

## • 综 述 •

## 内皮祖细胞治疗冠心病的研究进展

赵瑞霞 魏盟

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 是血管内皮细胞的前体细胞。目前发现它参与血管内皮修复和出生后的血管新生。新近的研究表明, 冠心病危险因素减少 EPCs 的数量, 削弱 EPCs 的功能。由于正常情况下内皮损伤和 EPCs 对内皮的修复作用处于动态平衡状态, 其数量和功能的异常必然参与冠心病的发生、发展, 提示 EPCs 在冠心病治疗中具有广阔的临床应用前景。本文就这一方面的研究进展作一综述。

## 1 EPCs 研究概况

以往认为, 血管发生只存在于胚胎发育期。至 1997 年 Asahara 等<sup>[1]</sup> 从外周血中发现并分离得到 EPCs, 首次证实了出生后血管发生的存在。该研究组发现新分离出的外周血 CD34 阳性的单个核细胞可以表达许多内皮细胞系的表面标志, 如 CD31、Tie-2、E 选择素、血管内皮细胞生长因子受体-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2) 等, 但这些均非特异性标志, 至今普遍认为 CD133、CD34、VEGFR-2 三者阳性为 EPCs。其后的研究发现脐血和骨髓中亦可以分离出 EPCs。

资料显示, 成年循环 EPCs 数量非常有限, 一些生理或病理状态会影响循环 EPCs 的数量, 如局部组织缺血、血管创伤、早期心衰等引起外周循环 EPCs 数量上升; 而高龄、吸烟、高血压病、高胆固醇血症、糖尿病、晚期心衰、外周血管疾病、慢性肾衰、中风、高 C-反应蛋白 (c-reactive protein, CRP) 血症等则引起循环 EPCs 数量下降。研究表明, 心血管疾病危险因素 (年龄、吸烟、高血压、高脂血症、糖尿病和家族史等) 和 EPCs 的数量、迁移功能呈显著负相关。然而冠心病患者外周血 EPCs 的动员则不一致。Vasa 等<sup>[2]</sup> 研究发现稳定性心绞痛患者循环 EPCs 数量下降了近 40%, 迁移能力受损, 并且随

着冠状动脉病变程度的加重, EPCs 水平逐渐降低, 可能与冠心病的多项危险因素有关。而不稳定性心绞痛患者循环 EPCs 水平明显升高<sup>[3]</sup>, 且与血 CRP 水平明显相关, 表明炎症可以促进 EPCs 的动员。急性心肌梗死患者循环 EPCs 的水平也明显升高, 7d 达到高峰<sup>[4]</sup>, 相应地, 血浆血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 水平也升高。这是由于冠状动脉急性缺血、损伤引起了趋化因子、VEGF 等释放, 从而快速动员骨髓中 EPCs 到外周血, 加速血管修复和形成, 试图维持缺血器官足够量的血液灌注。支架内再狭窄患者的 EPCs 数量也不相同, 弥漫性支架内再狭窄者的循环 EPCs 数量显著低于仅有局部再狭窄的患者<sup>[5]</sup>, EPCs 数量和迁移功能受损致内皮化不完全可能部分解释上述结果。

异体骨髓移植模型证实, 成年个体外周血中的 EPCs 主要来源于骨髓。骨髓中 EPCs 通常处于休眠状态, 当机体受到生理或病理的刺激后, EPCs 动员到体循环, 到达需要的位置 (归巢), 并在该部位分化、增殖形成内皮细胞 (endothelial cells, EC) 和新生血管。已证实影响 EPCs 动员的因素有: (1) 内源性刺激, 如组织缺血缺氧、损伤; (2) 外源性细胞因子, 如 VEGF、促红细胞生成素、干细胞因子 (stem cell factor, SCF)、重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子 (recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor, rhGM-CSF)、重组人粒细胞集落刺激因子 (recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF) 等; (3) 药物, 如他汀类药物、PPAR $\gamma$  激动剂等。此外, 雌激素、体育锻炼也可增加 EPCs 动员。

## 2 EPCs 在治疗冠心病中的应用

冠心病危险因素损伤内皮细胞导致内皮功能不全, 同时影响循环 EPCs 的数量和功能, 参与冠心病的发生、发展。EPCs 参与出生后血管发生为人们治疗冠心病提供了新的思路, 即利用一些药物或生长因子促进 EPCs 从骨髓向外周的动员, 也可以

收稿日期: 2006-11-06

作者单位: 200233 上海市, 上海市第六人民医院心内科

作者简介: 赵瑞霞, 女, 1979年5月生, 山西省侯马市人, 在读硕士研究生。Tel: 13774258823, E-mail: weirui1121@163.com

通过移植,提高循环中 EPCs 的数量,从而促进内皮修复和血管新生。

**2.1 促进内皮修复** Kong 等<sup>[6]</sup>采用脾切除大鼠颈动脉损伤模型皮下注射 rhG-CSF 8d,经免疫组化和形态测定分析的方法评估术后 2 周内皮覆盖率时发现:注射 rhG-CSF 组大鼠损伤血管内皮覆盖率为 90%,明显高于对照组(20%),且新生内膜厚度较对照组减少 58%。Shirota 等<sup>[7]</sup>从犬外周血中分离出 EPCs,体外扩增后种植于支架上,将支架植入血管中膜组织模型后,共聚焦激光显微镜和扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)发现:从支架上迁移过来的 EPCs 增殖并覆盖了血管中膜组织的内膜表面。这些研究表明动员或移植 EPCs 治疗可以促进血管损伤部位的内皮修复,同时抑制新生内膜过度增生。但是, Hu 等<sup>[8]</sup>在鼠颈动脉同种异体移植模型中进行同源异体骨髓移植,免疫组化结果显示:受体骨髓源 EPCs 加速移植植物内皮修复的同时,促进移植动脉粥样斑块内的血管新生,从而增加斑块的不稳定性。而 Silvestre 等<sup>[9]</sup>将骨髓源单个核细胞(bone marrow-derived mononuclear cell, BM-MNC)经静脉注入后肢缺血的 Apo-E 敲除鼠体内发现:与对照组相比,治疗组粥样斑块的体积增大,但对其成分无影响。因此,移植 BM-MNC 治疗在促进损伤血管内皮化的同时,参与了动脉粥样硬化的进展,这个问题还需要进一步的研究。

动物研究证实动员或移植 EPCs 可以促进损伤血管的内皮化和抑制血管内膜增生,提示临床上可通过动员或移植 EPCs 预防冠脉支架内再狭窄。Kang 等<sup>[10]</sup>入选 27 例心肌梗死患者分为 G-CSF 组、细胞移植组、对照组,前两组皮下注射 G-CSF 4d,随后 3 组均行经皮冠状动脉介入术,细胞移植组术中冠脉内注入外周血来源的自体干细胞。术后 6 个月的随访发现:G-CSF 组和细胞移植组都有较高的再狭窄率(67%、71.4%),最后该试验被迫中止。随后,该组研究人员又在兔髂动脉损伤模型上作了进一步的研究<sup>[11]</sup>。兔髂动脉损伤部位植入裸支架(bare-metal stent, BMS)或药物洗脱支架(drug-eluting stent, DES),给予皮下注射 rhG-CSF 6d,用形态测定分析法和 SEM 评估损伤后内皮修复的情况,术后 2 个月发现:BMS 注射 rhG-CSF 组新生内膜有明显的过度增生趋势,而 DES 注射 rhG-CSF 组该趋势明显下降,这可能与紫杉醇抑制平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)的增殖有关。体外试验显示,紫杉醇对人和兔 SMC 增殖的抑制作用

最强,EC 次之,对 EPCs 无抑制作用。因此 G-CSF 动员干细胞和 DES 相结合具有优势互补作用:DES 抑制动员干细胞治疗引起的新生内膜过度增生,而动员干细胞治疗则加速了 DES 的内皮化进程。两者的结合运用为治疗支架内再狭窄提供了新方法。

此外,加拿大 St. Michael 医院研究小组发明了 CD34<sup>+</sup> 捕获支架,其原理是利用支架上固定的抗 CD34 抗体来捕捉循环 EPCs,促进支架内皮化的进程。2005 年该支架的 HEALING-FIM 的临床试验入选 16 例冠脉造影显示血管狭窄 $\geq 50\%$ 的冠心病患者,成功植入 EPCs 捕获支架,6 个月随访发现:捕获支架可加速支架的内皮覆盖并减少支架内血栓形成,但冠脉造影显示支架内再狭窄率高达 13.3%<sup>[12]</sup>。而最近一个关于猪动静脉吻合处植入 CD34<sup>-</sup> 捕获支架(肾透析造瘘管)的研究表明,3d 和 28d 时该捕获支架表面的内皮覆盖分别为 95%和 85%,相应地,对照组为 0%和 32%,支架的内皮化加速,但捕获支架的内膜增殖( $5.96 \pm 1.9$ )mm<sup>2</sup>,明显高于 BMS 组( $1.70 \pm 0.4$ )mm<sup>2</sup><sup>[13]</sup>。

小规模临床研究显示 EPCs 的治疗可以促进内皮修复,但却加重了内膜增殖。推测其可能的原因有:(1)EPCs 的分化特性还未彻底明确,CD34<sup>+</sup> 的 EPCs 可能分化为 SMC 而加重再狭窄;(2)EPCs 分泌一些细胞因子如 VEGF 等,它可以促进 SMC 增殖而加重再狭窄;(3)EPCs 捕获支架通常用于冠心病患者,EPCs 的含量较正常人低,所以捕获效率受到影响;(4)缺乏生理条件的微环境,从 EPCs 分化而来的 EC 未必具有成熟的内皮功能;(5)动静脉吻合支架形成的涡流不利于 EPCs 分化为 EC。这关键是对 EPCs 本身的特征和分化趋势的研究还不够深入,以及捕获支架制作工艺尚未成熟。相信随着对 EPCs 研究的逐步深入,EPCs 在冠心病的介入治疗中将扮演更重要的角色。

**2.2 参与血管新生** 近来有研究者提出了“治疗性血管新生”的概念,倡导以提高或补充 EPCs 数量来增加血管生长因子的作用底物,达到更好的血管新生效果,治疗缺血性疾病。方法已由最初的单纯应用内皮细胞生长因子发展为细胞(EPCs)移植介导的血管新生。

**2.2.1 动员 EPCs 治疗冠心病** Orlic 等<sup>[14]</sup>在脾切除小鼠心肌梗死模型给予皮下注射 rhG-CSF、SCF 5d,术后 27d 病理检查显示:与对照组相比,治疗组梗死区有新生心肌、毛细血管及小动脉形成,小鼠梗死区面积由 64%缩小至 39%( $P < 0.001$ )。Seiler

等<sup>[15]</sup>对 21 例不宜行搭桥手术、年龄较大、弥漫性多支病变的患者,每日皮下注射 GM-CSF 或安慰剂,2 周后治疗组的侧支循环血流指数( $0.11 \pm 0.12$ )明显高于对照组( $-0.07 \pm 0.12$ ),心电图心肌缺血的表现也明显改善。

2.2.2 移植 EPCs 治疗冠心病 Kawamoto 等<sup>[16]</sup>在猪和裸鼠的心肌梗死模型中,经导管分别给猪和裸鼠心肌内注射外周血来源的自体 CD31<sup>+</sup>MNC 和人 CD34<sup>+</sup>MNC,术后 4 周,两者毛细血管密度都高于对照组,心超显示左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)升高, LVEF 由 35% 升至 45% ( $P < 0.01$ , 猪),短轴缩短率升高 ( $P < 0.01$ , 鼠),左室收缩末期径下降 ( $P < 0.01$ , 鼠)。2004 年在 TOPCARE - AMI 研究中<sup>[17]</sup>, 59 例急性心肌梗死患者冠状动脉内注射骨髓源或外周血来源的 EPCs,术后 4 个月随访左室造影发现: LVEF 升高,从 ( $50 \pm 10$ )% 到 ( $58 \pm 10$ )% ( $P < 0.01$ ),左室收缩末期容积减少,从 ( $54 \pm 19$ ) ml 降至 ( $44 \pm 20$ ) ml ( $P < 0.01$ )。同时采用增强对比的核磁共振技术,后期增强(late enhancement, LE)容积衡量梗死范围,术后 4 个月和 12 个月 LE 显著减小 ( $P = 0.003$ ,  $P < 0.01$ )。关于骨髓 EPCs 和外周血 EPCs 的治疗效果比较,目前还没有统一的结论,有研究认为骨髓 EPCs 效果优于外周血 EPCs<sup>[18]</sup>,也有研究结果表明两者对于新生血管的作用无明显差异<sup>[17]</sup>。

2.2.3 EPCs 结合基因治疗 为了更有效地利用有限的 EPCs,人们将基因与 EPCs 治疗结合起来,希望达到更强的治疗效果。Iwaguro 等<sup>[19]</sup>将转染了鼠的 VEGF 基因的人 EPCs 经静脉注入后肢缺血的裸鼠体内,治疗组术后血浆 VEGF 水平明显高于对照组,且缺血区新血管迅速生成,毛细血管密度显著增加,该结果显示 VEGF 明显增强了 EPCs 的血管新生特性。

近年来,EPCs 在“治疗性血管新生”方面研究进展很快,并且初步取得了肯定的结果。几个小规模的临床试验结果显示:注射骨髓或外周血来源 EPCs 进入缺血区域和应用 VEGF、G-CSF 等细胞因子动员 EPCs 进入缺血区域,可诱发缺血心肌的血管新生。EPCs 治疗的临床阶段目前限于:(1)严重的肢体缺血;(2)急性心肌梗死;(3)覆盖血管移植术,促进生物适应性。但其临床效果还不明朗,尤其关于 EPCs 有促进肿瘤血管生长的问题。此外,由于 EPCs 表面缺乏特异性标志,多数研究所用的移植细胞均非纯化 EPCs,细胞因子动员 EPCs 的同时

也动员其他干细胞。所以,对 EPCs 的生物学特性和临床应用需要进行更多研究,移植 EPCs 治疗急性心肌梗死的长期疗效和安全性仍需要大规模、随机临床试验来评价。

另外有研究<sup>[14,20,21]</sup>提示,EPCs 除参与血管新生外,还可以转化为心肌细胞,进一步改善梗死后的心肌再生。然而,近期研究排除了 EPCs 转化为心肌细胞的可能性<sup>[22,23]</sup>。

### 3 结 语

EPCs 由于取材方便、自体来源无免疫排斥、能在体外扩增并进行基因修饰等特点,给冠心病的治疗带来了新的曙光,通过动员或移植 EPCs 促进内皮修复、血管新生,具有重要的临床意义。但是,EPCs 仍存在许多尚待解决的问题,主要为:第一,EPCs 缺乏特有的表面标志物,其鉴定和纯化技术还不成熟;第二,EPCs 的数量有限,尤其血管病变者,急需优化体外扩增的方法;第三,EPCs 从骨髓动员、迁移、分化和归巢至外周组织的机制研究还处于起步阶段;第四,在特殊条件下 EPCs 的实验研究尚待开展:由于大多数患者存在机体或器官的缺血、缺氧或其他情况,探讨这些微环境对 EPCs 的影响是非常有实用价值的;第五,EPCs 的移植途径也有待进一步探讨。目前国内对 EPCs 研究方兴未艾,尽管现在还处于实验研究和小规模临床试验阶段,但其独特的血管保护作用将有可能成为心血管疾病较有前途的治疗手段之一。

### 参 考 文 献

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275:964-967.
- [2] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 2001, 89:E1-E7.
- [3] George J, Goldstein E, Abashidze S, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina; association with systemic inflammation. *Eur Heart J*, 2004, 25:1003-1008.
- [4] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 2001, 103: 2776-2779.
- [5] George J, Herz I, Goldstein E, et al. Number and ad-

- hesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23:e57-e60.
- [6] Kong D, Melo LG, Gneecchi M, et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation*, 2004, 110: 2039-2046.
- [7] Shirota T, Yasui H, Shimokawa H, et al. Fabrication of endothelial progenitor cell (EPC)-seeded intravascular stent devices and *in vitro* endothelialization on hybrid vascular tissue. *Biomaterials*, 2003, 24: 2295-2302.
- [8] Hu Y, Davison F, Zhang Z, et al. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation*, 2003, 108: 3122-3127.
- [9] Silvestre JS, Govova A, Brun V, et al. Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition. *Circulation*, 2003, 108: 2839-2842.
- [10] Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*, 2004, 363:751-756.
- [11] Hyun-Jai C, Tae-Youn K, Hyun-Ju C, et al. The effect of stem cell mobilization by granulocyte colony stimulating factor on neointimal hyperplasia and endothelial healing after vascular injury with bare-metal versus paclitaxel-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48:366-374.
- [12] Rotmans JJ, Heyligers JM, Verhagen HJ, et al. *In vivo* cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation*, 2005, 112:12-18.
- [13] Aoki J, Serruy PW, Van Beusekom H, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody CD34 the HEALING-FIM (healthy endothelial accelerated lining inhibits neointimal growth-first in man) registry. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45: 1574-1579.
- [14] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10344-10349.
- [15] Seiler C, Pohl T, Wustmann K, et al. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 2001, 104: 2012-2017.
- [16] Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi JI, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*, 2003, 107: 461-468.
- [17] Schachinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI trial. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44:1690-1699.
- [18] 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. *Lancet*, 2002, 360:427-435.
- [19] Iwaguro H, Yamaguchi JI, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*, 2002, 105: 732-738.
- [20] Badorff C, Brandes RP, Popp R, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*, 2003, 107: 1024-1032.
- [21] Yeh ET, Zhang S, Wu HD, et al. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34<sup>+</sup>-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells *in vivo*. *Circulation*, 2003, 108: 2070-2073.
- [22] Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 2004, 428: 664-668.
- [23] Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*, 2004, 428: 668-673.