

内皮祖细胞*

赵 瑛

(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 400047)

摘 要 :内皮祖细胞参与胚胎期原始血管网的形成。但近年的研究证实,内皮祖细胞参与出生后的内皮修复和血管新生过程,提示内皮祖细胞在血管再生和心血管疾病治疗中具有很好的应用前景。目前,确定内皮祖细胞还没有一个统一的标准,相对认可为内皮祖细胞的是含 CD34、CD133、FLK-1 等标志的阳性细胞。在正常情况下,外周血中 EPC 数量很低。本文侧重综述了 EPCs 的表型、鉴定、分离培养、数量。

关键词 :内皮祖细胞;表型;鉴定;分离培养;数量

中图分类号 :R318 ;R331.3⁺²

文献标识码 :A

文章编号 :1672-6693(2006)04-0068-03

Endothelial Progenitor Cells

ZHAO Ying

(College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract :during embryogenesis, endothelial progenitor cells participate in the initial processes of primitive blood vessel formation. It becomes evidently that endothelial progenitor cells are involved in postnatal reendothelization and vasculogenesis. It is suggested that endothelial progenitor cells will have clinical application prospects in vascular regeneration and treatment of heart and vascular diseases. Currently, there is no uniform definition of EPC, it was primarily defined by expression of cell surface antigens CD34, CD133, FLK-1. under steady-state physiological condition, quantity of EPCs is very low. In this review, we sum up pareicularly on phenotype, identification, isolation and culture and quantity of EPCs.

Key words :endothelial progenitor cells; phenotype; identification; isolation and culture; quantity

血管的发育不仅涉及从已存在的血管长出新毛细血管的过程(血管生成, angiogenesis),也涉及中胚层来源的成血管细胞(angioblasts)或内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)分化成为成熟内皮细胞(endothelial cells, ECs)从头形成原始血管网的过程(血管发生, vasculogenesis)。过去人们一直认为血管生成是出生后新血管形成的惟一方式。但近年的研究发现:在出生后的血管形成过程中,也有骨髓来源的 EPCs 分化参与,故称为出生后的血管发生(postnatal vasculogenesis)。这一现象自发现之日即引起极大关注,不仅是 EPCs 参与了缺血组织的新血管形成,也因为 EPCs 可作为心血管疾病危险因子的临床判定。本文侧重综述了 EPCs 的表型、鉴定、分离培养、数量。

1 EPCs 的表型特征

尽管对早期 EPCs 向 ECs 的精确分化途径还不清楚,但目前认为, EPCs 区别于成熟 ECs 的主要表面标志是 CD133^[1,2],即 AD133,它是一个新发现的造血干/祖细胞的表面标志,由一条长 865 个氨基酸的多肽链组成的糖蛋白抗原,分子量为 120kDa,含 5 个跨膜区, N 端位于细胞外, C 端位于细胞内,但其功能尚不清楚。CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺、CD34⁺/VEGFR-2⁺、CD34⁺细胞在体外培养时能分化为成熟的 ECs,且在动物缺血模型中,若使用这些细胞有助于新血管形成^[3-5]。由于造血干细胞也表达这些表面标志,因此有研究者认为这些细胞应该是成血-血管干细胞(hemangioblast),一个既能形成

* 收稿日期 2006-03-28

作者简介:赵瑛(1962-),女,四川彭州人,副教授,研究方向为生物医学工程。

内皮细胞又能形成造血细胞的双潜能干细胞。Pecoli 等^[6]采用集落分析证明,骨髓和脐血来源的 CD34⁺/VEGFR-2⁺ 细胞群在不同培养液中培养时,或能形成造血集落,或能形成内皮集落,说明在 CD34⁺/VEGFR-2⁺ 细胞群中包含有成血-血管干细胞。

Reyes 等^[7]研究显示内皮祖细胞的另一来源是骨髓中的 CD34⁺/VE-cadherin⁻/VEGFR-2⁺/CD133⁺ 多能性成体祖细胞(multipotent adult progenitor cell, MAPC),这些细胞在体外可培养 80 代以上,在 VEGF 作用下能分化为 CD34⁺/VE-cadherin⁺/VEGFR-2⁺ EPCs,并能继续分化为表达 CD31/CD36/vWF 的成熟 ECs。在基质胶中可形成像血管样的结构。来源于骨髓^[8]和其它组织^[9]的 SP 细胞(side population)也包含有造血干细胞和 EPCs。据最新报道^[10],具有胚胎干细胞标志(Nanog⁺, Oct-4⁺)和功能的 CD14⁺ VEGFR-2⁺ CD34^{low} 细胞亚群可能才是循环早期 EPCs 的主要来源。

2 EPCs 的鉴定

(1) 从 EPCs 表面分子标志上予以鉴定 CD34⁺/VEGFR-2⁺、CD34⁺/VEGFR-2⁺/CD133⁺ 阳性的细胞即可确定为 EPCs。

(2) 从 EPCs 生物学特性上予以鉴定 EPCs 可摄取乙酰化低密度脂蛋白(acLDL)并与荆豆凝集素-I(UEA-1)反应,故可将 EPCs 与 Dil-ac LDL 在一定条件下孵育,再与 FITC-UEA-1 反应,在倒置荧光显微镜下 Dil-ac LDL 呈红色荧光, FITC-UEA-1 呈绿色荧光,出现这种双阳性荧光的细胞即可鉴定为 EPCs^[11,12]。但也有在此基础上,用流式细胞仪进一步鉴定 EPCs 的报道^[13]。

(3) 体外血管生成模型说明所获细胞可直接参与血管新生,间接证明是 EPCs。Ingram 等^[14]根据干/祖细胞具有自我更新的基本特性,采用类似于造血细胞系的分类方法,首次提出用增殖和集落形成能力来鉴定 EPCs。该谱系分为四级:HPP-ECFCs (high proliferative potential-endothelial colony-forming cells)为高扩增潜能的内皮集落形成大细胞群,当它们再次以单细胞种植时,能形成第二、第三次集落,仍然保持高水平的端粒酶活性,脐带血来源 EPCs 可群体倍增 100 倍以上即属于 HPP-EPCs。LPP-ECFCs (low proliferative potential-endothelial colony-forming cells)为低扩增潜能的内皮集落形成细胞

群,每个集落约含有 50 个以上的细胞,当它们再次被种植时,尽管不能形成第二次集落,但能形成内皮细胞簇(endothelial cell clusters, EC clusters)。EC clusters 所含细胞低于 50 个,但这些细胞较 HPP-ECFCs 和 LPP-ECFCs 大,且已显示内皮细胞的分化特性。最后为终端分化的成熟内皮细胞。

3 EPCs 的数量

由于无统一的分离培养程序和对 EPCs 的鉴定。因此,将不同研究者的结果进行比较是很困难的。尽管成年后 EPCs 主要分布于骨髓,但 Kalka 等^[15]指出 EPCs(VEGFR-2⁺/VE-cadherin⁺/CD34⁺)在外周血中是 3 000 ~ 5 000 个/mL,但 Peichev^[16]估计 EPCs(CD34⁺/VEGFR-2⁺/CD133⁺)是 70 ~ 210 个/mL。Murohara^[16]指出脐血 MNCs 中的 CD34⁺ 细胞密度是成人外周血的 10 倍以上,与外周血相比,脐血中 MNCs 在培养时能产生更多的 EPCs。但可确定的是雌激素、运动、心肌梗塞、血管损伤、充血性心力衰竭、HMG-CoA 还原酶抑制剂、VEGF、EPO、G-CSF、PIGF、胚胎发育(脐血)能使 EPCs 的数量增加,而缺血性心血管疾病的危险因子(如抽烟、家族史、高血压)、肢体缺血、II 型糖尿病、镰状细胞性贫血、内毒素、立克次体感染会导致 EPCs 的减少^[17]。令人有趣的是 EPCs(CD34⁺/VEGFR-2⁺/CD133⁺)数量在 I、II 级慢性心力衰竭是增加,而 III、IV 级慢性心力衰竭则是减少^[18]。

4 EPCs 的分离和培养

绝大多数体外培养研究主要集中在如何改进 EPCs 分化为成熟内皮细胞的培养条件上。因而,目前并没有在体外分离培养 EPCs 的标准程序。最普遍采用的是,将骨髓或外周血经淋巴细胞分离液分离后,直接或再通过磁珠分选后的细胞放入经 FN、明胶或胶原 I 裱衬的塑料培养瓶中,培养液为添加 FCS、VEGF、IGF-1、FGF-b、EGF 的 EBM 或 M199。培养时间因研究者不同而异。

5 问题与展望

综上所述,尽管 EPCs 在血管再生和心血管疾病治疗方面具有很好的应用前景,但还有许多基础性和应用性的问题尚待解决。(1) EPCs 的起源?(2) 精确的表型?(3) 分离培养的标准程序?(4) 外周血中 EPCs 的数量?(5) 使用 EPCs 的安全性?

(6)不同来源的 EPCs 是否具有相同的治疗潜力? 尽管需要解决的问题很多,但相信随着研究的深入,用 EPCs 治疗疾病将会在血管生物学领域发挥巨大作用。

参考文献:

- [1] SCHMEISSER A , STRASSER R H. Phenotypic Overlap Between Hematopoietic Cells with Suggested Angioblastic Potential and Vascular Endothelial Cells[J]. Journal of Hematology and Stem Cell Research 2002 ,11 69-79.
- [2] RAFII S , LYDEN D. Therapeutic Stem and Progenitor Cell Transplantation for Organ Vascularization and Regeneration [J]. Nat Med 2003 9 702-712.
- [3] MASUDA H , ASAHARA T. Post-natal Endothelial Progenitor Cells for Neovascularization in Tissue Regeneration[J]. Cardiovasc Res 2003 58 390-398.
- [4] PEICHEV M , NAIYER A J , PEREIRA D , et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by Circulating Human CD34⁺ Cells Identifies a Population of Functional Endothelial Precursors[J]. Blood 2000 95 952-958.
- [5] ASAHARA T , MUROHARA T , SULLIVAN A , et al. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis[J]. Science ,1997 275 964-967.
- [6] PELOSI E , VALTIERI M , COPPOLA S , et al. Identification of the Hemangioblast in Postnatal Life[J]. Blood , 2002 ,100 3203-3208.
- [7] REYES M , DUDEK A , JAHAGIRDAR B , et al. Origin of Endothelial Progenitors in Human Postnatal Bone Marrow [J]. J Clin Invest 2002 ,109 337-346.
- [8] MAJKA S M , JACKSON K A , KIENSTRA K A , et al. Distinct Progenitor Populations in Skeletal Muscle Are Bone Marrow Derived and Exhibit Different Cell Fates During Vascular Regeneration[J]. J Clin Invest 2003 ,111 71-79.
- [9] JACKSON K A , MAJKA S M , WANG H , et al. Regeneration of Ischemic Cardiac Muscle and Vascular Endothelium by Adult Stem Cells[J]. J Clin Invest ,2001 ,107 :1395-1402.
- [10] ROMAGNANI P , ANNUNZIATO F , LIOTTA F , et al. CD14⁺ CD34^{low} Cells with Stem Cell Phenotypic and Functional Features Are the Major Source of Circulating Endothelial Progenitors[J]. Circ Res 2005 97 314-322.
- [11] VASA M , FICHTISCHERER S , ADLER K , et al. Increase in Circulating Endothelial Progenitor Cells by Statin Therapy in Patients with Stable Coronary Artery Disease[J]. Circulation 2001 ,103 2885-2890.
- [12] REHMAN J , LI J , ORSCHELL C M , et al. Peripheral Blood Endothelial Progenitor Cells are Derived from Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors [J]. Circulation 2003 ,107 :1164-1169.
- [13] THUM T , FRACCAROLLO D , GALUPPO P , et al. Bone Marrow Molecular Alterations after Myocardial Infarction : Impact on Endothelial Progenitor Cells[J]. Cardiovasc Res ,2006 70(1) 50-60.
- [14] INGRAM D A , MEAD L E , TANAKA H , et al. Identification of a Novel Hierarchy of Endothelial Progenitor Cells Using Human Peripheral and Umbilical Cord Blood[J]. Blood 2004 ,104(9) 2752-2760.
- [15] KALKA C , MASUDA H , TAKAHASHI T , et al. Vascular Endothelial Growth Factor165 Gene Transfer Augments Circulating Endothelial Progenitor Cells in Human Subjects[J]. Circ Res ,2000 86 :1198-1202.
- [16] MUROHARA T , IKEDA H , DUAN J , et al. Transplanted Cord Blood-derived Endothelial Precursor Cells Augment Postnatal Neovascularization[J]. J Clin Invest 2000 ,105 (11) :1527-1536.
- [17] HRISTOV M , WEBER C. Endothelial Progenitor Cells : Characterization , Pathophysiology , and Possible Clinical Relevance[J]. J Cell Mol Med 2004 8 :498-508.
- [18] VALGIMIGLI M , RIGOLIN G M , FUCILI A , et al. CD34⁺ and Endothelial Progenitor Cells in Patients With Various Degrees of Congestive Heart Failure[J]. Circulation 2004 ,110 :1209-1212.

(责任编辑 许文昌)