

外膜是血管病变的积极参与者

胡 维 诚

(山东大学医学院, 山东省济南市 250012)

[作者简介] 胡维诚, 男, 1945 年 6 月出生, 山东大学医学院病理生理学教研室教授、博士研究生导师。1984 年考取世界卫生组织奖学金赴美国华盛顿州立大学病理系进修; 1995 年获得国际动脉粥样硬化学会奖学金赴奥地利因斯布鲁克大学医学生物学和人类遗传学研究所进修; 2000 年获国家教委资助作为高级访问学者, 再次赴美国华盛顿州立大学病理系进修。近年来承担 5 项国家自然科学基金资助项目, 在国内外重要杂志发表科研文章 60 余篇, 获教育部提名 2002 年度国家科学技术二等奖一项, 山东省科技进步二、三等奖五项, 1997 年获政府特殊津贴, 2005 年获高等教育国家级教学成果二等奖、山东省高等教育教学成果一等奖。联系电话 0531-88382044, E-mail: huweicheng@sdu.edu.cn



[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉外膜; 成纤维细胞; 动脉粥样硬化

[摘 要] 长期以来对动脉外膜与血管病灶形成关系的研究较少。一般认为动脉外膜炎性细胞聚集是晚期动脉粥样硬化病灶的病理学特征之一, 外膜炎的严重程度与病灶的严重程度呈正相关。近年来有报告发现动脉外膜炎症是诱发动脉内膜粥样硬化病灶形成的早期事件。研究发现血管成形术后动脉还原型辅酶 ①氧化酶活性增强, 氧自由基生成增多, 刺激外膜成纤维细胞增殖、肌化并向内膜迁移, 参与新内膜增生, 促使血管再狭窄。由此抑制外膜成纤维细胞还原型辅酶 ①氧化酶活性成为有关基因治疗的新途径。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

一般认为血管外膜是有交感神经末梢和滋养血管分布的细胞外基质成分, 主要起到支撑血管的作用。长期以来对作为血管“外面的膜”在血管正常功能和病灶形成中的作用并未得到足够的重视。然而通过近年来的研究发现在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)和在各种血管成形术(angioplasty)后内膜病变发生过程中, 动脉外膜不是无辜的旁观者, 而是积极的参与者。

1 外膜炎症与动脉粥样硬化病灶形成

Allbutt^[1]在 1915 年最早报告发生 As 斑块的动脉外膜有炎性细胞聚集。Schwartz 和 Mitchell^[2]在 1962 年报告了对随机选取的 111 例冠心病人的 440 个斑块组织标本研究结果, 发现动脉外膜炎性细胞聚集与病灶的严重程度呈正相关。Parums 等^[3]在 1986 年发现聚集在动脉外膜的炎性细胞, 55% 为 B 淋巴细胞, 35% 为 T 淋巴细胞, 10% 为巨噬细胞。但在当时有关外膜炎症的研究并未得到足够的重视。

近几年来, 动脉外膜炎症与动脉粥样硬化病灶形成关系的研究文章逐渐增多。Vink 等^[4]在 72 例冠心病病人中查出 24 人的冠状动脉内膜斑块中有肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)特异性膜蛋白阳性表达, 但在其外膜查出该蛋白表达的却有 51 例。用 PCR 技术证实肺炎衣原体存在于动脉外膜巨

噬细胞, 结果提示血液中感染肺炎衣原体的单核细胞也可以通过动脉外膜滋养血管进入 As 斑块转化为巨噬细胞, 同时也说明动脉外膜有炎症存在。Toll 样受体(TLR)4 是细菌脂多糖的受体, 也可识别纤维粘连蛋白和热休克蛋白 60 等与组织损伤有关的内源性多肽。Vink 等^[5]用免疫组织化学法、蛋白印迹和 RT-PCR 技术证实在有 As 病灶的人冠状动脉外膜成纤维细胞有 TLR4 表达。这一结果同样说明在 As 病灶的动脉外膜发生了炎症反应。Bobryshev 等^[6]最近观察了 31 例腹主动脉瘤(直径 5~8 cm)病人手术切除的标本, 发现动脉壁外膜均存在由免疫活性的和表达抗原的细胞聚集组成的血管有关的淋巴样组织(vascular associated lymphoid tissue, VALT), 用免疫组织化学染色发现其为 T 细胞亚群、B 细胞、树突状细胞和巨噬细胞, 主要以 T 细胞为主。在 17 例标本中发现了典型的淋巴滤泡和 B 淋巴细胞形成的生发中心, 8 例有淋巴节样结构。在外膜存在淋巴滤泡和淋巴结样结构提示动脉瘤血管壁外膜发生了免疫反应。Higuchi 等^[7]按 AHA 分类法研究了 598 个人的主动脉斑块, 发现只有 2% 的 I 型病灶(非特异性内膜增厚)外膜有炎性细胞浸润, 而在 IV 型(粥样瘤)、Va 型(纤维粥样瘤)和 VI 型(破裂斑块)病灶有外膜炎性细胞浸润的分别高达 61%、69% 和 79%, 研究结果再次说明外膜炎症是晚期 As 斑块的组织病理学特点。

从上世纪末, 载脂蛋白 E 基因敲除(载脂蛋白 E^{-/-})小鼠成为研究 As 斑块形成的最重要实验动物模型之一, Seo 等^[8]研究了导致载脂蛋白 E^{-/-}小鼠颈总动脉等外周血管管腔狭窄的晚期 As 病灶, 指出外膜炎症、脂质沉积和中膜萎缩对外周

血管因 As 导致管腔狭窄起到重要作用。胡维诚等^[9]通过观察载脂蛋白 E^{-/-}小鼠心脏的连续切片,发现在其冠状动脉有两类 As 病灶,一类是从主动脉起始部直接延伸进入冠状动脉主干的“延伸病灶”,另一类是在冠状动脉小分支的“原位病灶”。进而研究发现外膜无炎性细胞聚集的冠状动脉主干不存在延伸病灶,存在延伸病灶的外膜部位均有炎性细胞聚集,而且是以淋巴细胞为主。在冠状动脉小分支有约 1/3 的原位病灶对应的外膜部位有炎性细胞聚集^[10]。Moos 等^[11]在 2005 年报告在 32、52、78 周非高脂喂养的载脂蛋白 E^{-/-}小鼠,随着 As 病灶的形成,无名动脉外膜 T 淋巴细胞数量分别超过内膜 6、24 和 85 倍。在年幼鼠多为 T 细胞,之后同时出现 T 和 B 细胞。在老年鼠腹主动脉外膜发现了炎性淋巴滤泡样结构,提示载脂蛋白 E^{-/-}小鼠在 As 发生过程中,在外膜发生局部的免疫反应。

对人的 As 病灶的研究和对实验动物的研究的基本结论是:在 As 病灶形成过程中动脉外膜细胞被激活,出现了炎症反应,外膜炎性细胞聚集与 As 斑块的严重程度成正比,而且外膜炎症如同动脉中膜萎缩一样是晚期 As 病灶的病理学特征之一。

近年来有少数学者提出动脉外膜炎症亦可能是 As 病灶形成的早期事件之一。Rayner 等^[12]对 6 周龄载脂蛋白 E^{-/-}小鼠喂高脂食物,连续观察主动脉根部 As 病灶形成的过程,他们用原位杂交方法证实该小鼠在第 2 周单核细胞趋化蛋白(JE/MCP)1 及其受体 CCR-2 的 mRNA 最早表达于动脉外膜的间质细胞。从第 4 周开始发现内膜部位有少量 JE 基因的表达,在此时尚无任何病灶生成。结果提示在内膜病灶形成之前,外膜首先开始了炎症过程。Isik 等^[13]联合应用原位杂交和免疫组化技术发现在主动脉移植大鼠,移植后 3 天内 JE 的 mRNA 首先在动脉外膜间质细胞表达,并有单核细胞浸润。从第 7 天 JE 的 mRNA 开始在内膜表达。结果提示在移植性血管病(移植性 As)新内膜增厚之前,在移植血管的外膜首先出现炎症反应。

如果继续有大量的研究支持外膜炎症是 As 病灶形成的始动环节这一观点,则无疑将是对 Ross 提出的“损伤—反应假说”和“炎症说”内涵的一个重要扩展。

近来有证据提示动脉外膜血管祖细胞也是 As 病灶内平滑肌细胞的来源之一,Hu 等^[14]用免疫组织化学技术发现在载脂蛋白 E^{-/-}小鼠主动脉根部外膜有 21% 的细胞表达干细胞标志 Sc α 1,而在正常组织 Sc α 1⁺的细胞只占 0.01%。另外还有 9% 的外膜细胞呈 c-kit⁺,15% 的外膜细胞 CD34⁺,4% 的外膜细胞 Flk1⁺。这些细胞均不表达胚胎干细胞的标志 SSEA-1。取 Sc α 1⁺的细胞离体培养,在 PDGF-BB 刺激下可分化为平滑肌细胞。这样又为外膜细胞在 As 病灶形成过程中的重要作用从另一方面提供了重要研究证据。

2 外膜与血管成形术后再狭窄

各种形式的血管成形手术后血管再狭窄是当前心血管病基础和临床研究面临的一个重大挑战。与 As 斑块形成研究一样,对血管成形术后血管病灶研究在过去同样着重于内

膜和中膜的炎症反应,很少注意外膜的反应及其在发生血管再狭窄中的作用。Okamoto 等^[15]用球囊损伤猪冠状动脉,发现损伤后 2 h 到 3 天在外膜有嗜中性粒细胞聚集,从 1 天到 7 天有巨噬细胞聚集。从 2 h 到第 7 天发现在损伤部位的外膜有粘附分子(P 选择素、E 选择素、VCAM-1)和嗜中性粒细胞特异性的 CXC 趋化因子的 mRNA 表达,而这些粘附分子和趋化分子在正常血管组织不表达。说明血管成形术外膜有炎症反应。

Scott 等^[16]对猪冠状动脉左前降支进行了经皮血管内冠状动脉成形术(PTCA),分别于术后第 1、第 3、第 7 和第 14 天处死动物,在处死动物前 24 h 注射溴化脱氧尿嘧啶(BrDU),用免疫组织化学法发现 BrDU 阳性(处于增殖状态)细胞。他发现术后 3 天在动脉外膜首先出现大量的处于增生状态的细胞,推测是外膜的间质细胞(成纤维细胞),而在动脉内膜和中膜仅有极少量 BrDU 阳性细胞。至术后 7 天才在新生内膜开始出现较多量的增生细胞。从切片上看 BrDU 阳性细胞的分布有从外膜向新内膜延伸的倾向,而且新内膜中 BrDU 阳性细胞染色较浅,提示新内膜内 BrDU 阳性细胞是最初掺入 BrDU 的细胞分裂形成的子代细胞,有部分标记的 DNA 进入了子代细胞,这些子代细胞呈现较浅的 BrDU 阳性染色。免疫组织化学染色还发现这些增生的细胞合成 α -SM actin 增多,发现成纤维细胞表型有变化形成了肌成纤维细胞,这显然与血管成形术后血管重塑和之后出现的管腔狭窄有关。同时作者还用原位杂交方法发现 PDGF A-链和 PDGF 的 β 受体表达增强,而且在每一个时间点出现表达增强的位置与细胞增殖的位置相一致。在血管成形术后外膜部位首先出现细胞增殖和合成细胞生长因子增多,推测血管外膜在血管成形术后发生继发性血管病灶中起到重要作用。Li 等^[17]离体培养原代外膜成纤维细胞,稳定转染 β -半乳糖苷酶(LacZ),在球囊损伤大鼠右颈总动脉后立即将转染后的成纤维细胞置入内膜损伤处的动脉外膜部位。作者发现原位于动脉外膜的 LacZ 阳性细胞(即外膜成纤维细胞)向腔面迁移参与新内膜形成,并用 RT-PCR 方法在损伤血管部位的新内膜检测到了 LacZ mRNA 的表达,这就为动脉外膜成纤维细胞在血管成形术后向内膜迁移,参与新内膜增生和促使血管再狭窄起到重要作用的新假说提供了直接证据。

Shi 等^[18]发现,球囊损伤猪冠状动脉 24 h 内,在活体上证明损伤血管的外膜部位 NADPH 氧化酶活性增加,超氧阴离子生成增多。因为应用 NADPH 氧化酶的特异性抑制剂 diphenyleneiodonium (DPI)可明显减少外膜超氧阴离子生成($P < 0.001$),从而证明外膜氧自由基生成是 NADPH 氧化酶依赖性的。作者还用免疫组织化学技术证明 NADPH 氧化酶的亚单位 p47phox 和 p67phox 在外膜成纤维细胞表达上调。离体培养外膜成纤维细胞方法证明,应用 DPI 和抗氧化剂清除活性氧后,外膜成纤维细胞增殖减少。上述结果提示血管 NADPH 氧化酶在冠状动脉球囊损伤后上调氧化应激过程中起关键作用,氧自由基刺激冠状动脉外膜成纤维细胞增殖,并与血管重塑有关。

3 外膜与基因治疗

近来基因疗法成为当前治疗心血管疾病的一个研究热点,血管腔内定位基因转染无疑是一种有效途径,但转染过程中阻断血流将会进一步造成内膜损伤,As 病灶和血管成形术后增厚的内膜对外源基因转染有一定的屏障作用,加之血流冲击,又可使转染效率下降,因而血管内膜基因治疗方法有一定的局限性。

基于在 As 和血管成形术后病灶与动脉外膜成纤维细胞关系的研究成果,近几年有学者试探以外膜成纤维细胞 NADPH 氧化酶为靶点,直接在血管外膜进行基因转染抑制该酶的活性,减少氧自由基的生成和外膜成纤维细胞增殖及迁移,阻止血管成形术后新内膜生成,并取得一定的成功。Siow 等^[19]在 2003 年构建了一个含有 β -半乳糖苷酶的腺病毒表达载体(AdLacZ)悬浮在一种氧化聚乙烯和聚丙烯共聚物凝胶(pluronic gel)中,放置于大鼠左颈总动脉周围表面,在活体上转染外膜成纤维细胞取得成功。进而该课题组于 2005 年^[20]报道成功构建了一种腺病毒表达载体,含有 β -半乳糖苷酶、转化生长因子(TGF) β 1 的拮抗物 smad7 和绿色荧光蛋白(GFP)基因,置于大鼠颈总动脉外膜成功转染了外膜成纤维细胞,4 天后行球囊损伤术,发现过度表达 smad7 的大鼠球囊损伤动脉后新内膜厚度明显减小,说明直接从外膜进行基因治疗是可行的。Jacobson 等^[21]发现一种 NADPH 氧化酶的嵌合肽抑制物(gp91ds-tat),通过影响 NADPH 氧化酶各组分的组装抑制该酶的活性。作者将 gp91ds-tat 放入微泵置于球囊损伤大鼠的颈总动脉外膜后,使外膜局部 $O_2^{\cdot-}$ 生成减少,并减轻新内膜的增生。该课题组 2005 年^[22]又成功构建了一种含有成纤维细胞活性的启动子、gp91ds 序列和 pPDGFR-荧光素酶的腺病毒载体(Ad-PDGFR-gp91ds-eGFP),在放置大鼠颈总动脉外膜后行球囊损伤,证明转染后使外膜局部 $O_2^{\cdot-}$ 生成减少,新内膜厚度减小。

与从血管内膜进行基因治疗相比,从血管外膜进行基因转染无疑有很多便利之处。基于已取得的研究成果,我相信将会有更多的学者重视外膜与血管病灶发生的研究工作。

[参考文献]

- [1] Allbutt C. Diseases of the arteries including angina pectoris[M]. London: Macmillan Co, 1915: 468
- [2] Schwartz CJ, Mitchell JRA. Cellular infiltration of the human arterial adventitia associated with atheromatous plaques[J]. *Circulation*, 1962, **26** (1): 73-78
- [3] Parums DV, Chadwaick DR, Mitchinson MJ. The localization of immunoglobulin in chronic periaortitis[J]. *Atherosclerosis*, 1986, **61**: 117-123
- [4] Vink A, Pasterkamp G, Poppen M, Schoneveld AH, de Kleijn DP, Roholl PJ, et al. The adventitia of atherosclerotic coronary arteries frequently contains Chlamydia pneumoniae[J]. *Atherosclerosis*, 2001, **157** (1): 117-122
- [5] Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ, van Middelaaar BJ, Sluiter JP, Smeets MB, et al. In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the de-

- velopment of intimal lesions[J]. *Circulation*, 2002, **106** (15): 1 985-990
- [6] Bobryshev YV, Lord RS. Vascular associated lymphoid tissue (VALT) involvement in aortic aneurysm[J]. *Atherosclerosis*, 2001, **154** (1): 15-21
- [7] Higuchi ML, Gutierrez PS, Bezerra HG, Palomino SA, Aiello VD, Silvestre JM, et al. Comparison between adventitial and intimal inflammation of ruptured and nonruptured atherosclerotic plaques in human coronary arteries[J]. *Arq Bras Cardiol*, 2002, **79** (1): 20-24
- [8] Seo HS, Lombardi DM, Polinsky P, Powell-Braxton L, Bunting S, Schwartz SM, et al. Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. Potential roles of lipid deposition, medial atrophy, and adventitial inflammation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (12): 3 593-601
- [9] Hu W, Polinsky P, Sadoun E, Rosenfeld ME, Schwartz SM. Atherosclerotic lesions in the common coronary arteries of Apo E knockout mice[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2005, **14** (3): 120-125
- [10] 王建丽, 高春荣, 李莉, 陈融, 李瑞峰, 胡维诚, 等. 载脂蛋白 E 基因剔除小鼠冠状动脉外膜炎的演变过程[J]. 山东大学学报(医学版), 2004, **42** (5): 518-521
- [11] Moos MP, John N, Grabner R, Nossmann S, Gunther B, Vollandt R, et al. The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (11): 2 386-391
- [12] Rayner K, Van Eersel S, Groot PH, Reape TJ, et al. Localisation of mRNA for JE/MCP-1 and its receptor CCR2 in atherosclerotic lesions of the Apo E knockout mouse[J]. *J Vasc Res*, 2000, **37** (2): 93-102
- [13] Isik FF, Coughlin SR, Nelken NA, Clowes AW, Gordon D. JE gene expression in an animal model of acute arterial graft rejection[J]. *J Surg Res*, 1996, **60** (1): 224-231
- [14] Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, et al. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in Apo E-deficient mice[J]. *J Clin Invest*, 2004, **113** (9): 1 258-265
- [15] Okamoto E, Couse T, De Leon H, Vinter-Johansen J, Goodman RB, Scott NA, et al. Perivascular inflammation after balloon angioplasty of porcine coronary arteries[J]. *Circulation*, 2001, **104**: 2 228
- [16] Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Simonet L, et al. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries[J]. *Circulation*, 1996, **93** (12): 2 178-187
- [17] Li G, Chen SJ, Oparil S, Chen YF, Thompson JA. Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries[J]. *Circulation*, 2000, **101** (12): 1 362-365
- [18] Shi Y, Niculescu R, Wang D, Patel S, Davenpeck KL, Zaleski A. Increased NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species in coronary arteries after balloon injury[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 739
- [19] Siow RC, Mallawaara CM, Weisberg PL. Migration of adventitial myofibroblasts following vascular balloon injury: insights from in vivo gene transfer to rat carotid arteries[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, **59** (1): 212-221
- [20] Mallawaarachchi CM, Weisberg PL, Siow RC. Smad7 gene transfer attenuates adventitial cell migration and vascular remodeling after balloon injury[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (7): 1 383-387
- [21] Jacobson GM, Douron HM, Liu J, Caretero OA, Reddy DJ, Andrzejewski T, et al. Novel NAD(P)H oxidase inhibitor suppresses angioplasty-induced superoxide and neointimal hyperplasia of rat carotid artery[J]. *Circ Res*, 2003, **92** (6): 637-643
- [22] Douron HM, Jacobson GM, Park JL, Liu J, Reddy DJ, Scheel ML, et al. Perivascular gene transfer of NAD(P)H oxidase inhibitor suppresses angioplasty-induced neointimal proliferation of rat carotid artery[J]. *Am J Physiol*, 2005, **288** (2): H946-953

(此文编辑 胡必利)