

restenosis in swine[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1996, 36: 767-775.

[9] Carter AJ, Scott D, Bailey LR, et al. High activity ^{32}P stents promote development of atherosclerosis at six months in a porcine model[J]. *Circulation*, 1997, 96(suppl 1): I-607.

[10] Laird JR, Carter AJ, Kufs WM, et al. Inhibition of neointimal proliferation with low-dose irradiation from a β -particle-emitting stent[J]. *Circulation*, 1996, 93: 529-536.

[11] Janicki C, Duggan DM, Coffey CW, et al. Radiation dose from a phosphorous- 32 impregnated wire mesh

vascular stent[J]. *Med Phys*, 1997, 24: 437-445.

[12] Dussailant GR, Mintz GS, Pichard AD, et al. Small stent size and intimal hyperplasia contribute to restenosis: a volumetric intravascular ultrasound analysis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1995, 26: 720-724.

[13] Ikari Y, Hara K, Tamura T, et al. Luminal loss and site of restenosis after Palmaz-Schatz coronary stent implantation[J]. *Am J Cardiol*, 1995, 76: 117-120.

[14] Serruys PW, Patrick KI. I like the candy, I hate the wrapper: The ^{32}P radioactive stent[J]. *Circulation*, 2000, 101: 3-7.

The problem of the "candy wrapper" for β -particle emitting stent implantation

REN Xiao-qing

(Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200001, China)

Abstract There is an "edge effect" or "candy wrapper" problem at the stent edges for β -particle emitting stent implantation. The mechanism for "candy wrapper" may conclude low activity level of radiation, aggressive injury to vessel at the margins of the stent and neointimal proliferation due to low-dose radiation stimulation. The methods to solve the "candy wrapper" could be proposed (1) the square-shouldered balloon, (2) the cold-end stent, (3) the hot-end stent, (4) a self-expanding radioactive stent, (5) the γ -stent and so on.

Key words restenosis; stent; radiation

文章编号: 1001-098X(2001)01-0033-05

电离辐射对血管内皮细胞影响的研究

陈建伟

(上海第二医科大学附属仁济医院核医学科, 上海 200001)

摘要: 利用放射性核素血管内照射治疗血管再狭窄逐渐受重视,但其作用机制未完全清楚。血管再狭窄是动脉损伤后的愈合反应,内皮细胞参与愈合过程。血管内皮损伤作为血管再狭窄的始动因素,内皮细胞的增殖与凋亡影响和干预再狭窄的过程。电离辐射影响血管内皮细胞的存活、凋亡、增殖、表型、功能等。通过电离辐射对血管内皮细胞影响的研究将有助于再狭窄的防治。

关键词: 电离辐射; 内皮细胞; 再狭窄

中图分类号: Q274 文献标识码: A

PTCA(经皮冠状动脉腔内成形术)在治疗阻塞性冠状动脉疾病方面得到了广泛应用,但是成功的PTCA后再狭窄发生率大约为30%~50%^[1-4]。

为了阻止或明显降低再狭窄的发生率,已经采取多种药物治疗方法,但疗效均不显著^[5]。血管内放射性治疗作为一种极有希望的方法正在被越来越多的人所接受。在一些动物实验和初步临床试验中,放射性内照射治疗抑制了血管平滑肌细胞的增殖和新生内膜的增生,取得了可喜的成果。但是,降低的再狭窄的发生率仍不令人满意,有作者^[6,7]推测血管内皮损伤、内皮化延迟是其中重要原因之一。内皮损伤作为

收稿日期: 2000-11-06

作者简介: 陈建伟(1970-),男,江苏武进人,上海第二医科大学附属仁济医院核医学科医师,硕士研究生,主要从事放射性核素抑制血管再狭窄的研究。

审校者: 上海第二医科大学附属仁济医院核医学科 黄钢

再狭窄的始动因素,内皮细胞的增殖与凋亡影响和干预再狭窄的过程。大量研究认为,再狭窄是动脉损伤后的愈合反应,内皮细胞起着举足轻重的作用,而电离辐射有可能影响血管内皮细胞的存活、凋亡、增殖、表型、功能等,内皮细胞的辐射耐受性和再生速度以及功能状况与血管愈合反应直接相关。因此,辐射对血管内皮细胞的影响的研究将成为进一步降低再狭窄发生率的突破口。

1 电离辐射的类型

目前,在再狭窄治疗中主要应用 γ 射线、 β 粒子(或 β 射线)。虽然采用了后装技术来改善 γ 射线治疗,但 γ 射线治疗仍存在三个明显的不足之处^[8]。

(1)过量的动脉周围组织的辐射剂量不能忽视;(2)在通常的导管实验室,合适的放射防护成为使用该技术的重要障碍,后装技术的使用在某种程度上减轻了防护问题,却延长了血管内的受照时间(20Gy需花费60min);(3) γ 源难以定位在管腔中心,难以保证管壁的均匀照射,导致管壁相对过低剂量和过高剂量。相比而言, β 源照射有三个优点:(1)在组织中剂量衰减更快,因此动脉周围组织受不必要照射更低;(2)在水或其它介质半价层厚度更低,很大程度上解决了防护难的问题,使它能在通常的导管室应用;(3)在短时间内使局部传输高剂量成为可能。

2 血管内治疗的照射方式

血管内放射性治疗分二种:(1)血管内高剂量率放射源,短时间照射;(2)低剂量率放射性支架持续照射。以前,关于血管再狭窄机制的研究主要集中在:血管的弹性回缩,平滑肌细胞的增殖、迁移,基质的沉积,血管重构等。近来,血管内皮细胞功能的保护和恢复愈来愈受重视。目前,关于二种血管内放射性治疗方法的疗效比较尚无肯定答案,但是放射性支架的应用的上升趋势似乎更大。在放射性支架中,³²P放射性支架的应用最广泛,由此产生的一些副作用逐渐得到认识,照射剂量和照射方式的选择还需探讨,其中尤为重要是³²P对内皮细胞的影响急需进一步深入认识。

3 电离辐射对内皮细胞存活的影响

辐射敏感性由诸多因素决定,辐射后细胞改变依赖于剂量水平高低和辐射后时间长短。通常,对辐射最敏感的细胞是那些低分化、分裂快、细胞周期复

制相百分比高的细胞。在不同的细胞周期时相,细胞表现出不同的辐射敏感性,但在非常高的剂量,不论处于细胞周期的何时相,辐射可直接致细胞死亡。辐射后细胞的组化改变包括细胞核和细胞质的肿胀、染色质浓缩、细胞器扭曲和变性。Rose RW等^[9]观察内皮细胞经¹³⁷Cs照射后的影响:无 laminin-1(层粘连蛋白)时,4Gy照射后 HUVEC(人脐静脉内皮细胞)显示细胞核的大小增加约40%,核染明显,出现多核,细胞同型性丧失;在8Gy照射后,13%的HUVEC显示多核和核多型性;随着剂量的增加,细胞质开始呈现纺锤型改变;在16Gy照射后,大约90% HUVEC细胞核进一步增大,或者多核,并且伴有细胞质纺锤型改变;20Gy照射后,20%的HMEC(人微血管内皮细胞)显示核碎裂,5%的HCAEC(人冠状动脉内皮细胞)显示核碎裂,但HUVEC几乎没有见到核碎裂,说明不同类型的内皮细胞对辐射的敏感性不同。当8Gy照射后6h和24h用凝胶电泳分析HUVEC的DNA变化:HUVEC的DNA在两时间均有低分子量“laddering”,在有 laminin-1时,细胞“laddering”显示核碎裂轻度降低,提示基底膜糖蛋白 laminin-1在辐射过程中保护内皮细胞不受辐射损伤,即血管内皮细胞在接近生理环境下,其辐射耐受性更大。在动物实验和临床试验中常用的辐射剂量 < 25Gy^[2,8,10],不至于引起血管内皮细胞的大片急性死亡。

4 电离辐射对内皮细胞凋亡的影响

多项研究揭示,电离辐射可致血管内皮细胞凋亡。在辐射反应中,研究较多的基因有 p53、bcl-2、bax 和 gadd45。辐射诱导 p53蛋白的表达可能与转录激活有关,也可能与翻译激活有关,但在内皮细胞很可能与翻译激活有关^[11]。p53基因是一种抑癌基因,其状况决定辐射敏感性。bcl家族调节凋亡有正向(如 bax)或负向(如 bcl-2)作用,作为膜相关蛋白质,两者在脑内线粒体膜、内质网、核膜均已被发现。bax 在脂质膜形成通道,其促凋亡效应通过小孔形成而激活,导致细胞色素 C 从线粒体膜内流到胞质。细胞色素 C 通过激活特殊的 caspase 启动凋亡程序。相比而言,bcl-2的过度表达阻止细胞色素 C 的释放。这样,bax 和 bcl-2的比例控制凋亡的开始。gadd基因家族的表达在多数情况下诱导 DNA 损伤或生长阻滞(growth arrest),但在人类细胞 gadd45 是辐射诱导的惟一成员。gadd45的 mRNA 和蛋白

质表达依赖于野生型 p53表型和 p53依赖的细胞周期阻滞,提示 gadd 45作为 p53的下游作用因素。

微血管内皮细胞受照射后 6~10h开始凋亡,而主动脉内皮细胞受照射后 12~16h发生凋亡,均与辐射后内皮细胞的早期形态异常一致^[11]。此外,血清生长因子可以减少内皮细胞的凋亡^[12]。

但是 Faleh J等^[13]在研究中发现,β辐射 3~30Gy剂量后,内皮细胞凋亡的发生与对照组相比无明显增加。

5 电离辐射对内皮细胞增殖的影响

Fareh J等^[13]报道,β辐射抑制血管平滑肌细胞增殖,且呈剂量依赖方式(0.4~10Gy),猪和人的 ED₅₀(半数有效剂量)分别为 1.10±0.07Gy和 1.08±0.12Gy,无显著差异;血管内皮细胞的 ED₅₀为 2.15±0.10Gy。血管平滑肌细胞与内皮细胞的 ED₅₀比较显示,除最高剂量(10Gy)外,β辐射抑制血管平滑肌细胞增殖的能力明显高于内皮细胞($P < 0.01$),即在一定辐射剂量条件下,辐射对血管平滑肌细胞的增殖抑制更大,对血管内皮细胞的抑制较小。Rose RW等^[9]发现,HUVEC HCAEC HMEC在受照射后细胞增殖均受抑制,在有 laminin-1时,HUVEC HCAEC的这种辐射效应减弱。HUVEC HCAEC的这种剂量依赖式抑制效应在 8Gy后达到平台。HMEC剂量依赖式抑制效应最大,在 8Gy以上未显示平台效应,呈继续抑制。

有作者发现,放射性支架治疗在一些实验动物或病例引起“边缘效应”^[14]。最近有报道^[7],¹⁹⁸Au放射性支架治疗产生血管内膜增生。这些均与内皮细胞损伤、内皮化延迟有关。

另有报道^[11],血管内皮细胞受照射后显示明显的修复能力和恢复潜力,受照射后内皮细胞丢失,保留存活的内皮细胞异常增殖,并可能导致管腔阻塞和毛细血管床减少。通常认为,毛细血管内皮细胞的辐射敏感性最强,而大血管内皮细胞的辐射抵抗性最强。辐射致动脉内皮细胞损伤,可导致染色体损伤和 DNA单链、双链的断裂,随之,辐射后内皮细胞 DNA的修复机制启动,大多数辐射诱导的 DNA链断裂在暴露治疗剂量后数分钟内修复;20Gy或更高的辐射剂量时,残留损伤可持续存在。照射后培养的血管内皮细胞的分裂活性增强,而血管平滑肌细胞的分裂活性没有增强^[11]。

Plasswilm L等^[15]在研究γ射线对内皮细胞增

殖影响时发现,蛋黄囊膜内皮细胞在 10Gy照射后与 0.2、4、8Gy相比血管密度明显增加($P < 0.05$);10Gy后 24h,平均 44.8%的内皮细胞 PCNA(增殖细胞核抗原)阳性,明显高于 24h后 4Gy的阳性率(22.7%)和对照组阳性率(19.4%);10Gy后 48h,平均 34.1%的内皮细胞 PCNA阳性,明显高于非照射组(18.1%)和 4Gy照射组(12%)。

照射后内皮细胞的附着、分化功能均呈剂量依赖性抑制,照射后内皮细胞的迁移没有受损害,足以修复内皮细胞的丢失^[11]。但是,另有作者发现,β辐射可抑制内皮细胞的迁移^[13]。

6 电离辐射对内皮细胞表型、功能的影响

主动脉内皮细胞在照射后数小时,内皮细胞 F-actin分布改变,细胞收缩,小分子量溶质和白蛋白穿透内皮细胞的流动呈剂量依赖性增加。照射后的内皮细胞合成、分泌的多种生物分子和蛋白质发生改变,包括生长因子和化学趋化物分泌增加, eicosanoid合成改变。辐射后内皮细胞分泌损伤标志物,如血栓素 vWf(von Willebrand因子)、肝素酶等。HUVEC照射前 P选择素位于胞质储存库,照射后(最低剂量为 2Gy)转移到细胞膜,并且粘附牢固^[16]。同样, HUVEC辐射后 ICAM-1(细胞间粘附分子)呈时间依赖(2~10d)和剂量依赖(2~10Gy)性上调,而 VCAM-1(血管细胞粘附分子)、E选择素无改变^[17]。Jahroudi N等^[18]发现,20Gy照射后人或牛的内皮细胞 vWf mRNA升高,细胞核 run-on试验显示 vWf转录活性升高,导致高水平的 mRNA聚集。辐射存活的内皮细胞表现出细胞质代偿性肥大和巨细胞形成,仍维持单层。照射培养的大血管内皮细胞对中性粒细胞粘附增加,促进细胞间血小板沉积。

细胞膜受体照射后也有变化,在 laminin-1包被的组织培养塑料上, HUVEC显示 KDR[内皮细胞 VEGF(血管内皮生长因子)受体的一种]的表达呈剂量依赖性增加,在 8Gy时表达最高。Kato H等^[19]发现,与内皮细胞有同源性的造血干细胞照射后 KDR表达,VEGF作用于其受体,抑制电离辐射诱导的细胞凋亡效应。在一定辐射剂量,细胞 KDR的上调为丝裂原提供更多的受体结合位点,可能保护内皮细胞不受辐射诱导的凋亡。

体外研究发现^[20],VEGF降低电离辐射对 HUVEC的杀伤。由于内皮细胞分泌几种抗增殖血

管扩张因子,促进内皮细胞的种植和再生,抑制VSMC的增殖^[21]。bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)作为一种强有力的内皮细胞丝裂原,保护大血管内皮细胞不受辐射诱导的凋亡^[22],但同时bFGF对其他细胞也是强有力的生长因子,如平滑肌细胞。VEGF通过内皮细胞膜上特异性VEGF受体发挥作用,VEGF能高效、特异地促进内皮细胞分裂和增殖,使血管内皮细胞迅速修复并发挥其功能。

VEGF及其家族的其他成员通过其特异性受体发挥作用。VEGF受体属于酪氨酸受体家族,有三种:VEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(KDR)、VEGFR-3(Flt-4),均几乎仅在内皮细胞表达^[23]。VEGFR-3在所有胚胎内皮细胞均表达,但随着生长发育,在大血管的表达减少,在成人组织基本上被限制在淋巴内皮细胞,在VEGFR-3 knockout的胚胎,内皮细胞的分化、原始血管网的形成和新生血管的形成不受干扰;在VEGFR-1过度表达的内皮细胞,VEGF作用后没有诱导丝裂活性;而靶向VEGFR-2失活,阻断内皮细胞和原始造血细胞的早期分化阻止血管形成。多项研究显示,仅VEGFR-2传递丝裂信号,VEGFR-2在VEGF诱导的内皮细胞信号传递中似乎是主要受体。VEGF刺激导致VEGFR-2强烈自身磷酸化,MAPK(mitogen-activated protein kinase)通路激活,细胞增殖、趋化和不同蛋白质生物合成的改变。VEGFR-2的激活,保护内皮细胞不受饥饿和TNF α 诱导的凋亡。

Sabate M等^[24]研究发现,冠状动脉经 β 射线内照射后6个月,17个受照射节段(89.5%)显示内皮功能正常,10个远端非受照射节段(53%)和5个对照节段(45%)呈内皮功能障碍。使用乙酰胆碱后受照射节段的管腔直径明显增大($P=0.01$)。提示球囊扩张术后 β 射线内照射的冠状动脉节段对乙酰胆碱的功能反应比非受照射节段似乎更好。

7 降低电离辐射对内皮细胞的损害

目前,已有几种方法可保护内皮细胞减少辐射损伤。(1)低氧环境 低氧条件下,可能由于自由基的生成减少,内皮细胞的辐射耐受性增加,同时低氧可促进内源性VEGF的合成和分泌;(2)细胞周期时相 利用细胞周期各时相的辐射敏感性不同,如牛内皮细胞G₁期比S期对辐射更敏感;(3)内皮细胞生长因子。在体外,bFGF保护大血管内皮细胞,抑制辐射诱导的凋亡。VEGF降低辐射诱导HUV EC的死

亡,并通过抗VEGF的治疗加强辐射诱导HUV EC的死亡^[25]。肝细胞生长因子是内皮特异性生长因子,对内皮细胞有很强的丝裂作用,也有可能保护或修复血管内皮细胞。内皮细胞生长因子明显改善内皮反应,有可能改善内皮细胞的功能^[26]。

8 小结

综上所述,增加血管内皮细胞的辐射耐受性,抑制内皮细胞的凋亡,促进血管内皮细胞的再生,保护血管内皮细胞的功能,将有助于再狭窄的治疗。尽管电离辐射对血管内皮细胞的作用机制尚未完全清楚,但电离辐射对内皮细胞的一些不利影响,将有可能通过与其他辅助方法(如VEGF)联合应用得到改善,同时电离辐射对内皮细胞的有利因素,将有可能通过协同作用得到进一步加强,最终把再狭窄的发生率控制到最低可接受的程度。

参考文献:

- [1] Fischell TA, Khanna BK, Fischell DR, et al. Low-dose, β -particle emission from 'stent' wire results in complete localized inhibition of smooth muscle cell proliferation [J]. *Circulation*, 1994, 90: 2956-2963.
- [2] Vodovotz Y, Wakesman R, Kim WH, et al. Effects of intracoronary radiation on thrombosis after balloon overstretch injury in the porcine model [J]. *Circulation*, 1999, 100: 2527-2533.
- [3] Warden AJ, Mbchb IP, Sabate M, et al. β -particle emission radioactive stent implantation [J]. *Circulation*, 1999, 100: 1684-1689.
- [4] King SB, Williams DO, Chougule P, et al. Endovascular β -radiation to reduce restenosis after coronary balloon angioplasty [J]. *Circulation*, 1998, 97: 2025-2030.
- [5] Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, et al. Endovascular low-dose irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in swine [J]. *Circulation*, 1995, 91: 1533-1539.
- [6] Costa M, Sabate M, van Der-Giessen W J, et al. Late coronary occlusion after intracoronary brachytherapy [J]. *Circulation*, 1999, 100: 789-792.
- [7] Schulz C, Niederer C, Andres C, et al. Endovascular irradiation from beta-particle-emitting gold stents results in increased neointima formation in a porcine restenosis model [J]. *Circulation*, 2000, 101(16): 1970-1975.
- [8] Verin, Poppwski Y, Urban P, et al. Intra-arterial beta irradiation prevents neointimal hyperplasia in a hypercholesterolemic rabbit restenosis model [J]. *Circulation*,

- 1995, 92 2284-2290.
- [9] Rose RW, O' Hara M, Williamson SK, et al. The role of laminin-1 in the modulation of radiation damage in endothelial cells and differentiation [J]. *Radiat Res*, 1999, 152 14-28.
- [10] Meerlin D, Tardif JC, Crocker IR, et al. Effects of intracoronary β -radiation therapy after coronary angioplasty [J]. *Circulation*, 1999, 99 1660-1665.
- [11] O' Connor MM, Mayberg MR. Effects of radiation on cerebral vasculature a review [J]. *Neurosurgery*, 2000, 46 138-151.
- [12] Grafe M, Steinhilber G, Desaga U, et al. Characterization of two distinct mechanisms for induction of apoptosis in human vascular endothelial cells [J]. *Clin Chem Lab Med*, 1999, 37(5): 505-510.
- [13] Fareh J, Martel R, Kermani P, et al. Cellular effects of β -particle delivery on vascular smooth muscle cells and endothelial cells [J]. *Circulation*, 1999, 99 1477-1484.
- [14] Albiero R, Adamian M, Kobayashi N, et al. Short- and intermediate-term result of (32) P radioactive beta-emitting stent implantation in patients with coronary artery disease The Milan dose-response study [J]. *Circulation*, 2000, 101(1): 18-26.
- [15] Plasswilm L, Hoper J, Cordes N, et al. Investigation of microvessel density after irradiation [J]. *Radiat Res*, 1999, 151(4): 454-460.
- [16] Hallahan DE, Virudachalam S. Accumulation of P-selectin in the lumen of irradiated blood vessels [J]. *Radiat Res*, 1999, 152(1): 6-13.
- [17] Gaugler MH, Squiban C, Van A, et al. Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells *in vitro* [J]. *Int J Radiat Biol*, 1997, 72 (2): 201-209.
- [18] Jahroudi N, Ardekani AM, Greenberger JS. Ionizing irradiation increases transcription of the von Willebrand factor gene in endothelial cells [J]. *Blood*, 1996, 88(10): 3801-3814.
- [19] Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation [J]. *Cancer Res*, 1995, 55 5687-5692.
- [20] Gorski DH, Beckett MA, Jaskowski NT, et al. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(14): 3374.
- [21] Morishita R, Aoki M, Nakamura S, et al. Potential role of a novel vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), in cardiovascular disease characterization and regulation of local HGF system [J]. *J Ather Thrombo*, 1997, 4(1): 12-19.
- [22] Langey RE, Bump EA, Quartuccio SG, et al. Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial [J]. *Br J Cancer*, 1997, 75(5): 666-672.
- [23] Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 253: 117-130.
- [24] Sabate M, Kay IP, van-Der-Giessen WJ, et al. Preserved endothelium-dependent vasodilation in coronary segments previously treated with balloon angioplasty and intracoronary irradiation [J]. *Circulation*, 1999, 100(15): 1623-1629.
- [25] Gorski DH, Beckett MA, Jaskowski NT. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(14): 3374-3378.
- [26] Bauters C, Six I, Meurice T, et al. Growth factors and endothelial dysfunction [J]. *Drugs*, 1999, 59 11-15.

The study of the effect of ionizing radiation on vascular endothelial cells

CHEN Jian-wei

(Renji hospital, Shanghai second medical university, Shanghai 200001, China)

Abstract The treatment of vessel restenosis by endovascular radiation is being taken into account. However, the mechanism for prevention of restenosis is not clear. Restenosis is a complex process that comprises endothelial cells and others. It appears, fundamentally, to be a wound-healing process. The injury of vascular endothelium is initial influence on the development of restenosis. The proliferation and apoptosis of endothelial cells will effect and intervene in the course of restenosis. Ionizing radiation will influence survival, apoptosis, proliferation, phenotype and function for endothelial cells. It will contribute the prevention of restenosis by means of the study of the effect of ionizing radiation on vascular endothelial cells.

Key words ionizing radiation; endothelial cells; restenosis