

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.40.015

[http://www.crter.org]

郭继强, 刘爱兵. 内皮祖细胞移植治疗糖尿病足的协同作用因素[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(40):7117-7124.

内皮祖细胞移植治疗糖尿病足的协同作用因素*

郭继强¹, 刘爱兵²(¹山西医学科学院生物治疗科, 山西省太原市 030000; ²武警总医院医学实验中心, 北京市 010071)

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 近几年来, 内皮祖细胞治疗糖尿病足取得了较大的进展, 内皮祖细胞移植已经逐渐发展成为糖尿病足治疗的新模式。

2 文章增加的新信息: 整合素是介导细胞与细胞外基质黏附作用的主要因子, 它通过调节内皮细胞的黏附和迁移能力, 参与新生血管管腔的形成和血管网络构建。细胞外基质是整合素的配体, 胶原和层粘连蛋白的沉积形成新的血管管腔。血管内皮生长因子受体 2 在内皮细胞增殖、血管生成以及增加血管的通透性等方面扮演着重要的角色。血管内皮细胞生长因子受体 2 和整联蛋白在这一治疗方法中可能发挥了协同作用。

3 临床应用的意义: 高血糖促进 $\beta 3$ 整合素和血管内皮生长因子受体 2 表达, 并且二者之间呈密切正相关。虽然 $\beta 3$ 整合素受高血糖刺激而表达增多, 其与玻连蛋白的黏附和迁移能力受到抑制, 但是可能通过受高血糖的刺激, 而增强血管内皮生长因子受体 2 的磷酸化水平及内皮细胞对血管内皮生长因子的敏感性, 以易于下游分子信号 FAK 和 MAPK/P38 的活化。这些变化有可能加剧细胞骨架重构和应力纤维的形成、细胞间连接结构的破坏, 从而加重细胞屏障功能的破坏。治疗糖尿病足的首要任务是控制血糖。

关键词:

干细胞; 干细胞综述; 糖尿病足; 自体; 内皮祖细胞移植; 血管内皮细胞生长因子受体 2; 整合素; 协同作用; 血管再生

主题词:

干细胞; 糖尿病足; 内皮细胞; 移植, 自体; 整合素类; 血管内皮生长因子受体 2

摘要

背景: 糖尿病足治疗已经走到瓶颈, 自体骨髓/外周血内皮祖细胞移植是近年来治疗糖尿病足的新方式。

目的: 针对血管内皮细胞生长因子受体 2 和整联蛋白在内皮祖细胞移植治疗糖尿病足过程中发挥作用的研究进展进行综述。

方法: 第一作者应用计算机检索 1998 年 1 月至 2012 年 12 月 PubMed 数据库、中国期刊全文数据库有关内皮祖细胞治疗糖尿病足、整合素与血管内皮细胞生长因子受体 2 的相互作用以及整合素与血管内皮细胞生长因子受体 2 在内皮祖细胞增殖与血管新生作用方面的文章, 英文检索词“diabetic foot, endothelial progenitor cells, VEGFR-2, integrin, synergistic effect”; 中文检索词“糖尿病足, 内皮祖细胞, 血管内皮细胞生长因子受体 2, 整合素, 协同作用”。共检索到 98 篇相关文献, 排除重复研究, 60 篇文献符合纳入标准。

结果与结论: 在糖尿病足治疗中, 自体骨髓/外周血内皮祖细胞越来越受到重视, 并逐渐成为最令人瞩目、最鼓舞人心的焦点, 内皮祖细胞移植已经逐渐发展成为糖尿病足治疗的新模式。血管内皮细胞生长因子受体 2 和整合素在糖尿病足治疗的血管生成中可能发挥了协同作用, 但仍有许多机制还不清楚, 要彻底明确整合素和血管内皮细胞生长因子的作用机制尚需进一步研究。

Synergistic factors of endothelial progenitor cell transplantation in the treatment of diabetic foot

Guo Ji-qiang¹, Liu Ai-bing² (¹Department of Biological Treatment, Shanxi Academy of Medical Sciences, Taiyuan 030000, Shanxi Province, China; ²Medical Experimental Center, Armed Police General Hospital, Beijing 010071, China)

Abstract

BACKGROUND: The treatment of diabetic foot has become a “bottleneck”. The transplantation of autologous bone marrow or peripheral blood endothelial progenitor cells is a new way for the treatment of diabetic foot in recent years.

OBJECTIVE: To review the effects of vascular endothelial growth factor receptor 2 and the integrin in treatment of diabetes foot by transplantation of endothelial progenitor cells.

METHODS: The first author searched PubMed database and Chinese periodical full-text database for related articles published between January 1998 and December 2012, with “diabetic foot, endothelial progenitor cells, VEGFR-2, integrin, synergistic effect” in English and Chinese, respectively. A total of 98 articles were searched, and 60 were included after excluding repetitive articles.

RESULTS AND CONCLUSION: In the diabetic foot treatment, autologous bone marrow or peripheral blood

郭继强★, 男, 1983 年生, 山西省太原市人, 汉族, 2012 年辽宁医学院毕业, 硕士, 初级检验技师, 主要从事细胞治疗方面的研究。

guojiqiang6@163.com

通讯作者: 刘爱兵, 主任医师, 硕士生导师, 教授, 武警总医院医学实验中心, 北京市 010071

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2013)40-07117-08

收稿日期: 2012-12-19

修回日期: 2013-03-18

(20120617001/G·A)

Guo Ji-qiang★, Master, Technician, Department of Biological Treatment, Shanxi Academy of Medical Sciences, Taiyuan 030000, Shanxi Province, China
guojiqiang6@163.com

Corresponding author: Liu Ai-bing, Chief physician, Master's supervisor, Professor, Medical Experimental Center, Armed Police General Hospital, Beijing 010071, China

Received: 2012-12-19

Accepted: 2013-03-18

endothelial progenitor cells has around increasing attention, and gradually become the focus of this field. Therapy with endothelial progenitor cells has gradually developed into a new method for diabetic foot. Vascular endothelial growth factor receptor 2 and the integrin may exhibit synergistic effects in the treatment of diabetes foot. However, the mechanism remains poorly understood. Further studies are needed to well understand their mechanism of action.

Subject headings: stem cells; diabetic foot; endothelial cells; transplantation, autologous; integrins; vascular endothelial growth factor receptor-2

Guo JQ, Liu AB. Synergistic factors of endothelial progenitor cell transplantation in the treatment of diabetic foot. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(40):7117-7124.

0 引言 Introduction

糖尿病足是糖尿病严重并发症之一,属于下肢慢性缺血,下肢慢性缺血是由于各种原因引起的下肢动脉慢性狭窄或闭塞,导致病变动脉远端组织缺血、缺氧、组织细胞变性、坏死等。临床类型有:下肢动脉硬化闭塞症、血栓闭塞性脉管炎、肢体缺血型的多发性大动脉炎、糖尿病周围动脉硬化症及糖尿病足等。临床表现主要为肢体麻木、发凉、间歇性疼痛,随着病变的发展,临床表现也随之加重,主要表现为静息状态下下肢疼痛,伴有局部营养不良、营养不良性溃疡、坏疽,随着病情的进一步恶化,患者将会有生命危险。

由于糖尿病固有的长期多系统、多脏器病变,以及发病足的复合组织、多层次侵袭破坏和难以控制的感染,使得糖尿病足的治疗过程较一般慢性创面修复更为复杂、反复,并且治疗周期长、费用高,感染难控制、易复发。保肢还是截肢,关系到糖尿病患者今后的生活质量问题,有必要尽快提出糖尿病足保肢指南、糖尿病足截肢的标准规范,使糖尿病足的治疗真正规范化。

在糖尿病足治疗中,内皮祖细胞越来越受到重视,并逐渐成为最令人瞩目、最鼓舞人心的焦点,内皮祖细胞移植已经逐渐发展成为糖尿病足治疗的新模式。整合素是介导细胞与细胞外基质黏附作用的主要因子,它通过调节内皮细胞的黏附和迁移能力,参与新生血管管腔的形成和血管网络构建。血管内皮细胞生长因子受体2在内皮细胞增殖、血管生成以及增加血管的通透性等方面扮演着重要的角色。本文主要针对血管内皮细胞生长因子受体2和整合素在内皮祖细胞治疗糖尿病足方法中发挥协同作用的研究及应用进展情况进行阐述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者检索1990至2008年PubMed数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)及中国期刊全文数据库(<http://www.cnki.net/>)。英文

检索词“diabetic foot, endothelial progenitor cells, VEGFR-2, integrin, synergistic effect”;中文检索词“糖尿病足,内皮祖细胞,血管内皮细胞生长因子受体2,整合素,协同作用”。共检索到98篇相关文献。

1.2 纳入标准 ①文章所述内容需与内皮祖细胞治疗糖尿病足、整合素与血管内皮细胞生长因子受体2的相互作用以及整合素与血管内皮细胞生长因子受体2在内皮祖细胞增殖与血管新生作用方面的研究密切相关。②同一领域选择近期发表或在权威杂志上发表的文章。

1.3 排除标准 重复性研究。

1.4 数据的提取 计算机初检得到98篇文献,阅读标题和摘要进行初筛,排除研究目的与本文无关及内容重复的研究38篇,共保留其中的60篇归纳总结。

1.5 质量评估 符合纳入标准的60篇文献中,文献[1-7]探讨了糖尿病足的治疗,文献[8-30]探讨了内皮祖细胞在糖尿病足治疗中的重要作用,文献[31-35]整合素与血管生成之间的关系,文献[36-41]探讨了血管内皮细胞生长因子受体2的作用,文献[42-60]探讨了血管内皮细胞生长因子受体2和整合素在内皮祖细胞治疗糖尿病足中的协同作用。

2 结果 Results

2.1 糖尿病足的治疗 目前,糖尿病足的治疗有:①糖尿病足的基础治疗:合理的膳食结构,戒烟戒酒。②糖尿病足的一般治疗:严格控制血糖、血脂、血压和对症治疗。③非手术治疗:抗感染、修复溃疡、改善微循环、高压氧治疗、营养神经和抗氧化治疗、自体干细胞移植、中医中药治疗。④手术治疗:血管重建和截肢、神经性溃疡外科治疗^[1-4]。药物治疗很难从根本上解决问题,而外科手术除采取高位截肢或动脉搭桥手术外,也多无其他比较好的治疗方案。

2.1.1 糖尿病足的保守治疗

国内外主要的药物治疗:①改善神经病变:维生素B₁、维生素B₁₂、甲钴胺(活性维生素B₁₂)可以改善糖尿病足的末梢神经病变。②改善微循环:扩张小动脉、微动脉,有效地改善微循环,增加缺血区域血液供应,前列腺素E、654-2、阿司匹林等。③中药制剂

对糖尿病足有一定疗效, 与其他药物联合应用可获得更好的效果, 如川芎嗪、红花注射液、复方丹参、疏血通等^[5-8]。

高压氧治疗:充分的组织氧压是控制感染和伤口愈合的重要因素。高压氧治疗不仅能增加血氧含量, 还可以减轻水肿, 促进肉芽组织的形成, 增加胶原的产生, 提高新生组织的血管形成, 加强中性粒细胞的杀菌作用, 有利于溃疡愈合, 加快愈合速度, 降低截肢率。

自体干细胞移植:干细胞是一种存在于骨髓造血中枢, 具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的细胞群体, 能够分化为全能干细胞、多能干细胞和专能干细胞。其在不同诱因条件下可分化为内皮细胞、神经细胞、基质细胞等。

2002年国际上首次报道了应用患者自体骨髓干细胞移植治疗缺血性下肢血管病, 取得了满意疗效, 未发现明显的不良反应。国内有学者刺激干细胞释放到外周血, 提取外周血干细胞移植治疗下肢缺血性血管病, 亦取得良好的疗效。从国内外临床上的应用情况来看, 干细胞移植取得了缓解症状、降低截肢平面甚至避免截肢的良好效果, 充分说明了这一技术的可行。

2.1.2 糖尿病足的微创介入疗法 超声消融技术是指利用特定波长的超声波, 有效识别动脉壁与阻塞硬化斑块和血栓, 并且具有选择性, 直接消融血栓和动脉硬化斑块, 使发生狭窄或闭塞的血管再通, 对糖尿病所致下肢动脉硬化闭塞症有治疗作用, 而远端血管不受影响^[9]。超声消融血栓有空穴、机械破碎和间接助溶作用^[10]。目前, 空穴破裂作用是超声消融术的主要作用。因为粥样硬化斑块、血栓等属于非弹性物质, 正常的动脉壁有丰富的胶原质和弹性成分, 而空穴破裂作用的敏感性与组织的弹性呈反比, 因此其对超声消融敏感性很高。

超声消融手术方案根据血管造影结果确定, 将导管通过股动脉将送至病灶, 疏通狭窄或闭塞的动脉血管, 糖尿病足下肢缺血状态得到有效改善^[10]。但是其仍存在不足: ①对有些动脉的动脉闭塞消融效果不佳, 比如腘动脉以下的动脉。王寅冬等^[11]的研究中胫后动脉闭塞7例患者中, 超声消融治疗后1例成功, 6例失败。②无良好的远端流出道, 疗效无法进一步巩固及改善。

尽管经皮腔内血管成形及支架置入等已成为有效的治疗下肢缺血的方法, 但有各自局限性。国内外研究资料表明, 骨髓、外周血、脐血中存在能分化为内皮细胞并参与血管新生的内皮祖细胞^[12-13]。内皮前体细胞在血管再生和心血管疾病治疗中具有广阔的应用前景。

2.2 内皮前体细胞 人体的干细胞群包括有多种干/祖细胞, 含有造血干/祖细胞、间充质干细胞、内皮前体细胞和非限制性体干细胞等^[14]。

内皮前体细胞是能增殖且分化为血管内皮细胞的一类祖细胞, 但在细胞表型却和成熟血管内皮细胞的不一样。其在骨髓、脐血、脾脏及外周血中均出现, 其受一系列细胞因子的调控, 增殖、分化为成熟内皮细胞, 正常生理情况下, 稳定血管内环境及修复受损血管内皮。

2.2.1 内皮前体细胞的来源 内皮前体细胞大多数来源于骨髓、脐血、外周血。从骨髓中得到内皮前体细胞, 不仅所需骨髓量大, 而且创伤和风险也较大; 外周血中内皮前体细胞含量极其有限, 仅占单个核细胞的0.002%。

脐血内皮前体细胞应用的好处: ①细胞含量丰富, 为外周血内皮前体细胞的10倍^[15]。②脐血来源广泛。③获取方式为无损伤性, 采集简便, 对供者(新生儿和产妇)无不良影响。④不涉及伦理学问题。⑤对人类白细胞抗原错配有有很好的耐受性及很强的增殖能力^[16]。

2.2.2 内皮前体细胞的分离、纯化、鉴定 密度梯度离心法和贴壁筛选法两步法是目前国内外内皮前体细胞分离纯化最常用的方法^[17]。首先, 从骨髓、外周血、脐血中分离得到单个核细胞, 再经过贴壁筛选、纯化内皮前体细胞, 从而能够获得纯度较高的内皮前体细胞。内皮前体细胞体外诱导分化, 向成熟内皮细胞转化。该方法不仅在内皮前体细胞增殖和迁移能力方面明显高于成熟内皮细胞, 体外可大量扩增, 且操作简单、经济, 取材容易, 易于在临床得到广泛应用。

内皮前体细胞表达内皮细胞特异性的抗原: CD34⁺、CD133⁺和血管内皮细胞生长因子受体2⁺, 但是国内外很多研究发现, CD133⁺表达在体外培养由内皮前体细胞逐渐分化成为成熟内皮细胞的过程中逐渐减弱, 成熟血管内皮细胞不表达CD133⁺^[18]。内皮前体细胞分泌血管内皮细胞生长因子、肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子1等生长因子, 促进内皮细胞的成熟^[19-20]。

2.2.3 内皮前体细胞治疗糖尿病足 近年来, 国内外研究表明缺血以后可通过侧支循环的建立和血管的新生得到代偿^[21]。Toshner等^[22]将外周血来源的CD133⁺细胞在体外诱导分化为成熟内皮细胞, 从而有助于修复缺血肢体血流。这种细胞也表达CD34⁺, 并且具有高增殖分化的潜能, 以参与缺血性局部代偿血管重建过程促进血管生成^[23]。骨髓中也存在同样的细胞, 可在下肢缺血部位生成新的血管。

内皮祖细胞移植治疗为糖尿病足患者带来了新希望。此方法的干细胞的来源主要分为自体骨髓干细

胞和外周血干细胞2种。自体外周血内皮祖细胞移植的方法是：①采集的30-40 mL骨髓，分离出单个核细胞。②经过贴壁筛选、纯化内皮前体细胞，能够获得纯度较高的内皮前体细胞。③制备成50-60 mL细胞悬液。④在患病肢体的缺血部位进行肌肉内注射。自体外周血内皮祖细胞移植的方法是：①动员外周血和采集外周血干细胞。②皮下注射450-600 $\mu\text{g}/\text{d}$ 的重组人粒细胞集落刺激因子5 d。③第6天，血细胞分离机采集单个核细胞，循环血量8 000-10 000 mL，采集单个核细胞约为100 mL。④经过贴壁筛选、纯化内皮前体细胞，能够获得纯度较高的内皮前体细胞。⑤做成细胞悬液，移植入缺血肢体肌肉内，并给予皮下注射低分子肝素钙5 000 U/d。缺血部位在3-6个月后可有新生血管。杨晓凤^[24]、郭连瑞等^[25]将造血干细胞移植入家兔和大鼠模型的患病肢体，病理切片可见有大量毛细血管新生，充分改善组织缺血状态，并且通过荧光标记证实了移植细胞中的内皮前体细胞参与生成新的毛细血管。研究表明，在细胞移植过程中，高白细胞血症可引起心脑血管意外或血栓形成。因此，在干细胞动员时，必须每天监测外周血白细胞总数及患者的症状，同时应用流式细胞仪监测采集前后的CD34⁺细胞变化，并且必须观察患者足部疼痛、皮温、溃疡是否愈合、间歇性跛行是否好转。目前，国内外已经有多家医院使一些糖尿病足患者获得了康复，并且已经逐步地规范这项技术，这些成功的病例表明，自体骨髓干细胞和外周血干细胞移植血管再生技术已成为必不可少的手段之一。

2.2.4 外周血内皮前体细胞移植 Colombo等^[26]的研究表明血管损伤后除局部血管壁细胞参与损伤血管修复外，外周血及骨髓中的内皮前体细胞也参与修复过程。有学者证明糖尿病患者外周血中内皮前体细胞数量较非糖尿病患者明显减少。徐寒松等^[27]证实糖尿病比正常人内皮前体细胞数量显著减少。在高血糖浓度环境中，并且增殖能力减低，内皮前体细胞的数量和增殖能力与血浆糖化血红蛋白水平有关。如果能够早期治疗、及时降低血糖在正常范围内，可以增加内皮前体细胞的数量并改善其功能，进而促进糖尿病血管病变的恢复。

内皮前体细胞的特性是：①具有迟发高增殖潜能是一个重要特性。②内皮前体细胞在15-20 d后可迅速生长的“鹅卵石”样内皮细胞，并能稳定传30代以上。③增殖能力是内皮细胞的10倍，但成熟内皮细胞在体外培养，4-6周后增殖能力明显下降。④内皮前体细胞具有很强的迁移能力。⑤分泌粘连蛋白、I和III型胶原等细胞外基质。

2.2.5 内皮前体细胞移植治疗糖尿病足面临的问题首要的问题是，到目前为止国内外没有标准的分离、

培养内皮前体细胞程序，常用的内皮前体细胞分离方法是免疫磁珠分选法和密度梯度离心法。免疫磁珠分选法特点是：①内皮前体细胞纯度较高。②数量非常少。③细胞活性影响大，不能增殖。④价格昂贵。⑤操作复杂，容易污染。密度梯度离心法分离内皮前体细胞的特点是：①细胞纯度不高。②经过贴壁筛选可获得相对较高纯度的内皮前体细胞。③操作简单。④经济。

第二，鉴定内皮前体细胞存在很大困难。在国内外大多数研究认为，同时吸收Dil-ac-LDL和结合FITC-UEA-I和(或)CD133⁺、CD34⁺、血管内皮细胞生长因子受体2⁺为正分化的内皮前体细胞，认为功能性前体内皮细胞表达CD34、血管内皮细胞生长因子受体2和CD133。内皮前体细胞表达CD133，并且随着内皮前体细胞逐渐转变为成熟内皮细胞，CD133表达迅速下降，直至不表达，同时CD133也是造血干细胞早期标志^[28-30]。

2.3 整联蛋白与血管生成 内皮细胞的增殖在血管新生这一复杂的过程起着关键作用^[31]。从内皮细胞的活化、增殖、迁移，到形成新生的血管。活化的内皮细胞会产生蛋白水解酶，其基膜和细胞外基质被降解，并且增殖，迁移至受损或者新生血管周围，形成了原始血管芽。内皮细胞在这个过程受内环境信号控制。

整合素是细胞黏附受体家族成员，在细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间起介导黏附作用的一种蛋白，并且在传导细胞与细胞外基质之间的双向信号的过程中极其重要的作用。整合素是由 α 和 β 两个亚单位组成，它们之间以非共价形式相连，目前研究已经发现形成24个 $\alpha\beta$ 异二聚体^[32]。整合素主要作用是抑制细胞凋亡，对细胞有延迟死亡或促进生长的作用，当与生长因子受体协同作用时可促进内皮前体细胞的增殖^[33]。

不同的整合素分布在不同部位和不同激活状态下的血管内皮细胞表面表达。许多的内皮细胞整合素对血管生成过程中的细胞生长、移行、连接起重要作用。包括 $\alpha1\beta1$ 、 $\alpha2\beta1$ 、 $\alpha4\beta1$ 、 $\alpha5\beta1$ 、 $\alpha6\beta1$ 、 $\alpha6\beta4$ 、 $\alpha9\beta1$ 、 $\alpha\nu\beta3$ 、 $\alpha\nu\beta5$ 等。多项研究表明，血管生成是多种整合素分子参与的复杂过程，抑制单一的某种整合素并不能完全抑制血管生成。体外实验中，单用整合素 $\alpha\nu\beta3$ 或 $\alpha\nu\beta5$ 的拮抗剂并不足以影响内皮细胞形成血管管腔的能力，而同时抑制整合素 $\alpha\nu\beta3$ 或 $\alpha\nu\beta5$ 的功能，血管生成受阻，说明整合素 $\alpha\nu\beta3$ 或 $\alpha\nu\beta5$ 的协同作用^[34]。抑制其中1种整合素，另一种能产生补偿作用。在缺血发生后两至三小时，大量血管内皮细胞表面整合素 $\alpha\nu\beta3$ 产生。整合素 $\alpha\nu\beta3$ 的作用主要是识别大量的配位体，从而增加内皮细胞黏附、迁移及对细胞外基质应答的能力。在静息状态下，血

管内皮细胞表面整合素 $\alpha V\beta 3$ 的表达处于低水平。在发生血管新生时, 在细胞因子和生长因子的刺激下, 其表达上升^[35]。

2.4 血管内皮细胞生长因子受体2 血管内皮细胞生长因子及其受体血管内皮细胞生长因子受体1、血管内皮细胞生长因子受体2、血管内皮细胞生长因子受体3, 在血管生成中占有重要作用。血管内皮细胞生长因子有5个成员血管内皮细胞生长因子A、血管内皮细胞生长因子B、血管内皮细胞生长因子C、血管内皮细胞生长因子D以及胎盘生长因子。血管内皮细胞生长因子A主要结合在血管内皮细胞生长因子受体2和血管内皮细胞生长因子受体1, 血管内皮细胞生长因子B和胎盘生长因子只结合在血管内皮细胞生长因子受体1上, 血管内皮细胞生长因子C和血管内皮细胞生长因子D只结合在血管内皮细胞生长因子受体3上。不同的受体在不同的细胞上表达不一致, 血管内皮细胞生长因子受体1主要表达在造血干细胞上, 血管内皮细胞生长因子受体2主要表达在血管内皮细胞上, 血管内皮细胞生长因子受体3主要表达在淋巴内皮细胞上。血管内皮细胞生长因子的表达受到低氧转录因子1的调控。血管内皮细胞生长因子及其受体可以促进内皮细胞的异常增生、迁移和存活, 增强血管的通透性, 在血管新生过程中起重要作用^[36]。血管内皮细胞生长因子是血管内皮细胞有丝分裂特异性诱导剂。血管内皮细胞生长因子受体磷酸化后还可通过激活磷脂酰肌醇3激酶, 促进抗凋亡分子的表达, 阻止内皮细胞凋亡。

血管内皮细胞生长因子受体2是血管系统最早出现的细胞标志, 为胚胎时期血管发育的关键受体, 可同时表达于成熟血管内皮细胞和造血干细胞上, 是内皮前体细胞的高富集性分子标记之一。近年来研究发现, 血管内皮细胞生长因子能诱导骨髓源性内皮前体细胞活化, 并从骨髓进入血液循环中, 血管内皮细胞生长因子受体2与其配体血管内皮细胞生长因子结合, 对于促进内皮前体细胞的分化成熟及调节生物学活性起到重要作用^[33], 能够增强血管新生的作用^[37]。血管内皮细胞生长因子受体2作为酪氨酸激酶家族成员之一, 可被酪氨酸激酶抑制剂选择性阻滞。

有些学者研究了关于整合素 $\alpha V\beta 3$ 与血管内皮细胞生长因子受体发生相互作用位点, 将删除或由 B1 的细胞质区替代 $\alpha V\beta 3$ 中 $\beta 3$ 的细胞质区, 发现 $\beta 3$ 的细胞外域和 αV 亚单位就足以与血管内皮细胞生长因子受体联系。因此认为, $\alpha V\beta 3$ 和血管内皮细胞生长因子受体相互作用增强血管内皮细胞生长因子受体的活性发生在细胞外区域^[38]。血管内皮细胞生长因子结合血管内皮细胞生长因子受体, 触发细胞质的信号传导, 依赖于整合素 $\alpha V\beta 5$ 的配位体和酪氨酸激酶Src的

活化^[39]。这导致血管内皮细胞钙黏蛋白细胞质区的磷酸化, 促进连环蛋白/钙黏蛋白复合物的分解, 导致了细胞-细胞间连接的分离。因此, 整合素 $\beta 5$ 的遗传缺陷可以减弱血管内皮细胞生长因子介导的血管通透性。

血管内皮细胞与纤维蛋白黏附后生长因子受体蛋白的表达明显减少, 而与玻连蛋白黏附后血管内皮细胞生长因子受体等受体蛋白表达明显增加。这种表达的增加依赖于整合素酪氨酸磷酸化信号。其中, 整合素 $\alpha V\beta 3$ 与玻连蛋白的连接对于血管内皮细胞生长因子受体2在细胞表面表达的检出是必须的^[40]。在体外血管新生模型的研究发现, $\alpha V\beta 3$ 还参与了血管内皮细胞生长因子触发的血管内皮细胞生长因子受体2激活的全过程。黏附于玻连蛋白的内皮细胞血管内皮细胞生长因子受体磷酸化增加, 血管内皮细胞生长因子的促有丝分裂作用被 $\alpha V\beta 5$ 提高。血管内皮细胞生长因子/血管内皮细胞生长因子受体系统能增强整合素 $\alpha V\beta 5$ 对玻连蛋白的识别和结合, 从而促进细胞黏附, 且在血管内皮细胞生长因子浓度较低时就能发挥明显的作用^[41]。

整合素和血管内皮细胞生长因子对血管新生过程中内皮细胞增生、分化、迁移和存活起重要作用^[42]。一些研究证明, 在促进血管新生过程中, 两者相互依赖, 相互影响^[43]。整合素 $\alpha V\beta 5$ 在大量的细胞和组织表达, 介导与细胞外基质的紧密接触。血管内皮细胞生长因子活化后, 内皮细胞的 $\alpha V\beta 5$ 被动员, 促进细胞增殖、迁移和对组织的侵袭。血管内皮细胞生长因子和整合素 $\alpha V\beta 5$ 在血管生成中起协同作用。

高血糖“代谢记忆”现象解释为早期强化降低血糖可以获得糖尿病并发症的长期收益, 而长期高血糖水平诱导的代谢应激可以导致靶器官的持续性异常(如视网膜、肾脏、心脏以及下肢动脉), 即使是后期通过干预降低到理想的血糖水平, 高血糖时期的损害仍然有所遗留, 以至于表现出相对高的糖尿病并发症发病率。内皮细胞损伤作为糖尿病并发症的中心环节, 在代谢记忆损伤机制中扮演着很重要的角色, 血管内皮是动脉粥样硬化形成的第一道防线, 内皮功能障碍是糖尿病血管并发症的重要病理生理改变。内皮功能是反映糖尿病并发症的敏感性和特异性指标。细胞增殖、凋亡之间的平衡是维持机体正常生理功能重要的因素。细胞异常凋亡在许多疾病尤其是心血管疾病的形成中起重要作用, 异常凋亡存在于动脉硬化斑块的內皮细胞, 参与了动脉粥样硬化的形成^[44]。短暂高血糖对血管内皮细胞增殖和凋亡的影响可以间接反映“代谢记忆”效应在糖尿病并发症内皮损伤中的作用。

内皮前体细胞在损伤血管局部所处的微环境对

于其分化及转归至关重要。根据文献报道显示, 两种因素的作用对于促进内皮前体细胞分化是必需的: 其一是黏附分子/整合素家族之间的相互作用; 其二是生长因子/剪切力的作用。

内皮前体细胞在趋化因子的作用下定向归巢至移植损伤血管内膜, 要完成黏附并定位于损伤的部位还需要血管内膜表达各种黏附分子的帮助。研究显示, 移植血管内皮细胞表面可以表达多种黏附分子^[45-48], 包括细胞间黏附分子1、血管细胞黏附分子1、P-选择素以及E-选择素等, 对促进内皮前体细胞黏附发挥重要作用^[49]。Rey等^[50]在小鼠移植血管病变模型中发现, 敲除血管细胞黏附分子1基因能明显减轻移植性动脉硬化, 这一结果表明了黏附分子在移植血管病变过程中所起的重要作用。此外, 内皮前体细胞表面也可表达整合素, 促进其黏附于受损血管内膜表面^[51-54]。因此, 内皮前体细胞表面的受体与活化或受损内皮细胞表面相应配体间的相互作用对于内皮前体细胞在移植中的归巢定位也具有重要意义。

近年研究发现, 糖尿病通常伴有血管内皮细胞生长因子的升高, 而血管内皮细胞生长因子不仅是促进内皮细胞增殖和血管生成的重要因子, 也是一种强力的血管通透因子。研究表明, 内皮细胞 $\beta 3$ 整合素胞浆结构域通常与受体酪氨酸激酶血管内皮细胞生长因子受体2形成分子复合物参与血管内皮细胞生长因子介导的生理反应^[55], 在血管内皮通透性的调控中, $\beta 3$ 整合素可能与血管内皮细胞生长因子受体2存在相互协调的机制^[56-57]。 $\beta 3$ 整合素基因敲除鼠的血管内皮受到血管内皮细胞生长因子刺激后表现出很高的通透性, 表明 $\beta 3$ 整合素在调节血管对血管内皮细胞生长因子的反应中发挥作用。与此相似, 高糖可以增强内皮细胞对血管内皮细胞生长因子的敏感性, 使其通透性增强18-23倍^[58], 高糖与非活化状态的 $\beta 3$ 整合素的相互作用破坏血管内皮细胞生长因子受体2- $\beta 3$ 整合素功能复合体, 并导致内皮细胞出现类似于 $\beta 3$ 整合素被敲除后的变化, 但是这一推测仍有待证实。

有文献报道血管内皮细胞生长因子能够促进脐静脉内皮细胞黏附和迁移的能力^[59-60], 但这种促进作用受到整合素拮抗剂抑制, 血管内皮细胞生长因子对脐静脉内皮细胞的作用主要是通过直接增加血管内皮细胞生长因子受体2的数量及功能或通过血管内皮细胞生长因子受体2与整合素的相互调节来实现的。

3 讨论 Discussion

内皮前体细胞是能增殖且分化为血管内皮细胞

的一类祖细胞, 但在细胞表型却和成熟血管内皮细胞的不一样。其在骨髓、脐血、脾脏及外周血中均出现, 其受一系列细胞因子的调控, 增殖、分化为成熟内皮细胞, 正常生理情况下, 稳定血管内环境及修复受损血管内皮。尽管经皮腔内血管成形及支架置入等已成为有效的治疗下肢缺血的方法, 但有各自局限性。国内外研究资料表明, 骨髓、外周血、脐血中存在能分化为内皮细胞并参与血管新生的内皮祖细胞。内皮前体细胞在血管再生和心血管疾病治疗中具有广阔的应用前景。

自从Folkman提出血管新生的概念后, 这个领域已成为一个研究热点。在促进血管新生过程中, 两者相互依赖, 相互影响。整合素 $\alpha \beta 5$ 在大量的细胞和组织表达, 介导与细胞外基质的紧密接触。血管内皮细胞生长因子活化后, 内皮细胞的 $\alpha \beta 5$ 被动员, 促进细胞增殖、迁移和对组织的侵袭。血管内皮细胞生长因子和整合素 $\alpha \beta 5$ 在血管生成中起协同作用。目前尽管对整合素和血管内皮细胞生长因子在血管新生过程中的作用研究比较深入, 但仍有许多机制还不清楚, 加之调节血管新生的各个环节因素众多、机制复杂, 因此要彻底明确整合素和血管内皮细胞生长因子的作用机制尚需进一步研究。

作者贡献: 第一作者和通讯作者构思并设计综述, 分析并解析数据, 所有作者共同起草, 经通讯作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 无涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 内皮前体细胞-是能增殖且分化为血管内皮细胞的一类祖细胞, 但细胞表型却和成熟血管内皮细胞的不一样。其在骨髓、脐血、脾脏及外周血中均出现, 受一系列细胞因子的调控, 增殖、分化为成熟内皮细胞, 正常生理情况下, 稳定血管内环境及修复受损血管内皮。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 黄斌, 赵纪春, 马玉奎, 等. 糖尿病足下肢动脉闭塞性病变的治疗选择[J]. 现代预防医学, 2011, 38(12): 372-376.
- [2] 张文夺, 姜桂喜, 李强, 等. 经皮腔内血管成形术治疗糖尿病足血管病变90例分析[J]. 中华普通外科杂志, 2011, 26(7): 283-290.
- [3] Romiti M, Albers M, Brochado FC, et al. Meta-analysis of infrapopliteal angioplasty for chronic critical limb ischemia. J Vasc Surg. 2008; 47(5): 1-15.

- [4] 李延铭.糖尿病足的分类分级法与治疗探讨[J].中国误诊学杂志, 2009,9(15):56-61.
- [5] 史国珍.糖尿病足的内科治疗[J].中国实用内科杂志,2007, 27(7): 39-43.
- [6] Ziegler D, Sohr CG, Nourooz J, et al. Oxidative stress and antioxidant defense in relation to the severity of diabetic polyneuropathy and cardiovascular autonomic neuropathy. *Diabetes Care*. 2004;27(9): 350-355.
- [7] Gnanaraj J, Gnanaraj D, Prasad A, et al. Salvaging a diabetic foot: a new cost-effective method. *Trop Doct*. 2012;42(2): 88-89.
- [8] Valabhji J. Foot problems in patients with diabetes and chronic kidney disease. *J Renal Care*. 2012;38(10): 99-108.
- [9] Kawamoto A, Asahara T, Losordo DW, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Radiat Med*. 2002;3(4):221 - 251.
- [10] 邢帅,陈剑秋,梁瑜祺,等.干细胞移植治疗下肢缺血性疾病的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(1):55-58.
- [11] 王寅冬,王爱林.超声消融联合自体干细胞移植治疗糖尿病足临床分析[J].黑龙江医学,2009,33(2):135-137.
- [12] Broun MA.,Zhang L, Levering VW, et al. Human Umbilical Cord Blood-Derived Endothelial Cells Reendothelialize Vein Grafts and Prevent Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30(11): 2150-2155.
- [13] Konstantinos S, Harald L, Gnerlich S, et al. Junctional Adhesion Molecule A Expressed on Human CD34+ Cells Promotes Adhesion on Vascular Wall and Differentiation Into Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(6): 1127-1136.
- [14] Choi K, Kennedy M, Kazarov A, et al. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*. 1998; 125(4): 725-732.
- [15] Iba O, Matsumbara H, Nozawa Y, et al. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation*. 2002;106(15): 2019-2025.
- [16] Assmus B, Tonn T, Seeger FH, et al. Red Blood Cell Contamination of the Final Cell Product Impairs the Efficacy of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(13): 1385-1394 .
- [17] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348(7): 593-600.
- [18] Bogoslovsky T, Spatz M, Chaudhry A, et al. Circulating CD133+CD34+ progenitor cells inversely correlate with soluble ICAM-1 in early ischemic stroke patients. *J Transl Med*. 2011; 26(9):145.
- [19] Fadini GP, Avogaro A. Potential manipulation of endothelial progenitor cells in diabetes and its complications. *Diabetes Obes Metab*. 2010;12(7): 570-583.
- [20] Steinmetz M, Nickenig G, Werner N, et al. Endothelial-regenerating cells: an expanding universe. *Hypertension*. 2010;55(3): 593-599.
- [21] Fadini GP, Boscaro E, Kreutzenberg S, et al. Time course and mechanisms of circulating progenitor cell reduction in the natural history of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2010;33(5): 1097-1102.
- [22] Toshner M, Voswinckel R, Southwood M, et al. Evidence of Dysfunction of Endothelial Progenitors in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(8): 780-787.
- [23] Jude EB, Oyibo SO, Chalmers N, et al. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity outcome. *Diabetes Care*. 2001;24(8):1433-1437.
- [24] 杨晓凤,徐波,王慧,等.家兔自体外周干细胞移植治疗下肢缺血的实验研究[J]. 中国实用内科杂志, 2005, 25(12):1103-1104.
- [25] 郭连瑞,谷涌泉,张建,等.不同途径移植骨髓单个核细胞治疗大鼠后肢缺血[J].中国临床康复, 2005, 9(10):57-60.
- [26] Colombo E, Marconi C, Taddeo A, et al. Fast reduction of peripheral blood endothelial progenitor cells in healthy humans exposed to acute systemic hypoxia. *J Physiol*. 2012; 590(3): 519-532.
- [27] 徐寒松,雷闽湘,孔德明,等.体外高浓度葡萄糖培养及黄芪干预人外周血内皮祖细胞的数量和增殖与分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011,15(32):6027-6031.
- [28] Liao YF, Chen LL, Zeng TS, et al. Number of circulating endothelial progenitor cells as a marker of vascular endothelial function for type2 diabetes. *Vasc Med*. 2010;15(4): 279-285.
- [29] 郑伟红,万亚峰. 从PBMCs及CD133免疫磁珠分选获得内皮祖细胞的体外研究[J]. 中国病理生理杂志,2010, 26(2):368-373.
- [30] Fadini GP,Sartore S,Albiero M,et al.Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(9): 2140-2146.
- [31] Maruotti N, Cantatore FP, Crivellato E, et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol*. 2006;21(5):557-566.
- [32] Carmona G, Chavakis E, Koehl U,et al.Activation of Epac stimulates integrindependent homing of progenitor cells. *Blood*. 2008;111(5): 2640-2646.
- [33] Gilcrease M. Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett*. 2007;247(25): 1-25.
- [34] Silvestre JS, Thery C, Hamard G, et al. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med*. 2005;11(5): 499-506.
- [35] Eliceiri BP, Cheresh DA. Role of alpha v integrins during angiogenesis. *Cancer J*. 2000;6(Suppl 3) : S245-249.
- [36] 刘文韬,陈国玉,夏建国,等.胃癌微卫星不稳定性与血管内皮生长因子表达关系的研究[J].医学研究生学报, 2007, 18(2): 37-40.
- [37] Yoon YS, Johnson IA, Park JS, et al. Therapeutic myocardial angiogenesis with vascular endothelial growth factors . *Mol Cell Biochem*. 2004;264 (1-2) : 63-74.
- [38] Weis S, Shintani S, Weber A, et al. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2004;113(6): 885-894.
- [39] Tsou R, Isik FF. Integrin activation is required for VEGF and FGF receptor protein presence on human microvascular endothelial cells. *Mol Cell Biochem*. 2001; 224(1-2):81-99.
- [40] Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, et al. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell*. 2000;6(4):851-860.
- [41] Borges E, Jan Y, Ruoslahti E. Platelet-derived Growth Factor Receptor β and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Bind to the β 3Integrin through Its Extracellular Domain. *J Biol Chem*. 2000;275(51):39867-39873.

- [42] Goyal A, Pal N, Concannon M, et al. Endorepellin, the angiostatic module of perlecan, interacts with both the $\alpha 2\beta 1$ integrin and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2): a dual receptor antagonism. *J Biol Chem.* 2011;286(29):25947-25962.
- [43] Rapraeger AC, Find all citations by this author (default). Or filter your current search Ell BJ, Find all citations by this author (default). Or filter your current search Roy M, VE-cadherin Stimulates Syndecan-1-Coupled IGF1R and Cross-Talk between $\alpha V\beta 3$ Integrin and VEGFR2 During the Onset of Endothelial Cell Dissemination in Angiogenesis. *FEBS J.* 2013;19(10):1111.
- [44] Kockx MM, Knaapen MW. The role of apoptosis in vascular disease. *J Pathol.* 2000;190(3): 267-280.
- [45] Jain S, Ward MM, O'Loughlin J, et al. Incremental increase in VEGFR1+ hematopoietic progenitor cells and VEGFR2+ endothelial progenitor cells predicts relapse and lack of tumor response in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(1): 235-242.
- [46] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J.* 1999; 18(14): 3964-3972.
- [47] Fadini GP, Sartore S, Agostini C, et al. Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30(51):1305-1313.
- [48] 付秀立, 赵焜, 王红祥, 等. 糖尿病周围血管病患者内皮祖细胞一氧化氮、内皮型一氧化氮合酶含量的变化[J]. 中国现代医学杂志, 2010,20(2):251-258.
- [49] Chavakis E, Aieher A, Heesehen C, et al. Role of $\beta 2$ -integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med.* 2005;201(1): 63-72.
- [50] Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2010;86(2): 236-242.
- [51] 李桂林, 杨宝钟. 内皮祖细胞在血管新生及血管组织工程化过程中的生物学意义[J]. 基础医学与临床, 2010,30(3):333-336.
- [52] Emmanouil C, Guillaume C, Urbich C, et al. Phosphatidylinositol-3-Kinase- γ is integral to homing functions of progenitor cells. *Circ Res.* 2008;102(8): 942-949.
- [53] McCall KD, Zutter M. Collagen receptor integrins: rising to the challenge. *Curr Drug Targets.* 2008;9(2): 139-149.
- [54] 董鹏, 王玉环, 张春虹. 血管内皮祖细胞在糖尿病周围血管并发症中的作用及治疗策略[J]. 医学综述, 2009,15(23):3630-3633.
- [55] Bogatcheva NV, Garcia JG, Verin D, et al. Role of tyrosine kinase signaling in endothelial cell barrier regulation. *Vascul Pharmacol.* 2003;39(4/5): 201-212 .
- [56] Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, et al. Regulation of integrin activity and signaling. *Biochim Biophys Act.* 2009; 1790 (6): 431-444.
- [57] Dvorak HF. Discovery of vascular permeability factor(VPF). *Exp Cell Res.* 2006;312(5): 522-526.
- [58] Gavrilovskaya IN, Gorbunove EE, Mackow NA, et al. Hantaviruses direct endothelial cell permeability by sensitizing cells to the vascular permeability factor VEGF, while angiotensin 1 and sphingosine 1-phosphate inhibit hantavirus-directed permeability. *J Virol.* 2008;82(12): 5797-5806.
- [59] Woodard AS, GarciaCardena G, Leong M, et al. The synergistic activity of $\alpha v\beta 3$ integrin and PDGF receptor increases cell migrati on. *J Cell Sci.* 1998;111(Pt 4): 469-478.
- [60] 王伟, 李戛, 王平忠, 等. 汉坦病毒感染对 $\beta 3$ 整合素及血管内皮生长因子受体2 的作用[J]. 中国病毒病杂志, 2011,1(4):254-259.

● 关于临床注册

SCI 数据库收录的《生殖医学系统生物学》杂志对临床试验注册的要求

● *Systems Biology in Reproductive Medicine* (《生殖医学系统生物学》), SCI收录杂志, ISSN: 1939-6368, 2012年影响因子1.847。主要发表研究原著, 通讯, 应用报告, 综述, 给编辑的信, 临床视角等类型稿件。

对临床试验注册的要求:《生殖医学系统生物

学》出版商Informa Healthcare 要求临床试验稿件在公开资源库中进行临床试验注册作为出版的必要条件。临床试验要在试验起步时或患者招募之前进行注册。临床试验注册号要写在稿件摘要方法部分。临床试验注册平台必须免费向公众开放, 并有非盈利为目的的组织管理。满足这些条

件的注册平台列表请参见世界卫生组织国际临床试验注册平台(ICTRP)。这项要求是根据国际医学期刊编辑委员会(ICMJE)指南而定的。欲了解更多信息, 请参阅 ICMJE 生物医学期刊 <http://www.icmje.org> 对投稿的统一要求。