

· 综 述 ·

转移生长因子和动脉粥样硬化

颜光涛

人和动物实验的很多证据发现动脉粥样硬化的发生和各种损伤诱导的血管内皮增生,均起因于内源性抑制系统的功能丧失,从而限制了损伤的正常修复。其中最为关键的是转移生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 的作用。正常人的平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)表达 I、II、III 型 TGF- β 受体,而损伤斑块中的血管内皮细胞 II 型受体表达显著降低,而 I 和 III 型基本不变。同时 II 型 TGF- β 受体 mRNA 在损伤的血管内皮细胞表达也显著下降。如果导入 II 型 TGF- β 受体则可以明显恢复 TGF- β 的生长抑制作用。由于在损伤血管局部 TGF- β 是过度表达的,因此受体选择性介导的细胞生长抑制,可以限制局部血管内皮的过度增殖,反之,则可出现失控的增生和过度表达的细胞间质成分,造成动脉粥样硬化。

1 TGF- β 及其受体介导的作用

TGF- β 是一种来源很广泛的细胞因子。正常分泌的 TGF- β 是一种不能结合受体的,无活性的“潜在的 TGF- β ”。由成熟的 TGF- β 二聚体,两个潜在相关多肽和 TGF- β 结合蛋白组成非共价结合物。结合物的作用有 3 种:①介导 TGF- β 的分泌;②使其处于失活状态;③在特定部位释放 TGF- β 而表现活性。正常情况下,可能是通过结合肽和结合蛋白携带 TGF- β 至细胞表面或细胞外基质等作用部位,通过前述酶类水解而释放激活。 α_2 巨球蛋白对于 TGF- β 的清除,发挥重要作用,它结合 TGF- β 后,后者便不能同其受体结合,而被携带于肝脏数分钟内灭活。因此, α_2 巨球蛋白是 TGF- β 血清的主要抑制物质,其他的灭活机制还有纤粘素、 β -聚糖和胶原 IV 等,它们将 TGF- β 保留于胞外基质中或灭活 TGF- β ,使其在局部仅能发挥短暂的局部功能。TGF- β 的受体表达于几乎所有的细胞,能介导功能的大约有 3 种(I、II 和 III 型),大多数细胞表达 2 种以上受

体,而上皮细胞、内皮细胞和淋巴样细胞仅表达 I 和 II 型受体,其中 TGF- β_1 与 I 和 II 型受体结合力高($K_d = 5 \sim 50$ pmol/L),与 III 型受体的结合力较高($K_d = 30 \sim 300$ pmol/L)。II 型 TGF- β 受体直接结合配体,而 I 型 TGF- β 受体不结合游离的 TGF- β_1 ,可与结合在 II 型 TGF- β 受体上的配体相互作用,形成多聚复合物进而传递信号。I 和 II 型 TGF- β 受体共同组成有活性的 TGF- β 受体,但两者却传递不同的信号,且与不同的功能相关:① TGF- β 抑制细胞的增殖的作用,必须有 II 型受体存在;② I 型 TGF- β 受体则介导对细胞外基质合成的作用。

TGF- β 在体内的作用主要是促进细胞外基质再生、调节炎症反应、抑制免疫功能和调节肿瘤生长。这种作用在损伤后的血管内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞过度增生、迁移形成粥样硬化斑块中都发挥重要作用^[1,2]。

2 动脉粥样硬化的病理特点和发病因素

动脉粥样硬化是一组称为动脉硬化的血管病变中常见和重要的一种。其特点是动脉发生了非炎症性、退行性和增生性病变,导致管壁增厚变硬、失去弹性和管腔缩小。多种机制参与该病的发病过程,近年多数学者认为损伤反应学说是最具说服力的机制。即粥样斑块形成是血管内膜对前述损伤作出反应的结果,而 TGF- β 参与了血管内膜的修复过程,针对不同的细胞和不同的年龄等因素,TGF- β 的作用有不同效果,可能在斑块形成和退化萎缩中发挥重要作用。

3 动脉粥样硬化的临床治疗和 TGF- β

心血管疾病是人类最大的死亡原因。动脉粥样硬化又是导致心血管疾病的首要危险因素。通常出现临床和心电图明显指征的病人接受冠状动脉搭桥或血管成形手术治疗。在西方每年大约有 30 万人接受此类治疗,而约有 95% 的人基本达到最初的血流供应,大大缓解心脏缺血状态。但是此类血管成形术受到两类严重临床并发症的挑战。大约 6.8 %

作者单位:100853 北京,解放军总医院基础所生化研究室

作者简介:颜光涛,男,医学硕士,研究员,研究室主任

的病人在临床和心电图上均表现出再闭塞,起因于血栓形成,血管弹性减弱或血管痉挛。大约 40 % 的病人出现临床和心电异常,表明在气囊血管成形术部位出现再狭窄。而且并非仅出现于冠状动脉成形术和硬化块切除术后。由于第二次血管损伤是纤维增生形成的,不能通过溶栓消除,且损伤程度又高于第一次,因此,仅能通过再一次切除斑块,或搭桥和血管成形术才能再通。气囊成形术可导致损伤部位最初的部分分离的肿胀块和裂缝,伴随着管壁上的血栓形成。组织学上看,这些肿胀部分和裂缝是在 3 个月内与纤维增生性损伤斑块同时发生的。

除人外,大鼠和兔在接受气囊血管成形术后同样在局部发生血管斑块,只不过在术后数周内可以自发性退缩而减弱甚至消失。但是,老年大鼠情况有所不同,可出现更具侵袭性的增生,不易通过内皮修复而痊愈。这种过度的反应是因为老年血管壁的内在变化决定的^[3]。研究证明,动脉粥样硬化在青年人很容易发生逆转而恢复,而在老年人则很难恢复。心电图显示成年人在血管成形术后的确发生再狭窄,但大多数还是自发性地发生了血管增生后的退缩性变化^[4]。TGF- β 在血管壁损伤修复中的重要作用是由于其在局部损伤后水平明显增加决定的。很多种细胞组织在血管损伤后均能产生和分泌 TGF- β 。转化后的 TGF- β 即是一种“隐藏分泌”的因子,保持于一种可被局部蛋白溶解活性因素激活的状态。TGF- β 在局部对血管内皮细胞有什么样的作用呢?如同很多生物系统一样,TGF- β 可诱导双功能效应,取决于它介导的特异的细胞信号类型。TGF- β 发挥强烈的内皮细胞增生和迁移抑制作用,涉及到细胞间基质的增多和糖蛋白合成增多^[5]。目前已经对 SMC 和相关的成心肌细胞进行了 TGF- β 反应的研究。非常典型,TGF- β 表现出强烈对 SMC 的抗增生和迁移的作用,同时,在大鼠主动脉则可由 TGF- β 诱导产生一些促移植因子如血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF),能反过来促进大鼠 SMC 的移植。

另外,TGF- β 对细胞凋亡的作用效应取决于细胞类型和所处的前后上下的作用部位。典型的作用是,TGF- β 增加和诱导血管 SMC 和内皮细胞凋亡发生。但如细胞已由其他因子诱导出现凋亡,则 TGF- β 可发挥抗凋亡作用。如此,从人血管壁斑块处分离的细胞倾向于自发性凋亡,而这种细胞在培养过程中则几乎完全抵制 TGF- β 诱导的凋亡出现^[6]。从生理角度理解,TGF- β 诱导的内皮细胞和 SMC 凋亡是损伤后修复过程中斑块能否退化萎缩

的关键因素。同时,TGF- β 也易于产生对单核巨噬细胞系统增殖和移动游离的抑制作用。但是一旦这些细胞已经处于激活状态,TGF- β 则发挥激活其分泌尿激酶和胞浆素酶的作用。至于淋巴细胞,在多数情况下均被 TGF- β 强烈抑制。很低剂量的 TGF- β 即产生对 B 和 T 淋巴细胞的凋亡诱导作用。在动脉硬化斑块区,淋巴细胞主要表达 I 型而不是 II 型受体,提示有限的 TGF- β 抵抗可能是淋巴细胞必须发挥的作用。

4 TGF- β 对损伤诱发的血管内膜增生的抑制作用

研究证实,通过 TGF- β cDNA 直接转入血管壁,可造成损伤血管壁显著的内膜和中层的增厚,主要是细胞间基质成分的增加造成的^[7]。同样,在进行气囊血管成形术同时,TGF- β 的直接侵入也可导致大鼠损伤斑块 2 倍的增厚,主要是由于融合细胞基质的增加。在兔同类实验中也出现同样的纤维化反应。但相反地在 TGF- β 抗体损伤局部侵入则可使内膜血管增生和纤维化显著抑制^[8]。

这样,血循环中 TGF- β 可能是一种非常重要的血管对损伤反应的调节因子。载脂蛋白 A(ApoA),通过干扰 TGF- β 在动脉壁正常的活化,可明显促进脂质诱导的血管损伤后斑块附近细胞的过度增生。而在血管损伤后的大鼠动物模型中,可发现 6h 后 TGF- β mRNA 出现明显增加,24h 可达到高峰,接下来的 2 周内可观察到局部融合膜纤维化的发展同 TGF- β mRNA 表达明显相关。还可见到在机械损伤、高血脂损伤、高盐性高血压造成的损伤动物模型中,动脉局部出现明显的 TGF- β 水平增加。同时伴有 I 和 II 型 TGF- β 受体的增加^[9]。经免疫组织化学分析,早期人动脉粥样硬化斑块中 TGF- β 受体水平也有不同的改变。大量已形成的纤维斑块中仅有比较低的 TGF- β 受体,但往往仅表达更为低水平的 II 型 TGF- β 受体。通过原位杂交技术可检出血管成形术后,出现再狭窄的斑块区域的确存在多量的 TGF- β 表达,但目前尚不知这种 TGF- β 是否完全具有活性。但可以肯定的是,该区域内由于 II 型受体的表达量明显下降,同 TGF- β 的抑制作用和促凋亡效应下降有关系,这样或许能解释为什么斑块的退化萎缩不良的原因。

5 TGF- β 在动脉粥样硬化发生中的作用同其 II 型受体功能不全有关

随年龄增加的动脉粥样硬化发生率和血管损伤

后斑块区域退化萎缩机制的下降同时出现。表明年龄造成血管内皮产生变化,能加快和加重血管的损伤。在老年和青年大鼠,通过气囊成形术后局部血管损伤后再狭窄的实验可以得出明显差异的结果^[3]。通过将老年大鼠的血管移植入青年大鼠的实验,表明主要是血管的年龄,而不是大鼠的年龄,决定其过度的内膜增生。进一步的研究显示,老年大鼠的 SMC 细胞缺乏 84.3ku 的 II 型 TGF- β 和 I 型 TGF- β 受体,而相应的 II 型受体的 mRNA 表达有明显的下降,但 I 型受体 mRNA 却没有明显的下降,老年和青年大鼠均显示同一表达水平。同体内实验结果完全相同,体外实验老年大鼠的 SMC 细胞显示对 TGF- β 增殖抑制作用的抵抗效应。从人动脉硬化斑块分离的细胞(lesion derived cells, LDC)几乎总是存在对 TGF- β 的抵抗作用,尽管有时可遇到某一株细胞开始是敏感的,但几乎总是能逐渐获得对 TGF- β 的抵抗作用。而且不论在大鼠或者人类,这种对 TGF- β 的获得性抵抗作用总是涉及到 II 型受体的选择性缺失^[6]。同样的情况还发生于培养的内皮细胞系,高水平的 TGF- β 总是诱导对其抗增殖效应的抵抗作用^[10]。

但是,重要的是尽管 LDC 细胞丧失了对 TGF- β 的增殖抑制作用,却保留了其他一些对 TGF- β 的生物反应。正常人和兔 SMC 均没有 TGF- β 诱导的³H-脯氨酸整合进入细胞基质的结果。但 LDC 和各种硬化斑块细胞,却同时显示其对 TGF- β 的抵抗作用和 2~3 倍的促进细胞基质渗入³H-脯氨酸,表明基质合成的加速化。这方面的机理目前仍然不清楚,不知是 TGF- β 的信号传导途径的差异所致或者是少量的受体阳性细胞可继而释放一些纤维生长因子,如 PDGF 等所致。

这种细胞增殖抑制作用的丧失伴随着¹²⁵I-TGF- β 同细胞表面受体的结合下降。LDC 仅表现出非特异性结合率,相反在正常人动脉 SMC 细胞显示出更高的结合率。用放射性标记结合/DSS 交联方法,SMC 通常展现出 3 种受体类型。定量放射自显影术表明,II 型和 I 型 SMC 受体的比率是 3:1。相反,LDC 细胞丧失 TGF- β 的增殖抑制率,缺失大量 II 型受体,而 I 型受体相对较少丧失活性。这种受体的不同改变,直接同老年和青年动脉斑块细胞表现出对¹²⁵I-TGF- β 结合率的差异相同,提示老年血管细胞可能主要是通过丧失 II 型 TGF- β 受体再狭窄和纤维化。

除此之外,RT-PCR 技术充分证实 TGF- β 受体

mRNA 水平在不同年龄的动脉血管细胞和斑块细胞发生了明显的改变,即正常的 SMC 表达多量 II 型受体和少量 I 型受体。同时,LDC 则特异性地丧失 II 型受体,大约比正常细胞减少 80%~90% 的 mRNA 表达量。如将 II 型受体全长 cDNA 插入 pcDNA3 和逆转录质粒后转入(经脂质体 Lipofectamine) SMC 和 LDC 则可有 30%~50% 的 TGF- β 抗增生效应得以恢复^[11]。该结果提示,LDC 和 SMC 细胞仍然保持胞内 TGF- β 的信号传递能力,仅丧失了表面的 II 型膜受体结合能力。同样,LDC 细胞则表现为相对稳定和高水平的 I 型受体和低量变化不定的 II 型受体。

对 II 型受体丧失的可能解释是 LDC 细胞受体基因发生突变所致。结肠癌细胞系的一支亚克隆细胞易于通过 DNA 修复酶突变而发生复制错误。而 II 型 TGF- β 受体基因就是一种非常重要的复制易错基因^[12]。通常这种突变易发生于高度重复的范围,而不是随处发生。这种微卫星突变造成 5'-区域的移码,继而影响 mRNA 稳定性,最终导致蛋白质和信号传导的丧失。采用一种末端纯化限制位点法,可消除 PCR 产物的缺口,查验某一碱基对的缺失。同时采用高保真酶(pfu)确保粥样硬化组织细胞的突变等位基因。这样可明确显示在上述组织细胞中的确存在 1~2 bp 的缺失^[13]。

在来源于动脉粥样硬化血管切除组织中的细胞,大约 85% 细胞系存在对 TGF- β 受体的抵抗,该比例明显超过那些没有发生突变的细胞。尽管如此,在一些存在对 TGF- β 有抵抗作用的细胞中,还是表现为基因编码区完全正常。这种情况说明不可能排除一些内含子和启动子的突变,继而影响信号的传递过程。这样就存在 II 型受体下调的其他机制。II 型受体的启动子已经克隆成功,由 2 个 SP₁ 位点所调控,其中阳性调控原件(ERE₂)可被一种新型的 Ets 样的转录因子所识别,分离的阳性调控原件的配体目前不得而知^[14]。重要的是,该受体的启动子不被甲基化修饰,采用甲基转移酶阻断剂 5-氮杂-脱氧胞嘧啶核苷可通过增加 SP₁ 转录因子活性而促进 II 型受体表达^[15]。这样的结果可部分恢复细胞的 II 型受体功能,增强 TGF- β 抗增殖效应。

6 TGF- β 敏感和抵抗的细胞模型

从上述资料中分析,在陈旧的动脉粥样硬化斑块中分离的细胞大多具有抵抗 TGF- β 的抗增殖效应。由于不断有新的细胞增殖进入斑块之中,实际

上就应该存在一区域既有两种受体表达,又对 TGF- β 敏感。由于炎症反应激活 TGF- β ,导致 TGF- β 促进的纤维化形成。目前 TGF- β 的抵抗机制主要与其 II 型受体下调有关,不能排除其他的途径仍然涉及该机理。

在上述的 LDC 中 TGF- β 的抵抗效应同样发现于其他一些关键的抑制因子。比如,糖皮质激素就具有强烈的抗增殖和凋亡诱导效应,是其发挥抗炎抗纤维化的药理作用的中心。LDC 也产生明显的糖皮质激素抵抗作用,同样也是由于靶细胞丧失了皮质激素受体而致^[16]。这样看来,TGF- β 抵抗作用仅是上述细胞广泛抵抗作用中的一种而已。从另一种角度看,这种获得性广泛抵抗作用可能使血管修复细胞可承受恶劣的环境改变,更易于修复损伤的血管壁内膜。如果这种抵抗作用不适当地持续存在于细胞,那么细胞就可能持续抵抗 TGF- β 及皮质激素生理作用,造成不适当的血管壁过度修复。这就可能是 TGF- β 功能不全和动脉粥样硬化可能的分子机制,选择合适的干预方法,可能对老年心血管病,动脉粥样硬化的发生、发展和治疗有益。

参考文献

- 1 Topper JN. TGF-beta in the cardiovascular system: molecular mechanisms of a context-specific growth factor. Trends Cardiovasc Med, 2000, 10: 132-137.
- 2 McCaffrey TA. TGF-betas and TGF-beta receptors in atherosclerosis. Cytokine Growth Factor Rev, 2000, 11: 103-114.
- 3 Stemerman MB, Weinstein R, Rowe JW, et al. Vascular smooth muscle cell growth kinetics *in vivo* in aged rats. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79: 3863-3866.
- 4 Mehta VY, Jorgensen MB, Raizner AE, et al. Spontaneous regression of restenosis: an angiographic study. J Am Coll Cardiol, 1995, 26: 696-702.
- 5 Chen JK, Hoshi H, McKeehan WL. Transforming growth factor type beta specifically stimulates synthesis of proteoglycan in human adult arterial smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 5287-5291.
- 6 McCaffrey T, Du B, Fu C, et al. The expression of TGF-beta receptors in human atherosclerosis: evidence for acquired resistance to apoptosis due to receptor imbalance. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31: 1627-1642.
- 7 Nabel EG, Shum L, Pompili VJ, et al. Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 10759-10763.
- 8 Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E, et al. Antibodies against transforming growth factor- β 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. J Clin Invest, 1994, 93: 1172-1178.
- 9 Kanzaki T, Tamura K, Takahashi K, et al. *In vivo* effect of TGF- β 1 in rabbit arteries injured with a balloon catheter. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995, 15: 1951-1957.
- 10 Narhi LO, Kenney WC, Prestrelski SJ, et al. Conformation of glutathione adduct and oxidized forms of platelet-derived growth factor. Int J Pept Protein Res, 1993, 41: 8-14.
- 11 McCaffrey TA, Consigli S, Du B, et al. Decreased type II / type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta 1. J Clin Invest, 1995, 96: 2667-2675.
- 12 Markowitz S, Wang J, Myeroff L, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. Science, 1995, 268: 1336-1338.
- 13 McCaffrey TA, Du B, Consigli S, et al. Genomic instability in the type II TGF-beta 1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. J Clin Invest, 1997, 100: 2182-2188.
- 14 Choi SG, Yi, Kim YS, et al. A novel ets-related transcription factor, ERT/ESX/ESE-1 regulates expression of the transforming growth factor-beta type II receptor. J Biol Chem, 1998, 273: 110-117.
- 15 Ammanamanchi S, Kim SJ, Sun LZ, et al. Induction of transforming growth factor-beta receptor type II expression in estrogen receptor-positive breast cancer cells through SP1 activation by 5-aza-2'-deoxycytidine. J Biol Chem, 1998, 273: 16527-16534.
- 16 Bray PJ, Du B, Mejia V, et al. Glucocorticoid resistance caused by reduced expression of the glucocorticoid receptor and heat shock protein 90 in cells from human vascular lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19: 1180-1189.

(收稿日期: 2002-04-02)

(本文编辑 李棉生)