

动脉粥样硬化时平滑肌细胞凋亡的研究进展

邹飞雁 杨和平 涂玉林 杨永宗

(衡阳医学院分子生物学研究中心,衡阳 421001)

摘要 动脉粥样硬化斑块中平滑肌细胞的凋亡随斑块发展不同程度而定。斑块凋亡及残体清除不足,可破坏纤维帽组织结构的平衡,影响斑块的稳定,使之易于破裂从而诱发临床事件(如心肌梗塞和猝死);凋亡可影响血管管腔的重构过程,例如对动脉狭窄部位行球囊扩张术后,设法加快内皮修复,促进凋亡,则对再狭窄的防治有积极意义。动脉凋亡可通过 P53 依赖性 & 非依赖性通路发生,还受自身免疫调节和生长因子

的网络调节。

关键词 动脉粥样硬化;平滑肌细胞;凋亡;斑块稳定;血管重构

细胞凋亡是一种细胞的生理性死亡。近年来免疫学家认为:无论是何种刺激因素引起,只要是由遗传控制,即在基因活动指导下进行的任何细胞死亡均为细胞凋亡,亦称为程序性细胞死亡(programmed cell

death, PCD)。凋亡是对许多细胞的有控变化的形态学描述,即在细胞死亡过程中,有细胞膜起泡、细胞皱缩、染色体凝缩、核碎片化,最终形成凋亡体。细胞凋亡在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)和再狭窄的发生中占有特殊地位。细胞凋亡是可以通过各种内外源信号的激活,引起细胞内一系列的基因调控过程。平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)凋亡呈规律性变化,其凋亡的基因调控也有其自身特点。

1 动脉粥样硬化斑块中的细胞凋亡

Geng 等^[1]用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 平移末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)方法检测到,在人冠状动脉、颈动脉粥样硬化病变晚期增厚的内膜中,细胞凋亡高达 30%~40%。Han 等^[2]分析了 35 例高度狭窄的冠状动脉粥样硬化病变标本,并将动脉粥样硬化斑块分为三区:(1)富含巨噬细胞区(macrophage-enriched area);(2)富含星形 SMC 区,又叫粘液瘤区(myxomatous area);(3)富含胶原区,又叫硬化区(sclerotic area)。他们发现动脉粥样硬化斑块的硬化区 TUNEL 阳性细胞达 10%,粘液瘤区为 15%,富含巨噬细胞区达 40%,而中膜平滑肌层仅有极少数细胞凋亡。Bennett 和 Shwartz^[3]体外培养成人动脉粥样硬化标本中 SMC,发现 As 斑块来源的 SMC 比正常动脉 SMC 具有更高的凋亡率。Bjorkerud 等^[4]培养人动脉 SMC,发现许多 SMC 聚集形成“球形体(spheroids)”,中心由圆形或多边形的 SMC 构成,外周以纺锤形的 SMC 包绕。此“球形体”比经典的体外培养的单层 SMC 更接近体内动脉 SMC 的形态结构,也许更适合作为体外研究 As 形成的模型。“球形体”培养几周后,出现细胞外基质;此时,许多细胞显示凋亡特征。这种自发凋亡也许表明动脉平滑肌细胞的增殖和凋亡可能是一个有控过程,新鲜血清有利于“球形体”的维持,无新鲜血清时,“球形体”失去原有的形态结构特征。这种退行性改变十分相似于 As 中所见 SMC 损伤特点,如出现泡沫细胞、细胞残体及凋亡的细胞等。这表明血清中生长因子是动脉 SMC 的生长所必需,缺乏这些因子可能触发动脉 SMC 的凋亡,As 发生发展与这一情况十分相似。Kockx 等^[5]在冠状动脉旁路搭桥术后,发现其搭桥的血管易发生闭塞。他们研究了 47 例病人,经外科手术后获得的完全和不完全闭塞搭桥血管标本 80 个,发现 81%有内膜增厚、泡沫细胞和血栓形成,增厚的内膜由少量 SMC 及大量的基质组成,这些与晚期 As 斑块成分十分相同,并且也显示凋亡的

特征。推测这可能是因凋亡造成 SMC 不断减少。Han 等^[2]为了动态研究 As 中细胞凋亡的规律,采用 TUNEL 检测凋亡和增殖细胞抗原(PCNA)检测增生,在球囊导管诱导的大鼠血管损伤模型上,证明 SMC 凋亡贯穿于内膜损伤修复全过程。新生内膜在第一周内 SMC 增殖达高峰,第八周降至基础水平(0~3%)。第 9 天凋亡达高峰,为 40%,第 14 天达 20%,第 28 天仍高于基础水平(达 10%),相应的中膜 SMC 凋亡是十分低的。上述资料表明 As 斑块的发生发展取决于细胞凋亡和细胞增殖的相对平衡。细胞增殖和细胞凋亡随时间、空间而改变。As 损伤早期和损伤中某一时期,细胞增殖占优势;一般来说,细胞凋亡相对迟于细胞增殖,到一定时期细胞增殖和细胞凋亡并行。

2 细胞凋亡与斑块稳定和血管重塑

细胞凋亡直接影响动脉形态与结构,对斑块稳定非常重要。现已知 As 诱发临床事件(心肌梗塞、猝死等)的罪魁祸首是斑块破裂,经常是 As 斑块的纤维囊发生深部裂隙。这种斑块的特点是:①细胞外脂质核心(包括结晶状胆固醇占斑块面积的 60%以上);②脂质池上被覆了纤维帽,纤维组织相对缺乏;③上述部位充满脂质的巨噬细胞密集而 SMC 相对较少;④斑块在血管腔内常呈偏心位置,这种斑块质地软,物理脆性大,在纤维囊移行至周围正常内膜处易受血流剪切力的作用,斑块常在此处破裂。随着 As 研究进展,发现在 As 病变中细胞凋亡是普遍存在现象,尤其在 As 晚期,由于 SMC 凋亡,致使纤维帽区和其下中膜及交界区 SMC 数目减少,细胞外基质分泌减少及破坏崩解增加,使斑块极不稳定而易于破裂^[1,7]。As 病变的血管内膜组织的凋亡可诱发临床并发症(出血性动脉破裂、出血性斑块破裂、粥样栓塞、血栓形成并闭塞),并且 As 斑块易破裂处存在凋亡残体及许多内含凋亡细胞的巨噬细胞和淋巴细胞,这些表明细胞凋亡残体清除不足及炎症反应参与 As 斑块破裂^[7]。细胞凋亡是 As 研究的新领域,在 As 晚期阻止 SMC 凋亡对防止 As 严重临床并发症的发生可能有积极意义。

血管重构影响 As 的自然过程^[8]。血管损伤特别易形成于血管分叉处,提示在 As 斑块形成中机械因素的重要性。在 As 开始时,单核细胞浸润起关键作用,内皮通过选择性粘附分子和化学趋化因子表达来调节单核细胞浸润。此外,蛋白酶的表达增加,引起斑块内纤维分解、斑块破裂、血栓破裂、血栓形成和损伤进一步发展。As 斑块可通过内膜增生、白细胞浸润、斑块反复破裂和血栓形成而得以发展。尽管斑块体积增大,但血管

狭窄部位的切应力可使血管半径增大。As 血管也发生代偿性扩张的血管重构。如果切应力恢复的代偿机制不能与斑块生长同步,狭窄部位的血流动力学就发生改变,使损伤进展,这不仅能加重狭窄的严重程度,而且可以触发急性缺血综合征。

对 As 斑块部位行血管成形术后的长期再通也依赖血管重构^[1]。一方面血管细胞的直接损伤使生长因子(如 PDGF-AA、TGF- β 、BFGF、IGF-1)的分泌增加,这些因素可引起即刻早期基因和相关基因的表达^[10],促进血管 SMC 的增殖,使内膜增厚。另一方面,血管损伤后不久内皮出现再生,再生内皮表面作为血流信号转换器,分泌细胞生长与迁移抑制因子(如 NO),调节细胞生长和细胞凋亡之间的相对平衡,促进管腔面积增加的血管重构过程。

3 细胞凋亡机制

3.1 P53 依赖性和非依赖性通路

血管壁细胞数量可由细胞增殖和细胞凋亡之间的平衡状态决定^[11]。细胞凋亡与细胞生长和细胞分化同属最基本的细胞学过程,它们决定着动脉 As 的发生、发展和转归。这些过程又受到来自细胞内和细胞外信号的调控。在这一领域里,特别是有关调控细胞凋亡的癌基因的研究,近几年在 As 研究中获得了长足的发展。

C-myc 蛋白属于核磷蛋白,其蛋白中发见的称“亮氨酸拉链”的模式,具有 DNA 活性。早期的一些研究证明:c-myc 能诱导除去生长因子的 SMC 和成纤维细胞凋亡^[12,13]。最近,Bennett 等^[14]证明正常 SMC 以及转染 c-myc 的 SMC,在无血清培养下,两者均出现细胞凋亡,这种细胞凋亡可被 bcl-2 和 c-myc 共同表达所抑制。bcl-2 抑制细胞凋亡的效应不是通过影响 c-myc 的致分裂活性,也不是通过影响 c-myc 表达来实现,而是阻断 c-myc 介导细胞凋亡得以实现的^[13,14]。此外,bcl-2 抑制细胞凋亡并不抑制正常 SMC 或转染 c-myc 的 SMC 内的 P53 表达,推论 bcl-2 在调节 SMC 凋亡中起主要作用^[15]。

腺病毒 E₁A 是病毒早期基因,能诱导宿主细胞增殖,编码多功能多肽,能与视网膜母细胞瘤基因产物和相关蛋白 P107 和 P300 结合^[16],干扰宿主细胞基因转录。虽然腺病毒 E₁A 基因产物不是正常哺乳动物基因组的成分,但可用于评价 E₁A 和 c-myc 诱导两者通路的内在联系。Bennett 等^[14]观察到 E₁A 和 c-myc 产物所诱导的 SMC 凋亡能被 bcl-2 所抑制,用无血清培养则促进凋亡,因而 E₁A 和 c-myc 诱导凋亡依赖于 P53

蛋白表达。由于野生型(wild-type)P53 促进 E₁A 和 c-myc 诱导的细胞凋亡,突变型(mutant-type)P53 则抑制 E₁A 和 c-myc 诱导的凋亡,E₁A 和 c-myc 两者增加 P53 蛋白表达,但 E₁A 对 P53 mRNA 水平的影响不大。虽然不能排除以下可能性:P53 诱导凋亡可因 E₁A 和 c-myc 感染细胞而致 DNA 损伤,但 E₁A 能稳定 P53 蛋白^[17],而且这种稳定的 P53 蛋白与野生型 P53 蛋白难以区别。c-myc 具有 DNA 结合活性,能与 P53 启动了结合并激活 P53^[18],因此 c-myc 可促进 P53 蛋白表达或其 mRNA 的表达^[19]。

野生型 P53 蛋白在 30% 血管成形术后在狭窄部位出现过表达^[20],这一研究引起了人们对 P53 与 SMC 增殖和凋亡方面的兴趣。将野生型 P53 导入 P53 阴性的肿瘤细胞,可使其发生凋亡^[21];在某些激素依赖性凋亡的肿瘤细胞出现 P53 表达增加,说明 P53 可作为细胞凋亡的生理性调质(physiological regulator)。将野生型或突变型 P53 导入正常 SMC 对细胞凋亡无明显影响,将 P53 导入正常 SMC,转染 c-myc 或 E₁A 的 SMC,对细胞增殖也无明显影响,说明 P53 对肿瘤细胞和 SMC 凋亡的影响不完全一致^[14]。已有实验显示斑块 SMC 较正常 SMC c-myc 基因表达增高^[22-24],新生内膜的 SMC 也有 c-myc 基因的上调^[10,25]。提示斑块内或新生内膜内 c-myc 上调可能有激活 P53 的作用,从而可通过 P53 依赖性途径诱导细胞凋亡。E₁A 在功能上可替代 c-myc,其诱导凋亡并非通过 c-myc 的表达。c-myc 和 E₁A 两者以共同的下游靶子—P53 诱导凋亡,因此 E₁A 和 c-myc 诱导凋亡是 P53 依赖性的。但在 SMC 中单独 P53 上调而无 c-myc 和 E₁A 共同表达并不诱导凋亡,提示 P53 可能是细胞凋亡通路的必要成分,而不仅仅是 E₁A 和 c-myc 诱导的细胞凋亡前的靶子。正常 SMC 置于贫血清条件下出现的细胞凋亡虽可被 bcl-2 抑制,但因抑制 P53 而发生改变。因此,贫血清条件(无 c-myc 或 E₁A 表达)下诱导的凋亡是 P53 非依赖性的。野生型 P53 的表达能增加 SMC c-myc 和 SMC E₁A 的细胞凋亡,P53 诱导细胞凋亡与其抑制细胞周期进程的通路不同,P53 诱导细胞凋亡并不需要新蛋白的合成^[26]。bcl-2 能阻断 E₁A 和 c-myc 诱导细胞凋亡,但不改变 P53 的表达,说明 bcl-2 抑制细胞凋亡不是通过 P53 介导的。

上述关于动脉 SMC 凋亡的 P53 依赖性和非依赖性通路的研究结果并非为 As 斑块细胞,以前研究也表明 As 斑块细胞与正常 SMC 有明显的差别^[22,23]。因此,研究 As 斑块细胞(尤其是冠状 As 斑块 SMC)凋亡基因调控规律,对 As 所诱导心肌梗塞和猝死的病因学具

有十分重要的意义。

3.2 自身免疫损伤机制

动脉粥样硬化(As)的发生发展的机制仍未明确,细胞凋亡也许是一种重要的独立因素,它参与As病变的始终。Bjorkerud^[9]发现As斑块和巨噬细胞大量凋亡,并且许多巨噬细胞内含有凋亡的细胞及凋亡残体。这些表明凋亡细胞及凋亡残体清除不足,也许由此引起血管形态结构和功能改变,也许促发As病变。以前认为凋亡残体是无免疫活性的,新近有证据表明凋亡细胞和凋亡残体对巨噬细胞具有强烈的化学趋化活性^[27],巨噬细胞本身也遭受细胞凋亡所释放的细胞因子的影响^[28],促进As病变中的炎症反应。凋亡细胞及凋亡体清除不足在其它组织中被认为是引起自身免疫损伤反应的机制之一^[29],As损伤也许是SMC和炎症细胞凋亡清除不足引发自身免疫损伤反应所致。

3.3 细胞凋亡的调节

有人认为在As病变中存在大量金属蛋白酶(metalloproteinase)^[27,30],此酶可分解细胞外基质产生碎片减少凋亡细胞的清除。这一机制是通过巨噬细胞玻璃粘连蛋白(vitronectin)受体介导的^[29,31]。新近研究表明,巨噬细胞对氧化型LDL受体的认识和摄取与吞噬凋亡残体受体是相同的,它们两者都是通过磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine)受体介导^[32],而且在As损伤中有丰富的氧化型低密度脂蛋白^[33],氧化型低密度脂蛋白本身有启动凋亡和致有丝分裂作用^[34]。

内膜细胞种类和数量的调节需要细胞生长和细胞死亡两者间的精确平衡。最近的研究表明,凋亡的降低也许是血管损伤形成的突出特征。以前鉴定为生长因子的许多分子也许作为阻止血管细胞死亡的因子,如碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)既能诱导内皮细胞有丝分裂,又能促进内皮细胞生存。同样,血小板源性生长因子(PDGF)、血管紧张素Ⅰ(AngⅠ)既能刺激细胞生长,也能促进血管SMC生存。介导抗凋亡反应的细胞信号通路需要进一步确定,最近在神经、造血、内皮细胞的研究表明,激活有丝分裂的蛋白激酶(MAPK)和3-磷酸肌醇激酶也许介导抗凋亡信号,而JNK激酶也许介导凋亡前信号。氧化还原状态的改变也许调节细胞死亡程序的激活。整合素(Integrins)也许是血管细胞生存的重要决定因素。以上的这些调控SMC增殖和凋亡的信号通路,可能是通过Bax-Bcl-2家族和类白介素转换酶(interleukin converting enzyme, ICE)半胱氨酸蛋白酶两者表达的相对平衡来调控的^[35]。

参考文献

- Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. *Am J Pathol*, 1995, 147: 251~266.
- Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, et al. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol*, 1995, 147(2): 267~277.
- Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cell derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1995, 95: 2 266~274.
- Bjorkerud S, Bjorkerud B, Toelsson M. Structural organization of reconstituted human arterial smooth muscle tissue. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14(4): 644~651.
- Kockx MM, Cambier BA, Bortier HE, et al. Foam cell replication and smooth muscle cell apoptosis in human saphenous vein grafts. *Histopathology*, 1994, 25(4): 365~371.
- 蔡海江. 动脉粥样硬化研究若干进展. *中国动脉硬化杂志*, 1995, 3(2): 81~83.
- Bjorkerud S, Bjorkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of Gruel and plaques instability. *Am J Pathol*, 1996, 149: 367~380.
- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, et al. The pathogenesis of coronary artery disease and acute coronary syndromes. *N Eng J Med*, 1992, 326: 242~250.
- Califf RM, Fortion DF, Frid DJ, et al. Restenosis after coronary angioplasty: an overview. *J Am Coll Cardiol*, 1991, 17(Suppl): 242~250.
- 杨和平, 杨永宗, 唐朝枢, 等. 动脉硬化平滑肌细胞增殖中即刻早期基因与c-sis基因表达和调控. *衡阳医学院学报*, 1994, 22: 89~129.
- Vaux DL. Toward on understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 786~789.
- Bennett MR, Evan GI, Newby AC. Deregulated expression of the c-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, interferon- γ , hepalin, and cyclic nucleotide analogues and induces apoptosis. *Circ Res*, 1994, 74: 525~536.
- Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, et al. Induction of apoptosis in fibroblast by c-myc protein. *Cell*, 1992, 69: 118~128.
- Bennett MK, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of rat

- vascular smooth muscle cells is regulated by P53-dependent and independent pathways. *Circ Res*, 1995, **77**: 266~273.
- 15 Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, et al. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **145**: 1 325~336.
 - 16 Whyte P, Buckkovich KJ, Horowitz JM, et al. Association between an oncogene and an anti-oncogene; the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 1988, **334**: 124~129.
 - 17 Lowc SW, Rulcy HE. Stabilization of the P53 tumor suppressor is induced by adenovirus E1A and accompanies apoptosis. *Enes Dev*, 1993, **7**: 535~545.
 - 18 Reisman D, Elkind NB, Roy B, et al. c-myc transactivates the P53 promotor through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ*, 1993, **4**: 57~65.
 - 19 Hermeking H, Eick D. Mediation of c-myc-induced apoptosis by P53. *Science*, 1994, **265**: 2 091~093.
 - 20 Speir E, Modali R, Huang ES, et al. Potent role of human cytomegalovirus and P53 interaction in coronary restenosis. *Science*, 1994, **265**: 391~394.
 - 21 Show P, Bovey R, Tardy S, et al. Induction of apoptosis by wild-type P53 in human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 4 495~499.
 - 22 杨和平, 张 敏, 杨永宗, 等. 动脉粥样硬化斑块内泡沫细胞 c-myc 基因表达的研究. *中国病理生理杂志*, 1992, **8**(6): 622.
 - 23 杨和平, 张 敏, 杨永宗, 等. 动脉斑块和斑块旁中膜 c-myc 基因检测和细胞表型的比较研究. *中华病理学杂志*, 1992, **21**(6): 349.
 - 24 Parkes JL, Cardell RR, Hubbard FC, et al. Cultured human atherosclerotic plaque smooth muscle cells retain transforming potential and display enhanced expression of the myc proto-oncogene. *Am J Pathol*, 1991, **138**: 765~775.
 - 25 Haltgardh-Nilsson A, Rrondahl U, Jiang WQ, et al. Endogenous activation of c-myc expression and DNA synthesis in serum-starved neonatal rat smooth muscle cells. *Differentiation*, 1993, **52**: 161~168.
 26. Wangner A, Rokontis JM, Hay N. Myc-mediated apoptosis requires wildtype P53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of P53 to induce P21 waf1/cip1. *Gene Dev*, 1994, **8**: 2 817~830.
 - 27 Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, et al. Increased expression of matrix matalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerosis. *J Clin Invest*, 1994, **94**: 2 493~503.
 - 28 Kornbluth RS. The immunological potential of apoptotic debris produced by tumor cells during HIV infection. *Immunol Lett*, 1994, **43**: 125~132.
 - 29 Savill J. Review : apoptosis in disease. *Eur J Clin Invest*, 1994, **24**: 715~723.
 - 30 Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, et al. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutive produce matrix-degrading proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 402~406.
 - 31 Savill J, Draisfield I, Higg N, et al. Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature*, 1990, **343**: 170~173
 - 32 Sambrano GR, Steinberg D. Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages : role of membrane phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 1 396~400.
 - 33 Yla-Herttuala S, Palinski W, Butler SW, et al. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb*, 1994, **15**: 32~40.
 - 34 Bjorkerud B, Bjorkerud S. Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth apoptosis in arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16**: 416~424.
 - 35 Gibbons GII, Dzau VJ. Molecular therapies for vascular diseases. *Science*, 1996, **272**: 689~693.

(1996-03-05 收到, 1997-02-28 修回)