

# 载基因支架治疗血管再狭窄

金 旭<sup>1</sup>, 宋存先<sup>1</sup>, 朱文玲<sup>2</sup>

(中国医学科学院 中国协和医科大学 1. 生物医学工程研究所, 天津市 300192; 2. 北京协和医院, 北京市 100730)

[关键词] 生物医学工程学; 支架载基因治疗血管再狭窄; 综述; 血管再狭窄; 基因治疗

[摘要] 血管局部定位基因转染是目前血管再狭窄基因治疗研究的热点, 它将特异性基因精确定位转染至局部血管壁, 实现外源性基因表达, 从而最大限度地发挥生物学效应。血管内支架作为一种局部定位并长期保留在体内的外源性植入物, 是对血管内再狭窄进行基因治疗的比较理想的运载体系。

[中图分类号] Q789

[文献标识码] A

经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)术后血管内再狭窄一直是困扰医生和患者的一大难题。人们通过不断改进球囊导管类型来减少再狭窄的发生, 但再狭窄的发生率仍居高不下, 约为 30%~50%<sup>[1]</sup>, 其主要原因是术后血管壁的弹性回缩、血管的负性重塑及血管内膜的过度增生。PTCA 术后血管支架的植入明显降低了再狭窄的发生率<sup>[2,3]</sup>, 但是血管支架的植入仅仅防止了血管壁的弹性回缩, 并不能抑制血管内膜的增生, 支架内再狭窄率仍然高达 20%~80% 左右<sup>[1,4]</sup>, 支架内再狭窄成为临床上面临的主要问题。因此, 发明一种行之有效的预防和治疗再狭窄的方法成为目前介入心脏病学的主要目标之一。已有研究证实: 不论在动物试验还是在临床试验中, 药物洗脱支架均可显著降低支架内再狭窄的发生率<sup>[5,6]</sup>。但是, 该类支架存在困扰其临床应用的缺陷: 药物作用缺乏靶向性, 支架上携带的药物多为细胞毒性药物, 该类药物不但可作用于中膜的血管平滑肌细胞抑制内膜增生, 而且也抑制血管内皮细胞的增殖, 因此可造成血管内皮愈合延迟; ④某些细胞毒性药物可能存在“类放射效应”, 引起支架植入部位局部细胞的过度损伤、死亡, 即所谓“黑洞”效应, 导致支架裸露以及血管壁变薄; ⑤支架载药能力有限; 药物的缓、控释行为较难控制; 药物也可能引起晚期血栓、动脉瘤以及慢性炎症并发症<sup>[7]</sup>。

随着心血管疾病的分子及基因机制研究的深入, 血管内再狭窄的基因治疗成为目前研究的热点<sup>[8]</sup>, 而且已经在动物以及临床试验中取得了显著效果<sup>[9]</sup>。以往研究多采用导管作为基因运载体系<sup>[10]</sup>, 但是导管体系存在着作用时间短、基因易扩散等缺点, 近年来, 人们越来越重视以支架为基础的再狭窄的基因治疗, 本文对此做一综述。

## 1 血管内再狭窄的发病机理及目前用于再狭窄治疗的基因

目前, PTCA 术后及支架植入后血管再狭窄的发病机制已比较明确<sup>[5,11]</sup>, 主要包括 4 个时期。iv 血栓期: 该期发生于血管损伤后, 并于数小时内达到高峰, 表现为血小板粘附、聚集及纤维素沉积; ⑤炎症期: 主要表现为在损伤血管局部炎症细胞(T 淋巴细胞、中性粒细胞和单核巨噬细胞)浸润; ⑥增生期: 该期主要表现为血管中膜平滑肌细胞的增殖、迁移; ⑦基质沉着、血管重塑期。目前应用于再狭窄治疗的基因已经超过 20 种, 主要针对血管再狭窄的机制从不同环节予以干预, 有些基因如 VEGF/VEGF-A、eNOS 和 iNOS 等同时具有抑制内膜过度增生和血管壁细胞保护的双重功能。

## 2 支架的包被

无论药物洗脱支架还是作为基因运载体系的支架, 有效的包被是其成功的关键。理想的包被物质至少应具备以下特点: ①包被物可有效地固定生物活性物质; ②包被物可调控生物活性物质的释放; ③包被物具有足够的抗性, 能在设定时期内抵抗血流的冲击和机械应力, 维持其完整性; ④包被物质应该为不溶性的(最好是惰性的), 而且应该容易获得; ⑤包被物质应该有良好的组织相容性, 不会导致血栓和炎症等副作用。

目前, 尚无一种物质可以完全满足以上要求, 已报道的用于支架包被的材料十分广泛, 可分为天然高分子材料和合成高分子材料。前者包括胶原蛋白<sup>[12]</sup>、明胶蛋白<sup>[13-16]</sup>、纤维蛋白<sup>[17]</sup>和磷酸胆碱<sup>[18,19]</sup>等, 该类物质最大优点是生物相容性好, 可生物降解, 且降解产物几乎没有抗原性, 但是其性能的可调控性差。后者是当前研究的热点, 不同组分的高聚物会赋予支架不同的性能, 即使是相同组分的高聚物制备条件的改变, 也会对包被后支架的生物学性质产生很大的影响。用于包被支架的合成高分子材料可分为以下几类: ①可生物降解型: 如聚乳酸、壳聚糖和聚羟基丁酸酯等; ②不可生物降解型: 如乙烯-醋酸乙烯酯高聚物和有机硅橡胶类等, 这种情况下药物的缓释一般由扩散渗透控制; ③共聚物: 如聚乳

[收稿日期] 2004-12-06 [修回日期] 2005-10-10

[作者简介] 金旭, 博士研究生, 研究方向为心血管支架基因治疗运载体系及载药、载基因纳米粒子, E-mail 为 jinxudl2000@163.com。通讯作者宋存先, 研究员, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物缓、控释、纳米粒子及基因治疗心血管疾病的研究, 联系电话为 022-87892052, E-mail 为 scxian@tom.com。朱文玲, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病介入治疗、心血管病理生理、细胞生物学及药物治疗方面研究。

酸与聚乙醇酸的共聚物(PLGA)、聚乳酸与聚己内酯共聚物(PLA/PCL)、聚乳酸与壳聚糖的共聚物等,通过改变共聚物组成可以更好的控制包被层的降解速度。Van der Giessen 等<sup>[20]</sup>比较了包被于支架表面的5种可生物降解多聚物(包括PLGA、PCL、PHBV、POE和PEO/PBTP)和3种不可生物降解多聚物(PUR、SIL和PETP)的生物相容性,结果发现所有多聚物均导致了显著的猪冠状动脉内炎症反应,并且随之出现内膜增厚,这是体外试验所未预料到的。De Scheerder 等<sup>[21]</sup>比较了有机聚磷腈(PP)和聚氨酯(PU)包被支架和裸金属支架,涂层厚度约23  $\mu\text{m}$ ,在置入猪冠状动脉后6周,裸金属支架组和聚氨酯组冠状动脉管腔最小直径无明显差异,而有机聚磷腈组引起明显狭窄。Whelan 等<sup>[18]</sup>进行了磷酸胆碱(PC)包被支架和裸支架的对照研究,发现12周时两组管腔面积和新生内膜面积均无明显差异,也无炎症反应发生。国内研究报道明胶蛋白涂层支架(涂层厚度5~10  $\mu\text{m}$ ),置入猪冠状动脉后7天完全内皮化,28天时未见明显局部反应,无异物巨细胞聚集<sup>[13-16]</sup>。综上所述,目前人们普遍认为薄层涂层(10  $\mu\text{m}$ 或更薄)微米级厚度的包被是安全的,且生物相容性较好<sup>[22]</sup>。

### 3 支架载基因的方法及疗效

#### 3.1 先包被支架再吸附基因

YE 等<sup>[23]</sup>制备了PLLA-PCL包被的可降解的微孔血管内支架,在使用前通过简单吸附载核定位 $\beta$ -gal基因的重组腺病毒载体,植入兔颈动脉后,发现报告基因集中表达于中膜平滑肌细胞,部分样本发现邻近外膜细胞也有表达。国内以小型猪为实验动物也进行了大量实验,通过使用交联明胶涂层的支架,通过简单吸附的方法转运基因,结果均出现了转入基因的表达,其中质粒pcDNA2-LacZ在中膜平滑肌细胞表达约为3.0%左右,并在内膜和外膜均有表达<sup>[13]</sup>。在Ad-ProrUK支架植入7天时证实有ProrUK mRNA和蛋白质的生成,并且在3个月时实验组再狭窄的发生率为0/4,而对照组为8/8<sup>[14]</sup>。质粒pcDNA3-iNOS支架植入7天在中膜和内膜检测出iNOS基因及蛋白的表达,以平滑肌细胞最为明显<sup>[15]</sup>。携带质粒pcDNA3-VEGF支架植入猪冠状动脉后7天,证实有VEGF mRNA及蛋白质表达,但3个月后重复冠状动脉造影发现,转基因组和对照组均发生再狭窄,平均管腔狭窄直径分别是69%  $\pm$  10%和80%  $\pm$  14%,差异无显著性<sup>[16]</sup>。吴隐雄等<sup>[19]</sup>采用PC涂层包被支架经简单吸附腺病毒载体携带的报告基因 $\beta$ -gal和治疗基因TIMP3后,植入猪冠状动脉7天后发现治疗组有TIMP3 mRNA表达,转染率为6.6%  $\pm$  3.6%,4周时发现治疗组管腔内径明显大于对照组,有效减轻了再狭窄。

#### 3.2 包被物基因共混包埋后包被支架

包被物基因共混包埋后包被支架是使用最多的载基因支架的制备方法。Klugherz 等<sup>[24]</sup>使用PLGA同质粒报告基因pEGFP-N3涡旋共混方法制备的混合乳液薄层包被支架进行试验,发现7.9%  $\pm$  0.7%兔颈动脉平滑肌细胞表达报告基因,猪冠状动脉支架植入后5~7天发现总的GFP表达的效

率为1.14%  $\pm$  0.08%,主要转染部分为中膜,内膜和外膜也有转染。Perlstein 等<sup>[25]</sup>使用加入交联剂碳二亚胺的变性胶原同质粒pEGFP-N3共混后多薄层包被支架,并且在包被支架的表面吸附PLGA,空气干燥后植入猪冠状动脉,发现10.8%的新生内膜被转染,而且PLGA显示出了基因的缓释效果。Takahashi 等<sup>[26]</sup>采用脂肪族多聚碳酸盐/聚氨酯同质粒DNA共混后多次浸泡涂层的方法包被支架,包被重量约为4 mg,厚度约为35  $\mu\text{m}$ ,分别使用3种报告基因pGFP、p $\beta$ -gal和p-Cl,植入兔髂动脉后7天,所有样本均出现支架植入部位血管壁基因转染,而且主要发生在管腔表面,转染范围同基因负载量相关;同时发现巨噬细胞也是转染的靶细胞,为转基因至免疫细胞提供了新的思路。Nakayama 等<sup>[27]</sup>则通过基因共混的方法制备光激活水凝胶包被的携带Ad-LacZ基因的金支架,植入兔颈总动脉3周后,管腔表面仍旧可检测到LacZ基因的表达产物。

#### 3.3 通过化学表面修饰和免疫连接的方法连接支架和基因

简单吸附方法可能存在基因携带量不足、结合不牢固的弱点,人们利用包被物质及基因载体本身固有特性,设计出许多牢固有效的连接基因的方法,如Klugherz 等<sup>[12]</sup>利用交联剂SPDP的特性将胶原蛋白包被同腺病毒载体有效连结,在植入猪冠状动脉后,总的转染率达到5.9%  $\pm$  1.1%,并且未出现支架外血管和远隔器官转染基因的播散。另外也可利用非病毒载体等的电荷性质和免疫学性质将基因有效固定于支架上。

#### 3.4 支架携带导入治疗基因的细胞回体基因治疗

应用导入治疗基因的细胞(“种子细胞”)回体治疗的想法由来已久,许多实验室都通过外科手术制备过“种子细胞”,并通过血管内注入或移植植入的方法进行疾病的基因治疗<sup>[28]</sup>。近10余年来,人们曾尝试在体外使用导入基因的内皮细胞作为“种子细胞”来覆盖支架<sup>[29]</sup>。但是,这些研究都存在“种子细胞”来源少,植入支架的细胞数量少,球囊扩张、血流冲击等会使“种子细胞”损失以及制备过程繁琐等缺陷。Panetta 等<sup>[30]</sup>通过组织工程的方法改进网格支架结构,并使用纤维连接蛋白涂层,将报告基因pGFP导入自体细胞后装载入支架,植入猪自身冠状动脉4周后发现1个月内GFP稳定表达( $5.2 \times 10^5$  GFP阳性细胞/ $\text{cm}^2$ 网格),且1个月来转染细胞数量未有明显变化。

### 4 前景与展望

以支架为运载体系的基因治疗已显示了良好的前景,但是,基因治疗的成功需要有效的治疗基因、合适的载体及适宜的运载体系,三者缺一不可。目前有效的治疗基因越来越多,治疗载体也越来越趋于理想,但在运载体系方面,尤其是经皮血管内基因治疗装置的进展甚微。载基因支架已成为目前研究热点,同药物洗脱支架一样,包被物质的安全性和基因释放的可控性仍然是努力的方向。另外,还可以尝试在同一支架上携带不同的治疗物质的“鸡尾酒”疗法(如携带基因+药物或不同的治疗基因等)。血管内支架将成为一个心血管疾病基因治疗的坚实平台,不久的将来我们就会在临床

上应用携带治疗基因的血管支架。

# [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Fischman DL, Leon MB, Bain DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease, Stent Restenosis Study Investigators[ J ]. *N Engl J Med*, 1994, **331** ( 8 ): 496-501
- [ 2 ] Serruys PW, Foley DP, Suttrop MJ, Rensing BJ, Suryapranata H, Materne P, et al. A randomized comparison of the value of additional stenting after optimal balloon angioplasty for long coronary lesions: final results of the additional value of NIR stents for treatment of long coronary lesions (ADVANCE) study[ J ]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, **39** ( 3 ): 393-399
- [ 3 ] van den Brand MJ, Rensing BJ, Morel MA, Foley DP, de Valk V, Breeman A, et al. The effect of completeness of revascularization on event-free survival at one year in the ARTS trial[ J ]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, **39** ( 4 ): 559-564
- [ 4 ] El-Omar MM, Dangas G, Iakovou I, Mehran R. Update on Ir-stent Restenosis [ J ]. *Curr Interv Cardiol Rep*, 2001, **3** ( 4 ): 296-305
- [ 5 ] Kipshidze N, Leon MB, Tsapenko M, Falotico R, Kopia GA, Moses J. Update on sirolimus drug-eluting stents[ J ]. *Curr Pharm Des*, 2004, **10** ( 4 ): 337-348
- [ 6 ] Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O' Shaughnessy C, Mann JT, et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease[ J ]. *N Engl J Med*, 2004, **350** ( 3 ): 221-231
- [ 7 ] Liistro F, Colombo A. Late acute thrombosis after paclitaxel eluting stent implantation[ J ]. *Heart*, 2001, **86** ( 3 ): 262-264
- [ 8 ] Ylä-Herttuala S, Martin JF. Cardiovascular gene therapy[ J ]. *Lancet*, 2000, **355** ( 9199 ): 213-222
- [ 9 ] Mann MJ, Whittlemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, et al. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial[ J ]. *Lancet*, 1999, **354** ( 9189 ): 1 493-498
- [ 10 ] Sharif F, Daly K, Crowley J, O' Brien T. Current status of catheter- and stent-based gene therapy[ J ]. *Cardiovasc Res*, 2004, **64** ( 2 ): 208-216
- [ 11 ] 李拥军, 管珩, 王宗立. 血管再狭窄的基因治疗[ J ]. 中国动脉硬化杂志, 2001, **9** ( 1 ): 77-81
- [ 12 ] Klugherz BD, Song C, DeFelice S, Cui X, Lu Z, Connolly J, et al. Gene delivery to pig coronary arteries from stents carrying antibody-tethered adenovirus [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2002, **13** ( 3 ): 443-454
- [ 13 ] 钱杰, 高润霖, 史瑞文, 宋来凤, 祁哲, 李永利, 等. 金属蛋白涂层支架用于小型猪冠状动脉质粒介导下转基因研究[ J ]. 中国循环杂志, 1999, **14** ( 3 ): 152-154
- [ 14 ] 袁晋青, 高润霖, 史瑞文, 宋来凤, 汤健, 李永利, 等. 在小型猪模型由蛋白涂层金属支架局部转染尿激酶前体基因对冠状动脉再狭窄的影响[ J ]. 中华心血管病杂志, 1999, **27** ( 5 ): 349-352
- [ 15 ] 戴军, 高润霖, 汤健, 宋来凤, 魏英杰, 宋莉, 等. 蛋白涂层支架携带一氧化氮合酶基因转染小型猪冠状动脉的可行性研究[ J ]. 中国循环杂志, 2001, **16** ( 1 ): 61-63
- [ 16 ] 钱杰, 高润霖, 汤健. 质粒介导下转染血管内皮生长因子基因不能防治小型猪冠状动脉再狭窄[ J ]. 中国循环杂志, 2002, **17** ( 5 ): 389-391
- [ 17 ] McKenna CJ, Camrud AR, Sangiorgi G, Kwon HM, Edwards WD, Jr Holmes DR, et al. Fibrin film stenting in a porcine coronary injury model: efficacy and safety compared with uncoated stents[ J ]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, **31** ( 6 ): 1 434-438
- [ 18 ] Whelan DM, van der Giessen WJ, Krabbendam SC, van Vliet EA, Verdouw PD, Serruys PW, et al. Biocompatibility of phosphorylcholine coated stents in normal porcine coronary arteries[ J ]. *Heart*, 2000, **83** ( 3 ): 338-345
- [ 19 ] 吴隐雄, Johnson THC, Baumbach A, Newby AC, Karsch KK. 包裹支架转移治疗基因到猪冠状动脉的实验研究[ J ]. 中山大学学报·医学科学版, 2003, **24** ( 5 ): 471-474, 478
- [ 20 ] van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, van Beusekom HM, Serruys PW, Jr Holmes DR, et al. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries[ J ]. *Circulation*, 1996, **94** ( 7 ): 1 690-697
- [ 21 ] De Scheerder IK, Wilczek KL, Verbeken EV, Vandorpe J, Lan PN, Schacht E, et al. Biocompatibility of polymer-coated oversized metallic stents implanted in normal porcine coronary arteries[ J ]. *Atherosclerosis*, 1995, **114** ( 1 ): 105-114
- [ 22 ] Tanabe K, Regar E, Lee CH, Hoyer A, van der Giessen WJ, Serruys PW. Local drug delivery using coated stents: new developments and future perspectives[ J ]. *Curr Pharm Des*, 2004, **10** ( 4 ): 357-367
- [ 23 ] Ye YW, Landau C, Meidell RS, Willard JE, Moskowitz A, Aziz S, et al. Improved bioresorbable microporous intravascular stents for gene therapy[ J ]. *Asaio J*, 1996, **42** ( 5 ): M823-827
- [ 24 ] Klugherz BD, Jones PL, Cui X, Chen W, Meneveau NF, De Felice S, et al. Gene delivery from a DNA controlled-release stent in porcine coronary arteries [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2000, **18** ( 11 ): 1 181-184
- [ 25 ] Perlstein I, Connolly JM, Cui X, Song C, Li Q, Jones PL, et al. DNA delivery from an intravascular stent with a denatured collagen-poly(lactic-polyglycolic acid)-controlled release coating: mechanisms of enhanced transfection[ J ]. *Gene Ther*, 2003, **10** ( 17 ): 1 420-428
- [ 26 ] Takahashi A, Palmer-Opolski M, Smith RC, Walsh K. Transgene delivery of plasmid DNA to smooth muscle Cell and macrophages from a biostable polymer-coated stent[ J ]. *Gene Ther*, 2003, **10** ( 17 ): 1 471-478
- [ 27 ] Nakayama Y, Ji-Youn K, Nishi S, Ueno H, Matsuda T. Development of high performance stent: gelatinous photogel-coated stent that permits drug delivery and gene transfer[ J ]. *J Biomed Mater Res*, 2001, **57** ( 4 ): 559-566
- [ 28 ] Wilson JM, Birinyi LK, Salomon RN, Libby P, Callow AD, Mulligan RC. Implantation of vascular grafts lined with genetically modified endothelial cell [ J ]. *Science*, 1989, **244** ( 4910 ): 1 344-346
- [ 29 ] Flugelman MY, Vimani R, Leon MB, Bowman RL, Dichek DA. Genetically engineered endothelial cell remain adherent and viable after stent deployment and exposure to flow in vitro[ J ]. *Circ Res*, 1992, **70** ( 2 ): 348-354
- [ 30 ] Panetta CJ, Miyauchi K, Berry D, Simari RD, Holmes DR, Schwartz RS, et al. A tissue engineered stent for cell-based vascular gene transfer[ J ]. *Hum Gene Ther*, 2002, **13** ( 3 ): 433-441

( 此文编辑 朱雯霞 )