

文章编号:1005-6947(2004)01-0047-04

· 综述 ·

动脉粥样硬化闭塞性疾病的基因治疗

肖乐 综述 时德 审校

(重庆医科大学附属第一医院 血管外科, 重庆 400016)

摘要:采用文献检索方法对动脉粥样硬化闭塞性疾病的基因治疗价值进行分析并加以综述。可选择的主要基因为促进血管再生和改善脂质代谢障碍的基因;转基因载体包括病毒性和非病毒性;转基因技术包括体外和体内转基因,后者包括开放外科、经皮注射和导管技术。血管再生可能导致的肿瘤生长和载体引起的危害是潜在的并发症。动脉粥样硬化闭塞性疾病的基因治疗有良好的前景,但动脉粥样硬化闭塞性疾病的特征性、发病机制还有待深入研究,载体和转基因技术还有待发展以提高安全性和效率。

关键词:动脉粥样硬化;动脉闭塞性疾病;综述文献

中图分类号:R543.5;R44

文献标识码:A

动脉粥样硬化累及大、中动脉,它以平滑肌细胞移行、增殖、胆固醇聚集、结缔组织形成、炎细胞浸润、血栓形成和钙化为特征。冠状动脉粥样硬化引起的心肌梗死是发达国家居民的主要死因之一。累及周围动脉的粥样硬化发病率亦较高,美国70岁以上慢性下肢动脉硬化性闭塞病的发病率为10%,年手术10万人次。虽然外科搭桥术,经皮血管成形术,血管移植术等取得了令人瞩目的成就,但是远端缺乏良好流出道的多平面、多节段的广泛的动脉闭塞以及术后的再狭窄,使很多患者不能受益于这些治疗。此类病例药物疗效不佳,又无法手术或介入治疗,截肢率达8%~30%^[1]。

基因治疗是应用基因工程和细胞生物学技术,将一些具有治疗价值的外源基因以一定手段导入体内,通过修复或补充失去正常功能的基因及其表达产物,或抑制体内某些基因过度表达,达到治疗目的。

1 可选择的主要基因

1.1 促进血管再生的基因

收稿日期:2002-06-20;

修订日期:2003-03-26。

作者简介:肖乐(1975-),男,重庆人,重庆医科大学附属第一医院研究生,主要从事血管外科和肿瘤的综合治疗方面的研究。

血管系统的形成包括血管发生和血管再生两个不同的生物学过程。血管再生是指从已存在的血管网的内皮细胞分化形成新的血管。包括血管内皮细胞的迁移和增殖,血管基底膜的降解,蛋白溶解酶的表达及其对细胞外基质的降解,新形成的细胞外基质的重排和内皮细胞血管壁的形成^[2]。

1.1.1 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) VEGF在血管再生和肿瘤的发育中起重要作用。Isner^[3]等利用水凝胶导管技术将phVEGF¹⁶⁵ DNA质粒转移入下肢动脉硬化闭塞症患者体内,结果增加侧支循环生成,改善肢体缺血症状,开创了非遗传性血管疾病基因治疗的先河。目前,正在进行的I,IIa期临床实验以检测VEGF基因治疗的安全性和观察VEGF异构体的效果。55例下肢严重缺血病例(Rutherford评分4~6分)通过肌肉注射phVEGF¹⁶⁵质粒,一些病例已取得了临床效果,踝肱指数检测显示患肢血供增加,提高了缺血性溃疡的治愈率。

1.1.2 成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF) FGF直接作用于血管细胞,诱导内皮细胞生长和血管再生。在压力诱发的心肌缺血模型中,冠状动脉内注射表达人FGF-5

的重组腺病毒,结果在转基因2周后通过血管再生增加了血流^[4]。

1.1.3 血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF) 亦称扩散因子/肝细胞生长因子(scatter factor/hepatocyte growth factor, SF/HGF),参与血管再生过程,通过旁分泌促使腔内细胞前体向血管壁聚集,还通过自分泌刺激内皮细胞增殖和迁移,通常在血管内皮细胞和平滑肌细胞中表达。Van Belle等^[5]发现在缺血肢体模型应用重组PDGF能明显改善侧支循环形成和局部血流。

1.1.4 血管生长素-1(angiotensin-1, Ang1) 血管生长素是内皮细胞特异性Tie2受体酪氨酸激酶释放的,Ang1是正常血管发生所必须的,它的过度表达可引起血管再生^[6]。

1.1.5 胎盘生长因子(placental growth factor, PlGF) VEGF的同系化合物,诱导内皮细胞生长和血管再生。将重组PlGF应用于小鼠肢体缺血模型,能明显增加侧支循环形成,且效果与VEGF无明显差异^[7]。

1.2 改善脂质代谢障碍的基因

1.2.1 高密度脂蛋白(HDL)受体基因 动脉硬化与血浆LDL呈正相关,与HDL呈负相关。B清道夫受体(SR-BI)是一个HDL受体,涉及体内选择性脂肪摄取。重组腺病毒介导的

SR-BI 在肝脏中的过度表达,使小鼠血浆 HDL 水平显著升高,从而影响动脉硬化发生和进程^[8]。

1.2.2 脂蛋白脂肪酶基因 脂蛋白脂肪酶是高甘油三酯脂肪酶水解的限速酶。用腺病毒介导的人脂蛋白脂肪酶的基因能改善载脂蛋白 E 和 LDL 受体缺陷的小鼠的脂质代谢障碍^[9]。

1.2.3 载脂蛋白基因 载脂蛋白 E 具有分解血管壁的胆固醇,局部抗氧化、抗血小板和抗炎作用。肌内注射携带人载脂蛋白 E-2 基因的质粒,能明显减少小鼠主动脉的粥样斑块。但是没有减轻高脂血症,可能其机制为局部调节脂蛋白代谢^[10]。

1.2.4 白介素-10 (IL-10) 将携带 IL-10 基因的腺病毒用于颈动脉粥样硬化的小鼠,能明显减轻血管狭窄,降低血浆胆固醇和促进单核细胞失活^[11]。

1.3 抗单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)

是促进单核细胞聚集的一个重要细胞因子。将 N-末端缺失突变的人 MCP-1 基因转染小鼠骨骼肌,结果有效阻断 MCP-1 活性,抑制粥样斑块形成,但对血浆脂浓度无明显影响^[12]。

此外,还有抗血管平滑肌细胞增殖的基因,如一氧化氮合酶 (NOS) 基因,反义细胞调控基因 (CDL-2, CDK-2, PCNA), 反义癌基因 (ras, myc, myb, fms), 抗癌基因 (Rb, p53)。

2 用于转基因的主要载体

2.1 复制缺陷逆转录病毒

逆转录病毒是最有特征的病毒载体。它是有外壳的双股 RNA 病毒,通过受体介导的胞吞作用进入宿主细胞,一旦进入细胞, RNA 通过逆转录酶转录为 DNA,并融入宿主细胞基因组,与宿主细胞一起存活,能转移至任何子细胞,长期确切表达目的 DNA 序列^[13]。缺点:体内内皮细胞转染率低 (<1.0%);不能容纳超过 7kB 的 DNA;需要靶细胞处于分裂周期;因

与宿主细胞的染色体整合而可能发生突变;很难生成高滴度病毒。

2.2 复制缺陷腺病毒

腺病毒是血管内皮转基因最有效的载体。腺病毒无包壳,系 24 面体的双链 DNA 病毒,作为核附加体存在,很少融入宿主基因组^[14]。腺病毒有高效的转染能力,能容纳大基因序列 (>7kB),能转染分裂和非分裂细胞,能高浓度生产,很少发生直接突变。缺点:腺病毒因为只能暂时表达,所以只能限于暂时治疗,治疗慢性疾病需要重复剂量;会引起免疫反应,所以会限制内皮细胞的生存时间和重复使用^[15];高浓度使用时会损伤细胞。

2.3 其他病毒载体

包括单纯疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒、乳头瘤病毒和腺病毒相关病毒。后者是一种单链 DNA 病毒能转染非分裂细胞,又能融入宿主基因组,同时具备腺病毒和逆转录病毒载体的优点。

目前研究热点是病毒载体的改革,包括完全避免自然转录单位的“无生气”的腺病毒。Bilbao^[16]和他的小组研究出一种嵌合体病毒载体,结合了腺病毒在体内高效的转基因能力和逆转录病毒的稳定表达能力。携带有生长因子的腺病毒载体诱导出增生后,运用另外两种腺病毒,其一编码有逆转录病毒,另一编有逆转录病毒组装编码。

2.4 非病毒载体

病毒有细胞毒性,能诱发免疫反应。野生型竞争复制病毒的污染总是潜在的。非病毒载体能避免上述问题,且不与宿主基因组融合,减少突变发生。但转染效力很低 (2%),包括裸 DNA、质粒、脂质体、有特异性配体和病毒成分表面的复杂合成载体。非病毒载体必须能浓缩 DNA 至足够小以通过胞吞作用进入细胞。

质粒是一种螺旋状双股 DNA,能够在宿主细胞自主复制,但转染率较低。质粒能被压缩入一种物质中,构成脂质体,它是一种单层或多层的囊

泡,能被合成为带中性、阴性或阳性电荷,有人工膜的活性,能通过受体介导的胞吞作用转运大分子通过细胞膜。但脂质体易被核内体俘获,直至与溶酶体融合,导致大分子的破坏^[17]。

将携带有人载脂蛋白 A-1 基因的受体介导的半乳糖多聚左旋赖氨酸和质粒复合物,注入兔尾静脉后,发现被肝细胞特异性摄取,并转染入细胞核^[18]。

3 转基因技术

3.1 体外转基因

首先从动脉或静脉采集自体内皮或平滑肌细胞并培养,然后转染适当的重组 DNA,并再植入血管。主要优点是,在重植入以前能可靠地评价靶细胞的基因表达。主要缺点是要求获得同源细胞系和在采集细胞、转染效率定量和再植入上花费时间较多^[19]。

3.2 直接转基因 (体内转基因)

比体外转基因更快速和更简单,但缺乏正确的细胞特异性。

3.2.1 外科基础上的转基因 分离出靶血管部分后,夹住近端和远端,结扎所有分支,当血液排空后即注入载体溶液,并孵化一段时间,然后用盐或磷酸盐缓冲液冲洗^[20]。这种方法在直接转基因中转染效率最高,主要优点是能对目的部位特异地、独立地转染。缺点是要求暴露血管的熟练技术和钳夹、结扎血管引起的创伤影响。

3.2.2 经皮注射 当基因产物的旁分泌效应是治疗性时,血管周围的组织也可被转染。肌内注射载体非常简单,可有效地诱发血管再生^[21]。

3.2.3 导管技术 包括穿孔气囊导管,水凝胶包裹的血管成形术气囊导管和双气囊导管。转基因的最佳导管系统须具备以下功能:将载体转移到正确的解剖部位,并特异地转染靶细胞;最少发生载体向远端部位脱落;治疗剂无不必要的全身影响;因转基因导致的并发症最小。

(1)穿孔气囊导管 先将导管伸入靶血管部位,再向表面有许多小孔

(24~300个)的气囊里注入载体溶液,并使囊内的压力保持在2~5个大气压内,以促进载体穿过小孔并进入血管壁^[21]。缺点是转染效率低、组织损伤率高和特异性低。增强型导管有1800个小孔,并有2层膜以减小流体力学能量,可降低血管损伤。

(2)水凝胶包裹的血管成形术导管 将亲水的外衣包裹“光滑”的血管成形术导管后,其大小在接触水后会膨胀至2~3倍^[22]。先将气囊充盈至2个大气压,然后浸入溶液中以黏附载体,载体也可涂在气囊表面,然后将气囊放气并通过鞘进入靶血管。再取出鞘,充盈气囊至2个大气压,即可向内皮细胞转移载体。与穿孔气囊导管相比,它能与内皮均匀地接触,更均匀地分布载体。缺点是缺乏细胞特异性,全身病毒脱落和很低的转染率。

(3)双气囊导管 与外科技术不同的是不用外科钳夹。用两个闭塞气囊隔离出靶血管段,抽空该段的血液后,通过两个气囊间的单独小孔注入载体溶液^[22]。该法内皮转染率高,组织损伤最小,避免了开放外科操作的患病率,主要缺点是靶血管段必须没有分支。

4 并发症和副作用

基因治疗最重要的潜在危险在于目的基因和所用的转基因载体。当治疗目的是诱导血管再生时,虽然大量的研究已排除VEGF等导致肿瘤形成的可能性,但理论上会加速潜在的微小的恶性病灶生长。在进行临床试验前,必须详询患者可能的肿瘤史,并用合适的显像技术排除已存在的肿瘤。已有报道用腺病毒转基因后造成的严重副作用。新的载体系统,如新一代腺病毒载体,新脂质体,能更有效和更安全。同时,局部应用因用量少可增加安全性

5 主要问题和研究方向

动脉硬化闭塞性疾病的特征性发病机制还有待深入研究,必须着力明

确病变的关键基因。同时,仅仅转移一种基因治疗严重的动脉闭塞性疾病还不够,几种重组的生长因子构成的“基因鸡尾酒”可能会增强治疗效果。目前所应用的病毒载体大多数缺乏组织特异性和靶向性,并且转基因效率较低。今后,可能会出现编码有不同蛋白和携带有调节因子的载体。

参考文献:

- [1] Mikko OH, Mikko PT, Marja L, *et al.* Insights into the molecular pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic strategies using gene transfer[J]. *Vascular Medicine*, 2000,5(1):41-48.
- [2] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. *Cell*, 1996, 86(3):353-354.
- [3] Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, *et al.* Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF¹⁶⁵ in patients with ischaemic limb [J]. *Lancet*, 1996,348(9024):370-374.
- [4] Giordano FJ, Ping P, Mckirnan MD, *et al.* Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart [J]. *Nat Med*, 1996,2(5):534-539.
- [5] Van Belle E, Witzensbichler B, Chen D, *et al.* Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis [J]. *Circulation*, 1998,97(4):381-390.
- [6] Suri C, Jones PF, Pantano S, *et al.* Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis [J]. *Cell*, 1996,87(7):1171-1180.
- [7] Luttun A, Tjwa M, Moons L, *et al.* Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1 [J]. *Nat Med*, 2002,8(8):831-840.
- [8] Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, *et*

al. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000,20(3):721-727.

- [9] Zsigmond E, Kobayashi K, Tzung KW, *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of human lipoprotein lipase ameliorates the hyperlipidemia associated with apolipoprotein and LDL receptor deficiencies in mice [J]. *Hum Gene Ther*, 1997,8(16):1921-1933.
- [10] Athanasiopoulos T, Owen JS, Hassall D, *et al.* Intramuscular injection of a plasmid vector expressing human apolipoprotein E limits progression of xanthoma and aortic atheroma in apoE-deficient mice [J]. *Hum Mol Genet*, 2000,9(17):2545-2551.
- [11] Von Der TJH, Kuiper J, Fekkes ML, *et al.* Attenuation of atherosclerosis by systemic and local adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-10 in LDLr^{-/-} mice [J]. *FASEBJ*, 2001,15(14):2730-2732.
- [12] Egashira K, Koyanagi M, Kitamoto S, *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits vascular remodeling in rats: blockade of MCP-1 activity after intramuscular transfer of a mutant gene inhibits vascular remodeling induced by chronic blockade of NO synthesis [J]. *FASEBJ*, 2000,14(13):1974-1978.
- [13] Nabel EG, Plautz G. Site-specific gene expression in vivo by direct gene gene transfer into the arterial wall. *Science*, 1990,249(4974):1285-1288.
- [14] Horwitz MS. *Virology* [M]. New York: NY Raven, 1990. 234-236.
- [15] Zaner J, Peterson DM, Puga AP, *et al.* Safety and efficacy of repetitive adenovirus-mediated transfer of CFTR cDNA to airway epithelia of primates and cotton rats [J]. *Nature Genet*, 1994,6(1):75-83.
- [16] Bilbao G, Feng M, Rancourt C, *et al.* Adenoviral retroviral vector chimeras: a novel strategy to achieve high-efficiency stable transduction in vivo [J]. *FASEBJ*, 1997,11(3):624-634.

文章编号:1005-6947(2004)01-0050-03

· 综述 ·

血液中血管内皮生长因子和肿瘤的研究进展

郑江华¹综述 罗开元², 时德¹审校

(1. 重庆医科大学附属第一医院 血管外科, 重庆 400016; 2. 云南省第二人民医院 普外科, 云南 昆明 650021)

摘要:通过 CBMDisc 和 MEDLINE 的搜索,对血液中血管内皮生长因子(VEGF)和肿瘤预后的关系作一综述。大量研究证实肿瘤中 VEGF 高表达与多数肿瘤预后呈负相关;不同肿瘤患者血液中 VEGF 水平对预后和对抗癌治疗的效果有预测和监测作用。检测血液 VEGF 方法简便,非侵入性,可提供传统的临床病理学所不能提供的新信息。

关键词:血管内皮生长因子/血液;肿瘤/诊断;预后;综述文献

中图分类号:Q58; R44 **文献标识码:**A

近年来肿瘤领域内研究的重大进展之一是确立了肿瘤血管生成(angio-genesis)在肿瘤发展中的重要地位^[1]。肿瘤血管生成由一系列血管生成因子与抑制因子间的相互作用来调节的,其中血管内皮生长因子(VEGF)是目前发现最重要的血管生长因子,它与肿瘤患者预后是近几年的研究热点。本文仅以血液中 VEGF 来源、生物学意义及其临床意义为重点综述如下。

收稿日期:2003-01-23;

修订日期:2003-11-26。

作者简介:郑江华(1975-),男,重庆岳池人,重庆医科大学附属第一医院住院医师,主要从事血管外科及肿瘤方面的研究。

1 VEGF 来源和生物学意义

VEGF 是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素。其主要生物学功能:(1)选择性增强血管内皮细胞有丝分裂,刺激内皮细胞增殖并促进血管形成;(2)升高血管尤其是微小血管的渗透性,使血浆大分子外渗沉积在血管外基质中,为肿瘤细胞的生长和新生毛细血管网的建立提供营养。总体来看,血液中 VEGF 水平在人类的多数肿瘤中是一种有用的预测因子。有文献^[2~4]证实血液的 VEGF 是所建立的预后参数(如淋巴结转移和肿瘤分期)中较强的,独立的预后因

子。然而也有研究证实:尽管肿瘤中的 VEGF 表达是肿瘤(如肺癌、卵巢癌)重要的预后因子,但血清中 VEGF 与预后无关系^[5,6]。造成不同结果的原因主要是由于血液中 VEGF 可能还来源于其他细胞,侵入肿瘤的淋巴细胞和巨噬细胞以及多种血细胞(如嗜中性细胞,血小板等)都可表达 VEGF^[7~9]。健康成人血液中 VEGF 水平较低,它们是由上述的正常细胞分泌的。几乎所有研究都证实肿瘤患者血液中的 VEGF 水平较健康人血液 VEGF 为高。关于肿瘤细胞和非肿瘤细胞分泌 VEGF 的相关性研究结果存在一定的差异。肿瘤患者 VEGF 主要

[17] Thomas JW, Kuo MD, Chawla M, et al. Vascular gene therapy [J]. Radio Graphics, 1998, 18: 1373 - 1394.

[18] Dizhe EB, Akifiev BN, Missul BV, et al. Receptor-mediated transfer of DNA-galactosylated poly-L-lysine complexes into mammalian cells in vitro and in vivo [J]. Biochemistry (Mosc). 2001, 66 (1): 55 - 61.

[19] Nabel EG, Nabel GJ. Gene-transfer

approaches to vascular disease [A]. In: Mockrin SC. Molecular Genetics and Gene Therapy of Cardiovascular Diseases [M]. New York: NY Dekker, 1996 487 - 511.

[20] Lemarchand P, Jones M, Yamada I, et al. In vivo gene transfer and expression in normal uninjured blood vessels using replication-deficient recombinant adenovirus [J]. Circ Res, 1993, 72 (5): 1132 - 1138.

[21] Jejurikar SS, Welling TH, Zelenock

JA, et al. Induction of angiogenesis by lidocaine and basic fibroblast growth factor: a model for in vivo retroviral-mediated gene therapy [J]. J Surg Res, 1997, 67 (2): 137 - 146.

[22] Willard JE, Landau C, Glanman B, et al. Genetic modification of the vessel wall: comparison of surgical and catheter-based techniques for delivery of recombinant adenovirus [J]. Circulation, 1994, 89 (5): 2190 - 2197.