

# 细胞凋亡与动脉粥样硬化

丁志山 沃兴德

(浙江中医学院分子医学研究所, 杭州 310009)

**摘要** 平滑肌细胞、内皮细胞和巨噬细胞与动脉粥样硬化的发生发展密切相关。在动脉粥样硬化斑块中, 巨噬细胞、平滑肌细胞与内皮细胞都经历着凋亡与坏死, 凋亡占主导地位, 参与了粥样硬化的形成过程。氧自由基、某些生长因子、一氧化氮、内毒素以及氧化型低密度脂蛋白等可诱导细胞凋亡。细胞凋亡具有复杂的分子调控机制, 多种基因参与了凋亡的发生。

**关键词** 细胞凋亡; 动脉粥样硬化; 肌, 平滑; 内皮; 巨噬细胞

细胞的生长、分化和死亡是生命活动的正常组成部分, 细胞死亡有两种不同的形式, 即坏死与凋亡(apoptosis)。细胞凋亡也称程序性细胞死亡(programmed cell death), 是细胞衰老死亡过程的主要形式, 它不同于细胞坏死, 是细胞接受某种信号后或受到某些因素刺激后一种主动的、在一些凋亡相关基因的调控下的死亡过程。细胞凋亡涉及多种心血管疾病, 目前已成为心血管疾病研究的热点。

在动脉粥样硬化斑块组织中, 内皮细胞(endothelial cell, EC)、平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)、巨噬细胞及淋巴细胞都存在着死亡过程。近来发现动脉粥样硬化斑块中许多细胞死亡的发生是通过凋亡。对细胞凋亡机制的了解进展很快, 但目前仍未发现细胞凋亡的固定模式。细胞发生凋亡时, 细胞内  $Ca^{2+}$  浓度升高及  $Ca^{2+}$  依赖性酶激活, 核酸内切酶切断 DNA, 使

之裂解成 190 bp 左右的核苷酸序列, 琼脂糖电泳呈梯形(DNA Ladder), 细胞骨架被钙蛋白酶破坏, 细胞皱缩, 核染色质浓缩, 细胞膜泡状突起, 凋亡小体形成。

细胞凋亡具有复杂的分子调控机制, 多种基因参与了凋亡的发生。广义上讲, 细胞内外的信号能够激活靶细胞内的第二信使, 导致两类基因产物的表达。第一类, 如 *c-myc*、*bcl-2* 与 *P53*, 控制着细胞凋亡。这类基因产物间的相互作用可以调控激活影响细胞死亡的第二类基因的活性, 其表达产物如半胱氨酸蛋白酶则是一种白细胞介素-1 $\beta$  转接酶, 它能引起不可逆的蛋白质降解和细胞的解体。在动脉壁细胞中, 细胞凋亡可通过特殊的细胞因子结合到细胞表面的受体来调控。细胞凋亡的胞间信号传递可以通过在其它环境也起作用的调控子来完成, 例如胞间  $Ca^{2+}$  的迁移和细胞增殖, 抗凋亡信号也可通过生成生长因子来调控, 或通过细胞与胞外间质的相互作用来实现调控。

目前, 动脉粥样硬化斑块中细胞凋亡的原因尚未明了。体外实验发现氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, 氧化型 LDL)可诱导细胞凋亡<sup>[1]</sup>。肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )与其它细胞因子在体外的各种类型细胞试验中也可诱发凋亡<sup>[2]</sup>。有人认为在细胞表面热休克蛋白(heat shock protein, HSP)的自身抗体也可诱发泡沫细胞<sup>[3]</sup>和 EC 死亡<sup>[4]</sup>, 体外试验已证明热休克蛋白可被氧化型 LDL 诱导产生。另外, 氧自由基、缺血和去除血清、某些生长

因子、NO、某些抗氧化剂及内毒素等也可诱导细胞凋亡。

## 1 内皮细胞凋亡

内皮细胞(EC)衬覆于血管内壁,是血管壁的主要屏障。EC的更新通常是缓慢的。引起EC脱落的具体原因还不清楚,但EC可在一定条件下发生凋亡。

氧自由基和过氧化氢对EC造成的损伤较重。高浓度的过氧化氢能引起细胞坏死,而低浓度的过氧化氢则引起EC的凋亡,凋亡的危害远大于坏死,易于生成动脉粥样硬化。自由基清除剂能阻止由过氧化氢诱发的内皮细胞凋亡。内毒素导致的内皮细胞凋亡有组织器官的特异性,热应激反应能促进内毒素诱导的内皮细胞凋亡。

撤除生长因子<sup>[5]</sup>,或者加入 $\gamma$ -干扰素、转化生长因子 $\beta$ 1、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 等均可引起EC凋亡<sup>[6,7]</sup>。撤除生长因子以后,碱性纤维母细胞生长因子可以抑制凋亡。电离辐射能诱导EC的凋亡,主要发生在G0~G1期细胞,是通过改变酶活性而诱导EC凋亡,由损伤如电离辐射引起的EC凋亡。也可以在体内被碱性纤维母细胞生长因子和蛋白激酶C抑制。

撤除血清以后EC的凋亡能被*bcl-2*阻断<sup>[8]</sup>。有证据表明,白细胞介素 $\gamma$ 调控的凋亡可由于*bcl-2*的下调而引起<sup>[6]</sup>。因此抗凋亡基因产物的下降调节也可调控因撤除生长因子而导致的EC对凋亡的敏感性。作为这一观点的证据是培养的EC对凋亡的敏感性看起来同抗凋亡基因A20的表达有关,但与*bcl-2*与*bcl-x*的表达无关<sup>[9]</sup>。

内皮细胞(EC)对凋亡的敏感性看起来非常依赖于细胞粘附和细胞外基质分子产生的信号。在缺乏基质相互作用的情况下,人血管EC所进行的凋亡能被整合蛋白质 $\beta$ 1所阻断<sup>[10]</sup>,在体内整合蛋白 $\alpha$ , $\beta$ 的单克隆抗体能通过诱导正在扩增的EC的凋亡而破坏血管的生成<sup>[11]</sup>。静止期的血管不受这种抗体的影响,这说明EC只有在细胞分裂周期时才受影响。

氧化型LDL导致体外EC死亡的机制还在研究中<sup>[1]</sup>,氧化型LDL可导致EC的凋亡,可能是因为EC中*bcl-2*的表达很低,并且胞液内 $Ca^{2+}$ 浓度升高也可诱导EC凋亡<sup>[12]</sup>。

现在人们越来越相信,EC凋亡而从管腔表面丢失,是导致动脉粥样硬化形成的原因。同时EC也可能调控着SMC的凋亡。例如,在大鼠的颈动脉气囊成形术模型中,内皮重植后SMC凋亡减少<sup>[6]</sup>,这显示了正

常的内皮表面能阻止SMC的凋亡。

## 2 平滑肌细胞的凋亡

平滑肌细胞(SMC)的增殖是动脉粥样硬化的主要病理特征之一。组织学研究发现在动脉粥样硬化形成的早期和中期,SMC增殖超过了细胞死亡,结果导致SMC数明显增加,促进了纤维帽的形成与发展。纤维帽虽然是细胞性质的,但在较严重的动脉粥样硬化斑块中,纤维帽中的细胞已大大减少;体外培养的人或大鼠的SMC以及人的动脉粥样硬化斑块中的SMC都存在着凋亡现象,说明SMC凋亡与动脉粥样硬化有密切关系。

诱导SMC凋亡的因素有多种,诱导凋亡的因子或刺激是通过第二信使系统传递信号的。动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞和T淋巴细胞由于炎症反应产生的炎性细胞因子可致SMC凋亡,细胞分裂素,如 $\gamma$ -干扰素、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 及白细胞介素-1 $\beta$ 也能诱导SMC的凋亡<sup>[2]</sup>。碱性纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)可以有效地促进多种类型的细胞进行分裂,如果内源性bFGF分泌被抑制可导致SMC凋亡。同EC一样,抗氧化剂、缺血、去除血清或者去除某些生长因子也可诱导SMC凋亡。但未见射线诱导的SMC凋亡的文献报道。氧化型LDL对SMC的毒性作用<sup>[1]</sup>最近已引起人们的兴趣。体外实验发现低浓度的修饰LDL能刺激SMC分裂<sup>[13]</sup>,而在较高浓度下则诱导凋亡<sup>[14]</sup>。在气囊成形术实施30 min即可发现高频的SMC凋亡<sup>[15]</sup>,7天至30天内仍可发现SMC凋亡。

平滑肌细胞(SMC)凋亡的调控是一个复杂的过程,体外培养的SMC在低血清时发生的凋亡,部分可被胰岛素样生长因子-1或血小板源性生长因子所阻断<sup>[6,16]</sup>。虽然胰岛素样生长因子-1和血小板源生长因子在正常的和动脉粥样硬化的动脉壁上都存在,但是低浓度的生长因子可以在动脉粥样硬化斑块的深层区域引起凋亡。

调控SMC凋亡的许多基因产物与调控EC凋亡的相似,SMC的凋亡能被*c-myc*的去调节表达所启动<sup>[17]</sup>,*c-myc*下降调节能促进SMC增殖和凋亡共存,并且不需要生长停滞。*c-myc*靶基因的诱导可能是凋亡所需要的,但至今还未确定。然而,*c-myc*诱导的SMC凋亡至少部分受P53调控,血清撤去后引起的由*c-myc*诱导的死亡或凋亡也可被*bcl-2*的过量表达所阻断。

对体内SMC凋亡的机制知之甚少,但已经发现

SMC 凋亡能影响动脉壁的厚度和动脉腔的大小。近来研究发现<sup>[18]</sup>,在动脉壁发生发育重塑(remodeling)后 SMC 的凋亡可控制其数目。推测在粥样硬化斑块中比较严重的区域 SMC 的凋亡导致了粥样硬化斑块的破裂与血栓形成。在动脉粥样硬化形成过程中,SMC 凋亡也可导致动脉管腔的严重改变,或者使粥样硬化斑块下肌层萎缩。然而,动脉粥样硬化形成的动物模型显示在体内<sup>[19]</sup>和体外<sup>[17]</sup>细胞增殖与细胞死亡致粥样硬化是独立调控的,提示 SMC 凋亡在体内与体外的调控途径是不一致的。

### 3 巨噬细胞的凋亡

动脉粥样硬化损伤中的巨噬细胞几乎都变成泡沫细胞,但是泡沫细胞的死亡导致细胞外脂质核的发生和扩大<sup>[20]</sup>。在早期损伤的脂质核附近,存在巨噬细胞抗体和蜡样质,这两种复合物的存在促进了巨噬细胞死亡和脂质核的扩大<sup>[20]</sup>。

体外实验证明氧化型 LDL 可以引起小鼠<sup>[21]</sup>和人<sup>[22,23]</sup>的巨噬细胞死亡,主要是通过细胞凋亡。能看到典型的凋亡特征:DNA 的梯形条带<sup>[24,25]</sup>。更重要的是,小鼠和人的巨噬细胞也能在体外氧化修饰其自身的 LDL,结果导致自身的死亡。这种损伤能被脂溶性的抗氧化剂所抑制<sup>[21]</sup>。最近发现在兔动脉粥样硬化病变中<sup>[26]</sup>和灵长类的食饵性动脉粥样硬化中<sup>[27]</sup>,抗氧化剂丙丁酚可抑制泡沫细胞的形成和脂质核的发展。巨噬细胞损伤同氧化过程中的化学物质密切相关。

在人的动脉粥样硬化斑块中,巨噬细胞源泡沫细胞比平滑肌细胞源泡沫细胞更易发生凋亡,特别是在脂质核内和脂质核周围。在脂质核的非细胞部分可发现凋亡残留物。

就巨噬细胞活性而言,在动脉粥样硬化斑块形成的所有阶段都是潜在的危害。氧化型脂蛋白可导致巨噬细胞死亡,这在理论上可被抗氧化剂控制。然而,单纯地延长病变处巨噬细胞的生存并非明智的策略。虽可延缓脂质核的扩大,但其代价是增加病灶内巨噬细胞的数量并可能增加血栓形成的机会。

内皮细胞(EC)不断更新是动脉粥样硬化损伤区的一个基本特性,从与其它形式炎症的类似结果看出,试图干涉 EC 凋亡是不明智的。近年来有研究提示动脉粥样硬化可能是一种良性肿瘤,但试图诱导动脉粥样硬化斑块中的 SMC 凋亡也是不适宜的,因为这可能削弱深度发展的动脉粥样硬化斑块从而导致粥样斑块加速破裂,形成血栓。Han 等<sup>[28]</sup>对动脉粥样硬化患者旋切出

的冠状动脉粥样硬化斑块进行了观察,结果发现了 SMC 的凋亡,因此推测 SMC 的凋亡调控失调或凋亡小体的清除不足是加剧动脉粥样硬化发展的重要因素,而阻止凋亡推进也极有可能增大动脉粥样硬化伤口的体积。经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)主要的并发症是再狭窄(RS),主要表现为 SMC 的增殖和迁移以及新生内膜的增厚,推测 SMC 凋亡不足是导致再狭窄的重要原因,因此可通过转基因等方法来增加 SMC 的凋亡以防治再狭窄。

### 参考文献

- 1 Chisolm GM. Cytotoxicity of oxidized lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*, 1991, 2: 311~316.
- 2 Geng Y, Wu Q, Muszynski M, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1-beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16: 19~27.
- 3 Xu Q, Luef G, Weimann S, et al. Staining of endothelial cells and macrophages in atherosclerotic lesions with human heat-shock protein-reactive antiser. *Arterioscler Thromb*, 1993, 13: 1 763~769.
- 4 Schett G, Xu Q, Amberger A, et al. Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cells. *J Clin Invest*, 1995, 96: 2 569~577.
- 5 Araki S, Shimada Y, Kaji K, et al. Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 214: 582~588.
- 6 Maier J, Morelli D, Balsari A. The differential response to interferon-gamma by normal and transformed endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 214: 582~588.
- 7 Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, et al. Tumour necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol*, 1991, 214: 582~588.
- 8 Kondo S, Yin D, Aoki T, et al. Bcl-2 gene prevents apoptosis of basic fibroblast growth factor-deprived murine aortic endothelial cells. *Exp Cell Res*, 1994, 213: 428~432.
- 9 Varani J, Dame MK, Tayle CG, et al. Age-dependent injury in human umbilical vein endothelial cells-relationship to apoptosis and correlation with lack of A20 expression. *Lab Invest*, 1995, 73: 851~858.
- 10 Meredith J, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*, 1993, 4: 953~961.

- 11 Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, et al. Integrin alpha beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 1994, **79**: 1 157~164.
- 12 Salvayre R, Escargueil-Balanc I, Meihac O, et al. Endothelial cell damage by mildly oxidized low-density lipoprotein. In: *Free Radicals, Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis*. Edited by Bellomo G, Maggi E, Rice-E-vans C. London: Richelieu Press, 1995; 163~181.
- 13 Peter Gorog. Modified low density lipoprotein is a potent stimulus for smooth muscle cell outgrowth from rat aortic explant *in vitro*. *Atherosclerosis*, 1997, **129**: 1~7.
- 14 Bjorkerud B, Bjorkerud S. Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16**: 416~424.
- 15 Harris P, Luc M, Kevin K, et al. Evidence for the rapid onset of apoptosis in vascular smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation*, 1997, **95**: 981~987.
- 16 Bennett MR, Evan GL, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic-plaques. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 2 266~274.
- 17 Bennett MR, Evan GL, Schwartz SM. Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53 dependent and independent pathways. *Circ Res*, 1995, **76**: 168~175.
- 18 Cho A, Courtman D, Langille L. Apoptosis in arteries of the neonatal lamb. *Circ Res*, 1995, **76**: 168~175.
- 19 Thomas W, Kim D, Lee K, et al. Population dynamics of arterial cells during atherogenesis X II. Mitogenic and cytotoxic effects of a hyperlipidaemic(HL) diet on cells in advanced lesions in the abdominal aortas of swine fed an HL diet for 270~345 days. *Exp Mol Pathol*, 1983, **39**: 257~270.
- 20 Ball RY, Stowers EC, Burton JH, et al. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis*, 1995, **114**: 45~54.
- 21 Reid VC, Mitchinson MJ. Toxicity of oxidized low density lipoprotein towards mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *Atherosclerosis*, 1993, **98**: 17~24.
- 22 Marchant CE, Law NS, Van der Veen C, et al. Oxidized low density lipoprotein is cytotoxic to human monocyte-macrophages; protection with lipophilic antioxidants. *FEBS Lett*, 1995, **358**: 175~178.
- 23 Simon JH, Laszlo H, Katharine C, et al. Apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein. *J Pathol*, 1996, **179**: 294~302.
- 24 Reid VC, Hardwick SJ, Mitchinson MJ. Fragmentation of DNA in P388D1 macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein. *FEBS Lett*, 1993, **322**: 218~220.
- 25 刘尚喜, 周 玫, 陈 瓊. 氧化型低密度脂蛋白不同组分在诱导巨噬细胞凋亡中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4** (4): 241~245.
- 26 Braesen JH, Beisiegel U, Niendorf A. Probucol inhibits not only the progression of atherosclerotic disease, but causes a different composition of atherosclerotic lesions in WHHL-rabbit. *Virchows Arch*, 1995, **426**: 179~188.
- 27 Chang MY, Sasahara M, Chait A, et al. Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the non-human primate by probucol. I. Cellular composition and proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 1 631~640.
- 28 Han DKM, Haudenschild CC, Hong MK, et al. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol*, 1995, **147**: 267~277.