

## PTCA 术后再狭窄的基因治疗

刘嵩凯 综述 丁金凤 审校

1977 年, 瑞士科学家 Grüntzig 完成了世界首例 PTCA, 经过近 20 年的发展, 由于新技术的应用和经验的积累, PTCA 技术已在提高成功率及降低急性并发症方面取得了令人瞩目的成绩。但其术后的再狭窄却依然是困扰该技术应用的主要难题。所谓再狭窄, (Restenosis, RS), 即是 PTCA 术后所获得的管腔直径的增加丧失 50% 以上, 其发生大都在术后 6 个月以内, 且发病率高达 30% ~ 40%。以美国为例, 1991 年共进行 PTCA 30 万例, 其中 1/3 ~ 1/2 的患者发生了 RS。全世界的科学界对这一问题进行了大量的基础及临床研究, 曾利用药物及导管、支架等介入性手段对其进行防治, 但均缺乏明显疗效<sup>[1]</sup>。

随着现代分子生物学基础理论和技术的飞速发展, 从分子水平上对疾病的发病机理加以阐释并予以治疗已成为可能。一门标志着从分子水平上探讨心血管疾病防治的学科——分子心脏病学随即兴起。特别是 1989 年 Nabel 等人利用逆转录病毒载体将 LacZ 基因导入动脉内皮细胞获得成功<sup>[2]</sup>及 1990 年美国第一例临床基因治疗病例——腺苷脱氨酶(ADA)缺乏所致的先天性免疫缺陷综合征(SCID)得到美国 NIH 正式批准以来, 有关心血管疾病基因治疗的研究在世界各地蓬勃开展。如何利用这一新技术对 RS 进行防治自然就成为分子生物学家和心脏病学家共同关注的焦点。

### 一、再狭窄的病理生理

RS 的形成及发展过程, 总的来说是动脉损伤后机体稳态失衡的综合结果。由于这一过程涉及诸多生物因素, 且这些因素之间彼此又相互联系, 构成了一个复杂的作用网络。因此, 迄

今, 其确切的发病机制尚未明晰, 目前认为可能与以下因素有关。

(一) 血管内膜的增生 进行 PTCA 时, 由于球囊加压、扩张, 使冠状动脉内粥样斑块及内膜撕裂, 同时牵拉动脉中膜, 使内皮细胞剥脱, 内皮下的胶原和弹力纤维暴露, 从而使血小板、巨噬细胞聚集, 并和剥脱的内皮细胞及损伤的平滑肌细胞(SMCs)共同分泌血小板衍生生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子(IGF)等细胞因子, 这些细胞因子通过自分泌、旁分泌、胞内分泌等途径分别作用于损伤部位的 SMCs 上各自的受体, 引起 SMCs 的增生及迁移<sup>[3]</sup>。

在动脉损伤的动物模型中, 亦发现了 c-fos、c-myc、c-myb 等编码转录因子的细胞原癌基因的表达。提示上述生长因子的促 SMCs 增殖作用是通过这些原癌基因完成的。但 SMCs 增殖的启动及维持因素的确切分子机理尚未明了<sup>[4]</sup>。

利用大鼠颈动脉球囊损伤模型可将动脉损伤过程分为三个时相: 1. 血管壁损伤后, SMCs 即开始分裂, 这一时相从损伤后 24 小时 ~ 持续数日; 2. 损伤后第二天, SMCs 开始跨越内弹力板, 形成第一层内膜(假内膜), PDGF、bFGF 参与这一过程; 3. SMCs 迁至内膜后, 继续分裂, 并且分泌大量胞外基质, 使假内膜体积增加, 造成管腔狭窄。这一时相 SMCs 的增殖与 TGF- $\beta$  和 Ang II 有关<sup>[5]</sup>。

近年来一些基础及临床研究结果也对上述假设提出了异议, 如: O'Brien 等用免疫细胞化学的方法标记 PCNA(proliferation cell nuclear antigen), 检验了 100 位 RS 病人的冠脉标本, 发

现其中仅有 26% 为 PCNA 阳性,而这些 PCNA 阳性标本中,又仅只有不到 1% 的细胞处于增殖状态<sup>[6]</sup>;临床上应用的一些抗增殖药物治疗 RS 效果欠佳,也说明内膜增生在 RS 发生中的作用有待进一步探讨。

(二) 血栓形成 PTCA 术后早期 (1 小时内),由于球囊扩张所致的动脉内膜损伤和血小板聚集,可激活凝血机制,导致扩张部位血栓形成,明显的残余狭窄和冠脉痉挛引起的血流异常,也可进一步增加血栓形成的机会,随后血栓机化,也是造成 RS 的原因之一。据统计,3% ~ 5% 的病人术后 1 小时内发生的急性血管闭塞是由血栓造成的,另有 40% 的病人发现血栓参与了 RS 斑块的构建。

(三) 动脉重构 所谓动脉重构,就是动脉血管总面积或内弹力板以内血管面积发生的改变。

PTCA 术后,局部血管扩张将导致该处血管壁切应力低于术前水平,为维持此处血管剪切力的平衡,将出现局部血管壁的回缩。

更为重要的是,手术时造成的斑块撕裂和內、外膜损伤,将会在手术部位发生非特异性炎症反应,一些炎性细胞和中膜的 SMCs 分泌大量的蛋白水解酶,将胞外基质中的胶原蛋白降解,同时合成纤粘连蛋白、I、III 型胶原蛋白,沉积在该处,最终形成一个纵横交错的纤维网,大大降低了动脉壁的代偿作用,当内膜增厚或血栓形成时,由于血管壁缺乏代偿性扩张,从而加速了 RS 的发展<sup>[7]</sup>。

## 二、对 RS 进行基因治疗的候选基因

目前对 RS 进行基因治疗的外源基因主要依据其发病机理选取,大致可分为以下两类。

(一) 抗 SMCs 增殖及迁移的基因 如:通过导入内皮细胞源性的一氧化氮合成酶基因 (EC-NOS),使损伤动脉内膜合成 NO 分子,从而抑制 SMCs 的增生和迁移<sup>[8]</sup>。

再如:通过导入胸腺核苷激酶 (tk) 基因使一些抗增殖药物的素性活化,杀死增生的 SMCs<sup>[9]</sup>。

(二)、抗血栓形成的基因 1. 如:组织纤

溶酶原激活物 (t-PA)、尿激酶原 (Pro-UK) 等纤溶酶原激活物类分子激活纤溶酶,使局部形成的血栓溶解,可以减少 RS 的发生;2. 如:环氧化酶 1 (COX-1),通过导入内皮细胞的 COX-1 合成前列环素 2 (PGI<sub>2</sub>),抑制血小板聚集,减少血栓形成,并且可以减少 PDGF 的释放,间接抑制了内膜增生<sup>[10]</sup>。

## 三、RS 基因治疗策略

RS 的基因治疗可分为体外基因转移和体内基因转移两种方式。

(一) 体外基因转移 将重组的外源基因导入体外培养的靶细胞,筛选后将转化细胞用球囊或导管重新植入损伤部位,外源基因表达后在该部位发挥功能。此方法具有转移效率高的优点,但操作繁琐,较为费时。

(二) 体内直接基因转移 直接用带孔球囊将重组 DNA 溶液注入受损血管壁, DNA 随机进入 ECs 或 SMCs 表达外源蛋白。该方法操作简便,转移范围广,但转移效率较低。

## 四、基因转移方法

由于逆转录病毒只能感染复制期细胞,且病毒滴度低,故不适合于做为 RS 治疗的载体。目前在 RS 治疗中应用最多的基因转移系统有以下三种。

(一) 经血管壁的反义寡核苷酸转移 利用反义寡核苷酸分子抑制 c-myc 等原癌基因的表达,进而抑制 SMCs 的增殖,以达治疗 RS 目的。

反义寡核苷酸是单链的 DNA 或 RNA 分子,通常为 15 ~ 30bp,通过扩散入胞,与具有互补序列的靶 mRNA 结合,抑制其转录,并阻止 mRNA 从核内运出,加速 RNaseH 对 mRNA 的降解。

该转移系统优点有:1. 可进入各种类型及复制状态的细胞;2. 可通过化学合成大量获取;3. 不整合入细胞基因组,相对安全;4. 无外源蛋白表达,不发生免疫反应。

其缺点有:1. 缺乏细胞靶向性;2. 易降解,需要较高的治疗浓度和作用时间。

Simons 等人利用外周血管滴注的方法将反

义 c-myb 导入损伤的大鼠颈动脉, 结果提示: 该方法有效地抑制了 c-myb 的表达。Northern blot 示: 用反义寡核苷酸处理过的动脉 c-myb mRNA 几乎不表达, 而对照组的 c-myb mRNA 高表达。由此, 反义寡核苷酸做为载体对 RS 进行基因治疗具有可能性<sup>[11]</sup>。

(二) 脂质体介导的基因转移 脂质体是由一些中性或阳性的脂质分子在水环境中形成的脂双层微粒, 可以和 DNA 形成 DNA-脂质体复合物, 通过膜的融合作用将外源 DNA 带入靶细胞。该法的优点有: 1. 载体一般用表达性质粒, 和脂质体一样都易于构建; 2. 可转染各种细胞; 3. 可携带较大片段 DNA。而其缺点为: 1. 转移效率低, 一般 <1%; 2. 细胞靶特异性差。

Victor Jdzau 等用携带 EC-NOS cDNA 的表达型质粒 pUC13 与 HMG-1 核蛋白及 HVJ 脂质体 (Hemagglutinating virus of Japan) 混合后导入内皮细胞损伤区, 通过 Western blot 及免疫组化和 DNA 合成率测定, 证明该方法可使大鼠颈动脉损伤 14 天后假内膜的形成 70% 被抑制, 充分显示了这一方法的可行性和有效性<sup>[8]</sup>。

(三) 重组的复制缺陷型腺病毒 (Ad) 经皮穿刺基因转移 Ad 是双链 DNA 分子, 整个基因组长 36Kb。可分为 10 个图距单位 (Mapping unit, mu)。用做基因治疗的通常是 Ad-2 和 Ad-5。通过缺失其 E1 区 (1-9mu) 造成复制缺陷。因为该区编码的 E1A、E1B 转录调节蛋白可参与诱导病毒晚期基因的表达<sup>[12]</sup>。复制缺陷型的 Ad 可通过转染人胚肾 293 细胞 (该细胞含 E1 区) 而重新进行复制, 产生病毒颗粒<sup>[13]</sup>。

Ad 载体之所以近年来为众多的基因治疗所推崇, 主要基于以下原因: 1. 可感染的宿主细胞广泛, 包括非复制期细胞; 2. 基因转移效率高; 3. 可插入大片段外源 DNA, 达 7.5kb; 4. 易于制备, 可获得高滴度血清, 达  $10^{10}$  pfu; 5. 应用安全, 不整合入染色体, 无致癌危险。

但在应用过程中, 也发现其具有下列局限性: 1. 缺乏细胞靶向性; 2. 由于不整合入染色体, 故不能长期表达, 表达时限一般在 1 个月之

内, 但这对 RS 的治疗已经足够; 3. 免疫反应: Ad 载体所表达的病毒相关蛋白可被机体免疫系统所识别, 从而针对靶细胞产生免疫反应, 降低了基因治疗的效果。

Nabel 等人曾利用 Ad 载体携带疱疹病毒的胸腺核苷激酶 (tk), 用球囊导入猪的股动脉损伤处, 通过表达 tk 将核苷酸类似物 ganciclovir 磷酸化后转为其活性形式, 掺入复制的 DNA 中, 造成增殖的 SMCs 死亡, 达到了抑制内膜增生的目的。结果显示: 实验组与对照组相比, 动脉壁增厚程度下将了 50%~90%, 尤以中层最为明显<sup>[9]</sup>。

Wu 等利用 Ad-5 将 EC-COX-1 转入动脉成形术后的猪颈动脉细胞, 通过表达 COX-1 增加 PGI<sub>2</sub> 合成, 抑制局部血栓, 以求阻断 RS 进展。结果示: 实验组猪的 SMCs 表达了 5 倍于正常的 PGI<sub>2</sub><sup>[10]</sup>。

#### 五、问题及展望

RS 由于发病机制复杂, 许多具体的分子细节尚不清楚, 而且用于基因治疗的载体系统发展亦不完善, 这些都给目前 RS 的基因治疗带来了诸多困难和问题。

(一) 缺乏有效的外源基因 由于难以判断哪个因素在 RS 的发病中起主导作用, 因此目前所使用的外源基因均不能达到根治的目的。这一问题的解决只能靠 RS 发病机理在分子水平上的突破。故大力加强这方面的基础研究势在必行。

(二) 缺乏有效的基因转移途径 目前使用的几种基因转移途径, 都存在转移效率低和缺乏细胞靶向性的弊端。这在某种程度上大大限制了基因治疗在临床上的应用。因此, 寻找细胞特异性的启动子和增强子应是今后努力的方向。

(三)、外源基因的表达缺乏可控性 基因治疗中导入的外源基因因缺乏自我调控能力, 故不能根据机体的需要随时调整表达水平, 需要反复监测。因此, 如何在外源基因的上游, 添加可诱导的调控元件并寻找与之匹配的同生理调节一致的信号分子, 是解决这一难题的关键

所在。

(四) Ad 的免疫反应问题 当前,在 RS 的基因治疗中,Ad 是最有希望率先应用于临床的载体,但其致命的弊端即是它的免疫反应问题<sup>[14]</sup>。如何从 Ad 载体的改造入手,利用蛋白质工程的方法降低病毒蛋白的免疫原性;或利用 IL-2、IFN- $\gamma$  等细胞因子刺激机体产生抗 Ad 蛋白的抗体可能会对解决这一棘手难题有所裨益。

(五)缺乏有效的动物模型 实验动物模型的建立无疑对于阐明 RS 的发病机理及提供防治手段具有不可替代的作用。但由于动物的解剖结构与操作方法同人体有较大的差距,因此造成了许多在动物身上得出的结论无法应用于人体。迄今,无论是早期的鼠颈动脉损伤模型,还是最近的猪股动脉损伤模型,都不能完全模拟人 PTCA 术后动脉的改变情况。今后如何改进已有的动物模型或者寻找更为接近人体的动物模型无疑将会大大推进人们对 RS 的认识程度<sup>[15]</sup>。

RS 的防治是心血管领域一项公认的难题。但相信随着其分子生物学机理的逐渐阐明和基因转移技术的日臻完善,在基因水平上对其进行彻底根治将为时不远。

## 参考文献

1. Faxon DP, Currier JW. Prevention of post-PTCA restenosis. *Annals New York Academy of Science*. 1994, 58: 419.
2. Nabel EG, Plautz G, Nabel GJ et al. Recombinant gene expression in vivo within endothelial cells of the arterial wall. *Science*. 1989, 244: 1342.
3. Liu MW, Roubin GS, King SB III et al. Restenosis after coronary angioplasty: potential biologic determinant and role of intimal hyperplasia. *Circulation*. 1989, 79: 1374.
4. Pollack PS. Proto-oncogenes and cardiovascular system. *Chest*. 1995, 107: 826.
5. O'Brien ER, Schwartz SM. Update on the biology and clinical study of restenosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 1994, 4: 169.
6. O'Brien ER, Schwartz SM, Alpers CE. Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. *Circulation Research*. 1993, 73: 223.
7. Post MJ, Borst C, Kuntz RE et al. The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. *Circulation*. 1994, 89: 2816.
8. Dzaio VJ, Heike EL, Gary HG, et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995, 92: 1137.
9. Ohno T, San H, Nabel EG et al. Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science*. 1994, 265: 781.
10. Zoldhelyi P, McNatt J, Wu. KK et al. Prevention of arterial thrombosis by adenovirus-mediated transfer of cyclooxygenase gene. *Circulation*. 1996, 93: 10.
11. Simons M, Edleman E, Dekeyser JL et al. Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. *Nature*. 1992, 359: 67.
12. Graham F, Vander EA. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus. *Virology*. 1973, 54: 536.
13. Graham F, Smiley J, Russell WC et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type-5. *J Gen Virol*. 1977, 36: 59.
14. Schulick AH, Newman KD, Dichek DA. In vivo gene transfer into injured carotid arteries - optimization and evaluation of acute toxicity. *Circulation*. 1995; 91: 2407-2414.
15. Jackson CL. Animal models of restenosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 1994, 4: 122.