

- 11 Morbach S, Furchert H, Gröblinghoff U, et al. Long - term prognosis of diabetic foot patients and their limbs: amputation and death over the course of a decade [J]. Diabetes Care, 2012, 35 (10) : 2021 - 2027
- 12 魏聪. 糖尿病大血管病变的研究进展 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, 10: 1292 - 1296
- 13 Claesson K, Kolbel T, Acosta S. Role of endovascular intervention in patients with diabetic foot ulcer and concomitant peripheral arterial disease [J]. Int Angiol, 2011, 30 (4) : 349 - 358
- 14 吕雄, 李波, 曹明满, 等. 糖尿病下肢血管病治疗方法的概述与选择 [J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21 (1) : 113 - 114
- 15 Bril V. Neuromuscular complications of diabetes mellitus [J]. Continuum : Minn, 2012, 20 (3) : 531 - 544
- 16 Mehra M, Merchant S, Gupta S, et al. Diabetic peripheral neuropathy: resource utilization and burden of illness [J]. Med Econ, 2014, 17 (9) : 637 - 645
- 17 Desai B, Freeman E, Huang E, et al. Clinical value of tapentadol extended - release in painful diabetic peripheral neuropathy [J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2014, 7 (2) : 203 - 209

(收稿日期: 2015-04-03)

(修回日期: 2015-04-27)

## 内皮祖细胞在缺血性脑卒中诊治中的研究进展

岳丹丹 吴丹红

**摘要** 内皮祖细胞是一种兼有造血干细胞和内皮细胞部分特征和功能的干细胞。内皮祖细胞可作为缺血性脑卒中的生物学标志物, 与缺血性的损伤程度和预后有紧密联系, 还具有促进血管发生、形成新的血管以及保护神经、修复缺血性脑卒中后受损神经的作用。

**关键词** 内皮祖细胞 缺血性脑卒中 生物学标志物 治疗

中图分类号 R74

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.049

脑卒中以其高致病率、高致死率、高致残率给社会、家庭及个人带来沉重的经济和精神负担。缺血性脑卒中占所有脑卒中的 85%<sup>[1]</sup>, 近年来缺血性脑卒中新的治疗方法的兴起让人们开始关注内皮祖细胞(EPCs)。EPCs 是一种兼有造血干细胞和内皮细胞部分特征和功能的干细胞, 它可作为生物学标志物评估缺血性脑卒中预后, 也可通过促进血管增生、神经修复等发挥治疗作用。本文就内皮祖细胞的生物学特征、作为缺血性脑卒中评估预后的生物学标志物以及临床应用方面的研究进行综述。

### 一、EPCs

1. EPCs 的来源和特征:EPCs 有多种来源和生物标志物。Asahara 等<sup>[2]</sup> 在 1997 年从人外周血中利用 EPCs 表达的标志物 CD34 和 Flk - 1 (KDR, VEGFR2) 分离出 EPCs, 除了上述两种标志物, 还有 CD133、CD31、CD45、CD14、CD115、CD146、CD144、CD105、

vWF、CD117、TIE - 2 等<sup>[3]</sup>。1999 年, Asahara 等<sup>[4]</sup> 证明了 EPCs 可来源于骨髓。随后, 研究发现 EPCs 可以出现在骨髓、脾脏、外周血及脐带血等<sup>[5]</sup>。

根据培养特点, EPCs 主要分为早期的 EPCs 和晚期的 EPCs 两类<sup>[6]</sup>。早期的 EPCs 由来自外周血的单核细胞培养 4~10 天获得, 它们类似于成集落内皮细胞(CFU-ECs), 在 2~3 周数量达到高峰, 形状类似纺锤形, 寿命只有 4 周; 晚期的 EPCs 或内皮集落形成细胞(ECFCs)由单核细胞培养大于 14 天获得, 呈鹅卵石样, 在 4~8 周快速增长, 存活 12 周<sup>[1]</sup>。

2. EPCs 动员和归巢:(1)动员:EPCs 动员是指骨髓中的 EPCs 在缺血的诱导下离开骨髓。而参与 EPCs 动员的机制多种多样。Bogoslovsky 等<sup>[7]</sup> 为研究生长因子与 EPCs 之间的关系, 检测 17 个明确为缺血性脑卒中的患者发现, SDF - 1 $\alpha$  与缺血性脑卒中患者早期 EPC 的升高关系密切。Mao 等<sup>[8]</sup> 研究发现, 永久性大脑中动脉闭塞(pMCAO)后, 与正常组相比, 使用 CXCR4 的拮抗剂 AMD3100 治疗后, 内源性 EPCs 的数量、毛细血管密度和缺血区域脑流量明显减少以及神经生物功能恶化; 提示 SDF - 1/CXCR4 途径参与了 EPCs 动员过程。此外, Morancho 等<sup>[9]</sup> 通过阻塞大脑中动脉在小鼠中形成局灶性缺血模型, 比

基金项目:上海市卫生和计划生育委员会科研基金资助项目(2014040332); 上海交通大学医工交叉研究基金资助项目(YG2013MS23)

作者单位:201999 上海交通大学医学院附属第三人民医院神经内科

通讯作者:吴丹红,主任医师,硕士生导师,电子信箱:kathywuxue@sina.com

较 MMP-9 敲除型和野生型在缺血后 6、24h EPCs 的计数及缺血区域血管生成能力,结果发现 MMP-9 敲除型小鼠缺血后 EPCs 释放高峰延迟,并且 EPCs 数量减少,表明 MMP-9 与缺血性脑卒中后 EPCs 数量相关。Chen 等<sup>[10]</sup> 在研究血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 改善 EPCs 功能时,发现通过调节内源性一氧化氮合酶和一氧化氮通路来改善 EPC 的功能,并且认同了依据 EPC 在治疗缺血性脑卒中的有效性,提示一氧化氮与缺血性脑卒中后 EPCs 功能相关。(2) 归巢:归巢是指骨髓中动员的内皮祖细胞在多种途径作用下到达缺血或损失区域。它们归巢到缺血或损失区域是它们执行血管形成功能的重要过程。例如, SDF-1/CXCR4 轴在介导缺血组织 EPC 归巢中起着重要作用; CXCR2 和它的配体, CXCL1 和 CXCL7 已经被证明介导 EPC 归巢到受损动脉<sup>[11]</sup>。CXCL5 和它的受体可作为 EPC 归巢到受损组织的信号分子<sup>[12]</sup>。Basile 等<sup>[13]</sup> 研究发现促血管生成的骨髓源性的单核细胞归巢到损伤的血管,它们分泌的生长因子或细胞因子诱导晚期 EPCs 出现在损伤的组织或血液中。由此可见,多种因子参与 EPCs 的归巢。

## 二、EPCs 与缺血性脑卒中

鉴于 EPCs 的作用机制和归巢过程,EPCs 功能多种多样。循环 EPCs 的水平能独立预测缺血性脑卒中的预后<sup>[14]</sup>。同时,EPCs 能通过促进血管内皮修复、血管形成及神经修复等进而发挥治疗作用。

1. 生物学标志物:2007 年,Sobrino 等<sup>[15]</sup> 发现急性缺血性脑卒中后循环 EPCs 的增加与良好的预后以及缺血面积减少有关。Bogoslovsky 等<sup>[16]</sup> 研究也发现循环 EPCs 的数量与缺血损失严重程度呈反比,较高水平的 EPCs 代表着较小的损伤面积,最后的损害以及损害的进展,而且可以作为缺血性脑卒中急性期严重程度的标志物。Tsai 等<sup>[17]</sup> 在评价循环 EPCs 系列变化与不同急性缺血性脑卒中亚型预后之间的关系的研究中,对 65 个急性缺血性脑卒中患者(45 个小血管患者和 20 个大血管患者)和 65 个对照组进行了前瞻性研究。在脑卒中发生后 48h 内、7 天、30 天检测患者血中 EPCs 的数量,结果发现,急性缺血性脑卒中(AIS)患者血中 CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> 和 KDR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> EPCs 显著降低,而大血管脑卒中患者血中 CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> EPCs 水平更低,在协方差调整后逐步逻辑回归分析,只有脑卒中亚型和入组时 KDR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> 的 EPCs 能独立预测脑卒中 6 个月的预后;提示较少数量的 EPCs 是缺血性脑卒中后 6 个月预后的

独立危险因素。关于这些生物学标志物,需要更大样本及前瞻性的研究来验证这些结果,寻找敏感度和特异性高的 EPCs 表型,必要时可联合多个表型的 EPCs,进而使 EPCs 成为缺血性脑卒中的诊断方法之一。

2. EPCs 在缺血性脑卒中的治疗作用:EPCs 在动物实验中作为细胞治疗来研究缺血性脑卒中的研究众多。Qiu 等<sup>[18]</sup> 通过阻断大鼠大脑中动脉 2h 后再开放 24h 形成脑缺血再灌注模型,将大鼠分成 3 组,假手术 + 细胞培养液(SHAM)组,缺血再灌注 + 细胞培养液(I/R)组,缺血再灌注 + EPCs(EPC)组。EPCs 来源于供体大鼠的骨髓中,在特定介质中生长并根据几个表面标志物利用流式细胞分析仪分离得到。EPCs( $10^6$ )通过尾静脉注入到灌注刚发生和发生 12h 后的大鼠中。灌注后损伤面积通过 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色测定。结果发现 SHAM 组没有损伤,I/R 组损伤面积为  $28.9\% \pm 1.8\%$ ,但是 EPC 组损伤面积明显减少,表明 EPCs 移植能够显著减少脑损伤面积。Tsuji 等<sup>[19]</sup> 的研究显示静脉内注入人脐带血细胞 CD34<sup>+</sup> 减少新生小鼠脑卒中的组织脑缺血面积,以及缺血周边暂时性脑血流量的增多。Moubarak 等<sup>[20]</sup> 在小鼠短暂性大脑中动脉闭塞模型(MCAO)中的研究发现来源于人的血液的 ECFCs 在脑缺血区表现出归巢能力,而且 ECFC 移植能够使脑凋亡细胞数量减少,毛细血管密度增加以及促进损伤组织神经发育。

除了单一 EPCs 细胞治疗外,Barclay 等<sup>[21]</sup> 使用了移植的增生血管模型来评价人类不同种类细胞(不纯化的单核细胞,纯化的外周血细胞,骨髓细胞或脐带血 CD34<sup>+</sup> 细胞以及来源于这些细胞的 ECFC)的效果,结果表明联合应用 CD34<sup>+</sup> 细胞和 ECFCs 可能为体内血管生成提供巨大的细胞支持,进而得出两种细胞联合治疗在体内血管增生和血流恢复方面较单种细胞治疗表现出优越性。Nih 等<sup>[22]</sup> 提出 EPCs 和平滑肌祖细胞(SMPCs)的联用可能是治疗缺血性脑卒中的新的方法,提示联合治疗可能为缺血性脑卒中治疗带来更多的益处。

## 三、展望

EPCs 给缺血性脑卒中诊断和治疗带来新的希望,尽管大量的研究试图使 EPCs 的定义标准化,然而 EPCs 确切的定义和分子特征仍然在讨论之中。所以,仍需要大量的研究探索 EPCs 的来源,进而明确标志物,更好地运用相关方法检测其功能。其次,

为了更好地明确多种 EPCs 的治疗效果和其促进血管再生的细胞和分子机制,需要选定更好的动物模型。治疗缺血性损伤只能通过在细胞和分子水平全面的理解血管增生机制而获得,进一步应用于临床。再者,ECFCs 近来成为治疗缺血性脑卒中的新的研究目标,但 ECFCs 的治疗效果仍然处于探索之中。而且 ECFCs 临床应用的主要难题是外周血中这些细胞含量极少,因而迫切需要当前体外诱导 ECFC 形成和 ECFC 来源的内皮细胞扩增技术的改善。最后,目前有大量关于干细胞治疗缺血性脑卒中的研究,但是关于检测治疗效果的方法仍然有限。有研究运用磁共振 (MRI) 和近红外线荧光成像 (NIRF) 来观察缺血性脑卒中后 24h 注入 EPCs 血管生成情况<sup>[23,24]</sup>。另一研究也试图建立一种非侵入性的图像方法来监测糖尿病脑卒中大鼠移植的 EPCs 如何归巢<sup>[5]</sup>。希望在不久的将来,一种类似于上述方法的非侵入性检测方法可以帮助评价缺血性脑卒中患者血管生成治疗效果。

### 参考文献

- 1 Zhao YH, Yuan B, Chen J, et al. Endothelial progenitor cells: therapeutic perspective for ischemic stroke [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19(2): 67–75
- 2 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275 (5302): 964–967
- 3 Pelosi E, Castelli G, Testa U. Endothelial progenitors [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2014, 52(4): 186–194
- 4 Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal neovascularization [J]. *Circ Res*, 1999, 85(3): 221–228
- 5 Bai YY, Wang L, Peng XG, et al. Non-invasive monitoring of transplanted endothelial progenitor cells in diabetic ischemic stroke models [J]. *Biomaterials*, 2015, 40: 43–50
- 6 Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use [J]. *Circ Res*, 2012, 110(4): 624–637
- 7 Bogoslovsky T, Spatz M, Chaudhry A, et al. Stromal-derived factor-1[alpha] correlates with circulating endothelial progenitor cells and with acute lesion volume in stroke patients [J]. *Stroke*, 2011, 42 (3): 618–625
- 8 Mao L, Huang M, Chen SC, et al. Endogenous endothelial progenitor cells participate in neovascularization via CXCR4/SDF-1 axis and improve outcome after stroke [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(5): 460–468
- 9 Moráncho A, Hernández-Guillamón M, Boada C, et al. Cerebral ischaemia and matrix metalloproteinase-9 modulate the angiogenic function of early and late outgrowth endothelial progenitor cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(12): 1543–1553
- 10 Chen J, Xiao X, Chen S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 priming enhances the function of endothelial progenitor cells and their therapeutic efficacy [J]. *Hypertension*, 2013, 61(3): 681–689
- 11 Walenta KL, Bettink S, Bohm M, et al. Differential chemokine receptor expression regulates functional specialization of endothelial progenitor cell subpopulations [J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(2): 299–305
- 12 Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, et al. Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(2): 711–721
- 13 Basile DP, Yoder MC. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(1): 10–16
- 14 Yip HK, Chang LT, Chang WN, et al. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2008, 39(1): 69–74
- 15 Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, et al. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome [J]. *Stroke*, 2007, 38(10): 2759–2764
- 16 Bogoslovsky T, Chaudhry A, Latour L, et al. Endothelial progenitor cells correlate with lesion volume and growth in acute stroke [J]. *Neurology*, 2010, 75(23): 2059–2062
- 17 Tsai NW, Hung SH, Huang CR, et al. The association between circulating endothelial progenitor cells and outcome in different subtypes of acute ischemic stroke [J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 427: 6–10
- 18 Qiu J, Li W, Feng S, et al. Transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates cerebral ischemia and reperfusion injury by inhibiting neuronal apoptosis, oxidative stress and nuclear factor- $\kappa$ B expression [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(1): 91–98
- 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 [J]. *Neuroscience*, 2014, 263: 148–158
- 20 Moubarik C, Guillet B, Youssef B, et al. Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke [J]. *Stem Cell Rev*, 2011, 7(1): 208–220
- 21 Barclay GR, Tura O, Samuel K, et al. Systematic assessment in an animal model of the angiogenic potential of different human cell sources for therapeutic revascularization [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2012, 3(4): 23
- 22 Nih LR, Deroide N, Lere-Dean C, et al. Neuroblast survival depends on mature vascular network formation after mouse stroke: role of endothelial and smooth muscle progenitor cell co-administration [J]. *Eur J Neurosci*, 2012, 35(8): 1208–1217
- 23 Liu J, Wang Y, Akamatsu Y, et al. Vascular remodeling after ischemic stroke: mechanisms and therapeutic potentials [J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 115: 138–156
- 24 Bai YY, Gao X, Wang YC, et al. Image-guided pro-angiogenic therapy in diabetic stroke mouse models using a multi-modal nanoprobe [J]. *Theranostics*, 2014, 4(8): 787–797

(收稿日期:2015-04-01)

(修回日期:2015-04-14)