

文章编号: 1001-098X(2001)01-0027-04

射线对血管平滑肌细胞抑制作用的机制

庄永志, 王俊杰

(北京大学第三医院肿瘤治疗中心, 北京 100083)

摘要: 血管腔内放疗预防经皮穿刺冠状动脉血管成形术(PTCA)后再狭窄的临床应用取得了令人瞩目的疗效。人们认为,射线预防PTCA后血管再狭窄主要是射线对血管平滑肌细胞产生的抑制作用,但是这种抑制作用的机制尚不清楚,目前认为最关键的因素是射线抑制了血管平滑肌细胞的迁移和增殖,凋亡在射线抑制再狭窄过程中所起的作用尚存在争议。在这个过程中,射线对巨噬细胞和多种细胞因子的抑制作用也逐步受到人们的重视。

关键词: 血管内照射; 再狭窄; 平滑肌细胞; 经皮穿刺冠状动脉成形术

中图分类号: Q274 文献标识码: A

血管腔内放疗预防经皮穿刺冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)后再狭窄的临床应用取得了良好的效果,但射线抑制PTCA术后血管再狭窄的机制尚未完全阐明。有研究证实,PTCA术后再狭窄过程涉及多种因素,其中最重要的原因是由于PTCA后血管中膜平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)迁移至内膜,增殖和分泌细胞外基质,导致管腔狭窄^[1]。

1 射线对血管平滑肌细胞迁移的抑制作用

VSMCs按其表型可分为收缩型和合成型,后者属于一种幼稚的平滑肌细胞,其增殖能力及生物学特性与体外培养条件下的平滑肌细胞相似。VSMCs的功能与其表型密切相关^[2],合成型细胞具有很强的迁移能力。VSMCs的应力纤维和微丝束中含有 α -actin,其重要功能之一是阻止细胞发生迁移^[3]。 α -actin表达水平的高低可代表VSMCs迁移能力的大小,增生活跃的VSMCs, α -actin表达水平很低,因此人们可通过检测 α -actin表达水平来判断VSMCs迁移能力。

PTCA后,收缩型平滑肌细胞演变为合成型平滑肌细胞,迁移能力增强,并逐渐由中膜迁移至内膜^[1]。Jeannette F等^[4]研究发现, β 射线照射后,VSMCs中 α -actin免疫组化染色增强,由此认为 β 射线可诱导合成型平滑肌细胞向收缩型平滑肌细胞转化,降低VSMCs迁移能力。他们发现1Gy β 射线照射即可显著抑制VSMCs迁移,表明 β 射线对VSMCs迁移的抑制作用较其对细胞增殖的抑制作用更为显著。

Kumar CC等在1995年发现,如果应用有丝分裂抑制剂抑制细胞增殖,VSMCs中 α -actin基因启动子活性就会增强,p53可诱导细胞周期发生阻滞,抑制细胞增殖,由此Comer KA等^[5]设想,p53是否也在 α -actin基因的转录调节中起到某些作用?他们经研究发现, α -actin基因中转录起始位点区域附近的碱基序列存在p53结合部位,如果p53发生活化, α -actin mRNA水平就会明显增高, α -actin的表达也会相应增强。根据上述结果,Comer KA等认定 α -actin基因是p53肿瘤抑制蛋白的转录靶基因。这个结论为我们从分子水平上解释射线抑制VSMCs迁移的机制提供了明确的思路:射线照射后,VSMCs DNA受到损伤,诱导p53表达增强,进而引起其转录靶基因 α -actin基因表达增强, α -actin表达增多后阻止细胞发生迁移,使VSMCs迁移能力明显降低。

2 射线对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用

PTCA可造成血管壁损伤,在术后最初48h内,血管壁中有一部分VSMCs很快进入细胞周期,这部分细胞是造成细胞增殖进而导致内膜增厚的根

收稿日期: 2000-12-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39900167)

作者简介: ①庄永志(1972-),男,黑龙江大庆人,大庆油田总医院主治医师,现为北京大学第三医院肿瘤治疗中心硕士研究生(委托培养),主要从事射线抑制再狭窄的细胞和分子生物学机制研究。

②王俊杰(1964-),男,内蒙古乌兰浩特人,北京大学第三医院肿瘤治疗中心副主任医师,硕士,主要从事射线抑制再狭窄的细胞和分子生物学机制,肿瘤粒子种植治疗的研究。

审校者: 北京大学第三医院肿瘤治疗中心 贾廷珍

源。这些有增殖能力的细胞易于受到射线的杀伤,丧失增殖能力^[6]。

Jeannette F等^[4]就 β 射线对VSMCs增殖和存活情况的影响进行了研究,结果表明: β 射线照射后VSMCs增殖能力明显降低,随着剂量增高,射线对增殖的抑制作用加大,但 β 射线照射对细胞存活情况却没有明显影响。未照射组细胞存活的百分率为 $96\% \pm 0.6\%$,照射剂量为1.3和10Gy时细胞存活的百分率均为 $95\% \pm 1\%$,两者之间无统计学意义上的差别,即使将剂量提高到20Gy和30Gy,也没有对细胞存活情况产生明显影响,细胞存活的百分率仍达 $94\% \pm 0.9\%$ 。由此Jeannette F等认为,射线抑制再狭窄的机制主要是抑制了VSMCs的有丝分裂。

Jeannette F等进一步研究了射线对VSMCs细胞周期的影响,结果发现 β 射线可诱导VSMCs产生G₁期阻滞。在 β 射线照射后第6、10、16、24、48、72、96和120h收集细胞,用流式细胞仪检测发现2、10和30Gy照射后都可引起VSMCs出现G₁期阻滞,导致S期细胞分数减少。24h后,部分细胞进入S期,G₁期阻滞程度开始减弱,但直至照射后第120h,仍存在一定程度的G₁期阻滞。

有研究表明,含有p21、p53、p34或视网膜母细胞瘤的重组腺病毒可使细胞周期发生阻滞,且在动物实验中可减少血管内膜的增生。由此,人们猜想p53可通过诱导p21抑制周期依赖性激酶,并使受照后的VSMCs发生G₁期阻滞。Gartel AL等^[7]在1996年提出了一个新的观点,认为射线不通过p53途径也可激活p21的转录,诱导细胞周期出现阻滞。Mayberg MR等^[8]的研究证实了这一观点。他们应用 γ 射线对体外培养的鼠平滑肌细胞进行照射,用Western杂交检测发现,在照射后4h野生型p53开始表达,其表达的峰值出现在照射后6h,p21在照射后1h即开始出现表达,其表达有两个峰值,分别出现在照射后3h和7h。由于p21先于p53表达,因此Mayberg MR等认为射线不通过p53途径也可激活p21的转录,但p21出现的第二个表达峰值仍有可能是受p53调控所致。

对敲除p21基因的小鼠进行研究发现,细胞G₁或阻滞明显减弱,但仍有G₁期阻滞的发生。这表明除了p21是p53参与细胞G₁期阻滞的下游分子外,还有其他分子参与G₁期阻滞,gadd45(growth arrest DNA damage gene)就是其中之一,其第三个密

码子含有一个p53结合元件,因此其表达可被p53所诱导。gadd45诱导细胞周期阻滞的机制是与PCNA结合,抑制DNA的合成。

当细胞受到电离辐射而导致DNA损伤后,p53和p21基因被激活,p53蛋白可进一步激活其下游效应基因p21及gadd45,使p21及gadd45 mRNA和蛋白水平显著升高。p21和gadd45单独或相互作用共同调控细胞周期,使细胞周期不能前进,阻滞于G₁期,增殖受抑。

3 射线对平滑肌细胞凋亡的影响

射线可诱导多种血液系统细胞和免疫相关细胞发生凋亡,但目前尚不清楚射线是否可诱导高分化的VSMCs发生凋亡,Jeannette F等^[4]应用1~30Gy低剂量率的 β 射线、高剂量率的 γ 射线和高剂量率的电子线分别对体外培养的人VSMCs进行照射,照射后24~72h收集细胞,采用电镜以及流式细胞仪来检测细胞是否发生凋亡。结果发现,这三种射线在上述条件下均未使VSMCs凋亡增加。同样,Corinne M等^[6]应用2.5、5和10Gy γ 射线对体外培养的大鼠VSMCs进行照射,照射后24、48、72和96h收集细胞作“DNA ladder”实验,结果没有出现DNA片段。Heckenkamp J等^[9]和Waksman R等^[10]的研究结果也表明VSMCs受到射线照射后并不产生凋亡。

诱导细胞发生凋亡存在不同的生化机制,但在细胞质却经历一个共同的调节步骤,含有半胱氨酸蛋白酶的caspases家族在这一共同步骤中起主要作用。研究证实,caspases-8的激活是 γ 射线诱导凋亡所必需的。Mayberg MR等^[8]就 γ 射线照射后鼠VSMCs中caspases活化情况进行了研究,他们应用25~10Gy γ 射线对体外培养的鼠VSMCs进行照射,之后在不同时间对caspases活化情况进行检测,结果表明,在所检测的所有时间点内(具体时间点文献没有描述),caspases都没有发生活化。综合Corinne M等^[6]和Waksman R等^[10]的研究结果,Maybere MR等认为凋亡在射线抑制VSMCs的过程中不起作用。

但是,Verin V等^[11]认为,射线可以诱导VSMCs发生凋亡。他们应用18Gy的 β 射线对PTCA后的兔血管模型进行血管内照射,采用DNA片段末端标记原位杂交方法,在照射后第8、第21天和第6周对VSMCs凋亡的情况进行检测,结果发现与对

照组相比,受照组动物 VSMCs 凋亡数量明显增多,对照组和受照组照后第 8 第 21天和第 6周发生凋亡的细胞百分率分别为: 0.014%和 0.23% ($P=NS$); 0.012%和 0.07% ($P=0.05$); 0%和 0.16% ($P=0.03$).

尽管发生凋亡细胞的比率很低,但 Verin V 等认为并不能因此而低估其作用,因为凋亡的发生不易捕捉到,一旦细胞出现染色体浓缩或出现其他与凋亡相关的典型的形态学特征,这些细胞会很快被邻近的巨噬细胞吞噬和降解,经过 0.5~2h 就无法识别出这些细胞^[12]。同时 Verin V 等认为,即使细胞凋亡数量的绝对数改变很少,也对组织细胞的构成产生重要影响。停留在 G₀期的细胞群中很少出现凋亡,而有丝分裂较活跃的细胞群却经常发生凋亡。由于 PTCA 后有相当一部分 VSMCs 进入了有丝分裂周期,因此 Verin V 等认为这是射线诱导 VSMCs 发生凋亡的原因,其他研究没有出现凋亡是由于观察凋亡这一指标时所采用的时间点不同所造成的。根据 Bochaton-Piallat M L 等^[13]的研究,动脉损伤后,凋亡最常出现在第 15天,第 21天达到最高峰。其它研究观察凋亡的时间均在 7d 之内,故而不易发现凋亡。Verin V 认为,射线诱导 VSMCs 发生凋亡也是射线抑制 VSMCs 的机制之一。

4 射线对巨噬细胞和多种细胞因子的抑制作用

血管再狭窄是局部血管损伤后的一种修复反应,在这个过程中有很多细胞因子和生长因子促进 VSMCs 增殖。在血管受到损伤后的炎症反应过程中,巨噬细胞和淋巴细胞迁移和聚集到炎症部位,这些被活化的巨噬细胞可释放具有诱导作用的细胞因子,刺激 VSMCs 的迁移和增殖^[14]。VSMCs 发生增殖后可分泌 M-CSF(巨噬细胞集落刺激因子)和 GM-CSF(粒-巨噬细胞集落刺激因子),吸引更多单核细胞来源的巨噬细胞发生增殖,由此可见巨噬细胞在 VSMCs 增殖过程中起到了介导和放大作用。在新生内膜的增生过程中,被活化的血小板也可释放多种细胞因子,其中血小板生长因子(PDGF)是一种强烈的化学趋化因子,它可使更多的单核细胞/巨噬细胞被吸引过来,因此人们认为血小板在 VSMCs 的增殖和迁移过程中也起到了一定的促进作用。

由于血小板对射线具有高度的抗性,内皮细胞的放射敏感性处于中等水平且不能产生 PDGF,而

炎性细胞中的巨噬细胞/单核细胞/T细胞家族可产生 PDGF且对辐射非常敏感,由此 Rubin P 等^[15]设想射线对这些细胞的抑制作用可能在射线抑制再狭窄的过程中起到重要作用。随后进行的实验证明,这种设想是正确的:他们应用球囊导管建立了大鼠颈动脉内膜损伤模型,损伤后立即放置¹⁹²I源进行血管内照射,剂量为 5 10和 15Gy,照射后 24h~6个月内不同时间处死动物,用抗 CD11b、mac-1 抗-PDGF和 α -actin 进行免疫组化染色,观察血管壁组织切片中巨噬细胞、PDGF 的分布和 VSMCs 增殖情况,结果发现血管内照射后,巨噬细胞数量明显减少,PDGF 表达减少,VSMCs 增殖受抑。因此,Rubin P 等认为射线抑制再狭窄的机制是:射线使血管损伤后巨噬细胞聚集的数量明显减少,抑制了巨噬细胞在 VSMCs 增殖过程中所起到的介导和放大作用,使 PDGF 的作用不能得到发挥,从而不能使更多的 T细胞和巨噬细胞聚集到炎症部位,最终使巨噬细胞和 PDGF 对 VSMCs 迁移和增殖的刺激作用受到抑制,进而有效地避免了再狭窄的发生。

5 问题与展望

虽然人们对射线抑制 VSMCs 的机制有了一些了解,但仍有许多问题尚未得到阐明:(1)谁是射线作用的靶细胞?以往人们把研究重点放在 VSMCs,但 Rubin P 等^[15]认为单核细胞/巨噬细胞在再狭窄的发生中起重要作用,对辐射敏感,是射线主要作用的靶细胞,射线对巨噬细胞的抑制作用是射线抑制 VSMCs 的主要机制;(2)凋亡在射线抑制 VSMCs 过程中所起的作用:有关资料结论相反,观察的时间点也不一致,因此这个问题仍有待进一步研究;(3)有些研究发现,射线照射后非但没有抑制 VSMCs 增殖,反而起到了促进作用^[16],这些研究至少说明在某些条件下射线照射可促进 VSMCs 增殖,其作用机制需要进一步深入研究。随着研究的深入,人们对射线抑制 VSMCs 机制的认识会逐步加深,进而更好地指导临床治疗。

参考文献:

- [1] Vein V, Urban P, Poppowski Y, et al. Feasibility of reduce restenosis after balloon angioplasty [J]. Circulation, 1996, 93: 529-536.
- [2] Katoh Y, Periasam M. Growth and differentiation of smooth muscle cells during vascular development [J]. Trends Cardiovasc Med, 1996, 6: 100-106.

- [3] Ronnov-Jessen L, Peterson OW. A function for filamentous alpha-smooth muscle actin retardation of motility in fibroblasts [J]. *J Cell Biol*, 1996, 134: 67-80.
- [4] Jeannette F, Remi M, Pouneh K, et al. Cellular effects of β -particulate delivery on vascular smooth muscle cells and endothelial cells [J]. *Circulation*, 1999, 99: 1477-1484.
- [5] Comer KA, Dennis PA, Armstrong L, et al. Human smooth muscle alpha-actin gene is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein [J]. *Oncogene*, 1998, 16: 1299-1308.
- [6] Corinne M, Gajdusek, Hua Tian BS, et al. Gamma radiation effect on vascular smooth muscle cells in culture [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1996, 36(4): 821-828.
- [7] Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21-negative regulator of the cell cycle [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1996, 213: 138-149.
- [8] Mayberg MR, London S, Rasey J. Inhibition of rat smooth muscle proliferation by radiation after arterial injury [J]. *Radiat Res*, 2000, 153: 153-163.
- [9] Heckenkamp J, Leszczynski D, Schiereck J. Different effects of photodynamic therapy and gamma-irradiation on vascular smooth muscle cells and matrix [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19: 2154-2161.
- [10] Waksman R, Rodriguez JC, Robinson KA, et al. Effect of intravascular irradiation on cell proliferation, apoptosis and vascular remodeling after balloon overstretch [J]. *Circulation*, 1997, 96: 1944-1952.
- [11] Verin V, Popowski Y, Bochaton-Piallat ML. Intra-arterial beta irradiation induces smooth muscle cell apoptosis and reduces medial cellularity in a hypercholesterolemic rabbit restenosis model [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000, 46: 661-670.
- [12] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation [J]. *J Cell Biol*, 1992, 119: 493-501.
- [13] Bochaton-Piallat ML, Gabbiani F, Redard M, et al. Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening [J]. *Am J Pathol*, 1995, 146: 1059-1064.
- [14] Libby P, Schwartz D, Brogi E, et al. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression [J]. *Circulation*, 1992, 86 (Suppl III): III 47-III 52.
- [15] Rubin P, Williams JP, Riggs PN. Cellular and molecular mechanisms of radiation inhibition of restenosis [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998, 40: 929-941.
- [16] Carter AJ, Scott D, Bailey L, et al. Dose-response effects of ^{32}P radioactive stents in an atherosclerotic porcine coronary model [J]. *Circulation*, 1999, 100: 1548-1554.

Mechanisms of radiation for the inhibition of vascular smooth muscle cells

ZHU ANG Yong-zhi, WANG Jun-jie

(Department of Oncology, the Third Hospital of Beijing University, Beijing 100083, China)

Abstract Endovascular radiation is a promising technique to substantially reduce the restenosis post-PTCA. Inhibition of VSMCs by radiation is thought as the main cause, but the mechanism of this is not clear. Inhibition of VSMCs proliferation and migration by radiation is regarded as the most important factor. The role of apoptosis in this cause is not determined. However, inhibition of macrophage and cytokines by radiation is emphasized recently.

Key words endovascular radiotherapy; restenosis; vascular smooth muscle cells; percutaneous transluminal coronary angioplasty