

· 专家述评 ·

内皮祖细胞移植在糖尿病视网膜病变中的应用现状及挑战

栾蓉 邵彦 李筱荣

天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼视光学院 天津医科大学眼科研究所 国家眼耳鼻喉疾病临床医学研究中心天津市分中心 天津市视网膜功能与疾病重点实验室, 天津 300384
通信作者: 李筱荣, Email: xiaorli@163.com

【摘要】 内皮祖细胞(EPCs)是具有血管生成潜能的祖细胞,其主要功能一方面是通过旁分泌促血管生成因子及神经保护因子而发挥作用,另外一方面是具有向血管内皮细胞分化的能力,并将自身整合到新形成的毛细血管中,因而在血管修复和神经保护中发挥重要作用。EPCs 的表面标志物和功能研究是 EPCs 研究的基础。目前一系列临床试验、动物实验和离体细胞学研究表明,EPCs 的自体移植或与其他细胞联合移植可促进视网膜血管修复,改善视网膜功能且安全性较好。糖尿病视网膜病变(DR)被定义为由全身代谢异常引起的视网膜神经血管单位(NVU)受损的难治性视网膜疾病,EPCs 数目改变及功能受损参与 DR 的发生和发展,眼科医师应该关注基于 EPCs 的疗法对 DR 的治疗意义。目前 DR 的治疗策略包括 EPCs 移植、EPCs 与其他细胞联合移植以及内源性 EPCs 的调节,EPCs 独特的生物学特性为其在修复 NVU 损伤及 DR 防治方面提供许多可能性。本文从 EPCs 的起源、生理病理状态、功能、治疗策略、临床应用 5 个方面展开,介绍 EPCs 在 DR 中的最新研究进展,同时对 EPCs 治疗存在的问题和技术瓶颈进行讨论。

【关键词】 糖尿病视网膜病变/治疗; 内皮祖细胞; 血管内皮损伤; 神经保护; 细胞疗法

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81900891); 天津市医学重点学科(专科)建设项目(TJYXZDXK-037A); 天津市京津冀基础专项项目(19JCZDJC64000)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221005-00468

Application studies and challenges of endothelial progenitor cells transplantation for diabetes retinopathy

Luan Rong, Shao Yan, Li Xiaorong

Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Tianjin Branch of National Clinical Research Center for Ocular Disease, Eye Institute and School of Optometry, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China
Corresponding author: Li Xiaorong, Email: xiaorli@163.com

【Abstract】 Endothelial progenitor cells (EPCs) are progenitor cells possessing vasculogenic potential. The main function of EPCs is to play a role by paracrine angiogenic factors and neuroprotective factors. EPCs also have the ability to differentiate into endothelial cells and integrate themselves into newly formed capillaries. Therefore, EPCs play an important role in vascular repair and neuroprotection. The research on surface markers and functions of EPCs is the basis of EPCs research. A series of clinical trials, animal and cell experiments show that EPCs transplantation and joint transplantation of EPCs and other cells can promote vascular repair and improve retinal function with good safety. EPCs are expected to be an effective treatment for diabetic retinopathy (DR). DR is now defined as a refractory eye disease with retinal neurovascular unit (NVU) injury associated with systemic metabolism abnormality. Change in EPCs count and damage of EPCs function are involved in the occurrence and development of DR. Ophthalmologists should pay attention to the early managing approach of EPCs. Current treatment strategies include transplantation of EPCs, joint transplantation of EPCs with other cells, and regulation of endogenous EPCs. The unique biological characteristics of EPCs provide many possibilities in repairing retinal NVU injury and DR prevention and treatment. This article introduces the latest research progress of EPCs for DR from five aspects including the origin of EPCs, physiological and pathological state, function, treatment strategy and clinical application. At the same time, the existing problems and technical bottlenecks will also be discussed.

【Key words】 Diabetic retinopathy/therapy; Endothelial progenitor cells; Vascular endothelial injury;



Neuroprotection; Cell therapy

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81900891); Tianjin Key Medical Discipline (Specialty) Construction Project (TJYXZDXK-037A); Natural Science Foundation of Tianjin (19JCZDJC64000)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221005-00468

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的主要微血管并发症之一,是全世界劳动年龄人口视力下降或致盲的主要原因。研究表明,我国 2 型糖尿病患者 DR 的总患病率为 11.9%~43.1%,其中 4.4%~13.8% 的患者视力下降^[1]。目前 DR 的主要治疗方法为激光或者手术,对于重度增生性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)患者疗效欠佳。抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)药物玻璃体腔注射是临床上抑制视网膜新生血管的重要手段,但该疗法存在增加视网膜组织纤维化的作用,增加视网膜功能下降或牵拉性视网膜脱离等一系列并发症的风险。近年来人们对 DR 病理机制的认识逐渐加深,认为 DR 的早期病理变化并不仅仅是单纯的微血管改变,而是视网膜神经血管单元(neurovascular unit, NVU)的损伤,提示我们应探寻特异性的治疗策略。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)具有血管修复和神经保护能力,为 DR 的预防和治疗提供了有潜力的研究方向。

1 从神经血管单元角度认识 DR

视网膜是具有高度组织特异性的神经血管组织,复杂的神经网络与血管组织的相互耦合形成了精密的结构和功能网络——NVU,包含神经元、视网膜血管细胞(血管内皮细胞、周细胞)及胶质细胞(星形胶质细胞、Müller 细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞),对维持血-视网膜屏障结构和功能的完整性、调节视网膜血流具有重要作用。

DR 的病理过程中,视网膜神经元凋亡和微血管组织损伤共同引起视网膜结构和功能异常,而视网膜神经退行性病变的发生先于微血管损伤。谷氨酸盐是视网膜的主要兴奋性神经递质,在糖尿病早期阶段,由多个途径介导的谷氨酸盐兴奋毒性和神经保护因子分泌失衡可引起一系列机体和组织的氧化应激及炎症反应,导致突触后神经元细胞内钙超载,进而诱导细胞死亡^[2]。视网膜的神经组织病变产生多种代谢产物,激活胶质细胞而分泌大量炎症因子,如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素(interleukin, IL)1 β 等,触发血管内皮细胞的损伤,破坏微血管结构的完整性,并进一步影响神经细胞的代谢及功能,加重神经组织损害,引起神经血管

耦联结构和功能逐渐崩解、血管通透性异常及局部血流调节失衡,导致血-视网膜屏障破坏。此外,血管组织结构的进一步破坏导致管腔闭塞,血流灌注不足,视网膜缺血缺氧,刺激多种血管生成因子的产生,导致视网膜新生血管的形成。

2 EPCs 的生物学特性

2.1 EPCs 的表面标志物

CD34⁺细胞首次从成人外周血循环中分离出来,被认定为 EPCs 细胞群体。CD34⁺细胞在血管生长因子刺激下具有向血管内皮细胞分化的能力。然而,CD34 并不是 EPCs 的特异性标志物,2000 年研究者发现了另一个祖细胞标志物——造血干细胞,并将外周血中能够共表达 CD133、CD34、血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR2)等干细胞表面标志物的细胞群体定义为 EPCs。然而,之后的研究证明,这些细胞群体还表达巨噬细胞/单核细胞标志物,如 CD14、CD45 和 CD115,并且增生能力有限,不能分化为血管内皮细胞,因而不能称之为完全意义上的 EPCs。目前多数研究将 CD34⁺/VEGFR2⁺/CD45⁻细胞称为 EPCs。EPCs 存在不同的分型和界定,主要是因为不同的研究者在分析特定细胞群的功能变化时选择的表面标志物谱有所不同。

2.2 EPCs 的体外培养

根据培养时间的不同可将体外培养的 EPCs 分为早期 EPCs 和晚期 EPCs^[3]。早期 EPCs 在培养的 1 周以内出现,定义为髓系血管生成细胞(myeloid angiogenic cells, MACs),主要特征为共表达 CD133 和 CD117,这些细胞不具备分化为血管内皮细胞的能力,但是依然具有造血细胞的特点,可分泌多种生长因子和神经营养因子,在血管生成和神经保护中发挥调节作用。晚期 EPCs 在培养的 4 周内出现,为生长内皮细胞(outgrowth endothelial cells, OECs),又称为内皮集落形成细胞(endothelial colony forming cells, ECFC),其免疫表型为 CD31、血管内皮细胞钙黏连蛋白、血管性血友病因子、CD146、VEGFR2 表达阳性,同时 CD45 和 CD14 表达阴性,具有分化为血管内皮细胞的能力。

3 DR 疾病过程中 EPCs 数目及功能改变

正常状态下,EPCs 细胞群体的锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)呈高表达,可清除线粒体中的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),在抗氧化应激过程中发挥重要作用。高糖高脂状态下,EPCs 线粒体生成增加,而 MnSOD 等抗氧化酶水平显著降低,激活氧化应激反应,导致线粒体功能障碍,诱发 EPCs 凋亡^[4],降低一氧化氮(nitric oxide, NO)合酶活性,减少 NO 的产生,而 NO 是动员骨髓 EPCs 向缺血区归巢的重要因子。在糖尿病这个病理

过程中,EPCs 中多种微小 RNA(micro RNA, miRNA)的表达也发生变化^[5-6],从而影响其分化为血管内皮细胞的能力。以上一系列调控因素可导致 DR 中 EPCs 的数量及功能发生改变(表 1,2),从功能层面减弱 EPCs 迁移、增生、黏附能力,加速细胞凋亡;从数量上,糖尿病患者 EPCs 数量减少,研究发现非增生性 DR 患者视网膜中 EPCs 减少,而增生性 DR 视网膜中 EPCs 数量增加^[7]。然而,也有研究发现,视网膜中 EPCs 的数量随着 DR 病情的进展而逐渐减少^[8],这可能与各实验采用不同细胞标志物进行细胞验证,或 DR 的分期和分型不同有关。

表 1 糖尿病及 DR 患者中 EPCs 数量与功能变化

作者	EPCs 标志物	结论
Bhahatwadekar 等 ^[5]	CD34 ⁺	DR 患者外周血 EPCs 中 miR-92 表达减少;miR-92 可以增强 CD34 ⁺ 细胞的功能
Garcia de la Torre 等 ^[6]	CD45 ⁻ , CD34 ⁺ , KDR ⁺ , CD45 ⁻ , CD34 ⁺ , CD144 ⁺	1 型糖尿病患者外周血中 EPCs 减少,EPCs 中 miR-126 表达增加
王凡等 ^[7]	CD34 ⁺ , CD309 ⁺ , VEGFR2 ⁺	非 DR、NPDR 患者外周血 EPCs 数量降低,PDR 患者外周血 EPCs 数量显著增多
Huang 等 ^[8]	CD31 ⁺ , VEGFR2 ⁺ , CD45 ⁻ , CD133 ⁺	2 型糖尿病 PDR 患者的 EPCs 含量显著低于 NPDR 患者
Jung 等 ^[9]	CD34 ⁺ , CD133 ⁺ , KDR ⁺	糖尿病患者 EPCs 凋亡率较高,其迁移及血管生成能力均受损
Segal 等 ^[10]	CD34 ⁺	糖尿病患者 CD34 ⁺ 细胞“刚性”增强,变形能力减弱,在 SDF-1 和 VEGF 诱导的迁移中表现出明显的功能障碍
陈海龙 ^[11]	CD34 ⁺ , VEGFR2 ⁺	PDR 患者的外周血 EPCs 数量明显增多,NPDR 及 PDR 患者的外周血 EPCs 黏附、迁移功能均受损
张惟等 ^[12]	CD34 ⁺ , KDR ⁺	PDR 患者外周血 EPCs 数量较正常者明显减少
Kady 等 ^[13]	CD34 ⁺	糖尿病引起视网膜内皮细胞和 CD34 ⁺ 循环血管生成细胞功能障碍
吉宗珊等 ^[14]	CD34 ⁺ , VEGFR2 ⁺	糖尿病患者外周血 EPCs 数量明显减少,NPDR 组与糖尿病组外周血 EPCs 数量无统计学差异。PDR 组与糖尿病组相比,EPCs 数量显著增加

注:DR:糖尿病视网膜病变;EPCs:内皮祖细胞;miR:微小 RNA;NPDR:非增生性糖尿病视网膜病变;PDR:增生性糖尿病视网膜病变;SDF-1:基质细胞衍生因子 1;VEGF:血管内皮生长因子

表 2 影响 EPCs 功能及数量的机制

调控因素	在糖尿病中的变化	对 EPCs 数量及功能的影响
NO	高血糖和 OxLDL 导致 NO 合酶活性降低,NAD(P)H 氧化酶生成增加,导致超氧化物的产生增加,减少可利用的 NO	血清中 NO 的水平与 EPCs 数量呈正相关,NO 的缺乏影响了骨髓中 EPCs 的动员及其归巢到缺血区的能力
EPCs 抗氧化酶	糖尿病 EPCs 线粒体中 ROS 产生增加,而 MnSOD 等抗氧化酶的表达和活性降低,不能抵抗氧化应激	EPCs 内过度氧化应激,导致线粒体功能障碍,激活了 EPCs 自噬途径,损害其修复血管能力
Akt/FoxO1 通路	高血糖通过氨基己糖途径,抑制 PI3K/Akt 通路的激活	PI3K/Akt 通路通过调节 FOXO 转录因子的活性来指导细胞的生长和分化过程。低活性的 Akt/FoxO1 抑制了 EPCs 的分化
miRNA	高糖状态下的氧化应激、晚期糖基化终产物的形成等影响了 EPCs 内多种 miRNA 的表达,从而影响其分化为血管内皮细胞的能力	

注:EPCs:内皮祖细胞;NO:一氧化氮;miRNA:微小 RNA;OxLDL:氧化低密度脂蛋白;ROS:活性氧簇;MnSOD:锰超氧化物歧化酶



4 EPCs 治疗 DR 的作用机制

早期和晚期 EPCs 具有不同的功能,在血管修复和神经保护方面共同发挥作用,具有治疗 DR 的潜在优势,其主要机制如下。

4.1 促进血管修复和再生

EPCs 的治疗机制主要基于其具有血管内皮细胞分化潜能。无论是骨髓分离纯化还是体外培养,EPCs 都能够整合进入血管并原位分化为成熟的血管内皮细胞,完成血管内皮的修复和血管重建。其中,作为高度表达内皮标志物的细胞群体,ECFCs/OECs 可重建视网膜血管网络。体外模型中,OEC 可以黏附和紧密连接的方式与视网膜微血管内皮细胞结合,并整合成血管系统;体内模型中,玻璃体腔注射自体 OEC 可使氧诱导视网膜病变 (oxygen induced retinopathy, OIR) 模型小鼠视网膜无血管区减少 40%,正常血管面积增加 31%,病理性血管减少 58%,证明 OEC 能够促进功能性新生血管的产生,减少病理性新生血管的形成^[15]。人 CD34⁺ 细胞在链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠模型中也显示出归巢整合及血管修复作用,玻璃体腔注射人骨髓来源的 CD34⁺ 细胞 4 周后,CD34⁺ 细胞组小鼠视网膜血管密度明显高于对照组^[16]。

4.2 血管神经保护作用

EPCs 的旁分泌功能也不容忽视。Jeong 等^[17] 的动物实验首次证明 EPCs 具有血管生成和神经营养的双重作用,尽管早期和晚期 EPCs 均可分泌细胞因子,但早期 EPCs 主要发挥旁分泌作用。早期 EPCs 分泌的细胞因子中,IL-8 可促进血管内皮细胞增生,增强基质金属蛋白酶的表达,调节血管生成。多种血管生成因子和神经营养因子,如 VEGF、成纤维生长因子 2、脑源性神经营养因子等可激活原位成熟血管内皮细胞,增加细胞的增生和迁移,提供内皮和神经保护功能。

4.3 直接分化为光感受器

EPCs 具有向多个胚层分化的潜力,在相关因子的诱导下可以分化成多种细胞。近年来的研究发现,在光感受器生长因子的诱导下,EPCs 在体外可以通过表达特定基因而分化为光感受器,从而减少光感受器损失导致的内层视网膜神经血管重构^[18]。

5 基于 EPCs 的 DR 治疗策略

结合 DR 的发病机制,我们应将研究方向聚焦于 EPCs 对疾病早期和中期的神经血管单元损伤修复功能,治疗策略为增加 EPCs 数量及改善其功能,从而保护视网膜神经组织,加强血管的修复,减少缺氧及炎症

刺激、预防和控制疾病的进展。

5.1 自体细胞移植

理想情况下,患者可用自身细胞治疗,尽可能减少排异反应。然而,糖尿病患者机体动员 EPCs 进入血循环的能力降低,功能受到抑制。Tanaka 等^[19] 开发的质量定量培养系统可显著提高糖尿病患者 EPCs 数量和质量,一定程度上弥补糖尿病患者自体细胞治疗的局限性。另外,早期和晚期 EPCs 在重建血管时作用不同,与单纯 ECFC 移植相比,早期 EPCs 和 ECFC 的联合移植可发挥协同作用,早期 EPCs 分泌的细胞因子不仅可以调控血管内皮细胞的增生和迁移能力,还能以自分泌和旁分泌的方式作用于其本身及 ECFC,进一步增强两者的功能。研究发现在肢体缺血的动物模型中,早期 EPCs 与 ECFC 联合移植组的小鼠肢体毛细血管密度明显高于 ECFC 单独移植组^[20]。

5.2 EPCs 与其他细胞的联合移植

细胞之间的相互作用可能会影响细胞功能。脂肪干细胞分泌的外泌体可对抗高糖环境下 EPCs 的功能障碍,促进 EPCs 增生和血管生成。间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 通过 CXCR2 和 CXCR4 之间的正反馈机制促进 EPCs 向 MSC 迁移^[21]。MSC 分泌的相关因子,如 VEGF、基质细胞衍生因子 1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 等可促进 EPCs 向内皮细胞分化并整合到视网膜血管中。EPCs 与 MSC 共培养时,EPCs 的增生、集落形成、迁移和血管生成活性显著增强,细胞分化和血管样结构的形成时间明显早于单种细胞的培养方法。

5.3 内源性 EPCs 的调节

受高糖环境的影响,糖尿病患者 EPCs 存在糖代谢和脂质代谢紊乱,EPCs 增生、迁移、黏附及血管生成能力减弱^[22]。基于提高供体 VEGF、SDF-1、粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、促红细胞生成素、NO 的疗法可一定程度上改善 EPCs 的归巢效率,多种药物,如降糖药 (二甲双胍、胰高血糖素样肽-1 激动剂、二肽基肽酶-4 抑制剂、噻唑烷二酮、阿卡波糖、胰岛素)、维生素 D、他汀类降脂药、血管紧张素转换酶抑制剂和血管紧张素受体阻滞剂等可以抑制炎症,减少氧化应激,增加 NO,上调 Akt 通路活性,从而增加 EPCs 的数量,改善其功能。

6 EPCs 治疗缺血性疾病的临床研究

近年来,采用 EPCs 治疗的临床试验涉及多种缺血性疾病,包括外周血管疾病、心血管疾病、黄斑变性及视网膜缺血性疾病 (表 3)。

表 3 EPCs 治疗缺血性疾病的临床研究

文献	细胞种类	表面标志物	疾病类型	给药途径	结果
Park 等 ^[23]	自体骨髓 CD34 ⁺ 细胞	CD34 ⁺	CRAO/CRVO, Stargardt 病, RP, 黄斑变性	玻璃体腔注射	6 例患者的最佳矫正视力均较基线提高, 2 例患者 (CRVO、Stargardt 病) 的微视野检查显示黄斑区平均敏感度较基线提高, 1 例患者 (Stargardt 病) 在随访 6 个月后, 闪光 ERG b 振幅增加了 30%~40%
Tanaka 等 ^[24]	G-CSF 动员自体外周血 CD34 ⁺ 细胞	CD34 ⁺	糖尿病慢性溃疡	肌肉注射	约 18 周观察到伤口闭合, 血管灌注增加
Burt 等 ^[25]	G-CSF 动员自体外周血 CD133 ⁺ 细胞	CD34 ⁺ , CD133 ⁺	闭塞性动脉硬化症, Buerger 病, 血栓性血管炎	肌肉注射	所有患者的静息痛均有缓解, 9 例患者中有 7 例避免截肢, 2 例患者血管造影提示有新的侧支血管形成
Boyle 等 ^[26]	G-CSF 动员自体外周血 CD34 ⁺ 细胞	CD34 ⁺	陈旧性心肌梗死	经冠脉注射	治疗后 3 个月进行的灌注扫描并未显示血流明显改善, 在 12 个月时血管造影检测到侧支血管形成

注: EPCs: 内皮祖细胞; G-CSF: 粒细胞集落刺激因子; CRAO/CRVO: 视网膜中央动/静脉阻塞; RP: 视网膜色素变性; ERG: 视网膜电图

现有的临床研究中, EPCs 的主要来源为自体骨髓细胞, 给药方式主要为局部注射。一项前瞻性研究对 6 例患者行 CD34⁺ 细胞玻璃体内腔注射, 包括视网膜动/静脉阻塞 (central retinal artery/vein occlusion, CRAO/CRVO)、视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 或遗传性/非渗出性年龄相关性黄斑变性, 首次在人眼中证明 EPCs 修复视网膜神经和血管损伤的潜力^[23], 未出现眼部或全身不良反应。经过 6 个月的随访, 患者的最佳矫正视力均较基线提高, 2 例患者 (视网膜、Stargardt 病) 的微视野检查显示黄斑区平均敏感度较基线提高; 1 例 Stargardt 病患者闪光 ERG b 波振幅增加 30%~40%, 证明 CD34⁺ 细胞对改善视网膜内层神经功能有一定作用。另一项研究中, 5 例糖尿病慢性溃疡患者接受 CD34⁺ 细胞治疗平均 18 周后伤口均完全愈合, 血管灌注明显增加^[24]。目前多个临床试验证明了 EPCs 治疗的安全性和治疗糖尿病其他并发症及视网膜神经血管病变的治疗效果。但目前已发表的临床试验仍然较少, 样本量小, 且定义 EPCs 的细胞表面标志物较单一, 仍需谨慎分选功能更强、纯度更高的细胞系, 不断完善临床研究设计和目标。

7 EPCs 治疗 DR 面临的思考与挑战

近年来, 抑制病理性新生血管形成的抗 VEGF 药物已逐渐成为 PDR 和糖尿病黄斑水肿的主要治疗方法之一。然而, 抗 VEGF 药物可能会增加纤维化并发症的风险, 进而导致牵拉性视网膜脱离等一系列并发症, 而基于 EPCs 的疗法则在 DR 的早期治疗中发挥作用, 通过促进生理性血管的生成使得视网膜缺血区域重新血管化, 逆转缺血缺氧状态, 并促进神经结构和功

能修复。现有的研究数据表明, EPCs 对修复视网膜血管和神经损伤至关重要, 极有可能成为抗 VEGF 药物的补充或替代治疗。

然而, EPCs 治疗 DR 在临床上应用仍有很大挑战。第一, EPCs 分离和体外培养是细胞移植的前提条件。EPCs 可在骨髓、外周血和脐带血中分离培养出。研究表明, 体外培养的 EPCs 可被其他细胞表型所污染, 如 MSC、平滑肌祖细胞及炎症细胞等^[27]。随着传代次数增加, 细胞中 CD34、CD133 和 VEGFR2 表达水平降低, 细胞纯度显著下降, EPCs 的血管生成能力也逐渐下降。细胞培养条件会影响早期和晚期 EPCs 的生物学特性, 不同种类培养基培养的 EPCs 细胞形态、生物功能、内皮标志物的表达有所差异, 不同浓度胎牛血清培养条件下表现出不同的管腔形成模式, 这既对自体细胞移植和组织工程应用提供了基础, 同时也对培养条件的选择提出了挑战。因此, 安全高效的 EPCs 来源、分离及培养 EPCs 的“金标准”技术、最佳体外培养条件, 以及如何清除污染细胞是未来需要关注的重点。

第二, EPCs 治疗 DR 的安全性和有效性始终值得关注。Reid 等^[28]将 ECFC 注入健康小鼠玻璃体内以评估其免疫原性。结果显示, ECFC 在 3 d 内凋亡, 不会导致眼内炎症反应或异常新生血管形成。一些临床研究也证明, 玻璃体、冠状动脉及肌肉注射 EPCs 后并无不良临床事件发生。然而, 也有研究报道脐带血来源的 EPCs 经体外扩增后出现染色体异常^[29]。即使细胞功能没有发生变化, 动物实验中也未出现肿瘤, 但 EPCs 在临床应用时仍需谨慎。值得注意的是, 糖尿病患者 EPCs 功能较正常来源 EPCs 明显减弱, 而外源性

EPCs 则对抑制移植排斥反应提出了进一步的挑战。尽管少数临床试验报道 EPCs 自体移植可以有效治疗糖尿病相关并发症,但由于入组样本量较少,且缺乏长期随访结果,其长期疗效和不良作用尚未肯定。

第三,需要考虑给药途径和治疗周期。玻璃体腔药物注射有引起眼内炎、出血、眼压升高等不良反应的风险,此外作为一种全身疾病,糖尿病可能影响全身各个器官,DR 往往双眼发病。因此,全身给药可能是另一种备选给药途径。研究证明,在小鼠 OIR 模型中,经颈总动脉注射与玻璃体腔注射 ECFC 对缺血视网膜的血管修复效果相当^[28]。另外,功能正常的 EPCs 仍然需要被输送到糖尿病病理环境中,这对 EPCs 在患者体内的存活时间和治疗效果提出了挑战,可能需要反复给药。因此,全身输注可能是另一种备选的移植途径。

DR 患者体内 EPCs 受多种信号分子和通路调控,存在不同程度的数量改变与功能障碍。不同于传统的只针对微血管病变的疗法,EPCs 的多个细胞种群都具有血管修复及神经保护作用,并且在内源刺激或其他干细胞联合作用下可发挥更强的修复作用,不仅能够干预 DR 的早期病理过程,还能够修复神经血管耦合,全面控制疾病进展,因此在延缓和逆转 DR 进展上存在巨大潜力,值得眼科医生关注。然而,目前仍缺乏大样本临床试验来验证 EPCs 的安全性和有效性,EPCs 的体外扩增也受到细胞来源、培养条件、细胞污染等技术问题的限制,其体外培养时间、移植数量、给药途径等尚缺乏金标准,尚存在许多亟待解决的问题。眼科研究者仍应进一步跟踪和参与相关研究,以规范 EPCs 的分离、培养、扩增技术,确定治疗时机及安全性,优化治疗方案。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 李筱荣、邵彦:参与选题、文章智力性内容修改和最终定稿;栾蓉:参与资料的收集、论文撰写和修改

参考文献

- [1] Chua J, Lim C, Wong TY, et al. Diabetic retinopathy in the Asia-Pacific [J]. Asia Pac J Ophthalmol (Phila), 2018, 7(1): 3-16. DOI: 10.22608/APO.2017511.
- [2] Xiao C, He M, Nan Y, et al. Physiological effects of superoxide dismutase on altered visual function of retinal ganglion cells in db/db mice [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(1): e30343 [2022-09-06]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22272340. DOI: 10.1371/journal.pone.0030343.
- [3] Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, et al. Endothelial progenitors: a consensus statement on nomenclature [J]. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(5): 1316-1320. DOI: 10.1002/sctm.16-0360.
- [4] Wang C, Mao C, Lou Y, et al. Monotropein promotes angiogenesis and inhibits oxidative stress-induced autophagy in endothelial progenitor cells to accelerate wound healing [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(3): 1583-1600. DOI: 10.1111/jcmm.13434.
- [5] Bhatwadekar AD, Yan Y, Stepps V, et al. miR-92a corrects CD34⁺ cell dysfunction in diabetes by modulating core circadian genes involved in progenitor differentiation [J]. Diabetes, 2015, 64(12): 4226-4237. DOI: 10.2337/db15-0521.
- [6] García de la Torre N, Fernández-Durango R, Gómez R, et al. Expression of angiogenic microRNAs in endothelial progenitor cells from type 1 diabetic patients with and without diabetic retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(6): 4090-4098. DOI: 10.1167/iovs.15-16498.
- [7] 王凡, 武志峰, 管怀进, 等. 2 型糖尿病患者糖尿病视网膜病变不同时期外周血内皮祖细胞的数量变化 [J]. 中华眼底病杂志, 2011, 27(3): 222-225. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2011.03.006. Wang F, Wu ZF, Guan HJ, et al. The amount of endothelial progenitor cells at different stages of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2011, 27(3): 222-225. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2011.03.006.
- [8] Huang YC, Liao WL, Lin JM, et al. High levels of circulating endothelial progenitor cells in patients with diabetic retinopathy are positively associated with ARHGAP22 expression [J/OL]. Oncotarget, 2018, 9(25): 17858-17866 [2022-09-09]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29707151. DOI: 10.18632/oncotarget.24909.
- [9] Jung C, Rafnsson A, Shemyakin A, et al. Different subpopulations of endothelial progenitor cells and circulating apoptotic progenitor cells in patients with vascular disease and diabetes [J]. Int J Cardiol, 2010, 143(3): 368-372. DOI: 10.1016/j.ijcard.2009.03.075.
- [10] Segal MS, Shah R, Afzal A, et al. Nitric oxide cytoskeletal-induced alterations reverse the endothelial progenitor cell migratory defect associated with diabetes [J]. Diabetes, 2006, 55(1): 102-109.
- [11] 陈海龙. 不同时期糖尿病视网膜病变患者外周血内皮祖细胞数量及功能的变化 [J]. 医学综述, 2016, 22(10): 2018-2020. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2016.10.043. Chen HL. Changes of number and function of peripheral blood endothelial progenitor cells of patients with diabetic retinopathy at different stages [J]. Med Recapitulate, 2016, 22(10): 2018-2020. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2016.10.043.
- [12] 张惟, 韩琪, 陈松, 等. 增生型糖尿病视网膜病变患者外周血内皮祖细胞的数量变化及意义 [J]. 中华眼底病杂志, 2011, 27(3): 218-221. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2011.03.005. Zhang W, Han Q, Chen S, et al. Quantitative analysis of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2011, 27(3): 218-221. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2011.03.005.
- [13] Kady N, Yan Y, Salazar T, et al. Increase in acid sphingomyelinase level in human retinal endothelial cells and CD34⁺ circulating angiogenic cells isolated from diabetic individuals is associated with dysfunctional retinal vasculature and vascular repair process in diabetes [J]. J Clin Lipidol, 2017, 11(3): 694-703. DOI: 10.1016/j.jacl.2017.03.007.
- [14] 吉宗珊, 庄德舒, 汝童, 等. 糖尿病视网膜病变患者内皮祖细胞的数量变化分析 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(32): 6252-6255. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2016.32.011. Ji ZS, Zhuang DS, Ru T, et al. Changes in the number of endothelial progenitor cells in patients with diabetic retinopathy [J]. Prog Mod Biomed, 2016, 16(32): 6252-6255. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2016.32.011.
- [15] Medina RJ, O'Neill CL, Humphreys MW, et al. Outgrowth endothelial cells: characterization and their potential for reversing ischemic retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(11): 5906-5913. DOI: 10.1167/iovs.09-4951.
- [16] Yazdanyar A, Zhang P, Dolf C, et al. Effects of intravitreal injection of human CD34⁺ bone marrow stem cells in a murine model of diabetic retinopathy [J/OL]. Exp Eye Res, 2020, 190: 107865 [2022-09-14]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31682846. DOI: 10.1016/j.exer.2019.107865.
- [17] Jeong JO, Kim MO, Kim H, et al. Dual angiogenic and neurotrophic effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells on diabetic

- neuropathy[J]. Circulation, 2009, 119(5): 699-708. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.789297.
- [18] Qiang S, Alsaedi HA, Yuhong C, et al. Morphological and genetical changes of endothelial progenitor cells after *in-vitro* conversion into photoreceptors[J]. J Photochem Photobiol B, 2018, 183: 127-132. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.003.
- [19] Tanaka R, Masuda H, Fujimura S, et al. Quality-quantity control culture enhances vasculogenesis and wound healing efficacy of human diabetic peripheral blood CD34⁺ cells[J]. Stem Cells Transl Med, 2018, 7(5): 428-438. DOI: 10.1002/scrm.17-0043.
- [20] Yoon CH, Hur J, Park KW, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells; the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases[J]. Circulation, 2005, 112(11): 1618-1627. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.503433.
- [21] Tan Y, Shu L, Xu P, et al. Mesenchymal stem cells attract endothelial progenitor cells via a positive feedback loop between CXCR2 and CXCR4[J/OL]. Stem Cells Int, 2019, 2019: 4197164 [2022-09-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31885605>. DOI: 10.1155/2019/4197164.
- [22] Shao Y, Chen J, Dong LJ, et al. A protective effect of PPAR α in endothelial progenitor cells through regulating metabolism [J]. Diabetes, 2019, 68(11): 2131-2142. DOI: 10.2337/db18-1278.
- [23] Park SS, Bauer G, Abedi M, et al. Intravitreal autologous bone marrow CD34⁺ cell therapy for ischemic and degenerative retinal disorders: preliminary phase 1 clinical trial findings[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 56(1): 81-89. DOI: 10.1167/iops.14-15415.
- [24] Tanaka R, Masuda H, Kato S, et al. Autologous G-CSF-mobilized peripheral blood CD34⁺ cell therapy for diabetic patients with chronic nonhealing ulcer[J]. Cell Transplant, 2014, 23(2): 167-179. DOI: 10.3727/096368912X658007.
- [25] Burt RK, Testori A, Oyama Y, et al. Autologous peripheral blood CD133⁺ cell implantation for limb salvage in patients with critical limb ischemia[J]. Bone Marrow Transplant, 2010, 45(1): 111-116. DOI: 10.1038/bmt.2009.102.
- [26] Boyle AJ, Whitbourn R, Schlicht S, et al. Intra-coronary high-dose CD34⁺ stem cells in patients with chronic ischemic heart disease: a 12-month follow-up[J]. Int J Cardiol, 2006, 109(1): 21-27. DOI: 10.1016/j.ijcard.2005.05.024.
- [27] Wang CH, Huang PH, Chen JW, et al. Clinical application of endothelial progenitor cell: are we ready? [J]. Acta Cardiol Sin, 2013, 29(6): 479-487.
- [28] Reid E, Guduric-Fuchs J, O'Neill CL, et al. Preclinical evaluation and optimization of a cell therapy using human cord blood-derived endothelial colony-forming cells for ischemic retinopathies [J]. Stem Cells Transl Med, 2018, 7(1): 59-67. DOI: 10.1002/scrm.17-0187.
- [29] Vanneaux V, El-Ayoubi F, Delmau C, et al. *In vitro* and *in vivo* analysis of endothelial progenitor cells from cryopreserved umbilical cord blood: are we ready for clinical application? [J]. Cell Transplant, 2010, 19(9): 1143-1155. DOI: 10.3727/096368910X504487.

(收稿日期:2022-10-05 修回日期:2022-10-19)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)

读者·作者·编者

本刊对医学研究中知情同意和医学伦理学描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述,本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1) 知情同意 在未事先获得知情同意的情况下,患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息,包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开,除非这些信息对于本研究是必需的,如需在出版物上显示,应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息,但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部,不足以保护患者的隐私权),应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法,作者应该确保这些改变不影响研究的科学性,并且编辑应在文中对此予以说明。

(2) 医学伦理学 以人体为实验对象的研究,作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或 1975 年赫尔辛基宣言(2005 年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题,作者应当做出客观说明并解释研究的合理性,提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究,作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和利用指南。

(本刊编辑部)

广告目次

瑞秀复(眼科用生物羊膜) 广州瑞泰生物科技有限公司……封二

同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……前插页

沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 广东泰恩康医药股份有限公司……前插页

递法明片 惠州市百吉瑞医药有限公司……封三

迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底



中华医学杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究