

·综述·

血管内皮生长因子(VEGF)基因治疗冠心病进展

杨克明 胡盛寿

中国医学科学院 北京协和医科大学 心血管病研究所
阜外心血管病医院外科(北京, 100037)

一、背景

冠状动脉旁路移植术(CABG)和经皮冠状动脉腔内成形术(PTCA)对于治疗大部分冠心病病人有较好的近期和远期疗效。但对另一部分终末期患者,如弥漫性冠状动脉病变,CABG或PTCA治疗效果不佳,或有反复PTCA或CABG史仍有大量药物治疗不能控制的心绞痛发作,或者由于目标血管条件差,缺乏移植桥材料,不能耐受手术,故不再适用于常规的治疗方法(CABG、PTCA)。针对这部分病人,VEGF基因治疗具有很广阔的研究和应用前景。

二、VEGF特性

VEGF是一个高度特异性的血管内皮细胞生长刺激因子。由于编码VEGF mRNA剪接方式不同,在人和动物体内VEGF共有五种存在形式,即VEGF₁、VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉、VEGF₂₀₆、VEGF₁₄₅。VEGF₁₈₉和VEGF₂₀₆属不溶性蛋白,一般难以纯化^[1],所以VEGF中研究最多的是VEGF₁₂₁和VEGF₁₆₅,这类因子特异地与血管内皮受体(FLK1和FLT1)结合,产生增加微血管与小静脉血管的通透性;诱导血管内皮细胞及非内皮细胞(如肿瘤细胞)的形态学变化并促进血管内皮细胞分裂、增殖、细胞钙聚集以及诱导血管生成等作用。在心血管系统中,VEGF有如下作用:①心肌缺血、缺氧时内源性VEGF表达增加^[2]。外源性VEGF可促进缺血心肌的侧枝循环^[3]。②VEGF可导致冠状动脉内皮依赖的舒张反应^[4],并且在侧枝循环区域这种反应更为强烈^[5]。③静脉内注射VEGF,其通过扩血管效应可引起剂量依赖的平均动脉压下降^[6]。④VEGF可加速损伤血管内皮化,减少内中膜增生,从而防治血管再狭窄^[7]。

三、VEGF基因载体及转染系统

由于VEGF在改善心肌缺血中的重要作用,许多学者试图通过直接介入VEGF蛋白来改善心血

运^[8]。但单纯介入VEGF蛋白可引起系统低血压^[9],并因VEGF蛋白具有很短的半衰期^[10],发挥治疗作用必须连续不断地进行VEGF蛋白介入,既昂贵又不方便。因此,多数学者提出用局部组织表达VEGF蛋白的基因介入方式达到相同治疗目的。

VEGF基因载体可分为病毒类和非病毒类。病毒类载体包括逆转录病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒等。含有单链RNA的逆转录病毒可将逆转录DNA整合到宿主细胞中,但是这种载体只能转染有复制能力的细胞,这一点不适用于心脏组织细胞^[11]。逆转录病毒难以纯化和浓缩,病毒制备滴度低^[12],且不稳定,有插入性基因突变的危险。含有双链DNA的腺病毒载体,不整合到宿主染色体中,并且克服了逆转录病毒的诸多缺点,且转染率高。有报道在动物实验中,可有接近100%的转染率到动脉内皮细胞^[13],在体外细胞转染中,转染率可达2—70%^[14]。但由于表达了病毒蛋白和特定的基因产物,可引起强烈的T淋巴细胞参与的细胞免疫反应^[15,16]和由中性粒细胞和巨噬细胞浸润为特征的急性炎症反应^[17,18],这种免疫和炎症反应直接影响腺病毒的转染和表达。正在研究和适用的新一代缺陷腺病毒载体可以更有效地驻留病毒表达蛋白,减少这种蛋白特发的细胞免疫反应。非病毒类载体以质粒DNA和脂质体DNA为主,均为非整合状态存在。质粒DNA转染安全、简便,但转染效率低,只接近1%。脂质体DNA较质粒转染率高,但成功转染需要高浓度脂质体,且具有细胞内脂质聚集的潜在毒性。目前在研究中还应用一种复合形式,如质粒DNA—HVJ。HVJ病毒有助有质粒转染到细胞中,转染率高,且缺乏相关毒性^[19]。

VEGF转染途径主要包括冠脉内转染和心肌转染。经皮冠脉内局部转染主要以介入方式,通过导

管球囊或支架上基因涂层,以压力方式^[20]或离子渗透方式^[21]将基因转染到冠脉血管壁内,它主要应用于再狭窄的防治。冠脉内直接基因注射转染率低,基因转染不局限,易有系统转染扩散的危险。心肌内注射是目前应用最广的转染方式,其转染范围局限、准确、操作简便,较少有系统扩散的危险。微創心肌内注射方式,可以避免开胸创伤,通过电生理左室定位,用导管进行心室注射转基因^[22]。通过导管技术进行心包内转染^[23],可有效地将基因转染到脏层心包组织,试图达到治疗心肌疾病的目的。

目前,在 VEGF 基因治疗冠心病方面,虽然有多种载体和转染系统可供选择,但是仍存在如下问题有待解决^[24]:1. 载体相关炎症 2. 局限的表达时间 3. 不完善的转染系统 4. 基因表达率不高。尽管如此,近两年许多研究机构进行了这方面的动物和临床实践,主要集中在应用质粒和腺病毒作为载体以心肌内直接注射方式转基因治疗冠心病。

四、VEGF 基因治疗冠心病的动物实验

国外五年前已经开展了这方面的基础研究。美国波士顿伊丽莎白医学中心 ISNER 研究小组,率先将 VEGF 基因直接肌肉注射治疗肢体缺血性疾病。无论在动物实验还是一期临床都取得了很好的结果^[25,26]。在此之后,他们将类似的治疗方法应用到冠心病。在起初的动物实验阶段,他们将表达 VEGF 质粒直接心肌注射治疗小型猪的慢性心肌缺血模型,并得到如下结论^[27]:①通过血浆 VEGF 蛋白 ELISA 定量检测和心脏 VEGF 蛋白 Western 杂交检测,质粒导入心肌后得到有效表达,表达高峰出现在术后 7 天左右;②通过术前术后核素扫描及冠造对比,说明经过基因治疗后,缺血心肌新生血管较对照组明显增多,心肌灌注得以改善;③通过围手术期血流动力学监测、心电监测、术前后超声对比、血心肌酶、以及组织病理检测,认为这种治疗方式是安全的。在纽约医院的另一个研究小组,以腺病毒作为载体,直接心肌注射 VEGF 基因治疗小型猪慢性心肌缺血模型,得到了与质粒注射相似的动物实验结果^[28]。

五、VEGF 基因治疗冠心病的临床

1998 年,ISNER 研究小组率先将 VEGF 质粒应用到一期临床。在随后的一年中有 20 例接受了用单纯基因治疗终末期冠心病。虽然开展的病例数有限,随诊时间不长,但近期的临床结果仍然令人鼓舞^[29]。除一人在术后 4 月因非心脏原因死亡外,所有病人心绞痛发作次数、服药量均有明显减少,活动

耐量增高。其次,通过手术前后核素 SPECT 以及冠造对比,心肌灌注有明显改善。最后,通过围术期血流动力学监测、心电图、超声(包括 TEE)、血生化指标证实,基因注射前后未出现新的心肌梗死、心功能损害、室壁运动的异常。这些临床结果可以提示:VEGF 质粒直接心肌注射在临床应用中是安全、有效的。但就目前的临床结果,其治疗疗效还需进一步的远期随诊观察。一期临床实验研究由于采用非随机方法,没有设立对照组,其疗效还有待进一步评价。1999 年,纽约的研究小组率先将腺病毒介导的 VEGF 基因应用于一期临床^[30]。在接受治疗的 21 例中有 6 例是单纯进行基因注射。在这 6 例中,术后心绞痛症状、踏板实验、核素及冠状动脉造影指标均较术前有明显改善。通过围术期监测、心电图、超声、血生化提示这种治疗方式具有一定安全性。但是以腺病毒作为载体,其引发的免疫炎症反应,目前仍有争论,还需在临床和动物实验中观察和评价。

六、VEGF 基因合并激光心肌运重建术(TMR)治疗冠心病的临床研究

最初是 VEGF 蛋白合并 TMR 在非缺血模型的实验研究。在一月后的病理组织检查中,实验组与对照组新血管的增生未见显著性差异。说明单一进行 VEGF 蛋白注射并不能获得有效的、足够多的新生血管^[31]。为了使 VEGF 在一段时间的长期、稳定表达,在小型猪慢性心肌缺血动物模型上进行了 VEGF 质粒合并 TMR 的动物实验研究^[32]。研究中发现:1. 合并治疗组的基因表达率要高于单纯基因治疗的表达率。其原因可能在于:TMR 的热损伤提高了可复性损伤细胞对质粒的摄取,增加了基因表达;TMR 本身的损伤刺激,致使产生炎症反应,促进毛细血管及大血管生成。2. 术后 6 周,通过超声对室壁运动评价提示:合并治疗的室壁运动异常率要明显低于单纯 VEGF 基因治疗或单纯 TMR 治疗,说明合并治疗在疗效上优于后二者。另一组关于 TMR 合并 VEGF 腺病毒在缺血模型上的动物实验研究,通过激光隧道内直接注射转基因方法^[33]结果表明,TMR 合并 VEGF 的基因表达要低于 VEGF 组。通过免疫组化白细胞 CD—18、CD—4、CD—8 的检测评估,作者认为合并治疗基因表达率降低并不是因为病毒介导的免疫反应,而是激光所至的组织损伤和炎症反应。TMR 与基因治疗的相互关系、作用机理、作用效果还不十分明确,还有待进一步的研究阐明。

参 考 文 献

1. Luj Wiedemann H, Himpl R, et al. Similarity in structure between clq and collections as judged by electron microscopy. *Behring Inst Mitt*, 1993, 93:6.
2. Shweflin D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-in situated angiogenesis. *Nature*, 1992, 359:843.
3. Banai S, Jaklitsch MT, Show M, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*, 1994, 89:2183.
4. Ku DD, Zaleski Jk, Liu SY, et al. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol*, 1993, 265:H586.
5. Sellik FW, Wang SY, Stamler A, et al. Enhance microvascular relaxation to VEGF and bFGF in chronically ischemic porcine myocardium. *Am J Physiol*, 1996, 271(2P2): H713.
6. Yang Thomas GR, Bunting S, et al. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1996, 27(26):838.
7. Asahara T, Bauters C, Pastore C, et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon injured rat carotid artery. *Circulation*, 1995, 91(11):2793.
8. Harada K, Friedman M, Lopez JJ, et al. Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol*, 1996, 270:H1791.
9. Hariawala MD, Horowitz JJ, Eakof D, et al. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res*, 1996, 63:77.
10. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 1994, 93:662-70.
11. Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 1990, 10:4239-4242.
12. O'Brien ER, Alpers CE, Stewart DK, et al. Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue: Implications for antiproliferative therapy. *Circ Res* 1993, 73:223-231.
13. Lemarchand P, Jones M, Yamada I, Crystal RG. In vivo gene transfer and expression in normal uninjured blood vessels using replication-deficient recombinant adenovirus vectors. *Cardiovascular Res*, 1997, 35:391-404.
14. Laurent J, Feldman, Gabriel Steg. Optimal techniques for arterial gene transfer. *Cardiovascular Res*, 1997, 35:391-404.
15. Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, Leiden JM. Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nature Med*, 1996, 2:545-550.
16. Yang Y, Nunes FA, Berencsei K, Furth EE, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits El-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91:4407-4411.
17. Schulick AH, Newman KD, Virmani R, Dicke DA. In vivo gene transfer into injured carotid arteries. Optimization and evaluation of acute toxicity. *Circulation*, 1995, 91:2407-2414.
18. Feldman LJ, Pastore CJ, Aubailly N, et al. Improved efficiency of arterial gene transfer by use of poloxamer 407 as a vehicle for adenoviral vectors. *Gene Ther*, 1997, 4:189-198.
19. Morishita R, Gibbons G, Kaneda, Y, et al. Novel and effective gene transfer technique for study of vascular renin angiotensin system. *J Clin Invest*, 1993, 91:2580-2585.
20. Wolinsky H, Thung SN. Use of a perforated balloon catheter to deliver concentrated heparin into the wall of the normal canine artery. *J Am Coll Cardiol*, 1990, 15:475-481.
21. Fernandez-Ortiz A, Meyer BJ, Mailhac A, et al. A new approach for local intravascular drug delivery: Iontophoretic balloon. *Circulation*, 1994, 89:1518-1522.
22. Peter R Vale, Douglas W, Losordi, MD, et al. Catheter-based myocardial gene transfer utilizing nonfluoroscopic electromechanical left ventricular Mapping. *J Am Coll Cardiol*, 1999, 34:246-54.
23. Keith L M, Michael Woody, M. S, et al. Efficient in vivo catheter-based pericardial gene transfer mediated by adenoviral vectors. *Clin Cardiol*, 1999, 22:1-23-1-29.
24. Peter Sinnaeve, Olivier Varenne, et al. Gene therapy in the cardiovascular system: an update. *Cardiovascular Res*, 1999, 44:498-506.
25. Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation*, 1996, 94:328-90.
26. Losordo DW, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis. *Circulation*, 1998, 98:2800-4.
27. Rene A. Tio, Tengis Tkebuchava, et al. Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Human gene therapy*, 1999, 10:2953-2960.
28. Charles A. Mack, MD, et al. Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, 115:168-77.
29. James F, Symes, MD, et al. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg*, 1999, 68:830-7.
30. Todd k. Rosengart, MD, et al. Angiogenesis gene therapy: Phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation*. 1999, 100:468-474.
31. Kirk J. Fleischer, MD, et al. One-month histologic response of transmyocardial laser channels with molecular intervention. *Ann thorac surg*, 1996, 62:1051-8.
32. Umer Sayeed-Shah, MD, et al. Complete reversal of ischemic wall motion abnormalities by combined use of gene therapy with transmyocardial laser revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, 116:763-9.
33. G. Chad Hughes, Brian H. Annex, et al. Transmyocardial laser revascularization limits in vivo adenoviral-mediated gene transfer in porcine myocardium. *Cardio Res*, 1999, 44:81-90.