

手术中一种新的细胞治疗方法——内皮祖细胞

李洁 李萍 阎春生 哈小琴

摘要 内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)分离于外周血和骨髓(bone marrow, BM),并在体内被纳入生理和病理的新生血管形成过程。与分化的内皮细胞(endothelial cells, ECs)比较,EPCs 移植通过在缺血器官内原位分化和增殖促进血管的发育。基于 EPCs 在新生血管形成中的闭合功能这一新颖概念,EPCs 的有益特性对细胞治疗以及针对缺血组织再生的细胞介导治疗具有吸引力,本文主要总结了目前关于 EPCs 的研究及其在不同手术中的作用。

关键词 内皮祖细胞 手术 治疗

中图分类号 R616.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.02.002

1963年,首次报道血液中可能存在内皮细胞,而后在心脏移植患者的冠状动脉内壁发现了受体来源的内皮细胞,提示受体血液中的内皮细胞定居于移植体并参与血管壁的构建,再次证明移植体表面存在内皮细胞,而这些内皮细胞只可能来源于血液。1997年,Asahara等^[1]首次证明循环外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞,并称之为血管内皮祖细胞。内皮祖细胞来源于骨髓,它们进入循环血,在血管移植体上分化为内皮细胞^[2]。内皮祖细胞是在缺氧等病理条件下从骨髓中募集的,在缺血组织的新生血管形成中发挥至关重要的作用。目前已经建立了两种主要的 EPCs 亚型:所谓的“早期”EPCs(随后称为早期 EPCs)和后期衍生的 EPCs(晚期 EPCs)^[3]。在体外培养过程中,根据其生物学特性和外观可对其进行分类。“早期”EPCs 出现在外周血来源的单核细胞在内皮细胞特异性培养基中培养后不到1周,而在2~3周后可以发现晚期的 EPCs。晚期 EPCs 被认为主要是通过其分化成成熟内皮细胞的能力直接参与新生血管的形成,而早期 EPCs 将各种血管生成因子表达为内源性货物,以旁分泌的方式促进血管生成,在心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)过程中,各种因素控制 EPCs 向血管形成区域的归巢。

EPCs 在人血液中循环,具有分化为内皮细胞的能力,它们参与血管生成,能够以各种方式将炎症和

缺血/再灌注损伤(I/R)造成的损害降到最低^[4]。例如,EPCs 显示细胞内过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶或锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutases, MnSOD)等抗氧化酶水平升高。抗氧化应激能力的增强使 EPCs 能够在缺血损伤后活性氧(reactive oxygen species, ROS)升高的微环境中发挥作用。EPCs 的数量可能与血管修复有关,循环 EPCs 数量的减少预示着心血管事件的发生。然而,EPCs 的明确定义还没有找到,到目前为止,EPCs 还没有特异性的细胞表面标记或一致的表型,这些细胞在外周血中非常罕见。另外,EPCs 主要受 HIF-1、VEGF、SDF 等多种细胞因子的动员归巢至特定部位并入血管内皮,受多种信号系统的调节进行分化完成血管新生^[5]。各种治疗手段亦会影响血 EPCs 水平的改变。研究不同治疗手段对 EPCs 的影响不仅可以预测患者治疗后的转归而且可以指导制定联合治疗策略,掌握不同治疗手段对 EPCs 的不同影响,有助于权衡联合治疗方案。

一、内皮祖细胞与经皮冠状动脉介入治疗术

EPCs 在心血管系统和经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)术后冠状动脉再狭窄的病理生理学中的作用是有争议的。尽管研究描述了 EPCs 在动脉粥样硬化过程中的保护作用,但在再狭窄中,EPCs、内皮修复和诱导新内膜增殖之间存在复杂的关系,因此,尚不清楚 EPCs 在这种情况下是否具有有益或有害的影响,有研究者为了探究经皮冠状动脉介入治疗支架置入术前循环 EPCs 与冠状动脉再狭窄和不良心血管事件的关系,在 PCI 术前及术后1天取静脉血,通过流式细胞术进行免疫表型分析,总白细胞计数和 EPCs 鉴定^[6]。结

基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目

作者单位:730030 兰州大学公共卫生学院(李洁、李萍、阎春生、哈小琴);730050 兰州,解放军联勤保障部队第940医院(李洁、李萍、哈小琴);730050 兰州,甘肃省干细胞与基因药物重点实验室(李洁、李萍)

通讯作者:哈小琴,博士后,主任医师,电子信箱:haxiaoqin2013@163.com

果表明,基线 EPCs 计数与年龄和冠状动脉疾病的程度呈负相关,与另一项研究结果相似^[7]。

而在这项研究中,约 2/3 的患者 PCI 术后 EPCs 计数下降,且 EPCs 计数与 PCI 术后预后无显著相关性。这与其他研究描述的由于 PCI 导致内皮损伤进而致使 EPCs 动员从而使 EPCs 计数增加有所不同,而对于这些不同的结果,研究者也表明可以通过研究的 EPCs 亚群的差异以及 PCI 引起的血管损伤程度的差异来解释^[7]。EPCs 的研究具有挑战性,目前还没有完全准确定义 EPCs 的标准,所以导致了 EPCs 不同亚群的鉴定。同时,内皮祖细胞的动员和功能受到心血管危险因素、伴随疾病和 PCI 损伤内皮细胞数量的影响,而这些影响又难以控制,因此,需要继续研究,以阐明 EPCs 在 PCI 术后再狭窄和预后中的作用。

二、内皮祖细胞与心脏手术

手术后外周血中 EPCs 的突增可能是多因素的,涉及氧化应激损伤、缺氧和炎性反应,手术后已知的用于募集 EPCs 的化学引诱物如 MIF、CXCL12 和 CXCL8 水平明显增加^[8]。当将这些发现转化回体外实验时,结果表明,在体外测量的生理浓度下,既没有 CXCL12 也没有 CXCL8 介导的 EPCs 迁移效应,使用所描述的 EPCs 分离模型和随后的迁移测定,MIF 被鉴定为 EPCs 迁移的主要介质。在这方面,实验证明 MIF 和 VEGF 对缺氧条件下 EPCs 迁移的影响最大。但是,VEGF 的测量显示 VEGF 在术后的血液浓度中无显著变化,这可能和部分手术中 VEGF 与肝素的结合有关。因此,MIF 可能在心脏手术患者的 EPCs 募集中血管生成趋化因子中起主导作用,并且可能通过将 EPCs 运输到损伤部位来启动并促进心肌缺血再灌注后的愈合过程。MIF 水平在心肌缺血再灌注后立即增加,MIF 介导的对 EPCs 募集的影响是否可能影响心脏重塑和血管生成仍然是推测,这对预防心肌缺血再灌注后的心力衰竭具有重要意义^[9]。

三、内皮祖细胞与减肥手术

尚不清楚在肥胖症中毛细血管密度或循环内皮祖细胞的数量是否减少,或者是否也存在小血管的纤维化。此外,从未评估过减轻重量对这些参数的可能影响。因此,一项研究调查了 25 例严重肥胖患者的 EPCs 和毛细血管密度,均进行了减肥手术,18 例血压正常的强壮(able-bodied)患者和 12 例高血压强壮(able-bodied)患者作为对照。所有患者在减肥手术期间都接受了皮下脂肪活检。在 5 例患者中,在腹部整形术的外科手术期间,约 1 年后持续减轻体重后

获得第 2 次活检。肥胖导致 EPCs 和毛细血管密度降低,体重减轻后 EPCs 显著增加,肥胖患者的血管胶原含量明显增加。在血压正常的肥胖患者和高血压肥胖患者之间没有观察到血管胶原的显著差异。在显著减轻体重后,胶原蛋白含量几乎正常化。在各组之间及减肥前后的应力应变关系均无差异。综上所述,数据表明肥胖导致微血管稀疏,肥胖患者的 EPCs 明显减少。减肥手术引起的显著体重减轻似乎能显著改善 EPCs 的数量,但不能改善毛细血管稀疏,无论血压升高与否,肥胖患者都存在明显的皮下小阻力动脉纤维化,持续的减肥手术可诱导微血管纤维化几近恢复^[10]。

四、内皮祖细胞与骨科手术

一项实验在大鼠股骨截骨模型中评估了局部使用体外扩张 EPCs 对血管生成的刺激和骨折部位骨愈合的促进作用,根据放射学、组织学和显微 CT 结果,EPCs 治疗组与对照组比较,局部 EPCs 治疗可显著促进大鼠股骨节段性骨缺损的骨再生。在一项类似的研究中,同一研究小组报道局部 EPCs 治疗对生物力学稳定性有良好的影响^[11]。有报道表明,外周血来源的 EPCs 有助于体外间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的成骨分化,而 MSCs 支持 EPCs 的增殖^[12]。另外有实验在体外共培养系统中研究了骨髓 EPCs (BM-EPCs)与 MSCs 的相互作用,其数据表明,BM-EPCs 和 MSCs 之间通过旁分泌和直接细胞接触机制发生交联,从而调节血管生成反应^[13]。在大鼠模型研究中,观察到 EPCs 与间充质干细胞之间的协同作用,并认为 EPCs 在新生血管形成的初始阶段对完全骨再生至关重要,而 EPCs 治疗的积极效果也已在韧带组织再生中得到证实^[14]。另有研究探讨了局部移植的人外周血 CD34⁺ 细胞对内侧副韧带损伤愈合的影响,与对照组比较,通过肉眼观察,组织学和生物力学评估显示 CD34⁺ 细胞移植组的韧带愈合显著增强,推测循环人 CD34⁺ 细胞的局部移植可通过新血管形成促进有利环境来增强韧带愈合过程^[15]。基于体外和动物模型 EPCs 研究的良好结果,临床试验开始。作为一项临床试验的试点病例,有研究报道了将自体外周血 CD34⁺ 细胞移植到胫骨骨折不愈合患者体内的结果,骨折经细胞移植治疗 12 周后实现临床及影像学愈合,并且未发生严重的短期并发症^[16]。EPCs 具有向内皮细胞分化、参与新血管构建等独特功能,可塑性强,可为骨和韧带组织工程提供治疗方案。在不久的将来,可能会吸引更多

多的研究者来探索这些细胞在骨科手术中的潜力。

五、内皮祖细胞与腹腔镜手术

癌症的进展在很大程度上依赖于新生血管的形成,循环内皮祖细胞具有体外形成完整血管结构的能力,在肿瘤血管生成中发挥重要作用,手术损伤可导致动物模型中 EPCs 的动员,这可能对癌症患者的预后产生负面影响。有实验研究了 20 例接受开腹手术治疗各种形式的腹部癌症的患者,以及 20 例年龄和性别都与其相匹配的健康对照组^[17]。术前、术后第 1 天和第 2 天分别测定外周血单个核细胞中循环 EPCs 的数量,其定义为 CD34⁺/KDR⁺ 细胞。与基线值比较,手术导致循环 EPCs 水平在第 1 天和第 2 天显著升高,对照组中 EPCs 水平无变化。手术组的变化幅度明显大于对照组。接受非肿瘤性疾病腹腔镜手术的受试者术后 EPCs 水平也有所增加。患者手术组和健康对照组的主要特征为:在年龄、性别分布、体重、血脂和血压等方面比较,差异无统计学意义,而手术干预后癌症患者的白细胞计数、血浆 C 反应蛋白水平明显升高,总、高密度脂蛋白胆固醇、血清甘油三酯下降,EPCs 计数的变化与年龄、体重、血脂参数、血压或术后 C 反应蛋白水平比较差异无统计学意义,手术干预时间是唯一与 EPCs 计数变化有显著直接关系的因素。本研究证明了腹腔镜手术干预后,循环的 CR34⁺/KDW 细胞在腹部肿瘤患者中迅速增加。综上所述,接受选择性腹腔镜手术的癌症患者术后 EPCs 增加,而手术应激诱导的 EPCs 动员对肿瘤和肿瘤转移生长的潜在不良影响需要在未来的研究中加以解决。

六、展 望

介入手术后,EPCs 被动员通过血液循环向受损伤部位和缺血组织聚集从而发挥其生理作用,参与胚胎血管形成、出生后血管形成、血管创伤后血管愈合、缺血性疾病血管再生等。EPCs 的数量反映了修复内皮和血管损伤的内源性能力。另外,EPCs 的数量还与高血压、糖尿病、血脂异常、吸烟、年龄等危险因素呈负相关,与心血管疾病发生率和病死率有关^[18-21]。然而,EPCs 的研究还未完全,有必要进一步研究 EPCs 的不同亚型,并评估其在人类疾病中的功能作用,使其在各类手术中的进一步研究成为可能,为外科医生提供新的治疗方式。

参考文献

1 Asahara T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science(Washington DC),1997,275(5302):964-966

2 Kalender G, Kornberger A, Lisy M, et al. Kinetics of circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing carotid artery surgery [J]. Therapeut Clin Risk Manage, 2016, 12(14):1841-1847

3 Emontzpoehl C, Simons D, Kraemer S, et al. Isolation of endothelial progenitor cells from healthy volunteers and their migratory potential influenced by serum samples after cardiac surgery[J]. J Visual Exp, 2017, 2017(120):55192

4 Rybalko VY, Pham CB, Hsieh PL, et al. Controlled delivery of SDF-1 α and IGF-1: CXCR4⁺ cell recruitment and functional skeletal muscle recovery[J]. Biomater Sci, 2015, 3(11):1475-1486

5 Lan TH, Xu DP, Huang MT, et al. Ginsenoside Rb1 prevents homocysteine-induced EPC dysfunction via VEGF/p38MAPK and SDF-1/CXCR4 activation[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):13061

6 Montenegro FS, Correia M, Muccillo F, et al. Associations between endothelial progenitor cells, clinical characteristics and coronary restenosis in patients undergoing percutaneous coronary artery intervention [J]. BMC Res Notes, 2018, 11(1):278

7 Lin Y, Luo LL, Sun J, et al. Relationship of circulating CXCR4⁺ EPC with prognosis of mild traumatic brain Injury patients[J]. Aging Dis, 2017, 8(1):115-127

8 Ep VDV, Döring Y, Weber C. MIF and CXCL12 in cardiovascular diseases: functional differences and similarities[J]. Front Immunol, 2015, 6:373

9 Atesok K, Li R, Schemitsch E. Endothelial progenitor cells: a novel cell-based therapy in orthopaedic surgery[J]. J Am Acad Orthopaed Surg, 2012, 20(10):672-674

10 Richards WO, Prutzman KB, O'Hea Martha F, et al. Bariatric surgery improves the circulating numbers and biological activity of late outgrowth endothelial progenitor cells[J]. Surg Obesity Relat Dis, 2014, 10(5):906-913

11 Li R, Atesok K, Nauth A, et al. Endothelial progenitor cells for fracture healing: a microcomputed tomography and biomechanical analysis [J]. J Orthopaed Trauma, 2011, 25(8):467-471

12 Liang Y, Wen L, Shang F, et al. Endothelial progenitors enhanced the osteogenic capacities of mesenchymal stem cells in vitro and in a rat alveolar bone defect model[J]. Arch Oral Biol, 2016, 68:123-130

13 Zhang M, Ahn W, Kim S, et al. Endothelial precursor cells stimulate pericyte-like coverage of bone marrow derived mesenchymal stem cells through PDGF-BB induction, which is enhanced by substance-P[J]. Microcirculation, 2017, 24(8):e12394

14 He X, Dziak R, Yuan X, et al. BMP2 genetically engineered MSCs and EPCs promote vascularized bone regeneration in rat critical-sized calvarial bone defects[J]. PLoS One, 2013, 8(4):e60473

15 Jiang D, Yang S, Gao P, et al. Combined effect of ligament stem cells and umbilical-cord-blood-derived CD34⁺ cells on ligament healing[J]. Cell Tissue Res, 2015, 362(3):587-595

16 Kawakami Y, Matsumoto T, Mifune Y, et al. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in the field of orthopaedics[J]. Cur Stem Cell Res Ther, 2017, 12(1):3-13

后更差,而在本研究中,IMN + RTI 组的患者临床病理表现更重,与 PLA2R - Ab 效价相一致;以上均提示,即便在 IMN 合并的这两种病理损害患者中,PLA2R - Ab 效价依然可以对疾病表现有一定的预测作用。而其他几组的 PLA2R 抗体效价和单纯 IMN 组比较,差异无统计学意义。

本研究存在一定的局限性,如为单中心横断面研究,缺乏预后的研究资料,为了更深入了解 IMN 合并肾脏病理损害患者的临床及病理特征,还需大样本、多中心、前瞻性研究来探索 IMN 合并肾脏病理损害患者的自然变化规律;此外,IMN 合并其他肾脏病理损害的具体病理生理机制目前并不完全清楚,需要进一步研究。

综上所述,多数 IMN 合并肾脏病理损害患者疾病更严重,针对合并的不同肾脏病理损害类型进行分析,可以帮助更深层次的理解疾病,并对治疗提供更多参考。

参考文献

- 1 Ng JK, Ma TK, Lai FM, *et al.* Causes of nephrotic syndrome and nephrotic - range proteinuria are different in adult Chinese patients: a single centre study over 33 years [J]. *Nephrology*, 2018, 23 (6): 565 - 572
- 2 Couser WG. Primary membranous nephropathy [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12 (6): 983 - 997
- 3 Taguchi T, Oyamada M, Harada T. Pathology of membranous nephropathy [J]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*, 2011, 53 (5): 684 - 691
- 4 郭艳红, 郑丹侠, 王悦. 年轻人膜性肾病的临床病理特点及治疗效果 [J]. *中国血液净化*, 2017, 16 (4): 242 - 246, 272
- 5 Xu X, Wang G, Chen N, *et al.* Long - term exposure to air pollution and increased risk of membranous nephropathy in China [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27 (12): 3739 - 3746
- 6 Radhakrishnan J, Cattran DC. The KDIGO practice guideline on glomerulonephritis: reading between the (guide) lines - application to the individual patient [J]. *Kidney Int*, 2012, 82 (8): 840 - 856
- 7 Chen Y, Tang L, Feng Z, *et al.* Pathological predictors of renal out-

- comes in nephrotic idiopathic membranous nephropathy with decreased renal function [J]. *Nephrol*, 2014, 27 (3): 307 - 316
- 8 秦美君, 李虎才, 王立新. 特发性膜性肾病肾小管间质损伤与临床病理相关性研究 [J]. *医学研究杂志*, 2018, 47 (6): 63 - 68
- 9 Kramer AB, Van Timmeren MM, Schuur TA, *et al.* Reduction of proteinuria in adriamycin - induced nephropathy is associated with reduction of renal injury molecule (Kim - 1) over time [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296 (5): 1136 - 1145
- 10 Truong LD, Farhood LD, Tasby A, *et al.* Experimental chronic renal ischemia: morphologic and immunologic studies [J]. *Kidney Int*, 1992, 41 (6): 1676 - 1689
- 11 王梅, 王海燕. 缺血性肾病发病机制和预后 [J]. *中国实用内科杂志*, 2005, 25 (10): 865 - 866
- 12 Rodrigues JC, Haas M, Reich HN. IgA nephropathy [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12 (4): 677 - 686
- 13 Strippoli GF, Maione A, Schena FP, *et al.* IgA nephropathy: a disease in search of a large - scale clinical trial to reliably inform practice [J]. *Am J Kidney Dis*, 2009, 53 (1): 5 - 8
- 14 林新春, 张颖, 胡瑞敏, 等. 膜性肾病伴 IgA 肾病的临床病理特征及预后分析 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2017, 7: 660 - 664
- 15 王素霞, 邹万忠, 杨莉, 等. 膜性肾病合并 IgA 肾病的临床病理特点 [J]. *中华病理学杂志*, 2007, 36 (3): 171 - 174
- 16 刘子琪, 刘爱萍, 王培玉. 中国糖尿病患病率的流行病学调查研究状况 [J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2015, (7): 547 - 550
- 17 吴淋淋, 刘树军, 张金勇, 等. 2 型糖尿病合并非糖尿病肾病的临床及病理分析 [J]. *中国实验诊断学*, 2016, 20 (9): 1543 - 1545
- 18 Soleymanian T, Hamid G, Arefi M, *et al.* Non - diabetic renal disease with or without diabetic nephropathy in type 2 diabetes: clinical predictors and outcome [J]. *Ren Fail*, 2015, 37 (4): 572 - 575
- 19 崔英春, 王杨威, 王永刚, 等. 2 型糖尿病合并特发性膜性肾病临床及病理分析 [J]. *中国实验诊断学*, 2018, 22 (6): 1026 - 1028
- 20 Saif A, Soliman NA, Abdel - Hameed A. Early evaluation of renal hemodynamic alterations in type I diabetes mellitus with duplex ultrasound [J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2010, 21 (2): 295 - 299

(收稿日期: 2019 - 04 - 23)

(修回日期: 2019 - 06 - 24)

(上接第 8 页)

- 17 Acker SN, Seedorf GJ, Abman SH, *et al.* Abnormal pulmonary artery endothelial - smooth muscle cell interactions in experimental congenital diaphragmatic hernia (CDH) [J]. *Pediatr Rese*, 2015, 186 (3): S73
- 18 Ambasta RK, Kohli H, Kumar P. Multiple therapeutic effect of endothelial progenitor cell regulated by drugs in diabetes and diabetes related disorder [J]. *J Translat Med*, 2017, 15 (1): 185
- 19 Wils J, Favre J, Bellien J. Modulating putative endothelial progenitor cells for the treatment of endothelial dysfunction and cardiovascular

- complications in diabetes [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 170: 98 - 115
- 20 Shi Z, Chen Y, Cao J, *et al.* Intratracheal transplantation of endothelial progenitor cells attenuates smoking - induced COPD in mice [J]. *Int J Chronic Obstruct Pulmonary Dis*, 2017, 12: 947 - 960
- 21 Altabas V, Altabas K, Kirigin L. Endothelial progenitor cells (EPCs) in ageing and age - related diseases: how currently available treatment modalities affect EPC biology, atherosclerosis, and cardiovascular outcomes [J]. *Mechani Ageing Deve*, 2016, 159: 49 - 62

(收稿日期: 2019 - 04 - 30)
(修回日期: 2019 - 05 - 06)