

# 血管平滑肌细胞移行及表型转换的分子机制

盛晓赞 综述<sup>1</sup>, 王树人 审校<sup>2</sup>

(1. 兰州大学第一临床医学院, 甘肃省兰州市 730000; 2. 四川大学华西医学中心, 四川省成都市 610041)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管平滑肌细胞; 表型; CA<sub>v</sub>2 元件; MADS 家族; 平滑肌  $\alpha$ -肌动蛋白

[摘要] 在动脉粥样硬化发生、发展的不同阶段, 血管平滑肌细胞表型转换具有重要且可能是不同的病理生理学意义。文章复习了近年动脉粥样硬化病损内膜中血管平滑肌细胞来源、血管平滑肌细胞表型转换的分子机制及鉴别不同平滑肌细胞表型的标志性分子, 以期为深入理解动脉粥样硬化的发病机制和相关研究提供有益认识。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 在成年个体是一种高度特化的细胞, 具有收缩、调节血管张力和维持血压等功能, 而不表现增殖能力, 此时主要表达收缩蛋白及收缩相关分子<sup>[1]</sup>, 为收缩表型。但当生长环境改变时可发生可逆的表型转换, 去分化为合成表型。在某些疾病中, 如动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)、高血压和肿瘤等的发生、发展过程中, VSMC 表型转换即可能发挥抗损伤、修复的作用, 也深深地卷入其致病过程。As 主要波及大中动脉的内膜, 正常内膜通常极少平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC), 增厚内膜的 SMC 系移行而来, 这些移行的 SMC 来自何方, 其表型转换、增殖和移行的分子机制何在, 等等。现就这些问题作一综述。

## 1 移行至动脉粥样硬化病损内膜中平滑肌细胞的来源

上世纪 70~80 年代以来, As 病损内膜中 SMC 一直被认为来源于中膜, 系中膜 SMC 在各种去分化因素影响下, 发生表型转换、增殖并穿透内弹力膜移行至内膜, 参与内膜损伤的修复; 亦成为管壁基质沉淀、血管硬化和管腔狭窄的基本机制。大量证据显示, 表型转换的 VSMC 可生成基质金属蛋白酶、组织型纤溶酶原激活物等组织分解酶类, 以帮助 VSMC 的移行<sup>[2]</sup>。但近年涌现出大量的研究报告显示, 血管损伤动物模型和 As 中增殖的 SMC 和 SMC 样细胞可以来源于循环和外膜中的祖细胞、转分化的内皮细胞、外膜的成纤维细胞及造血干细胞<sup>[3-5]</sup>。这些报告极大地刺激了对 VSMC 分化及表型转换的研究, 人们设想, 针对血循环中靶细胞的新治疗方案也许比针对动脉中膜靶细胞的治疗方案要容易得多。但另一方面, 迄今仍有强有力的研究显示, As 内膜斑块中的 SMC 无例外地来源于局部的中膜<sup>[6,7]</sup>, 这些作者认为, 上述研究都存有各式各样的方法学缺陷, 尚不足以否定“As 病损内膜中 SMC 来源于中膜”的认识。

在血管发育过程中, 特别是血管发生的早期阶段, 有大量 SMC 祖细胞的迁移, 此期 SMC 具有明显的迁移和迅速增殖的能力, 可以合成包括胶原、蛋白聚糖、弹力蛋白、钙粘素和整合素等物质以构成血管的基质。SMC 和血管内皮细胞之间形成丰富的缝隙连接, 内皮细胞通过和 SMC 及外膜细胞的连接形成管状, 这是血管生成、发育的基本过程。VSMC 在血管发育的不同阶段呈现不同的表型, 即使是成年动物的 VSMC 也有明显的异质性。Frid 等<sup>[8]</sup>检测了胎儿期、新生儿期和成年牛肺动脉中膜 SMC 的各种分化标志物, 包括  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin, SM- $\alpha$ -actin)、平滑肌肌球蛋白重链 (smooth muscle myosin heavy chain, SM-MHC)、调宁蛋白、结蛋白和组蛋白, 及其细胞定位、分布形态和弹力层模式等, 他们认为成年牛肺动脉中膜 SMC 至少有四种不同的表型, 分别来源于四种不同的 SMC 系, 且在发育的不同阶段有其特有的基因表达谱。这或许意味着它们在动脉中膜中有着不同的功能而且对病理生理刺激有着不同的反应。其它不同种属和血管来源的研究也获得了类似的结果<sup>[9]</sup>。

在成熟的血管, SMC 呈现非常低的增殖能力, 不迁移, 合成细胞外基质的能力也非常弱。血管受损时, “收缩表型”的 SMC 迅速转变为“合成表型”, 在血管修复中起关键作用。损伤恢复后, 血管局部环境的变化恢复正常, SMC 再次回复收缩表型。成年动物 SMC 随环境的变化其表型也可发生转化, 显示出高度的可塑性。但如前所述, 这些参与修复、重构的“合成表型”SMC 可能来源于血管局部的中膜 VSMC; 也可能来自血循环的祖细胞或干细胞。认为血管修复的 VSMC 来源于血循环的祖细胞或干细胞的最著名报道来自一组日本学者, Sata 等<sup>[3]</sup>发现, 在成型术后血管再狭窄、移植血管病、高脂血症诱导的 As 模型上, 参与血管内膜增生的 VSMC 基本上都来自移植的骨髓细胞, 而非管壁自身固有的 SMC; 而且还显示, 纯化的造血干细胞在体外、体内都可被诱导分化为 SMC。随后的许多研究既有支持、扩展 Sata 等结果的, 也有提出质疑、反对的。支持的文章更将 VSMC 来源扩展到外膜中的祖细胞、外膜的成纤维细胞、转分化的内皮细胞及血循环中固有的 SMC 祖细胞。但 Bentzon 等<sup>[6,7]</sup>用性别错配的骨髓细胞移植, 以绿色荧光蛋白作标记, 在载脂

[收稿日期] 2008-05-19 [修回日期] 2008-09-20

[作者简介] 盛晓赞, 硕士研究生, 主要从事动脉粥样硬化的研究, Email 为 xiaoyun\_310520@sina.com。通讯作者王树人, 博士研究生导师, Email 为 wangshuren1945@yahoo.com.cn。

蛋白 E 基因敲除小鼠模型上, A<sub>s</sub>斑块中的 VSMC 绝大部分来源于管壁自身固有的 SMC, 而非血液循环中的骨髓细胞。Bentzon 等及其它持类似观点的作者指出, VSMC 来源于血液循环细胞的相关研究多存在一些重要的方法学缺陷, 如在动物模型上进行的研究要么对中膜 SMC 造成广泛的损伤, 要么由于与宿主基因不匹配及供体细胞未给予足够的免疫抑制, 造成移植相关的免疫损伤等; 也没有提供骨髓细胞表达 SMC 标志物的证据, 诸如 SM- $\alpha$ -actin、平滑肌分化特异性抗原等; 也有作者研究表明, 移植的骨髓细胞主要行使的是内皮的修复和保护<sup>[10]</sup>。

虽然目前尚无结论性认识, 但 A<sub>s</sub>斑块中 VSMC 异质性来源已受到广泛关注。事实上, A<sub>s</sub>斑块中 VSMC 也显示出显著的异质性, 虽然整体上人们将 VSMC 分为收缩表型和合成表型, 但这两种表型代表的仅是 VSMC 表型的两个极端, 大量过渡状态的中间类型共存于同一血管壁内。且 VSMC 表型转换涉及到细胞的形态、结构、功能、组份及基因表达谱等许多改变, 许多表型标志分子并不具有唯一性, 它们可同时在收缩表型和合成表型的 VSMC 中显著表达<sup>[11]</sup>。

## 2 血管平滑肌细胞表型转换的分子机制

VSMC 的表型转换受一系列复杂的信号分子和环境因素整合效应的影响, 如血小板源生长因子 BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)、生长因子、可溶性细胞因子、钙信号、基质成份、机械力学因素和神经影响等的综合调节。亦与相关基因顺式调控元件的结构有关。

### 2.1 参与调节血管平滑肌细胞表型转换的顺式调控元件

Ravi Karra 等<sup>[12]</sup>研究显示, 可能有数百个基因的改变参与了表型转换和 A<sub>s</sub> 的早期进展, 涉及表型转换相关的基因多为转录因子编码基因, 而涉及 A<sub>s</sub> 早期进展的基因则多与脂质代谢相关。目前最受人关注的顺式调控元件为 CA<sub>1</sub>G, 为 CC(A/T) 6GG 序列, CA<sub>1</sub>G 元件的启动几乎为 SMC 所有分化标志基因的表达所必需。该序列是转录因子血清反应因子 (serum response factor, SRF) 的结合位点, SRF 是转录因子 MADS (MCM1, agamous, deficient, serum response factor) 家族成员之一, SRF 与 CA<sub>1</sub>G 的结合可启动一系列肌肉特异和非肌肉特异的转录。有趣而又令人困惑的是, 该结合可调控两组功能似乎完全相反的基因, 即激活一些早期基因促进细胞的生长和增殖, 如 *c-fos* 也激活促进细胞分化的基因, 如 SM- $\alpha$ -actin、SM-MHC 和肌动蛋白相关蛋白 (SM-22-actin, SM-22 $\alpha$ ) 等。

SRF 与 CA<sub>1</sub>G 如何区别调控这两组功能相反基因的机制尚不完全清楚, 但已有一些端倪。以典型的表型分化基因 SM- $\alpha$ -actin 为例, SM- $\alpha$ -actin 以 CA<sub>1</sub>G 作为表达调控的必需顺式元件, 可能涉及多种复杂机制, 特别是心肌素。心肌素是近年来新发现的一个 SRF 的辅因子<sup>[13]</sup>, 其与 SRF 结合进而影响 SRF 与 DNA 结合。心肌素与 SRF 的结合还受许多其它因素的影响, 如上皮锌指转录因子 Knuppel 样因子 4 (knuppel like factor 4, KLF4) 和 PDGF-BB 等, 这些辅因子调控着 SRF 与 CA<sub>1</sub>G 的不同结合, 从而使 SRF 与 CA<sub>1</sub>G 的不同

结合区别调控两组功能相反的基因。心肌素激活的 CA<sub>1</sub>G 依赖的平滑肌细胞分化基因包括 SM- $\alpha$ -actin、SM-MHC、SM-22 $\alpha$  和调宁蛋白等, 这些基因都包含有多个 CA<sub>1</sub>G 元件。但心肌素不激活只含一个 CA<sub>1</sub>G 元件的 *c-fos* 这可能是 CA<sub>1</sub>G 区别调控这两组功能相反基因的又一机制。另一方面, Owens 等<sup>[14]</sup>发现, 引起 SMC 去分化的 PDGF-BB 的浓度约为引起 SMC 增殖浓度的 1/10 且成纤维细胞生长因子 2、凝血酶和胎牛血清在引起 SMC 增殖的同时并不影响 VSMC 的 SM- $\alpha$ -actin 等分化基因的表达。也就是说, SMC 分化表型标志分子的表达还有除增殖以外的一些其它调控因素的参与, 换句话说, SMC 增殖的调控与 SMC 分化、或表型转换的调控虽然紧密相关, 但并不完全呈此消彼长的关联方式。

### 2.2 钙信号与血管平滑肌细胞的表型转换

近年来越来越多研究显示, 钙信号及其相关分子 (包括离子通道、钙泵等) 的变化可能是 VSMC 表型转换的又一重要机制<sup>[15]</sup>。收缩表型 VSMC 的钙内流信号主要受控于细胞膜上高电压激活的 L 型钙通道 (激活电压约在 -30 mV) 和肌浆网上钙诱导的钙释放 ( $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release, CICR), 即 Ryanodine 受体通道。这两种钙信号不但引起兴奋-收缩耦连, 亦引起 VSMC 分化标志基因的激活, 如 SM- $\alpha$ -actin、SM-MHC、心肌素和收缩蛋白的表达, 被称为兴奋-转录耦连, 该兴奋-转录耦连被证实系通过 RhoA-Rho 激酶系统。

随血管壁损伤、体外培养等环境刺激因素的改变, VSMC 向合成、增殖表型转换, L 型钙通道和 Ryanodine 受体通道表达下调; 而细胞膜上低电压激活的 T 型钙通道 (约 -60 mV) 和肌浆网上 Canonical 瞬态受体电位通道 (canonical transient receptor potential channels, TRPC) 表达上调。这两种通道都在更负的膜电位下被激活, 被称为超极化激活的钙内流。在增殖表型 (体外培养) 和收缩表型 (在体) VSMC 测得的静息膜电位分别为 -45~-70 mV 和 -40~-50 mV, 这显然与上述通道表达的改变相吻合。TRPC 属非选择性阳离子通道家族, 为受体操作通道, 与磷脂酶 C 耦联, 各种因素引起的 VSMC 向增殖表型转换都伴随有 TRPC1 的表达上调、经 TRPC 的钙内流和细胞周期的激活。拮抗、抑制 T 型钙通道或 TRPC 通道都显示出对 VSMC 增殖的抑制。

降低胞内的钙浓度主要经由钙泵, 包括内质网膜上的肌浆/内质网钙 ATP 酶 (sarcolemmal/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase, SERCA) 和胞膜上的浆膜钙 ATP 酶 (plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase, PMCA)。SERCA 有几种亚型, 目前发现, SERCA 2a 的表达与增殖相拮抗, 以腺病毒转染 SERCA 2a 使其高表达可抑制增殖; SERCA 2b 的高表达则与促进增殖相关。PMCA 由 4 个独立的基因编码 4 个 PMCA 异构体, VSMC 主要表达 PMCA1 和 PMCA4 的各种异构体。PMCA1 的高表达可抑制 VSMC 的增殖, 阻止细胞进入 S 期; 而 PMCA4a 则与促增殖相关。

与 VSMC 表型转换相关的钙信号相关分子还有三磷酸肌醇 (inositol-1, 4, 5-triphosphate, IP3) 受体、KCa1.1 和 KCa3.1 钾通道、氯离子通道、钙离子/钙调蛋白依赖的蛋白激酶  $\zeta$  和钙调磷酸酶等<sup>[16]</sup>。但总体来看, VSMC 向增殖表

型转换的相关钙信号主要表现为:钙进入通路从电压门控性通道向受体操作性通道转移,维持一个持续增高的胞浆钙浓度和更负的膜电位。

### 2.3 调节血管平滑肌细胞表型转换的转录因子

VSMC表型转换需要一系列转录因子的表达,确定与VSMC表型转换有关的转录因子是认识VSMC表型转换机制的前提和基础。

**2.3.1 MADS家族** MADS转录因子含58个氨基酸,特异地结合CAAG序列,其基本功能为调控发育。MADS-box是一个大家族,拟南芥基因组的分析显示,有107个基因编码MADS-box转录因子<sup>[17]</sup>,但迄今为止,80%以上MADS蛋白的功能都不清。就已知而言,MADS-box可大致分为iv型(SRF)和⊕型(MEF-2)。iv型SRF的功能已如前述。MEF-2属⊕型MADS-box转录因子,系钙依赖的细胞分化调控因子,分子结构中含有一个高度保守的MADS区和一个MEF-2区。MEF-2包括A、B、C、D四个成员,在骨骼肌、心肌和VSMC中均有表达,其中A、B、D三个成员与VSMC表型转换有关。有研究发现,在颈动脉内膜剥脱术后的新生内膜中MEF-2A、MEF-2B和MEF-2D的表达逐渐增高,14天达到高峰,其表达谱型与新生内膜中表达上调的其它基因相一致,提示MEF-2参与VSMC向合成表型的转化<sup>[18]</sup>。

**2.3.2 GATA家族** GATA是含锌指结构的转录因子,其基因定位于18q11-1~18q11-2与DNA调控区(AT)GATA(A/G)相互作用。该家族包括6个成员,其中GATA-6与VSMC的增殖与分化调控有关。现已证实,GATA-6在G0期大鼠VSMC中表达,当VSMC因外界刺激而增殖时,其表达明显下调,该基因表达谱型与VSMC收缩蛋白基因的表达相一致。GATA-6过表达不仅可阻止促分裂素诱导的细胞周期的启动,还可减弱增殖细胞核抗原的表达,显示抑制细胞增殖的效应。研究还发现,大鼠主动脉球囊损伤后第1~3天,GATA-6表达明显下调,第7天恢复正常,向血管壁中导入GATA-6可使内膜增厚减少50%左右,同时可逆转VSMC分化标志基因的表达。多种VSMC特异基因的启动子区内均含有GATA-6结合位点,提示GATA-6参与VSMC的分化与表型转换过程<sup>[19]</sup>。

**2.3.3 含LM域蛋白家族** 亦称含LM结构域因子,其命名是因为首先在三个转录因子Lin-11、Isf1和Mec3(LM)的同源盒结构域旁发现一富含半胱氨酸、且具有一个或多个锌指样结构的基序,除上述三个转录因子外,迄今已发现的LM蛋白达60多个。它们不仅参与多种基因的转录调控,而且与许多细胞的分化和发育相关。

其中,LM蛋白中第二组的CRP2/SmLM与平滑肌细胞的表型调控关系密切,CRP2募集SRF和GATA等形成一多蛋白复合体参与激活VSMC的特异性分化基因<sup>[17]</sup>。已经证明,CRP2/SmLM主要在VSMC中表达。PDGF-BB刺激平滑肌细胞或当血管受到损伤时,CRP2/SmLM表达下调,显示CRP2/SmLM参与VSMC分化表型的调控。

**2.3.4 同源异形盒蛋白** 同源异形盒蛋白指编码基因含有同源异形结构域的一个大家族蛋白,亦被翻译成同源盒蛋

白。同源异形盒是编码60个氨基酸的蛋白结构域,其功能主要与胚胎的发育和细胞分化相关。进化上高度保守,具有螺旋-转角-螺旋结构。目前发现有三种同源异型基因表达与VSMC的表型转换有关。

### 2.4 调节血管平滑肌细胞表型转换的信号通路

迄今为止,VSMC表型转换的调节因素与细胞信号转导通路尚未完全明了。在众多因素中,促进VSMC向合成表型转换的正性调节因素包括PDGF-BB、表皮生长因子(epidermal growth factor EGF)家族成员、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor bFGF)、胰岛素样生长因子iv(insulin-like growth factors-1 IGF)以及其它生长因子和物理、化学因素,如血管壁损伤、力学因素等。负性调节因素包括转化生长因子β1(transforming growth factor beta 1, TGFβ1)家族、肝素、胰岛素、氧化应激和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases MAPK)等。

**2.4.1 丝裂原活化蛋白激酶级联途径** Su等<sup>[20]</sup>在观察活性氧(reactive oxygen species ROS)对VSMC分化的调节机制时发现,ROS的抑制剂(N-乙酰半胱氨酸、超氧化物歧化酶)减少平滑肌分化蛋白α-actin、调宁蛋白及SM1和SM2肌球蛋白的基础表达,且p38MAPK活性减弱。相反,ROS活性增强,VSMC分化标志蛋白表达升高,p38MAPK活性也增强。抑制p38MAPK的活性可减少VSMC分化标志蛋白表达;用含活性MKK6(p38激活剂)的腺病毒转化VSMC可增加其分化标志蛋白表达,而以含阴性p38MAPK的腺病毒转化VSMC,则减少其分化标志蛋白的表达,该结果强烈提示,ROS通过p38MAPK信号通路促进VSMC的分化。Viedt等<sup>[21]</sup>用血管紧张素⊕(angiotensin ⊕, Ang⊕)处理大鼠VSMC亦发现,Ang⊕诱导的VSMC分化标志蛋白表达亦经由JNK和p38MAPK通路,且系ROS介导,并认为此通路可能与As的发病有关。

Tock等<sup>[22]</sup>发现血流剪切力增加α-actin蛋白的表达和启动子的活动。同一条件下,剪切力增强ERK、JNK和p38MAPK的表达。JNK或p38的抑制阻断剪切力诱导的启动子活动增强作用。3种激酶活性形式的表达,都增加了α-actin启动子的活动。实验表明,在成年大鼠VSMC中,剪切力导致细胞向收缩表型转化,机制亦通过MAPK级联通路。

但另一方面,MAPK通路也可能参与不同VSMC亚型的增殖和迁移。Yamanaka等<sup>[23]</sup>用分化SMC原代培养系统研究EGF家族成员对平滑肌细胞表型转换时发现,EGF、肝素结合型EGF(HB-EGF)、TGF-α、Epregrulin(ER)和β-cellulin(BTC)四种因子结合其受体EGFR后,导致了VSMC向合成表型转换,这种作用受ERK和p38MAPK两条通路的协调激活。

Kavuma等<sup>[24]</sup>研究显示,不同VSMC亚型的增殖和迁移是MAPK依赖的。WKY122-2SMC(相当于未成熟型)和WKY3M-22同等地表达JNK和p38MAPK磷酸化活性形式。而ERK的活动在WKY122-2细胞大于WKY3M-22细胞。两型细胞的增殖分别被ERK、JNK和p38各自的抑制剂PD98059、SP600125和SB202190所减弱,而PD98059的抑

制效果对 WKY122-2 SMC 有更大的影响。两型细胞的迁移受到 SP600125 和 SB202190 的抑制, 而 PD98059 没有影响两型细胞的迁移。这两型细胞的迁移是 JNK2 和 p38 依赖的, 不依赖 ERK, 这表明 SMC 异质性至少部分地被特定的 MAPK 通路所调节。

**2.4.2 磷脂酰肌醇激酶通路** 胰岛素具有维持 VSMC 静止并同时能促进 VSMC 迁移的作用, 胰岛素同时调控这两种相反功能的确切机制尚不完全明了。Wang 等<sup>[25]</sup> 分别用磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase PI3K) 抑制剂和 MAPK 抑制剂研究发现, Wortmannin (PI3K 抑制剂) 能使胰岛素刺激的 SM- $\alpha$ -actin mRNA 和蛋白表达分别减少 26% 和 48%, 但对 VSMC 的迁移无影响。MAPK 抑制剂 PD98059 使迁移率抑制 52%, 但不影响 SM- $\alpha$ -actin 的水平。在 PDGF 引起 VSMC 去分化后, 胰岛素分别增加 111% 和 118% 的 SM- $\alpha$ -actin mRNA 和蛋白质表达。该研究显示, 胰岛素维持 VSMC 静止和逆转 PDGF 去分化作用由 PI3K 通路介导, 而胰岛素促进 VSMC 迁移则由 MAPK 通路介导。

在培养 VSMC 的快速增殖期蛋白激酶 C $\alpha$  (protein kinase C, PKC) 活性减弱, 而在细胞生长汇合时, 活性增强; 维甲酸诱导细胞分化的同时诱导 PKC $\alpha$  的表达增强。将 PKC $\alpha$  微注射入去分化的细胞, 肌动蛋白的表达增强。其它作者也得出类似结论: 维持 SMC 分化依赖于 PI3K 途径<sup>[26]</sup>。

**2.4.3 环一磷酸腺苷通路** 环一磷酸腺苷 (cAMP) 通路是已知的维持 VSMC 收缩表型和阻滞增殖的通路。Klemm 等<sup>[27]</sup> 发现 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB) 在稳定中膜的 VSMC 中含量高, 而在增殖倾向的细胞中含量少。在暴露于慢性缺氧条件下或加入 PDGF 后的新生牛血管, CREB 缺乏或减少, 且 VSMC 增殖加速; 但血清去除 VSMC 静止时, CREB 增加。同时, 载体构造转染试验也从转录因子水平证明 cAMP 通路具有维持 VSMC 分化成熟和阻断生长的作用。

总体来看, MAPK 级联途径具有促进 VSMC 增殖、DNA 合成及细胞分化和迁移的作用, 是细胞增殖、分化的最主要通路。PI3K 途径具有维持细胞静止和分化成熟的作用, cAMP 途径是维持 VSMC 收缩表型、促进分化的通路。有人推断 PI3K/蛋白激酶 B (Akt) 途径和 ERK 与 p38MAPK 通路之间的平衡可能决定了 VSMC 的表现型。但显然, 三个通路的交互作用及其与表型的关系尚有大量的疑问有待阐明。

### 3 血管平滑肌细胞表型标志分子

由于 SMC 功能的多样性及不同的成熟分化状态, VSMC 常可同时显示不同分化程度的多种标志分子, 且目前也尚无一个标志物可作为辨别 VSMC 表型的金标准。但一些 SMC 分化选择性的基因和基因产物已经被鉴别出来, 这对相关的 VSMC 成熟分化状态的研究具有很大的帮助。包括 SM- $\alpha$ -actin, SM-MHC, h1 调宁蛋白、SM 22 $\alpha$ 、大动脉类羧肽酶蛋白 (ACLP)、结蛋白、钙调蛋白结合蛋白和平滑肌细胞分化特异性蛋白等, 下面择其典型简述几种 SMC 表型转换的标志分子。

#### 3.1 平滑肌 $\alpha$ 肌动蛋白

肌动蛋白是真核细胞中普遍存在的含量最丰富的蛋白质, 以氨基酸序列分类, 在成熟的鸟类或哺乳动物中至少存在 6 种肌动蛋白亚类, 其中两种广泛存在于肌肉和非肌肉细胞的胞浆中, 称为  $\beta$  和  $\gamma$  肌动蛋白, 另外四种主要分布于肌肉细胞中, 统称为  $\alpha$ -肌动蛋白。按分布的不同, 又分为位于横纹肌的  $\alpha$ -S-actin, 位于心肌的  $\alpha$ -C-actin, 位于血管平滑肌的  $\alpha$ -SM-actin 以及位于胃肠道平滑肌的  $\alpha$ -V-actin 四种。

$\alpha$ -SM-actin 是细胞来源于平滑肌组织的标志, 在不同表型的平滑肌细胞中具有不同的表达比例。根据其表达比例的不同, 主要被分为两种表型: (1) 收缩型, 见于成熟的 VSMC, 其  $\alpha$ -SM-actin 在细胞中呈优势表达, 细胞通常呈梭形, 具有较强的收缩功能。(2) 增殖型, 见于发育早期或病理过程中的 VSMC, 其  $\alpha$ -SM-actin 含量甚微, 细胞形状与成纤维细胞相似, 增殖能力旺盛。在 VSMC 的发育过程中, 细胞经历了由增殖型向收缩型的表型转换,  $\alpha$ -SM-actin 也经历从少而多的转变。病理状态下, 当 VSMC 受到损伤并进行修复时, 这一发展规律会再现。在血管损伤后的初始修复阶段, VSMC 呈现活跃复制,  $\alpha$ -SM-actin 的含量减少, 非肌肉型肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 含量增加。当病变逐步修复后, 血管平滑肌细胞停止分裂增殖,  $\alpha$ -SM-actin 含量增加, 细胞恢复到正常分化状态。 $\alpha$ -SM-actin 是 VSMC 的一个主要分化标志。

#### 3.2 骨桥蛋白

骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 是 1983 年 Herring 等最早从骨基质中分离出的一种磷酸化糖蛋白, 分子量为 44 kDa, 约含 300 个氨基酸残基, 富含唾液酸, 其分子中有一个含 Arg-Gly-Asp-Ser 的结构域, 通过这一区域, OPN 可与组织中的钙离子、羟基磷灰石结合, 能调节羟基磷灰石晶体生长, 因此, OPN 被认为是成骨细胞成熟分化的标志。但在 VSMC, OPN 则显示为由收缩表型向合成表型转换的标志基因<sup>[28]</sup>, 它是血管细胞的主要粘附及趋化因子, 还与动脉粥样硬化斑块的钙化密切相关。白细胞介素 1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、PDGF、bFGF、EGF、TGF- $\beta$ 、TL21 和 Ang<sup>II</sup> 均能刺激血管内皮细胞和平滑肌细胞高表达 OPN<sup>[28]</sup>。

#### 3.3 Epiregulin

Epiregulin 是截止目前 EGF 家族中最后被发现的成员。是一个 46 肽, 能抑制某些肿瘤细胞的生长, 包括 HeLa 表皮癌细胞 A431 和肺癌细胞 A549。Takahashi 等<sup>[29]</sup> 证明 Epiregulin 从致 A5 危险因素刺激后的 VSMC 中释放, 是 VSMC 去分化的主要自分泌和旁分泌因子。

#### 3.4 调宁蛋白和肌动蛋白相关蛋白 SM 22 $\alpha$

调宁蛋白是平滑肌组织特有的分化蛋白, 它在平滑肌组织中含量与原肌球蛋白相似。在成人主动脉中膜内, 调宁蛋白的表达同  $\alpha$ -SM-actin, SM-MHC 和钙调蛋白结合蛋白一样, 受到发育性的调控。

SM 22 $\alpha$  是在早期胚胎发育过程中平滑肌、心脏和骨骼肌细胞表达的一平滑肌特异性蛋白, 推测是一种钙离子结合蛋白, 亦被认为主要在分化的 VSMC 中表达。

## 4 小结

血管平滑肌分化调节的机制相对复杂,环境因素和遗传程序相互作用,控制 VSMC 基因谱协调表达。骨髓源的循环祖细胞可能参与了内膜损伤的修复;而血管壁固有的已分化 SMC 表型短暂逆转在内膜损伤修复、As 发病中可能发挥更重要作用。SMC 表型转换是一连续过程,迄今尚未发现单个标志基因能完全确定 SMC 的表型状态。因此,综合应用几个关键的标志指标行表型鉴定可能会更客观。

## [参考文献]

- [1] Mak W, Majesky. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, **27** (6): 1248-258
- [2] Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G, Pepper MS. Plasminogen activator expression in rat arterial smooth muscle cells depends on their phenotype and is modulated by cytokines [J]. *Circ Res* 1998, **82** (10): 1086-093
- [3] Sata M, Saito A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Nat Med* 2002, **8** (4): 403-409
- [4] Sata M. Role of circulating vascular progenitors in angiogenesis, vascular healing and pulmonary hypertension: lessons from animal models [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, **26** (5): 1008-014
- [5] Caplice NM, Bunch TJ, Stalboeger PG, et al. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (8): 4754-759
- [6] Bentzon JF, Weile C, Sondergaard CS, et al. Smooth muscle cells in atherosclerosis originate from the local vessel wall and not circulating progenitor cells in ApoE knockout mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, **26** (12): 2696-702
- [7] Bentzon JF, Sondergaard CS, Kassem M, et al. Smooth muscle cells healing atherosclerotic plaque disruptions are of local, not blood, origin in apolipoprotein E knockout mice [J]. *Circulation*, 2007, **116** (18): 2053-061
- [8] Frid MG, Moiseeva EP, Sternark KR. Multiple phenotypically distinct smooth muscle cell populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media in vivo [J]. *Circ Res* 1994, **75** (4): 669-681
- [9] Hao H, Ropraz P, Verin V, et al. Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, **22** (7): 1093-099
- [10] Rauscher FM, Gokhschmidt C, Lemont PJ, Davis BH, et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2003, **108** (4): 457-463
- [11] 王生兰, 苏娟, 徐一洲, 等. 大鼠血管平滑肌细胞体外培养的表型转换及表型鉴定 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (4): 268-272
- [12] Ravi Karra, Sreekanth Venkumullapalli, Chunning Dong, et al. Molecular evidence for arterial repair in atherosclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (46): 16789-794
- [13] Wang D, Chang PS, Wang Z, et al. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor [J]. *Cell* 2001, **105** (7): 851 - 862
- [14] Owens GK. Molecular control of vascular smooth muscle cells differentiation and phenotypic plasticity [J]. *Novartis Found Symp*, 2007, **283**: 174-191
- [15] House SJ, Potier Marie, Bisailon Jonathan, et al. The non-excitable smooth muscle calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease [J]. *Pflugers Arch*, 2008, **456** (5): 769-785
- [16] 孙宁玲, 马旗, 李世军. 血管平滑肌细胞增殖中蛋白激酶 G 与钙调磷酸酶信号通路的交互调节 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (8): 645-648
- [17] Chang DF, Belaguli NS, Jiang Chang, et al. LM-only protein CRP2 switched on smooth muscle gene activity in adult cardiac myocytes [J]. *PNAS*, 2007, **104** (1): 157-162
- [18] McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death [J]. *Trends Biochem Sci* 2002, **27** (1): 40-47
- [19] Mano T, Luo Z, Malendowicz SL, et al. Reversal of GATA-6 down-regulation promotes smooth muscle differentiation and inhibits intimal hyperplasia in balloon-injured carotid artery [J]. *Circ Res* 1999, **84** (6): 647-654
- [20] Su B, Mitra S, Gregg H, et al. Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation [J]. *Circ Res* 2001, **89** (1): 39-46
- [21] Viedt C, Soldt J, Krieger-Brauer H J, et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, **20** (4): 940-948
- [22] Toek J, van Putten V, Sternark KR, et al. Induction of SM-alpha-actin expression by mechanical strain in adult vascular smooth muscle cells is mediated through activation of JNK and p38 MAP kinase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **301** (4): 1116-121
- [23] Yananaka Y, Hayashi K, Komurasaki T, et al. EGF family ligand dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells through EGF2 receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **281** (2): 373-377
- [24] Kavuma MM, Khachigian IM. ERK, JNK, and p38MAP kinases differentially regulate proliferation and migration of phenotypically distinct smooth muscle cell subtypes [J]. *J Cell Biochem*, 2003, **89** (2): 289-300
- [25] Wang CC, Curevich I, Drazin B. Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways [J]. *Diabetes* 2003, **52** (10): 2562-569
- [26] Ohkawa Y, Hayashi K, Sobue K. Calcineurin-mediated pathway involved in the differentiated phenotype of smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **301** (1): 78-83
- [27] Klamm DJ, Watson PA, Frid MG, et al. cAMP response element-binding protein content is an molecular determinant of smooth muscle cell proliferation and migration [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (49): 46132-141
- [28] Speer MY, McKee MD, Gukelberg RE, et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo [J]. *J Exp Med*, 2002, **196** (8): 1047-055
- [29] Takahashi M, Hayashi K, Yoshida K, et al. Epirgulin as a major autocrine/paracrine factor released from ERK and p38MAPK-activated vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 2003, **108** (20): 2524-529

(此文编辑 许雪梅)