

# 血管成形术后血管外膜与平滑肌细胞的迁移

天津医科大学总医院(300052)

王永利综述 贺能树审校

**摘要** 平滑肌细胞的迁移是血管成形术后血管再狭窄形成的重要机制之一。传统认为血管新生内膜来源于血管中膜平滑肌细胞的内向迁移,但最近国外有学者提出新的学说:血管外膜细胞内膜迁移造成血管再狭窄。这一学说将可能对血管成形术后血管再狭窄的研究和临床治疗产生重大影响。

**关键词** 血管成形术;平滑肌细胞;血管外膜;迁移

平滑肌细胞(VSMC)的迁移是血管成形术后血管再狭窄形成机制中的重要环节之一,过度增殖的新生内膜细胞是血管再狭窄的直接病因。就其来源,传统认为是血管损伤后的中膜VSMC向内膜迁移。但有学者认为新生内膜细胞来源于血管外膜细胞的向内迁移。本文对血管成形术后血管外膜与VSMC的迁移作一概述。

## 一、启动平滑肌细胞迁移的诱因

正常血管由3层结构组成,由外弹力板和内弹力板将其进行分隔<sup>[1]</sup>。内层:即血管内膜,由连续的内皮细胞组成。通常处于静止态(非分裂态),正常的内皮细胞覆盖有硫酸肝素以及活性前列腺素,使其具有抗血栓形成的特性。内膜是具有高度新陈代谢活性的组织,合成并释放血管收缩素以及对局部刺激做出反应。理化因素对血管正常的内皮细胞损伤,尤其血管球囊成形术和血管内支架对血管内膜的损伤,将导致内膜层表面特性及功能的改变,失去对血小板粘附作用的抑制以及对循环血细胞(如单核/巨细胞)局部沉积的抑制,随后启动VSMC向血管内膜层(内皮下)的迁移。在内膜的损伤、血小板的沉积、血栓的形成和趋化因子的释放这一病理过程中,内膜损伤为VSMC迁移提供了触发条件,反过来又成为迁移的靶向结构。

## 二、血管外膜细胞的属性

Wilcox等<sup>[2]</sup>认为,增殖的外膜细胞是肌成纤维细胞(myofibroblast),具有纤维细胞的特性,能够诱导表达 $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -actin),这一假设已得到其实验证实。增殖的外膜细胞在损伤后的初始阶段, $\alpha$ -肌动蛋白为阴性,但在术后的第14d发生表型变化, $\alpha$ -肌动蛋白为阳性。既往实验中,不能被高分化VSMC的标记物结蛋白(desmin)和h-钙

调结合蛋白(h-caldesmen)染色,也不能被平滑肌细胞肌球蛋白抗体染色,并具有 $\alpha$ -平滑肌肌球蛋白诱导表达这一特性的细胞,被确认为肌成纤维细胞<sup>[3]</sup>。增殖的外膜细胞在术后第3d及第14d被房肽素(Vimentin,既能对VSMC着色又能使肌成纤维细胞染色的标记物)浓染,但不能被结蛋白或h-钙调结合蛋白染色,仅能被平滑肌细胞肌球蛋白抗体淡染。因此,可以认为血管外膜增殖的细胞是肌成纤维细胞。在3~14d间,血管外膜上表达 $\alpha$ -肌动蛋白的肌成纤维细胞发生表型转化,类似于肌成纤维细胞在伤口愈合或肿瘤形成过程的表型转化。

体内外肌成纤维细胞的 $\alpha$ -肌动蛋白合成,受许多因素刺激,包括肝素<sup>[4]</sup>、TNF- $\gamma$ 及转化生长因子- $\beta$ <sup>[5,6]</sup>。在皮肤创口愈合及疤痕收缩过程中,可以见到肌成纤维细胞决定的 $\alpha$ -肌动蛋白的表达<sup>[7]</sup>。在冠状动脉损伤的模型中可以见到血管外膜周围间隙出现肌成纤维细胞围绕损伤的冠状动脉,这些细胞中的收缩蛋白上调,表明肌成纤维细胞与血管成形术后的再塑形引起的血管再狭窄相关,即由外膜收缩再塑形性再狭窄。

## 三、血管外膜与VSMC的迁移

目前的实验及理论认为,在成形术后的血管再狭窄中,VSMC的增殖与迁移是两个关键步骤。VSMC从血管中膜向内膜迁移成为经典模式。

小型动物实验,如兔和鼠的周围血管损伤模型中,大量的实验证据表明,周围血管剥脱伴不同程度损伤,诱导VSMC的增殖及新生内膜的形成。大多数学者认为,这些模型中,血管中层VSMC在损伤后48h内开始增殖,1周后,这些增殖的细胞穿越内弹力板迁移至血管内膜,并成为增殖活跃的细胞群

主体<sup>[8,9]</sup>,随后以 VSMC 增殖及基质合成形成血管病变。这一过程在损伤后的内膜中延续长达 3 个月。

但有些学者通过实验得出不同的结论。Scott 等<sup>[10]</sup>认为,血管外膜在 VSMC 的增殖迁移中起了不可忽视的作用。为明确外膜细胞的归宿,Scott 等以猪为实验模型,观察其冠状动脉在血管成形术后的 VSMC 迁移。在实验的早期,采用 5 溴二脱氧尿苷(bromo-dexyuridine, BrDU)标记血管外膜的增殖细胞群,即在血管损伤后的 2~3d 内经耳缘静脉注射 BrDU,随后不再给予 BrDU。当新生血管内膜充分形成时,检测这些细胞群的分布。因术后第 3d,外膜细胞构成了增殖细胞的主体,表现为 BrDU 标记物阳性,对其进行追踪,可以明确这些细胞是否从外膜迁移并分布到新生内膜的细胞体系中。这一方法的原理,以前曾用于鼠颈动脉损伤模型中,即以 [<sup>3</sup>H] thymidine 标记增殖的中膜 VSMC 追踪其向新生内膜迁移<sup>[11]</sup>。实验的第 14d,血管内膜上可检测到 BrDU 阳性细胞。约有 43% 的新生内膜细胞来自血管外膜上,即术后 2~3d 与 BrDU 结合的血管外膜增殖细胞。血管成形术 2 周后,仍可在损伤血管外膜周围发现术后 2~3d 时出现的大量与 BrDU 标记物结合的增殖细胞。然而,43.1±3.3% 新生内膜细胞同样表现为 BrDU 标记物阳性。血管外膜标记物 BrDU 阳性的增殖细胞,倾向从血管外膜向内膜连续延伸性分布。只是,这些新生内膜细胞 BrDU 染色较淡,表明自血管损伤后 2~3d 与 BrDU 结合的外膜细胞在新生内膜上经历了分裂复制,因而在其子代细胞中丢失了标记性的 DNA。这些实验结果提示:增殖的外膜细胞从外膜穿越残留的外弹力板,成为新生内膜的细胞主体。

Wilcox 等<sup>[12]</sup>认为,既往大多数学者将对血管成形术后再狭窄研究的视点聚集在阻断 VSMC 内膜迁移上的观点有误,在血管成形术后的再狭窄病变形中,血管外膜可能起着重要的作用。许多研究也提示了外膜在 VSMC 增殖迁移中的重要作用。例如:将血管外膜剥脱刺激血管病变形成的模型,用于动脉粥样硬化及血管球囊成形术后再狭窄的研究已有报道<sup>[12-14]</sup>;使用球囊导管损伤鼠主动脉后,观察到基因表达的改变,如组织因子<sup>[15]</sup>或血管紧张素的改变<sup>[16]</sup>;经血管外膜给药刺激血管病变的形成;反义寡核聚体抑制 c-myc<sup>[17]</sup>;鼠颈动脉球囊导管剥脱术后在血管外膜使用肝素<sup>[18,19]</sup>或钙拮抗剂有效抑制血管病变形<sup>[20]</sup>。其中有些被看作是药物对血管中层平滑肌细胞的直接作用,血管外膜仅

被简单看作给药的便利途径。基于实验的结果,Wilcox 等认为在血管成形术中,多数实验对血管外膜细胞的直接作用较之对中膜平滑肌细胞的作用更有效。

Wallner 等<sup>[21]</sup>实验中发现,表达细胞粘素-C(Tenascin-C)的肌成纤维细胞,在血管损伤后 7~14d,穿过管壁在内膜上继续表达上述物质,且细胞粘素-C 促进 VSMC 的迁移。Li 等<sup>[22]</sup>实验中使用雌激素并通过雌激素受体途径,调控 VSMC 表达因子,控制血管外膜纤维细胞的迁移,从另一个角度证明了内膜细胞的起源。

就冠状动脉成形术后的第一波增殖而言,猪模型实验结果也表明,冠状动脉成形(PTCA)术后的细胞增殖在最早发生的时间点上,外膜细胞增殖比中膜更显著。

此外,实验中观察血管内膜细胞的间质改变发现,内膜细胞的间质表现为星形样,胞浆量变化较大,苏木精染色胞核极度苍白,但不能被标示  $\alpha$ -肌动蛋白的抗体或内皮细胞、巨噬细胞或淋巴细胞的标记物染色。体内外增殖时,VSMC 可以显示不同程度的  $\alpha$ -肌动蛋白抗体染色,因而,常呈现间质或成纤维细胞样的形态学表现。以前,据此认为内膜细胞出现的间质也来源于粥样斑块或中膜上的 VSMC<sup>[23]</sup>。但基于外膜的肌成纤维细胞可能参与血管成形术后的内膜病理性改变这一实验结果,因此必须重新考虑发生间质改变的血管内膜细胞,可能起源于外膜或肌成纤维细胞而不是中膜的 VSMC。

Lijnen 等<sup>[24]</sup>在实验研究中也曾发现,在有组织抑制(TIMP<sup>-/-</sup>)基质金属蛋白激酶(MMPs)的鼠颈动脉上,外膜上  $\alpha$ -肌动蛋白阳性的细胞能穿越弹力板间隙,说明血管损伤后存在外膜细胞的内膜迁移倾向。David 等<sup>[25]</sup>采用快速冷冻法,灭活血管中、内膜细胞,剥离外膜,在血管周围间隙种植 SMC(tTA-MMP9),发现四环素调控阴性的 SMC(TET-SMC)过度表达 MMP9(即明胶酶 B),细胞向腔内迁移增加,给予 BB-94 可以终止这一过程。因冷冻的颈动脉段未种植 VSMC,第 7d 在中、内膜也未见 VSMC,两周后中膜及内膜的 VSMC 不可能来源于邻近未损伤的动脉,只能来源于外膜。另有实验,将体外 BrDU 标记的 VSMC 从外部种植,形成的内膜和中膜为 100% BrDU 阳性细胞(Hasenstab 等未发表的资料,1999 年)。可以得出结论,中膜和内膜的细胞源于外膜种植细胞的迁移<sup>[26,27]</sup>。

Pieniek 等<sup>[28]</sup>亦持有这一观点,即血管成形术后新生内膜细胞来源于外膜的肌成纤维细胞。但 Randolp 等<sup>[29]</sup>对上述实验性结论表示怀疑。他认为在血管损伤愈合过程中缺少特异性的标记物,用以区分 VSMC 和肌成纤维细胞,因而有碍于清晰理解血管外膜在血管成形术后的中膜及内膜愈合中的作用。在其研究中,中等程度的中膜损伤后并非总是可以见到  $\alpha$ -肌动蛋白的表达。

综上所述,多数实验结果支持血管成形术后的再狭窄中 VSMC 的迁移与血管外膜有着密不可分的关系。对血管外膜细胞的迁移进行阻断并深入研究,可能为血管成形术后再狭窄的治疗提供新的思路。

### 参 考 文 献

- Robertson RM, Quertemous T, Varughan D, et al. Gene therapy in cardiovascular disease. *Cardiology in gene therapy*, 1996, 1-6
- Wilcox JN, Waksman R, King SB, et al. The role of the adventitia in the arterial response to angioplasty: the effect of intravascular radiation. *Int J Radit Oncol Biol Phy*, 1996, 36(4): 789-796
- Naktata Y, Shionya S. Vascular lesions due to ovstruction of the vasa vasorum. *Nature*, 1996, 212(2): 1258-1259
- Desmouliere A, Rubbia-Brandt L, Grau G, et al. Heparin induces alpha-smooth muscle actin expression in cultured fibroblsdttd and in granulation tissue myofibroblasts. *Lab Invest*, 1992, 67(4): 716-726
- Clark RA. Regulation of fibroplasias in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci*, 1993, 306(1): 42-48
- Ehrlich HP. Woudd closure: evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye*, 1988, 2(Pt 2): 149-157
- Csborn M, Debus E, Wever K. Monoclonal antibodies specific for vimentin. *Eur J Cell Biol*, 1984, 34(2): 137-143
- Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury, I: smooth muscle growth in the avsence of endothelium. *Lab Invest*, 1983, 49(3): 327-333
- Reidy MA, Fingerle J, Linddner V. Factors controllng the development of arterial lesions after injury. *Cirulation*, 1992, 86 [Suppl III]: 43-46
- Scott NA, Cioplla GD, Cheryl E, et al. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteryies. *Cirulation*, 1996, 93(2): 2178-2187
- Clowes AW, Schwartz SM. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res*, 1985, 56(4): 139-145
- Barker SG, Tilling LC, Miller GC, et al. The adventitia and atherogenesis: removall initiates intimal proliferation in the rabbit which regresses on generation of a'neoadventitia'. *Atherosclerosis*, 1994, 105(4): 131-144
- Booth RF, Martin JF, Honey AC, et al. Rapid development of atherosclerotic lesions in the rabbit carotid artery induced by perivascular maipulation. *Atherosclerodis*, 1989, 76(4): 257-268
- Chignier E, Eloy R. Adventitial resection of small artery provokes endothelial loss and intimal hyperplasia. *Surg Gynecol Obstet*, 1986, 164(3): 327-334
- Marnur JD, Rossikhina M, Guha A, et al. Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. *J Clin Invest*, 1993, 91(3): 2253-2259
- Rakugi H, Jacob HJ, Krieger JE, et al. Vascular inhury induces angiotnsinogen gene expression in the media and neointima. *Cirulation*, 1993, 87(1): 283-290
- Simons M, Edelman ER, Dekeyser JL, et al. Antisense c-myc oligonucleotuides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. *Nature*, 1992, 359(1): 67-70
- Edelman ER, Adams DH, Karnovsky MJ, et al. Effect of controlled adventitial heparin delivery on smooth muscle cell proliferation following endothelial injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(10): 3773-3777
- Okada T, Bark DH, Mayverg MR, et al. Localized release of perivascular heparin inhibits intimal proliferation after endothelial injury without systemic anticoagulation. *Neurosurgery*, 1989, 25(3): 892-898
- Hadeishi H, Mayverg MR, Seto M, et al. Local application of calcium antagonists inhibits intimal hyperplasia after arterial injury. *Neurosurgery*, 1994, 34(2): 114-121
- Wallner K, Sharifi BG, Shah PK, et al. Adventitial remodeling after angioplasty is associated with expression of tenascin mRNA by adventitial myofibroblasts. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37(2): 655-661
- Li G, Chen YF, Greene GL, et al. Estrogen inhibits vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro. *Cirulation*, 1999, 100(15): 1639-1645
- Wilcox JN, Smith KM, Williams LT, et al. Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in sit hybridization. *J Clin Invest*, 1988, 82(4): 1134-1143
- Lijnen HR, Soloway P, Collen D. Tissue inhivitr of matrix metalloprotninases-1 impairs arterial neointima formation after vascular injury in mice. *Circ Res*, 1999, 85(4): 1186-1191
- Mason DP, Kenagy RD, Hasenstab D, et al. Matrix metallopteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the ijured rat carotid artery. *Circ Res*, 1999, 85(12): 1179-1185
- Rocnik E, Chan B, Pickering J. Evidence for a role of collagen syntghesis in arterial smooth muscle cell migration. *J Clin Invest*, 1998, 101(4): 1889-1898
- Li G, Chen SJ, Oparil S, et al. Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries. *Cirulation*, 2000, 101(12): 1362-1365
- Shi Y, Pieniek M, Fard A, et al. Adventitral remodeling after coronary arterial injury. *Circulltion*, 1996, 93(2): 340-348
- Geary RL, Nikkari ST, Wagner WD, et al. Wound healing: A paradigm for lumen narrowing after arterial reconstruction. *J Vasc Surg*, 1998, 227(2): 96-108

(收稿 2001-09-06)