

内皮祖细胞及其在脑梗死中的应用进展

廖少华[#]综述,陈康宁,周振华 审校

(第三军医大学西南医院神经内科,重庆 400038)

关键词:脑梗死;内皮祖细胞;应用进展

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.02.040

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)02-0196-03

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)于1997年首先被Asahara等^[1]描述,被发现参与了缺血后血管新生。Lapergue等^[2]在进一步的研究中发现,EPCs是成体干细胞的一种,在分化过程中,逐步失去干细胞特征,成为成熟的内皮细胞,在损伤后内皮修复和血管生成过程中发挥了重要作用。近年来,有关EPCs在缺血性疾病的治疗及血管生成中的作用研究方兴未艾。本文对EPCs的基础研究现状及在脑梗死治疗中的作用研究作一综述。

1 EPCs 基础研究现状

1.1 EPCs 的来源、分离、培养、鉴定 Ribatti等^[3]研究发现,成年后EPCs绝大部分存在于骨髓,与造血干细胞联系密切,骨髓基质提供其最佳微环境。其次,外周血中也有一定的EPCs,他们是从骨髓释放后还未结合到血管壁的内皮细胞。另外,脐带血作为成体干细胞的主要来源之一,其中含有大量造血干细胞和EPCs等。近来还有报道发现EPCs也可能起源于成人血管壁的平滑肌和外膜层之间的区域。

EPCs分离方法有3种^[4]:(1)免疫磁珠分离:可选用CD34⁺磁珠、CD133⁺磁珠等,具有分选纯度高、分选后细胞活性好等特点,但费用较高,且单独培养往往不易增殖。(2)密度梯度离心法:此种方法根据细胞密度大小不同,采用不同密度的分离液将目的细胞从血液/骨髓中分离出来。(3)差速贴壁法:根据各种细胞贴壁能力的不同而达到分离EPCs的目的。3种方法各有其优缺点,可根据实验条件、经费、经验等选择。

EPCs培养条件要求较高,其专用培养基为EGM-2 MV,也有人应用M199为基础,添加血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)和胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor,IGF)及胎牛血清等。培养板可用明胶或纤连蛋白包被。一般于培养第3天EPCs形成集落,在7~28 d可以计数集落。

EPCs的鉴定标准目前仍有待统一。Rouhl等^[5]认为,由于EPCs处于干细胞向内皮细胞分化的过程中,必须小心选择结构和功能特征的联合鉴定,以除外未成熟干细胞和成熟内皮细胞。EPCs结构特征的鉴定主要是利用流式细胞术检测其特有的表面抗原^[1],如:CD34、VEGF R₂/KDR、CD31、CD133等。目前,大多数研究者使用CD133/VEGF R₂或加CD34作为标志^[6]。有报道认为电镜下的W-P小体可视为EPCs的特征性结构,所以电镜观察也被认为是特征性的鉴定手段之一。对于EPCs的形态及功能鉴定,主要观察细胞培养过程中特征性“血岛”样集落形态、“铺路石”样细胞单层、吞噬乙酰化低密度脂蛋白及结合植物凝集素等^[1],这2种方法相结合的EPCs鉴定目前都被广泛应用。EPCs的鉴定目前主要存在如下问

题:(1)如何确定EPCs特异性的表面标记,CD34是否应该作为EPCs标记之一。如Popa等^[7]研究认为CD34⁺细胞可能类似于晚期贴壁细胞,只是新生血管的调节者,不能分化为成熟内皮细胞。(2)培养48 h后贴壁的细胞被认为可能通过分泌生长因子促进EPCs增殖和分化,但自身并不分化成为成熟内皮细胞,这部分细胞是否应该归于EPCs还存在争议。(3)分别利用流式细胞术和细胞培养所测得的EPCs数量,其结果无法相互换算。

1.2 EPCs 动员、迁移、归巢 目前,有关EPCs动员、迁移、归巢的分子机制仍不十分明确。EPCs从骨髓动员需要血管新生的生理和病理事件作为诱导,如目标组织释放的细胞因子、生长因子、性激素等。有研究表明,EPCs的动员能被粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor,GM-CSF)或VEGF诱导,并且决定性依赖于内皮一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)的激活,eNOS表达于骨髓基质细胞^[8]。Huang等^[8]利用小鼠下肢缺血模型证实,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs),特别是MMP-9缺陷可能通过降低EPCs动员、迁移功能影响了缺血后血管新生过程。

有关EPCs的迁移过程,Walenta等^[9]证实,基质细胞来源因子-1(stromal cell-derived factor,SDF)、曲动蛋白、白三烯4显著促进了EPCs迁移、黏附过程,其中的SDF-1 α 的受体CXCR-4高表达于EPCs,在促进EPCs定向迁移到受损的血管内皮表面发挥了重要作用。另外,一些药物如他汀,通过激活Akt/NOS途径和上调MMP-2和MMP-9表达,可以促进EPCs迁移和增殖,并减少EPCs凋亡,从而增强EPCs功能^[10]。

EPCs归巢于受损内皮部位的机制仍有待进一步研究。有研究者分别通过小鼠下肢缺血和心肌梗死模型证实, β_2 整合素高表达于EPCs表面,通过与其配体血管细胞黏附分子(intercellular cell adhesion molecule,ICAM-1)、细胞间黏附分子(vascular cell adhesion molecule,VCAM)及纤维蛋白原的相互作用,介导EPCs与血管内皮的黏附过程。这一过程被认为是EPCs归巢的关键步骤。当然, β_2 整合素可能只是在EPCs归巢过程中发挥作用的因子之一,其他参与因素仍需进一步研究。

2 EPCs 在脑梗死中的应用研究

2.1 EPCs 对血管作用的相关研究 血管病变是脑梗死发生的病理基础。作为EPCs应用于脑梗死治疗的基础课题,EPCs对血管的多方面作用一直是研究的重点之一。

2.1.1 EPCs 与动脉粥样硬化 EPCs与动脉粥样硬化发生、发展的关系,可能是复杂的。在动脉硬化病理过程中,单核细

[#] 现工作单位:济南军区第一五二中心医院神经内科(467000)。

胞、巨噬细胞和 T 细胞介导内皮损害,被认为是动脉粥样硬化炎症反应机制的启动因素之一。EPCs 在修复受损内皮时被消耗,数量明显下降,造成损害/修复之间的失衡,进一步导致动脉粥样硬化病程进展和血管事件发生。支持这一观点的是,在活动性血管炎患者中,EPCs 很少被发现。但 Fadini 等^[11]认为,EPCs 数量与动脉粥样硬化发生之间的关系并不明显,而主要与其功能异常有关。另外一个证明 EPCs 参与损伤内皮修复过程的经典试验是,2003 年 Griese 等^[12]通过注射 EPCs 到小鼠颈动脉球囊损伤模型,发现 EPCs 存在于损伤后重新覆盖的内皮。目前认为,EPCs 修复受损的血管内皮,是通过多方面的作用^[13]。一方面 EPCs 分化为内皮细胞,直接替换受损内皮。另一方面,EPCs 通过旁分泌 GM-CSF、VEGF、前列环素 2(prostacyclin)和增加细胞内环磷酸腺苷发挥血管保护作用^[14]。但是,目前也有证据表明,EPCs 可能加速动脉粥样硬化进展。George 等^[15]利用载脂蛋白 E 敲除小鼠模型,发现 EPCs 移植加速了粥样斑块的形成。他认为可能的原因是 EPCs 促进了斑块早期血管滋养管网络形成,为炎症细胞到达正在增生的血管内膜提供了途径,从而促进了这一损害的进展。Liu 等^[13]进一步研究后认为,EPCs 可能通过以下 3 方面促进动脉硬化进展:(1)早期 EPCs 的动员或移植可能促进不适宜的血管生成加速动脉粥样硬化进程;(2)血小板黏附于受损内皮后,能够诱导 EPCs 分化为泡沫细胞;(3)EPCs 可能募集平滑肌细胞于粥样斑块。因此,EPCs 在动脉粥样硬化发生、发展过程中可能存在损害/修复的两面作用,其具体机制仍有待进一步研究。

2.1.2 EPCs 与再内皮化 多种危险因素(如缺血缺氧、高血糖、高血脂等)引起的内环境紊乱,血管内介入手术、支架植入等,都可直接导致血管内皮损害。EPCs 定向归巢于内皮损害部位,并通过分化为成熟内皮细胞实现再内皮化是这一病理过程重要的修复机制。目前研究较多的是支架植入术后血管的再内皮化。有研究证实,EPCs 迁移并增殖,可在支架和邻近模拟动脉处形成完全内皮化的管腔。进一步的研究通过采用载有整合素连接环精-甘-天冬氨酸肽的支架或涂有 CD34 单抗的支架来吸引外周血循环的 EPC,结果均提示 EPCs 可加速损伤血管的再内皮化,并抑制动脉新生内膜形成。这些试验证明,覆有 EPCs 的支架可能是促进再内皮化的一条新途径,可能对预防支架术后狭窄有重要意义。

2.1.3 EPCs 在血管新生(neovascularization)过程中的重要作用 一般认为,血管新生包括血管生成(angiogenesis)和血管发生(vasculogenesis)。血管生成是指由已经存在的主血管内的静止的内皮细胞被激活开始,冲破管壁基质,迁移、增殖和重构,以发芽或非发芽方式形成新生血管网。Asahara 等^[1]将 EPCs 注射到动物缺血肢体,并在缺血部位新形成的血管内皮中发现注射的 EPCs,表明它们参与了缺血后血管生成过程。Hu 等^[16]利用大鼠心肌梗死模型证实,EPCs 移植促进心肌梗死区域周围血管生成,且新生血管内皮可发现移植的 EPCs。有关新生血管功能的认识目前还不统一。多数人认为,新生血管可以促进缺血区域周围的血液供应,并利用激光多普勒测量进行了验证。但是,Krenning 等^[17]认为,新出芽的血管通透性较高,可能会有血浆蛋白的渗出,在功能上仅相当于为迁移的内皮细胞提供通道,早期可能不能形成有效的血流灌注。

血管发生是指中胚层来源的 EPCs 或血管母细胞在原位进行分化、聚集,形成心脏和大血管的始基以及原始的毛细血管网。既往的研究认为,成年后主要是以血管生成的方式获得

血管新生。但是,成人骨髓和外周血 EPCs 的发现,挑战了这一理论。Jujo 等^[18]认为,损伤组织可释放多种因子,诱导 EPCs 从骨髓动员并释放到外周血液。EPCs 被募集到损伤组织部位后,可进一步分化、增殖、迁移并参与血管的生长,从而参与出生后血管发生。除了直接参与新生血管结构之外,Dai 等^[19]还发现,EPCs 募集到缺血组织还可通过分泌细胞保护因子或生长因子[如 VEGF、肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor)、SDF-1 α 等],促进本地内皮细胞的增殖和迁移。这种旁分泌作用可能是 EPCs 促进血管新生的一种间接机制。

2.2 EPCs 与脑梗死的研究现状及分析

2.2.1 EPCs 作为判断脑梗死风险的标志 有关 EPCs 与血管事件风险的联系最初开始于心血管临床研究。在一些前瞻性研究中,EPCs 数量被发现与心血管风险相关。Werner 等^[20]随访了 519 例稳定型冠心病患者共 12 个月,发现发生心血管事件的患者,EPCs 数量(通过流式细胞术和细胞培养计数)少于未发生心血管事件者。有关 EPCs 的神经血管研究目前还很有限。有报道在卒中后和稳定期脑血管患者中,快速贴壁细胞集落数量的下降,对照组是没有血管病者。高龄和脑血管疾病一般来说都是较低 EPCs 数量的独立相关因素。但这 2 项研究都缺乏严格的实验设计,没有设置年龄的对照组。随后的进一步研究证实,脑梗死患者急性期和慢性期 EPCs 水平较正常对照组显著降低。Chu 等^[21]在病因方面进一步分类,发现动脉粥样硬化性脑梗死患者 EPCs 水平显著低于心源性栓塞患者。因此,低水平 EPCs 可认为是动脉粥样硬化性脑梗死的危险因素之一,并可能成为预测脑缺血风险的独立指标。

Rouhl 等^[5]认为,EPCs 能否作为判断脑梗死风险的标志,还需要进一步说明以下问题。(1)EPCs 的定量:细胞培养和流式细胞术都不是金标准,且 2 种方法测得的结果不能相互换算。(2)EPCs 数量在脑梗死发生后反应性上升需要一个过程,因此,EPCs 数量在稳定期比急性期在风险评价方面更重要。(3)EPCs 数量与脑梗死事件风险大小之间联系的病理生理机制还有待进一步阐明。(4)不同病因的脑梗死,其发病机理与血管内皮损害的联系不同。因此,应结合不同病因的脑梗死来判断其与 EPCs 数量之间的联系。

2.2.2 EPCs 移植治疗脑梗死的相关研究 EPCs 作为脑梗死治疗手段的报道多见于动物实验模型。应用于这些实验的 EPCs,来源包括骨髓、脐带血和外周血等。有研究者利用小鼠脑梗死模型,发现骨髓来源的 EPCs 参与了血管新生的过程。进一步的研究还发现 EPCs 的应用改善了血管通透性,促进了血脑屏障修复,从而减轻了脑水肿。有实验证实,EPCs 静脉应用与纹状体立体注射相比,前者更能改善动物梗死模型的长期功能恢复。在类似的多个实验中,EPCs 的应用还缩小了脑梗死体积,并促进了长期神经功能恢复。在进一步的研究中,Fan 等^[22]通过对裸鼠大脑中动脉缺血模型移植 EPCs 治疗,证实 SDF-1 信号途径能诱导 EPCs 迁移并在 EPCs 介导的神经保护中起到了关键的作用。上述研究都说明,EPCs 应用对脑梗死有治疗作用。

2.2.3 EPCs 移植治疗脑梗死的可能机制 目前,推测可能的作用机制有如下方面。(1)诱导血管新生,增加梗死区域脑组织血流供应,并为神经干细胞通过新生血管迁移到梗死区域提供通道。(2)修复受损的血管内皮,维持血脑屏障的完整性,减轻梗死区域病理性脑水肿。(3)通过旁分泌 VEGF 等因子,刺激脑组织内神经干细胞的增殖,从而促进神经功能恢复。

2.2.4 EPCs 移植治疗脑梗死存在的问题 虽然大多数动物

实验应用 EPCs 移植治疗脑梗死取得了显著的效果,但仍存在一系列的问题。(1)EPCs 移植后,新生的毛细血管内皮细胞之间的连接不够紧密,通透性较高,可能加重脑水肿或增加出血风险。(2)EPCs 及旁分泌的 VEGF 等促进血管新生,可能导致局部毛细血管无序生长,成为血管瘤或毛细血管团。(3)EPCs 移植的时机、途径、监测方式还有待进一步的实验验证^[2]。(4)目前仍缺乏鉴定 EPCs 的特异性表面标志,与之较易混淆的单核-巨噬细胞可能促进动脉粥样硬化斑块的形成,而造血干细胞也可能增加水肿和出血风险。

2.2.5 EPCs 移植治疗脑梗死的研究方向 未来可能在如下方面进一步研究以促进 EPCs 的治疗应用。(1)可通过在分子水平上调治疗性的特征,如上调 EPCs 黏附于受损部位血管内皮的有关因子,个性化应用 EPCs,增强 EPCs 治疗作用。(2)转基因技术应用于 EPCs 治疗也是一个方向。应用转基因 EPCs 作为基因治疗的载体,这种细胞能在新生血管部位保持较长时间活性,并能在局部过表达一些血管生成因子或神经营养因子,增强其血管生成或神经保护作用。

3 结 论

目前,有关 EPCs 生物学特征及 EPCs 移植治疗脑梗死的研究仍处于初期。它可能在脑梗死治疗方面开启一条新的有意义的途径。当然,EPCs 在脑梗死后血脑屏障修复、血管新生和神经发生过程中的重要性不应被过分强调。将来 EPCs 研究应该着力于确立 EPCs 特异性标志,并进一步应用转基因 EPCs 治疗。

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(7): 964-967.
- [2] Lapergue B, Mohammad A, Shuaib A. Endothelial progenitor cells and cerebrovascular diseases[J]. *Prog Neurobiol*, 2007, 83(6): 349-362.
- [3] Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review[J]. *Leukemia Res*, 2007, 31(4): 439-444.
- [4] 白春雨, 侯玲玲, 庞全海, 等. EPCs 的分离培养与鉴定[J]. *生物技术通报*, 2010, 32(2): 24-27.
- [5] Rouhl R, Oostenbrugge R, Damoiseaux J, et al. Endothelial progenitor cell research in stroke a potential shift in pathophysiological and therapeutical concepts[J]. *Stroke*, 2008, 39(17): 2158-2165.
- [6] Friedrich E, Walenta K, Seharlau J, et al. CD34⁺/CD133⁺/VEGF R-2⁺ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities[J]. *Circ Res*, 2006, 98(1): 20-25.
- [7] Popa E, Harmsen M, Tio R, et al. Circulating CD34⁺ progenitor cells modulate host angiogenesis and inflammation in vivo[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41(1): 86-96.
- [8] Huang P, Chen Y, Wang C, et al. Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(8): 1179-1184.
- [9] Walenta KL, Bettink S, Böhm M, et al. Differential che-

- mokine receptor expression regulates functional specialization of endothelial progenitor cell subpopulations[J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(2): 299-305.
- [10] Shao H, Tan Y, Eton D, et al. Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(5): 1376-1384.
- [11] Fadini G, Sartore S, Albiero M, et al. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(14): 2140-2146.
- [12] Griese D, Ehsan A, Melo L, et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts; Implications for cell-based vascular therapy[J]. *Circulation*, 2003, 108(21): 2710-2715.
- [13] Liu P, Zhou B, Gu D, et al. Endothelial progenitor cell therapy in atherosclerosis: A double-edged sword? [J]. *Ageing Res Rev*, 2009, 8(2): 83-93.
- [14] Santhanam A, Smith L, He T, et al. Endothelial progenitor cells stimulate cerebrovascular production of prostacyclin by paracrine activation of cyclooxygenase-2[J]. *Circ Res*, 2007, 100(9): 1379-1388.
- [15] George J, Afek A, Abashidze A, et al. Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(12): 2636-2641.
- [16] Hu CH, Li ZM, Du ZM, et al. Expanded human cord blood-derived endothelial progenitor cells salvage infarcted myocardium in rats with acute myocardial infarction [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(5): 551-556.
- [17] Krenning G, van Luyn MJ, Harmsen MC. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy [J]. *Trends Mol Med*, 2009, 15(3): 180-189.
- [18] Jujo K, Ii M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45(4): 530-544.
- [19] Dai Y, Ashraf M, Zuo S, et al. Mobilized bone marrow progenitor cells serve as donors of cytoprotective genes for cardiac repair[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44(3): 607-617.
- [20] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(10): 999-1007.
- [21] Chu K, Jueg KH, Lee ST, et al. Circulating endothelial progenitor cells as a new marker of endothelial dysfunction or repair in acute stroke[J]. *Stroke*, 2008, 39(5): 1441-1447.
- [22] Fan Y, Shen F, Frenzel T, et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice[J]. *Ann Neurol*, 2010, 67(4): 488-497.