

- 7 Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, *et al.* The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110: 1037 – 1044
- 8 Pak M, Lopez MA, Gabayan V, *et al.* Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity[J]. *Blood*, 2006, 108(12): 3730 – 3735
- 9 Rodriguez R, Jung CL, Gabayan V, *et al.* Hepcidin induction by pathogens and pathogen – derived molecules is strongly dependent on interleukin – 6[J]. *Infect Immun*, 2014, 82(2): 745 – 752
- 10 Besson – Fournier C, Latour C, Kautz L, *et al.* Induction of activin B by inflammatory stimuli up – regulates expression of the iron – regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling[J]. *Blood*, 2012, 120(2): 431 – 439
- 11 Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism[J]. *Annu Rev Med*, 2011, 11(62): 347 – 360
- 12 Kurzrock R, Voorhees PM, Casper C, *et al.* A phase I, open – label study of siltuximab, an anti – IL – 6 monoclonal antibody, in patients with B – cell non – Hodgkin lymphoma, multiple myeloma, or Castleman disease[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(13): 3659 – 3670
- 13 Doyle MK, Rahman MU, Frederick B, *et al.* Effects of subcutaneous and intravenous golimumab on inflammatory biomarkers in patients with rheumatoid arthritis: results of a phase I, randomized, open – label trial[J]. *Rheumatology*, 2013, 52(7): 1214 – 1219
- 14 Fernandes A, Preza GC, Phung Y, *et al.* The molecular basis of hepcidin – resistant hereditary hemochromatosis[J]. *Blood*, 2009, 114(2): 437 – 443
- 15 Origa R, Galanello R, Ganz T, *et al.* Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta – thalassemia[J]. *Haematologica*, 2007, 92(5): 583 – 588
- 16 Pasricha SR, Frazer DM, Bowden DK, *et al.* Transfusion suppresses erythropoiesis and increases hepcidin in adult patients with beta – thalassemia major: a longitudinal study[J]. *Blood*, 2013, 122(1): 124 – 133
- 17 Troutt JS, Butterfield AM, Konrad RJ. Hepcidin – 25 concentrations are markedly increased in patients with chronic kidney disease and are inversely correlated with estimated glomerular filtration rates[J]. *J Clin Lab Anal*, 2013, 27(1): 504 – 510
- 18 Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, *et al.* Mutations in TM-PRSS6 cause iron – refractory iron deficiency anemia (IRIDA)[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(5): 569 – 571
- 19 Kim A, Fung E, Parikh SG, *et al.* A mouse model of anemia of inflammation: complex pathogenesis with partial dependence on hepcidin[J]. *Blood*, 2014, 123(8): 1129 – 36
- 20 Lioupis C, Barbatis C, Drougou A, *et al.* Association of haptoglobin genotype and common cardiovascular risk factors with the amount of iron in atherosclerotic carotid plaques[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 216(1): 131 – 138
- 21 Ling S, Nheu L, Komesaroff PA. Cell adhesion molecules as pharmaceutical target in atherosclerosis[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2012, 12(2): 175 – 183
- 22 Lin HL, Xu XS, Lu HX, *et al.* Pathological mechanisms and dose dependency of erythrocyte – induced vulnerability of atherosclerotic plaques[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43(3): 272 – 280
- 23 Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, *et al.* An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(3): 985 – 997
- 24 van der Weerd NC, Grooteman MP, Bots ML, *et al.* Hepcidin – 25 is related to cardiovascular events in chronic haemodialysis patients[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(12): 3062 – 71

(收稿日期:2015 – 04 – 28)

(修回日期:2015 – 05 – 12)

内皮前体细胞在动脉粥样硬化发生中的作用

郑森峰 张文健 娄晋宁 李成辉

摘 要 内皮前体细胞(endothelial progenitor cell,EPC)能够分化成内皮细胞,在损伤内皮的修复和血管新生中发挥重要作用。内皮功能障碍启动白细胞黏附、脂质过氧化等导致动脉粥样硬化(atherosclerosis)的一系列过程,内皮损伤和修复失衡引发动脉粥样硬化的理论被广泛接受。EPC的数量和功能能够预测心血管疾病的发生和预后,多种动脉粥样硬化的危险因素降低EPC水平,动物实验中给予EPC细胞治疗能够减轻动脉粥样硬化的严重程度,以EPC为基础的细胞治疗可能成为治疗动脉粥样硬化新的希望。

关键词 内皮前体细胞 动脉粥样硬化 血管修复 细胞治疗

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.02.005

作者单位:100069 北京,中日友好医院

通讯作者:李成辉,教授,博士生导师,电子信箱:chenghui_li@sina.com

动脉粥样硬化以炎症细胞浸润、脂质过氧化、细胞外基质沉积、平滑肌细胞增生等因素导致的粥样斑块发生为主要特征,内皮细胞功能障碍被认为是这一系列病理过程的起始原因^[1]。血管内皮在维持血管结构、调节血管张力、介导凝血和炎症反应等过程中发挥着重要作用,正常的内皮结构和功能对于维持血管稳态不可或缺。血流动力学变化、药物的细胞毒性、介入治疗以及免疫反应等因素会导致内皮细胞的脱落、死亡或功能障碍,循环中的免疫细胞聚集到损伤发生的区域,炎性细胞浸入血管床,氧化和吞噬脂质,最终导致动脉粥样硬化的发生^[2]。

早期研究认为血管内皮的修复是通过相邻内皮细胞的迁移增殖来实现的,但是 1997 年 Asahara 等发现,从外周血细胞中分离的 CD34⁺ 的细胞能够在体外培养分化成内皮细胞,并且这些细胞移植到下肢缺血的小鼠体内后能够整合到新生的血管中,这个标志性的研究证实了循环中的某类细胞能够作为内皮细胞的前体,参与血管新生,内皮前体细胞(endothelial progenitor cell, EPC)的概念也由此产生^[3]。近年来研究认为动脉粥样硬化是血管内皮损伤与修复失衡导致的疾病,高血压、糖尿病、吸烟、酗酒等动脉粥样硬化的危险因素会直接地影响 EPC 的数量和功能^[4]。EPC 与心血管疾病的预后密切相关,一系列与 EPC 相关的研究发现 EPC 在动脉粥样硬化的发生、发展过程中发挥重要的作用^[5]。

一、EPC 的生物学功能

1. EPC 的血管修复功能:EPC 参与血管损伤后的内皮修复,在导丝拉伤造成颈动脉损伤的模型中,他汀类药物(statin)能够增加循环中的 EPC 数量和损伤区域 EPC 的黏附,黏附的 EPC 修复损伤血管,缓解因内膜增生导致的血管再狭窄。在另一种球囊扩张导致的颈动脉损伤模型中,利用粒系集落刺激因子(granulocyte - colony stimulating factor, G - CSF)能够促进 EPC 从骨髓动员到循环中,使得损伤表面重新内皮化,从而减少新生内膜的生成。除了动员内源性 EPC 的方法,输注外源 EPC 也能够促进损伤血管的修复。在兔的球囊损伤模型中,体外扩增的 EPC 孵育到动脉损伤的区域,显著促进了损伤血管的重新内皮化^[6]。

2. EPC 的促进血管新生功能:EPC 可能通过两种方式促进血管新生,一是直接整合到血管形成血管结构,二是分泌促血管生成的细胞因子。提取细胞内含有标记蛋白的转基因动物的骨髓,将其移植到缺血模

型动物的体内,在新生血管内可以发现含有标记蛋白的内皮细胞,说明骨髓来源的 EPC 参与了血管新生,但是新生血管含有标记蛋白的阳性率在不同缺血模型中为 0 ~ 90%;在不同的研究中,直接输入的 EPC 整合到血管结构的阳性率也有很大不同。在很多研究中没有发现或者发现只有很少 EPC 整合到血管结构,大量 EPC 在血管周围分布,分泌促血管生成的细胞因子来促进血管新生。这两种 EPC 不同的作用方式很大程度上是由于 EPC 分离纯化方法的不同导致的,从外周血中分离出的 EPC 含有大量的单核细胞,单核细胞能分泌促血管新生因子,但是不能形成血管结构,因此 EPC 的促血管新生功能可能是由不同种类细胞协同作用、共同完成的^[7]。

二、EPC 与动脉粥样硬化

1. 内皮功能障碍是动脉粥样硬化的起因:动脉粥样硬化是以在大动脉和中动脉形成含有胆固醇、细胞外基质、浸润炎性细胞、增殖平滑肌细胞等成分的粥样斑块为主要特征的血管病变。血管内皮在维持血管正常的结构和功能中起着至关重要的作用,大量研究发现动脉粥样硬化的发生伴随着内皮功能障碍。内皮功能障碍导致内皮屏障被破坏,内皮对于脂蛋白的通透性增加,内皮上黏附分子的表达上调。黏附分子激活促进白细胞聚集,白细胞在单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein - 1, MCP - 1)、白介素-8(interleukin - 8, IL - 8)、血小板衍生生长因子(platelet - derived growth factor, PDGF)、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage - colony stimulating factor, M - CSF)、骨桥蛋白(osteopontin)等因素的趋化下跨过受损的内皮屏障,迁移到内膜下,吞噬脂蛋白形成泡沫细胞(foam cell),分泌细胞外基质和多种细胞因子,诱导平滑肌细胞的迁移和增殖,最终形成粥样斑块^[8]。在动脉粥样硬化的模式动物 ApoE 敲除小鼠中发现其内皮细胞新生和替换的速率要明显高于正常小鼠,并且骨髓来源的 EPC 参与到了内皮细胞的更新修复当中,动脉粥样硬化是血管损伤和修复失衡导致的病变的观点逐渐被认同,EPC 在其中的作用也越来越被重视^[9]。

2. EPC 是预测动脉粥样硬化发生风险和预后的指标:多种与动脉粥样硬化相关的危险因素与 EPC 密切相关, Framingham 评分(Framingham score)能够预测动脉粥样硬化发生的风险,循环中的 EPC 数量与 Framingham 评分呈负相关^[10]。EPC 还可以衡量内皮功能和血管状态,肱动脉血流介导的血管扩张功能是最常用

的衡量血管舒缩功能和内皮功能的指标,EPC 的数量与其明显正相关,很多研究直接使用 EPC 作为衡量内皮功能的指标^[11]。除了 EPC 数量的改变,EPC 的功能在疾病发展中也可能发生变化。在一项心肌缺血的研究中,骨髓中 EPC 的数量在心肌缺血后没有发生明显的变化,而 EPC 形成细胞集落的能力降低,这说明心血管疾病的发生不仅有 EPC 数量的下降,还伴随着 EPC 功能的障碍^[12]。

EPC 还与心血管疾病的预后密切相关,在一项前瞻性研究中,EPC 的数量与心血管疾病的病死率呈明显的负相关,并且疾病的严重程度、采取干预的手段和患者本身的心血管危险因素的变化不会破坏这种关系,这表明 EPC 是一种适应性广、敏感度高的预测心血管疾病预后的指标^[13]。

3. 动脉粥样硬化影响 EPC 的因素和机制:氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是导致动脉粥样硬化最重要的因素之一,oxLDL 可以诱导 EPC 的凋亡和衰老,还能够降低 EPC 的黏附、迁移和血管结构形成能力。oxLDL 抑制蛋白激酶 B(protein kinaseB, PKB)的磷酸化,降低 eNOS 的表达,增加氧化低密度脂蛋白受体-1(oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)的表达,并且 ox-LDL 对 EPC 功能的影响能被 L-精氨酸(L-arginine)或者 LOX-1 的单克隆抗体预处理阻断,提示 oxLDL 通过 LOX-1 抑制 eNOS 通路影响 EPC 的功能^[14]。LDL 在慢性肾病的尿毒症血浆中会转变为氨基甲酰化的 LDL(carbamylated LDL, cLDL),cLDL 是指示慢性肾病严重程度的指标,也参与到动脉粥样硬化的发生中。cLDL 会导致线粒体去极化和氧化应激,抑制 EPC 增殖和形成血管结构,而且 cLDL 还能通过降低磷酸化组蛋白 H2AX 的表达,促使 EPC 衰老^[15]。吸烟会产生一种负电的低密度脂蛋白 L5,L5 通过 LOX-1 降低 PKB 磷酸化,抑制 EPC 的分化;吸烟还会增加氧化应激,减少一氧化氮的合成,诱导 EPC 的衰老和死亡,EPC 的数量在戒烟之后会明显上升^[16]。

C 反应蛋白(C-reactive proein, CRP)能够增加 EPC 活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成,N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)和 CRP 抗体能够抑制这种效应;CRP 降低 EPC 中谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase)、增加锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)的表达,转染 MnSOD 的干扰 RNA 能够显著抑制 CRP 引发的 ROS 增加、细胞凋亡和端粒酶失活,因此 CRP 可

能通过影响 EPC 的氧化应激状态,引起 EPC 的衰老和凋亡^[17]。其他一些因素也可能影响 EPC 的数量和功能。血管紧张素 II(angiotensin II)通过降低端粒酶活性、激活氧化应激反应加速 EPC 衰老。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)可能通过抑制骨髓功能,减少循环中 EPC 的数量。辅酶 II 氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NADPH oxidase)缺陷能缓解高脂血症导致的 EPC 功能障碍,其机制可能与 eNOS 失活、ROS 生成抑制有关^[18]。

4. 以 EPC 为基础的细胞治疗对动脉粥样硬化的干预:对 apoE 敲除小鼠静脉输注从野生型或者 4 周龄 apoE 敲除小鼠的骨髓中分离出来的 EPC,能够明显的减轻动脉粥样硬化的严重程度,输入的 EPC 分布在粥样斑块发生的表面,并且与成熟的内皮细胞共定位,说明 EPC 分化成内皮细胞整合到斑块部位内皮;输注 EPC 没有改变小鼠血浆胆固醇水平,但是明显增强了血管内皮细胞的端粒酶活性,说明 EPC 并不影响脂肪代谢,其治疗作用是通过调节血管内皮的修复来实现的^[19]。但是 EPC 输注对于治疗动脉粥样硬化并不是一直有利的,在一项研究中给 apoE 敲除小鼠输注 EPC,并且结扎股动脉造成下肢缺血,输注 EPC 能明显缓解下肢的缺血程度,增加缺血部位的血管新生,但是也明显增加了动脉粥样硬化的严重程度。在另一项研究中,给 apoE 敲除小鼠输注 EPC 增加了粥样斑块的发生和不稳定性^[20]。

这种不一致可能是由多种原因导致的。首先,EPC 是一个宽泛的概念,在不同研究中 EPC 分离的方法和来源都是不同的,单核细胞、淋巴细胞等促炎细胞经常参与到 EPC 的构成,这使得 EPC 具有促血管修复外的多种功能。其次,这些研究中对疾病的干预阶段是不同的,在 EPC 抑制动脉粥样硬化的研究中开始输注 EPC 的时间是未发生动脉粥样硬化的 3 周龄,而在 EPC 促进动脉粥样硬化的研究中应用的都是已发生粥样斑块的 10 周龄以上的小鼠,这也提示着 EPC 可能在动脉粥样硬化未发生或者早期阶段通过修复损伤内皮来阻止或者减慢动脉粥样硬化的发生,而在动脉粥样硬化发生之后,内皮损伤在动脉粥样硬化发展中的作用降低,修复内皮不能逆转动脉粥样硬化的发展,反而可能由于 EPC 的促进炎症反应等作用加重动脉粥样硬化。

三、展 望

目前以 EPC 为基础的细胞治疗已经应用在心肌

缺血等疾病的临床实验中,但是其对动脉粥样硬化干预的研究还停留在动物实验阶段。EPC 细胞治疗需要在动脉粥样硬化早期干预,但是动脉粥样硬化早期症状不明显,难以及时治疗,而晚期干预效果有限,确定有效的细胞治疗干预时间点是亟待解决的问题。另外,现行用于细胞治疗的 EPC 多来自于患者自身的外周血,这样可以解决免疫排斥的问题,但是心血管疾病会降低 EPC 的数量和功能,使得自体移植 EPC 的治疗效果有限。开发新的 EPC 来源,完善 EPC 的分离培养技术,是 EPC 细胞治疗需要解决的另外一个问题。

参考文献

- Athyros VG, Tziomalos K, Katsiki N, *et al.* Novel data on the pathogenesis of atherosclerosis, treatment targets, and new therapeutic interventions in lipid – related cardiovascular risk factors[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 20(40): 6215 – 6219
- Rabelink TJ, de Boer HC, van Zonneveld AJ. Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2010, 6(7): 404 – 414
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964 – 967
- Du F, Zhou J, Gong R, *et al.* Endothelial progenitor cells in atherosclerosis[J]. *Front Biosci: Landmark Ed*, 2012, 17: 2327 – 2349
- Lin CP, Lin FY, Huang PH, *et al.* Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species and inflammation[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 845037
- Sukmawati D, Tanaka R. Introduction to next generation of endothelial progenitor cell therapy: a promise in vascular medicine[J]. *American Journal of Translational Research*, 2015, 7(3): 411 – 421
- King TF, McDermott JH. Endothelial progenitor cells and cardiovascular disease[J]. *Journal of Stem Cells*, 2014, 9(2): 93 – 106
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis[J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 317 – 325
- Krankel N, Luscher TF, Landmesser U. 'Endothelial progenitor cells' as a therapeutic strategy in cardiovascular disease[J]. *Current Vascular Pharmacology*, 2012, 10(1): 107 – 124
- Castejon R, Jimenez – Ortiz C, Valero – Gonzalez S, *et al.* Decreased circulating endothelial progenitor cells as an early risk factor of sub-clinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus[J]. *Rheumatology*, 2014, 53(4): 631 – 638
- Bruyndonckx L, Hoymans VY, Van Craenenbroeck AH, *et al.* Assessment of endothelial dysfunction in childhood obesity and clinical use[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 174782
- Sen S, McDonald SP, Coates PT, *et al.* Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease[J]. *Clinical Science*, 2011, 120(7): 263 – 283
- Bakogiannis C, Tousoulis D, Androulakis E, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells as biomarkers for prediction of cardiovascular outcomes[J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(16): 2597 – 2604
- Ji KT, Qian L, Nan JL, *et al.* Ox – LDL induces dysfunction of endothelial progenitor cells via activation of NF – kappaB[J]. *Bio Med Research International*, 2015, 2015: 175291
- Carracedo J, Merino A, Briceno C, *et al.* Carbamylated low – density lipoprotein induces oxidative stress and accelerated senescence in human endothelial progenitor cells[J]. *FASEB J*, 2011, 25(4): 1314 – 1322
- Blum A. HMG – CoA reductase inhibitors (statins), inflammation, and endothelial progenitor cells – new mechanistic insights of atherosclerosis[J]. *Bio Factors*, 2014, 40(3): 295 – 302
- George J, Matucci – Cerinic M, Bar I, *et al.* Circulating autoantibodies to endothelial progenitor cells: binding characteristics and association with risk factors for atherosclerosis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e97836
- Haddad P, Dussault S, Groleau J, *et al.* Nox2 – derived reactive oxygen species contribute to hypercholesterolemia – induced inhibition of neovascularization: effects on endothelial progenitor cells and mature endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 217(2): 340 – 349
- Rauscher FM, Goldschmidt – Clermont PJ, Davis BH, *et al.* Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2003, 108(4): 457 – 463
- Alexandru N, Andrei E, Dragan E, *et al.* Interaction of platelets with endothelial progenitor cells in the experimental atherosclerosis: Role of transplanted endothelial progenitor cells and platelet microparticles[J]. *Biology of the Cell*, 2015, 107(6): 189 – 204

(收稿日期:2015 – 07 – 21)

(修回日期:2015 – 08 – 17)

关于审稿专家、作者提供银行卡号的启事

由于本单位财务管理规定,今后发放稿费、审稿费要通过银行转账,希望审稿专家和发表论文的作者及时登录医学研究杂志网页(www. xyjzz. cn),进入到专家审稿或者作者投稿版块,在个人介绍栏中提供银行卡号(储蓄卡或借记卡)、开户行名称、卡主姓名以及身份证号,以便及时为您发放审稿费或稿费,或者将银行卡信息发送到编辑部邮箱 xyjzz@imicams. ac. cn。联系电话:010 – 52328678(尹老师)。

《医学研究杂志》编辑部