

RNAi 在血管成形术后再狭窄防治中的研究进展

黄胜超 李建文

血管成形术后再狭窄 (restenosis) 是困扰血管外科的一大难题,也是血管外科研究的热点,其发生的机制尚未完全阐明,内皮细胞损伤、血栓形成、内膜增生是再狭窄的主要病理改变,而血管平滑肌细胞增生并向内膜迁移、细胞外基质堆积是再狭窄的病理学基础。血管重建术后再狭窄是多种基因、细胞因子、细胞信号分子、血管活性物质等各种因素参与的复杂病理过程。目前已对血管成形术后再狭窄的防治进行了大量的研究,包括药物治疗、放射治疗、支架修饰和基因治疗等。但现有药物都未能降低血管成形术后再狭窄的发生率;血管内放射治疗、支架修饰等治疗方法虽取得一些疗效,但均存在相当程度的再狭窄率。随着 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术的迅速发展,国内外已有学者在 RNAi 技术防治血管成形术后再狭窄领域作了大量研究,现综述如下。

一、RNAi 技术

1. RNAi 技术的发现与发展:RNAi 是一种广泛存在生物界的古老现象,1990 年 Napolie^[1] 在研究牵牛花时,牵牛花本来有的紫色素基因和转入的外来紫色素基因都失去了功能,并称这种现象是“协同抑制”。1994 年, cogni 等^[2] 在链孢菌中发现了 RNA 干扰现象,他将外源类胡萝卜素基因导入链孢菌,结果使转化细胞中的内源性类胡萝卜素基因受到了抑制,当时称这种现象为消除作用。1995 年,康奈尔大学的 Guo 和 Kempthues^[3] 在线虫中进行反义 RNA 实验时观察到正义 RNA 也具有很高的基因沉默活性。1998 年,华盛顿 Carnegie 研究院的 Andrew Fire 和 Craig Mello^[4] 通过实验阐明了这一反常现象:在秀丽线虫同时注射反义 RNA 和正义 RNA 比单独注射反义 RNA 诱导基因沉默的效率 10 倍。他们的研究证明,在正义 RNA 阻断基因表达的试验中,真正起作用的是双链 RNA,制备正义 RNA 或反义 RNA 时都污染了少量

dsRNA,由此推断,是 dsRNA 触发了高效的基因沉默机制并极大地降低了靶基因的 mRNA 水平,故将这一现象命名为 RNAi。

RNAi 是生物界普遍存在的一种基因调节机制和防御现象。但在哺乳动物细胞中,大于 30bp 的 dsRNA 导入后,会启动细胞内的病毒防御机制, RNA 依赖的蛋白激酶 (RNA - dependent protein kinase, PKR) 被激活,使翻译起始因子 eIF2a 磷酸化,导致细胞内全部蛋白质合成关闭;活化的 PKR 还可以活化 2,5 - 寡聚腺苷酸合成酶,生成 2,5 - 寡聚腺苷酸,从而激活非序列专一性的 RNaseL,引起 mRNA 的非特异性降解;PKR 可以激活干扰素基因的表达,进一步扩大 dsRNA 的非特异性作用。上述因素在一段时间内限制了 RNAi 在哺乳动物细胞中的应用。2001 年 Elbashir 等^[5] 首次采用化学合成的 21 个核苷酸 siRNA 导入到人胚肾细胞 (human embryo kidney, HEK) 和人宫颈癌细胞 (HeLa) 中,模拟了 Dicer 产物,观测到 RNAi 现象的发生,而未激活非特异的干扰素现象。此后 RNAi 技术在哺乳动物细胞基因功能的研究中得到了广泛应用。现 RNAi 技术已经广泛应用于基因研究、转基因技术、基因治疗、药物开发等领域。

2. RNAi 的机制:生化和遗传学研究表明, RNAi 的作用机制包括起始阶段和效应阶段。在起始阶段,实验导入、异常表达的转基因、RNA 病毒感染、转座子转录等来源的细胞内 dsRNA 被特异的 RNase III 类核酸酶 (又称 Dicer 酶) 以 ATP 依赖的方式切割成小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)^[6]。siRNA 的结构为长为 21 ~ 23 核苷酸 (nucleotide, nt) 的双链 RNA, 5' 单磷酸和 3' 羟基末端,互补双链的羟基端均有一个 2 ~ 3nt 的单链突出^[7]。在效应阶段, siRNA 与一个核酶复合物结合,形成 RNA 诱导沉默复合物 (RNA - induced silencing complex, RISC)^[8]。首先 RISC 中的 siRNA 变性,正义链与反义链解离开,然后反义链在 ATP 的作用下,通过碱基互补配对与同源的靶 mRNA 结合,在核酸内切酶的作用下,自 siRNA 中点位置将靶 mRNA 切断,从而诱发宿主细胞针对

基金项目:广东省自然科学基金资助项目 (8152402301000015)

作者单位:524001 湛江,广东医学院附属医院血管外科

通讯作者:李建文,电子邮箱:gdyfywjk@163.com

这些 mRNA 的降解反应。siRNA 不仅能引导 RISC 切割同源单链 mRNA, 而且可作为引物与靶 RNA 结合并在 RNA 聚合酶作用下合成更多的新的 dsRNA, 新合成的 dsRNA 再由 Dicer 切割产生大量的次级 siRNA, 从而使 RNAi 的作用进一步放大, 最终将靶 mRNA 完全降解。

二、RNAi 在血管成形术后再狭窄防治中的研究进展

1. RNAi 在调控细胞生长因子及血管活性物质的研究: 血小板源生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 是结缔组织源性细胞强有力的促有丝分裂剂, 是促血管平滑肌细胞增生和迁移的重要细胞生长因子。季军等^[9]将 PDGF-B siRNA 表达载体转染入兔髂动脉再狭窄模型的动脉内膜, 结果表明 PDGF-B siRNA 显著抑制血管平滑肌细胞表达增生细胞核抗原 (PCNA)、PDGF-B mRNA 和内膜增生。载脂蛋白 D (apolipoprotein D, ApoD) 是 PDGF-B 调节血管平滑肌细胞迁移的必要因子, Leung 等^[10]将针对 ApoD 的 siRNA 转染入人肺动脉血管平滑肌细胞中, 结果显示 ApoD mRNA 和 ApoD 蛋白显著降低, 博伊登室 (Boyden chamber) 的迁移测定显示血管平滑肌细胞迁移降低。

碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 对血管平滑肌细胞增生和迁移、新生血管的形成及血管损伤后内皮细胞的移行有重要作用。bFGF 对血管平滑肌细胞增生和迁移的机制主要与活性氧 (reactive oxygen - species, ROS) 有关, ROS 不仅可以作为第 2 信使活化丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK), 而且还增加了 bFGF 与血管平滑肌细胞表面的 bFGF 的受体结合能力, 从而促进血管平滑肌细胞增生和迁移。NOX (NADPH oxidase 是 NADPH 氧化酶的同源物, 可以激活多条信号转导通路, 调节细胞的生长、增生、分化, NOX 家族有 6 个成员即 NOX1、NOX3、NOX4、NOX5、DUOX1、DUOX2, 其中 NOX1 分布在血管平滑肌中。Schroder 等^[11]发现 NOX1 siRNA 能减少 ROS 的生成, 从而抑制了 bFGF 诱导的血管平滑肌细胞增生和迁移。

肾素-血管紧张素系统 (RAS) 在血管成形术后再狭窄的发生起着重要作用, 血管紧张素 II (Ang II) 是 RAS 的最重要的活性物质, 通过激活血管紧张素 II 受体 (AT) 发挥效应。Ang II 与多种细胞因子、生长因子相互作用, 启动了不同的细胞内信号转导系统, 促进血管平滑肌细胞增生、肥大并参与血管重塑。

Zhang JQ 等^[12]构建针对血管紧张素 II 1a 型 (AT1a) 受体的 SiRNA 表达质粒载体, 并转染入血管平滑肌细胞, 实验结果表明其能抑制 AT1a 型受体基因表达, 并抑制 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞增生。

2. RNAi 对血管成形术后再狭窄细胞信号传导的调控: 胞外的信号分子可以通过激活血管平滑肌细胞磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 - kinase, PI3K) 而激发血管平滑肌细胞增生和迁移。PI3K 磷酸化磷脂酰肌醇, 产生磷脂酰肌醇 3, 4 - 二磷酸 (PI 3, 4 - bisphosphate, PI3, 4 - P2) 和磷脂酰肌醇 3, 4, 5 - 三磷酸 (PI3, 4, 5 - trisphosphate, PI3, 4, 5 - P3 或 PIP3)。PI3, 4 - P2 和 PIP3 是调节细胞增生、迁移的重要信号分子。刘苏健等^[13]将针对 PI3K - Akt - mTOR 信号通路中的上游信号分子 PI3K p110 β 亚单位编码基因 Pik3cb 的 SiRNA 表达载体转染大鼠主动脉血管平滑肌细胞, Western blot 检测 PI3K 下游信号分子 Phospho - Akt 蛋白于转染后 24h、48h 分别降低 57.4% 和 75.1%, 流式细胞术检测转染后细胞凋亡增加。

核因子 κ B (nuclear factor - κ B, NF - κ B) 是真核细胞的转录因子, NF - κ B 体系主要参与机体防御反应、组织损伤和应激、细胞分化和凋亡以及肿瘤生长抑制过程的信号传递。Dwarakanath 等^[14]将 NF - κ B p65 的 siRNA 转染入平滑肌细胞中, 实验结果显示 NF - κ B p65 蛋白表达明显下降, 而且有效地阻断 13 - HPODE (13 - hydroperoxyocta decadienoic acid) 诱导的 MCP - 1 (monocyte chemoattractant protein - 1) 和 TNF - α 基因表达, 抑制平滑肌细胞炎症反应和增生。

小 G 蛋白 (small G protein) 是一组相对分子质量 20 ~ 30kDa 的细胞内重要信号分子, 具有 GTP 酶活性, 在细胞内起分子开关作用。当血管壁细胞受到生长因子、细胞因子等细胞外有害刺激时, 信号在细胞内经小 G 蛋白转导, 引起血管内皮细胞、血管平滑肌细胞功能、形态、表型和基因表达等改变, 参与再狭窄进程。Min 等^[15]构建了小单体 GTP 结合蛋白 (small and monomeric GTP binding protein, Ki - ras2A) siRNA 的表达载体, 并转染入 VSMC 后, 结果表明 Ki - ras2A 的表达明显降低, MKP - 1 (mitogen - activated protein kinase phosphatase - 1) 增加而磷酸化的 ERK (extra-cellular regulated kinase) 减少, 抑制血管平滑肌细胞增生。

3. RNAi 对血管再狭窄基因水平的调控: bcl - 2

基因是细胞凋亡的重要抑制基因,抑制 bcl-2 表达可以促进血管平滑肌细胞的凋亡,从而能预防血管再狭窄。陈华等^[16]将装载靶向 bcl-2 基因小干扰 RNA (siRNA) 的表达载体 (pshRNA-bcl-2 质粒) 转染入体外培养的兔血管平滑肌细胞,36h 后 RT-PCR 检测实验组的 bcl-2 mRNA 表达水平下降,Western blot 检测实验组的 bcl-2 蛋白下降达 89.6%,而空载体对 bcl-2 无抑制作用,结果表明 pshRNA-bcl-2 具有特异性抑制血管平滑肌细胞目的基因 bcl-2 的作用。

AP-1 转录因子是一类由立即早期基因编码的核转录因子。AP-1 组成成员包括 C-Fos 家族的 C-Fos、Fos-B、Fra-1、Fra-2, C-Jun 家族的 C-Jun、Jun-B、Jun-D。Zhang HW 等^[17]设计了针对 AP-1 的 siRNA,转染入大鼠血管平滑肌细胞,结果表明 AP-1 siRNA 不仅能抑制大鼠血管平滑肌细胞的 AP-1 mRNA 表达,而且能降低 C-Jun 和 C-Fos 的磷酸化水平,同时降低了 U-PA、MMPs、TGF- β_1 、bFGF 的表达,从而抑制了血管平滑肌细胞的增生、迁移和分化。

4. RNAi 在调节细胞外基质的研究:骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 是细胞外基质中一种重要的磷酸化糖蛋白,是血管平滑肌由收缩表型向合成表型转化的标志基因,又是血管细胞的主要黏附及趋化因子。参与血管成形术再在狭窄的细胞因子:PDGF、bFGF、EGF、TGF- β 、TL21、Ang II 均能刺激血管内皮细胞和平滑肌细胞过度表达 OPN。Ye S 等^[18]将 OPN 短发夹 RNA (shRNA) 的表达质粒转染入大鼠血管平滑肌细胞,RT-PCR 检测 OPN mRNA 和 Western blotting 检测 OPN 蛋白均明显下降,MTT 检测显示血管平滑肌细胞增生受抑制,ELISA kit 检测 I 型和 III 型胶原分泌明显减少。

透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是血管成形术后再狭窄损害细胞外基质中的重要成分,调节血管平滑肌细胞的表型,促进血管平滑肌细胞的增生和迁移。HA 是由透明质酸合酶 (hyaluronic acid synthase, HAS) 合成,血管平滑肌细胞中 HAS 的主要亚型是 HAS2。Sussmann 等^[19]将特异的 HAS2 siRNA 转染入平滑肌细胞,结果显示 HAS2 mRNA 表达水平下降,透明质酸分泌下降 50%。细胞形态学分析表明 HAS2 参与调节细胞形态和伸展调节,抑制 HAS2 表达明显增加了单个平滑肌细胞所占的面积,转染 HAS2 siRNA 的平滑肌细胞胞质非常薄且与培养瓶底

面紧密连接,抑制平滑肌细胞的迁移和增生。

基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 是血管成形术后再狭窄的重要因素,不仅影响血管平滑肌细胞的增生和迁移,而且在血管基膜的分解与重塑中也起着重要作用。MMP-2 又称明胶酶 A,主要降解明胶和 I、II、III、VII 型胶原以及基膜成分,在血管细胞外基质重塑中起着重要作用,多种细胞因子刺激可诱导 MMP-2 表达增加。Hlawaty H 等^[20]构建了 MMP-2 siRNA 的表达载体,并分别转染在体内和体外兔血管平滑肌细胞,实验结果表明,MMP-2 siRNA 显著抑制了体外培养的血管平滑肌细胞 MMP-2 的基因表达和血管平滑肌细胞迁移;MMP-2 siRNA 转染活体内的球囊损伤动脉后,能降低平滑肌细胞中 MMP-2 前体的活性,这表明 MMP-2 siRNA 可用于修改活体内动脉生物学特性。

三、问题与展望

综上所述,RNAi 在血管成形术后再狭窄防治中的研究已经取得了一定的成绩,但还存在以下问题:①目前对 RNAi 的研究大多是体外细胞水平的研究,而在体内特别是人体试验中 siRNA 是否能有效地沉默目的基因而不干扰其他正常的基因仍需进一步的研究证明;②大多的实验是瞬时转染,如何在体内获得高效而稳定的转染仍需进一步探讨,需要寻找高效低毒的载体,研究更合适的基因输送技术;③血管成形术后再狭窄是一个多因素、多基因参与的复杂过程,仅沉默单个基因难以从根本上防治血管成形术后再狭窄,仍需探索再狭窄的关键基因及联合沉默多基因技术。以 siRNA 为基础治疗其他疾病的药物已经进入临床研究阶段,如治疗老年性黄斑变性、丙型肝炎的 RNAi 药物,这些临床研究为 RNAi 在血管成形术后再狭窄防治的研究提供了广阔前景。随着分子生物学技术的不断发展,RNAi 技术的不断改进,RNAi 技术一定会在血管成形术后再狭窄防治的研究领域中得到更广泛的应用。

参考文献

- 1 Napolio C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, 2: 279-289
- 2 Cogoni C, Romano N, Macino G. Suppression of gene expression by homologous transgenes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1994, 65: 205-209
- 3 Guo S, Kemphues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 1995, 81(4): 611-620
- 4 Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic in-

- interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811
- 5 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498
 - 6 Bernstein E, Caudya A, Hammond SM, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, 409(6): 363-366
 - 7 Hammond SM, Bernstein E, Beach D, *et al.* An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cell. *Nature*, 2000, 404(3): 293-296
 - 8 Zilbermann S, Cao XF, Jacobsen SE. Argonaute4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, 2003, 299(6): 716-719
 - 9 季军, 姬尚义, 令文萍, 等. 转染血小板源性生长因子-B 干扰性小 RNA 防治兔血管再狭窄的实验研究. *实用医学杂志*, 2008, 24(23): 4021-4022
 - 10 Leung W CY, Lawrie A, Demaries S, *et al.* Apolipoprotein D and platelet-derived growth factor-BB synergism mediates vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*, 2004, 95: 179-186
 - 11 Schroder K, Helmcke L, Palfi K, *et al.* Nox1 Mediates Basic Fibroblast Growth Factor-Induced Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(8): 1736-1743
 - 12 Zhang JQ, Ma YX, Wang DW, *et al.* Selective knockdown of Angiotensin II receptor subtype 1a in rat vascular smooth muscle cells by RNA interference. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2006, 34(1): 54-59
 - 13 刘苏健, 刘宏, 赵京, 等. 大鼠 Pik3cb 短发卡状 RNA 对平滑肌细胞增殖的影响. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2008, 28(10): 1234-1239
 - 14 Dwarakanath RS, Sahar S, Reddy MA, *et al.* Regulation of monocyte chemoattractant Protein-1 by the oxidized lipid, 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid, in vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 36(4): 585-595
 - 15 Min LJ, Mosl M, Li JM, *et al.* Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 2005, 97: 434-442
 - 16 陈华, 景在平, 包俊敏, 等. RNA 干扰对兔血管平滑肌细胞 bcl-2 基因表达的影响. *中国普外基础与临床杂志*, 2007, 14(1): 56-58
 - 17 Zhang HW, Wang X, Zong ZH, *et al.* AP-1 inhibits expression of MMP-2/9 and its effects on rat smooth muscle cells. *J Surg Res*, 2009, 157(1): e31-e37
 - 18 Ye S, Sun Y, Bie A, *et al.* Influence of osteopontin short hairpin RNA on the proliferation and activity of rat vascular smooth muscle cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009, 29(2): 144-149
 - 19 Sussmann M, Sarbia M, Meyer-Kirchath J, *et al.* Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. *Circ Res*, 2004, 94(5): 592-600
 - 20 Hlawaty H, San Juan A, Jacob MP, *et al.* Inhibition of MMP-2 gene expression with small interfering RNA in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(6): H3593-H3601

(收稿: 2010-06-07)

超声技术在颈内静脉穿刺置管术中的应用

陆利冲 汪小海 郑曼

超声技术具有操作简便安全, 显像实时直接, 无创伤、可重复等优点, 目前认为将超声技术应用于颈内静脉穿刺置管术中可使穿到颈内静脉的穿刺针数减少、穿刺置管时间缩短、穿刺成功率提高、并发症减少^[1-3]。尤其在对肥胖和婴幼儿患者等体表标志困难、颈椎及静脉畸形、反复穿刺失败及置管困难可能造成严重并发症时使用, 可使颈内静脉穿刺成功率大大提高^[4-8]。本文将介绍利用超声技术指导颈内静脉穿刺置管方法, 以及评价其带来的相关问题进行综

述。

一、作为颈内静脉穿刺置管用的超声类型选择

临床上超声引导颈内静脉穿刺置管时采用的超声设备主要有两种类型: 多普勒超声和 B 型超声(也称为实时二维超声)^[7,9-11]。多普勒超声应用时, 通过红细胞这个移动物体转换成一个放大的音频信号, 基于动静脉血流声音的不同, 实时提供声音信号帮助静脉穿刺, 更能以不同颜色显示血流的方向, 色泽的深浅代表血流的流速来更好地判断血管是否通畅、管腔是否狭窄、闭塞^[12]。但与 B 超相比需要更长的学习时间, 穿刺置管时间较长, 成本上升。Schummer 等人^[13]发现在两种类型的超声引导下颈内静脉一次穿刺成功率 B 超组明显优于多普勒组, 尤其是在体重

作者单位: 210008 南京医科大学附属鼓楼临床医学院麻醉科
(陆利冲、汪小海); 南京大学医学院附属鼓楼医院麻醉科(郑曼)

通讯作者: 汪小海, 电子信箱: wxh32@jlonline.com