

细胞周期基因调控策略在血管成形术后 再狭窄防治中的应用

李浪综述, 冯建章审校

(广东省心血管病研究所 广东省人民医院霍英东心脏中心, 广东省广州市 510100)

[主题词] 细胞周期; 基因治疗; 肌, 平滑; 血管成形术; 再狭窄

[摘要] 血管成形术后再狭窄的主要病理特征是血管平滑肌细胞过度增殖。血管平滑肌细胞增殖有其自身调控机制, 应用细胞周期调控基因预防血管成形术后再狭窄是近年研究的新思路和热点, 本文综述了该领域的最新进展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

经皮冠状动脉腔内成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 是治疗冠心病最有效的非手术方法, 开创了介入性心脏病学的新纪元。然而其术后 3~6 个月高达 30%~50% 的再狭窄率严重影响了 PTCA 的远期疗效。近 10 年来, 全球针对再狭窄展开了广泛、深入的研究, 各种介入方法及有关药物均试用于再狭窄的防治。迄今为止, 尚未发现获得满意临床疗效的药物, 而介入治疗也仅有血管内支架植入可降低再狭窄率, 仍未控制到满意水平。随着分子生物学的发展, 人们对再狭窄机制及其防治的研究有望从基因水平取得突破。

1 经皮冠状动脉腔内成形术后再狭窄的机理

1.1 内膜增生学说

传统的内膜增生学说认为, PTCA 损伤血管内皮细胞, 破坏内弹力层, 中膜断裂, 血小板聚集到血管损伤部位, 形成血栓, 并释放血管活性因子和有丝分裂生长因子, 导致血管痉挛及平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 增殖并向内膜下迁移, 最终导致血管内膜增生^[1]。动物实验、人体尸检及在体冠状动脉再狭窄血管标本的研究证实了上述观点^[2,3]。

1.2 血管重塑学说

近年来随着血管内超声和计量组织学的发展, 提出了血管重塑 (vascular remodeling) 的新观点。血管重塑是指血管受血液动力学/体液因素的影响而发生的血管结构适应性改变和重建的过程, 血管重塑的结果包括血管横截面积增加所致的代偿性血管增粗和血管腔面积减少所致的慢性回缩^[4]。血管重塑的研究方法主要是测量内弹力膜包围面积的改变。近年来, 不少实验及临床研究证实了血管重塑在 PTCA 术后再狭窄发生中的重要性。Kakuta 等^[5]对血管形成术后即刻和 4 周处死的高胆固醇血症兔的髂动脉作定量组织学比较

发现: 4 周内弹力膜包围面积增加 20%, 内膜面积增加 0.82 mm², 但管腔面积仅减少 0.34 mm², 说明血管代偿性增粗可以减少管腔狭窄; 将兔模型分为再狭窄组和非再狭窄组比较, 发现再狭窄组血管内膜横截面积增加值大于内弹力膜包围的横截面积增加值, 最终导致管腔横截面积减少, 而非再狭窄组内弹力膜包围的横截面积增加值大于内膜增加值。所以, 管腔横截面积未见减少。Lafont 等^[6]研究则说明 77%~86% 的血管腔面积减少源于血管重塑而非内膜增生为主。Kimura 等^[7]应用冠状动脉内超声检查 PTCA 术前、术后即刻、术后 24 h 并随访术后 1 个月及 6 个月的冠脉病变部位, 发现术后 1 个月内, PTCA 部位管腔内径增大, 随后外弹力板包围面积逐渐减少, 管腔直径随之减少, 至 6 个月时管腔已明显缩小, 提示血管重塑所致的慢性回缩是再狭窄的主要原因。

1.3 细胞凋亡学说

细胞凋亡 (apoptosis) 是由基因控制的细胞主动死亡过程, 对机体调控发育和维护内环境稳定具有重要意义^[8]。原癌基因是 SMC 增殖的触发和调控因素, 而抑癌基因则反馈抑制 SMC 的过度增殖, 并促进细胞凋亡。两者平衡协调才能维持细胞的正常增殖。目前认为球囊对血管的机械性损伤、血栓形成及血管活性因子和促有丝分裂因子等多种因素可激活原癌基因的表达, 抑制抑癌基因活性, 启动细胞增殖信号传递系统, 使 SMC 过度增殖和迁移, 而 SMC 凋亡不足和不能及时清除增殖过剩细胞导致再狭窄发生^[9]。已证实, *c-fos* 和 *c-myc* 是动脉损伤的早期表达基因, 当 SMC 受到有丝分裂因子刺激 2~4 h 即可迅速诱导 *c-myc* 表达至高峰, 随后可维持表达几个细胞循环。因此, *c-myc* 在细胞增殖周期发挥启动和维持的双重作用, 而 *c-fos* 可诱导 *c-myc* 表达^[10]。调控细胞凋亡还有以下重要基因, 抑制凋亡如 *bcl-2*、*ced-9*、*ras* 等, 促进凋亡如 *P53*、*c-myc*、*Rb* 等。

综上所述, PTCA 术后再狭窄机制尚未完全明了。在再狭窄发病机制中, 内膜增生与血管重塑的作用孰轻孰重仍存争议, 目前比较趋向的观点认为内膜增生与血管重塑协同作用导致了再狭窄的发生, 两者均为再狭窄防治的重要目标,

[作者简介] 李浪, 男, 30 岁, 广东梅州人, 主治医师, 心血管内科博士, 主要从事冠心病发病机制和防治的研究。冯建章, 研究员, 中华心血管学会副主任委员, 广东省心血管学会主任委员, 博士生导师。

而 SMC 凋亡相对减少在再狭窄发生过程中也具有重要意义。

2 细胞周期调控机制

细胞周期分为 G1 期(DNA 合成准备期)、S 期(DNA 合成期)、G2 期(有丝分裂准备期)和 M 期(有丝分裂期)。在哺乳动物的整个细胞周期调控中,G1→S 期的调控是至关重要的核心过程,它决定细胞对外界增殖信号如各种生长因子等的加工、反应,决定细胞是进入有丝分裂,还是发生凋亡抑或进入静止期 G0 期,修复损伤 DNA^[11]。在细胞周期 G1→S 期的调控中,存在正、负两种调控。所谓正调控,即促进细胞 G1→S 期转变过程。视网膜母细胞瘤基因(Rb)是正调控的中心,其调控模式如下:外界促细胞增殖信号激活细胞表面受体,通过第二信使传递信号促进细胞周期素(cyclin)基因表达,cyclin 与对应的细胞周期依赖性激酶(cyclindependent-kinase, CDK)结合形成 cyclin-CDK 复合物,cyclin-CDK 复合物对 Rb 基因表达的 Rb 蛋白磷酸化,磷酸化的 Rb 蛋白失去活性,释放与其结合并处于活性抑制状态的转录因子 E2F,游离的 E2F 恢复其活性,进入细胞核启动一系列基因表达,如 *c-myc*、*cdc-2*、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和胸腺嘧啶核苷激酶等,促进细胞完成 G1→S 转变^[12]。所谓负调控,是指抑癌基因调控细胞程序化死亡或凋亡的过程,它在维持自身稳定、防止细胞过度增殖方面发挥重要作用。新近研究表明,参与 G1→S 期调控的重要抑癌基因包括 P53、P21、P15、P16、P27 及 Rb 等,它们的主要作用机制是抑制 cyclin-CDK 复合物活性,防止 Rb 磷酸化,从而阻止细胞进入 DNA 合成期。细胞周期正、负调控平衡协调,维持细胞增殖的正常进行。显而易见,当这种平衡被打破时,细胞将获得增殖优势。

3 细胞周期调控基因在再狭窄防治中的应用

随着细胞周期调控机制的深入研究,人们尝试采用细胞周期调控原理防治再狭窄并取得了引人注目的成果。细胞周期调控的主要原理是抑制 SMC 过度增殖和诱导已增殖过剩 SMC 凋亡。迄今为止,已有下列基因调控措施应用于再狭窄的实验性治疗并获得成功。

3.1 反义核酸技术

反义核酸技术是根据碱基互补、配对原理,用特定互补的 DNA 或 RNA 片段与靶基因或其表达的 mRNA 结合,从而抑制靶基因转录或翻译。其中,反义寡核苷酸技术的研究最为广泛和深入。大鼠颈动脉球囊损伤后,细胞周期调节的关键酶 CDK2 与 *cdc-2* 激酶激活可能导致血管平滑肌细胞增殖。Morishita 等^[13]合成了 CDK2 的反义寡核苷酸,以病毒 HVJ-脂质体为介导,转染到大鼠损伤颈动脉。转染 2 周即发现内膜增生被显著抑制(抑制率达 60%),单独应用 *cdc-2* 激酶的反义寡核苷酸治疗,内膜增生仅减少 10%,而两者联合应用内膜增生几乎被完全抑制。Suzuki 等^[14]在新近研究中也证实了 HVJ-脂质体介导的 CDK2 反义寡核苷酸对移植冠状动脉内膜增生的抑制作用。④PCNA 是一种核内蛋白,

作为 DNA 聚合酶的辅助因子协助 DNA 的合成,促进细胞进入 S 期。当细胞在 G0 或 G1 期时基本不表达,而在 S 期时表达,这是细胞增殖的标志。Simons 等^[15]采用合成的 PCNA 反义寡核苷酸抑制大鼠颈动脉损伤后的血管内膜增生,结果表明 SMC 的增殖受到显著抑制。④癌基因存在所有细胞中,通过接收、传递、放大细胞信号,编码关键蛋白质调节 SMC 的增殖。癌基因 *c-myb*、*c-myc* 编码调节细胞增殖与分化的 DNA 结合蛋白,具有静止期 SMC 低表达和增殖期 SMC 高表达的特点。研究已证实 *c-myc* 和 *c-myb* 的反义寡核苷酸既可有效抑制体外培养的 SMC 增殖,也可有效抑制动脉损伤后再狭窄的形成^[16,17],并发现 *cdc-25A* 的表达可调节 *c-myc* 介导的细胞凋亡的能力^[18]。人 MAT1 基因是 CDK 激酶的下游作用目标,当给培养的兔的主动脉平滑肌细胞转染反义 MAT1RNA 后,发现 MAT1 基因表达减少,细胞增殖明显延迟。这种效应是由于反义 MAT1RNA 导致细胞 G1 期阻滞和细胞凋亡所致^[19]。E2F 是一种重要的转录因子,可激活一系列细胞周期调节基因表达,如 *c-myb*、*cdc-2* 和 *PCNA* 等,促进细胞增殖。Morishita 等^[20]采用人工合成的与 E2F 具有高度亲和力的双链互补 DNA 竞争结合游离的 E2F,形成稳定复合物,从而抑制 E2F 活性。研究表明,SMC 增殖受到明显抑制,有效抑制期长达 8 周之久。

3.2 抑癌基因转染

抑癌基因(tumor suppressor gene)在正常情况下不表达或弱表达,而当癌基因被激活,细胞处于增殖旺盛状态时,抑癌基因表达将随之活跃,以抑制癌基因过度表达所致的细胞过度增殖。当抑癌基因由于突变、缺失或甲基化而导致表达下降,抑癌基因与癌基因的平衡被打破时,细胞将获得增殖优势。目前获得成功的目标抑癌基因包括 P53、P21、Rb 和 P27 等。P53 基因编码细胞周期调节的关键蛋白,通过激活 P21 发挥抑制 cyclins 的活性。Aoki 等^[21]为证实 P53 对 SMC 增殖的作用,采用反义 P53 转染人 SMC,发现 SMC 的 DNA 合成较对照组明显增加,细胞数量也显著增多。Yoshikazu 等^[22]观察了以 HVJ/脂质体为载体,P53 基因转染对体外培养牛的 SMC 增殖的影响。转染 2 天后,SMC 的增殖明显减弱,5 天后,几乎所有的细胞出现 G1 期停滞。体内转染 P53 基因也能有效抑制兔颈动脉球囊损伤后内膜增生。Matsushita 等^[23]观察了 P21 基因转染对人血管平滑肌细胞增殖的抑制作用,发现 P21 基因通过 HVJ/脂质体的载体成功转染后,人的 SMC 增殖被明显抑制,并出现了细胞凋亡的特征性表现如细胞皱缩等,提示 P21 基因转染抑制 SMC 增殖的作用,除 P21 阻滞细胞周期进程外,还与诱导 SMC 凋亡密切相关。Chang 等^[24]还观察到以腺病毒为载体联合应用 P21 基因和 Rb 基因转染成功抑制 SMC 增殖,其机理为使细胞增殖停滞在 G1 期,抑制 P21/PCNA 复合物的形成。新近研究还表明,P21 还具有抑制 VSMC 移行的作用。Fubui 等^[25]将 P21 基因转染到家兔主动脉平滑肌细胞后发现,P21 可抑制 α -actin, integrin β 5 β 1 和 vinculin 等细胞骨架蛋白的伸展,转染 P21 的 SMC 仍能保持原形,说明 P21 限制了 SMC 伸展和移行,其机理可能为 P21 抑制了 SMC 与细胞外基质之间的粘附。如前所述,

Rb 基因在细胞增殖调控中起关键作用,磷酸化是 Rb 蛋白的主要调节形式。以腺病毒载体介导的 Rb 基因可抑制体外培养的 SMC 生长,减少合成后期和分裂期细胞量^[26]。在体实验则进一步观察到腺病毒载体介导的 Rb 基因能快速有效地导入球囊拉伤的鼠颈动脉 SMC 并表达,成功转染后可有效抑止球囊拉伤所致的 SMC 增殖和内膜增厚^[27]。近年发现 P27kip1 基因在细胞周期负调控中发挥重要作用,可抑制多种 cyclin-CDK 复合物活性。研究表明 P27kip1 基因转染 SMC 可明显抑制 SMC 增殖,SMC 多被终止于 G1 期^[28]。

4 结 语

基因治疗再狭窄已展示了美好的临床应用前景,但目前需要解决一些问题。再狭窄是多因素作用的结果,需阐明各基因在再狭窄发生中的作用和地位,使治疗更具针对性。即将完成的人类基因组计划有望最终解决这一难题,届时目的基因的选择将更具针对性和个性。④需构建更安全、高效及可调控的载体,以早日应用于临床。目前正在尝试对腺病毒载体的改良如将其 E1、E2、E4 区或 E1、E4 区一并切除,有望克服其产生抗体的缺点。腺相关病毒载体等新型载体的出现和完善,也为研究增添了新的曙光。基因疗法诱导新生血管再生治疗心肌梗死的临床研究已取得成功,成为本世纪最有希望进入临床常规治疗的基因工程疗法^[29],相信基因治疗再狭窄的临床应用也不会太遥远。

参考文献

- [1] Casscells W. Migration of smooth muscle cells and endothelial cell; critical events in restenosis [J]. *Circulation*, 1992, **86**: 723-729
- [2] Nobuyoshi M, Kimura T, Ohishi H, et al. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: pathologic observations in 20 patients [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1991, **17**: 433-439
- [3] Safian RD, Gelbfish JS, Emy RE, et al. Coronary atherectomy: clinical, angiographic and histological findings and observation regarding potential mechanisms [J]. *Circulation*, 1991, **82**: 69-79
- [4] Currier JW, Faxon DP. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: have we been aiming at the wrong target [J]? *J Am Coll Cardiol*, 1995, **25**: 516-520
- [5] Kakuta T, Currier JW, Haudenschild CC, et al. Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation account for restenosis after angioplasty: a study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig [J]. *Circulation*, 1994, **89**: 2 809-815
- [6] Lafont A, Guzman LA, Whitlow PL, et al. Restenosis after experimental angioplasty, intimal, medial and adventitial changes associated with constrictive remodeling [J]. *Circ Res*, 1995, **76**: 996-1 002
- [7] Kimura T, Kaburagi S, Yokoi H, et al. Time course of vessel response after coronary angioplasty final results of serial ultrasound restenosis (SURE) study [J]. *Circulation*, 1996, **94**(Suppl): I-135
- [8] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. *Science*, 1995, **267**: 1 456-462
- [9] Epstein SE, Speri E, Unger EF, et al. The basis of molecular strategies for treating coronary restenosis after angioplasty [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1994, **23**: 1 278-288
- [10] Bennett MR, Anglin S, McEwan JR, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by c-myc antisense oligodeoxynucleotides [J]. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 820-828
- [11] Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer ③ cyclin D and CDK inhibitors come of age [J]. *Cell*, 1994, **79**: 573-582
- [12] Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control [J]. *Cell*, 1995, **81**: 323-330
- [13] Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, et al. Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense kinase oligonucleotides [J]. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 1 458-464
- [14] Suzuki J, Isobe M, Morishita R, et al. Prevention of graft coronary arteriosclerosis by antisense cdk2 kinase oligonucleotide [J]. *Nature Medicine*, 1997, **3**: 900-903
- [15] Simons M, Edelman E, Rosenberg R. Antisense proliferating cell nuclear antigen oligonucleotides inhibit intimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model [J]. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 2 351-356
- [16] Shi Y, Fard A, Galeo A, et al. Transcatheter delivery of c-myc antisense oligomers reduces neointimal formation in a porcine model of coronary artery balloon injury [J]. *Circulation*, 1994, **90**: 944-951
- [17] Guwn J, Holt CM, Francis SE, et al. The effect of oligonucleotides to c-myc on vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after porcine coronary angioplasty [J]. *Circ Res*, 1997, **80**: 520-531
- [18] Macdonald K, Bennett MR. cdc25A is necessary but not sufficient for optimal c-myc induced apoptosis and cell proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 1999, **84**: 820-830
- [19] Wu L, Chen P, Hwang JJ, et al. RNA antisense abrogation of MAT1 induces G1 phase arrest and triggers apoptosis in aortic smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 5 564-572
- [20] Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, et al. A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 5 855-859
- [21] Aoki M, Morishita R, Matsushita H, et al. Inhibition of the p53 tumor suppressor gene results in growth of human aortic vascular cells: potential role of p53 in regulation of vascular smooth muscle cell growth [J]. *Hypertension*, 1999, **34**: 192-200
- [22] Yoshikazu, Yonemitsu, Yasufumi K, et al. Transfer of wild-Type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo [J]. *Circ Res*, 1998, **82**: 147-156
- [23] Matsushita H, Morishita R, Kida I, et al. Inhibition of growth of human vascular smooth cells by overexpression of p21 gene through induction of apoptosis [J]. *Hypertension*, 1998, **31**(1 pt 2): 493-498
- [24] Chang MW, Barr E, Lu MM, et al. Adenovirus mediated over expression of the cyclin/ cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and formation neointima in the rat carotid artery model of balloon angioplasty [J]. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 2 260-268
- [25] Fukui R, Shibata N, Kohbayashi E, et al. Inhibition of smooth

- muscle cell migration by the p21 cyclin- dependent kinase inhibitor [J]. *Atherosclerosis*, 1997, **132**: 53- 59
- [26] 夏永静, 蒋 雷, 梨 健. Rb 基因对血管平滑肌细胞生长抑制作用的研究 [J]. 中华医学杂志, 1997, **77**: 252- 255
- [27] Smith RC, Wills KN, Antelman D, et al. Adenoviral constructs encoding phosphorylation- competent full length and truncated forms of the human retinoblastoma protein inhibit myocyte proliferation and neointima formation [J]. *Circulation*, 1997, **96**: 1 899- 905
- [28] 潘晓明, 章卫平, 吴宗贵, 等. 腺病毒介导的人 P27kip1 基因高表达对大鼠血管平滑肌细胞增殖的抑制作用 [J]. 中华医学杂志, 2000, **80**: 312- 313
- [29] Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, et al. Angiogenesis gene therapy : phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expression VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease [J]. *Circulation*, 1999, **100**: 468- 474
- (此文 2000- 02- 28 收到, 2000- 07- 25 修回)
- (此文编辑 朱雯霞)