

## • 综 述 •

## 内皮祖细胞支架的研究进展

赵清 综述 魏盟 审校

大量证据表明,以雷帕霉素和紫杉醇为代表的药物洗脱支架可降低再狭窄的发生,然而,近年发现其存在支架晚期栓塞现象<sup>[1]</sup>,该现象与再内皮化的延迟有关。有研究发现雷帕霉素抑制循环平滑肌祖细胞增殖的同时,对起源于单个核细胞的内皮样细胞也有抑制作用,而这种抑制作用,势必影响再内皮化进程<sup>[2]</sup>。因此,有必要研制更为合理和完善的新型支架以减少支架晚期血栓形成。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)具有向内皮系分化的特性,是内皮修复的最佳来源。目前,以 EPCs 制成的支架大致可分为两种: EPCs 捕获支架和 EPCs 种植支架。本文就 EPCs 的生物学特性和 EPCs 支架作一综述。

## 1 EPCs 的生物学特性

Asahara 等<sup>[3]</sup>于 1997 年采用免疫磁珠吸附法首先在成人外周血中分离出可分化为内皮细胞的 CD34<sup>+</sup>造血干细胞,并将其命名为 EPCs。以后研究发现,早期 EPCs 表达 CD133(即 AC133)、CD34 和 VEGFR-2(也称 KDR 或 Flk-1),而循环 EPCs 低表达 CD133,继续表达 CD34 和 VEGFR-2,并开始表达内皮系细胞特异性标志: VE-钙粘蛋白(VE-cadherin)、E-选择素、内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)、血管假性血友病因子(von Willebrand factor)、CD31 等。AC133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>和 CD34<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup>细胞在内皮生长因子的刺激下均可分化为内皮细胞<sup>[4,5]</sup>。EPCs 除了来源于骨髓和脐带血外,还可来源于非骨髓组织,如脂肪组织、心脏、胚胎肝及神经组织等。这些不同来源的细胞在特定条件下均可分化为内皮细胞。过氧化物酶体增生物激活受体- $\gamma$ 激动剂罗格列酮可促使骨髓源性成血管祖细胞向内皮细胞方向分化<sup>[6]</sup>。然而, EPCs 也可向平滑肌细胞方向分化。Simper 等<sup>[7]</sup>发现人外周血单个核细胞在加有血小板衍生生长因子(PDGF-BB)的内皮培养基 EGM-2 培养时,可分化为具有平滑肌细胞

表型( $\alpha$ -SMA, 肌球蛋白重链, calponin 阳性)的细胞。

在外周血中至少存在两种 EPCs: 早期和晚期 EPCs 或称过溢生长 EPCs(outgrowth EPCs)<sup>[8]</sup>。晚期 EPCs 较早期 EPCs 和内皮细胞的寿命长,且具有很强的增殖能力,体外可扩增  $10^7$  倍。此外, EPCs 还具有迁移、黏附和分泌功能。当患者具有心血管危险因素(吸烟、糖尿病等)或为冠心病患者时, EPCs 的增殖、迁移和黏附能力下降,他汀类药物(如阿托伐他汀)、雌激素和生长因子(如 VEGF)可通过磷脂酰肌醇 3-激酶[(phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)/丝氨酸/苏氨酸激酶(serine/threonine kinase, Akt)(PI3K/Akt)]途径诱导生成一氧化氮,促使动员骨髓 EPCs 进入外周血<sup>[9,10]</sup>;也可激活端粒酶,延迟 EPCs 的衰老,从而增强其增殖、迁移和分泌功能<sup>[11]</sup>。他汀类药物可上调整合素亚单位  $\alpha_5$ 、 $\beta_1$ 、 $\alpha_v$  和  $\beta_3$ , 以增加 EPCs 的黏附能力<sup>[12]</sup>。

EPCs 可在一定条件下向内皮细胞方向分化,并且具有增殖、迁移、黏附功能,而 EPCs 本身又具有分泌细胞因子和生长因子的功能,此可以自分泌和旁分泌方式作用于自身及邻近成熟内皮细胞和组织中祖细胞,从而有利于发挥内皮样作用。因此,使 EPCs 黏附于支架上,可加速内皮化进程,防止血栓形成。

## 2 EPCs 捕获支架

EPCs 的表面表达 CD34, 利用 CD34 抗体与其相应抗原结合,可分选出 EPCs。在支架表面包被 CD34 抗体,植入血管后,可以通过抗原-抗体结合的原理,自动捕捉血液中的 EPCs,使其附着在支架上,所以称为 EPCs 捕获支架<sup>[13]</sup>。

2002 年加拿大学者将包被 CD34 抗体的支架植入猪冠脉 1h 后,发现包被抗体的支架 70% 表面被 EPCs 覆盖,相当于每  $1\text{mm}^3$  黏附 2000 个 EPCs,而未包被抗体的支架表面几乎无细胞覆盖;48h 后包被抗体的支架表面内皮完全覆盖;而且 28d 时形成的新生内膜面积明显低于无包被抗体对照组<sup>[14]</sup>。2005 年包被 CD34 抗体的捕获支架首次在冠心病患者中进行临床观察(HEALING-FIM),该试验是

收稿日期:2006-09-27

作者单位:200233 上海市,上海交通大学附属第六人民医院心内科  
作者简介:赵清,女,1970 年 2 月生,上海市人,在读博士研究生,副主任医师  
通讯作者:魏盟, Tel:021-64369181-8332

单中心、前瞻性和非随机,共入选 16 名患者,随访 9 个月,1 例患者发生非 ST 段抬高型心肌梗死,主要心脑血管不良事件发生率为 6.3%,靶血管重建率为 6.3%,未发生支架内血栓,随访 6 个月血管造影显示平均晚期腔径丢失( $0.63 \pm 0.52$ )mm,血管内超声显示支架容积阻塞( $27.2 \pm 20.9$ )%,然而新生内膜增殖较既往裸支架无明显降低。Aoki 等<sup>[13]</sup>认为未取得理想临床疗效的原因很大部分归结于捕捉支架的工艺,在 HEALING-FIM 试验中采用的包被支架是储存在叠氮化钠水溶液,使用前需冲洗;植入前需用手将支架套在球囊导管上;支架本身得经较高强度的  $\gamma$  射线消毒,从而使细胞生物活性下降。所以,在 HEALING-II 试验中,对包被 CD34 抗体的支架进行改进(如干支架,支架预先装在球囊导管上,低强度辐射消毒)后植入患者,初步研究发现,EPCs 数量与靶血管病变的血运重建率有相关性,数量越低,则需要血运重建率高;服用他汀类药物患者的 EPCs 数量是对照组的 2 倍,且靶血管血运重建率为 0%。鉴于 HEALING-II 初步试验结果,目前正拟进行评价他汀类与 EPCs 水平的多中心研究(Statin dosing and EPC Level Study)、评价 Genous Bio-engineered R 支架联合他汀类药物治疗冠心病患者的多中心、前瞻性和随机研究(HEALING III)、e-HEALING 试验和评价 Genous Bio-engineered R 支架对 ST 段抬高型心肌梗死患者的安全性和可行性的 HEALING-AMI 试验,这些试验将就临床应用抗体包被支架的疗效和安全性作出进一步的评估。

Rotmans 等<sup>[15]</sup>将包被 CD34 抗体的聚四氟乙烯移植物(ePTFE)植入猪颈动脉和颈静脉之间,术后 3d、28d 移植物表面 95% 和 85% 覆盖内皮,而 28d 后在与静脉吻合的移植物有明显的内膜增生。其发生的原因可能为:捕获的 CD34<sup>+</sup> 细胞向内皮细胞分化的同时,向平滑肌细胞方向分化;CD34<sup>+</sup> 细胞分泌的细胞因子促进内膜增生;生理性微环境的缺乏减弱了内皮的保护作用;湍流妨碍了 EPCs 向内皮细胞方向的分化,尤其位于血管吻合处;CD34<sup>+</sup> 细胞的成熟因 CD34 表位与固定抗体结合而受到阻碍。

EPCs 包被抗体支架在工艺上要求高,且捕获的 EPCs 只有与抗体匹配的一种,事实上 EPCs 的表面标志众多,CD34<sup>+</sup> 的 EPCs 只占一小部分,部分成熟的内皮细胞表面也能表达 CD34<sup>+</sup>,导致捕捉的细胞数量少和缺乏相对特异性。最近,由德国学者研制出一种新型包被支架,其表面为整合素和亲水性肽(cyclic Arg-Gly-Asp, cRGD),离体试验表明,

cRGD 可促进 EPCs 的迁移,将支架植入猪冠状动脉后 4 周,EPCs 较未包被的支架黏附多,且从冠脉注入的 EPCs 也主要归集于支架上,表明该支架可捕捉 EPCs;植入 12 周后,包被支架组较对照再狭窄率显著降低<sup>[16]</sup>。

### 3 EPCs 种植支架

研究发现,AC133<sup>+</sup> EPCs 在体外可黏附到分别涂有肝素、胶原、氧化铝、纤连蛋白、层粘连蛋白等的支架上,提示 EPCs 可制备种植支架是可行的。日本研究者 Shirota 等<sup>[17]</sup>设计了两种 EPC 种植的支架,一种是光处理明胶包被支架,另一种是两层包被支架,内层为薄层多微孔的聚氨酯薄膜,外层为光处理明胶。从犬外周血中分离并体外培养 EPCs,与上述支架共孵育,培养 7d 后,两种支架表面均覆盖 EPCs,并且支架扩张后细胞仍能黏附于支架上。将支架植入模拟血管中膜组织模型中,经过 7d 培养后,从支架迁移过来的 EPCs 增殖并覆盖了模拟血管中膜组织的内膜表面。此外,Shirota 等<sup>[18]</sup>还尝试将种植有 EPCs 的管状胶原组织贴附到支架上,用球囊将支架在模拟动脉中膜组织中展开,发现 EPCs 仍能在支架表面和模拟中膜组织的邻近区域形成内皮。为了证实 EPCs 种植的混合血管移植物的非致血栓性,他们将从犬外周血中分离培养的 EPCs 种植到 I 型胶原网格上,用分段、多微孔的聚氨酯甲酸酯薄膜包裹制成支架,通过球囊植入到犬的颈动脉,3 个月后支架表面覆盖  $\beta$  因子染色阳性,呈铺路石样的细胞,从而在体实验也证实 EPCs 种植支架可防止血栓形成<sup>[19]</sup>。除了犬 EPCs 外,人 EPCs 也可在多微孔的聚氨酯薄膜和光处理明胶的支架上黏附和增殖,并在血流剪切应力影响下,仍能良好覆盖<sup>[20]</sup>。

EPCs 可在体外通过可控条件(特定培养基联合细胞生长补充物,药物如他汀类,基因修饰)进行扩增,但有关 EPCs 种植支架的研制目前仍处于实验阶段。其突出缺点在于其体外制备时间长,不能用于临床急诊介入治疗。此外,EPCs 种植支架在套上球囊和植入在体血管过程时将面临细胞丢失和活性下降的问题。

### 4 总结

EPCs 支架是目前较为新型的具有内皮功能的生物支架,两种支架孰优孰劣,各有千秋。捕获支架可较容易植入体内,无细胞丢失的问题,而种植支架则面临植入体内时细胞丢失,细胞活性下降的风险;

捕获支架制备时间较种植支架短;捕获支架制备后可随时植入体内,而种植支架只能择期使用;捕获支架的贮存较种植支架容易;捕获支架只能捕获与抗体相匹配的EPCs,对EPCs功能的改善只能通过全身用药,而种植支架上的EPCs可通过基因修饰、局部或全身用药和细胞因子等多种方式改善细胞数量和功能;种植支架的表面需包被纤连蛋白、胶原等致栓性物质,支架植入体内过程中细胞丢失,致栓性物质暴露于血液后易形成血栓。虽然EPCs捕获支架已率先应用于临床,但临床疗效并未达到预期效果,所以,如何完善EPCs支架的制备尚需进一步探索。

#### 参考文献

- [1] Joner M, Finn AV, Farb A, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48: 193-202.
- [2] Fukuda D, Sata M, Tanaka K, et al. Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells. *Circulation*, 2005, 111: 926-931.
- [3] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275: 964-967.
- [4] Kim SY, Park SY, Kim JM, et al. Differentiation of endothelial cells from human umbilical cord blood AC133-CD34<sup>+</sup> cells. *Ann Hematol*, 2005, 84: 417-422.
- [5] 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. *Circ Res*, 2003, 93: 980-989.
- [6] Wang CH, Ciliberti N, Li SH, et al. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage. *Circulation*, 2004, 109: 1392-1400.
- [7] Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, et al. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*, 2002, 106: 1199-1204.
- [8] Yoon CH, Hur J, Park KW, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells. *Circulation*, 2005, 112: 1618-1627.
- [9] Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI3 kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*, 2001, 108: 391-397.
- [10] Strehlow K, Werner N, Berweiler J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*, 2003, 107: 3059-3065.
- [11] Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Hypertens*, 2005, 23: 1699-1706.
- [12] Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization; a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2002, 105: 3017-3024.
- [13] Aoki J, Serruys PW, Van Beusekom H, et al. Stents coated with antibody against CD34. The HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45: 1574-1579.
- [14] Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, et al. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44: 733-739.
- [15] 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.
- [16] Blindt R, Vogt F, Astafieva I, Fach C, et al. A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47: 1786-1795.
- [17] 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.
- [18] Shirota T, Yasui H, Matsuda T. Intraluminal tissue-engineered therapeutic stent using endothelial progenitor cell-inoculated hybrid tissue and *in vitro* performance. *Tissue Eng*, 2003, 9: 473-485.
- [19] He H, Shirota T, Yasui H, et al. Canine endothelial progenitor cell-lined hybrid vascular graft with non-thrombogenic potential. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 126: 455-464.
- [20] Shirota T, He H, Yasui H, et al. Human endothelial progenitor cell-seeded hybrid graft: proliferative and antithrombogenic potentials *in vitro* and fabrication processing. *Tissue Eng*, 2003, 9: 127-136.