

# 冠状动脉粥样硬化斑块破裂的细胞与分子生物学研究进展

覃 军 综述, 何作云 审校

(第三军医大学附属新桥医院心内科, 重庆 400037)

[主题词] 动脉粥样硬化; 斑块破裂; 细胞因子; 基质金属蛋白酶

[摘要] 近 10 年来对冠状动脉粥样硬化斑块生物学和动脉粥样硬化斑块破裂触发的认识迅速加深, 已明确几种使斑块失稳定的分子和细胞学机制。将来血管病理生理学的研究应以稳定易破裂动脉粥样硬化斑块以及减少动脉粥样硬化斑块破裂后血栓形成为方向。本文介绍了近年来动脉粥样硬化斑块破裂的细胞学及分子生物学研究进展。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

多数急性冠状动脉事件(不稳定性心绞痛、急性心肌梗塞和心脏性猝死)系由于狭窄并不十分严重的动脉粥样硬化斑块破裂、继发血栓导致, 通过冠状动脉血运重建可纠正严重狭窄, 但并不改变动脉粥样硬化的生物学过程, 斑块不稳定的问题仍然存在。因此, 研究动脉粥样硬化斑块破裂的机理及寻找稳定斑块的有效治疗措施具有重要的临床意义<sup>[1]</sup>。

动脉粥样硬化斑块破裂可由血流动力学、生物力学因素(包括血压及脉压, 心脏收缩, 冠脉血管痉挛, 斑块内毛细血管出血, 管壁应力)及介入手术机械外力间接或直接引起<sup>[2]</sup>, 本文主要对由于斑块内在不稳定性所引起的自发性破裂的研究作一综述。

## 1 动脉粥样硬化斑块的结构及不稳定性动脉粥样硬化斑块的特征

### 1.1 动脉粥样硬化斑块的结构及特点

典型晚期斑块由一个脂质(主要为低密度脂蛋白)和坏死细胞及其残存物质混合形成的粥样核心及纤维帽组成。当粥样物质中的脂质以胆固醇结晶形式存在时, 在体温下呈胶状, 使粥样斑块不易破裂; 而当脂质以胆固醇酯形式存在时, 在体温下呈液状, 粥样斑块易破裂。

纤维帽是由增生的胶原纤维和平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)构成的致密层。纤维帽的厚度、强度及其胶原组织含量多少对于防止斑块破裂至关重要, 而斑块与正常内膜交界处(即肩部)是纤维帽最薄、斑块最易发生破裂处。斑块中的细胞外基质主要是胶原及弹性蛋白, 其中胶原在纤维帽中含量最大。纤维帽中的胶原以间质胶原为主并赋予纤维帽稳定性, 斑块中的胶原为Ⅰ型和Ⅲ型胶原。生理状态下 SMC 合成并释放胶原, 血小板源性生长因子或转化生长因子

-β 能刺激 SMC 增加间质Ⅰ型和Ⅲ型胶原前体 mRNA 表达及蛋白质合成<sup>[3]</sup>。蛋白多糖也参与斑块纤维帽的形成, 但在细胞外基质中其抵抗破裂的作用不大。通常钙构成斑块体积的 20%, 并与斑块的总体积明显相关。斑块中钙羟磷灰石的沉积是个活跃的过程, 发生动脉粥样硬化的区域可能表达与钙代谢有关的几种基因, 如 osteopontin 和 osteocalcin<sup>[4]</sup>。当纤维帽大量钙化时, 其僵硬程度增加, 也可使纤维帽易于破裂。

生物力学研究表明, 斑块纤维帽承受的应力作用最大<sup>[5]</sup>, 并且是血液与斑块中强致血栓形成的脂核的分隔。纤维帽在决定斑块破裂中的重要地位使之成为细胞学和分子生物学研究斑块破裂的突破点。

### 1.2 不稳定性动脉粥样硬化斑块的特征<sup>[6, 7]</sup>

大量研究已明确不稳定斑块在结构、细胞学及分子水平的一等特征: ①偏心的管腔周缘; ②质丰富的斑块; ③含有厚度易变或较薄的纤维帽; ④局部炎症细胞浸润; ⑤巨噬细胞增多, 活性增加; ⑥活化 T 淋巴细胞; ⑦新生微血管; ⑧ SMC 减少; ⑨炎症标志物增加; ⑩基质金属蛋白酶表达; ⑪组织因子增加。

## 2 不稳定性动脉粥样硬化斑块破裂的机理

迄今斑块破裂的机理尚未完全明了, 研究表明斑块不稳定与多种参与动脉粥样硬化形成的细胞及因子有关, 其破裂与否取决于维护斑块稳定与致斑块不稳定因素的动态平衡。

### 2.1 肿瘤坏死因子抑制胶原基因表达及合成

最早进入斑块破裂研究领域的是作为炎症和免疫反应的蛋白质介质——细胞因子和生长因子。研究发现细胞因子能调节稳定纤维帽的间质胶原的合成, 即血小板源性生长因子或转化生长因子-β 可刺激 SMC 合成胶原增多。但无论是生理状态还是激活状态时, 肿瘤坏死因子几乎能完全性抑制 SMC 表达间质胶原基因, 且此作用与干扰素-γ 毒性无关<sup>[8]</sup>。采用酶谱分析技术(zymographic analysis technique)发现, 在动物

脉粥样硬化病变组织中 T 淋巴细胞与间质胶原蛋白及其 mR-NA 呈负相关<sup>[9]</sup>。结合在动脉粥样硬化斑块中只有 T 淋巴细胞能分泌干扰素- $\gamma$ , 表明不稳定斑块中活化 T 淋巴细胞分泌干扰素- $\gamma$ , 从而抑制斑块中 SMC 的胶原基因表达及胶原合成<sup>[8]</sup>。干扰素- $\gamma$  还能抑制 SMC 增殖、促进其死亡或凋亡, 减少斑块中 SMC 数量, 进一步削弱斑块纤维帽的稳定性。此外, 干扰素- $\gamma$  通过活化巨噬细胞释放基质金属蛋白酶降解斑块中的细胞外基质, 是其导致斑块不稳定的另一途径<sup>[10]</sup>。

## 2.2 斑块中细胞外基质的降解作用

**2.2.1 基质金属蛋白酶降解胶原** 纤维帽或斑块的完整性、稳定性不仅依赖胶原生物合成, 也与其降解速率有关。通常具有三联螺旋结构的间质胶原纤维非常稳定, 能抵抗作用很强的蛋白水解酶。但基质金属蛋白酶与细胞内酶(如溶酶体)不同, 其在生理 pH 时能特异性降解细胞外基质。基质金属蛋白酶系蛋白酶超家族, 主要来源于巨噬细胞, 目前已发现的基质金属蛋白酶有 12 种。其中 MMP1(间质胶原酶)特异性分解细胞外基质, 首先攻击稳定、致密三联纤维网状胶原; MMP2(明胶酶 A)及 MMP9(明胶酶 B)进一步分解胶原片段; MMP3(stromelysin)为第三类基质金属蛋白酶, 能将其余基质金属蛋白酶由酶原形式转化成活性基质金属蛋白酶, 并降解构成基质的另外二种主要成份弹性蛋白及蛋白多糖中的蛋白质。人动脉粥样硬化斑块中 SMC、巨噬细胞及 T 淋巴细胞均能分泌 MMP1、MMP9 及 MMP3<sup>[11]</sup>, 斑块表面的内皮细胞也能分泌 MMP1。

**2.2.2 基质金属蛋白酶的正向调节** 正常动脉无活性基质金属蛋白酶存在。然而采用底物酶谱法(substrate zymography technique)研究表明动脉粥样硬化病变处存在活性基质金属蛋白酶<sup>[12]</sup>, 并已证实人动脉粥样硬化斑块中的平滑肌细胞能表达活性基质金属蛋白酶<sup>[13]</sup>。多种细胞因子(白细胞介素-1、肿瘤坏死因子<sup>[10]</sup>和 CD40 配基<sup>[14]</sup>)均能促进单核细胞/巨噬细胞表达基质金属蛋白酶。在细胞因子(如干扰素- $\gamma$ 、肿瘤坏死因子、白细胞介素-1 和巨噬细胞集落刺激因子)的作用下, 活化 T 淋巴细胞及 SMC 也能分泌基质金属蛋白酶。新近还发现人 SMC 源性泡沫细胞也能表达基质金属蛋白酶, 但尚未证实是否具有活性。此外, 体外实验显示 I 型胶原能促进单核细胞释放 MMP9。

CD40-CD40 配基(CD40L)信号传导通路在调节非免疫细胞参与动脉粥样硬化形成中具有重要意义。CD40L 为跨膜糖蛋白(分子量为 45~50 kDa), 存在于动脉粥样硬化病变组织中巨噬细胞和内皮细胞上, 活化 T 淋巴细胞也表达 CD40L。通过 CD40L 能诱导内皮细胞、SMC 及巨噬细胞表达 MMP1 和 MMP3, 能诱导内皮细胞和 SMC 表达 MMP9。而且, 表达基础水平无活性 MMP2 的这二种细胞能在 CD40L 介导下表达活性的 MMP2, 更为重要的是 CD40L 介导表达基质金属蛋白酶的作用远远强于干扰素- $\alpha$  和白细胞介素- $1\beta$  的刺激作用<sup>[15]</sup>。

**2.2.3 其它酶的降解作用** 巨噬细胞可通过释放纤溶酶原激活物及吞噬作用降解、削弱细胞外基质。活化的肥大细胞也能分泌蛋白水解酶, 如类胰蛋白酶(trypsin)和胃促胰液酶(chymase)参与消化斑块细胞外基质, 后者还能活化巨噬细

胞等所释放的无活性基质金属蛋白酶<sup>[6]</sup>。

巨噬细胞是不稳定斑块的主要构成细胞, 其在斑块中的作用从冠状动脉粥样硬化组织中已得到病理证实: 不稳定型心绞痛与非 Q 波性心肌梗死者冠状动脉粥样硬化斑块中的巨噬细胞含量大于稳定型心绞痛者; 与稳定型心绞痛或无症状性动脉粥样硬化比较, 急性冠状动脉综合征者其富含巨噬细胞区与整个斑块的比率较高。因此斑块中巨噬细胞的浸润程度对不稳定斑块的损害过程起重要的调控作用。

**2.2.4 基质金属蛋白酶的负向调节** 同生物体中的许多调节机制一样, 机体也存在内源性抑制基质金属蛋白酶的机制。已发现核受体能通过多种途径抑制基质金属蛋白酶, 其中核受体超家族中的过氧化物增殖活化剂受体(peroxisomal proliferator-activated receptor $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )尤为引人注目。在动脉粥样硬化形成中转录因子 PPAR $\gamma$  调控脂代谢和脂肪形成, 而正常动脉组织很少表达 PPAR $\gamma$ 。研究表明 PPAR $\gamma$  不仅能抑制细胞因子介导的巨噬细胞的活化, 在体外还能抑制动脉粥样硬化形成中具有重要意义的多种基因(包括基质金属蛋白酶基因)的转录启动子的转录<sup>[16]</sup>。新近研究进一步证实人动脉粥样硬化斑块的单核细胞在分化为巨噬细胞过程中能表达 PPAR $\gamma$ , 并且在二种活化剂 15d-PGJ2 (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2) 和 troglitazone(一种抗糖尿病药物)的作用下, PPAR $\gamma$  呈浓度依赖方式抑制基质金属蛋白酶的 mRNA 表达及其分解胶原活性<sup>[17]</sup>。

机体普遍存在的基质金属蛋白酶抑制剂 TIMPS 抑制其降解胶原的作用。生理状态下, SMC 表达二种主要的 TIMPS (TIMP1 和 TIMP2) 异构体及 MMP2, 但生物化学研究表明体内此种 MMP2 因与其相应的抑制剂 TIMPS 以复合物形式存在而不表现出活性。炎症因子(如 TNF、IL-1)作用于 SMC, 在促进其表达 MMP2 的同时 TIMPS 的表达并不增加, 因而使 SMC 获得降解胶原的能力<sup>[18]</sup>。由于不稳定斑块中巨噬细胞较多, SMC 较少, 因而 SMC 的这种保护作用在病理状态下意义有限。此外, 有报道表明 T 淋巴细胞源性的干扰素- $\gamma$  能抑制重组人 CD40 配基的诱导巨噬细胞产生基质金属蛋白酶的作用。

## 2.3 动脉粥样硬化斑块不稳定与免疫反应及炎症

对 71 例不同程度急性冠脉综合征行斑块切除术的病人进行回顾性研究表明, 斑块内含白细胞介素-2R(CD25)阳性 T 淋巴细胞随缺血性冠脉综合征的严重程度显著增高, 提示不稳定斑块内存在免疫反应活化和放大, 可能导致具有降解组织和血管活性的炎性产物暴增, 减弱斑块的稳定性。因此, T 淋巴细胞活化是不稳定斑块生物学过程的另一特征。

至于触发不稳定斑块中免疫反应活化的抗原, 资料提示过的有热休克蛋白、巨细胞病毒抗原、肺炎衣原体蛋白质及脂多糖抗原、脂质衍生物。但迄今体外研究表明, 唯有氧化型 LDL 的抗原结构能够刺激人动脉粥样硬化斑块衍生 T 淋巴细胞。载脂蛋白 E 基因敲除动物的粥样斑块病变的细胞分析表明, CD25 阳性、CD4 阳性细胞参与这种遗传性高胆固醇血症动物病变形成。因而认为血管壁堆积胆固醇和 T 细胞活化之间可能有直接联系并可能是通过氧化修饰脂蛋白的自身免

疫反应介导。如果氧化型 LDL 真的引起上述免疫反应的活化(无论是单独地或与其他抗原共同作用),降脂治疗就不但有减小脂核及斑块体积的远期疗效,还有减少炎症物质暴增和稳定斑块的近期效果<sup>[19]</sup>。事实上,新近研究已表明低脂饮食能通过降低基质金属蛋白酶表达及活性,促进胶原积累,从而达到稳定斑块的近期效果<sup>[20]</sup>。

### 3 稳定斑块的意义及分子生物学治疗

#### 3.1 稳定动脉粥样硬化斑块的意义

最近有关他汀类的临床试验结果显示,积极的内科治疗可减少有创性治疗。因此既往先入为主的“冠脉腔学”应该让路给对动脉粥样硬化病理生理学的进一步认识,重新谨慎评估稳定斑块的积极内科治疗与血运重建在慢性心肌缺血处理中的相对裨益;同时,将来血管病理生理学及生物学的研究应以稳定易破斑块以及减少斑块破后血栓形成成为方向。

#### 3.2 基因治疗动脉粥样硬化斑块

基因治疗斑块的目的是通过基因转移防止动脉粥样硬化斑块破裂、恢复受损血管内皮的功能和防止血栓形成,可能思路有: ①基质金属蛋白酶组织抑制剂; ②用反义原理阻断促炎分子,如核因子 KB; ③用转基因方法过度表达一氧化氮合酶或前列环素合酶,以减轻内皮功能低下和随之存在的促凝状态; ④抑制 CD40 信号转导环节; ⑤用转基因方法抑制血管过度表达组织因子的通路。既往的难题是没有适用的动物模型,无法检验这些研究策略。新近 Rekhter<sup>[21]</sup>报道通过在食饵性兔动脉粥样硬化的主动脉内膜下置入可控球囊建立了粥样斑块破裂模型,预计将大大推进这方面的研究。

#### 参考文献

- [1] Kullo IJ, Edwards WD, Schwartz RS. Vulnerable plaque: Pathobiology and clinical implications[J]. *Ann Intern Med*, 1998, **129**: 1 050- 060
- [2] Gronholdt MLM, Pedersen SD, Falk E. Coronary atherosclerosis: determinants of plaque rupture[J]. *Eur Heart J*, 1998, **19** (suppl C): C24- 29
- [3] Amento EP, Ehsani N, Palmer H, et al. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells[J]. *Arterioscler Thromb*, 1991, **11**: 1 223- 230
- [4] Celermajer DS. Noninvasive detection of atherosclerosis[J]. *NEJM*, 1998, **339**: 2 015
- [5] Cheng GC, Loree HM, Kamm RD, et al. Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions[J]. *Circulation*, 1993, **87**: 1 179- 187
- [6] Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption[J]. *Circulation*, 1995, **92**: 657- 671
- [7] Kristensen SD, Ravn HB, Falk E. Insights into the pathophysiology of unstable coronary artery disease[J]. *Am J Cardiol*, 1997, **80** (5A): 5E- 9E
- [8] Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes[J]. *Circulation*, 1995, **91**: 2 844- 850
- [9] Rekhter MD, Zhang K, Narayanan AS, et al. Type 1 collagen gene expression in human atherosclerosis[J]. *Am J Pathol*, 1993, **143**: 1 634- 648
- [10] Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF-  $\alpha$  and IL- 1 selectively induce expression of 92- kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol*. 1996. **157**: 4 159- 165
- [11] Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques[J]. *J Clin Invest*, 1994, **94**: 2 493- 503
- [12] Galis ZS, Sukhova GK, Kranzher R, et al. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix- degrading proteinases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 402- 406
- [13] Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, et al. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, **748**: 501- 507
- [14] Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture [J]? *Circ Res*, 1997, **81**: 448- 454
- [15] Mach F, Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: A key role in atherosclerosis [J]? *Atherosclerosis*, 1998, **137**: S89- S95
- [16] Ricote M, Li A, Wilson T, et al. The peroxisome proliferator- activated receptor-  $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation [J]. *Nature*, 1998, **391**: 79- 82
- [17] Marx N, Sukhova G, Murphy C, et al. Macrophages in human atheroma contain PPAR gamma[J]. *Am J Pathol*, 1998, **153**(1): 17- 23
- [18] Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, et al. Cytokine- stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion [J]. *Circ Res*, 1994, **75**: 181- 189
- [19] Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, et al. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma[J]. *Circulation*, 1998, **97**: 2 433- 444
- [20] Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist J, et al. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease and serological evidence for chlamydia pneumoniae infection [J]. *Circulation*, 1999, **99**: 1 540- 547
- [21] Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, et al. Animal model that mimics atherosclerotic plaque rupture[J]. *Circ Res*, 1998, **83**: 705- 713

(此文 1999- 09- 13 收到, 2000- 01- 10 修回)

(此文编辑 朱雯霞)