

心血管分子生物学研究进展

Progress in Cardiovascular Molecular Biology

周爱儒 汤 健

(北京医科大学心血管基础研究所, 教授 北京 100083)

心血管病是一类严重危害人类生命健康的疾病,其发病率和病死率位于各类疾病的第一、二位。据估计,全世界每年因心血管病死亡的人数超过2 000万。我国各地高血压的发病率为8%~20%,近年来有明显增高的趋势。百余年来,人们对心血管病进行了大量的研究,亦取得了很大的进展。但迄今为止,对于某些心血管病的发病原理还不十分清楚,因此尚无有效的防治措施。与其它系统一样,心血管的研究可以从整体、器官、细胞和分子四个水平进行。近20年来,由于分子生物学理论和技术的发展,人们逐步认识到:心血管生理、病理最本质、最核心的问题是基因及其调控问题。但是,与肿瘤比较,心血管系统分子生物学的研究起步较晚,基础比较薄弱。

心血管分子生物学的主要内容包括五个方面:(1)心血管系统重要蛋白质的基因克隆和表达。(2)心血管细胞增殖、分化和凋亡的基因调控。(3)心血管病发病的分子生物学机理。(4)心血管病的基因诊断。(5)心血管病的基因治疗、基因预防和基因药物。本文结合我研究所近年来的工作,简要介绍以下几个方面的研究进展。

一、心血管系统的基因克隆

人类基因组DNA约含有 3×10^9 个碱基对和10万个表达蛋白质的基因。实际上,这些蛋白质基因的总长度仅占全部基因DNA的5~10%。从1990年开始实施的全球范围人类基因组计划(Human Genome project, HGP)预计用15年时间作出人类全部基因图(gene map)和基因组DNA的全序列,这将为了解所有基因的位置、结构、功能、表达调控,以及包括心血管病在内的疾病基因奠定基础。

据估计,心血管系统约有2万多个基因,目前克隆出的不足20%,其中一些基因的功能尚不十分清楚。心血管系统的蛋白质大体上可分为三大类:结构蛋白质,如细胞骨架蛋白、基质蛋白等;功能蛋白质,如肌球蛋白、肌动蛋白等;调节蛋白质,如血

管活性多肽、离子通道蛋白、多肽生长因子等。当然,这种分类只是相对的,因为许多所谓“结构蛋白质”也具有重要的作用;反之亦然。这些蛋白质均由相应的基因编码而合成。以常见血管活性多肽为例,其中相当一部分基因现已克隆出来。现已确定,人肾素基因位于第1号染色体上,全长11.7kp,有10个外显子和9个内含子,转录的mRNA为1.6kb;肾素基因中还含有多个顺式和反式调节原件。血管紧张素原的基因定位于1q42—43,由5个外显子和4个内含子组成,其cDNA约12kb,TATA盒位于5'端—31处,其上游含有雌激素、cAMP等反应原件。血管紧张素转换酶基因位于17q23,全长21kb,由26个外显子和25个内含子组成,有两个启动子。内皮素基因定位于第6号染色体(6p23),全长约6.8kb,含有5个外显子和4个内含子,其mRNA为2.2kb。内皮素A型受体基因位于第4号染色体,全长40kb,含有8个外显子和7个内含子,无TATA盒;内皮素B型受体基因全长36kb,含7个外显子和6个内含子,有多个启动子,但也缺乏TATA盒。人一氧化氮合成酶基因定位于7q36,全长25kb,含26个外显子和25个内含子,有一个TATA盒和CAAT盒。

高血压的发病机理十分复杂(我所提出的高血压发病分子机理假说示意图见封二),多年来人们致力于高血压相关基因的研究。虽然迄今已发现近百种基因可能与高血压发病有关,包括上述各种血管活性物质的基因,但对它们在高血压发病中的确切作用目前尚未定论,尤其是还不能肯定哪一种基因是高血压的关键基因。近年我们研究所开展了寻找新的高血压相关基因的研究。主要策略是:依据SHR(自发性高血压大鼠)和WKY大鼠(正常血压)为同一种系大鼠,但二者血压表型不同。我们应用差异显示法(differential display)对两种大鼠培养的血管平滑肌细胞中mRNA进行分析,发现其二者mRNA图谱存在差异,即一些mRNA在SHR中高表达,而另一些mRNA则在WKY中高表达。对这些差异的mRNA进行反转录扩增,获取cDNA,经克隆、

测序,并与已知大鼠基因库 cDNA 比较,发现两段 cDNA 与已知 cDNA 无同源性。再以此为探针,从大鼠主动脉血管平滑肌细胞的 cDNA 文库中筛选、克隆,分别获得两个阳性,定名为 HRG—1 和 HRG—2。前者 cDNA 长约 2.6kb,现已获得其 3'端 1.5kb 的核苷酸序列,它与现知大鼠基因无同源性。这一新基因在 WKY 鼠的血管平滑肌细胞、肾脏、心脏中高表达;应用内皮素促进血管平滑肌细胞增殖时,其表达下降,表明可能属于抑制平滑肌细胞增殖、降低血压的相关基因。在人体亦存在类似 HRG—1 的基因。这一基因已被国际 Gene Bank 收录、公布。HGR—2 基因目前亦已获得 3'端 0.56kb 的部分序列。

高血压是一种多基因决定和受环境因素影响的疾病。多种基因参与血压调节,并彼此相互协同或拮抗,它们在高血压发病中的作用各异。不同类型、不同时期的高血压中,相关基因也可能不同。研究高血压的关键基因是一项长期而艰难的工作。

二、血管平滑肌细胞增殖的分子生物学机理

现已确定,血管平滑肌细胞增殖是多种心血管疾病的重要细胞学基础,包括高血压、动脉粥样硬化、血管再狭窄等。因此,血管平滑肌细胞增殖的分子机理研究受到人们高度重视。

细胞增殖的调控十分复杂,血管平滑肌细胞也不例外。据目前所知,有多种因素影响平滑肌细胞增殖,包括癌基因和抑癌基因、细胞周期基因、生长因子及其受体基因,以及一些血管活性多肽的基因等。

癌基因 (oncogene) 与抑癌基因 (tumor Suppressive gene) 虽然最初是从癌瘤研究中发现的,但现已有充分证据表明它们是一类正常基因组,不仅参与癌瘤的形成,而且对包括血管平滑肌细胞在内的其它细胞的增殖调节也具有重要作用。例如,血管平滑肌细胞的增殖和分化与癌基因表达密切相关。实验表明,胎鼠和新生大鼠的血管平滑肌细胞处于“合成状态”,其中癌基因 *myc* 和 *fos* 有较高表达,而成年大鼠的血管平滑肌细胞则处于“收缩状态”,其中 *myc* 和 *fos* 基因的表达较低。本研究所曾报道,自发性高血压大鼠 (SHR) 的血管平滑肌细胞处于增殖的“合成状态”,其中有多种癌基因表达增高。用限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP) 方法研究还表明,SHR 和高血压病人细胞中某些癌基因可能发生突变。与此同时,SHR 血管平滑肌细胞中野生型 P53 基因 (抑癌基因) 表达下降,而突变型 P53 基因 (癌基因) 蛋白表达增加。家兔动脉粥样硬化斑块组织中,P53 基因有甲基化改变。对人动脉

粥样硬化斑块中抑癌基因 P53 的序列测定证明,其基因第八外显子中 272 位密码子由正常的 GTG 变成 GCG,免疫组化也显示斑块组织中突变 P53 蛋白的表达。因此,我们曾提出,癌基因的过度表达和/或抑癌基因的突变、表达不足是血管平滑肌细胞增殖的重要原因之一。这些结果为阐明高血压、动脉粥样硬化、血管成型术后再狭窄等心血管疾病的分子机理提供了基因基础。

生长因子也是调节血管平滑肌细胞增殖、生长的重要因素。例如,我们的实验表明,SHR 比相应正常血压大鼠的血管平滑肌细胞中 IGF—I (胰岛素样生长因子—I) 及其受体 mRNA 均有较高表达,而 IGF—I 受体的反义基因则可抑制 SHR 血管平滑肌细胞的增殖。另有报道,TGF— β (转化生长因子 β) 与 EGF (表皮生长因子)、bFGF (成纤维细胞生长因子) 或 PDGF (血小板源生长因子) 等协同促进血管平滑肌细胞增殖的同时,也诱导其中 *c-myc* 基因的表达。促红细胞生成素 (EPO) 也可看成是一种促进血管平滑肌细胞增殖的生长因子。应用重组人 EPO 在促进平滑肌细胞增殖的同时,*c-myc*、*jun*、*c-fos* 的 mRNA 表达也增强,并表现磷脂酶 C 的激活。这些变化均可最终导致血管肥厚和高血压。现已证明,心血管细胞,包括血管平滑肌细胞、内皮细胞、心肌细胞等,不仅是多种生长因子作用的效应细胞,它们也是合成和分泌多种生长因子的细胞。这些生长因子主要通过自分泌和旁分泌方式,并彼此相互作用,形成复杂的网络 (network) 体系。它们不仅在维持心血管组织的正常结构和功能方面发挥重要作用,而且还参与以心血管细胞生长和分化异常为主要病理变化的心血管疾病的发生发展过程,其确切的作用机理尚有待进一步研究。

除了生长因子外,心血管细胞还可合成分泌多种心血管活性物质 (见封二循环系统内分泌理论示意图),包括缩血管多肽和舒血管物质。前者主要有肾素—血管紧张素系统 (RAS)、内皮素 (ET) 系统等;后者主要有血管内皮衍化舒张因子 (EDRF) 和心钠素等。这些物质不仅在血管张力调节中起重要作用,同时也是血管平滑肌细胞增殖的调节剂。例如,局部血管紧张素 II 通过 I 型受体,诱导 *ras*、*myc*、*fos* 等癌基因表达,促进血管平滑肌细胞增殖。内皮素也是血管平滑肌细胞的促分裂剂。我们的实验证明,SHR 的血管平滑肌细胞、心、肾等组织中 ET、ECE、(内皮素转换酶) 基因表达明显增加;向 SHR 血管平滑肌细胞中导入 ET 或 ECE 基因的反义寡聚核苷酸均可抑制细胞增殖。一氧化氮 (NO) 是 EDRF 的主要成员,它由精氨酸通过 NOS (一氧化氮合成酶) 催化生成,而 NOS 是其生成的限速酶。NO 除了作为细胞内的信息分子,参与多种生理活动外,还具有抑制血管平滑肌细胞增殖的功能。

我们的实验也表明,SHR 的血管平滑肌细胞、心、肾、脑组织中 NOS 基因表达降低;向高血压的血管平滑肌细胞中转移外源 NOS 基因,则可增加 NO 生成,抑制细胞增殖。由此可见,ET 与 NO 系统之间的平衡及相互调节在维持血压和血管平滑肌细胞的增殖状态中起重要作用。

在血管活性物质、生长因子调节血管平滑肌细胞增殖过程中,细胞内的信号传递途径具有重要意义。除了 G 蛋白、PKA(蛋白激酶 A)、PKC(蛋白激酶 C)、PI(磷脂酰肌醇)外,TPK(酪氨酸蛋白激酶)、MAPK(丝裂素活化蛋白激酶)是当前研究的热点。

细胞增殖和细胞凋亡(apoptosis)是维持细胞相对平衡的一对矛盾,心血管细胞也是如此。例如细胞凋亡参与血管的再塑(remodeling)过程。不仅对保持发育中血管壁的正常结构具有生理作用,而且也有病理意义。例如,血管损伤平滑肌细胞增殖的同时,亦发生凋亡,导致血管壁再塑。这可能与动脉粥样硬化和高血压的形成有关。

三、心血管病的基因治疗

基因治疗是通过转移外源基因,补充、校正、抑制靶细胞中某些基因的异常表达,或导入某些具有治疗作用的基因,达到治疗疾病的目的。1990 年美国对 ADA(腺苷脱氨酶)基因缺陷的艾滋病首例基因治疗成功,开创了人类应用基因治疗的历史。1993 年美国又利用 LDL—R(低密度脂蛋白受体)基因,成功地治疗了家族性高胆固醇血症,为心血管病基因治疗开辟了新的里程碑。据报道,世界各国现已有 100 多个基因治疗的方案在进行临床或临床前试验。心血管病是基因治疗研究的重要组成部分,但目前尚处于起步阶段。

确定治疗基因和合适的基因转移系统是实现基因治疗的两个关键。当前心血管病基因治疗的策略,即可供选择的靶基因主要有以下几类:

1. 针对血管平滑肌细胞增殖的基因。如前所述,血管平滑肌细胞的异常增殖是多种心血管病发病的重要环节。因此,抑制平滑肌细胞增殖则是这些心血管病治疗的重要途径。目前应用的基因有:反义细胞周期基因,如反义 cdc—2、反义 cdk—2 等;反义癌基因,如反义 ras、反义 myc、反义 myb 等;正义抑癌基因,如 Rb、P53 等。此外,促血管平滑肌细胞增殖的活性多肽反义基因(如反义血管紧张素转换酶、反义内皮素及反义内皮素转换酶等基因),抑制血管平滑肌细胞增殖的活性物质基因(如 NO 合成酶、心钠素等基因),反义生长因子及其受体基因等也均为可选择的基因。用于肿瘤治疗的单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV—TK)的“自杀性”基因,也能抑制血管平滑肌细胞增殖。本研究所应用上述

各类基因的转移,已获得在离体和整体情况下抑制平滑肌细胞增殖和血管再狭窄的良好效果。例如,我们重组反义 N—ras₁(外显子 1)基因和重组正义 P53 基因的逆转录病毒载体,通过球囊导管转染局部内皮剥脱损伤的血管壁,可以明显抑制血管内膜平滑肌细胞增生和再狭窄的发生(见封二图)。

2. 抗凝血和溶血栓的基因。血小板粘附、高凝状态和血栓形成心肌梗塞、脑血栓、PTCA—再狭窄等的主要危害因素。可供选择的基因有:反义粘连分子基因,如反义 VCAM、反义 ICAM 等;纤溶酶的基因,如 tPA、SK、Pro—UK(尿激酶原)等。本研究所通过腺病毒—pro—UK 基因转移,可显著抑制血管内皮损伤后血栓的形成,防止血管梗塞。

3. 促进血管生成和侧枝循环的基因。心肌梗塞、肢体血管闭塞等常引起组织坏死。促进局部新生血管形成和侧枝循环可以改善血液供应、防止或减轻坏死。VEGF(血管内皮生长因子)是一类特异促进血管内皮细胞增殖、促血管形成的生长因子。应用 VEGF 的基因可以治疗肢体脉管闭塞病、心肌梗塞等,称之为“分子搭桥术”。本研究所利用 VEGF 基因的肌肉缝线,促进大鼠动脉闭塞的下肢血管生成,治疗肢体血管闭塞病获得初步成功。

4. 降低血浆胆固醇和高脂血症的基因。高脂血症是动脉粥样硬化的重要病因。降低血脂的有关基因有:LDL—R 基因、脂蛋白脂肪酶基因,以及一些载脂蛋白(ApoE、ApoB)基因等。本所构建了腺病毒相关病毒(AAV)/LDL—R 载体,治疗家兔实验性高胆固醇血症也获成功(见封底图)。

5. 增加心肌收缩力的基因。心肌梗塞引起的纤维化是影响心肌收缩功能的重要原因。利用某些促进纤维母细胞肌源化的基因,如 MyoD 基因,可以使纤维母细胞分化成为肌细胞,恢复心肌收缩力。

随着心血管病发病分子生物学机理研究的深入,相信还会有更多的基因可供治疗的选择。但是,值得提出的是,心血管病属于多基因异常的疾病,不像单基因缺陷的遗传病那么简单,由此大大增加了心血管病基因治疗的复杂性和研究难度。

选择有效的基因转移方法或基因运载系统(gene delivery system)是基因治疗成功的另一个关键,心血管病的基因治疗也不例外。目前,基因转移方法可大体分为非病毒介导和病毒介导两大类。前者包括物理法、化学法、受体介导法等;后者有逆转录病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒和其它病毒载体等。近年来,我们及其它实验室将上述两类方法结合起来,又发展了病毒—脂质体(其构建示意图见封面)和受体—病毒介导的基因转移方法。理想的基因转移方法应该是安全、高效、特异、稳定、简便,并具有可控制。现有的基因转移方法各有优缺点,但均不够理想。因此,发展更好的基因运载体系

是基因治疗研究的重要课题。本研究所近年发明了基因缝线方法(见封三图),对肌肉、血管等组织进行基因转移,简便易行,效率高。此外,我们还根据内皮素受体 A、B 亚型选择性分布的特点,分别构建了血管内皮细胞和平滑肌细胞的高度靶向性基因转运载体(见封三图)。上述两项技术均已获得国家专利。在心血管病的基因治疗中,血管腔内的基因转移起着重要作用。国外常用的方法是水凝胶(hydrogel)球囊法,但这种方法的转移效率较低。我所发展的多聚赖氨酸基因球囊(见封三图)、基因支架等均可明显提高转基因效率。

近几年来,心血管病基因治疗取得了一些进展,展示了诱人的前景,因此成为世界各国的研究热点之一。但目前多处于基础试验或实验室研究阶段,向临床应用的过渡还有许多问题尚待解决。对

此,我们应该采取既积极又慎重的态度。

心血管分子生物学的研究内容十分广泛。本文的几例仅反映了若干侧面,难免“挂一漏万”。例如,近年来对收缩蛋白、细胞粘附分子、细胞外基质等在心血管系统中作用的研究受到高度重视,亦取得较大进展。分子遗传学也大大推动了遗传性心血管疾病的研究。此外,随着分子生物学技术的发展,转基因动物和基因敲除(gene knock out)在心血管研究中逐步得到普遍应用。在心血管病治疗中利用基因药物的时代也不再遥远。这些研究的结果必将更加加深对心血管病发病机理的认识,从而对诊断和治疗有所创新和突破。心血管分子生物学研究前景广阔。我国心血管分子生物学的研究历史不长,任重而道远。

(责任编辑 王宏章)

彩图说明

循环系统的内分泌功能理论和高血压发病机理的假说

周爱儒

(北京医科大学心血管基础研究所,教授 北京 100083)

一、

封二图 1 是血液循环系统的内分泌功能理论示意图,它好似一把“钥匙”。心血管系统不仅是一个血液循环的动力和管道体系,而且心血管细胞亦可以自身合成和释放多种内分泌物质(标注在图 1 上)。这些物质通过自分泌、旁分泌、胞内分泌和循环分泌等不同方式,调节心血管的活动和细胞的生长、增殖。循环系统的内分泌活性物质在心血管的功能调节和心血管病的发病过程中具有重要意义。许多环境因素和致病因子均可通过心血管内分泌的途径而发挥作用。循环系统内分泌的平衡是维持心血管正常功能的必备条件,而其平衡的紊乱则是发生心血管疾病的物质基础。由此可以认为,循环系统内分泌是了解心血管功能和解释心血管病发病机理的一把“钥匙”,在防治心血管病药物的研究和开发中也具有重要作用。

(上接第 24 页)

应高度重视,加大对农业科技、教育领域的支持力度,使规模经营特别是农村经济的发展纳入科学的发展轨道,使其与现代化农业生产模式的建立相联系。

粮食生产的规模经营,是联产承包责任制与农业现代化建设的最佳结合点,是农业生产向更高水平发展的必然要求,它能使生产力获得一次解放。推进粮食生产规模经营并不是规模越大越好,必须注意适度。适度是一个动态的概念,是由多因素决

二、

封二图 2 是高血压发病机理的假说的示意图。血压的调节是一个多级自分泌、旁分泌网络“阴阳”平衡的过程。这种平衡的失调可以引起高血压。各种环境致病因子或遗传因素可以通过心血管系统自分泌和旁分泌调节网络,引起促高血压活性物质(如肾素血管紧张素系统、内皮衍化收缩因子)过量分泌和/或抗高血压活性物质(如心钠素、内皮衍化舒张因子)产生、分泌不足,导致平衡失调。这种活性物质的失调,再通过细胞内信息传导体系(G 蛋白、磷脂酶、酪氨酸蛋白激酶、Ca²⁺等),将信息传递至细胞核,引起某些癌基因表达增强和/或抑癌基因表达不足、某些生长因子基因表达增强和/或生长抑制因子基因表达减弱,致使血管平滑肌细胞表型变化,促进增殖和异常分化。由此产生血管再塑,使血管壁细胞重排和结构改变、管腔狭窄、反应性增加、外周阻力增高,导致高血压。

(责任编辑 王宏章)

定的,应当因地制宜,要运用市场调节这个杠杆去实现它的适度。有关部门在实施的时候,应把握这样一个原则,即规模经营的土地产出率、粮食商品率应高于当地平均水平,以确保社会粮食生产总量的增加。粮食生产的规模经营伴随着农村经济的发展而产生,在社会主义市场经济的建立中不断得到完善,并将在农业现代化的建设中发挥其应有的作用。

(责任编辑 王宏章)