

# 内皮祖细胞功能缺陷的机制及其药物干预

马 靖, 谢和辉, 陈丰原, 沈甫明 (第二军医大学药学院药理教研室, 上海 200433)

**摘要** 内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 来源于骨髓, 循环、分化为成熟的内皮细胞参与血管生成。许多因素可影响外周循环 EPCs 的数量及功能。因此, 采用药物动员或改善其功能有可能成为治疗血管疾病的一种新策略。

**关键词** 内皮祖细胞; 血管新生; 药物治疗

中图分类号: R972 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)05-0321-04

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 来源于骨髓, 可被动员到外周循环分化为成熟内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 参与成体后的血管新生<sup>[1]</sup> (angiogenesis)。血管内皮功能正常对于血管内平衡非常重要, 内皮功能受损是高血压、糖尿病等血管疾病的重要发病机制。最近的研究表明, 在这些病理状态下, 外周血中 EPCs 的数量减少并且功能受损。因此, 在了解 EPCs 功能受损机制的基础上, 采用药物动员或改善其功能有可能成为治疗血管疾病的一种新策略。本文对高血压、糖尿病状态下 EPCs 功能缺陷以及药物干预作一综述。

## 1 EPCs 功能缺陷的机制

研究表明 EPCs 与心血管疾病相关因素关系密切, 循环 EPCs 被认为可以预测心血管事件的发生率。心血管疾病是糖尿病患者死亡的主要原因<sup>[2]</sup>, 心血管疾病危险因素促进 EPCs 功能损伤, 而且在所有的危险因素中, 高血压是导致 EPCs 功能损伤重要的独立因素。越来越多的体内外实验表明高血糖、高血压状态下 EPCs 的动员、迁移、归巢和黏附等功能受损。

**1.1 糖尿病 EPCs 功能缺陷的机制** NO 介导的信号转导通路对于 EPCs 的功能非常重要。四氢生物喋呤 (tetrahydrobiopterin, BH4) 是 eNOS 合成 NO 的重要辅助因子, BH4 不足导致 eNOS 脱耦联 (uncoupling), 使得 NO 生物利用度降低<sup>[4,5]</sup>。糖尿病患者体内氧化应激水平升高, EPCs 胞内 BH4 被过氧化物氧化, eNOS 脱耦联, 主要催化  $O_2^{\cdot -}$  (而不是 NO) 生成, EPCs 迁移功能受损。抑制 PKC 激活或外源性补充 BH4 可减少高糖介导的  $O_2^{\cdot -}$  产生, 改

善 EPCs 的功能<sup>[4]</sup>。

基质细胞衍生因子 (stromal cell derived factor 1, SDF-1) 在 EPCs 的动员和归巢中发挥重要作用。CD34<sup>+</sup> EPCs 表面表达 CXCR4 和 CD26/二肽基肽酶 IV, 前者是 SDF-1 的受体。CD26/二肽基肽酶 IV 降解 SDF-1 导致 EPCs 迁移功能缺陷。另外, 组织缺血时产生缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1), 上调 VEGF 或 SDF-1 的表达促进 EPCs 的动员<sup>[6,7]</sup>, 而这一动员过程是由活化的基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 介导的<sup>[3]</sup>, 糖尿病小鼠骨髓中 MMP-9 水平降低损害了 EPCs 的动员。

凝血酶敏感蛋白-1 (thrombospondin-1, TSP-1) 是一种多功能蛋白, 能够与多种基质蛋白和细胞表面受体相互作用。Masaaki 等<sup>[8]</sup> 证实高血糖状态下, EPCs 的 TSP-1 表达上调, 同时证明 TSP-1 的表达量与 EPC 黏附能力负相关, 但 TSP-1 损害 EPCs 黏附能力的确切机制还需深入研究。Arduo 等<sup>[9]</sup> 报道糖尿病来源的 EPCs 表现为衰老样生长停滞, 这依赖于 Akt 的活化。

转录因子 forkhead 家族的 FoxO1 和 Fox3a 无论在胚胎时期的新血管形成还是在成体后的血管新生都发挥重要的作用<sup>[10-12]</sup>。Valentina 等<sup>[13]</sup> 证实高糖条件下, EPCs 中 PI 3-kinase/Akt 通路依赖性的 FoxO 蛋白的磷酸化显著减少, FoxO1/3a 不能发挥作用使得 EPCs 不能分化为 ECs。另一个重要的翻译后修饰控制 FoxO1 的活性是 K242 和 K245 的乙酰化和去乙酰化作用。高糖条件下, EPCs 中 FoxO1 的乙酰化显著增加, 使 FoxO1 的活化受到抑制<sup>[14]</sup>。

综上所述, 糖尿病来源的 EPCs 功能缺陷与 SDF-1 降解, eNOS 脱耦联, MMP-9 缺陷, TSP-1 上调, Akt/FoxO 活化有关。这些因素共同作用使得 EPCs 的动员、迁移、归巢和黏附功能受损。

## 2 高血压和 EPCs 功能受损

高血压是导致 EPCs 迁移功能受损的独立因素<sup>[15]</sup>。肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 对血管 ECs 和上皮细胞具有促有丝分裂作用。高血压患者体内血管紧张素 II (angiotensin II) 水平升高, HGF 下调导致 EPCs 迁移功能受损<sup>[16, 17]</sup>。与此同时, 高血压状态下氧化的低密度脂蛋白 (ox-LDL) 阻断 VEGF 诱导的 Akt 活化和 NO 的产生, 损害 EPCs 的迁移功能<sup>[18, 19]</sup>。

端粒酶具有对端粒的延伸作用, 在缺乏端粒酶的细胞中, 端粒会逐渐缩短直至损害基因。高血压状态下, Ang II 和活性氧 (ROS) 水平升高, 抑制端粒酶的活性, 加速 EPCs 老化<sup>[20]</sup>。研究发现高血压大鼠 (自发性和去氧皮质酮盐性两种高血压大鼠) 体内分离得到的 EPCs 老化加剧<sup>[21]</sup>。而且端粒酶的活性、EPCs 老化的程度和高血压患者的严重性指数关系密切。体外研究表明 Ang II 能够刺激 EPCs 表达 gp91<sup>phox</sup><sup>[22]</sup>, 从而升高过氧化亚硝酸盐 (ONOO<sup>-</sup>) 的水平并相应的通过抑制端粒酶的活化而促进 EPCs 老化。另外, BH4 被氧化导致 eNOS 脱耦联, 使得 EPCs 的动员功能受损。

因此, 高血压状态下, Ang II 水平升高引起的旁分泌效应是损害 EPCs 迁移功能的重要机制。目前, 高血压时 EPCs 功能受损的机制尚不完全明确。

## 3 药物对 EPCs 功能的影响

在了解 EPCs 功能受损机制的基础上, 国内外大量研究表明药物能够动员骨髓中的 EPCs, 增加外周血中该细胞的数量或改善其增殖、迁移、黏附和小管形成能力, 有可能成为治疗血管疾病的一种新策略。目前已报道能够影响 EPCs 的药物包括他汀类药物 (statins)、血管紧张素转化酶抑制剂 (angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI 类)、血管紧张素 II 受体阻断剂 (angiotensin II receptor antagonist, ARB 类)、钙离子拮抗剂 (calcium channel blocker, CCB 类)、PPAR $\gamma$  激动剂和促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 等。

他汀类药物能够抑制 3-羟-3-甲基戊二酸辅酶 A (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶, 从而抑制胆固醇的生成, 降低外周血中胆固醇的水平。Dimmeler 等<sup>[23]</sup> 的体外研究证实他汀类药物 1  $\mu$ M 辛伐他汀 (simvastatin) 和 1  $\mu$ M 美伐他汀 (mevastatin) 均能增加 EPCs 的数量。20 mg/(kg $\cdot$ d) 辛伐他汀给药健康小鼠 3 周, 造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 和 EPCs 的数量均

显著增加。而且证实他汀类药物的这种作用是 PI 3-kinase/Akt 通路介导的。但是, Levadot 等<sup>[24]</sup> 在得到了与上述一致的研究结果的同时证实大剂量的他汀类药物 10  $\mu$ M 对 EPCs 数量的增加和功能的改善都较 1  $\mu$ M 的差。这种负性影响的作用机制目前尚不完全明确, 有研究者认为可能过高浓度的他汀类药物对细胞具有一定的毒性作用。总之, 他汀类药物的主要临床作用是降低血脂, 大型临床试验表明应用该药能够显著降低心血管事件的发生率。就目前研究证实氟伐他汀、辛伐他汀和美伐他汀均能有效增加外周血 EPCs 的数量并改善其增殖、迁移、黏附和小管形成功能。

常规降压药物如 ACEI 类、ARB 类和 CCB 类, 在降压之外还能增加外周血中 EPCs 的数量并改善其功能, 并且这种作用不依赖于药物相应的降压机制。Tao 等<sup>[25]</sup> 临床研究发现稳定型冠心病患者 (stable coronary artery disease, CAD) 应用 ACEI 类降压药雷米普利 (ramipril), 外周血中 EPCs 的数量及体外增殖、迁移、黏附和血管形成能力均显著增强。Bahmann 等<sup>[26]</sup> 报道 ARB 类药物奥美沙坦和依贝沙坦均能够增加 2 型糖尿病患者再生 EPCs 的数量, 但是该作用的细胞内作用机制目前尚没有定论。在原发性高血压临床治疗中 CCB 类降压药尼索地平能够独立于其降压作用而促进 EPCs 从骨髓的动员<sup>[27]</sup>; Ando 等<sup>[28]</sup> 体外研究证实贝尼地平能够促进 EPCs 的分化, 且此作用有可能依赖于 PI 3-kinase/Akt 信号途径。

部分高血压患者存在胰岛素抵抗, 可能合并有糖尿病、高血脂等。而胰岛素抵抗为高血压的起病或促进因素, 因此在这一类患者中, 改善胰岛素抵抗及降低血糖、调节血脂对血压控制显得尤为重要。噻唑烷二酮类 (thiazolidinediones, TZDs) 药物罗格列酮 (rosiglitazone)、吡格列酮 (pioglitazone) 能够激动 PPAR $\gamma$  受体, 提高胰岛素敏感性而降低血糖。Pistrosch 等<sup>[29]</sup> 研究表明 2 型糖尿病患者服用罗格列酮 12 周, 外周血中 EPCs 的数量明显增加且迁移能力亦得到改善。Inanishi 等<sup>[30]</sup> 体外研究证实吡格列酮能够下调血管紧张素 II 1 型受体 (AT1R) 的表达, 可能因此阻断 Ang II 导致的端粒失活进而抑制 EPCs 老化。临床应用苯磷硫胺 (benfotiamine, BFT) 预防糖尿病并发症, 治疗和预防糖尿病视网膜病变。Marchetti 等<sup>[31]</sup> 证实体外高糖环境培养的 EPCs 黏附功能受损, 而加入苯磷硫胺就能改善 EPCs 的这一功能。渥曼青霉素 (wortmannin) 是 PI 3-kinase/Akt 通路的抑制剂, 他的存在能够阻断苯磷硫胺的这一作用, 由此证实苯磷硫胺拮抗高糖对

EPCs的毒性作用依赖于该通路。

EPO 是一种能够促进红细胞生成的生长因子, 研究证实它能够改善慢性心力衰竭动物模型的心脏功能<sup>[32]</sup>。研究表明 EPO 能够诱导 VEGF 表达并上调其受体, 刺激 EPCs 从骨髓动员到外周血<sup>[33]</sup>, 归巢到缺血心肌组织, 形成新生血管整合到心肌脉管系统, 增加缺血组织的血供而改善心脏功能。

#### 4 结论和展望

内皮祖细胞分化为成熟的内皮细胞而参与重新内皮化 (re-endothelialization) 和血管新生, 近年来研究表明自体移植 EPCs 是一种几乎无副作用的缺血性疾病治疗手段。尽管距 EPCs 的发现已有十年之久, 目前对它的研究仍处于初级阶段, 前期大量研究工作已经证实 EPCs 参与了损伤血管内皮的修复和缺血组织的血管新生, 但其自身更新过程尚不清楚, 对病理状态下 EPCs 的动员、迁移、归巢和分化的调节机制也缺乏透彻的了解。不过, 许多因素可影响外周循环 EPCs 的数量及功能, 采用药物动员或改善其功能有可能成为治疗血管疾病的一种新策略。EPCs 的生物学特性和功能使它能够缺血性疾病治疗领域发挥不可估量的作用。

#### 参考文献:

[1] Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells [J]. *Annu Rev Med* 2005, 56: 79.

[2] Avogaro A, Toffolo G, Kwanuka E, et al. L-arginine nitric oxide kinetics in normal and type 2 diabetic subjects: a stable-labelled 15N arginine approach [J]. *Diabetes* 2003, 52: 795.

[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: 625.

[4] Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, et al. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling in pairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes [J]. *Diabetes* 2007, 56: 666.

[5] Luo JD, Wang YY, Fu WL, et al. Gene Therapy of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Manganese Superoxide Dismutase Restores Delayed Wound Healing in Type 1 Diabetic Mice [J]. *Circulation*, 2004, 110: 2484.

[6] Lee SH, Wolf PL, Escudero R, et al. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction [J]. *N Engl J Med* 2000, 342: 626.

[7] Pillarisetti K, Gupta SK. Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor 1 (SDF-1) & SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction [J]. *Inflammation*, 2001, 25: 293.

[8] Li M, Takenaka H, Asai J, et al. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury [J]. *Circ Res* 2006, 98: 697.

[9] Rosso A, Balsano A, Gambino R, et al. p53 mediates the accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in diabetes [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 4339.

[10] Daly C, Wong V, Burova E, et al. Angiotensin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1) [J]. *Genes Dev* 2004, 18: 1060.

[11] Hosaka T, Biggs WH 3rd, Tieu D, et al. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 2975.

[12] Funayama T, Kitayama K, Shinoda Y, et al. Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 34741.

[13] Marchetti V, Menghini R, Rizza S, et al. Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/FoxO signaling [J]. *Diabetes* 2006, 55: 2231.

[14] Marchetti V, Menghini R, Rizza S, et al. Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/FoxO signaling [J]. *Diabetes* 2006, 55: 2231.

[15] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. *Circ Res* 2001, 89: e1.

[16] Matsumoto K, Morishita R, Tamura N, et al. Improvement of endothelial dysfunction by angiotensin II blockade accompanied by induction of vascular hepatocyte growth factor system in diabetic spontaneously hypertensive rats [J]. *Heart Vessels* 2003, 18 (1): 18.

[17] Sengupta S, Gherardi E, Sellers LA, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor can induce angiogenesis independently of vascular endothelial growth factor [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23(1): 69.

[18] Chavakis E, Dembach E, Hermann C, et al. Oxidized LDL inhibits VEGF-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/eNOS pathway [J]. *Circulation*, 2001, 103: 2102.

[19] Dimmeler S, Dembach E, Zeher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at Ser 1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration [J]. *FEBS Lett* 2000, 477: 258.

[20] Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, et al. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence [J]. *J Cell Mol Med* 2009, 13(3): 454.

[21] Yang DG, Liu L, Zheng XY, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) and telomerase may co-modulate endothelial progenitor cells senescence [J]. *Ageing Res Rev*, 2008, 7 (2): 137.

[22] Wang X, Chen J, Tao Q, et al. Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells [J]. *Drug Chem Toxicol* 2004, 27: 250.

从而改变蛋白质的功能,特别是与膜相关的钙泵,引起肝细胞内钙稳态的破坏,造成肝细胞坏死和肝功能减退。丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)是肝内的主要功能酶,在肝脏组织损伤及坏死时,酶从细胞内溢入血液,使得血清相关转氨酶的水平显著升高。此外,对乙酰氨基酚在肝内代谢过程中产生的自由基可引起肝细胞膜脂质过氧化,GSH含量降低,MDA升高<sup>[10]</sup>。我们通过比较药物组小鼠和模型组小鼠血清ALT、AST活力水平,肝组织GSH含量以及脂质过氧化产物MDA含量,发现五味子提取物单独给药对对乙酰氨基酚引起的小鼠肝损伤没有显著的保护作用,而五味子提取物和黄芪多糖配伍,可降低对乙酰氨基酚引起的小鼠血清转氨酶和肝组织MDA水平,提高肝组织GSH含量,使肝组织细胞损伤得到一定程度的恢复,从而具有保护肝损伤的作用。CDI结果表明,二者配伍应用具有协同的保肝作用。

小鼠摄入过量的对乙酰氨基酚诱发急性肝损伤,药物活性代谢产物可与肝蛋白如细胞色素酶P450共价结合使其发生改变,这种改变的蛋白以外来物被机体免疫系统识别,导致对正常肝细胞成分的自动免疫攻击,引起免疫反应和免疫介导的损伤<sup>[11]</sup>。本研究中,当五味子提取物单独作用时,其降酶保肝的作用并不显著,而与黄芪多糖配伍后,便表现出显著的肝保护作用。有文献报道黄芪多糖具有免疫调节作用,并且对于外源性物质引起的免疫性肝损伤有良好的保护作用。所以,黄芪多糖可能

通过调节肝损伤小鼠的免疫功能,协同五味子提取物提高肝脏的还原性谷胱甘肽和抗氧化水平,保护肝细胞,有效地对抗对乙酰氨基酚过量引起的肝毒性。

#### 参考文献:

- [1] 李小光,高勤,翁文,等.五味子有效部位及其药理作用研究进展[J].中药材,2005,28(2):156
- [2] 杨觉民,钱义顺.五味子联合黄芪饮片治疗慢性乙型肝炎[J].江西中医药,2003,5(34):18
- [3] 黄楨.黄芪多糖研究现状与进展[J].中国肿瘤临床,2007,34(15):896
- [4] 袁伯俊,廖明旭,李波,等.药物毒理学实验方法与技术[M].北京:化学工业出版社,2007:533
- [5] 范兴良,张丹丹,王灵台,等.补肾方及其拆方对D-氨基半乳糖致小鼠肝损伤的保护作用[J].实验研究,2008,28(6):475
- [6] 彭万仁,宛新安,孙国平,等.丹皮酚协同顺铂抑制人食管癌Eca-109细胞的增殖[J].安徽医药,2007,11(6):492
- [7] Larrey D. Epidemiology and individual susceptibility to adverse drug reaction health affecting the liver [J]. *Semin Liver Dis* 2002, 22(2): 145
- [8] 张彩霞.对乙酰氨基酚过量引起的肝脏损害及防治[J].中华当代医学,2008,3(8):45
- [9] 陈雪龙.实验性肝损伤动物模型的研究进展[J].实验动物科学,2008,25(3):47
- [10] 姚光弼,陈成伟.药物与中毒性肝病[M].上海:上海科学技术出版社,2002:64
- [11] 张喜红,阎明.药物性肝损伤的发病机制和临床特点及其易感因素[J].国际消化病杂志,2007,27(1):21

收稿日期:2009-01-06

(上接第323页)

- [23] Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI3-kinase/Akt pathway [J]. *J Clin Invest* 2001, 108(3): 391
- [24] Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. *J Clin Invest* 2001, 108(3): 399
- [25] Min TQ, Zhu CJ, Xiang WX, et al. Improvement in Endothelial Progenitor Cells from Peripheral Blood by Ramipril Therapy in Patients with Stable Coronary Artery Disease [J]. *Cardiovasc Drugs Ther* 2004, 18(3): 203
- [26] Bahnan FH, Groot K, Mueller O, et al. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists [J]. *Hypertension* 2005, 45: 526
- [27] Bendorff RA, Gehling UM, Appel D, et al. Mobilization of Putative High Proliferative Potential Endothelial Colony-Forming Cells during Antihypertensive Treatment in Patients with Essential Hypertension [J]. *Stem Cells Dev* 2007, 16(2): 329
- [28] Ando H, Nakanishi K, Shibata M, et al. Benidipine, a dihydropyridine-Ca<sup>2+</sup> channel blocker, increases the endothelial differentiation of endothelial progenitor cells in vitro [J]. *Hypertens Res* 2006, 29(12): 1047
- [29] Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlegel U, et al. PPARgamma agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells [J]. *Atherosclerosis* 2005, 183(1): 163
- [30] Inanishi T, Kobayashi K, Kuroi A, et al. Pioglitazone inhibits angiotensin II-induced senescence of endothelial progenitor cells [J]. *Hypertens Res* 2008, 31(4): 757
- [31] Marchetti V, Menghini R, Rizza S, et al. Benfotiamine Counteracts Glucose Toxicity Effects on Endothelial Progenitor Cell Differentiation via Akt/FoxO Signaling [J]. *Diabetes* 2006, 55: 2231
- [32] Haned S, Barshack I, Luboshits G, et al. Erythropoietin improves myocardial performance in doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *Eur Heart J* 2006, 27: 1876
- [33] Bahnan FH, de Groot K, Spandau JM, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells [J]. *Blood* 2004, 103: 921

收稿日期:2009-06-17