

血管内皮生长因子在冠心病中的应用前景

刘启功 综述, 汪道文, 陆再英 审校

(华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科, 湖北省武汉市 430030)

[主题词] 冠状动脉疾病; 内皮生长因子; 治疗

[摘要] 血管内皮生长因子能高效特异促进血管内皮细胞分裂和增殖, 迅速有效地促进缺血区侧枝循环的建立, 加速损伤血管内皮的迅速修复, 有利于激光隧道的内皮化, 在促进缺血心肌更新供血、预防冠状动脉成形术后再狭窄和提高激光心肌血运重建疗效方面起重要作用, 在冠心病的治疗中展现出良好的应用前景。

[中图分类号] R543.1

[文献标识码] A

[作者简介] 刘启功, 男, 1968年9月出生, 湖北省咸宁市人, 医学博士, 副教授, 研究方向为心脏电生理和心血管疾病的分子生物学。汪道文, 男, 1957年3月出生, 医学博士, 教授, 博士研究生导师。陆再英, 女, 1934年11月出生, 博士, 教授, 博士研究生导师, 博士后流动站心血管病专业负责人。

冠心病的发病率和致死率均较高, 经皮腔内冠状动脉成形术(percutan transluminal coronary angioplasty, PTCA) 和冠状动脉旁路移植术(coronary artery bypass grafting, CABG) 是目前较为有效的治疗手段之一, 但仍有部分病人不能接受, 且PTCA后3~6个月内再狭窄率高达30%~50%, 尚无理想的解

决办法。因此,促进冠状动脉侧枝循环的建立使缺血心肌达到更新供血和预防 PTCA 后再狭窄已成为冠心病目前的研究热点。激光心肌血运重建(transmyocardial laser revascularization, TMLR)虽然已成为 PTCA 和 CABG 的重要补充,但激光隧道的过早闭合又使其疗效大打折扣。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是近几年来发现的一种糖蛋白,能高效特异促进血管内皮细胞分裂和增殖。大量研究证明,VEGF 能迅速有效地促进缺血区侧枝循环的建立,加速损伤血管内皮的迅速修复,有利于激光隧道的内皮化,在促进缺血心肌更新供血、预防 PTCA 后再狭窄和提高 TMLR 疗效方面起重要作用,在冠心病的治疗中展现出诱人的应用前景。

1 血管内皮生长因子概述

血管内皮生长因子(VEGF)家族包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 和 VEGF-E,通常所说的 VEGF 是指 VEGF-A。VEGF 是一种糖蛋白,分子质量约 45 kDa,为同型二聚体,编码 VEGF 的基因位于 6p21.3,由 8 个外显子和 7 个内含子组成断裂基因,在转录和翻译过程中通过不同的剪接方式在人类至少形成五种亚型:VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF189 和 VEGF206,其中 VEGF165 为主要的生物活性形式。VEGF 能增加小血管壁的通透性,因此又称为血管通透因子(vascular permeability factor, VPF)。VEGF 以旁分泌和自分泌方式,通过三种具有酪氨酸激酶活性的受体 Flt-1、Flk-1/KDR 和 Flt-4,特异性地作用于靶细胞——血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)而发挥其作用^[1,2]。

2 血管内皮生长因子基因搭桥治疗冠心病

与 CABG 相对应,基因治疗促进缺血区侧枝循环的建立,称为“基因搭桥”、“分子搭桥”或“生物搭桥”。目前研究较多的有 VEGF、成纤维细胞生长因子和血管生成素,VEGF 除对 VEC 具有高度特异性外,还具备以下特点:VEGF 可通过肝素结合位点与细胞表面和细胞间质的硫酸肝素结合而延长其作用时间;VEGF 主要通过旁分泌方式起作用,还可通过自分泌方式起作用,即 VEC 可分泌 VEGF 并反过来作用于 VEC,使 VEGF 的作用放大^[1,2];心肌和骨骼肌缺血时不仅 VEGF 表达上调^[3,4],缺血区 VEC 上的 VEGF 受体表达也增强^[5],这样 VEGF 在靶区能发挥较好的效应,同时可避免非靶器官的负反应;VEGF 能抑制肿瘤坏死因子 α 、 H_2O_2 和缺氧多种因素诱导的 VEC 凋亡^[6,7],是对 VEGF 促进 VEC 增殖的重要补充;骨骼肌和心肌缺血时,在局部外源基因转移和表达效率增强^[8]。这些特性决定了 VEGF 用于治疗缺血性疾病有较好的疗效。

以美国波士顿著名心血管专家 Isner 教授等为首的众多实验小组进行了大量的动物实验研究,均证实 VEGF 能促进缺血区侧枝循环的建立,并能改善缺血区血流。经美国药品和食品管理局批准,Isner 教授等于 1994 年底率先将 VEGF 基因治疗方案正式应用于临床。他们首先选择那些慢性下肢

缺血患者作为治疗对象,证实不管是球囊导管转移,还是肌肉注射,较大剂量的 VEGF 均能促进缺血下肢形成侧枝循环,并能改善远端肢体的血流,且无明显副作用^[9-12]。

基于此,人们很快将 VEGF 应用于冠心病,初步结果显示 VEGF 治疗冠心病是安全、可行的。通常选择劳累性心绞痛(Ⅱ或Ⅲ级),放射性核素计算机断层摄影证实存在可逆的心肌缺血,常规药物疗效欠佳,具有多支血管病变,不适合 PTCA 或 CABG 的病人作为治疗对象。6 个月内进行成功的血管重建措施(PTCA 或 CABG);恶性肿瘤;眼底病变;左心室射血分数 < 20% 之一者除外。

2.1 携 hVEGF165 基因的质粒(phVEGF165)治疗冠心病^[13,14]

将 20 人平分为 2 组:125 μ g phVEGF165/人组和 250 μ g phVEGF165/人组,左前胸第 4 或 5 肋间微切口(8~10 cm),于左心室游离壁分 4 点心肌内注射,每点相距 1 cm,注射时持续经食管超声监测以免注射到室壁外。结果表明:平均手术时间 75 min,术后拔管时间 15~20 min,心肌注射时心率、血压、肺动脉压无改变,仅见单源性室性过早搏动,无急性心肌梗死,术中失血 < 50 mL,胸腔引流量 148 \pm 22 mL,平均住院时间 3.9 d;血 VEGF 水平术后升高,14 d 达高峰,术后 90 d 降至正常;术后 60 d,所有患者心绞痛缓解,术后 6 个月 70% 病人心绞痛消失,术后 30 d、60 d、90 d 和 6 月硝酸甘油用量较术前明显减少;放射性核素计算机断层摄影证实心肌缺血明显减轻,静息和负荷时缺血分数降低;冠状动脉造影显示侧枝血管增多,造影分数增加;心输出量术后短暂下降,术后 24 h 增加。

2.2 腺病毒载体介导 hVEGF121 基因治疗冠心病

以 E1 和 E3 区缺失的复制缺陷型重组五型腺病毒作为载体,以 hVEGF121 cDNA 作为目的基因,同样可促进冠心病患者冠状动脉侧枝循环的建立。Rosengart 等^[15,16]将 21 人分 2 组:A 组($n=15$) 在 CABG 的同时,对于 CABG 不能解决的缺血心肌进行心肌内注射,并分成不同剂量的 5 个亚组;B 组($n=6$) 为心肌内注射。从非缺血区到缺血区呈线状逐点心肌注射,每点 100 μ L,共 10 点,两点相距 1~1.5 cm。结果发现,A 组死亡 3 人,与心肌内基因注射无直接关系;无全身和心脏方面的副作用包括与腺病毒载体相关的副作用。所有病人心绞痛好转,术后 30 d 左心室造影和放射性核素计算机断层摄影显示局部室壁运动改善,心肌缺血减轻;B 组运动试验显示运动时间延长。

2.3 hVEGF 治疗冠心病^[17]

由于基因治疗冠心病的方法较复杂,有人试图采用静脉应用 hVEGF 来治疗冠心病。VIVA Trial 为一多中心、双盲、随机、安慰剂对照试验,观察 hVEGF165 对不适合 PTCA 或 CABG 的劳累性心绞痛患者的疗效。病人随机分成安慰剂对照组和不同剂量的 VEGF 组[17 ng/(kg·min) 和 50 ng/(kg·min)],首先冠状动脉输注 10 min,再分别于 3、6、9 d 后静脉滴注各 4 h。60 d 后,病人耐受良好,但与对照组比较,治疗组心绞痛无明显改善,运动耐量增加并不明显,放射性核素计算机断层摄影和磁共振造影显示心肌缺血无明显减轻。

尚在等待治疗后 120 d 的结果。

上述均为 I 期临床试验结果,而 ③期临床试验结果尚待时日。国内少数单位已开始 VEGF 基因搭桥治疗下肢缺血性疾病,但例数较少,且尚未正式报道,而 VEGF 基因搭桥治疗冠心病尚未开始。

3 血管内皮生长因子预防 PTCA 后再狭窄

3.1 血管内皮生长因子预防 PTCA 后再狭窄的机理

大量研究表明,再狭窄是动脉损伤后的愈合反应,是一个复杂的生物学过程,有多种因素参与,其中内皮细胞损伤是再狭窄的始动因素。因此,促进 PTCA 后损伤内皮的迅速修复有可能预防再狭窄。

血管内皮生长因子(VEGF)能高效、特异地促进 VEC 的分裂和增殖,有利于血管内皮恢复解剖上的完整性;能抑制肿瘤坏死因子- α 、 H_2O_2 和缺氧等多种因素诱导的 VEC 凋亡^[6,7],加速损伤内皮的修复;能促进 VEC 分泌一氧化氮和前列环素,抑制内皮素的分泌和血小板源性生长因子-B mRNA 的转录^[18,19],有利于内皮功能恢复正常:扩张血管,抑制血小板粘附和聚集,抗血栓,抑制血管平滑肌细胞增殖和移行,防止炎性细胞浸润和有害物质透入;能抑制胶原纤维和纤维粘连素的合成,促进胶原酶的分泌^[6,7],不利于基质沉积。这些作用干预了再狭窄形成的多个环节,且 VEGF 不同于其它生长因子,对血管平滑肌细胞和成纤维细胞无直接促增殖作用,不至于因此而加重动脉粥样硬化斑块和使 PTCA 后血管内膜与中膜过度增生影响治疗效果甚至使病情恶化。因此,VEGF 有望在预防 PTCA 后再狭窄中发挥重要作用。

3.2 血管内皮生长因子预防血管成形术后再狭窄的实验研究^[20-24]

众多学者利用球囊剥脱鼠颈动脉、兔颈动脉、兔股动脉、兔髂动脉内皮,局部给予 hVEGF165 或 phVEGF165 或缺失 E1 区的复制缺陷型重组五型腺病毒载体介导的 hVEGF165 基因,或局部植入 Palmaz-Schatz 支架,观察 3~4 周。与对照组相比,处理组血管段新生内皮面积/受损内膜面积明显增加,内皮修复和支架内皮化明显加快;血栓形成率和血栓性血管闭塞率明显减少;内膜面积/中膜面积、最大内膜厚度、最大中膜厚度和管腔狭窄程度明显减轻;损伤血管段对乙酰胆碱、5-羟色胺和硝普钠引起的舒缩反应更明显,接近于正常血管。一系列的动物实验表明,VEGF 能预防实验性血管成形术后再狭窄。

3.3 血管内皮生长因子预防 PTCA 后再狭窄的临床试验^[25]

KUOPIO Angioplasty Gene Transfer Trial(KAT Trial)是在芬兰进行的随机、双盲、安慰剂对照试验。病人入选标准为:30~75 岁,稳定心绞痛,主要冠状动脉直径狭窄 60%~99%,病变血管直径 3.0~4.0 mm,病变血管未作过 PTCA,无应用乙酰水杨酸和肝素的禁忌症。有弥漫性病变;主要冠状动脉闭塞或血栓形成;开口处病变;冠状动脉解剖复杂;分叉处病变;狭窄病变长度 > 2 cm;急性心肌梗死或不稳定心绞痛;糖尿病;恶性肿瘤者均除外。将 15 人分成 2 组:VEGF 组($n=10$)用 1 mg 质粒/脂质体介导的 VEGF 基因;对照组($n=$

5)用 1 mg 质粒/脂质体介导的 β -半乳糖苷基因或乳酸盐溶液。PTCA 后通过自灌注球囊(6 个大气压 10 min)进行基因转移,必要时于基因转移后植入支架,住院 48 h,随访 6 个月。结果发现:术后 2 d,除 C 反应蛋白一过性升高和血小板一过性减少外,余正常;术后血 pHVEGF 聚合酶链反应阴性;术后各时相血 VEGF 正常;术后 48 h 内无低血压、心绞痛、急性心肌梗死、脑血管意外等并发症或不良反应;PTCA 即刻和术后 6 月冠状动脉造影,对照组和治疗组病变血管直径无明显差异。初步提示通过球囊导管进行冠状动脉内转移 hVEGF165 基因预防 PTCA 后再狭窄是安全的。

4 血管内皮生长因子与激光心肌血运重建术联合应用

激光心肌血运重建(TMLR)治疗冠心病的可能机制包括:激光打出的隧道为血液从左心室腔弥散到心肌提供了通道;刺激激光通道周围心肌微血管增生,并证明与局部 VEGF mRNA 表达上调有关^[26];激光所致去神经区域使病人不能感受到疼痛。但是,激光隧道容易闭合,且新生的心肌小血管通常难以满足要求,而 VEGF 一方面能促进激光通道周围形成更多的新生血管,另一方面还可使激光通道发生内皮化而避免其闭合;且激光的温热效应可使局部 VEGF 基因转移和表达效率增加^[27]。因此,二者具有协同作用。

Shah 等^[27]将猪开胸后于左回旋支根部放置动脉缩窄环,6 周后分组:1 组为缺血对照组;2 组为 TMLR 处理组;3 组为 TMLR + β -半乳糖苷基因(100 μ g)处理组;4 组为 phVEGF165(100 μ g)处理组;5 组为 TMLR + phVEGF165(100 μ g)处理组;6 组为正常对照组。phVEGF165 或 β -半乳糖苷基因分 3 等份等间距注射于激光隧道周围 4 mm 处。6 周后经食道超声及经心包超声显示第 5 组局部室壁运动较其它组明显改善,提示 VEGF 可增强 TMLR 的效果。

5 血管内皮生长因子在心脏促血管生成治疗中存在的问题

5.1 给药途径和剂量

有静脉给药、经冠状动脉给药和直接心肌注射 3 种途径。前者方法简单,但疗效和安全性较差;后者疗效较可靠,副作用较小,但较为复杂;经冠状动脉给药与临床最为接近,但技术难度较大,且粥样斑块处基因转移和表达效率较低^[28],目前研究较少。

5.2 安全性问题

在非靶器官中,血管生成是否会起肾脏和眼底视网膜血管增生、肿瘤和促进肿瘤生长及转移、动脉粥样硬化进展^[29],目前尚缺乏足够的证据。

5.3 基因载体的选择

目前常用的有质粒、重组腺病毒和腺病毒相关病毒载体。质粒载体虽然安全,但目的基因转移和表达效率低,很难满足临床需要。腺病毒载体虽然克服了上述缺点,但可能会引起免疫反应,在临床应用因免疫反应致死的病例已有

报道^[30]。腺相关病毒载体同时具备二者的优点,具有良好的应用前景正日益受到重视。

5.4 评价心脏血管生成的疗效

通常根据症状改善情况、生活质量提高和运动耐量试验、放射性核素计算机断层摄影、冠状动脉造影和磁共振血管造影等来评价,但现在还很难评价促血管生成的疗效。

总之,基因治疗严格的靶向性及安全性是未来研究的课题,而寻求有效、安全、可控、易行的基因转移方法和基因载体是解决这一问题的关键。

6 展望

大量的动物实验证实,VEGF 能促进缺血区建立侧枝循环、预防血管成形术后再狭窄和提高 TMLR 的作用。I 期临床试验也初步证明了这一点,并相继进入 II 期临床试验。随着基因技术的飞速发展,VEGF 有望成为治疗冠心病的重要措施之一,并与 PTCA、CABG 和 TMLR 并驾齐驱,甚至部分取代之。

参考文献

- [1] Ferrara N. Role of VEGF in the regulation of angiogenesis [J]. *Kid Intern*, 1999, **56**: 794- 814
- [2] Herttua SY, Martin JF. Cardiovascular gene therapy [J]. *Lancet*, 2000, **355**: 213- 222
- [3] Kranz A, Rau C, Kochs M, et al. Elevation of VEGF-A serum levels following acute myocardial infarction. Evidence for its origin and functional significance [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, **32**: 65- 72
- [4] Hojo Y, Ikeda U, Zhu Y, et al. Expression of VEGF in patients with acute myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, **35**: 968- 973
- [5] Brogi E, Schattman G, Wu T, et al. Hypoxia induced paracrine regulation of VEGF receptor expression [J]. *J Clin Invest*, 1996, **97**: 469- 476
- [6] Watanabe Y, Dvorak HF. VEGF inhibits anchorage disruption induced apoptosis in microvessel endothelial cells by inducing scaffold formation [J]. *Exp Cell Res*, 1997, **233**: 340- 349
- [7] Spyridopoulos I, Brogi E, Kearney M, et al. VEGF inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor- α : balance between growth and death signals [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, **29**: 321- 330
- [8] Takeshita S, Isshiki T, Sato T, et al. Increased expression of direct gene transfer into skeletal muscles observed after acute ischemic injury in rats [J]. *Lab Invest*, 1996, **74**: 1061- 1065
- [9] Isner JM, Walsh K, Symes J, et al. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease [J]. *Circulation*, 1995, **91**: 687- 692
- [10] Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, et al. Treatment of thromboangiitis obliterans by intramuscular gene transfer of VEGF: preliminary clinical results [J]. *J Vasc Surg*, 1998, **28**: 964- 975
- [11] Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al. Early reports: clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb [J]. *Lancet*, 1996, **348**: 370- 374
- [12] Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia [J]. *Circulation*, 1998, **97**: 1114- 1123
- [13] Symes JF, Losordo DW, Vale PR, et al. Gene therapy with VEGF for inoperable coronary artery disease [J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, **68**: 830- 837
- [14] Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 1998, **98**: 800- 804
- [15] Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, et al. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease [J]. *Circulation*, 1999, **100**: 468- 474
- [16] Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, et al. Six-month assessment of a phase I trial of angiogenic gene therapy for the treatment of coronary artery disease using direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing the VEGF121 cDNA [J]. *Ann Surg*, 1999, **230**: 466- 472
- [17] Henry TD, Annex BH, Azrin MA, et al. Double blind, placebo controlled trial of recombinant hVEGF-The VIVA Trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1999, **33**: 384A
- [18] 刘启功, 颜进, 张卫东, 等. hVEGF165 基因转移对血管内皮细胞增殖及分泌功能的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2000, **21**(9): 489- 490
- [19] 刘启功, 张卫东, 颜进, 等. 血管内皮生长因子预防血管成形术后再狭窄的机理研究 [J]. *美国中华心血管病杂志*, 2000, **2**(2): 77- 79
- [20] Asahara T, Bauters C, Pastore C, et al. Local delivery of VEGF accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon injured rat carotid artery [J]. *Circulation*, 1995, **91**: 793- 801
- [21] Asahara T, Chen DH, Tsurumi Y, et al. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF gene transfer [J]. *Circulation*, 1996, **94**: 3291- 3302
- [22] Belle EV, Maillard L, Tio FO, et al. Accelerated endothelialization by local delivery of recombinant human VEGF reduces intimal formation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **235**: 311- 316
- [23] Belle EV, Tio FO, Chen DH, et al. Passivation of metallic stents after arterial gene transfer of phVEGF165 inhibits thrombus formation and intimal thickening [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1997, **29**: 371- 379
- [24] 刘启功, 岳远坤, 陆再英, 等. 腺病毒载体介导 hVEGF165 基因预防血管成形术后再狭窄的实验研究 [J]. *国际心血管杂志*, 2000, **2**(2): 147- 149
- [25] Laitinen M, Hartikainen J, Hiltunen MO, et al. Catheter-mediated VEGF gene transfer to human coronary arteries after angioplasty [J]. *Hum Gene Ther*, 2000, **11**: 263- 270
- [26] Horvath KA, Chiu E, Maun DC, et al. Upregulation of VEGF mRNA and angiogenesis after transmural laser revascularization [J].

- Ann Thorac Surg*, 1999, **68**: 825– 829
- [27] Shah US, Mann MJ, Martin J, et al. Complete reversal of ischemic wall motion abnormalities by combined use of gene therapy with transmyocardial laser revascularization [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, **116**: 763– 769
- [28] Feldman LJ, Steg PG, Zheng LP, et al. Low-efficiency of percutaneous adenovirus-mediated arterial gene transfer in the atherosclerotic rabbit [J]. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 2 662– 671
- [29] Inoue M, Itoh H, Ueda M, et al. VEGF expression in human coronary atherosclerotic lesions [J]. *Circulation*, 1998, **98**: 2 108– 116
- [30] Lehman S. Virus treatment questioned after gene therapy death [J]. *Nature*, 1999, **401**: 517– 518
- (此文 2000– 11– 14 收到, 2001– 04– 22 修回)
(此文编辑 胡必利)