

# 细胞凋亡与动脉粥样硬化关系的最新研究进展

王 贞<sup>1</sup>, 李海波<sup>2</sup> 综述, 洪嘉玲<sup>1</sup> 审校

(武汉大学医学院 1. 生物化学教研室, 2. 药理学教研室, 湖北省武汉市 430071)

[主题词] 细胞凋亡; 动脉粥样硬化; 基因表达; 信号传导

[摘要] 细胞凋亡是受基因控制的细胞主动性“自杀”过程, 其异常可引起机体疾病。动脉粥样硬化中多种凋亡相关基因的表达发生变化, 且发病过程中又有各种因素影响着细胞凋亡。因此, 对二者关系的深入研究有助于更透彻地理解动脉粥样硬化的发病机制, 从而为防治动脉粥样硬化提供可靠的理论基础。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

细胞凋亡是受基因控制的一种生理性死亡模式, 通过这一模式机体控制组织中细胞数目, 清除无用的、有害的及异常的细胞, 从而维持机体自身稳定。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是指发生在大型或中型弹性动脉、肌性动脉壁内膜及内膜下, 以脂质沉着, 并伴有中层平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)向内膜移行、增殖为特征, 内膜增厚发展而形成的粥样病灶或纤维脂质斑块。在其形成过程中, 不规则的细胞凋亡引起动脉管壁在形态发生、结构稳定及代谢等方面的异常。有关凋亡的众多生理和生化因子可能参与了血管细胞的凋亡过程, 影响 As 斑块的完整性和稳定性。

## 1 动脉粥样硬化中细胞凋亡相关基因、信号传导及调控因子

### 1.1 p53 基因

人类 p53 基因定位于 17p13, 全长 20 kb, 含 11 个外显子, 其表达产物 p53 蛋白含 393 个氨基酸残基。p53 蛋白广泛存在于各种正常组织中, 在调控细胞周期、细胞凋亡和监管基因组完整性等方面均有重要作用。野生型 p53 的一个重要功能是作为一种转录因子, 在细胞的 G<sub>1</sub> 期监视细胞基因组 DNA 的完整性。如果 DNA 受损, p53 使细胞停滞在 G<sub>1</sub> 期, 修复后再进入 M 期, 如不能修复, 则诱导细胞凋亡, 避免细胞癌变。突变的 p53 基因则丧失监视功能, 不但没有抑癌作用, 反而促细胞癌变。最近有研究指出, 野生型 p53 通过调节 SMC 迁移和诱导凋亡抑制人隐静脉冠状动脉旁路移植术新内膜形成。用腺病毒作载体, 将 p53 基因转染 SMC, 使之过量表达 p53, 发现 p53 过量表达对 SMC 增殖无影响, 但却能促进凋亡, 同时能够抑制 SMC 迁移至内膜, 从而减少内膜增厚。这可能为冠状动脉搭桥术后提高血管开放率提供了一种有效的方法<sup>[1]</sup>。Hayashi 等<sup>[2]</sup>在研究 cAMP 对人主动脉 SMC 增殖的影响时发现, p53、p21 基因表达增强。应用磷酸

二脂酶-3 抑制剂 cilostazol 可见主动脉 SMC 内 cAMP 积聚, 后者以剂量依赖性抑制血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)引起的血管平滑肌细胞(vascular SMC, VSMC)增殖。cilostazol、腺苷酸环化酶激活剂 forskolin 和 cAMP 类似物 8-溴-cAMP 能够增强 VSMC p53 蛋白的表达, 明显促进 DNA 裂解, 形成凋亡。因此可以试图应用 cAMP 类似物来对抗 As 中 VSMC 增殖, 从而达到治疗的目的。

### 1.2 bcl-2 家族

bcl-2 定位于 18q21, 约长 230 kb, 含 3 个外显子, 编码 229 个氨基酸残基的膜蛋白。bcl-2 家族成员分成两类: 抑制细胞凋亡类, 包括 bcl-2、bcl-XL 等; ④促进细胞凋亡类, 包括 bax、bcl-Xs 等。心脏移植术发生 As, 移植术 VSMC 增殖所致的弥漫性血管内膜增厚是 As 的病理基础。有研究者将反义 bcl-X 寡核苷酸(bcl-XODN)导入小鼠心脏移植术管腔内, 4 周后收集移植术, 发现正义 bcl-XODN 组和空白对照组 bcl-X 蛋白和细胞粘附分子增多, 凋亡受抑; 而反义 bcl-XODN 组则通过增强的凋亡机制有效地阻止了新内膜形成<sup>[3]</sup>, 这为防止心脏移植术发生 As 提供了一种新的思路。

### 1.3 Fas/FasL/caspases 死亡信号途径

Fas 属于 TNF 受体基因超家族, 胞内段含有一个 80 个氨基酸的死亡功能区, 可与胞质内的衔接蛋白 FADD、TRADD、RIP 和 RAIDD 相结合, 活化 caspases 家族, 引起细胞凋亡。caspase-3 是细胞凋亡的主要执行分子。尽管 VSMC 表达 Fas 分子, 但对 Fas 介导的凋亡却显示出显著的异质性, 表现为 Fas 敏感型和 Fas 抵抗型。Chan 等<sup>[4]</sup>在研究健康人冠状动脉中膜 VSMC 时发现, Fas 敏感型 VSMC 表达 Fas 分子, 且能够招募胞质内衔接蛋白 RIP, 而 Fas 抵抗型 VSMC 胞内 FADD 和 caspase-3、caspase-7 及 caspase-8 分子水平均下降, FLIP 和 c-IAP-1 水平则上升。FLIP 是一种抑制蛋白, 能阻断 caspase-8 和 caspase-10 等的活性, 从而抑制细胞凋亡。c-IAP-1 是一种 NF- $\kappa$ B 控制的基因产物, 可能也在 caspase 水平上抑制细胞凋亡。Fas 介导的凋亡能被 caspase-3 或 8 抑制剂所阻断, 却不能被 caspase-1、caspase-6 及 caspase-7 抑制剂所阻断。据此认为, Fas 敏感性不仅是由表达 Fas 分子与否决定, 还取决于受体后死亡信号蛋白的表达水平。

[收稿日期] 2002-03-11 [修回日期] 2002-06-07

[作者简介] 王贞, 女, 1978 年 1 月出生, 湖北武汉人, 生物化学与分子生物学专业硕士研究生。李海波, 男, 1973 年 10 月出生, 湖北武汉人, 药理学专业硕士研究生。洪嘉玲, 女, 1934 年 1 月出生, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脂蛋白与动脉粥样硬化的研究。

Imanish 等也对 Fas 抵抗进行了一定的研究。体外实验表明, VSMC 只有在蛋白抑制物或附加的炎症介质的作用下, 才对抗 Fas 抗体或 FasL 敏感, 至于蛋白抑制物是否减少某些细胞保护因子的持续表达, 从而使细胞对 Fas/FasL 介导的凋亡敏感还有待进一步阐明。研究还发现, 原代 VSMC 中不仅存在 Fas 分子, 而且表达关键的死亡信号分子, 如 FADD、caspase-3 等, 同时还含有高浓度的  $\kappa$ -FLIP。当加入蛋白抑制剂 CHX 后,  $\kappa$ -FLIP 水平下降, 与凋亡程度呈剂量和时间依赖关系, 还与 caspase-8 和 3 的活性呈负相关。但未观察到 bcl-2 水平的改变, 甚至没有任何轻微的上调。于是, 对 As 提出了一种新的猜想:  $\kappa$ -FLIP 对 VSMC 的凋亡抵抗可能起到一定作用, 而其水平下调有可能使 VSMC 对凋亡更加敏感<sup>[5]</sup>。

Schneide 等对家兔颈 As 灶形成过程中和血管内皮细胞表达 FasL 情况进行研究, 发现无论 FasL 基因是转染的, 还是对照组, 均未见明显的细胞凋亡发生。所以认为, 增多的 FasL 表达只是通过改变 As 灶的细胞构成, 即合成增殖表型 SMC 的积聚来加速 As 灶演进<sup>[6]</sup>。此观点还需进一步证实。

#### 1.4 NF- $\kappa$ B

转录因子 NF- $\kappa$ B 是抗细胞凋亡基因表达的主要控制因子。NF- $\kappa$ B 在胞质中与一抑制亚单位 I $\kappa$ B 结合成复合物, 并处于非活性状态。TNF- $\alpha$  与其受体结合可诱导抗凋亡和促凋亡两种信号途径。抗凋亡信号途径能活化 NF- $\kappa$ B 诱导激酶, 活化 I $\kappa$ B 激酶, 使 I $\kappa$ B 磷酸化, 磷酸化的 I $\kappa$ B 与 NF- $\kappa$ B 异二聚体脱离, NF- $\kappa$ B 转位至核内, 活化存活基因的表达。促凋亡信号途径通过衔接蛋白 TRADD 和 FADD, 然后由 caspase 级联反应而诱导细胞凋亡。由 NF- $\kappa$ B 活化的抗细胞凋亡基因仍有待确定, 可能编码锰超氧化物歧化酶(MnSOD)、cIAP2 和锌指蛋白 A20。Obar 等为弄清特异性抑制 NF- $\kappa$ B 表达是否影响 TNF- $\alpha$  依赖的人类 VSMC 的凋亡, 构建了一个重组腺病毒载体, 使其转染的细胞表达 I $\kappa$ B- $\Delta$ N 蛋白(I $\kappa$ B- $\Delta$ N), 而这个蛋白缺乏激活 NF- $\kappa$ B 所必需的磷酸化作用位点。I $\kappa$ B- $\Delta$ N 的过量表达能够抑制由 TNF- $\alpha$  或 IL-1 $\beta$  诱导的 NF- $\kappa$ B 活化。在过量表达 I $\kappa$ B- $\Delta$ N 的细胞里, TNF- $\alpha$  能显著诱导凋亡, 而 IL-1 $\beta$  则无此效应。caspase-3 家族的选择性抑制物 Z-DEVD-fmk 能够抑制 TNF- $\alpha$  诱导的凋亡, 且 I $\kappa$ B- $\Delta$ N 的过量表达可诱导 TNF- $\alpha$  介导的 caspase-3 和 caspase-2 活化。提示, I $\kappa$ B- $\Delta$ N 过量表达可特异地抑制 NF- $\kappa$ B 和上调 caspase-3、caspase-2 活性而诱导 TNF- $\alpha$  依赖的人 VSMC 凋亡<sup>[7]</sup>。这为我们运用腺病毒介导的 I $\kappa$ B- $\Delta$ N 基因治疗 As 奠定了理论基础。

## 2 动脉粥样硬化中影响细胞凋亡的因素

### 2.1 机械因素

血流的性质能够影响内皮细胞凋亡。研究者挑选上、下游区域均清晰可见, 且无闭塞的 13 例人颈动脉 As 斑块作为研究对象, 应用免疫组织化学及原位末端标记技术检测凋亡。发现和上游相比, 在低流速、低切应力的下游区域内皮细胞更易凋亡。提示, 局部切应力能够影响管腔内皮细胞凋亡, 并且可能是斑块破裂、血栓形成的一个主要决定因素<sup>[8]</sup>。

### 2.2 一氧化氮

内外源性一氧化氮(nitric oxide, NO) 作用于靶细胞可使胞内 wt-p53 合成增多, 使细胞周期停滞于 G<sub>1</sub> 期而促凋亡。Moeslinger 等<sup>[9]</sup>用尿素抑制诱导型一氧化氮合酶(iNOS) 的活性, 发现被脂多糖刺激生长的小鼠巨噬细胞 NO 合成受到抑制, 并伴随巨噬细胞增殖。iNOS 蛋白的表达与尿素呈剂量依赖性递减; 胞浆 DNA 片断的减少说明尿素促增殖效应正是 NO 介导凋亡减少的结果。iNOS 的表达可能有利于防止血管成形术或心脏移植术后血管再狭窄的发生。这与 NO 可诱导 Fas/FasL 介导的人冠状动脉 As 斑块中淋巴细胞和巨噬细胞凋亡及 As 退化有关。另一方面, 由 iNOS 产生的过氧化氮也可能损伤细胞和组织, 与 As 进展有关。所以, iNOS 在 As 退化及进展中均可能扮演重要角色<sup>[10]</sup>。

### 2.3 生长因子

血管壁中膜 SMC 向内膜迁移及过度增殖是 As 形成过程中的一个重要事件。增殖的 VSMC 摄取脂质, 转变为泡沫细胞, 或合成胶原等细胞外间质, 参与 As 病灶的演变。As 早期, VSMC 的增殖与凋亡失衡造成 VSMC 数量的过度增加, 而晚期斑块中 VSMC 的凋亡则造成斑块的不稳定。源自人 As 斑块的 VSMC(pVSMC) 对凋亡存在内在敏感性, 对胰岛素样生长因子-1(IGF-1) 的保护作用不起任何反应。在探讨其机制时发现, 和正常人血管中膜 SMC 相比, 人 pVSMC 显示 < 25% 的 IGF-1 结合率及 < 20% 的 IGF-1 受体表达率。pVSMC 表达并分泌高水平的 IGF-1 结合蛋白(IGFBP) 及 IGF-1 类似物, 且内膜 pVSMC 的 IGF-1R 表达水平比中膜低, 尤其是在斑块的边缘区域。由此认为, 人 pVSMC 对凋亡显示内在敏感性, 在一定程度上是因为 IGF-1R 表达缺陷, IGF-1 介导的生存信号传导受损以及 IGFBP 分泌增多有关<sup>[11]</sup>。

肝细胞瘤源性生长因子(hepatoma derived growth factor, HDGF) 是分泌型肝素结合生长因子家族的一个成员, 高表达于胚胎期主动脉内。最近有研究证实, 血清培养 8~24 h 后, SMC 可表达 HDGF mRNA, 在增殖的 SMC 中尤为显著。外源性和内源性 HDGF 的过量表达能够明显增加 SMC 数量及其 DNA 合成。在培养的 SMC 核内、19 天胎鼠主动脉 SMC 及内皮细胞内、成年鼠邻近腹主动脉狭窄区域的 SMC 内以及小鼠颈动脉内皮剥脱后新内膜中的 SMC 内均可检测到天然 HDGF。而且, 在人颈 As 的 SMC 内, HDGF 与增殖细胞核抗原共同存在, 提示 HDGF 可能有助于调节 SMC 生长<sup>[12]</sup>。

### 2.4 胆固醇

晚期 As 斑块中的巨噬细胞积聚大量游离的胆固醇(free cholesterol, FC), 后者的细胞毒性可致巨噬细胞凋亡, 但其具体机制尚未阐明。研究者将负载有 FC 的巨噬细胞和 caspase-3 选择性抑制剂共同孵育, 发现可以阻断凋亡发生, 提示其中有 caspases 家族的参与。Fas 或 FasL 基因突变的小鼠巨噬细胞对 FC 诱导的凋亡显示出明显的抵抗, 由 FC 诱导的野生型巨噬细胞凋亡可被抗 FasL 抗体阻断。FC 负载对细胞表面 Fas 分子表达没有影响, 但能引起很小却具有再生性的 FasL 表达增多。为明确该发现的生理意义, 研究者进一步比较了 FC 负载和空载的 Fas 缺陷巨噬细胞(仅表达 FasL) 在加入表达 Fas 的巨噬细胞后发生凋亡的能力。结果显示,

FC 负载的巨噬细胞比 FC 空载的巨噬细胞更易凋亡,且此效应能完全被抗 FasL 抗体阻断。由此认为,FC 可以激活 FasL 的表达,从而导致 FC 负载的巨噬细胞发生 Fas 介导的细胞凋亡<sup>[13]</sup>。然而,在研究胆固醇及其氧化产物对 VSMC 凋亡的影响时发现,仅胆固醇氧化物能抑制 VSMC 增殖,且诱导其凋亡,游离胆固醇则无此效应。7-酮基胆固醇是增殖的最强抑制剂,25-羟基胆固醇是凋亡的最强诱导剂,提示不同的胆固醇产物抑制增殖、诱导凋亡的途径可能不同,在 As 演进过程中地位也不同。另有实验发现,用气囊损伤家兔主动脉壁后,给予胆固醇饮食,并未发现 VSMC 凋亡水平有何改变,提示在此实验模型中决定凋亡的主要因素是气囊损伤<sup>[14]</sup>。这一观点还有待更多的实验结果来验证。

## 2.5 氧化型低密度脂蛋白

氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, ox-LDL)是 As 发展中的一种独立危险因素,它在巨噬细胞、SMC 转变为泡沫细胞以及调节细胞增殖、凋亡中起到重要作用。最近的研究关注更多的是 ox-LDL 介导凋亡的具体途径。Kataoka 等<sup>[15]</sup>用高浓度 ox-LDL 诱导培养的牛主动脉 SMC 凋亡。ox-LDL 通过使受胞外信号调控的激酶磷酸化而上调凝集素样 ox-LDL 受体-1(lectinlike ox-LDL receptor 1, LOX-1)的表达,抗 LOX-1 单抗可阻断细胞通过 LOX-1 摄取 ox-LDL,从而抑制 ox-LDL 诱导的牛主动脉 SMC 凋亡。这种抗体能抑制 Bax/Bcl-2 比例的增加。而且,在体内 As 斑块的易破边缘区域,LOX-1 与 Bax 是共同存在的。故而认为,ox-LDL 可通过 LOX-1 调节 Bax/Bcl-2 比例来诱导细胞凋亡。Okura 等<sup>[16]</sup>发现 ox-LDL 可增加培养的人冠状动脉 VSMC 的 Bax 表达。在取自人主动脉、颈动脉、股动脉的晚期 As 斑块的 VSMC 中可见 Bax 免疫反应性增强,凋亡细胞数目增多。但早期 As 斑块中,VSMC 虽表达 BAX 蛋白,却并未检测到凋亡。Heemeier 等<sup>[17]</sup>研究认为 ox-LDL 通过抑制 NF- $\kappa$ B 活性干扰抗凋亡基因 A20 的表达,从而使人血管内皮细胞对凋亡刺激物更加敏感。这可能是由 ox-LDL 组成成份溶血磷脂酰胆碱引起的。另一组研究者则认为,ox-LDL 诱导的细胞凋亡包括 TNF- $\gamma$  和 Jun 激酶的活化。更为重要的是,实验显示温和的 ox-LDL 同样能够活化一系列氧基团敏感的信号传导途径,提示广泛的 LDL 氧化修饰在体内信号传导过程中并非必要条件<sup>[18]</sup>。

其它影响 As 中细胞凋亡的因素也陆续被发现和证实。如乳糜微粒残粒在细胞内代谢时可产生超氧自由基,引起人巨噬细胞和兔动脉 VSMC 凋亡<sup>[19]</sup>。肥大细胞分泌颗粒中的食糜酶也可能参与 As 中 SMC 的凋亡<sup>[20]</sup>。另外,一种新的由 31 个氨基酸组成的内皮素-1 显示出比由 21 个氨基酸组成的内皮素-1 更强的刺激 VSMC 增殖的潜力<sup>[21]</sup>,它在 As 中的作用还需进一步研究。

综上所述,各种因素均通过不同的信号传导通路表达多种凋亡相关基因,最终导致细胞凋亡。在 As 发生发展中,各种因素相互关联,形成复杂的网络,共同调节细胞增殖与凋亡。因此其具体调节机制的进一步阐明,必然会为防治 As 提供一定的理论基础和有效的治疗手段。

## [参考文献]

- George J, Angelini D, Capogrossi C, et al. Wild-type p53 gene transfer inhibits neointima formation in human saphenous vein by modulation of smooth muscle cell migration and induction of apoptosis. *Gene Ther*, 2001, **8** (9): 668-676
- Hayashi S, Morishita R, Matsushita H, et al. Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21. *Hypertension*, 2000, **35** (1): 237-243
- Suzuki J, Isobe M, Morishita R, et al. Antisense Bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Cardiovasc Res*, 2000, **45** (3): 783-787
- Chan W, Hegyi L, Scott S, et al. Sensitivity to Fas-mediated apoptosis is determined below receptor level in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 2000, **86** (10): 1 038-046
- Imanishi T, Hano T, Nishio I, et al. Transition of apoptotic resistant vascular smooth muscle cells to troptotic sensitive state is correlated with downregulation of c-FLIP. *J Vasc Res*, 2000, **37** (6): 523-531
- Schneider B, Vassalli G, Wen S, et al. Expression of Fas ligand in arteries of hypercholesterolemic rabbits accelerates atherosclerotic lesion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (2): 298-308
- Ohara H, Takayanagi A, Hirahashi J, et al. Overexpression of truncated I kappa B alpha induces TNF-alpha dependent apoptosis in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (10): 2 198-204
- Triot O, Mallat Z, Heymes C, et al. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 2000, **101** (21): 2 450-453
- Moeslinger T, Spieckermann G. Urea-induced inducible nitric oxide synthase inhibition and macrophage proliferation. *Kidney Int*, 2001, **59** (Suppl): 78S2-78S8
- Esaki T, Hayashi T, Muto E, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and Fas/Fas ligand correlates with the incidence of apoptotic cell death in atherosclerotic plaques of human coronary arteries. *Nitric Oxide*, 2000, **4** (6): 561-571
- Patel A, Zhang J, Siddle K, et al. Defect in insulin-like growth factor-1 survival mechanism in atherosclerotic plaque-derived vascular smooth muscle cells is mediated by reduced surface binding and signaling. *Circ Res*, 2001, **88** (9): 895-902
- Everett D, Lobe R, Matsumura E, et al. Hepatoma-derived growth factor stimulates smooth muscle cell growth and is expressed in vascular development. *J Clin Invest*, 2000, **105** (5): 567-575
- Yao M, Tabas L. Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the fas pathway. *J Biol Chem*, 2000, **275** (31): 23 807-813
- Yin J, Chautour X, McLachlan C, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by cholesterol and its oxides in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*, 2000, **148** (2): 365
- Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, et al. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (6): 955-960
- Okura Y, Brink M, Itabe H, et al. Oxidized low-density lipoprotein is associated with apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 2000, **102** (22): 2 680-686
- Heemeier K, Leicht W, Palmethofer A, et al. Oxidized LDL suppresses NF-kappa B and overcomes protection from apoptosis in activated endothelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 2001, **12** (3): 456-463
- Napoli C, Quehenberger O, De-Nigris F, et al. Mildly oxidized low density lipoprotein activates multiple apoptotic signaling pathways in human coronary cells. *FASEB J*, 2000, **14** (13): 1 996-007
- Yu C, Mano C. Chylomicron remnant-induced foam cell formation and cytotoxicity: a possible mechanism of cell death in atherosclerosis. *Clin Sci (Colch)*, 2000, **98** (2): 183
- Leskinen M, Wang Y, Leszczynski D, et al. Mast cell chymase induces apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (4): 516
- Nagata N, Niwa Y, Nakaya Y. A novel 31-amino acid-length endothelin, ET-1(1-31), can act as a biologically active peptide for vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **275** (2): 595

(此文编辑 文玉珊)