

内皮祖细胞(EPCs)在心脏移植血管病变(CAV)中的研究进展

胡 馗^{1,2}(综述) 洪 涛^{1,2,3Δ}(审校)

(¹ 复旦大学附属中山医院心外科 上海 200032; ²上海市心血管病研究所 上海 200032;

³上海市器官移植重点实验室 上海 200032)

【摘要】 内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是一类能分化为成熟内皮细胞(endothelial cells, ECs)的内皮前体细胞,具有促进损伤血管修复和新生血管形成的特点。研究发现 EPCs 在心脏移植血管病变(cardiac allograft vasculopathy, CAV)的发生和发展中起着重要作用,移植后供心血管内皮损伤可以触发 EPCs 的修复过程。本文综述了移植血管病变的发生发展过程中 EPCs 的归巢和分化,探讨了 EPCs 对 CAV 的预测、诊断和治疗价值。

【关键词】 心脏移植血管病变(CAV); 内皮祖细胞(EPCs); 归巢; 分化; 预测; 治疗

【中图分类号】 R 392 **【文献标志码】** B **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2013.04.023

Progress on the research of endothelial progenitor cells (EPCs) in cardiac allograft vasculopathy (CAV)

HU Kui^{1,2}, HONG Tao^{1,2,3Δ}

(¹ Department of Cardiovascular Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

² Shanghai Institute of Cardiovascular Disease, Shanghai 200032, China;

³ Shanghai Key Laboratory of Organ Transplantation, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Endothelial progenitor cells (EPCs) have the ability to differentiate into mature endothelial cells (ECs). They can facilitate the repair of damaged blood vessels or augment development of new vessels. Recent data indicate that EPCs play a significant role in the occurrence and development of cardiac allograft vasculopathy (CAV). The injury of endothelium of donor heart post-transplantation triggers the process of neoendothelialization. This paper reviews homing and differentiation of EPCs in the occurrence and development of allograft vasculopathy, and explore the prediction, diagnosis and therapeutic value of EPCs on CAV.

【Key words】 cardiac allograft vasculopathy (CAV); endothelial progenitor cells (EPCs); homing; differentiation; diagnosis; treatment

心脏移植血管病变(cardiac allograft vasculopathy, CAV)是影响心脏移植患者长期生存

的主要原因。据报道 CAV 是移植后 1~3 年死亡的首位原因,3 年内死亡率达 17%^[1],移植后第 1、

ΔCorresponding author E-mail: Hong.tao@zs-hospital.sh.cn

5、10年CAV的检出率分别为7.1%、31.5%、52.7%^[2]。内皮损伤是CAV发生和发展的重要环节,内皮损伤后,内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)会归巢到损伤部位,分化为成熟内皮细胞,同时通过旁分泌等作用对损伤内皮进行修复,以恢复内皮结构和功能的完整性。EPCs对损伤内皮的修复作用有望作为新的预防和治疗CAV的靶点。

内皮损伤与修复在CAV的发生发展中的作用

内皮损伤与CAV 内皮结构和功能的完整是血管内皮功能正常的基础。移植后的细胞和体液免疫、高脂血症、巨细胞病毒感染、心脏停搏液、冷缺血、保存液、免疫抑制药物的使用等因素共同作用引起冠脉内皮细胞的激活;其次,抗体和补体介导的直接损伤和细胞毒性T细胞介导的内皮细胞凋亡亦可导致内皮损伤。当内皮的损伤程度和持续时间达到一定程度以后,血管壁的自我调节能力遭到破坏并向纤维化增生重构发展,而血管的纤维化重构又反过来影响血管壁的自我调节能力,形成恶性循环,最终导致CAV的发生、发展而出现临床症状^[3]。

移植内皮损伤后的再生与替代 移植后血管内皮的损伤启动祖细胞对内皮的修复。最近的研究认为损伤或坏死的供心血管内皮细胞由受体来源的祖细胞修复并形成新内皮^[4]。Hu等^[5]的动物实验显示因凋亡或坏死而全部消失的移植内皮细胞完全由受体来源的祖/干细胞代替并形成完整的新内皮。内皮损伤后的祖细胞替代现象在人体同样存在,替代由循环祖细胞完成^[6]。Simper等^[7]的研究表明,在性别不匹配的移植患者供心的大血管和心外膜病变的小血管中同样观察到受体来源的祖细胞的定植。Similarly等^[6]发现在移植早期就可以观察到人体心脏移植物的内皮细胞部分地被受体来源的祖/干细胞所替代,可能与供心切取和移植过程中的损伤有关。

EPCs的鉴定及其在CAV过程中的归巢与分化

EPCs来源和鉴定 EPCs主要存在于骨髓、外周血和脐带血,少量存在于心脏、血管壁、骨骼肌和脂肪组织,骨髓中含有的大量造血干细胞和间充质干细胞等可分化为EPCs。另外肝脏、脾脏和肾脏也含有少量EPCs^[8]。最近的研究发现,EPCs来源于胚胎时期的卵黄囊和尿囊,而不是来源于胚体^[9]。自1997年第一次从外周血分离出EPCs以来,关于EPCs的研究很多,由于没有确切的标记,至今没有统一的鉴定EPCs的方法。目前常用的表面抗原标志有

CD133、CD34、CD14、CD45、CD31、CD146、VEGFR-2、FGFR-1和vWF等,研究者多利用几个抗原标志组合作为确定EPCs的标志^[10]。由于研究者所选取的EPCs鉴定标志不尽相同,使得EPCs相关报道的结论之间存在差异。

EPCs的归巢 EPCs的归巢与多种细胞因子和趋化因子有关。这里只讨论移植血管病变过程中EPCs的归巢。EPCs的归巢主要由被激活的移植血管内皮细胞表面的黏附分子与EPCs表面相应的黏附分子受体相互作用而完成。移植早期对供体血管内皮细胞的免疫反应引起内皮的激活和损伤,炎性细胞激活而释放细胞因子和趋化因子,细胞因子和黏附分子为祖细胞向移植血管壁的动态迁移提供信号。Sakihama等^[11]用小鼠主动脉移植模型证实SDF-1是祖细胞归巢的关键分子,在移植血管病变的过程中,移植内部的SDF-1上调,SDF-1的受体CXCR4在干/祖细胞表达增加,CXCR4阳性的干/祖细胞穿过微血管外膜进入内膜腔面。Satoh等^[12]发现他汀类药物通过抑制SDF-1/CXCR4和ICAM-1/CD18途径减少骨髓来源的EPCs的动员及归巢。敲除细胞内黏附分子1或者血管细胞黏附分子1基因可以减少移植血管新生内皮的损害^[13]。推测黏附分子的高表达与EPCs的归巢有关。

EPCs的分化 一般认为,EPCs的分化至少需要两个条件:(1)黏附分子/整合素家族成员间的相互作用;(2)生长因子和切应力。激活的内皮表达的黏附分子和祖细胞的细胞膜上表达的整合素共同作用引导祖细胞归巢并诱导其分化。移植后各种损伤造成内皮和血小板激活,释放的生长因子增加。VEGF激活其下游的基质金属蛋白酶9,强有力地动员EPCs并促进其向损伤部位归巢、增殖和分化。VEGF不仅促进EPCs向损伤的内皮归巢而且刺激CD34⁺祖细胞分化为内皮细胞^[14]。Sca-1⁺祖细胞分化为内皮细胞必须有IV胶原和凝集素的相互作用以及VEGF的刺激^[15]。切应力诱导干/祖细胞分化涉及几个信号启动子和传导子,这一过程需要组蛋白脱乙酰基酶的激活^[16]。切应力快速激活祖细胞的VEGFR/Akt/eNOS通路,使NO合成增加,促进EPCs分化为成熟内皮细胞;HDAC3的磷酸化还可以使转录因子HoxA9表达增加,促进eNOS的合成。抑制HDACs可以减少转录因子HoxA9的表达,减少不同来源的祖细胞分化为内皮细胞的数量^[17]。切应力促进

EPCs 分化成熟的机制是通过激活 Sp1 而提高 EPCs ephrinB2 的表达,从而诱导 EPCs 分化为动脉内皮细胞^[18]。

EPCs 对 CAV 的预测、诊断和治疗价值

EPCs 对 CAV 预测和诊断价值 CAV 的早期诊断比较困难,目前把血管内超声作为诊断的金标准,但是由于其有创性、技术难度大和价格昂贵,普及有一定困难,很多机构仍用冠脉造影来检测 CAV。目前没有研究直接表明 EPCs 对 CAV 具有预测和诊断价值,但是有研究提示外周血中 EPCs 的数量与移植动脉内膜损伤的修复密切相关。可能成为移植血管病变的发病指标和干预靶点^[19]。Simper 等^[20]发现 CAV 的患者循环内的 EPCs 严重减少而受体来源的内皮细胞大量出现在供心的冠状动脉上。Sathya 等^[21]研究发现,移植后 EPCs 的功能监测能可靠地识别移植后免疫排斥的风险,以便于及时调整免疫抑制剂的使用;改善 EPCs 的寿命和功能可能有助于预防 CAV 的发生。Osto 等^[22]以冠状动脉血流速率 <2 作为诊断微血管病变的标准,发现移植后出现微血管病变的患者循环血中和移植血管内皮上 EPCs 的数量减少。Salama 等^[23]的研究发现,CAV 患者循环内的 CD14⁺ 单核细胞数量增加并与 CAV 的发展有关。但也有研究发现循环内 EPCs 的减少与供体年龄和 CAV 的发生没有关系^[24];CAV 患者 EPCs 的数量没有变化,而血浆 CXCL12 水平和循环平滑肌祖细胞的数量增加^[25]。随着研究的深入,EPCs 在 CAV 的早期发现和诊断方面可能会发挥一定的作用。

EPCs 对 CAV 治疗的前景 EPCs 移植在动物实验及前期临床实验已广泛开展并且取得了较为满意的结果。Werner 等^[26]将 C57bl/6 小鼠脾脏来源的 EPCs 和单核细胞通过静脉输注到颈动脉内皮损伤的小鼠体内,发现再内皮化显著加快,同时新生内膜的形成明显受到抑制。Zhao 等^[27]的实验也证实,自体来源的 EPCs 移植可以促进内皮剥脱的血管再内皮化,减少新生内膜的形成。EPCs 可能通过旁分泌等作用加速内皮化,改善血管内皮功能^[28];而过表达 eNOS 的 EPCs 促进损伤血管再内皮化和抑制血栓形成的作用增强^[29]。早期和晚期 EPCs 在促进新生血管形成过程中的作用不同,混合移植后会通过细胞因子和金属蛋白酶产生协同作用^[30]。Kawamoto 等^[31]用猪的慢性心肌缺血模型证实移植自体来源的 EPCs 可以缓解慢性心肌缺血,促进缺血区域血管再生,改善左室功能。Assmus 等^[32]用自体骨髓来源的单核

细胞或 EPCs 经冠脉注入急性心梗患者,随访 4 月后发现心肌功能显著改善。EPCs 移植在改善心功能、增加左室射血分数、降低左室收缩末内径、缩小梗死范围、改善左室运动功能等方面都具有积极作用,而且无炎症反应、栓塞、心律失常、死亡等严重并发症^[33]。大量的研究已经证实了 EPCs 移植的可行性,EPCs 修复损伤内皮、保护内皮功能的特性在 CAV 的发生发展中将起到积极的保护作用;EPCs 移植可能会成为预防和治疗 CAV 的新的手段。

结语 CAV 是影响心脏移植患者长期生存的最主要因素,但是目前其发病机制并不清楚,早期发现和预防手段也较为有限。移植血管内皮损伤是 CAV 的发生发展的重要环节,内皮细胞损伤以后各种细胞和体液因子启动 EPCs 对损伤内皮的修复,以恢复血管内皮结构和功能的完整性。但是 EPCs 在整个 CAV 过程中的归巢、分化等机制并不清楚,如果能探明这些机制,必将为 CAV 的早期诊断、预防和治疗提供新的手段。另一方面,EPCs 移植在促进损伤血管再内皮化、改善缺血组织血供等方面具有一定效果。这给我们通过 EPCs 移植治疗 CAV 提供了参考和依据,EPCs 移植有望成为新的预防和治疗 CAV 的手段。但是,目前 EPCs 移植治疗 CAV 的研究仍存在着一些问题:(1)EPCs 的表型尚未确定,缺乏确切统一的鉴定 EPCs 的方法;(2)EPCs 的数量有限,扩增和培养困难;(3)细胞移植的安全性有待进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Taylor DO, Edwards LB, Aurora P, *et al.* Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult heart transplant report-2008[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2008, 27(9): 943-956.
- [2] Taylor DO, Stehlik J, Edwards L B, *et al.* Registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-sixth official adult heart transplant report-2009[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2009, 28(10): 1007-1022.
- [3] Hu Y, Davison F, Zhang Z, *et al.* Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells [J]. *Circulation*, 2003, 108(25): 3122-3127.
- [4] Hillebrands JL, Klatter FA, Rozing J. Origin of vascular smooth muscle cells and the role of circulating stem cells in transplant arteriosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(3): 380-387.
- [5] Hu Y, Davison F, Zhang Z, *et al.* Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells [J].

- Circulation*,2003,108(25):3122—3127.
- [6] Minami E, Laflamme MA, Saffitz JE, *et al.* Extracardiac progenitor cells repopulate most major cell types in the transplanted human heart[J]. *Circulation*,2005,112(19): 2951—2958.
 - [7] Simper D, Wang S, Deb A, *et al.* Endothelial progenitor cells are decreased in blood of cardiac allograft patients with vasculopathy and endothelial cells of noncardiac origin are enriched in transplant atherosclerosis [J]. *Circulation*,2003,108(2):143—149.
 - [8] Sirker AA, Astroulakis ZM, Hill JM. Vascular progenitor cells and translational research: the role of endothelial and smooth muscle progenitor cells in endogenous arterial remodelling in the adult[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2009, 116 (4):283—299.
 - [9] Pardanaud L, Eichmann A. Extraembryonic origin of circulating endothelial cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (10):e25889.
 - [10] Timmermans F, Plum J, Yoder M C, *et al.* Endothelial progenitor cells: identity defined? [J]. *J Cell Mol Med*, 2009,13(1):87—102.
 - [11] Gao C, Li Y. SDF-1 plays a key role in the repairing and remodeling process on rat allo-orthotopic abdominal aorta grafts[J]. *Transplant Proc*,2007,39(1):268—272.
 - [12] Satoh K, Fukumoto Y, Nakano M, *et al.* Statin ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension associated with down-regulated stromal cell-derived factor-1 [J]. *Cardiovasc Res*,2009,81(1):226—234.
 - [13] Dietrich H, Hu Y, Zou Y, *et al.* Mouse model of transplant arteriosclerosis: role of intercellular adhesion molecule-1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20 (2): 343—352.
 - [14] Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, *et al.* Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo [J]. *J Exp Med*,2006,203(5):1221—1233.
 - [15] Xiao Q, Zeng L, Zhang Z, *et al.* Stem cell-derived Sca-1+ progenitors differentiate into smooth muscle cells, which is mediated by collagen IV-integrin alpha1/beta1/alphaV and PDGF receptor pathways[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007,292(1):C342—C352.
 - [16] Zeng L, Xiao Q, Margariti A, *et al.* HDAC3 is crucial in shear-and VEGF-induced stem cell differentiation toward endothelial cells [J]. *J Cell Biol*, 2006, 174 (7): 1059—1069.
 - [17] Rossig L, Urbich C, Bruhl T, *et al.* Histone deacetylase activity is essential for the expression of HoxA9 and for endothelial commitment of progenitor cells [J]. *J Exp Med*,2005,201(11):1825—1835.
 - [18] Obi S, Yamamoto K, Shimizu N, *et al.* Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells[J]. *J Appl Physiol*,2009,106(1):203—211.
 - [19] 杨兆华,洪涛,朱仕杰,等.腹主动脉移植后小鼠外周血内皮祖细胞数量的动态变化及意义[J]. *中华器官移植杂志*,2011,32(4):231—234.
 - [20] Simper D, Wang S, Deb A, *et al.* Endothelial progenitor cells are decreased in blood of cardiac allograft patients with vasculopathy and endothelial cells of noncardiac origin are enriched in transplant atherosclerosis [J]. *Circulation*,2003,108(2):143—149.
 - [21] Sathya CJ, Sheshgiri R, Prodger J, *et al.* Correlation between circulating endothelial progenitor cell function and allograft rejection in heart transplant patients[J]. *Transpl Int*,2010,23(6):641—648.
 - [22] Osto E, Castellani C, Fadini GP, *et al.* Impaired endothelial progenitor cell recruitment may contribute to heart transplant microvasculopathy [J]. *J Heart Lung Transplant*,2011,30(1):70—76.
 - [23] Salama M, Andrukhova O, Roedler S, *et al.* Association of CD14+ monocyte-derived progenitor cells with cardiac allograft vasculopathy [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011,142(5):1246—1253.
 - [24] Wei H, Mao Q, Liu L, *et al.* Circulating endothelial progenitor cell numbers are not associated with donor organ age or allograft vasculopathy in cardiac transplant recipients[J]. *J Neurosci Res*,2011,89(11):1822—1828.
 - [25] Schober A, Hristov M, Kofler S, *et al.* CD34+CD140b+ cells and circulating CXCL12 correlate with the angiographically assessed severity of cardiac allograft vasculopathy[J]. *Eur Heart J*,2011,32(4):476—484.
 - [26] Werner N, Junk S, Laufs U, *et al.* Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury[J]. *Circulation*,2003,108S(17):26.
 - [27] Zhao XH, Huang L, Yin YG, *et al.* Autologous endothelial progenitor cells transplantation promoting endothelial recovery in mice[J]. *Transpl Int*,2007,20(8):712—721.
 - [28] He TR, Smith LA, Harrington S, *et al.* Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries [J]. *Stroke*, 2004,35(10):2378—2384.
 - [29] Kong D, Melo LG, Mangi AA, *et al.* Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells [J]. *Circulation*, 2004, 109 (14):1769—1775.
 - [30] Yoon CH, Hur J, Park KW, *et al.* Synergistic Neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells—The role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases[J]. *Circulation*, 2005, 112 (11): 1618—1627.
 - [31] Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, *et al.* Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2003, 107 (3): 461—468.
 - [32] Assmus B, Schachinger V, Teupe C, *et al.* Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI) [J]. *Circulation*, 2002,106(24):3009—3017.
 - [33] Young PP, Vaughan DE, Hatzopoulos AK. Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy [J]. *Prog Cardiovasc Dis*,2007, 49(6):421—429.