

## •文献综述•

## 心血管疾病基因治疗研究进展

范乐明

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 南京 210029)

**主题词** 冠心病; 心肌梗死; 基因治疗; 基因转移; 动脉粥样硬化; 肌,平滑; 血管**摘要** 心血管疾病是危害人类健康的最重要疾病之一。冠状动脉粥样硬化性心脏病的致死致残率尤高,迫切需要发展长时效、少创伤的治疗方法。有关心血管疾病基因治疗的研究近年来受到人们重视,并获得较快发展。

心血管疾病基因治疗在广泛开展细胞水平和动物模型研究的同时,已有进入临床实验的先驱报告。本文就心血管系统基因转移方法学的进展和心血管疾病基因治疗基础研究的进展作一简要综述。

### 1 基因治疗心血管疾病的可能性

基因治疗主要是指体细胞基因治疗,即将具有防治潜能的外源基因(目的基因)通过相应载体转移到患者的有关器官组织(靶组织),并获得适当表达,以达到防治或减轻疾病的目的。目前体内基因转移技术虽然效率不理想,但已可使某些重组蛋白获得具有治疗价值的表达水平。血管内皮细胞或平滑肌细胞在体外进行基因转移后再移植回体内,已能在局部表达外源基因产物达六个月以上。向高血压小鼠导入组织激肽释放酶基因,获得了该基因高效表达和使动脉血压下降的效果<sup>[1]</sup>。针对细胞周期中多种调节蛋白表达水平的调节可有效防止血管内膜增生<sup>[2]</sup>,增强应激蛋白、抗氧化因子和抗炎因子的表达被证实有助于控制心肌重复缺血再灌注损伤和梗死范围的扩展<sup>[3]</sup>。对于严重梗死或衰老的心肌,由于疤痕和间质取代了心肌细胞,心肌收缩能力严重受损,多种基因和细胞因子的治疗可望刺激其再生和恢复失去的心肌。动脉粥样硬化的病因发病学较为复杂,对于主要由于遗传缺陷所致者一般可采用基因置换或基因修饰等策略,而增强有关蛋白的表达能直接或间接抑制病灶的发生发展,这有可能适用于具有各种危险因素人群的防治。大量研究结果表明,基因治疗完全有可能成为防治心血管疾病的一种重要手段。

### 2 心血管系统基因转移方法学的进展

基因治疗的关键技术是基因转移,包括分离目的基因,构建表达载体以及将此输送至靶细胞。目的基因主要是依据病因和发病学选定,表达载体经多年发展已有较多选择。其中裸露DNA和DNA-脂质体,DNA-配基复合物较易构建,也较稳定,但转移效率有限。新近Dzau等<sup>[4]</sup>发展的融源型病毒脂质体载体利用日本血凝病毒可与细胞融合的特点,使DNA易于直接导入细胞,避免在溶酶体内降解,从而提高转移效率。在病毒载体方面,逆转录病毒载体可直接整合入宿

主基因组,表达水平高而持久,但宿主细胞必须处于分裂期。腺病毒载体则对静止期细胞也有效,其主要缺点是由于转化细胞的同时也表达腺病毒结构蛋白,可招致免疫攻击而使外源基因短暂表达。已有几种旨在减少免疫源性的第二代腺病毒载体问世,同时还建立了几种抑制宿主免疫的方法<sup>[5]</sup>。除有效性外,安全性和准确性是构建表达载体时需要考虑的另外两个重要因素。某些基因在其表达水平超出一定范围后可能会从有益变为有害;同样,对某种细胞有益的基因在其他细胞内表达时可能有害。因此不少学者正在致力于发展能随意控制目的基因表达水平的载体和具有细胞转录特异性的载体<sup>[6]</sup>。

基因转移的最后一步是将构建好的载体准确有效地输送到靶细胞。体内心肌细胞基因转移的首次实验是用注射针头将DNA直接注入开胸大鼠的左心室,外源基因被心肌细胞摄取和表达。此类实验虽然对基因和促进子在体内的表达和调节提供了有价值的信息,但显然不适于临床应用。以后不少实验室采用双囊导管进行血管内定位输送,或在血管手术时用人造或自体血管内预置经基因转移的内皮细胞<sup>[7]</sup>。这种从血管内向动脉壁进行基因转移的缺点是内皮细胞和内弹力层可作为物理屏障限制基因载体的穿透,血流的稀释作用也会影响转移效率。最近有报告用包绕动脉的套管通过外膜达到向动脉壁进行基因转移的新方法。其优点是表达载体保持较高浓度,始终与外膜紧密接触,并可保持内皮细胞完整(血管内转移法使内皮细胞脱落程度不同)。此法除外膜和平滑肌细胞层外,内皮细胞也能获得不同程度的转化。因而也适用于改变血管内皮功能的基因治疗或表达分泌性蛋白质,通过弥散而作用于动脉壁的其他部位<sup>[8]</sup>。汤健等<sup>[9]</sup>近年创建了基因缝线、基因气囊导管、基因支架、基因电针及内皮细胞介导的基因转移等六种新的直接基因转移法,使心血管系统的基因转移更为安全有效。

### 3 心血管疾病基因治疗基础研究的进展

#### 3.1 抗血管内膜增殖

大量研究表明,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)激活、增殖和迁移是动脉粥样硬化发生发展的重要因素,也是血管重建术后再狭窄的主要原因。VSMC通常是静止的,细胞周转率仅0.1%细胞/天。直接机械损伤或

由邻近血小板、巨噬细胞或内皮细胞分泌的促丝裂因子如血小板源性生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子和胰岛素样生长因子-1 均可激活细胞内信号传导通路而启动细胞周期。细胞周期的运转又受多种细胞核蛋白和激酶的调控,包括成视网膜细胞瘤抑制蛋白、转录因子 *e2f*、细胞周期素依赖性激酶、增殖细胞核抗原(*proliferating cell nuclear antigen*, PCNA) 和 *p21* 及 *p53* 蛋白等。适当调节这些细胞内、外因子的表达水平即可控制 VSMC 的病理性增殖。Dzau 等<sup>[4]</sup>通过 HVJ 脂质体将 PCNA 和细胞分裂周期激酶的反义寡核苷酸(*oligodeoxynucleotide*, ODN) 转染人气囊损伤的在体大鼠颈动脉,二周后新生内膜形成被完全抑制;一次转染后的抑制率持续达 8 周。在大鼠颈动脉血管成形术后应用 *c-myc* 或 *c-myb* 反义核苷酸也获得了显著的效果<sup>[2]</sup>。其他报告减少气囊损伤后 VSMC 增殖的方法尚有:腺病毒载体导入自杀基因如单纯疱疹病毒胸苷嘧啶基因或胞嘧啶脱氨酶基因;腺病毒介导生长终止特异性同源盒基因;HVJ 脂质体介导内皮细胞一氧化氮合酶基因;腺病毒介导 *ras* 信号转导蛋白突变基因;逆转录病毒载体导入诱导性一氧化氮合酶基因;以及重组腺病毒介导成视网膜细胞瘤抑制蛋白基因或 *p21* 蛋白基因<sup>[2]</sup>。其中成视网膜细胞瘤和 *p21* 系作用于多种细胞核蛋白调控细胞增殖的共同通路,因而效果较佳。

### 3.2 抗血栓形成

冠状动脉内局部血栓形成是心肌梗死的常见原因之一,也是血管成形术后再狭窄的另一重要诱因。血管内皮细胞和平滑肌细胞均为抗血栓形成的靶细胞。前者直接与血液组分接触,而后者则在斑块出血、纤维帽破裂或医源性内皮损伤时暴露于血液。减少血栓性病变的一种策略是改变组织型纤溶酶原激活物(*tissue plasminogen activator*, TPA) 与其抑制物(*plasminogen activator inhibitor 1*, PAI-1) 之间的平衡有利于血栓溶解。用逆转录病毒载体在体外将人 TPA 基因转移至人血管内皮细胞和平滑肌细胞内可增高 TPA 分泌,并增加纤溶活性。腺病毒介导的 TPA 基因转移,也使 TPA 基因缺陷小鼠和过度表达 PAI-1 小鼠的纤溶活性明显增强<sup>[10]</sup>。血管环氧化酶(*cyclooxygenase 1*, COX-1) 是  $PGI_2$  合成的限速酶,后者抑制血小板聚集,并维持平滑肌细胞松弛。用腺病毒载体将 COX-1 基因导入猪受损颈动脉,结果  $PGI_2$  合成增高,防止血管成形术诱发的血栓形成<sup>[11]</sup>。已知水蛭素是血栓形成的有效抑制剂,Rade 等<sup>[12]</sup>在大鼠颈动脉损伤模型中通过重组腺病毒载体表达水蛭素基因,抑制血栓形成,使新生内膜形成减少 35%。

### 3.3 缺血/再灌注损伤和心肌梗死

通过遗传修饰使心脏的纤维母细胞转化为肌性表型是使已发生梗死的心肌恢复功能的可能途径。Murry 等<sup>[13]</sup>将带有肌源性基因 *Myo D* 的腺病毒载体注入心肌损伤后开始修复的肉芽组织,发现 *Myo D* 还能诱导其他肌特异性基因(肌浆蛋白和胚胎骨骼肌 MHC) 同时表达,提示利用此法有可能为心肌梗死区提供新的收缩性组织而不是疤痕组织。Schneider 等<sup>[14]</sup>则提出向心肌细胞提供重新进入细胞周期所

必需的遗传信息,使之增殖而修复梗死区。Li 等<sup>[3]</sup>采用抗氧化基因治疗以减轻兔心肌缺血/再灌注损伤,方法是借助腺病毒载体介导使肝细胞产生和分泌超生理水平的细胞外超氧化物歧化酶,然后注射肝素使之从结合部位释放至血液,结果实验动物的心肌对缺血/再灌注损伤的抵御能力明显增强。

### 3.4 高血压的基因治疗

肾素-血管紧张素-醛固酮系统中的基因是高血压基因治疗中很有希望的目的基因。例如,采用有效载体使肝细胞产生足量的  $AT_1$  受体拮抗剂或  $\beta$ -阻滞剂可能是一个值得一试的方法。Chen 等<sup>[15]</sup>探索了激肽释放酶-激肽系统与肾素-血管紧张素-醛固酮系统之间互相依赖的关系。他们用腺病毒载体介导使自发性高血压大鼠表达人激肽释放酶结合蛋白 *Kallistatin*,后者为丝氨酸蛋白酶抑制剂,能结合并抑制组织激肽释放酶,使高血压大鼠的血压明显下降,持续达 4 周以上,Niranjan 等<sup>[16]</sup>观察到将带有内皮素-1 基因的腺病毒载体注入大鼠,可使其血浆内皮素含量增高六倍,伴血压明显升高;阻断内皮素受体又可使血压恢复正常。Schiffrin 等<sup>[17]</sup>也发现某些高血压患者动脉中内皮素-1 基因表达增强,表明 ET 受体拮抗剂可能对此类患者有效。

### 3.5 心力衰竭的基因治疗

各种心血管疾病的晚期均可能导致充血性心力衰竭。显然,纠正原始病因是防止心衰发生的根本,基因治疗并非没有用武之地。已证实某些神经激素和细胞因子在介导疾病的进一步发展和导致心率紊乱中所起的作用<sup>[18]</sup>,通过基因转移表达致病神经激素或细胞因子的特异性拮抗物或其受体的竞争性抑制物,有可能阻止病情恶化。Kubota 等<sup>[19]</sup>观察到心肌特异性过度表达  $TNF-\alpha$  的转基因小鼠出现十分类似于充血性心力衰竭的表型,提示控制心肌内  $TNF$  表达应该是有益的。心肌细胞去极化延迟是衰竭心脏发生致命性心律失常的重要原因。有报告用腺病毒载体介导的方法使衰竭的狗心肌细胞钾通道缺损获得逆转,表明基因治疗可改变成年哺乳类心肌细胞的电生理特性,纠正其兴奋性和收缩性方面的紊乱<sup>[20]</sup>。Hajjar 等<sup>[21]</sup>将肌浆网钙泵通过腺病毒载体转移入大鼠离体心肌细胞,发现舒张期缩短而收缩性增强,提示有可能改善衰竭心肌的功能。

### 3.6 外周血管梗塞的基因治疗

外周血管梗塞除影响局部功能外,尚可能导致截肢等严重后果。在受累部位刺激血管新生是较为理想的治疗方法。动物实验已证实血管内皮细胞生长因子(*vascular endothelial growth factor*, VEGF) 具有血管发生作用。将含有 VEGF 表达载体的水凝胶涂敷于血管导管气囊表面即可实现 VEGF 基因的定向转移。有关临床 I 期实验正在进行中<sup>[22]</sup>。

### 3.7 脂代谢异常的基因治疗

研究表明某些脂蛋白,如低密度脂蛋白、氧化型低密度脂蛋白,脂蛋白(a) 和富含甘油三酯脂蛋白残体具有高度致动脉粥样硬化作用,而另一些(如高密度脂蛋白) 则有保护作用。用基因转移方法针对性地调节这些脂蛋白的水平能有效防止动脉粥样硬化进展甚至促进病灶消退。在实验动物

模型已证实有效的候选基因及其主要作用见表 1。由于这些基因在体内多以肝为主要表达场所,故在体细胞基因治疗中多以肝细胞为靶细胞。其中体外法低密度脂蛋白受体基因转移治疗家族性高胆固醇血症已在临床获得初步成功,并证实为安全可靠<sup>[23]</sup>。

表 1. 防治脂代谢异常的候选基因

候选基因	主要功能
LDL receptor	加速肝对 IDL/LDL 摄取 <sup>[23]</sup>
VLDL receptor	加速肝对 VLDL 摄取 <sup>[24]</sup>
cholesterol 7 $\alpha$ hydroxylase	将胆固醇转化为胆汁酸 <sup>[25]</sup>
apo A-I	升高 HDL 水平, 激活 LCAT <sup>[26]</sup>
apo B/E-C-I	减少 apo B100 生成; 降低 LP(a) 水平 <sup>[27]</sup>
apo E	加速肝对含 apo E 脂蛋白摄取 <sup>[28]</sup>
LCAT	升高 HDL 水平, 促进胆固醇逆转运 <sup>[29]</sup>
LPL	加速富含 TG 脂蛋白清除 <sup>[30]</sup>

#### 4 结语

目前基因治疗应用于心血管疾病临床的主要障碍在于基因转移技术,特别是尚缺乏绝对安全、高效而且可以调控的表达载体,但以上众多的心血管疾病基因治疗基础研究已向我们展示了基因治疗在防治心血管疾病应用方面的广阔前景。正在顺利进行的人类基因组计划还将进一步阐明各个基因在相应疾病发生中的作用,使基因治疗更具针对性。可以相信,随着基因转移技术难点的逐步克服,基因治疗必将成为人类战胜包括心血管疾病在内一切疾病的重要手段之一。

#### 参考文献

- Jin L, Zhang JJ, Chao J, et al. Gene therapy in hypertension: adenovirus-mediated kallikrein gene delivery in hypertensive rats. *Hum Gene Ther*, 1997, **8**: 1 753- 761
- Leiden JM. Cytostatic gene transfer for vascular proliferative disorders. *J Vasc Surg*, 1996, **24**: 163- 168
- Li Q, Bolli R, Qiu Y, et al. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase alleviates myocardial stunning in conscious rabbits. *Circulation*, 1997, **96**: 17- 41
- Dzau VJ, Mann MJ, Morishita R, et al. Fusigenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 1 421- 425
- Gerard RD, Chan L. Adenovirus-mediated gene transfer strategies and applications in lipoprotein research. *Curr Opin Lipidol*, 1996, **7**: 105 - 111
- Miller N, Whelan J. Progress in transcriptionally targeted and regulatable vectors for genetic therapy. *Hum Gene Ther*, 1997, **8**: 803- 815
- Dunn PF, Newman KD, Jones M, et al. Seeding of vascular grafts with genetically modified endothelial cells: Secretion of recombinant TPA results in decreased seeded cell retention in vitro and in vivo. *Circ*, 1996, **93**(7): 1 439- 466
- Laitinen M, Pakkanen T, Donetti E, et al. Gene transfer into the carotid artery using an adventitial collar: Comparison of the effectiveness of the plasmid-liposome complexes, retrovirus, pseudotyped retrovirus and adenoviruses. *Hum Gene Ther*, 1997, **8**: 1 645- 650
- 汤健,秦阳君,陈光慧. 肌肉介导的基因转移 DNA 药物及其在心血管疾病中的应用. *中华医学杂志*, 1997, **77**: 798- 800
- Carmeliet P, Stassen JM, Van Vlaenderen I, et al. Adenovirus-mediated transfer of tissue-type plasminogen activator augments thrombolysis in tissue-type plasminogen activator-deficient and plasminogen activator inhibitor-1-overexpressing mice. *Blood*, 1997, **90**: 1 527- 534
- Zoldhelyi P, McNatt J, Xu XM, et al. Prevention of arterial thrombosis by Adenovirus-mediated transfer of cyclooxygenase gene. *Circ*, 1996, **93**: 10- 17
- Rade JJ, Schulick AH, Vimmani K, et al. Local adenovirus-mediated expression of recombinant hirudin reduces neointima formation after arterial injury. *Nat Med*, 1996, **2**: 293- 298
- Murry CE, Kay MA, Bartosek T, et al. Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with Myo D. *J Clin Invest*, 1996, **98**: 2 209- 217
- Schneider MD. Myocardial infarction as a problem of growth control cell cycle therapy for cardiac myocytes. *J Card Fail*, 1996, **2**: 259 - 263
- Chen LM, Chao L, Chao J. Adenovirus-mediated delivery of human kallistatin gene reduces blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Hum Gene Ther*, 1997, **8**: 341- 347
- Niranjan V, Telemaque S, de Wit D, et al. Systemic hypertension induced by hepatic overexpression of human preproendothelin-1 in rats. *J Clin Invest*, 1996, **98**: 2 364- 372
- Schiffirin EL, Deng LY, Sventek P, et al. Enhanced expression of endothelin-1 gene in resistance arteries in severe human essential hypertension. *J Hypertens*, 1997, **15**: 57- 63
- Shan K, Kurrelmyer K, Seta Y, et al. The role of cytokines in disease progression in heart failure. *Curr Opin Cardiol*, 1997, **12**: 218
- Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res*, 1997, **81**: 627- 635
- Nuss HB, Johns DC, Kaab S, et al. Reversal of potassium channel deficiency in cells from failing hearts by adenoviral gene transfer a prototype for gene therapy for disorders of cardiac excitability and contractility. *Gene Ther*, 1996, **3**: 900- 912
- Hajjar RJ, Kang JX, Gwathmey JK, et al. Physiological effects of adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in isolated rat myocytes. *Circulation*, 1997, **95**: 423- 429
- Isner JM, Walsh K, Symes J, et al. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circ*, 1995, **91**: 2 687- 692
- Raper SE, Grossman M, Rader DJ, et al. Safety and feasibility of liver-directed ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Annals of Surgery*, 1996, **223**: 116- 126

- 24 Kobayashi K, Oka K, Forte T, et al. Reversal of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice by adenovirus-mediated gene transfer of the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 6 851- 860
- 25 Spady DK, Cuthbert JA, Willard MN, et al. Adenovirus-mediated transfer of a gene encoding cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase into hamsters increases hepatic enzyme activity and reduces plasma total and low density lipoprotein cholesterol. *J Clin invest*, 1995, **96**: 700- 709
- 26 Talleux A, Hennuyer N, Caillaud JM, et al. Protective effect of human apoA1 overexpression on atherosclerosis in transgenic rabbit. *Atherosclerosis*, 1997, **134** (1, 2): 35- 40
- 27 Hughes SD, Rouy D, Navaratnam N, et al. Gene transfer of cytidine deaminase apoBEC-1 lowers lipoprotein (a) in transgenic mice and induces apolipoprotein B editing in rabbits. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**: 39- 49
- 28 Stevenson SC, Marshall-Neff J, Teng B, et al. Phenotypic correction of hypercholesterolemia in apoE-deficient mice by adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Arterioscler Thromb*, 1995, **15**: 479- 484
- 29 Brousseau ME, Wang J, Demosky SJ, et al. Correction of hypoalphalipoproteinemia in LDL receptor deficiency by lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT). *Atherosclerosis*, 1997, **134**: 32- 34
- 30 Zsigmond E, Kobayashi K, Tzung KW, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of human lipoprotein lipase ameliorates the hyperlipidemias associated with apolipoprotein E and LDL receptor deficiencies in mice. *Hum Gene Ther*, 1997, **8**: 1 921- 933
- (此文 1999- 01- 17 收到, 1999- 05- 17 修回)
- (此文编辑 文玉珊)