杂志, 2009, 35(4): 219-227.
- [26] 郭春荣,许维春,唐卫东,等. 抑郁症患者脑电超慢涨落检测分析. 临床精神医学杂志, 2006, 16(6): 226-227.
- [27] 唐卫东,李培芬,屈珍. 脑涨落图仪检测抑郁症患者脑内神经递质功率变化特点分析. 精神医学杂志, 2012, 25(1): 25-28.
- [28] 陈康宁,陈胜利,罗芳,等. 脑涨落图中神经递质变化与脑卒中后抑郁障碍. 中国临床康复, 2005, 9(16): 118-119.
- [29] 朱天民,杜宇鹏,郑重,等. 网络成瘾患者脑电超慢涨落图的分析. 中国病理生理杂志, 2010, 26(3): 598-600.
- [30] 朱天民,李辉,杜宇鹏,等. 电针结合心理干预对网络成瘾患者网络渴求及脑电超慢涨落图的影响:随机对照研究. 中国针灸, 2011, 31(5): 395-399.

内皮祖细胞在缺血性脑血管疾病治疗中的研究进展

龚如 综述 江基尧 审校

上海交通大学医学院附属仁济医院神经外科,上海市 200127

摘要:近年来,成人外周血中鉴定出一类具有前体内皮细胞特性的细胞,称之为内皮祖细胞(EPC)。对于这种细胞的研究表明其具有干细胞特性,参与了神经再生和再血管化,在脑血管疾病中发挥正性作用,能够帮助缺血性卒中后的神经功能恢复。目前临床治疗缺血性脑血管疾病手段单一且疗效不确切,内皮祖细胞的修复潜力越来越受到关注。本文讨论了目前关于内皮祖细胞特性的研究进展,以及它对于缺血性脑血管疾病的治疗作用及其临床应用前景。

关键词:内皮祖细胞;缺血性脑血管疾病;缺血性卒中;再血管化;神经再生

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)是一类来源于造血细胞的成人干细胞,EPC具有分化成为内皮细胞的能力,而内皮细胞是体内脉管系统的重要组成部分,脑血管疾病大多数是在颅内血管本身受损的基础上发生发展的。Asahara等^[1]在1997年首先报道分离出了一类能够参与血管新生的细胞。之后越来越多的研究表明,EPC能够在缺血、出血、药物诱导等情况下参与组织修复和功能恢复。本文着重于介绍EPC在脑缺血时的治疗作

用,并对国内外目前EPC的研究现状做一综述。

1 EPC的特性和鉴定

目前已证明,EPC的主要来源是骨髓中的造血干细胞并可释放进入周围血。内皮祖细胞的发现改变了过去对成人体内再血管化的理解,过去认为成人体内只发生血管新生(angiogenesis),即通过前血管的成熟内皮细胞出芽,而从头开始合成血管的血管发生(vasculogenesis)过程只存在于胚胎发育阶段。成人体内内皮祖细胞的发现改变了这一认识,

收稿日期:2013-12-20;修回日期:2014-04-04

作者简介:龚如(1987-),男,博士研究生,主要从事内皮祖细胞与脑血管病相关研究。

通讯作者:江基尧,男,教授,主任医师,博士,博士生导师,主要从事神经外科疾病基础及临床研究。

越来越多的研究证据表明人体内骨髓来源的内皮祖细胞在生理和病理情况下对再血管化具有重要的作用。

目前对于 EPC 的研究主要通过以下两个方法来鉴定 EPC, 一是通过细胞表面的分子标志, 另一种是通过其功能表现来鉴定 EPC。例如, Hibbert 等^[2]选择 CD45 dim/34⁺/133⁺/117⁺ 作为内皮祖细胞表面标志, 采用流式细胞仪计数法测定 EPC 数量。通过功能表现鉴定 EPC 的方法主要是利用 EPC 的集落形成特点。1997 年 Asahara 等^[1]发现内皮祖细胞在电镜下具有中心细胞群和周围围绕的放射状细小、平坦细胞的集落特点。基于此, 后来关于 EPC 的很多研究通过计算 EPC 集落群来测定 EPC 水平。之所以在 EPC 鉴定时, 不同的研究小组采用不同的鉴定方法, 主要由于还没有公认的明确的表面标记来鉴定 EPC。目前, 大多数的研究小组采用 CD133/KDR2 双阳性或加 CD34 阳性的细胞作为 EPC 的标志^[3]。

2 EPC 的动员及其调节

研究发现, 许多生理、病理和药物可以使体内 EPC 产生动员。Chiang 等^[3]研究发现非酒精性脂肪肝患者与没有脂肪肝的患者相比, 循环 EPC 数量降低, EPC 功能降低。几种化学酶和细胞活酶的水平, 例如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、巨噬细胞-粒细胞集落刺激因子 (macrophage-granulocyte colony stimulating factor, GM-CSF) 和间充质细胞分化因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1), 也可以影响 EPC 的数量或功能。

Hill 等^[4]在研究心血管危险因素和 EPC 数量关系时发现高血压患者的循环 EPC 水平较正常人减低, 进一步的研究表明 CXC 趋化因子受体 7 (CXC chemokine receptor 7, CXCR7) 信号通路在高血压引起的 EPC 功能受损中发挥重要作用^[5]。II 型糖尿病患者的循环 EPC 水平也明显下降^[6]。另外, 有研究发现高密度脂蛋白的降低与循环 EPC 数量的降低有关^[7]。以上病理状态同时也是脑血管疾病的危险因素, 可见 EPC 的降低与脑血管疾病之间有着密切的关联。

药物因素也可以引起 EPC 水平的变化, 例如促红细胞生成素、雌激素、他汀类药物、血管紧张素转化酶抑制剂都可引起 EPC 水平上升。

缺血引起 EPC 的变化已经有大量的研究证据。

一项针对急性脑缺血患者研究中, 研究者发现脑梗死后 5 d 时的循环 EPC 水平较发病 24 h 明显增加^[8]。国内研究也有类似结果, 缺血性卒中发病 7 d 循环中 EPCs 数量增加, 第 14 天达高峰, 第 21 天开始下降, 且血浆 SDF-1 浓度呈类似变化^[9]。

3 EPC 与动脉粥样硬化

许多研究表明, 动脉粥样硬化性疾病与 EPC 数量减少有关。Bielak 等^[10]研究了 57 位正常人样本发现, 循环 EPC 水平与颈动脉内膜厚度 (intima-media thickness, IMT) 呈负相关, 提示 EPC 水平低下是早期亚临床动脉粥样硬化的独立预测因素。Yip 等^[11]的进一步研究证实急性脑梗死时, 循环中 EPC 水平能够独立预测神经损害程度及预后。

动脉粥样硬化是慢性炎症引起的内皮细胞受损的病理过程, 其中内皮失功能是重要的触发环节。有证据表明血管受损时, EPC 产生动员, 从而补充受损动脉的内皮细胞。Condon 等^[12]比较了普通剖腹手术和腹腔镜手术, 发现两种手术引起血管损伤后, 循环 EPC 水平均有上升, 且普通剖腹手术更明显。进一步研究发现, 血管损伤后的早期反应, 包括血小板和纤维蛋白的黏附, 都能够募集 EPC 至血管损伤部位分化为内皮细胞^[13]。一项针对大鼠腹主动脉瘤栓塞的实验中, 对大鼠腹主动脉瘤行弹簧圈栓塞后, EPC 移植加速了动脉瘤颈的内膜增生^[14]。目前认为, EPC 修复血管内皮是通过多方面的作用, 一方面 EPC 分化为内皮细胞, 直接替换受损的内皮。另一方面, EPC 通过旁分泌 GM-CSF、VEGF、前列环素-2 和增加细胞内环磷酸腺苷发挥血管保护作用。

4 脑缺血时 EPC 的神经再生作用

目前普遍认为成人具有复制新神经元和神经胶质细胞的神经干细胞存在于大脑内。早期的动物实验表明在成年大鼠全脑缺血模型中, 与对照组相比, 海马齿状回的细胞增殖有 12 倍的提升^[15], 这表明脑缺血可以引起神经干细胞的增殖, 参与神经元的修复。Palmer 等^[16]认为, 在神经组织中, 神经再生和血管再生是一个共同发育、互相依赖的过程, 因此他们提出了血管微环境 (vascular niche) 的概念。Sun 等^[17]的研究结论支持了这一理论。他们发现在体外共培养系统中发现, 室下区神经干细胞的增殖与分化依赖内皮细胞, 而且这一过程是 VEGF 激活 Notch 和 Pten 信号通路的结果。

EPC 作为内皮细胞的前体, 其在脑缺血后的神

经功能恢复过程中的作用如何呢? Rosell 等^[18]在对大脑中动脉闭塞的大鼠静脉注射 EPC 和其分泌因子后发现,该处理方法能够显著增加梗死周围区的毛细血管浓度和脑梗死后大鼠前肢的肌力恢复。

5 脑缺血时 EPC 的血管再生作用

近年来针对 EPC 对于脑缺血时的血管再生作用进行了许多的研究。这些研究主要可以分为三个研究方向:①通过移植 EPC 细胞至全身循环或缺血部位来实现修复作用;②通过药物注射加强 EPC 的动员来实现修复作用;③加强 EPC 的归巢来实现缺血部位的修复。

Rosell 等^[18]发现在卒中动物模型中注射 CD34⁺/CD133⁺ 细胞能够在卒中后在脑缺血区域加速血管新生,且这种治疗方法同样使这些大鼠增加了神经再生并改善其功能恢复。相似地,卒中大鼠静脉注射的人脐带血能够增加梗死区域脑血流量并减少梗死面积^[19]。许多的研究都表明 EPC 在缺血后能够帮助血管新生,这为我们未来治疗脑缺血提供了重要依据。此外,Wei 等^[20]还发现低氧处理的骨髓间充质干细胞能够增强脑缺血大鼠的血管新生和神经再生,这可能为加强移植治疗的疗效提供了一种新的思路。

血管内皮生长因子(VEGF)通过在缺血性疾病中增加 EPC 数量和加强血管新生,在 EPC 动员方面发挥了重要作用。在卒中动物模型中,卒中 36 h 后注射 VEGF 能够改善血管新生、神经再生^[21]。另一个能够增加 EPC 水平的药物是 HMG 辅酶 A 还原酶抑制剂,即他汀类药物。他汀类药物能够增加 EPC 动员和血管新生。在动物试验中,卒中 24 h 后的 14 天中注射阿托伐他汀能够明显改善功能恢复,而且阿托伐他汀能够在缺血带中增加 VEGF、血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)和脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达^[22]。国内学者发现对急性脑梗死患者联合应用氯吡格雷与阿司匹林,相比于单用阿司匹林,能够提高患者脑梗死发病 1 周及 2 周后的 NIHSS 评分^[23]。德国的一项包含 7535 名研究对象的前瞻性研究表明,他汀类药物能够降低急性脑梗死死亡率且有助于脑梗死的预后^[24]。最新的研究发现促红细胞生成素可以改善全脑缺血后的记忆功能^[25],另一项研究显示联合静脉注射促红细胞生成素和 EPC 能够完全改善缺血后的神经恢复^[26]。

归巢是 EPC 向损伤或缺血部位动员的过程。

增加缺血疾病时 EPC 的血管新生的另一个策略是通过增加 EPC 至损伤部位的归巢。间充质细胞分化因子-1(SDF-1),一个与 CXCR-4 受体相连的 CXC 家族的化学因子,在离体时对 EPC 具有吸引作用,它可能在 EPC 的归巢中发挥重要作用。Wang 等^[27]的研究发现在脑缺血时,SDF-1 在卒中后的缺血半暗带中上调,这暗示了这个因子在 EPC 归巢中的重要性。

以上研究结果都表明,EPC 作为内皮细胞前体,参与了脑缺血后的血管修复,并帮助脑缺血后的功能恢复。

6 EPC 的临床应用及可能存在的问题

目前临床上被证明确实有效的治疗于缺血性脑血管病方法只有溶栓治疗,然而溶栓治疗因为其较苛刻的治疗窗而影响了其临床应用的广泛性。在这样缺少治疗缺血性脑血管疾病的背景下,进一步探索新的治疗方法变得格外引人注目。内皮祖细胞作为具有干细胞特性的一类能够参与缺血部位神经修复和血管再生的细胞,其临床应用前景是巨大的,已有的实验研究表明注射 EPC 能够通过快速地建立侧支循环减少脑梗死面积。然而,EPC 的作用具有多面性和不确定性。未来很有可能通过分子水平调控 EPC 的动员和归巢,从而实现 EPC 用于治疗缺血性脑血管疾病。

参 考 文 献

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275(5302): 964-966.
- [2] Hibbert B, Ma X, Pourdjabbar A, et al. Pre-procedural atorvastatin mobilizes endothelial progenitor cells; clues to the salutary effects of statins on healing of stented human arteries. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16413.
- [3] Chiang CH, Huang PH, Chung FP, et al. Decreased circulating endothelial progenitor cell levels and function in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31799.
- [4] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 2003, 348(7): 593-600.
- [5] Zhang XY, Su C, Cao Z, et al. CXCR7 upregulation is required for early endothelial progenitor cell-mediated endothelial repair in patients with hypertension. *Hypertension*, 2014, 63(2): 383-389.
- [6] Liao YF, Feng Y, Chen LL, et al. Coronary heart disease

- risk equivalence in diabetes and arterial diseases characterized by endothelial function and endothelial progenitor cell. *J Diabetes Complications*, 2014, 28(2): 214-218.
- [7] Rossi F, Bertone C, Michelon E, et al. High-density lipoprotein cholesterol affects early endothelial progenitor cell number and endothelial function in obese women. *Obesity*, 2013, 21(11): 2356-2361.
- [8] Sepp D, Franz D, Triftshaeuser N, et al. Mobilization of CD133⁺ progenitor cells in patients with acute cerebral infarction. *PLoS One*, 2014, 9(3): e70796.
- [9] 王妮,陈慧,郭慧娟,等.急性缺血性脑卒中患者外周血中内皮祖细胞的动态变化. *第三军医大学学报*, 2013, 35(20): 2187-2189.
- [10] Bielak LF, Horenstein RB, Ryan KA, et al. Circulating CD34⁺ cell count is associated with extent of subclinical atherosclerosis in asymptomatic amish men, independent of 10-year framingham risk. *Clin Med Cardiol*, 2009, 27(3): 53-60.
- [11] Yip HK, Chang LT, Chang WN, et al. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke*, 2008, 39(1): 69-74.
- [12] Condon ET, Barry BD, Wang JH, et al. Laparoscopic surgery protects against the oncologic adverse effects of open surgery by attenuating endothelial progenitor cell mobilization. *Surg Endosc*, 2007, 21(1): 87-90.
- [13] de Boer HC, Verseyden C, Ulfman LH, et al. Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(7): 1653-1659.
- [14] Zhang S, An Q, Li Q, et al. Therapeutic benefit of bone marrow-derived endothelial progenitor cell transplantation after experimental aneurysm embolization with coil in rats. *PLoS One*, 2014, 9(2): e90069.
- [15] Liu J, Solway K, Messing RO, et al. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci*, 1998, 18(19): 7768-7778.
- [16] Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*, 2000, 425(4): 479-494.
- [17] Sun J, Zhou W, Ma D, et al. Endothelial cells promote neural stem cell proliferation and differentiation associated with VEGF activated Notch and Pten signaling. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists. Dev Dyn*, 2010, 239(9): 2345-2353.
- [18] Rosell A, Morancho A, Navarro-Sobrinho M, et al. Factors secreted by endothelial progenitor cells enhance neurorepair responses after cerebral ischemia in mice. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73244.
- [19] Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, et al. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34(+) cells in a mouse model of neonatal stroke. *Neuroscience*, 2014, 263: 148-158.
- [20] Wei L, Fraser JL, Lu ZY, et al. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol Dis*, 2012, 46(3): 635-645.
- [21] Dzierko M, Derugin N, Wendland MF, et al. Delayed VEGF treatment enhances angiogenesis and recovery after neonatal focal rodent stroke. *Transl Stroke Res*, 2013, 4(2): 189-200.
- [22] Chen J, Zhang C, Jiang H, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(2): 281-290.
- [23] 赵真,包正军,许宏伟,等.氟吡格雷与阿司匹林联合应用在急性脑梗死治疗中的疗效评定. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2012, 39(2): 117-120.
- [24] Al-Khaled M, Matthis C, Eggers J. Statin treatment in patients with acute ischemic stroke. *Int J Stroke*, 2014, doi: 10.1111/ijss.12256.
- [25] Undén JI, Sjölund C, Lämsberg JK, et al. Post-ischemic continuous infusion of erythropoietin enhances recovery of lost memory function after global cerebral ischemia in the rat. *BMC Neurosci*, 2013, 14(27), doi:10.1186/1471-2202-14-27.
- [26] Pellegrini L, Bennis Y, Guillet B, et al. Therapeutic benefit of a combined strategy using erythropoietin and endothelial progenitor cells after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurol Res*, 2013, 35(9): 937-947.
- [27] Wang Y, Deng Y, Zhou GQ. SDF-1 alpha/CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. *Brain Res*, 2008, 1195: 104-112.