

调控血管新生在治疗再生障碍性贫血中的作用*

黄莉锋¹ 邓姝² 林圣云²

[关键词] 再生障碍性贫血;血管新生;血管内皮生长因子;Notch信号通路;间充质干细胞

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2018.01.015

[中图分类号] R556.5 [文献标志码] A

The role of regulating angiogenesis in the treatment of aplastic anemia

Summary Aplastic anemia (AA) is a bone marrow hematopoietic failure disease, the immune system disorders have been considered as the main pathogenesis of the disease. In recent years, more and more studies have found that bone marrow microvascular system plays an important role in the process of disease, including occurrence, development and treatment of AA. Promoting angiogenesis was seen as a new treatment. In this article, we review the roles of vascular endothelial growth factor, mesenchymal stem cells and Notch signaling pathway in the regulation of bone marrow microvascularization and in the treatment of AA.

Key words aplastic anemia; angiogenesis; vascular endothelial growth factor; Notch signaling pathway; mesenchymal stem cells

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是一种以造血干细胞损伤和全血细胞减少为特征的疾病,有多种发病机制,总结为免疫机制异常、造血微环境改变和造血干细胞缺陷三大原因。目前多以自身免疫异常作为该病的研究重点和治疗依据,免疫抑制治疗可以改善病情的事实也证实了该研究治疗方向的准确性,而免疫异常也会导致造血微环境的破坏。造血微环境为造血细胞直接的生存环境,骨髓正常的造血功能离不开功能完善的微环境。骨髓微血管系统作为微环境的一部分,它的主要作用是为造血细胞运输氧气、营养成分、信号因子,同时运输代谢废物,造血细胞的生存离不开功能完善的血管系统。研究发现 AA 患者骨髓微血管密度(microvessel density, MVD)显著低于正常人^[1],低血管密度势必会影响骨髓血供,对造血细胞的成熟与分化不利。骨髓微血管作为骨髓基质的一部分,由骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)分化而来,故 BM-MSCs 的分化趋势决定了骨髓微血管的生成情况。Tripathy 等^[2]研究证实 AA 患者的 BM-MSCs 更易向脂肪细胞分化,这势必会影响其向血管内皮细胞方向的分化。由此可知完善的骨髓血管系统与 AA 的发生、发展密切相关。

骨髓微血管作为微环境的一部分,对 AA 的发

生、发展、预后均起重要的作用,MVD 是衡量骨髓微血管数量的一项指标,可以反映 AA 患者骨髓的增生情况。孙忠亮等(2009)研究发现中药川芎嗪能明显提高 AA 患者的骨髓微血管数量,骨髓微血管数量提高的同时,测得患者治疗后外周血网织红细胞、中性粒细胞、血小板、血红蛋白和骨髓造血细胞比例较治疗前明显升高,可知提高 MVD 将会给 AA 患者带来血常规和骨髓像的明显回升。杨方方等(2015)比较了 AA 患者与正常人的 MVD,结果显示 AA 患者骨髓 MVD 低于正常人;又比较了重型 AA(SAA)和非重型 AA(NSAA)患者的骨髓 MVD,发现 SAA 患者骨髓 MVD 显著低于 NSAA 患者,可见 MVD 与 AA 的发病和严重程度都密切联系,通过提高微血管生成的治疗可能改善患者预后。因此,促进骨髓微血管生成可以作为治疗 AA 的一种方法。

血管生成是一个复杂的过程,是现存的血管通过出芽的方式完成的。首先是血管壁的基底膜在蛋白分解酶的作用下分解,该处内皮细胞分裂增殖、扩散并转移,不断地向前移动形成管腔,以后基底膜形成,血管周细胞移入,新生血管再逐渐成熟。血管生成的过程中,一部分内皮细胞的极性改变,获得迁移及侵袭进入周围组织的能力,这些细胞被称为尖端细胞,而其他的内皮细胞不发生分化,此类细胞称为茎细胞。茎细胞在尖端细胞的引领下,侵袭进入周围组织形成有效的血管腔^[3]。内皮细胞若没有这种变化,则会形成没有管腔的新生血管。而且血管内皮细胞的来源有多种途径,可以从内皮祖细胞来源,也可以是多向分化的干细胞来源。MSCs 作为一种具有多向分化能力的干细胞,

* 基金项目:浙江省中医药科学研究基金项目(No: 2016ZA080);2016 年省医药卫生一般研究计划(No: 2016KYA151);国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项课题(No:JDZX2015121)

¹ 浙江中医药大学(杭州,310000)

² 浙江省中医院血液科

通信作者:林圣云, E-mail: lsyww2012@163.com

可以经诱导分化为内皮细胞。

MSCs 是最常见的一种成体干细胞,具有多向分化能力,在不同的诱导条件下可分化为不同的细胞类型,如内皮细胞、心肌细胞、基质细胞等。另外, MSCs 来源比较广泛,除了来源于骨髓,也可以从脂肪组织、胎血、脐血等组织中分离出来^[4]。Hamzic 等^[5]通过实验表明尽管 AA 的 MSCs 呈现典型的形态学和特异性间充质标记物,但基质形成减少,而且它们的增殖和克隆能力显著降低,并且维持造血的能力显著降低。Tripathy 等^[2]比较了 AA 患者与对照受试者骨髓 MSCs,发现两者 BM-MSCs 具有相似的形态、表型,但 AA 患者的骨髓 MSCs 具有更高的向脂肪细胞分化的潜能,故我们可以了解 AA 患者的 BM-MSCs 分化为血管内皮细胞的可能性变小,对骨髓 MVD 的维持会有一定的影响。张新龙等^[6]通过比较异体移植 BM-MSCs 前后 AA 患者血常规检查结果,发现移植 BM-MSCs 一段时间后患者血三系较前都有明显提高,提示移植效果显著。BM-MSCs 有利于调节造血,改善机体造血微环境,促进骨髓造血。AA 患者 BM-MSCs 存在一定的缺陷,随着 MSCs 研究的不断深入,输注异体 BM-MSCs 促进血管再生将会成为 AA 治疗的新模式。另一方面,在 MSCs 分化成为血管内皮细胞,逐渐形成成熟血管的过程中,离不开血管内皮生长因子(VEGF)和 Notch 信号通路的作用。两者可协同促血管生成,进一步丰富了治疗 AA 的手段。

1 VEGF 的作用

VEGF 是目前被研究的最透彻的促血管生成因子,其家庭成员众多,主要有 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 和 PlGF,其中 VEGF-A 主要参与血管生成的调节。血管内皮生长因子受体有 3 种,分别为 VEGFR-1、VEGFR-2 (KDR/Flk-1)、VEGFR-3 (Flt-4),其中 VEGFR-2 在参与血管生成的内皮细胞中高表达,VEGF 的信号主要通过它传导^[7]。

1.1 VEGF 与 AA 骨髓微血管

VEGF 作为一种促血管生成因子,与骨髓微血管的生成和骨髓 MVD 的维持密切相关。王能勇^[8]运用酶联免疫技术比较了 AA 患者与健康志愿者血清 VEGF 的水平,结果显示 AA 患者血清中的 VEGF 浓度显著低于健康志愿者,提示 VEGF 与 AA 有一定的相关性。Gupta 等^[9]研究发现 AA 患者骨髓 VEGF 浓度与骨髓 MVD 都偏低,二者呈正相关,相应浓度的 VEGF 对应相应的 MVD,体现出 VEGF 在骨髓微血管生成中的重要作用。王海霞等^[10]比较了 AA 患者治疗前后骨髓小粒中 VEGF 表达量的变化,治疗后 VEGF 表达量明显增高,且与临床疗效呈正比。另外,VEGF 作为一

种促血管生成因子,在维持血管通透性方面亦有重要作用,血管正常的通透功能对血管内外的物质交换非常重要。VEGF 在骨髓微血管的生成与功能的发挥两方面都有重要作用,其分泌水平的高低与 AA 的发病和严重程度都密切相关。

1.2 VEGF 在治疗 AA 中的作用

AA 患者骨髓造血与血管新生能力都减弱,血管内皮生成因子分泌减少,血管通透性降低,造成组织缺血缺氧。目前环孢素与十一酸睾酮是治疗 AA 的常用药物,梁月娜等^[11]通过单药使用十一酸睾酮与使用环孢素联合十一酸睾酮治疗 AA 患者一段时间,比较患者血三系和血清 VEGF 水平的差别,发现血三系水平的升高总是与血清 VEGF 浓度的升高同步,VEGF 水平的高低对治疗效果影响重大,我们可以猜测血常规的恢复可能是药物间接通过 VEGF 的作用实现的,具体的研究还需深入。杨方方等(2015)利用中药制剂复方皂矾丸治疗 AA 患者,治疗后 AA 患者骨髓 MVD、VEGF 表达较治疗前明显提高,提示 VEGF 也可以作为一项判断治疗效果与预后的指标。Kodama 等^[12]研究发现 VEGF 水平的高低与 AA 严重程度呈反比,VEGF 水平越高,疾病越轻,VEGF 水平越低,病情越危重。可见 VEGF 除了作为一种促血管生成因子,提高 MVD,改善造血微环境,可视为治疗 AA 的一种手段,还可以作为一项检测指标,判断 AA 治疗的效果和预后。

1.3 VEGF 促 MSCs 分化的作用

另一方面,VEGF 表达的减少还可能与 MSCs 的生存、分化和发育等功能的障碍相关。徐蓉等^[13]通过用含有 VEGF、hFGF 等的培养基诱导 MSCs 分化成为血管内皮样细胞(ELCs),可使原先呈长梭形,旋涡状生长的 MSCs 形态变圆,与血管内皮细胞(ECs)相似,细胞流式与免疫荧光的结果均显示 ELCs 也表达 ECs 特异性表达的 CD31。还有其他研究也成功通过含 VEGF 等其他不同细胞因子的培养基诱导 MSCs 向内皮细胞分化。尽管诱导条件不尽相同,但均含有 VEGF,表明 VEGF 是 MSCs 分化为血管内皮细胞的必要条件。AA 患者的 BM-MSCs 更易向脂肪细胞分化,可能与 VEGF 的分泌水平降低相关。

2 Notch 信号通路的作用

Notch 信号通路由 Notch 受体(Notch1-4)、Notch 配体(jagged1、jagged2、DLL1、DLL3 和 DLL4)和 CSL DNA 结合蛋白、其他的效应物和 Notch 的调节分子等组成。Notch 信号的产生通常是相邻细胞间的 Notch 配体与受体结合后的结果。Roderick 等^[14]证明 Notch 信号通路可调控编码 T-BET 的基因,促进 T-BET 的生成,而 T-BET 则是调节 Th1 细胞分化的关键转录因子,最后通过相关

免疫机制促成 AA 的发生、发展。另一方面,Notch 信号通路也可以促进骨髓微血管生成,与 MSCs 分化为血管内皮细胞亦密切相关,对治疗 AA 也有其有利的一面。

2.1 Notch 信号通路在促血管生成的作用

在 4 种 Notch 受体中,其中 DLL4 在 Notch 信号通路介导的血管生长发育中发挥至关重要的作用,与 VEGF 共同作用促进内皮细胞向尖端细胞和茎细胞的分化^[15]。此外,在血管生成发芽期间,尖端内皮细胞需要装备一种微结构,称为伪足,在血管基底膜降解后协助尖端细胞迁移。Spuul 等^[16]发现 VEGF-A/Notch 信号通路对尖端细胞发展出伪足有重要作用,抑制了 Notch 信号通路后尖端细胞便不能获得伪足。可见 Notch 信号通路对血管新生的多个方面都有作用。

2.2 Notch 信号通路促 MSCs 增殖分化的作用

另外,Notch 信号通路与 MSCs 的增殖分化亦有一定相关性。张俊等(2011)使用相关通路阻断剂后,不能完全抑制 VEGF 对 MSCs 的增殖分化作用,这表明除了 MAPK、ERK 及 PI-3K 等信号通路外,可能还有其他的信号通路发挥 VEGF 促 MSCs 增殖分化的作用。廖凤玲等(2014)使用 Notch 通路阻断剂 DAPT 阻断 Notch 信号传导,使 VEGF 促大鼠 MSCs 的增殖作用明显受到抑制,说明 Notch 信号通路在骨髓 MSCs 增殖和分化的过程中起重要作用。

综上所述,本文就 Notch 信号通路、VEGF 和 MSCs 三者是如何相互作用促血管新生,以及血管生成后对治疗 AA 的影响作了简明的阐述。骨髓微血管系统作为骨髓微环境的重要部分,对 AA 的发生、发展及治疗预后都有重要影响。如何改善患者骨髓微环境从而治疗疾病已获得越来越多的关注,不同的研究思路和深度可能会收获不一样的研究效果,需待进一步深入与扩展。

参考文献

- [1] Wu DJ, Ye BD, Hu ZP, et al. Bone marrow angiogenesis in patients presenting with differential Chinese medicine syndrome: Correlation with the clinico-pathological features of aplastic anemia[J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19: 909—912.
- [2] Tripathy NK, Singh SP, Nityanand S. Enhanced adipogenicity of bone marrow mesenchymal stem cells in aplastic anemia [J]. *Stem Cells Int*, 2014, 2014: 276862.
- [3] Eilken HM, Adams RH. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22: 617—625.
- [4] Larijani B, Aghayan HR, Goodarzi P, et al. GMP-grade human fetal liver-derived mesenchymal stem cells for clinical transplantation[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1283: 123—136.
- [5] Hamzic E, Whiting K, Gordon Smith E, et al. Characterization of bone marrow mesenchymal stromal cells in aplastic anaemia [J]. *Br J Haematol*, 2015, 169: 804—813.
- [6] 张新龙, 陆益龙. 骨髓间充质干细胞治疗再生障碍性贫血的临床分析[J]. *中国继续医学教育*, 2015, 7(33): 108—109.
- [7] Kiselyov A, Balakin KV, Tkachenko SE. VEGF/VEGFR signalling as a target for inhibiting angiogenesis [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2007, 16: 83—107.
- [8] 王能勇. VEGF 在再生障碍性贫血中的表达及其意义[J]. *中外医疗*, 2014, 33(15): 63—64.
- [9] Gupta P, Khurana N, Singh T, et al. Bone marrow angiogenesis in aplastic anemia—a study of CD34 and VEGF expression in bone marrow biopsies[J]. *Hematology*, 2009, 14: 16—21.
- [10] 王海霞, 王安全, 田丛丛, 等. 愈障颗粒对非重型再生障碍性贫血患者骨髓小粒中 VEGF 表达的影响[J]. *陕西中医学院学报*, 2013, 36(3): 92—94.
- [11] 梁月娜, 张雅西, 覃永亮, 等. 环孢素 A 联合十一酸睾酮治疗慢性再生障碍性贫血的效果及不良反应探讨[J]. *临床和实验医学杂志*, 2016, 15(16): 1604—1606.
- [12] Kodama Y, Okamoto Y, Hashiguchi T, et al. Vascular endothelial growth factor corrected for platelet count and hematocrit is associated with the clinical course of aplastic anemia in children[J]. *Int J Hematol*, 2012, 95: 494—499.
- [13] 徐蓉, 徐金勇, 刘玮. 骨髓间充质干细胞定向分化为血管内皮样细胞的实验研究[J]. *生物医学工程杂志*, 2014, 31(2): 389—393.
- [14] Roderick JE, Gonzalez-Perez G, Kuksin CA, et al. Therapeutic targeting of NOTCH signaling ameliorates immune-mediated bone marrow failure of aplastic anemia[J]. *J Exp Med*, 2013, 210: 1311—1329.
- [15] 王彩琴, 郑惠珍. Delta 样配体 4/Notch 信号通路及血管新生的研究进展[J]. *广东医学院学报*, 2010, 28(6): 687—688.
- [16] Spuul P, Daubon T, Pitter B, et al. VEGF-A/Notch-induced podosomes proteolyse basement membrane collagen-IV during retinal sprouting angiogenesis[J]. *Cell Rep*, 2016, 17: 484—500.

(收稿日期: 2016-11-21)