

# 基因修饰内皮祖细胞在动脉粥样硬化中的应用

陈晓东 陈庆伟

**【摘要】** 内皮祖细胞是能分化为内皮细胞的前体细胞,动物及临床试验证实移植内皮祖细胞有益于治疗动脉粥样硬化。在病理状态下内皮祖细胞的功能受损,限制了其应用。通过基因修饰技术可以改善 EPCs 的功能并提高其移植效率,为动脉粥样硬化性疾病的细胞疗法提供了新的治疗策略。

**【关键词】** 内皮祖细胞;基因修饰;移植;动脉粥样硬化

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2012.04.007

## 1 EPCs 的定义及其动员、归巢过程

内皮祖细胞(EPCs)在缺血及细胞因子等的诱导下可以动员、归巢于动脉病变部位,转变为内皮细胞,从而实现病变处的再内皮化,促进血管新生。目前,EPCs 的准确表型以及通用的细胞分离程序都存在争议。研究 EPCs 的主要方法是流式细胞计数法和细胞培养。EPCs 通过流式细胞计数通常需要表达至少 1 个干细胞标志和 1 个内皮细胞标志。EPCs 最初被定义为 CD34<sup>+</sup> 及激酶插入区受体(KDR<sup>+</sup>)双阳性的细胞,后来增加 CD133 作为进一步的表面标志来鉴定 EPCs。CD133 是比 CD34 更不成熟的干细胞细胞表达,通常 CD34、KDR 及 CD133 三重阳性的细胞很稀少甚至很难被检测到,研究发现,三重阳性的细胞近似于造血祖细胞而不是 EPCs<sup>[1]</sup>。其他内皮抗原如 CD31 及血管性血友病因子(vWF)也被用于鉴定 EPCs。然而增加更多表面抗原会导致筛选出更少数量的合格细胞,并增加了方法的差异性。可靠的选择是 CD34<sup>+</sup>、KDR<sup>+</sup> 细胞,它符合最简单的 EPC 定义,能独立预测心血管事件。

在许多研究中 EPCs 是通过细胞培养进行分离。将未分类的外周血单个核细胞(MNCs)培养于纤维连接蛋白覆盖的平板上,置于添加如氢化可的松、基础纤维母细胞生长因子、胰岛素样生长因子和血管内皮生长因子的内皮培养基中。经过 2~4 d,细胞变成纺锤形并形成簇,能摄取乙酰化低密度脂蛋白,连接加纳籽凝集素-1(BS-1),表达内皮标

志如 CD31/vWF 或者酪氨酸激酶受体-2(Tie-2)。后来的研究方法添加一个预种植步骤,丢弃了被推定为间质来源的早期黏附细胞后,再重新培养于纤维连接蛋白覆盖平板,从而生长出被纺锤形细胞环绕的圆形细胞簇,这种细胞被命名为集落形成单位内皮细胞(CFU-EC)。研究显示,它可能是造血来源细胞表达全白细胞抗体 CD45,单核/巨噬细胞抗体 CD14 和 CD115,这些细胞增殖能力很差,在体内并不能生成血管<sup>[2]</sup>。通过长时间持续培养生成晚期 EPCs 或内皮集落形成细胞(ECFC),它具有很高的增殖能力,在体内融入灌注血管,被认为可能是真正的 EPCs。

EPCs 从骨髓中动员而输出具有非常精细的调节机制。缺血、缺氧是 EPCs 从骨髓释放的最强刺激与触发器。低氧导致缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )的稳定转录,触发基质细胞衍生因子-1(SDF-1)在缺血组织的表达。SDF-1 增强 EPCs 的黏附、迁移并归巢于缺血部位。HIF-1 $\alpha$  诱导 VEGF 表达从而激活骨髓间质细胞的内皮型一氧化氮合酶(eNOS)。一氧化氮(NO)诱导基质金属蛋白酶-9 表达,它分裂并释放可溶性的干细胞因子,从而加强血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR2<sup>+</sup>)的 EPCs 动员至外周循环中<sup>[3]</sup>。雌激素、促红细胞生成素、他汀类药物及体育锻炼都是通过 NO 途径而增加 EPCs 的动员。EPCs 募集于新生血管部位与炎症反应过程类似,在受损血管附近,EPCs 与受损内皮单层相互作用。黏附分子被认为是 EPCs 归巢的关键调节器,P-选择素和 E-选择素介导了这一过程的最初步骤。EPCs 的侵袭力决定了它能否迁移进入受损组织完成修复功能,组织蛋白酶 L 和基质

金属酶 2 与此侵袭力有关<sup>[4]</sup>。

## 2 EPCs 应用于动脉粥样硬化的研究及其局限

### 2.1 EPCs 移植应用于动脉粥样硬化的研究

循环 EPCs 的减少会在动脉粥样硬化性疾病早期导致内皮功能紊乱,在晚期则因妨碍侧支循环形成而导致明显临床症状。Werner 等<sup>[5]</sup>的一项前瞻性临床研究发现,循环 CD34<sup>+</sup>、KDR<sup>+</sup> 的 EPCs 的水平与心血管事件及死亡率呈负相关,反映了 EPCs 的保护作用。采用输入或增加动员的方法,增加循环中 EPCs 能促进内皮层的恢复和完整,抑制新内膜形成,增加缺血部位的血流。有研究使用年轻载脂蛋白 E(ApoE)基因剔除的大鼠骨髓来源的 EPC 移植入老年大鼠,可防止持续高脂血症导致动脉粥样硬化的进展。Wassmann 等<sup>[6]</sup>使用脾脏来源的 MNCs 改善了动脉粥样硬化大鼠的内皮依赖舒张功能。Schächinger 等<sup>[7]</sup>的研究中,20 例急性心肌梗死患者随机冠状动脉输注非体内扩增骨髓 MNCs 或源自外周血 MNCs 培养的 EPCs。4 个月后随访发现,左室射血分数和梗死区域的室壁运动明显增加,心脏形态、冠状动脉血流储备和损伤区域心肌活力改善,收缩末期直径减小。1 年后治疗组左室功能持续改善,收缩末容量及心肌功能障碍区域缩小。BOOST 试验<sup>[8]</sup>中 60 例心肌梗死患者接受经皮冠状动脉介入术(PCI)治疗时输注骨髓细胞,在自体骨髓 MNCs 输注后 6 个月,患者的左室射血分数及梗死边界区域收缩期室壁运动增加。上述这些动物及临床试验显示了 EPC 移植用于动脉粥样硬化的益处。

### 2.2 单纯 EPCs 移植的局限

尽管 EPCs 移植治疗已经做了相当多的研究,但其临床应用仍受到限制。经外周或骨髓采集的细胞数量不能满足治疗需要,体外扩增数量仍然有限。此外,疾病的状态可以影响 EPCs 的功能。2 型糖尿病患者 EPCs 黏附功能损害,成血管能力下降<sup>[9]</sup>,相似的功能改变也出现在老龄者及患有冠状动脉疾病或缺血性心肌病的患者中<sup>[10]</sup>,导致这些患者 EPCs 移植效果不佳。另外,高血压、高脂血症和同型半胱氨酸血症等各种病理状态均可造成 EPCs 功能损害。

## 3 基因修饰 EPCs 的应用

近年来使用基因修饰 EPCs,通过增强其增殖能力、存活时间以及归巢、分化能力,使之能克服单独细胞移植的局限。

### 3.1 端粒酶逆转录酶基因

作为调节细胞生命周期的分子,端粒酶的活性因端粒酶逆转录酶(TERT)基因转入修饰得到增强。Murasawa 等<sup>[11]</sup>研究发现,伴随着 TERT 基因的转导 EPCs 出现高端粒酶活性,有丝分裂能力超过对照组,细胞凋亡减少。VEGF 诱导 EPCs 的迁移能力也通过 TERT 的高表达而显著地增强。30 d 内就可见到完全分化的内皮细胞集落,而对照组没有检测到集落。在异体 EPCs 移植体内试验中,TERT 高表达 EPCs 改善了肢体中的血管再生,通过激光多普勒及毛细血管密度的检测可观察到肢体灌注比对照组增加了 4 倍。说明这种通过 TERT 转导而增强 EPCs 的再生能力将有潜力用于治疗缺血性疾病。

### 3.2 VEGF 基因

VEGF 是目前发现最强效的促血管生成因子和调控干细胞向内皮分化的细胞因子,而 VEGF165 是其中的主要表型。Meng 等<sup>[12]</sup>使用腺病毒-VEGF165 转染 EPCs 移植用于慢性静脉血栓形成疾病的治疗,加速了静脉血栓的再通。Iwaguro 等<sup>[13]</sup>研究发现,在肢体缺血动物模型移植 VEGF165 基因修饰的 EPCs 能挽救血管新生,恢复血流,仅需 EPCs 数量的 1/30 即能达到相同效果。推测 VEGF 转染后移植到体内一方面可以改善 EPCs 的功能,另一方面也可以通过分泌蛋白发挥其促血管生成的作用。

### 3.3 内皮型一氧化氮合酶基因

研究显示他汀类、雌激素、红细胞生成素通过上调内皮型一氧化氮合酶(eNOS)能增强 EPCs 的再内皮化能力;而氧化低密度脂蛋白或 C 反应蛋白会通过减少 EPCs 的 eNOS 表达而减弱 EPCs 的存活、分化及功能。eNOS 激活缺陷将影响 EPCs 参与的内皮修复。Cui 等<sup>[14]</sup>使用 eNOS 基因转导的 EPC 应用于球囊损伤的大鼠,发现过量表达 eNOS 的 EPC 能阻止内膜增生、修复受损血管并恢复血管功能。Kaur 等<sup>[15]</sup>将含有人类全长 eNOS 基因,采用脂质体转染质粒 pcDNA3 转染 EPCs,转染后 EPCs 的迁移、分化能力都增强。eNOS 基因转染可以扩大 EPCs 的血管生成特性,比单用 EPCs 在其临床使用方面的有显著优势。

### 3.4 HIF-1 $\alpha$ 基因

HIF-1 $\alpha$  是氧依赖性血管生成基因调控的关键因子。EPCs 表达 CXCR4 家族趋化因子受体 4(CXCR4),靶组织表达 SDF-1 及血管生成因子如

VEGF 表达均受 HIF-1 $\alpha$  调节。Jiang 等<sup>[16]</sup>应用 HIF-1 $\alpha$  修饰 EPCs,结果显示腺病毒介导的 HIF-1 $\alpha$  改造以后 EPCs 较单纯 EPCs 移植有更强的血管修复作用,HIF-1 $\alpha$  的过度表达进一步促进了低氧诱导 EPC 分化、增殖和迁移。

### 3.5 对氧磷酶 1 基因

对氧磷酶 1 (PON1)是一类钙离子依赖的高密度脂蛋白相关性且具有心血管保护作用的酯酶。Wang 等<sup>[17]</sup>使用重组腺相关病毒载体携带人对氧磷酶 1(hPON1)基因并转染 EPCs,再移植到动脉粥样硬化模型的 SD 大鼠。结果表明,其预防动脉粥样硬化效果优于单独 EPCs 移植组,也优于单独 hPON1 基因注射组。

### 3.6 其他基因

Kobayashi 等<sup>[18]</sup>使用血管生成素-1 的基因转移至自体骨髓单个核细胞(BM-MNCs)植入治疗兔后肢缺血模型,使血管造影评分和毛细血管密度显著改善,促进缺血组织的血管生成,减少了所需 MNCs 的用量。Sen 等<sup>[19]</sup>应用转导胰岛素样生长因子-1 基因的 EPCs 用于心肌梗死后大鼠,发现减少心肌的凋亡,增加梗死区域的毛细血管数目。Song 等<sup>[20]</sup>应用转染肝细胞生长因子基因的 EPCs 发现,较单纯 EPCs 移植相比,前者更能有效促进 EPCs 的增殖、迁移、促进毛细血管的生成,抑制球囊损伤后的内膜增生,促进血管再内皮化。

## 4 展望

基因修饰的 EPCs 移植其基因种类是多样的,主要是从增强 EPCs 的活力以及作用于 EPCs 的动员、增殖、归巢、分化等各个环节过程而增强其功能,其治疗作用比未经基因修饰的单纯 EPCs 移植更加有效。然而,动脉粥样硬化性疾病的病理过程十分复杂,且研究多为动物试验,在人体内基因修饰移植的临床安全性还未得到确认。基因修饰的 EPCs 移植疗法尚需更多的临床试验证实。

### 参 考 文 献

- [1] Case J, Mead LE, Bessler WK, et al. Human CD34 + AC133 + VEGFR-2 + cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors [J]. Exp Hematol, 2007, 35(7): 1109-1118.
- [2] Yoder MC, Mead LE, Prater D, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals [J]. Blood, 2007, 109 (5): 1801-1809.
- [3] Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand [J]. Cell, 2002, 109 (5): 625-637.
- [4] Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells[J]. Cardiovasc Res, 2008, 78(3): 413-421.
- [5] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes[J]. N Engl J Med, 2005, 353(10): 999-1007.
- [6] Wassmann S, Werner N, Czech T, et al. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells [J]. Circ Res, 2006, 99(8): e74-e83.
- [7] Schächinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 44(8): 1690-1699.
- [8] Wollert KC, Meyer GP, Latz J, et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial[J]. Lancet, 2004, 364(9429): 141-148.
- [9] Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures[J]. Circulation, 2002, 106(22): 2781-2786.
- [10] Kissel CK, Lehmann R, Assmus B, et al. Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 49(24): 2341-2349.
- [11] Murasawa S, Llevadot J, Silver M, et al. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells [J]. Circulation, 2002, 106(9): 1133-1139.
- [12] Meng QY, Li XQ, Yu XB, et al. Transplantation of VEGF165-gene-transfected endothelial progenitor cells in the treatment of chronic venous thrombosis in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(4): 471-477.
- [13] Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration [J]. Circulation, 2002, 105 (6): 732-738.
- [14] Cui B, Huang L, Fang Y, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase enhances inhibition of neointimal hyperplasia and restores endothelium-dependent vasodilatation[J]. Microvasc Res, 2011, 81(1): 143-150.
- [15] Kaur S, Kumar TR, Urano A, et al. Genetic engineering with endothelial nitric oxide synthase improves functional properties of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease: an in vitro study [J]. Basic Res Cardiol, 2009, 104(6): 739-749.

- rosiglitazone on atherosclerosis in diabetes patients with cardiovascular history trial[J]. *Circulation*, 2010, 121(10): 1176-1187.
- [19] Nissen SE, Wolski K. Rosiglitazone revisited: an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality[J]. *Arch Intern Med*, 2010, 170(14): 1191-1201.
- [20] Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(24): 2457-2471.
- [21] Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, et al. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial[J]. *Lancet*, 2009, 373(9681): 2125-2135.
- [22] Punthakee Z, Bosch J, Dagenais G, et al. Design, history and results of the Thiazolidinedione Intervention with vitamin D Evaluation (TIDE) randomised controlled trial [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(1): 36-45.
- [23] Fernandez M, Gastaldelli A, Triplitt C, et al. Metabolic effects of muraglitazar in type 2 diabetic subjects[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2011, 13(10): 893-902.
- [24] Henry RR, Lincoff AM, Mudaliar S, et al. Effect of the dual peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma agonist aleglitazar on risk of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes (SYNCHRONY): a phase II, randomised, dose-ranging study [J]. *Lancet*, 2009, 374(9684): 126-135.
- [25] Cavender MA, Lincoff AM. Therapeutic potential of aleglitazar, a new dual PPAR- $\alpha/\gamma$  agonist: implications for cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2010, 10(4): 209-216.

(收稿:2012-04-27 修回:2012-05-28)

(本文编辑:金谷英)

#### (上接第 209 页)

- [18] Prasad A, Gersh BJ, Bertrand ME, et al. Prognostic significance of periprocedural versus spontaneously occurring myocardial infarction after percutaneous coronary intervention in patients with acute coronary syndromes: an analysis from the ACUITY (Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy) trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(5): 477-486.
- [19] Testa L, van Gaal WJ, Biondi Zoccai GG, et al. Myocardial infarction after percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of troponin elevation applying the new universal definition [J]. *QJM*, 2009, 102(6):369-378.
- [20] Kerr AJ, Broad J, Wells S, et al. Should the first priority in cardiovascular risk management be those with prior cardiovascular disease? [J]. *Heart*, 2009, 95(2):125-129.
- [21] Shotan A, Blondheim DS, Gottlieb S, et al. Comparison of outcome of recurrent versus first ST-segment elevation myocardial infarction (from national Israel surveys 1998 to 2006) [J]. *Am J Cardiol*, 2011, 107(12):1730-1737.
- [22] Feldman DN, Kim L, Rene AG, et al. Prognostic value of cardiac troponin-I or troponin-T elevation following nonemergent percutaneous coronary intervention: a meta-analysis [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2011, 77(7): 1020-1030.
- [23] Nienhuis MB, Ottervanger JP, Bilo HJ, et al. Prognostic value of troponin after elective percutaneous coronary intervention: A meta-analysis [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2008, 71(3):318-324.

(收稿:2012-02-14 修回:2012-5-29)

(本文编辑:朱 映)

#### (上接第 212 页)

- [16] Jiang M, Wang B, Wang C, et al. Angiogenesis by transplantation of HIF-1 alpha modified EPCs into ischemic limbs [J]. *Cell Biochem*, 2008, 103(1):321-334.
- [17] Wang F, Xue J, Wang D, et al. Treatment of atherosclerosis by transplantation of bone endothelial progenitor cells over-expressed paraoxonase-1 gene by recombinant adeno-associated virus in rat[J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(11): 1806-1813.
- [18] Kobayashi K, Kondo T, Inoue N, et al. Combination of in vivo angiopoietin-1 gene transfer and autologous bone marrow cell implantation for functional therapeutic angiogenesis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(7):1465-1472.
- [19] Sen S, Merchan J, Dean J, et al. Autologous transplantation of endothelial progenitor cells genetically modified by adeno-associated viral vector delivering insulin-like growth factor-1 gene after myocardial infarction[J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(10):1327-1334.
- [20] Song MB, Yu XJ, Zhu GX, et al. Transfection of HGF gene enhances endothelial progenitor cell (EPC) function and improves EPC transplant efficiency for balloon-induced arterial injury in hypercholesterolemic rats [J]. *Vascul Pharmacol*, 2009, 51(2-3):205-213.

(收稿:2012-03-02 修回:2012-05-25)

(本文编辑:朱 映)