

## • 会议专题 •

## 动脉粥样硬化研究的若干进展

蔡海江

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 南京 210029)

## 1 “斑块稳定”概念

Brown BG<sup>[1]</sup>在1994年第十届国际动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 学术大会上总结了应用各种干预措施 (饮食改变、运动、降脂、降压药等) 所进行的十余个经过严密设计的大规模人群前瞻性研究, 包括 NHLBI (Type I)、CLAS、POSCH、Lifestyle、FATS、STARS 等等。这些试验的共同结果很明显, 即对照组的病人约有一半 As 病变进展, 而干预组则只有约 1/4 的病人病变进展; 与此同时, 对照组病人只有 10% 以下病变消退, 而治疗组病变消退者约占 25%。这一方面说明 As 是可防可治的。另一方面又发现了一个重要的事实, 尽管血管造影显示冠状动脉狭窄的改善只是轻度的, 但临床事件 (心肌梗塞、猝死等) 的减少却是惊人的, 可达到 30%~80%。

经过详细的临床-病理对照研究及动物试验, 对此现象得到了解释<sup>[2,3]</sup>, 轻-中度大小的斑块骤然破裂是引起事件的祸首。经常是 As 斑块的纤维囊发生深部裂隙。这种斑块的特征是: ①细胞外脂质核心 (包括结晶状胆固醇) 占斑块面积的 40% 以上; ②脂质池上被覆的纤维帽纤维组织相对贫乏; ③上述部位充满脂质的巨噬细胞密集而平滑肌细胞相对较少; ④斑块在血管腔内常呈偏心位置, 这种斑块的质地软、物理脆性大, 在纤维囊移行至周围正常内膜处易受血流剪切力的作用, 斑块常在此处破裂。此外, 局部内皮功能不全 (E-DRF 的合成及释放障碍, 或同时有内皮素-1 增加) 可引起血管收缩, 助长斑块破裂倾向。具有这些特点的斑块只占斑块总数的 10%~20%, 但 80%~90% 的临床急性事件系由少量的斑块引起。

斑块破裂的后果可以是迅速在原破裂处生成堵塞性管腔内血栓, 导致冠心病急性事件。也可以是在斑块内发生血栓, 纤维机化后重新使斑块愈合。反复破裂及血栓形成可导致形成较大而纤维化及稳定的斑块, 不易破裂。

有明显疗效的降脂药物问世也是近年来 As 研究的一大进展。降脂治疗的意义不仅在于预防 As, 对已

患 As 的病人, 持续降脂治疗可能使具有危险性的斑块中的脂质被重吸收, 脂质池变小, 动物实验中见到纤维囊壁浸润的泡沫细胞有相当量的减少, 斑块中心的胆固醇亦减少; 同时还有降低氧化 LDL 及改善内皮功能不全的作用, 最终使病变趋于稳定。临床上确使轻-中度病变不发展成为急性临床事件。所以现在对斑块消退的认识应从单纯追求管腔狭窄的改善转变至首先使“斑块稳定”。

## 2 生长因子、细胞因子的作用

参与 As 形成的细胞主要有内皮细胞、平滑肌细胞、单核巨噬细胞及 T 淋巴细胞。近年来有关 As 动脉壁方面的研究进展主要来自多种细胞因子、生长因子的发现及其功能的大量研究, 推动了对细胞信息传递的了解。

1993 年 Ross<sup>[4]</sup>发表了一篇关于 As 发生机制的综述, 详细阐述了各种细胞所分泌的各种因子及其相互作用。当内膜接触到损伤性物质时, 白介素-1 (IL-1)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、干扰素  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )、IL $_2$ 、多种集落刺激因子 (CSF) 等就作为炎症反应的介质出现, 可能同时也起免疫反应介质的作用。

主要的生长因子包括血小板源生长因子 (PDGF)、碱性纤维母细胞生长因子 (bFGF)、肝素结合性上皮生长因子 (HB-EGF)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、IL-1、TNF $\alpha$ 、转化生长因子  $\beta$  (TGF $\beta$ ) 等, 这些因子通常在正常动脉不表达, 而在 As 病变中则发生上行性调节。

有些因子具有多方面的作用, 例如既是增殖剂又是趋化剂。单核细胞须经趋化作用才能进入动脉壁, 平滑肌细胞从中膜进入内膜也需经趋化作用。各种集落刺激因子、单核细胞趋化蛋白-1、氧化 LDL、TGF $\beta$  都对单核细胞有趋化作用, 对内皮细胞有迁移作用; 而 PDGF、及 IGF-1 则对平滑肌细胞有趋化作用。许多细胞的胞浆中含 bFGF, 在细胞损伤时可被释放于基底膜处, bFGF 对内皮细胞是强力的促分裂剂和趋化剂, 对平滑肌细胞是促分裂剂。还应注意生长调节因子的作用在不同情况下可以是不同的, 有时能刺激细胞增殖,

有时又能抑制增殖。

在 As 发生过程中,不是那一个因子单独在起作用。通过细胞相互作用的网络,某个因子的释放将导致第二个因子在靶细胞中表达,它又可通过旁分泌刺激邻近的细胞,或自分泌刺激其本身。例如当氧化 LDL 作用于病变中的单核巨噬细胞时,就可引起 IL-1 或  $\text{TNF}\alpha$  的释放;在细胞培养时,这些因子或  $\text{TGF}\beta$  又能诱导平滑肌细胞中 PDGF-A 基因表达;在整体时,活化平滑肌细胞 PDGF-AA 的释放又能刺激其邻近细胞及自身。所以细胞因子及其他一些分子可以引起连锁反应使细胞不断增多;但在此情况下,为了保持平衡有些因子如  $\text{TGF}\beta$ 、IL-1 及 IFN $\gamma$ , 又能抑制内皮细胞或平滑肌细胞的增殖。

基于上述事实, Ross 认为 As 的实质是在动脉壁内皮及平滑肌细胞受到各种损伤时所引起的一种过度的、炎性-纤维增生性反应,有大量生长因子、细胞因子及血管调节因子参予其过程。因此如能调节编码这些因子的基因表达,就有可能研究出新的诊断和治疗制剂,防止 As 病变的形成或促其消退。

现在已有可能制备针对各种细胞因子或生长因子的抗体或拮抗剂,或应用反义寡核苷酸技术从基因水平阻遏其表达。Schwartz<sup>[5]</sup>根据 As 发生的细胞和分子机制,提供了分四个层次干预 As 进程的战略目标:①阻遏 As 的起始事件;②阻止斑块发展;③稳定斑块;④缩小斑块和移除其中的某些组分。相信基础理论研究的进展将会为 As 防治增添更多新武器。

### 3 氧化修饰脂蛋白学说面临检验

动脉粥样硬化形成的氧化修饰假说已到了可以称为“尴尬”的时期<sup>[6]</sup>,一方面它已成熟到得到许多实验和流行病学资料有力支持的阶段,但另一方面它还没有达到经临床检验而证实的地步。

已经有大量实验证明氧化 LDL 对血液中的单核巨噬细胞有趋化作用,能吸引其进入动脉内膜聚积,并抑制其活动;氧化 LDL 通过巨噬细胞上清道夫受体的摄取,促进泡沫细胞的形成;氧化 LDL 还具有细胞毒及能刺激细胞产生各种细胞因子及生长因子,从而促进 As 的发展。经过研究,一些传统的冠心病危险因素如低 HDL、高血糖、高血压、糖尿病等促进 As 的机理,亦应联系 LDL 氧化理论来考虑,几项应用抗氧化剂预防的动物试验可使 As 病变进展的速度减少 30%~80%,动物及人的 As 组织中均已发现修饰脂蛋白的存在。凡此种种均使此学说基本上已为学者们广泛接受。

各种学说或新治疗方法必须能经受大规模、随机、双盲临床试验的验证,得到肯定后才能推广应用,这在

近代西方临床医学似已成为不可逾越的一个重要步骤。抗氧化剂预防冠心病的人群试验结果至今不一致。1993 年召开的美国心血管流行病学学术会议上,共有 5 篇报告支持抗氧化剂预防冠心病的观点。美国最近发表的两个试验证明约 4 万名男性、8 万余名女性大量服用 Vit E,分别随访 4~8 年,冠心病的发生率均明显降低<sup>[7,8]</sup>。但 1994 年 MEJM 社论指出<sup>[9]</sup>,这些观察性研究的主要不足之处是:即使最好的几项研究所反映出来的服用抗氧化剂的裨益并不十分大,有可能系来自生活方式中未测定的其他差别,例如膳食结构的不同。最近芬兰所进行的一项 Vit E、 $\beta$  胡萝卜素的预防性研究结果则显示摄取两种维生素者,冠心病或脑卒中死亡率与对照组的差异均无统计学上有意义的显著性,认为以前发表的几项研究结果可能高估了这两种维生素的效果。

问题显然是很复杂的,到底哪一种抗氧化剂的作用最好?尚难预料。研究自由基的化学家们大多数都认为,有效的抗氧化活性需要几种不同的相互依赖的元素。因此最适宜的方法似为膳食混合加添 Vit E、Vit C、 $\beta$  胡萝卜素,虽然难以区分各自的作用,但唯有这样才能较好地回答“抗氧化剂能否阻止冠状动脉硬化”这个问题。有的学者认为即使抗氧化剂确能降低心血管病的危险,其程度也不如改变生活方式降低的幅度大,只能辅助控制或改变已知的危险因素,而不能取代后者,有的学者甚至提出过量 Vit E“治疗”可能带来危险。他指出“美国 1990 年有 726 万余名成人服用 Vit E,多数剂量为 400 IU/日,10%的人剂量达 800 IU/日,3%则高达 1 200 IU/日,他认为成人日需 Vit E 8~10 mg,服用 100 IU/日,已属过多,日服 300 IU 已可视为大剂量。Vit E 过多可带来许多生物性变化,可发生血栓性脉管炎、肺栓塞、高血压、疲倦、乳房瘤、肌无力等合并症,需要引起警惕。

出于对氧化脂蛋白学说的重视,除了传统的抗氧化维生素外,近年来又发现了许多食物中具有抗氧化作用的成分,还发现了具有抗氧化作用的药物。本着对科学严肃及对人类健康负责的态度,看来还需要继续进行更广泛、更深入的研究。

### 4 转基因动物及基因打靶技术在脂蛋白代谢及动脉粥样硬化研究中的应用

许多载脂蛋白、脂蛋白代谢酶及脂蛋白受体的基因已经克隆成功、测出序列并在人基因组定位。以前这些基因及其蛋白质的功能是靠生理学方法或利用一些有遗传性缺陷的动物或人来研究。转基因动物技术将外源性基因注射至动物的受精卵使之得到表达。这项

尖端技术可用于更精确可靠的研究,在脂蛋白代谢及 As 研究方面已获得较广泛的应用。Hofmann 率先将人 LDL 受体 cDNA 导入小鼠,证实了人 LDL 受体在整体的功能是使其配基在血浆中的浓度降低。接着 Walsh 等成功地将人 ApoA-I 基因转入小鼠,使血浆中相当于人 HDL<sub>2</sub> 的小 HDL 颗粒增多。Rubin 等<sup>[10]</sup>的转 ApoA-I 小鼠受到广泛注意,因为一直不明确流行病学所阐明的 HDL(Apo A-I)与 As 之间的负相关是 HDL 的直接抗 As 作用,还是与之相联系的其他因素的作用。Rubin 等将人 Apo A-I 基因转给对 As 敏感的 C57BL/6 小鼠,结果获得人 Apo A-I 的高效表达。当饲以高脂饲料时,转基因小鼠的 As 病变明显受到抑制,证明了 Apo A-I 对 As 的直接保护作用。Lawn 等将人 Apo (a) 转至小鼠后发现,在饲高脂饲料的条件下,表达人 Apo(a) 的转基因小鼠主动壁发生了含脂质的病变,其程度明显超过对照组。Schulitz 报告用易患 As 的动物株,形成了人 Apo A-I 及 Apo A-I 加 ApoA-Ⅱ 两种不同的转基因小鼠,饲以高脂饲料后,虽然动物的总胆固醇和 HDL-胆固醇浓度相同,但 A-I 加 A-Ⅱ 组小鼠的 As 病变面积比 A-I 组大 15 倍。Warden 等亦报告 Apo A-Ⅱ 转基因小鼠即使饲料中脂质低,As 早期病变的形成亦增多,说明富含 A-Ⅱ 的 HDL 颗粒功能已发生了改变。

述上述基因外,Apo C-Ⅲ、Apo A-Ⅳ、Apo C-Ⅱ、Apo E 及其变异体、Apo B、Apo E/C-Ⅰ、CETP、LCAP、LPL 等基因的转基因小鼠均已形成,在脂蛋白代谢与 As 发生的研究方面取得了很大的成绩。

基因打靶技术(gene targeting)是利用同源重组法使小鼠胚胎干细胞携带某种突变基因,以复制人类相应遗传性疾病的动物模型,已成为脂代谢及 As 研究的有力工具<sup>[11]</sup>。基因灭活(gene knockout)是在关键的基因编码区导入终止密码子,使该基因失去功能,是其中较常用的技术。

应用基因灭活技术破坏小鼠的 apoE 基因,获得的小鼠血浆中缺乏 apo E,血浆胆固醇升高 5 倍,甘油三酯升高 68%,类似人的 Ⅲ 型高脂蛋白血症。即使给这种小鼠饲以普通饲料,3 个月龄时主动脉即自发地发生脂质沉积,5 个月时已不断发展成为成熟的 As 病变,8 个月时可见严重的冠状动脉堵塞,证明基因变异本身就能自发地发生 As。这些动物外表健康、也能繁殖,具有很高的研究价值。

同样破坏小鼠胚胎干细胞中 apo a-Ⅰ 基因,获得的纯合子基因灭活小鼠血浆中缺乏 Apo A-Ⅰ,总胆固

醇降至正常的 1/3,HDL-胆固醇降至正常的 17%,但奇怪的是其主动脉并无脂质沉积的表现,说明单独 HDL 降低本身并不引起自发性 As,人类见到的现象与此相符。

用基因打靶技术形成小鼠 apo b 变异基因,使第 3 146 位氨基酸成为终止密码子。纯合子突变小鼠血中无 Apo B<sub>100</sub>,但有 50% 的 Apo B<sub>48</sub>,总胆固醇约为正常的一半,可用于研究低 Apo B 对 As 发生的影响。

最近构成了 LDL 受体基因灭活小鼠模型。纯合子小鼠由于缺乏此受体,使血浆胆固醇升高,不能自血浆中清除 VLDL 及 LDL。但血浆胆固醇升高程度较人类家族性高胆固醇血症(FHC)为低。鉴于 Apo E 基因灭活小鼠脂蛋白异常较人 Apo E 缺乏症严重,可以认为小鼠的 Apo E 在清除脂蛋白方面较人的 Apo E 作用更重要。

基因打靶技术的应用还在开始阶段,除了使单个基因灭活外,还可人工造成各种细微的突变,或者将两种以上突变基因转入同一动物,甚至将转基因动物与基因打靶技术合并应用,观察基因之间的相互影响。

随着体细胞基因转移技术的迅速发展,人类疾病的基因治疗已不再是遥远的未来。LDL 受体缺陷所致的 FHC 已被批准作为基因治疗的对象。基因治疗冠状动脉成形术(PTCA)后再狭窄已成为研究热点。1994 年美国 Wilson 小组报道了一例 FHC 纯合子妇女应用 *ex vivo* 法进行基因治疗,获得良好效果<sup>[12]</sup>。但患者须经两次手术、损伤太大,而且对其效果的判断有些科学家还持异议<sup>[13]</sup>。尽管如此,这毕竟是一个伟大的开端,相信经过不断改进,基因治疗动脉硬化性疾病必将蓬勃发展,并获得成功。

## 参考文献

- 1 Brown BG. *Atherosclerosis*, 1994, **109**: 1.
- 2 Fuster V. *Atherosclerosis*, 1994, **109**: 1.
- 3 Waters B. *Prog in Cardiovas Dis*, 1994, **37**: 107.
- 4 Ross R. *Nature*, 1993, **326**: 801.
- 5 Schwartz CJ. *Circulation*, 1992, **86**(suppl Ⅱ): Ⅱ-30.
- 6 Editorial. *N Engl J Med*, 1993, **328**: 1450.
- 7 Rimm EB, et al. *N Engl J Med*, 1993, **328**: 1450.
- 8 Stampfer MJ, et al. *N Engl J Med*, 1993, **328**: 1444.
- 9 Editorial. *N Engl J Med*, 1994, **320**: 1 080.
- 10 Rubin EM, Smith DJ. *Trends Genet*, 1994, **10**: 1 880 293.
- 11 Nobuyo M. *Curr Opin Lipidol*, 1993, **4**: 90.
- 12 Grossman M, et al. *Nature Genetics*, 1994, **6**: 335.
- 13 Brown MS, et al. *Nature Genetics*, 1994, **7**: 349.