

动脉粥样硬化的靶向治疗

杨和平 杨永宗

(衡阳医学院分子生物学研究中心, 衡阳 421001)

摘要 本文扼要介绍了动脉粥样硬化防治及研究中的新领域:①新型导向药物;②靶向性基因治疗;③基因重组免疫毒素;④治疗型抗体。重点概述了上述4个方面的研究进展。

关键词 动脉粥样硬化; 新型药物; 基因治疗; 基因重组免疫毒素; 抗体。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)于1886年被首次提出后,百余年来,一直是人类面临的一大顽症。尽管人们从未停止对As的研究、预防和治疗,在现代科学技术如此发达的今天,As不但没有得到有效的防治,而且越是发达的国家其人群中发病率越高。例如在美国每年仅接受血管成形术的就高达30万以上,但其中30%~40%的人在治疗后的6个月内发生血管再狭窄。而应用传统药物对As、高脂血症等的治疗又难以奏效。一些手术和介入性治疗虽有一定的收获但也仅是“治标”而“治本”。近年来,分子生物学的迅速发展把As研究和治疗带入了分子时代。

1 新型导向药物

开发治疗药物的传统方法包括筛选天然或合成药物来寻找干扰疾病生物学过程的物质。以前由于对于人类疾病的分子病因学知识有限而不得不采用这种随机的筛选方法。近年来,随着分子生物学、分子遗传学和分子药理学的进展,使调节正常生理过程的关键性蛋白得以鉴定,在某些情况下,已弄清引起疾病的细胞途径。这些信息可被用于设计特异性靶向途径的治疗药物。

1.1 信号转导

信号转导是细胞接受外部刺激后所引起细胞生长、分化和维持生存的一个生物学过程。靶向治疗离不开信号转导,靶向治疗的药物要通过信号转导加以实现。随着信号转导研究的深入,一些新的细胞内靶点得以发现。

酪氨酸蛋白激酶(protein tyrosine kinase, PTK)属于跨膜受体家族和细胞质非受体家族。受体酪氨酸

激酶由胞外结合配体结构域和一个单链跨膜蛋白结合域及胞质激酶结合结构域组成,其PTK活性受胞外结构域与配体结合的调节。配体与受体结合可诱导邻近的受体蛋白二聚化,使受体胞质区特异的酪氨酸残基相互磷酸化^[1]。

非受体酪氨酸激酶除有一般与受体酪氨酸激酶同源的约300氨基酸(有时可间断)激酶结构域序列外,还有受体酪氨酸激酶不具备的附加同源区。属于非受体酪氨酸激酶家族的src亚家族胞质酪氨酸激酶,以及许多PTK作用底物分子都存在一段称为src同源结构域(src homology domain, SH)序列。其中SH₁又称激酶催化结构域;SH₂由约100氨基酸残基构成,是含磷酸酪氨酸的蛋白特异结构的序列,其特异性由磷酸酪氨酸周围的氨基酸残基决定。src样激酶SH₂位置上的突变可以增减激酶活性;SH₃由约60个氨基酸残基组成,它涉及激酶定位在质膜胞质面或参与和细胞骨架蛋白的相互作用,与SH₂结合无关^[2]。许多PTK作用底物或相关蛋白分子,如磷脂酶C(phospholipase, PLCr)、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI₃激酶)、ras GTP酶活化蛋白(ras GTPase activating protein, ras GAP)、细胞骨架激酶、丝氨酸/苏氨酸胞质激酶和crk癌基因产物等也都发现存在着SH₂和SH₃结构域序列^[3]。

生长因子如PDGF与受体结合引起受体二聚体化,并激活受体酪氨酸蛋白激酶,从而导致受体几个位点自动磷酸化。PDGF受体与PP74[™]配体依赖性缔合作用是不通过SH₂结构域的,因PP74[™]不含SH结构域。推测PP74[™]与另一个酪氨酸磷酸化并带SH₂结构域的蛋白结合后再实现与PDGF受体的缔合作用,从而起到沟通PTK和丝氨酸/苏氨酸激酶信号网络的作用^[4]。当PDGF受体与靶分子缔合后,PI₃激酶、PLCr和ras GAP都明显增加酪氨酸磷酸化程度,而PP74[™]主要是增强对丝氨酸的磷酸化,酶磷酸化程度的增加一般能使酶活力增强。PDGF与受体相互作用的效应之一就是快速诱导磷脂酰肌醇的转换,释放游离的花生四烯酸,并形成新的花生酸包括前列腺素I₂和E₂^[5]。

游离花生四烯酸的早期释放,可能是由于磷脂酶A₂[PLA₂]和磷脂酶C的激活。对PDGF敏感的PLC/甘油二酯酶通路的激活导致磷脂酰肌醇的降解和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸[PIP₂]的分解,PIP₂的转换对于细胞进入S期和继续分裂是一个关键性的步骤。Matuoka等^[4]证明,抗PIP₂的单抗被微注射到经PDGF处理过的NIH3T3细胞的胞浆时,能够完全消除由正常PDGF诱导的³H-胸腺嘧啶掺入,表明PIP₂分解是PDGF促有丝分裂诱导细胞增殖的关键成分。PDGF对磷脂酰肌醇的合成也是早期的影响,接着花生四烯酸掺入到三酰基甘油,最后引起磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和三酰基甘油的合成。这说明PDGF在动脉粥样硬化发生发展中起重要作用^[7]。

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)与受体结合产生的信号转入到细胞核的过程已有许多报道,但仍不能就此提出FGF总的信号传导机理。现有的知识是通过研究多种细胞而来,但不知是否适用于其它细胞,不同的细胞在某种程度上采用不同的信号途径。已经提出了几条FGF致基因激活的信号1导通路:(a)诱导腺苷酸或鸟苷酸环化酶;(b)激活磷脂酶降解磷脂酰肌醇产生第二信使二酰基甘油和IP₃,然后激活蛋白激酶C和引起钙内流;(c)FGF受体与酪氨酸激酶有关^[8]。

对IGF-1受体信号转导机理知道不多。有人发现IGF-1能引起大鼠甲状腺细胞系中1,2-二酰基甘油含量增加54倍,若与促甲状腺激素(TSH)合用,可使DG含量增加189倍。TSH能使8-溴cAMP取代,提示与腺苷酸环化酶信号有交叉。然而IGF-1或TSH合用引起DG含量增加的速度并不快,提示此过程既是一个缓慢的酯水解过程,又可能是在转录水平上通过脂类合成酶进行调节^[9]。另外,人们发现百日咳毒素能抑制由IGF-1引起DNA合成及Ca²⁺内流,说明IGF-1生物效应中可能有G蛋白的参与^[10]。IGF-1受体自身磷酸化引起的生物反应信号可能有两种机制:一种是IGF-1诱导的受体自身磷酸化将引起受体构象的变化,使受体与其它膜成分或胞浆内第二信使相偶联,但信号传递并不伴随这些细胞组分的磷酸化。另一种可能机制是,IGF-1引起的受体酪氨酸激酶的活化会引起膜组分酪氨酸残基或第二信使的磷酸化,进而引起细胞一系列生化反应。

动脉粥样硬化及再狭窄动脉平滑肌细胞增殖中有PDGF、FGF和IGF受体的表达增加,这对于我们设计新的导向药物对As进行治疗提供了新的线索,也是我们在上文要介绍这三种生长因子信号转导途径的原

因。

1.2 靶向性药物

SH₂-磷酸酪氨酸相互作用的许多特点使其基于结构的药物设计(structure-based drug design, SBDD)具有特殊的吸引力:①小至5个氨基酸的磷酸肽即可在体外干扰这些结合性相互作用,结合位点的短小以及它是由一系列相邻氨基酸组成的特点使得肽模拟物的设计较为便利;②尽管这些相互作用的结合亲和力高,但其解离率也高,因而用肽模拟物去有效地竞争自然配体是可行的;③SH₂可作为可溶的、独立的区域来表达,而且它们容易形成用于结构分析所必需的晶体形式;④SH₂区域足够小,以至可用高分辨核磁共振进行分析。1981年根据ACE底物血管紧张素-I的化学结构设计出ACE活性部位模型合成了第一个口服有效的ACE抑制剂Captopril以来,14年中已有15种ACEI批准上市,正在研究的至少有78种。NO的亲核基团(Nucleophile)的加合物有良好的水溶性与稳定性,可释放NO产生舒张血管作用。这一新观点对研制有组织选择性的硝基扩血管药物,可望有优于传统的硝基扩血管药出现,有应用于冠心病、脑血管病的前景。血胆固醇过高已确定是动脉粥样硬化的重要致病因素。降低胆固醇的首要结果是改善血管内皮细胞功能,比其减轻血管堵塞更重要。在认识到-3-羟-甲基戊二酰酶A(HMG-CoA)还原酶是体内合成胆固醇的关键酶之后,就研制出化学结构与HMG-CoA相似的产物-洛瓦斯汀(lovastatin)为代表的系列降胆固醇药。这是根据对体内胆固醇合成规律的了解成功研制有效新药的一个范例。

2 靶向性基因治疗

不同的内源性蛋白或多肽,其分泌的方式不同,作用距离和范围也不同,如胰岛素、甲状腺素等激素类物质以内分泌方式作用于整个机体的各个器官组织。而PDGF、TGF、EGF、TNF、IL和CSF等对机体代谢重要调控作用的物质,主要以旁分泌或自分泌的方式在短距离内发挥局部调节作用;此外,许多治疗性蛋白质和多肽在体内半衰期短暂,如t-PA为6~8分钟,心钠素为2.5分钟;细胞因子的生物作用呈瞬时性。

对不同类型疾病的基因治疗同一般药物治疗一样,要求治疗物质到达机体的特定有效部位,而并非要求甚至需要杜绝全身性或系统性地分布。向细胞内导入目的基因,使其在细胞内获得有效的表达,产生出具有治疗效用的蛋白质或多肽,是基因治疗的最基本要素之一。

2.1 目的基因的制备

用于纠正靶细胞基因缺陷的外源基因称为目的基因。主要通过以下三种方法获得:①人工合成;②细胞分离;③对比较长、难于从细胞分离的基因,则先从组织细胞制备 mRNA,以 mRNA 为模板,经逆转录得到与 mRNA 互补的单链 cDNA,再经 DNA 聚合酶作用形成互补双链 cDNA,制成 cDNA 基因库,借助特异的探针筛选。热休克蛋白 70(hsp 70)在动脉粥样硬化发生发展有着重要的意义,我们运用逆转录获得目的基因 hsp 70 cDNA,随后构建了 hsp 70 cDNA 表达载体,在原核细胞中获得了高效表达^[11]。

2.2 受体介导的靶向性转基因在动脉粥样硬化治疗和研究中初露苗头

1992 年 Wilson^[12]采用受体介导靶向性转基因技术,从耳静脉将低密度脂蛋白受体基因转移到缺乏该受体的兔肝脏,持续 6 天后,明显降低了兔的血浆胆固醇含量,成为首例应用转基因技术获得具有临床治疗意义的效果。一例家族性高胆固醇症患者基因治疗的成功,极大地鼓舞了人们在动脉粥样硬化领域探索的信心。

对内皮素及其受体的研究已从生理学、细胞学和分子生物学等多种角度证实内皮素受体具有 3 种亚型,即 A 型、B 型和 C 型。其中 A、B 两型在机体内的分布具有显著的组织特异性;在血管平滑肌细胞大量存在 A 型受体兼少量 B 型受体,新近已合成出分别对 A、B 型受体具有高度选择性的多肽,称为 BQ₁₂₃(一种环状五肽)和 BQ₃₀₂₀(一种单链 16 肽)^[13~16]。有人把 BQ₁₂₃和 BQ₃₀₂₀与多聚赖氨酸以共价键相连建成靶向性携载体,经受体介导的方式将外源基因转移到血管平滑肌细胞和内皮细胞^[17,18],但应用到 As 的靶向性治疗尚有一定距离,需要进一步探索 As 斑块内皮细胞 B 型受体数目,这些受体数目与正常血管内皮细胞受体数目的差异等,以明确 B 型受体选择性的多肽 BQ₃₀₂₀与其它制剂相连接构建靶向性转基因是否具有特异性。

动脉粥样硬化斑块内的主要细胞成分为泡沫细胞,泡沫细胞的增殖与动脉粥样硬化发生发展密切相关。人 As 斑块内泡沫细胞有 PDGF-β 受体高表达,PDGF-α 受体反而下降,正常人或其它哺乳动物的大血管不表达 PDGF-β 受体^[19~25],由于 PDGF-β 受体的主要配基为 PDGF-BB^[22]。因此,选择 PDGF-β 与多聚赖氨酸以共价键相连构建靶向性携载体,经受体介导的方式将外源基因转移到泡沫细胞,对 As 的防治具有重要意义。

此外,动脉粥样硬化斑块内还有 bFGF、IGF 等受体的表达增加,可利用上述同样的方式对其实行基因

治疗。

2.3 目的基因导入靶细胞的方式

将目的基因高效地导入靶细胞内是基因治疗的重要步骤。转移外源基因的方法可分为两大类,即生物学方法和理化方法。生物学方法主要是利用载有目的基因的复制缺陷病毒感染细胞。常用的病毒有 RNA 病毒(逆转录病毒)及 DNA 病毒中的 SV₄₀、腺病毒等,其中逆转录病毒载体(retrovirus vector)应用最广,是基因转移时首选载体。理化方法也是基因转移的常用方法,与生物学方法相比,没有致病性,也排除了病毒感染的可能,其缺点是整合率低。

采用逆转录病毒载体携带目的基因进行基因治疗有独到的优点:转染效率高、对宿主细胞染色体整合率高,这使目的基因有可能获得长期、稳定地表达。Nabel 等^[23]用重组 β-半乳糖苷酶基因的逆转录病毒转染培养的血管内皮细胞,筛选出转染阳性细胞后,继续培养繁殖。随后,借助双球囊插管使血管内形成一段去内皮的封闭空间。把转有 β-半乳糖苷酶基因的内皮细胞注入这段血管,30 分钟后恢复血流。2~4 周后观察到植入的内皮细胞附着在血管腔面存活下来,而且能够表达 β-半乳糖苷酶基因产物。还有人以内皮细胞为靶细胞,将染有 β-半乳糖苷酶基因的内皮细胞培养在一种特殊的血管内移植上,使内皮细胞覆盖此移植体内侧面,以手术方式将其植入血管,与 Nabel 等收到同样的效果^[24]。Dicke 等^[25]针对动脉血管支架植入而引发狭窄问题,把重组的组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)基因转入内皮细胞,并在不锈钢血管支架上繁殖。植入血管后,支架上的内皮细胞可以合成并分泌 t-PA。这些实验对于易发生血栓和动脉粥样硬化的部位植入分泌性溶栓性蛋白防止血小板粘附,或抑制平滑肌细胞增殖等治疗性蛋白,对于局部血栓和再狭窄的防治都是很有意义的^[26]。

逆转录病毒载体有许多缺点:①对不同细胞的感染率差别很大(最高达 90%,低的为 20%以下);②插入目的基因容量有限,转移外源基因的长度约 7 kb,致使许多要求足够大的调控序列的基因无法转移和表达;③逆转录病毒对宿主细胞染色体的整合要求宿主细胞 DNA 处于可复制状态,处于 G₀ 和 G₁ 期静止状态的靶细胞不能被逆转病毒感染,只有当细胞进入 G₁ 后期或 S 期,逆转录病毒的感染才可以实现^[27];④逆转录病毒载体与辅助病毒重组可能成为具有完整复合能力的致病性病毒;⑤纯化不易,存在被复制型逆转录病毒污染的机会,具有潜在的致病性。人们设想,能否不用逆转录病毒载体,将目的基因导入靶细胞内,目前靶

向脂质体^[18]及配基-多价阳离子聚合物^[28]携带基因靶向转移取得了令人振奋的结果。

2.4 反义寡核苷酸技术

大量资料表明:动脉粥样硬化、血管成形后再狭窄和高血压发病中都有细胞增殖和迁移。而细胞增殖和迁移受基因的调控。利用反义(antisense)寡脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotides, ODN)技术,导入与靶基因互补的核苷酸片段,以抑制靶基因的高表达,可抑制细胞增殖^[30]。

2.4.1 反义寡核苷酸的种类 研究证实,寡核苷酸具有不同程度的调控基因表达的作用。①依据与靶基因序列互补性的差异可分为反义(互补)寡核苷酸或同义寡核苷酸、随机序列寡核苷酸及重复序列寡核苷酸。②根据碱基戊糖之间的立体构型,可分为 α -寡核苷酸(α -ODN)和 β -寡核苷酸(β -ODN)。③根据核苷磷酸二酯链上羟基被取代或修饰不同,可分为正常寡(脱氧)核苷酸(ODN)、寡核苷酸的甲基磷酸类似物(M-ODN)、硫代寡核苷酸(S-ODN)、寡核苷酸的乙氧基取代物(OEt-ODN)。④根据 ODN 末端修饰物不同,又形成不同特性的 ODN。如 ODN 末端可连接吡啶衍生物、乙酰基、补骨脂类、EDTA 铁等。⑤根据戊糖上脱氧数目不同,可形成脱氧寡核苷酸、双脱氧寡核苷酸等。

2.4.2 反义 ODN 的设计策略 从目前对平滑肌细胞(SMC)和内皮细胞的研究结果来看,ODN 的设计包括 6 个方面:靶序列的选择、特异性、通透性、亲合性、稳定性和对照。一般选择 mRNA 翻译起始区作为靶序列来设计 ODN。对于有突变的癌基因来讲,选择突变位点作为靶部位设计更为有效。Biro 等^[31]设计了一组实验,反义 c-myc ODN 长度为 15 或 18 个碱基,发现 mRNA 翻译起始区作为反义 ODN 可明显抑制 SMC 的增殖。

在特异性方面,为避免 ODN 与非靶序列的杂交,根据基因组碱基对推算并结合杂交稳定性和亲合性考虑。从杂交链的稳定性来讲,ODN 越长越好,但过长时又不易通过胞膜,而且与非靶序列结合机率增加,会引起非特异性抑制作用。从 ODN 自身稳定性、通透性考虑,最好对 ODN 进行修饰。从与杂交链亲合性方面考虑,由于 GC 之间的亲合力比 AU 之间的亲合力大,因此,增加针对 GC 的靶序列的碱基在 ODN 的比例,可增加其杂交亲合性,适当减少 ODN 的长度。ODN 实验需要严格的对照才能明确其是否具有特异抑制效应及是否存在副作用。一般以正义链(sense)作对照,更为严格的对照,可以使用 missense 和 reverse antisense,二者核苷组成与反义链完全一致,在 missense 其核苷

顺序完全打乱,而在 reverse antisense 其顺序完全颠倒。

近年用反义 ODN 对哺乳类动物 mRNA 翻译特异性的抑制已取得了重要进展^[32],但是在反义 ODN 运用于临床试验以前,须满足以下 6 条标准:①ODN 能容易且可大量合成;②在体内保持稳定;③能进入靶细胞;④能与细胞的靶结构(cellular targets)如 DNA 或 mRNA 相互作用;⑤能保持在靶细胞内;⑥不会以非特异性方式和其他大分子结合。硫代修饰的 ODN 能满足上述一些标准,且在病毒复制抑制方面显示了较好的前景。

2.4.3 干预细胞生长因子的反义 ODN 当 SMC 或内皮细胞受到刺激或接受某种信号后,可表达多种生长因子和细胞因子如 PDGF、bFGF、aFGF、IL-1、IL-6、IGF-1、IGF-2 等,生长因子与受体结合是细胞生长增殖信号传递的第一步。生长因子和受体结合可使细胞内蛋白质磷酸化,而后通过一系列过程将增殖信号传入核内,从而促进 SMC 或内皮细胞增殖。因此,人们试图用反义 ODN 来抑制生长因子的作用,以阻抑 SMC 或内皮细胞增殖。内皮细胞的迁移和增殖在各种血管病变中起重要作用。Itoch 等为了检查内源性 bFGF 作用,将与 bFGF mRNA 互补的反义 ODN 导入培养的牛主动脉内皮细胞中,用 ODN 处理后,能有效地抑制 bFGF 的合成,且抑制了内皮细胞的增殖。说明 bFGF 在内皮生长中起重要作用。

生长因子与受体的结合是在一些活性多肽如血管紧张素 I(angiotensin I, Ang I)作用下诱导发生的。已经证明 Ang I 有双向调节 SMC 增殖的作用。一方面可以通过促进 Ang I PDGF-A 链和 bFGF mRNA 的表达,进而促进细胞增殖。另一方面若阻断 Ang I 诱导 TGF- β 表达,则 SMC 中 DNA 合成增加,说明 Ang I 的抗增殖作用是通过促进 TGF- β 这条途径来实现的。为研究 Ang I 促增殖或抗增殖途径,Itoch 等^[33]用反义 bFGF、PDGF-A 和 TGF- β ODN 导入 SMC,并用 Ang I 诱导 SMC 增殖。反义 TGF- β ODN 使用后可以观察到 Ang I 促增殖效应明显加强,而反义 bFGF ODN 作用后则 Ang I 促增殖效应明显减弱。转染反义 PDGF-A ODN 的 SMC 对 Ang I 的反应无明显变化。上述结果说明 Ang I 促 SMC 增殖作用是由 bFGF 介导的。Ang I 对 SMC 的最终效应是 TGF- β 介导的抗增殖和 bFGF 介导的促增殖两种作用的综合效应。两种作用在正常 SMC 中是保持平衡关系的,在某种因素刺激下关系失衡就会引起 SMC 的异常增殖。

在 As、再狭窄和高血压发生发展中, SMC 的增殖有多种基因的协同作用, 同时也有些基因起主要作用, 如何确定哪一种基因起主要作用, Itoch 的实验为上述病变的相关基因筛选提供了新的思路。

2.4.4 干预 PCNA 的反义 ODN 生长因子或细胞因子对 SMC 增殖的影响不可能单独起作用, 它是一种通过细胞相互作用的网络系统, 如一种因子的释放可作用于其靶细胞引起另一因子的释放, 并且还可以通过旁分泌途径使其相邻近自身细胞分泌活性因子, 并可激活或抑制 SMC 的作用。同时也上行或下行调节 SMC 的受体, 通过信号传递促进或抑制 SMC 的增殖。不过这种促进或抑制作用可以汇集在细胞周期的 Go/S 交界处, 而且有一个共同的促进或抑制细胞 DNA 复制的机制。PCNA 是 DNA 聚合酶 δ 的辅因子, 在促进细胞周期进入 S 期、促进 DNA 合成方面起作用。Jaskulsk 等合成 4 个 18-merODN, 第 1 个序列为 PCNA 的 4 至 21 个核苷酸, 第 3 个序列为 22 至 39 个核苷酸, 第 2 和第 4 序列分别是第 1 和 3 和反义互补序列, 用上述 4 个 ODN 分别导入互补序列, 可明显地抑制细胞增殖。Speir 等合成上述 4 种 ODN 经化学修饰后导入鼠主动脉 SMC, 反义 ODN 能抑制 SMC 增殖 (50%) 和减少其 DNA 的复制, 呈剂量一效应关系。经 Western 杂交和免疫组化显示反义 ODN 能减少 PCNA 的表达, 说明 PCNA 是 SMC 的细胞周期及分裂过程中所必须的, 同时也是 DNA 复制所必须的。

2.4.5 干预细胞癌基因的反义 ODN c-myc 和鸡的髓母细胞增生症病毒的转化基因是同源, 对 SMC 生长起重要作用。该基因依赖细胞生长而表达, 静止细胞中表达水平低, 增生细胞迅速增加, 到 G1 晚期达顶点。对血清不能立即反应, 细胞呈指数增殖时才有基因表达, 即转录后才起始调控。Simons 等^[34]用 SV40T 转化鼠主动脉 SMC, 用反义 ODN (GTGTCGGGTCTCCGGC) 和含有两个错配的反义 ODN (GTGTCGGGTCTTCGGC, 前者和小鼠 c-myc 4~22 对核苷酸互补) 加入培养的 SMC 中, 发现反义 ODN 只对游离的增殖 SMC 产生抑制。反义 c-myc ODN 是通过抑制细胞进入 S 期达到抑制细胞增殖效应的。

在建立细胞模型的基础上, Simons 等^[35]用球囊导管损伤鼠冠状动脉, 同时用反义和正义 myb ODN 导入损伤处。结果发现导入反义 myb ODN 的血管未能检测到 c-myc mRNA 的表达, 并且内膜 SMC 增殖明显降低。

Brown 等从小牛 SMC 文库中克隆了 1.5 kb c-

myb, 分别与人和小鼠 c-myc 有 89% 和 85% 同源。运用小牛和小鼠 c-myc 基因, 检测到 SMC 增殖过程中 c-myc 基因转录速率和 mRNA 的稳定性无变化。因此 SMC 中 c-myc mRNA 变化调节与白细胞或成纤维细胞不同。用 myb 基因与胸苷激酶启动子或氯霉素乙酰转移酶启动子连接再转染到培养的 SMC 中, 有明显的促 SMC 增殖作用。用反义 myb ODN (5'-GTTTGT-GCTTCAGAAATGT-3' 或 5'-GGGGTCTCCGGG-CCAT-3') 明显地抑制细胞进入 S 期, 仅 30% 的 SMC 复制 DNA。我们用合成的正义和反义 c-myc 18-mer 分别导向培养的大鼠主动脉 (SMC), 同时用内皮素诱导 SMC 增殖。反义 c-myc 寡核苷酸对内皮素诱导 SMC 增殖有明显的抑制作用, 其抑制作用随浓度 ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的增加而增加。用 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 反义 ODN 抗细胞增殖能力随时间延长而下降。免疫组化显示受抑制细胞 myb 水平较同期对照组或正义 ODN 拮抗组低。这为反义 ODN 抑制生长因子或细胞因子诱导靶基因的高表达和细胞增殖提供了新的线索^[36]。

c-myc 基因是即刻早期基因 (immediate early gene), 它可被许多致分裂因子诱导表达, 其编码产物是一种转录因子, 在核内起调控其它基因表达的作用。我们曾观察到人动脉粥样硬化斑块组织中有 c-myc 的表达增加, 而这种表达增加是与 SMC 内合成型细胞器如高尔基体、粗面内质网和线粒体增加有关^[37-39], 说明 c-myc 基因表达异常参与 SMC 表型转变和细胞增殖。Biro 等用长度为 15 或 18-mer 的反义 ODN 能明显地抑制 SMC 增殖和迁移。

生长因子 (如 PDGF) 能促进即刻早期基因的表达, 而即刻早期基因表达产物可通过长时程的基因表达 (如 hsp 70) 来促使细胞增殖。目前研究比较深入的是 myc 和 hsp 70 的关系。各种病毒蛋白和核内癌基因产物可通过与特异序列的结合来调节细胞基因转录。腺病毒、SV40、多瘤病毒、腺病毒 Ela 产物可激活 hsp 70 表达。c-myc 蛋白质一些氨基酸序列与 Ela 相似, 它们可能有相似的可能。c-myc 蛋白还可与 hsp 70 基因上游特异序列相结合, 起着细胞内 DNA 复制起始 (ori) 和转录增强子的作用。另一方面, hsp 70 的表达可受血清刺激因子诱导。这种作用可由 cytosin araboside (一种 DNA 合成抑制剂) 所阻断。Kingston 等从鼠浆细胞瘤分离的 myc 有转录激活作用, 同时又将编码果蝇 hsp 70 启动子区域连接到二氢乙酸还原酶 (DHFR) 或氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 基因, 共同转染 CHO 细胞, myc 基因产物能促进 hsp 70 基因的表达^[40]。我们用内

皮素加入 SMC, 能促进斑块内 SMC 的增殖和 hsp 70 转录, 用反义 myc ODN 导入 SMC 中, 则可抑制斑块内 SMC 的增殖、c-myc 蛋白表达和 hsp 70 的转录, 说明 myc 蛋白有促进 DNA 转录活性, 可促进 hsp 70 的表达。hsp 70 为“分子伴侣”, 通过蛋白运输而参与增殖, 因此, 加入反义 myc ODN 后, 平滑肌细胞内 myc 蛋白表达下降, 对 hsp 70 基因转录的激活降低, 从而细胞增殖速度下降, 推论 myc 基因表达产物促细胞增殖作用与 hsp 70 的表达有关^[41, 42]。

Evans 等^[43]构建了 pRmb3SVneo(A) 表达载体和 pM(Bg)CAT 融合质粒, pRmb3SVneo 含有鸡肉瘤病毒末端重复序列和整个 c-myc 编码蛋白的序列, pM(Bg)CAT 含有 c-myc 5' 端序列(1.7 kb c-myc 启动子区域)。将 pRmb3SVneo 导入小鼠 CTLL-2T 细胞株中, 结果发现 c-myc 基因的表达明显增加, 将 pM(Bg)CAT 和 pRmb3SVneo 共同转染 CTLL-2T 细胞株, 可使 CAT 活性增加 10.65 倍, 且 c-Myb 能激活 1.7 kb 的 c-myc 启动子区域, 此区域含有 1 拷贝 c-myc 识别位点 CpyAAC(G/T)T。我们用反义 myb ODN 导入内皮素诱导的 SMC 中, 结果发现 Myc 蛋白表达下降, 同时抑制 Myb 的表达, 说明 Myb 蛋白具有激活 Myc 表达的作用。将反义 myc 和反义 myb ODN 同时加入内皮素诱导的 SMC 中, 则抑制细胞增殖和 Myc 蛋白表达的作用较单独使用反义 myc ODN 或反义 myb ODN 作用强, 说明反义 myb 和反义 myc ODN 有协同作用^[36, 44]。

c-fos 基因也属即刻早期基因, 在刺激细胞从静止到增殖时有暂时的表达, 但进入细胞周期后即无变化。我们用球囊导管扩张兔髂动脉, 30 min 开始表达 c-fos 基因, 90 min 达高峰, 120 min 又开始下降, 说明扩张的动脉粥样硬化斑块组织中有 c-fos 基因的一过性表达^[45, 46]。因此也有人用反义 c-fos ODN(5'-TTGAAC-CCGAACATCAT-3')来抑制动脉内皮细胞增殖^[47]。

由此可见, 反义癌基因 ODN 为基因表达调控提供了方便的手段, 它不需改变基因结构, 就能分析简单或复杂生物体内癌基因的功能。通过向细胞或组织中导入反义癌基因 ODN, 就可阻止相应基因的表达, 从而可以研究这些基因在对动脉粥样硬化、再狭窄和高血压发生中的意义。值得一提的是, Rosenberg 将反义 c-myc 硫代磷酸 ODN 用于内皮拉伤大鼠颈动脉, SMC 增殖受到了抑制, 用兔髂动脉作血管形成术后两个小时, 再以反义制剂处理, 也见到 SMC 生长有明显减慢, She Yi 等用球囊导管介导反义 c-myc ODN 能明显减少猪内皮剥脱后新生内膜的形成^[48], 在体实验说明反

义癌基因在抑制血管增生性病变具有广阔的前景。

2.4.6 干预细胞骨架蛋白的反义 ODN 动脉内膜下 SMC 增殖是动脉粥样硬化和再狭窄病变的主要特征之一。增殖的 SMC 可发生表型转变, 即由收缩型转变成合成型。收缩型 SMC 富含肌丝, 合成型 SMC 则可出现大量的内质网和发达的高尔基体^[49, 50]。正常情况下, SMC 呈收缩表型, 其特点是收缩型蛋白包括 actin 和 myosin 富集, 不论在体外或体内生长因子都可使失去分化状态, 细胞合成的大量内质网进而合成细胞外基质, 并表达新的蛋白如非肌肉 myosin、actins 和 α -actin。非肌肉型 myosin 是 myosin 家族中目前了解最少的一种, 它涉及到各种不同的细胞分裂、分泌和覆盖, 非肌肉型 myosin 若失去了特异的 myosin 异型时, 其细胞分裂的能力即丧失。目前已克隆出两种人的非肌肉 myosin 重链异型(NMMHC-A 和 NMMHC-B)。在正常组织中只表达一种异型(A 型), 但不同组织表达程度不同, NMMHC-B 存在于受损的兔颈动脉增生的 SMC 和人 As 斑块(正常没有)的 SMC 中, Simons 等合成反义 NMMHC ODNs(CATGTCCTCCAC-CTTGGA), 与人 NMMHC-A232~252 对核苷酸互补, 是非肌肉 myosin 序列同源区最接近的地方, 与人的 NMMHC-B 有一个核苷酸不同, 与鸡 NMMHC-A 和 NMMHC 有两个核苷酸不同。将反义 NMMHC ODN 导入大鼠动脉 SMC, 发现反义 ODN 可阻止 SMC 增殖。除了上述针对靶基因的反义寡核苷酸抑制动脉平滑肌细胞增殖以外, Abe 等^[51]的用反义 cdc2 和 cdk2 的 ODN 也能明显地抑制大鼠冠脉内皮剥脱后的平滑肌细胞增殖。

2.4.7 ODN 的靶向给药 寡核苷酸的结构修饰仍存在问题, 如易被体液或培养液中酶降解; 当水溶性增加, 脂溶性降低时, 细胞难以摄取, 缺乏靶细胞选择性等。势必造成药物的浪费和作用的降低, 以及产生非特异性抑制。为克服上述不足, 可用抗体介导的脂质体包装来解决。Milhaud 最早应用表面交联有蛋白 A 的脂质体 poly(rc)poly(n), 然后再连接针对靶细胞的单克隆抗体, 由此制得既能与靶细胞特异性结合, 又能以活性形式释放 poly(rc)poly(n) 的靶向脂质体。经 L929 细胞研究表明, 在相同条件下, 脂质体 poly(rc)poly(n) 的使用浓度至少要比未包装 ODN 低 3 个数量级。用抗体介导的脂质体反义 ODN 具有双重选择性: ①脂质体上单克隆抗体可以选择性结合于靶细胞上, 从而将药物以活性形式导入靶细胞, 而不影响或损伤其它细胞; ②特异性的反义 ODN 可选择性地封闭靶基因表达, 而不影响宿主细胞基因的表达及细胞增殖, 为

动脉粥样硬化靶向治疗的理想方法之一。

2.4.8 ODN 的毒副作用、存在问题和应用 ODN 中除嘧啶类衍生物交联体及 S-ODN 对体外细胞系统可产生轻微非特异性抑制外,大多数 ODN 对宿主细胞表达几乎无任何影响。但目前仍存在问题,①ODN 体内应用的药效学研究尚资料不足,多数研究停留在体外细胞培养系统;②ODN 体内应用虽无急性毒作用,但是否有慢性毒作用,长期应用有无致突变、致畸等作用尚需深入研究;③目前是对单一基因封闭的研究,而动脉粥样硬化是多基因遗传病,对数个关键基因的同步封闭是否有效,须深入探索;④动脉粥样硬化的发病是慢长的过程,可能涉及到较长时间的给药,ODN 对这种慢性病的作用有待进一步研究。

2.5 转基因动物

脂蛋白运输、脂蛋白表达和纤溶等异常与 As 的发生和发展密切相关。1979 年首次将外源基因导入小鼠胚胎获得了成功,1981 年建立了世界上第一个转基因动物模型^[52]。针对某一基因表达异常,导入某一正常的基因,替代其功能缺陷,建立转基因动物模型,已经成为在分子水平上认识 As 发病机理的有力工具,更是目前 As 基因治疗研究的很有价值的动物模型^[53]。

2.5.1 载脂蛋白基因 载脂蛋白 E 为 LDL 和乳糜微粒受体的配体,在清除血浆脂蛋白颗粒方面起重要作用。起初有人用 E 基因 5'端序列(缺乏肝调控元件)转小鼠,发现 E 表达低,对脂蛋白水平没有明显的影响^[54,55]。将金属硫蛋白(metallothionein)启动子与鼠 E 基因连接,通过锌(Zn^{2+})诱导, E 增加 4 倍, VLDL 和 LDL 明显减低, VLDL 和 LDL 清除速度增加 7 倍,对饮食诱导的高胆固醇血症有阻抗^[56]。Simonet 等^[57]用转载脂蛋白基因动物研究了基因的表达和调控。他们发现:仅 650 bp 的 5'端序列足以使其在睾丸和肾脏表达;载脂蛋白 E 和 C_{II} 基因是连锁的,两基因间存在着决定脑和皮肤特异表达的序列和抑制肾脏表达的序列。他们^[57]还发现:两基因在肝中表达需要顺式作用元件,即肝调控区,其长度为 2 kb,位于载脂蛋白 E 启动子下游约 8 kb, C_{II} 启动子下游 9 kb,将 2 kb 的肝调控区插入人载脂蛋白 E 基因邻近区域,转基因在肝中表达高,肾脏表达其次,并分泌大量转人载脂蛋白 E(为正常血浆水平的 4~5 倍)至血浆中。

载脂蛋白 E-leiden 和 E(cys-142)与人 III 型高脂蛋白血症显性传递(dominant transmission)有关。Fazio 等^[58]建立了转人载脂蛋白 E-leiden 和载脂蛋白 E(cys-142)缺陷突变体基因鼠。在转基因鼠中,人转基因产物载脂蛋白 E 仅产生于肾脏,而内源性鼠载脂蛋白 E 主

要产生于肝脏,血浆中转基因蛋白的浓度为内源性载脂蛋白 E 的两倍。这种模型的建立,将有利于研究遗传因素和环境因素对 III 型高脂蛋白血症基因表达影响。

A_{II} 构成总 HDL 蛋白 70%。在转基因小鼠和大鼠中, A_{II} 过量表达能选择性增加 HDL 胆固醇酯的水平^[59]。这与人类的研究结果相一致, HDL 胆固醇酯水平与 A_{II} 呈正相关。有人用高脂饮食喂养转人 A_{II} 基因小鼠,血浆中 HDL 胆固醇酯和 A_{II} 水平提高,主要代谢影响是增加 HDL 胆固醇酯和 A_{II} 的转运速率。而无 A_{II} mRNA 水平的增加;相反, probucol 能减少 HDL 胆固醇酯和 A_{II} 水平, HDL 胆固醇酯代谢速率增加,但 A_{II} 转运速度下降,也无 A_{II} mRNA 水平的变化。因此, A_{II} 水平的变化可能由转录后调节的。

O'Connell 等^[60]用转基因动物研究了载脂蛋白 A_{II} 和载脂蛋白 C_{II} 的转录调控。他们将 5'端 5 kb 至载脂蛋白 A_{II} 转录起始点 250 bp 上游的人载脂蛋白 A_{II} 基因导入小鼠,此外源基因仅在肝脏表达 mRNA,而不是在小肠表达,用显微注射法将载脂蛋白 A_{II} 和 C_{II} 基因(载脂蛋白 A_{II} 启动子 300 bp 至载脂蛋白 C_{II} 启动子上游-2.4 kb)注入小鼠后,小肠产生 A_{II} 和 C_{II} mRNA。作者认为决定小肠表达的信号位于载脂蛋白 C_{II} 启动子下游 2.4 kb;在 1.4 至 2.3 kb 的载脂蛋白 C_{II} 启动子之间的 1 kb 区域为决定载脂蛋白 A_{II} 和 C_{II} 在小肠表达的序列。

在含人载脂蛋白 A_{II} 的转基因鼠血浆中,发现的 90% 载脂蛋白 A_{II} 是人的而非鼠的,通过非变性梯度凝胶电泳显示,对照鼠的血浆中 HDL 主要是由单一的直径为 10.2 nm 的颗粒组成,而转基因鼠则由 11.4、10.2 和 8.7 nm 三种颗粒组成,分别与人 HDL₁、HDL₂ 和 HDL₃ 相对应。另外采用 [3H]-胆固醇亚油酸酯和 [^{125}I]-载脂蛋白 A_{II} 进行体内转换研究,发现对照组中存在选择性摄取 HDL 胆固醇的途径,说明载脂蛋白 A_{II} 一级结构对 HDL 颗粒大小分布及代谢有重大影响^[61]。

Heyek 等^[62]将转人载脂蛋白 A_{II} 基因小鼠(HuAITg)与转人胆固醇酯转运蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)基因小鼠(HuCETPTg)杂交得到一新品系(HuAICETPTg),在缺锌时, HDL 胆固醇酯减少 40%;给 HuAICETPTg 补锌后,用 3H 胆固醇标记 HDL 发现:HuAICETPTg 鼠比 HuAITg 鼠的 HDL 胆固醇酯清除率加快,同时前者 CETP 与 HDL 的结合也增加。最近, A_{II} 基因小鼠已经建立,并发现其 HDL 胆固醇酯水平下降^[63]。转 A_{II} 基因和缺 A_{II} 基因小鼠模型的建立将有助于饮食或药物对 HDL 胆固醇酯和 A_{II} 影响的研究,有助于 A_{II} 基因表达调控的研究。

人们曾设想,含有载脂蛋白 A₁ 和 A₂ 的高密度脂蛋白与只含载脂蛋白 A₁ 不含 A₂ 的 HDL 有不同的生理特性,为了阐明这些含有特异载脂蛋白的 HDL 在动脉粥样硬化发生中的作用,通过转基因的研究,分别产生人类的载脂蛋白 A₁ 和 A₁/A₂ 两种类型,结果发现这两组动物血清总 HDL 颗粒内和非 HDL 颗粒内胆固醇含量相似,转基因小鼠产生的 AI 及 AI/A₂ 两种 HDL 颗粒中载脂蛋白的含量不同,造成 HDL 组成成分不同。由此分别建立了既含 A₁ 又含 A₂ 的脂蛋白及只含 A₁ 不含 A₂ 的脂蛋白两种转基因小鼠亚群的动物模型。给予诱发动脉粥样硬化性损伤的程度进行分析中发现,含有 A₁/A₂ 的小鼠对膳食诱发动脉粥样硬化的易感性是只含 A₁ 小鼠的 15 倍,表明只 A₁ 不含 A₂ 的脂蛋白在防止小鼠动脉粥样硬化的发生上比既含 A₁ 又含 A₂ 的脂蛋白有更为显著的效应^[67]。

载脂蛋白 A₁ 转基因鼠已获表达,由于载脂蛋白 A₁ 是血浆中 HDL 的主要蛋白成分,它可以活化卵磷脂-胆固醇酰基转移酶,在反向胆固醇运输中载脂蛋白 A₁ 和 HDL 起重要作用,载脂蛋白 A₁ 和 HDL 的水平与动脉粥样硬化呈负相关,因此,利用转基因动物进行基因调控研究将有利于该病阐明和防治。

现已建立了几种转 C₃ 基因小鼠的模型。转入 C₃ 单拷贝基因后,小鼠血浆中 C₃ 增加 30%~40%,甘油三酯增加二倍多。其脂蛋白特征是,VLDL 颗粒较正常大,富含甘油三酯,且有脂蛋白成分改变,即 C₃ 增加,E 减少,游离脂肪酸增加。生物化学代谢显示,VLDL 分解速率下降。因此推论高甘油三酯血症似乎是延长了 VLDL 代谢时间。上述结果还提示,转 C₃ 基因小鼠可能为原发性高甘油三酯血症理想的动物模型^[64]。

载脂蛋白(a)是一种大分子糖蛋白,它以单个二硫键和载脂蛋白 B₁₀₀ 共价结合形成脂蛋白(a)。Kratz 等发现人载脂蛋白和纤维蛋白溶酶原(plasminogen, Pg)的氨基酸顺序及其 DNA 结构高度相似。后来,Maruyama 等又证实人载脂蛋白(a)基因和 PG 基因共存于第 6 号染色体 q24-q27 区。载脂蛋白(a)结构成分包括丝氨酸蛋白酶样结构区、kringle 样结构区(Kringle-like domains)和糖类成分。小鼠并不表达载脂蛋白(a),用人的 17 Kringle N、Kringler-和编码蛋白酶区段与 transferrin 启动子连接,转入小鼠后发现,载脂蛋白(a)仅在肝中表达。且载脂蛋白(a)无脂蛋白成分(lipoprotein-free fraction)^[65]。载脂蛋白(a)与动脉粥样硬化发生的关系比较密切,转载脂蛋白(a)基因小鼠的建立对阐明其发生机理有重要意义。

Rehnborg 等于 1964 年首次报道血浆脂蛋白之间

存在着胆固醇酯(cholesterol ester, CE)净转移现象。Zilversmit 于 1975 年首次发现血浆有一种特殊转运蛋白促进血浆脂蛋白之间的 CE 和甘油三酯转运和交换,称之为胆固醇酯转运蛋白(CETP)。小鼠血浆中缺乏 CETP 活性。将人 CETP 微基因(minigene)与鼠金属硫蛋白 I 启动子连接,转小鼠后血浆中有似人 CETP 活性;补锌后活性成倍增加,HDL 胆固醇酯和 A₁ 分别减少 35%~24%。将转人 CETP 基因小鼠与转人 A₁ 基因小鼠交配的子代与单独转人 A₁ 基因比较发现,补锌后,前者 HDL 胆固醇酯和 A₁ 水平显著下降^[64]。因此 CETP 过量表达能减少 HDL 胆固醇酯的水平。

CETP 存在种系差别,大鼠、小鼠、豚鼠、狗、羊和牛等 CETP 活性低,而兔、猴和人具有高活性 CETP。因此,也有人用猴 CETP cDNA 与鼠的金属硫蛋白启动子连接,转小鼠后 CETP 表达水平显著增加,且 CETP 活性与 HDL 胆固醇酯和 A₁ 水平呈明显反向关系。上述转 CETP 基因小鼠模型为胆固醇的逆向转运和动脉粥样硬化的研究开辟新的途径。

低密度脂蛋白受体位于细胞膜表面,以共价键和载脂蛋白 B 和 E 呈高度特异性结合,通过脂蛋白颗粒表面 B 和 E 识别,介导脂蛋白清除。将人 LDL 受体基因 cDNA 与小鼠金属硫蛋白 I 启动子连接导入转基因鼠中,通过重金属诱导后,清除 LDL 较对照组高 8~10 倍,且血浆中 LDL 受体配基 B 和 E 下降 90%以上^[64]。用人的 LDL 微基因与 transferrin 启动子连接,转基因小鼠中 LDL 受体水平持续增加。用高脂和高胆固醇喂养转基因鼠,并不增加 IDL 或 LDL 水平,VLDL 水平仅有轻度增加,而对照组小鼠三种脂蛋白成分均增加。

此外,转 uPA 和 PAI-I 的基因动物模型也已建立,但转 uPA 基因动物易出现自发性肠内和腹腔内出血,转 PAI-I 基因引起静脉闭塞。转入小鼠体内的某些癌基因,可引起心血管病变,如 SV₄₀Fag/ANF 引起动脉瘤,fp5 使心肌细胞纤维化和肥大,v-myc 使心肌纤维增生等^[66]。

2.5.2 缺基因动物 近年来,基因打靶技术与转染胚胎干细胞技术结合,将内源基因敲掉(knock out)建立的“缺基因”动物,在基因治疗和认识基因致病机理中得到广泛应用。

用缺基因小鼠方法使载脂蛋白基因的两个拷贝均失活。这种小鼠血液胆固醇水平极度升高(4.34~4.95 g·L⁻¹),野生型小鼠只有 0.60~0.86 g·L⁻¹;这是由于正常依赖载脂蛋白 E 受体介导的残粒脂蛋白清除机制受损所致。更有趣的是,载脂蛋白变异体小鼠失去了它们在正常情况下抗胆固醇的能力。当给予一种模拟

正常美国人胆固醇和饱和脂肪摄入量饮食时,其血液胆固醇水平迅速增高至 $18.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,并在 3 个月内即可产生严重的动脉粥样硬化,甚至在饮食中不含胆固醇,也可观察轻度的动脉粥样硬化。一只食无脂肪饮食的该种小鼠,8 个月时冠状动脉腔似乎完全堵塞。这些结果说明:鼠和其它啮齿动物,所以具有抗胆固醇诱导的动脉粥样硬化的能力,是因为它们能有效地利用载脂蛋白 E 来清除血液中富含胆固醇的脂蛋白。当这种清除作用被阻断时,小鼠和人一样,就变得易患动脉粥样硬化^[67,68]。上述实验还提示:①如果通过交叉繁殖实验,将载脂蛋白 E 变异体小鼠的遗传缺陷引入纯种的近亲繁殖系小鼠,以鉴定出尽管载脂蛋白 E 缺陷,但对饮食胆固醇引起高胆固醇血症的反应性仍呈减弱的品系,那么就有可能通过连锁分析定位出降低胆固醇的保护基因;②将载脂蛋白 E 变异体小鼠与其它系小鼠交配,然后对那些虽具有高水平血浆胆固醇,但却不发生动脉粥样硬化的子代进行连锁分析,就能鉴定出动脉粥样硬化的易感基因。

将 neo 基因插入到载体的 LDLR 基因的 4 个外显子中,并在打靶载体的短臂 3' 末端接上 2 个拷贝的 HSV-TK 基因。重组后的载体替换了胚胎干细胞内源性 LDLR 基因。转染后的细胞经 G418 和 GANC 选择,并经 PCR 和 Southern 印迹法确定。经过同源重组的细胞转入胚胎中,结果产生了 17 个嵌合动物,其中 13 个的后代携带了被破坏的等位基因。新生的 LDLR^{-/-}小鼠,体内中密度脂蛋白(IDL)和低密度脂蛋白(LDL)水平提高了 7~9 倍,致使小鼠血浆中胆固醇的水平较野生型小鼠高两倍,但高密度脂蛋白(HDL)和甘油三酯的水平维持正常^[55]。

此外,缺 N-myc 基因小鼠(纯合子)在发育的第 10~12 天死亡,其心脏发育严重受阻,发育第 11 天的心脏只相当于正常发育第 9 天的心脏^[70]。

3 基因重组免疫毒素

早在本世纪初 Ehrlich 就提出“双功能治疗剂”的概念,他设想的“魔弹”由“结合簇”和“毒性簇”构成。虽具有特异性杀伤作用,但不损伤正常组织细胞。1968 年 Moolen 等用抗腮腺炎病毒多克隆抗体与白喉毒素连接制成免疫毒素,特别是单克隆抗体问世以后,免疫毒素的研制迅速发展。但是,通过常规化学连接载体和毒素所制备的免疫毒素,稳定性和渗透性差,原料消耗大,而且制备过程复杂。随着分子生物学技术的应用,采用基因重组技术,连接载体和毒素基因并进行表达,获得基因重组免疫毒素,有效地避免了上述缺点,在动脉粥样硬化和再狭窄等方面显示出初步的应用前

景^[28]。

3.1 毒素

目前常用的毒素分二类:①植物毒素,包括蓖麻籽毒素(RT)、相思子毒素(abrin)、商陆抗病毒蛋白(pokeweed anti-viral protein, PAP)、gelonin 等;②细菌毒素,包括白喉类毒素(DT)、绿脓杆菌外毒素(PE)等。用于制备免疫毒素的主要是细菌毒素。随着分子生物学的发展和应用,对毒素蛋白特别是对 PE 的结构和功能有了深入的认识,在 As 研究中初步得到应用。

绿脓杆菌外毒素(PE)分为三个功能区:Ⅰ区系氨基末端区,由 1~252 号氨基酸组成,与易感细胞识别有关;Ⅱ区是中央区,包括 253~404 号氨基酸,与 PE “跨膜移位”有关;Ⅲ区是羧基末端区,由 405~613 号氨基酸组成,具有 ADPR 转移酶活性,在辅酶 I (NAD)的存在下抑制多肽链的延长。Jinno 等通过定点突变,将第 57 位氨基酸残基 Lys 突变为 Glu 后,毒素细胞结合能力显著降低,导致细胞毒作用减弱到突变前的 1/50~1/100,与缺失第 4~224 位氨基酸片段的效果相当。Chaudhary 等通过系列缺失突变试验指出,对毒素的毒性来说,第 246 His、247 Arg 和 249 His 残基是三个重要碱性氨基酸残基。如将这三个残基和 57 Lys 残基均突变为 Glu 后,则丧失了结合活性和非特异性细胞毒性^[71]。利用这种 PE 的突变体制备免疫毒素,既可避免非特异结合所引起的杀伤作用,又保留了穿膜辅助能力,是理想的毒素选择。我们根据球囊扩张术后平滑肌细胞高表达 bFGF 受体以及绿脓杆菌外毒素(PE)抑制细胞增殖作用的可调节性,将 bFGF 与缺失细胞识别序列(PE₁₋₂₂₄)进行重组,产生重组免疫毒素,拟对大鼠主动脉内皮剥脱后动脉平滑肌细胞进行导向治疗。

3.2 载体

自 1986 年 Murphy 首次报道基因重组免疫毒素研制成功以后,用作免疫毒素载体的范围愈来愈广。从理论上凡是能将毒素携带至靶细胞表面,并与相应的靶细胞或受体结合后通过受体介导的内吞作用进入细胞内部,然后免疫毒素穿膜进入胞浆发挥毒性作用的成分均可作为载体。

3.2.1 细胞生长因子 前述动脉粥样硬化斑块内泡沫细胞有 PDGF- β 、bFGF 和 IGF 的受体表达增加,即泡沫细胞内这些受体的数量增加;而正常组织细胞几乎不表达或低表达 PDGF- β 、bFGF 和 IGF 受体,即正常组织细胞内这些受体的数量很低。因此可以利用其专一性配基与 PE 重组,从而达到靶向性杀伤和抑制泡沫细胞的增殖。

3.2.2 导向型抗体 由于单克隆抗体能特异地识别 As 斑块相关抗原和细胞表面特异性抗原,被初步用来作为免疫毒素的载体,但是又由于其分子量大,渗透性差及免疫原性等问题,在临床应用中受到限制。目前,单链、单区抗体(single domain antibody)等在重组免疫毒素构建中显示出其优越性。单链、单区抗体等小型抗体具有比完整抗体更强的穿透能力,并避免了由于 Fc 段所引起的非特异性毒性作用,VH 和 VL 连接在一起的单链抗体虽然亲和力有所下降,但单链抗体作为载体的构建的重组免疫毒素的特异性杀伤活性并没有因此而减小。

3.2.3 重组免疫毒素融合基因的制备 PCR 技术和基因重组技术为重组免疫毒素融合基因提供了方便的手段,采用 PCR 技术和亚克隆方法,去除毒素基因的细胞结合功能区,改造后的毒素基因与载体基因连接,获得的融合基因转化入受体菌,表达出重组免疫毒素。毒素基因与载体基因间往往选择性地插入连接肽基因,目的是融合蛋白形成有效的空间结构,发挥载体与毒素双重生物效应^[72]。

4 治疗型单克隆抗体

采用单克隆抗体(McAb)技术已生产出针对多种抗原的特异性免疫球蛋白(Ig)。这些抗体对 As 的诊断和治疗具有巨大的潜力。但使用鼠类抗体存在一系列问题。首先是这些抗体的免疫原特性,反复注射会产生人抗鼠抗体(HAMA)。使用人 McAb 应能显著减少这种问题,但这些抗体通常受其特异性限制,此外,人体杂交瘤细胞常不稳定,人 Ig 产量低。

基因工程方法已解决了治疗用 McAb 的某些问题,因而有可能用人 Ig 序列替代鼠类抗体序列而不丧失其功能。这种新一代人源抗体是取代杂交瘤抗体的一个途径,其免疫原性反应较弱。同时人源抗体的表达也提供了修饰抗体 Fc 以适于其应用的机会。

人们在实验中发现,t-PA 等溶血栓药物与纤维蛋白的亲合力明显低于抗原与抗体之间的亲和力。如果把纤维蛋白单克隆抗体与溶血栓药物连接,单抗将携带溶血栓药物特异地结合到血栓上,使血栓部位溶血栓剂高度聚集,血栓溶解速度加快。Bode 等通过酶解的方法获得抗纤维蛋白单克隆抗体的 Fab' 片段,并将其与 UK 和 scu-PA 共价连接,其中 Fab'-UK 对纤维蛋白单体的溶解度较 UK 高 95 倍,对人血浆凝块的溶解率较 UK 高 4.4 倍。scu-PA-59D8-Fab' 对纤维蛋白单体的溶解度比 t-PA、scu-PA 和 UK 分别高 33、230 和 420 倍。溶解人血浆凝块的效率也明显高于 scu-PA。家兔颈静脉血栓显示溶栓效果提高 29 倍。Runge 等^[73]

研制出抗人纤维蛋白 β -链 N 端七肽的单克隆抗体,并将此抗体与 UK 或 t-PA 共价连接,制成 UK-59D8 和 t-PA-59D8 两种导向溶血栓剂。体外实验结果测得 UK-59D8 和 t-PA-59D8 溶解纤维蛋白效率比单纯 UK 高 100 倍,比单纯 t-PA 高 10 倍,溶解人血浆凝块效率比 t-PA 和 UK 高 3.2~5.4 倍^[74]。家兔颈静脉血栓模型显示,t-PA-59D8 体内溶血栓效率比 t-PA 高 2.8~2.9 倍。在同样的溶栓剂浓度下,t-PA-59D8 组血中纤维蛋白原和 α_2 -抗纤溶酶含量无明显变化,而 t-PA 对照组两者显著降低。说明抗体导向溶血栓剂的溶栓效率和特异性均明显优于单纯 t-PA。

由于纤维蛋白 β -链 N 端的特异性抗原决定区有可能在溶栓早期随纤维蛋白的聚合而部分遮蔽或丧失,Dewerchin 等^[75,76]研制出了抗交联纤维蛋白 D 二聚体的单克隆抗体 MA-15C5,将其与 rscu-PA 和 scu-PA 共价连接,体外测得连接物的纤溶效率较单纯 rscu-PA 和 rtcu-PA 效果好。说明与抗交联纤维蛋白 D 二聚体的单克隆抗体连接后,溶血栓效果和特异性均提高了。

Bode 等^[78]将 UK 与抗血小板膜糖蛋白 IIb/IIIa 的单克隆抗体 7E3 共价交联,体外测得 UK-7E3 的纤溶效率比 UK 约高 20 倍,提示抗血小板单抗也可将溶血栓剂导向血栓。

基因重组导向溶血栓蛋白比化学方法制备的导向溶血栓显示了更好的应用前景,因化学交联造成的低产率及活力的损失,给大规模制备以及用于临床带来困难。而基因重组技术在这方面显示了其优越性。Runge 等^[77]用含 scu-PA 和 59D8 编码基因的质粒转染杂交瘤细胞,获得了一个重组的纤溶酶原激活剂 scu-PA-59D8,其溶解血浆凝块的活力较 scu-PA 提高 6 倍,对家兔颈静脉血栓的溶解率较 scu-PA 高 20 倍。

Vandamme 等^[78]将编码人抗纤维蛋白 D 二聚体单抗 MA-15C5Hu 轻重链的 cDNA 与编码 scu-PA-32K 的 cDNA 融合,共转染中国仓鼠的卵巢细胞,获得了重组的纤溶酶原激活剂 MA-15C5 Hu/scu-PA-32K。其溶栓的效果也相当明显。

人类巨细胞病毒(HCMV)感染与动脉粥样硬化发生有密切的关系。动脉硬化性狭窄组织中出现 HCMV 蛋白 IE₁₀ 的表达,IE₁₀ 与 P₅₃ 结合,使其失去抑制组织细胞增殖的功能从而导致动脉平滑肌细胞增殖。加入抗体 IE₁₀ 后,使 IE₁₀ 不能与 P₅₃ 结合,其 P₅₃ 功能得以恢复,进而细胞增殖受阻^[79]。此外,在动脉粥样硬化的研究中,也广泛应用了生长因子、细胞因子和癌基因等单克隆抗体^[80]。

LDL 能诱导粘附分子(adhesion molecule, AM),包

血管细胞粘附分子(VCAM), 细胞间粘附分子(ICAM)等与动脉粥样硬化有密切关系。此外已知血小板聚集在血栓形成与动脉粥样硬化中起重要作用, 并已查明血小板聚集的共同中介物是糖蛋白Ⅱb/Ⅲa, 它作为纤维蛋白原的受体起聚集作用。近年研制的抗VCAM, 抗ICAM与抗血小板Ⅱb/Ⅲa的单抗(7E3), 在预防再狭窄有肯定的疗效。

5 展望

细胞的生物学行为受外源信号控制, 信号转导过程的偏差对动脉粥样硬化的发生有重要影响, 因而阻断特定细胞内信号传递途径可治疗动脉粥样硬化。细胞内信号传递经一系列蛋白质-蛋白质相互作用实现, 弄清这些蛋白质-蛋白质相互作用的结构特征, 及以此结构为基础, 开发治疗药物, 将对动脉粥样硬化防治产生相当影响。

已经证实, 基因的结构或表达异常是动脉粥样硬化的原因之一。基因治疗有可能使动脉粥样硬化得到根治。八十年代以来, 多种外源基因已成功导入哺乳类动脉细胞并得到预期表达。1992年, 一例家族性高胆固醇血症患者基因治疗的成功, 极大地鼓舞了人们在动脉粥样硬化领域探索的信心, 随着分子克隆技术的日益完善, 这一新的方法有可能使动脉粥样硬化的治疗产生重大变革。近几年随着分子生物学的发展, 特别是对基因表达调控的研究深入, 人们发现寡核苷酸(尤其是反义寡脱氧核苷酸)同互补的靶基因模板或mRNA杂交后, 几乎可以完全阻断靶基因的表达和转录, 随着这一研究的深入, 人们意识到应用反义ODN片段选择性地阻断某一基因的表达, 将成为一种全新的基因水平的治疗方法。

将毒素或改造后的毒素基因与抗体可变区或细胞因子、生长因子等载体基因融合后所制备的基因重组免疫毒素的出现, 克服了过去用抗体和常规化学连接方法制备免疫毒素的缺点, 扩大了载体选择的范围, 使得这一导向药物在动脉粥样硬化和再狭窄的防治中有了广泛的应用前景。

用聚合酶链反应(PCR)从杂交瘤或非免疫细胞基因库快速克隆抗体可变区(V区)基因、互补决定区(CDR)移植V区基因的设计和构建, Fv和单链Fv片段的构建等方法以及载体扩增在哺乳动物细胞或大肠杆菌中高效表达抗体及其片段的技术, 为动脉粥样硬化的防治提供了大量的产品, 如基因重组导向溶血栓蛋白是治疗心肌梗塞、脑血栓等血栓性心脑血管疾病的有效途径, 导向溶血栓剂的研究目前仍处于实验阶段, 相信不久的将来会有可能用于临床血栓病的治疗

的导向溶血栓剂问世。

参考文献

- Ullrich A, Schlessinger J. *Cell*, 1990, **61**: 203.
- Roch CA, et al. *Science*, 1991, **252**: 668.
- Margolis B. *Cell Growth Differ*, 1992, **3**: 73.
- Morrison DK, et al. *Cell*, 1989, **58**: 649.
- Habernicht AJR, et al. *J Clin Invest*, 1985, **75**: 1 381.
- Matuoka K, et al. *Science*, 1988, **239**: 640.
- 杨和平, et al. *生理科学进展*, 1994, **25**(5): 165.
- Coughlin SR, et al. *J Biol Chem*, 1988, **263**: 988.
- Brenner-Gati L, et al. *J Cell Invest*, 1988, **82**: 1 144.
- Nishimoto I, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, **148**: 403.
- 彭建平, et al. 待发表
- Wilson JM, et al. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 963.
- Arai H et al. *Nature*, 1990, **348**: 730.
- Mizuno T, et al. *Biochem J* 1992; **287**: 305.
- Molenaar P, et al. *Cir Res*, 1993, **72**: 526.
- Schvartz I, et al. *Biochemistry*, 1991, **30**: 5 325.
- 赵民清, et al. *北京医科大学学报*, 1994, **26**(增刊): 135.
- 赵民清, et al. *北京医科大学学报*, 1994, **26**(增刊): 139.
- Rubin K, et al. *Lancet*, 1989, **1**: 1 353.
- Majesky MW, et al. *J Cell Biol*, 1990, **111**: 2 149.
- Heldin CH, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**: 364.
- Newby A, George SJ. *Cardiovascular Research*, 1993, **27**: 1 173.
- Nabel EG, et al. *Science*, 1989, **244**: 1 342.
- Wilson JM et al. *Science*, 1989, **244**: 1 344.
- Dichek DA, et al. *Circ Res*, 1989, **80**: 1 347.
- Nabel EG, et al. *Cardiovasc Res*, 1994, **28**: 445~455.
- Miller DG, et al. *Mol Cell Bio*, 1990, **10**: 4 239.
- Wang CY, Huang L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 7 851.
- Wu CH, et al. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 1 6985.
- 杨和平, 杨永宗, et al. *生理科学进展*, 1995, 待发表.
- Biro S, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 654.
- Stein CA, Chen YC. *Science*, 1993, **261**(20): 1 004.
- Itoch H, et al. *J Clin Invest*, 1993, **91**: 2 268.
- Smons M, Rosenberg RD. *Circ Res*, 1992, **70**(4): 835.
- Simons M, et al. *Nature*, 1992, **359**(3): 67.

- 36 杨和平, et al. 北京医科大学学报, 1994, **26**(增刊): 242.
- 37 杨和平, 杨永宗. 国外医学·生理病理科学与临床分册, 1992, **6**(2): 70.
- 38 杨和平, et al. 中国病理生理杂志, 1992, **8**(6): 622.
- 39 杨和平, et al. 中华病理学杂志, 1992, **21**(6): 349.
- 40 杨和平, et al. 国外医学分子生物学分册, 1994, **169**(2): 70.
- 41 杨和平, et al. 衡阳医学院学报, 1994, **22**: 89.
- 42 杨和平, et al. 实验生物学报, 1995, **28**(1): 31.
- 43 Evans JL, et al. *Mol Cell Biol*, 1990, **10**(11): 5 747.
- 44 杨和平, et al. 临床与实验病理学杂志, 1995, **11**(1): 54.
- 45 杨永宗, et al. 北京医科大学学报, 1994, **26**(增刊): 262.
- 46 杨和平, et al. 衡阳医学院学报, 1994, **22**: 57.
- 47 Hsieh H, et al. *J Cell Physiol*, 1993, **154**: 143.
- 48 Shi Y, et al. *Circulation*, 1994, **90**: 944.
- 49 杨和平, et al. 中华医学杂志, 1993, **73**(11): 673.
- 50 杨和平, 杨永宗. 心肺血管学报, 1990, **9**: 166.
- 51 Abe II, et al. *BRRC*, 1994, **198**(1): 16.
- 52 Gordon JW, Ruddle FH. *Science*, 1981, **214**: 1 244.
- 53 Ishibashi S, et al. *J Clin Invest*, 1993, **92**: 883.
- 54 Simonet WS, et al. *JBC*, 1990, **265**(19): 10 809.
- 55 Smith JD, et al. *JBC*, 1990, **265**(25): 1 4707.
- 56 Shimano H, et al. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 2 084.
- 57 Simonet WS, et al. *Arterioscl Thromb*, 1991, **11**: 1 390a.
- 58 Fazio S, et al. *Arterioscl Thromb*, 1991, **11**: 13 90a.
- 59 Walsh A, et al. *J Lipid Res*, 1993, **34**: 617.
- 60 O'Connell A, et al. *Circulation*, 1990, **80**(suppl): 433.
- 61 郭中民, 陈保生. 国外医学分子生物学分册, 1994, **16**(3): 109.
- 62 Hayek T, et al. *Arterioscl Thromb*, 1993, **11**: 1 390.
- 63 Breslow JL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 8 314.
- 64 Aalto-Setälä K, et al. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 18 889.
- 65 Chiesa G, et al. *JBC*, 1992, **267**(34): 24 369.
- 66 Field LJ. *Annu Rev Physiol*, 1993, **55**: 97.
- 67 Zhang SH, et al. *Science*, 1992, **258**: 468.
- 68 Plump AS, et al. *Cell*, 1992, **71**: 342.
- 69 Charron J, et al. *Genes Dev*, 1992, **6**: 2 248.
- 70 杨和平、黄宗之. 中国动脉硬化杂志, 1994, **2**(4): 136.
- 71 Chaudhary VK, et al. *J Biol Chem*, 1990, **265**(27): 16 306.
- 72 Pastan I, et al. *Annu Rev Biochem*, 1992, **61**: 331.
- 73 Runge MS, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(21): 7 659.
- 74 Runge MS, et al. *Biochemistry*, 1988, **27**(4): 1 153.
- 75 Dewerchin M, et al. *Eur J Biochem*, 1989, **185**(1): 141.
- 76 Bode C, et al. *Thromb Haemostasis*, 1989, **62**(1): 483.
- 77 Runge MS, et al. *Circulation*, 1990, **82**(4): 375.
- 78 Vandamme AM, et al. *Eur J Biochem*, 1992, **205**(1): 139.
- 79 Speir E, et al. *Science*, 1994, **265**: 391.
- 80 杨和平, 黄宗之. 中国动脉硬化杂志, 1994, **2**(4): 152.