

转基因和基因转移技术在 动脉粥样硬化研究中的应用

范 乐 明

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 南京 210029)

将基因构件(包括编码和调节序列)导入生殖/胚胎细胞或体细胞,以改变其遗传特性、表达新表型性状并传递至后代的技术被分别称为“转基因作用”(transgenesis)和“基因转移”(gene transfer)。两者原理相同而目标有别,前者主要用于制备转基因动物作为疾病模型或在整体动物内研究某个基因的功能或调控;后者则用在基因水平对基因缺陷所致有病个体的治疗,即基因治疗。

1 转基因技术——转基因动物的制备

一般选用哺乳动物,关键是要将目的基因稳定地导入生殖细胞或胚胎,主要有三种方法^[1]。最常用的是将目的基因用显微注射法直接注入受精卵原核中,再植入假孕母体输卵管,任其足月。筛选出阳性幼仔(目的基因已被整合入基因组者),进行配对传代建系。此法相对简易,已成功应用于小鼠、大鼠、羊和猪。第二种方法是将目的序列导入胚胎干细胞(embryo stem cell, ESC)。ESC系指胚胎囊胚期的内细胞团中未分化的胚细胞,具有高度分化的潜能。外源基因通过电穿孔、磷酸钙沉淀或直接显微注射法导入ESC,再注入受体囊胚,后者植入假孕母体子宫内,所发育成的个体可含有外源基因,并在特异组织表达。第三种方法是在体外用重组逆转录病毒转染胚胎,再植入假孕母体。所得幼仔以是否存在重组病毒序列为依据进行筛选。其优点是病毒基因组只整合单个拷贝,整合时不伴有宿主序列重排。病毒序列可提供分子标记,可克隆出整合部位两侧的宿主序列。

2 转基因动物在动脉粥样硬化研究中的应用

小鼠因易饲养、生长期短和易获得纯系而受到青睐。借助转基因技术将相关基因导入小鼠使之过度表达,或通过同源重组使该内源基因失活,即可从正反两方面研究该基因的功能及其调控,已成为研究动脉粥样硬化特别是脂代谢紊乱的有用模型。

2.1 低密度脂蛋白受体转基因小鼠

Hofmann等^[2]用小鼠 metallothionein-I promoter

驱动的人 LDL 受体 cDNA 建立了 LDL 受体转基因小鼠。该促进子为非组织特异性,在检查的所有组织中均有表达。以 CaSO₄ 诱导 12 小时,LDL 受体 mRNA 增加 5 倍。对放射标记 LDL 的清除比对照鼠快 8~10 倍,血浆载脂蛋白 B 和 E 的浓度降 90%。Yokode^[3]用铁蛋白促进子驱动的人 minigene 结构建成转基因小鼠,其 LDL 受体水平逐渐增高。用高脂高胆固醇饲料后仅 VLDL 水平轻度增高而 IDL 或 LDL 水平不变;对照组小鼠用同样饲料后上述三种脂蛋白均显著升高。提示 LDL 受体的非调节性表达与个体对食物的反应有关,可能也是人群中食物反应差异的机制。Pathak 等^[4]用 LDL 受体转基因小鼠研究了受体定位,发现在肝细胞和小肠上皮细胞定位于基侧面,而在肾小管上皮细胞则定位于顶面。推测在转基因的编码序列中存在一种信号,可能以组织特异性的作用方式控制其在细胞表面的定位。

2.2 载脂蛋白 A I 转基因小鼠

Walsh 等^[5]将带有不同数量侧翼序列的人载脂蛋白 A I 基因制备转基因小鼠,以三种不同的基因结构建立 5 个小鼠系,发现小鼠内源性载脂蛋白 A I 在肝和小肠等量表达,而外源基因仅在肝内表达。实验提示 5' 端侧翼仅 256 个碱基对已足以使之在肝表达,而 5' 端侧翼 5.5 kb 和 3' 端侧翼 3.5 kb 的序列均不足以使小肠表达,故载脂蛋白 A I 基因在小肠表达所必需的顺式调节序列尚待测定。Rubin 等^[6]用对动脉粥样硬化敏感的 C₅₇BL/6J 小鼠,制备人载脂蛋白 A I 基因的转基因小鼠,其血浆 HDLC 浓度和载脂蛋白 A₁ 浓度均为对照组的二倍以上。两组动物同时喂饲高脂饲料 14 周,结果对照组主动脉粥样硬化面积平均为转基因组的 7 倍,证实了载脂蛋白 A I 的抗动脉粥样硬化作用。Williamson 等^[7]最近用同源重组技术破坏小鼠胚胎干细胞内的载脂蛋白 A I 基因,获得纯合子型载脂蛋白 A I 基因缺陷型小鼠,证实其血浆内缺乏载脂蛋白 A I, HDLC 含量仅为正常小鼠的 17%。

2.3 载脂蛋白(a)转基因小鼠

正常小鼠无载脂蛋白(a)。Chiesa 等^[4]用转铁蛋白促进子驱动的人载脂蛋白(a)基因建立转基因小鼠,结果所有被检组织中均得到表达,表达的人载脂蛋白(a)在血浆中主要以游离形式存在。将人 LDL 输入转基因小鼠则可使载脂蛋白(a)结合入 LDL 密度的脂蛋白中,人载脂蛋白(a)不能与鼠载脂蛋白 B 结合可能是由于缺乏一个必需的半胱氨酸。Lawn 等^[10]报告将表达人载脂蛋白(a)的转基因小鼠与对照小鼠同时喂饲高脂饲料 3.5 个月,结果转基因小鼠主动脉粥样硬化面积平均为 $1\,070\ \mu\text{m}^2/\text{切片}$,而对照组小鼠仅 $58\ \mu\text{m}^2/\text{切片}$ 。由于转基因小鼠中表达的人载脂蛋白(a)约 95% 以游离形式存在,因而认为在人类脂蛋白(a)的致动脉粥样硬化性性主要在于载脂蛋白(a)。后者可能结合于血管壁中对之具有亲和性的组分,如纤维粘连蛋白、胶原、弹性蛋白、氨基多糖等。载脂蛋白(a)被固着后,通过其亲和性又使含载脂蛋白 B₁₀₀ 的脂蛋白在管壁沉积,结合于管壁的载脂蛋白(a)也可增强抗纤溶活性并促进细胞游走,均有利于动脉粥样硬化病灶发生。

2.4 载脂蛋白 CⅢ 转基因小鼠

Ito 等^[11]首先建立了人载脂蛋白 CⅢ 的转基因小鼠,后者的血浆 TG 水平与 CⅢ 基因表达水平相一致。最近 Aalto-Setälä 等^[12]以人载脂蛋白 CⅢ 转基因小鼠为模型研究了原发性高甘油三酯血症的发生机制。发现转基因小鼠体内有略大于正常的 VLDL 颗粒积聚。这些颗粒富含 TG,载脂蛋白 CⅢ 含量增加而载脂蛋白 E 含量减低,游离脂肪酸含量也增加。代谢研究表明 VLDL 的 FCR 下降,VLDL-TG 生成率略增加。体外实验显示培养细胞对此类 VLDL 通过 LDL 受体介导的摄取减少,而 LDL 对其的脂溶作用正常,因而认为高甘油三酯血症并不是由于残体颗粒蓄积而是由于 VLDL 的存留时间延长。

2.5 载脂蛋白 E 转基因小鼠

Shimano 等^[3]用 metallothionein 促进子驱动的大鼠载脂蛋白 E 基因建立转基因小鼠,经 Zn^{2+} 诱导后动物的载脂蛋白 E 水平增高 4 倍,VLDL 和 LDL 水平明显下降。放射标记的 VLDL 和 LDL 清除率增加数倍,动物对食物诱发高胆固醇血症有明显抵抗。表明载脂蛋白 E 的过度表达可降低致粥样硬化性脂蛋白水平,减轻动物对高脂食物的反应。Maagdenberg 等^[14]用能导致人类Ⅲ型高脂蛋白血症的一种突变型载脂蛋白 E 基因(E₃-Leiden)制备转基因小鼠,发现其 VLDL 和 LDL 的胆固醇和 TG 水平均增高,且血浆脂蛋白水平明显受食物因素影响,为研究高脂血症中遗传与环境因

素的关系提供了有用模型。Piedrahita 等^[15]通过同源重组技术破坏小鼠胚胎干细胞的载脂蛋白 E 基因,培育出缺乏载脂蛋白 E 的种系,发现纯合子型小鼠血浆总胆固醇比正常高 5 倍,TG 水平则仅升高 68%,TC 主要存在于 VLDL 和 IDL。代谢研究表明该种系小鼠存在从血浆中清除脂蛋白的严重缺陷。Plump 等^[16]对载脂蛋白 E 缺陷小鼠分别用高脂和普通饲料喂 5 周,结果高脂饲料组 TC 增至 $18.21\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,主动脉内粥样硬化病灶面积为对照组的 3 倍。Zhang 等^[17]证明载脂蛋白 E 基因缺陷鼠喂普通饲料也可自发产生粥样硬化病灶。

3 基因治疗的原理、策略和方法

基因治疗系指利用 DNA 重组和基因转移技术,在基因水平对疾病进行治疗的一类方法。治疗原理包括^[18]:①纠正由于 DNA 编码信息异常所致基因产物缺失或功能障碍;②赋予某些细胞以新的功能或增强其原有的某些功能,从而改变疾病过程;③阻断某些细胞导致疾病的功能,从而消除或减轻疾病。

基因治疗的策略有基因修正(gene correction)和基因添加(gene augmentation)两类。基因修正是利用同源重组原理,以带有同源片段的外源基因对有缺陷的基因进行原位修正或置换。由于同源重组十分精确,不会影响缺陷基因以外的任何顺序,受治基因的表达调控也不受影响,因而是一种理想的方法。可惜目前能达到的同源重组效率很低($10^{-5} \sim 10^{-7}$),实用价值尚不高。基因添加是在缺陷基因以外的基因组任何部位,甚至是在缺陷基因所在细胞以外的其他细胞添加一个正常基因,用以弥补缺陷基因的不足或抵消异常基因的影响。此法靶细胞有选择余地,成功率也较高,因而较为常用。缺点是添加的基因随机插入基因组,其表达未必恰如其份,而且有导致内源基因被插入失活和原癌基因被激活的危险。新近发展的反义技术已成为基因治疗的又一种策略——基因抑制(gene suppression),即利用反义核酸降低或阻止变异基因的表达。反义核酸是指与靶基因或其 mRNA 互补的 DNA 或 RNA 片段,导入细胞后能与之特异结合,从而抑制靶基因的复制、转录、转录后加工或翻译。

基因治疗的关键方法是基因转移,必需将外源基因准确导入靶细胞,并在其中安全、忠实、长效地表达。目前对哺乳动物细胞的基因转移方法可分为重组病毒转导法和非病毒法两大类。根据实施方式又可分为直接法和间接法。直接法又称体内法(in vivo),系将外源 DNA 直接或经适当加工(脂质体包裹、结合特异蛋白等)后注入体内靶细胞或器官(或注入血液循环借助定向

组分定位于靶细胞),使之在局部表达而实现治疗目的。间接法又称体外法(*ex vivo*),先将目的基因在体外导入中介细胞(或称受体细胞,常用骨髓细胞、皮肤细胞、肝细胞、内皮细胞和淋巴细胞等),再将后者输回体内。

4 动脉粥样硬化的基因治疗

动脉粥样硬化为多因素疾病,除饮食、生活方式等环境因素外,多种脂蛋白及其受体、多种脂代谢酶、生长因子和细胞因子均与之有关。编码这些物质的基因大多已被克隆,其结构和功能也已基本阐明,因而在基因水平对动脉粥样硬化进行防治已成为可能。由于涉及基因较多,对每一个具体病人而言,其主要发病环节、病理特征和临床状态各异,因而所选用目的基因和策略也多有不同。目前报告较多者择要介绍于下:

4.1 增强低密度脂蛋白受体基因的表达

从基因水平增加正常 LDL 受体表达,不仅是 LDL 受体遗传性缺陷疾病(FH)的根本治疗措施,也有助于降低其他高胆固醇血症的 LDL 血浆水平,从而减小动脉粥样硬化发生的危险性。选择肝细胞作为靶细胞导入正常 LDL 受体基因以使血浆 LDL 水平降低的尝试已在不少动物试验中获得成功,包括间接法^[19,20]和直接法^[21,22]。Wilson 等^[23]通过逆转录病毒载体将正常 LDL 受体基因在体外导入一名纯合子型 FH 患者的肝细胞,再输回体内,取得初步成效,为在临床实施动脉粥样硬化的基因治疗作出了有益的尝试。

4.2 调节各类载脂蛋白基因表达水平

脂蛋白所含载脂蛋白量和质的异常也可导致脂代谢紊乱。新近发展的转基因动物(包括基因增加和基因缺失)从正反两方面阐明了各类载脂蛋白基因在脂代谢乃至在动脉粥样硬化发生发展中的作用^[24],为发展通过载脂蛋白基因防治动脉粥样硬化的方法提供了依据。例如已证实通过转导载脂蛋白 A I 基因提高 HDL 的全身或局部水平有助于防治动脉粥样硬化;导入正常载脂蛋白 E 基因并增强其表达则可能是治疗因载脂蛋白 E 基因缺陷所致 III 型高脂蛋白血症的重要措施。鉴于脂蛋白(a)已被证实为动脉粥样硬化的一个独立危险因素,且其浓度主要受遗传因素影响,对大多数药物或饮食调节均不敏感,因而从基因水平减少载脂蛋白(a)的表达(如用反义技术)可能是高脂蛋白(a)血症患者的主要出路。

4.3 抑制平滑肌细胞增殖和纤维增生反应

平滑肌细胞增殖和纤维增生是粥样硬化发生发展的重要一环,也是冠状血管成形术后再狭窄的原因之一。已证实 PDGF、bFGF、TGF- β 、ILs 以及原癌基因 c-

fos、c-myc 和 c-ras 等均与此有关。不少研究者已试图用这些基因的反义寡核苷酸来阻止 SMC 和纤维的异常增生,其关键是要将反义寡核苷酸或能在靶细胞内产生反义核酸的反义表达载体(在启动子和转录终止子之间反向插入一段靶基因)导入平滑肌细胞。我国赵民清等^[25]利用血管 SMC 表面有大量内皮素 A 型受体(ET_A)以及环五肽物质 BQ₁₂₃对 ET_A 有高度亲和性的特点,构建了活体内血管 SMC 靶向转运系统。张吉辉等^[26]用阳离子脂质体包裹反义表达载体转染大鼠血管 SMC 也获得成功。

4.4 加强局部纤溶活性

局部血栓形成是心肌梗塞常见原因之一,也是血管手术后再狭窄的另一种重要诱因。在易发生动脉粥样硬化的血管部位增加内源性纤溶酶原激活物的局部表达,可望增加这些部位的纤溶活性而不增加其他部位出血的危险,显然优于全身性使用外源性纤溶酶原激活剂。Dicke 等^[27]用含有 t-PA 基因的病毒载体转染血管内皮细胞再移植在人工血管膜上,证实 t-PA 的局部浓度升高 20~30 倍。我国姚阿卿等^[28]等考虑到内皮细胞生活周期较短,且能产生特异性 t-PA 活性抑制剂,而 SMC 则无此缺点,故选用 SMC 为靶细胞,通过病毒载体导入人的生长 Pro-UK 或 t-PA 基因 cDNA,获得有效表达。鉴于近年临床报告 Pro-UK 较 t-PA 更安全,故将 Pro-UK 基因导入血管 SMC 可能是防治心肌梗塞和血管手术后再狭窄的又一重要方法。

参考文献

- 1 Field LJ. *Trends Cardiovasc Med*, 1991, 1: 141.
- 2 Hofmann SL, et al. *Science*, 1988, 239: 1 277.
- 3 Yokode M, et al. *Science*, 1990, 250: 1 273.
- 4 Pathak RK, et al. *J Cell Biol*, 1990, 111: 347.
- 5 Walsh A, et al. *J Biol Chem*, 1989, 264: 6 466.
- 6 Rubin EM, et al. *Nature*, 1991, 353: 265.
- 7 Williamson R, et al. *PNAS*, 1992, 89: 7 134.
- 8 Schultz JR, et al. *J Biol Chem*, 1992, 267: 21 630.
- 9 Chiesa G, et al. *J Biol Chem*, 1992, 267: 24 369.
- 10 Lawn RM, et al. *Nature*, 1992, 360: 670.
- 11 Ito Y, et al. *Science*, 1990, 249: 790.
- 12 Aalto-Setälä K, et al. *J Clin Invest*, 1992, 90: 1 889.
- 13 Shimano H, et al. *PNAS*, 1992, 89: 1750.
- 14 Van den Maagdenberg, et al. *J Biol Chem*, 1993, 268: 10 540.
- 15 Piedrahita Ja, et al. *PNAS*, 1992, 89: 4 471.
- 16 Plump AS, et al. *Cell*, 1992, 71: 343.
- 17 Zhang SH, et al. *Science*, 1992, 258: 468.

-
- | | |
|--|--|
| 18 Williams. <i>Am J Med Science</i> , 1993, 302 : 129. | 25 赵民清, et al. 北京医科大学学报, 1994, 26 (增刊), 135. |
| 19 Wilson JM, et al. <i>PNAS</i> , 1988, 85 : 4 421. | 26 张吉辉, et al. 北京医科大学学报, 1994, 26 (增刊): 89. |
| 20 Chowdhury JR, et al. <i>Science</i> , 1988, 239 : 1 277. | 27 Dicked DA, et al. <i>Blood</i> , 1991, 77 : 533. |
| 21 Wilson JM, et al. <i>J Biol Chem</i> , 1992, 267 : 963. | 28 姚阿卿, et al. 北京医科大学学报, 1994, 26 (增刊), 115. |
| 22 Herz J, et al. <i>PANS</i> , 1993, 90 : 2 812. | |
| 23 Grossman M, et al. <i>Nature Genetics</i> , 1994, 6 : 335. | |
| 24 Maeda M, et al. <i>Curr Opin Lipodol</i> , 1993, 4 : 90. | |