

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.10.001

专家讲座

## 先天性心血管畸形的肺血管重构：一个历久弥新的话题

刘瀚旻

(四川大学华西第二医院儿科 / 肺血管重构研究室, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 左向右分流型先天性心脏病最严重的并发症是肺动脉高压, 肺动脉高压的实质是肺血管重构, 因此, 预防和逆转肺血管重构是提高患儿生存和生活质量的重要环节之一。本文从学科交叉的角度综述了肿瘤学和肿瘤药理学领域的进展对肺血管重构衍化出的新研究视点, 包括: 从肿瘤学的 DNA 损伤应答机制调控研究中提炼出来的全新的“ATM 通路表达的折点假说”, 提出了肺血管重构的关键环节——肺血管平滑肌细胞增殖的类肿瘤化可能是导致梗阻性肺动脉高压发生的基础病理; 从肿瘤药学的化疗药物在较低的非细胞毒浓度下具有较强的抗血管生成特性的理论拓展出的肺靶向给药系统逆转肺血管重构研究。这些新的研究方向将为肺血管重构的治疗拓宽新的研究领域。

[中国当代儿科杂志, 2013, 15(10): 805-809]

**[关键词]** 左向右分流先天性心脏病; 肺血管重构; DNA 损伤应答; 肺靶向给药

### Pulmonary vascular remodeling in congenital cardiovascular abnormalities: an eternal topic

LIU Han-Min. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Email: muxuan@163.net)

**Abstract:** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is one of the most severe complications of congenital heart defects with left to right shunt. Pulmonary vascular remodeling (PVR) is extremely essential in PAH. Therefore, prevention and reversion of PVR is one of the most important factors for improving quality of life for children suffering from PAH. In this article we reviewed the emerging research views on PVR from the disciplines of oncology and anti-tumor pharmacy. Two main sections were included. On the one hand, we introduced the "ATM signal turning point hypothesis" from the DNA damage response (DDR) mechanism research in oncology. The hypothesis suggests that the tumor-like proliferation of vascular smooth muscle cells might be the pathological basis of obstructive PAH. On the other hand, a new lung-targeted drug delivery system based on the fact that low concentration of anti-tumor drugs can inhibit angiogenesis without cellular toxicity was introduced. These new research directions could extend current practice in PVR therapy.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(10): 805-809]

**Key words:** Left-to-right congenital heart disease; Pulmonary remodeling; DNA damage response; Lung-targeted drug delivery system

自 2005 年起, 先天性心血管畸形已经位列我国围产期出生缺陷发生顺位的第一。按现有的人口出生率保守估算, 仅我国大陆地区每年新增加 150 000 余例患儿, 累积至今国内大陆地区尚未得到治疗的患儿约 2 000 000 例。与之对应, 每年国内大陆地区完成的先天性心血管畸形手术量为: 介入治疗不到 30 000 例, 外科手术治疗近 50 000 例。即现有的手术治疗量完全满足不了每年的新增患儿。在先天性心血管畸形患儿中, 左向右分流型约占 50%~70%。在等待手术的过程中, 肺血流量

增多、肺血管重构将导致这些患儿逐渐出现肺动脉高压, 最终丧失治疗机会。因此, 预防、逆转肺血管重构是提高患儿生存和生活质量、保障手术成功和预后的重要环节之一。

重构的本意是重新塑造或者改造, 与之相近的词汇包括重建、重塑等, 这是一个在各领域广泛应用的概念。在生命科学领域, 近三十年来, 重构的概念得到了最广泛的推广和应用。在心血管领域, 重构的概念先后衍生出心室重构、心房重构和血管重构等。血管重塑的概念首先由 Baumbach

[收稿日期] 2013-08-05

[作者简介] 刘瀚旻, 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 副院长。

和 Heistad 提出<sup>[1]</sup>,是指血管为适应内外环境的变化而发生的结构和功能的适应性改变。目前认为:在肺血管重构过程中,内皮屏障的破坏是血管重构的启动因素。受高速血流及血管扩张等病理因素的影响,血管内膜出现内皮细胞损伤和功能紊乱,触发了多种因子促增殖效应,形成了以血管平滑肌细胞的增殖和迁移为中心环节的病理生理学改变。血管平滑肌细胞是决定血管活性、血管构型及维持血管张力的重要因素。介导整个过程的分子生物调控网络一直是研究热点<sup>[2-5]</sup>。其中,三大重要气体信号分子的发现是血管重塑研究最重要的贡献:1986年, Ignarro 发现了内源性一氧化氮在心血管系统中具有独特信号分子作用并获得1998年诺贝尔医学奖。1997年,一氧化碳成为第二个被发现的内源性气体信号分子。2002年,硫化氢成为第三个也是我国科学家首先发现的气体信号分子。这三大气体信号分子体系对血管重塑的调控研究成为近十余年分子生物调控网络的重要组成部分。随着肺血管重构领域研究的拓展,给研究者提出的课题是:下一个亮点和热点在哪里?

一个很重要的临床切入点是:左向右分流型先天性心血管畸形的自然病程研究中存在这种病理生理现象:当患儿出现早期的肺血管重构,临床表现为轻度乃至中度肺动脉高压时,肺动脉平滑肌细胞(VSMC)的增殖对疾病症状具有一定代偿作用。一旦本身畸形得以修复,VSMC的增殖会逐步消失,VSMC可逆性地恢复正常。当发展为重度肺动脉高压时,即使将先心病治愈,VSMC仍会呈失控状继续不可逆性增殖,导致患儿出现顽固心衰而死亡<sup>[6]</sup>。是哪一条通路开关在其中起作用、什么时候起作用、起什么作用,目前尚不清楚。对这一现象的科学解释将对早期预测疾病的预后、降低严重并发症的发生起到重要作用。

学科交叉的视野给了我们新的启迪。当我们阅读肿瘤学的研究进展时,血管重构和肿瘤存在一个很类似的现象:细胞生长的失控。与之密切相关的DNA损伤应答调控机制研究进入我们的视线。

## 1 DNA损伤应答调控机制

### 1.1 研究现状

遗传信息的稳定传递是生命过程中经历的核心生物事件,所有细胞都有一套复杂精巧的蛋白质网络作用于DNA复制、重组、修复以及细胞周期检验等DNA代谢过程以保证遗传信息的稳定传

递。在基因组损伤的情况下,为维持细胞周期的准确进行,生物体进化出一系列损伤应答调控机制,以检测和及时修复DNA损伤,避免突变发生,维持基因组遗传信息的稳定性<sup>[7-8]</sup>。这一维护稳定性的分子调控网络机制统称为DNA损伤应答,主要包括以下四个部分:(1)激活细胞周期检验点(checkpoint)以阻滞细胞周期,使细胞有充分的时间进行损伤修复;(2)激活DNA损伤修复通路,解除异常的DNA结构,清除DNA损伤修复的空间构象障碍,避免损伤DNA及变异的遗传信息传递至子代细胞;(3)激活p53等凋亡通路,清除损伤严重、修复无望的细胞;(4)转录某些特定的基因,以利于细胞的生存。

大量基于肿瘤的研究证实,ATM蛋白激酶是这一信号网络的核心调控因子<sup>[9]</sup>。ATM是1995年在共济失调-毛细血管扩张症(AT)患者中发现的,分子量350 kD,蛋白由3056个氨基酸组成,羧基端与PI3K催化功能域高度同源<sup>[10]</sup>。当DNA发生双链断裂时,ATM信号通路即被激活,通过反式自体磷酸化,其无活性的同型二聚体快速解聚为有活性的单体,结合到DNA损伤部位,在那里磷酸化Chk2蛋白使之激活,激活的Chk2蛋白从损伤位点游离出来,进一步激活其下游分子如p53及其调控蛋白MDMX、Cdc25家族磷酸酶、BRCA1及转录因子如FOXO1及E2F1等引起瀑布效应,完成DNA修复<sup>[11-12]</sup>。

### 1.2 将DNA损伤应答机制引入血管重构领域的理论基础

DNA损伤应答调控机制是近年来肿瘤研究领域研究热点。ATM-Chk2信号通路的作用证据主要来自于对癌症中这些信号分子的突变分析,其中包含遗传自父母的突变和环境等诱发的突变研究和对体外细胞及动物模型的研究。基于以下研究,可以认为ATM/ATR信号通路在肺血管重构中具有重要的作用。

(1) ATM的发现基于共济失调-毛细血管扩张症。这一常染色体疾病本身就有血管病变,只是迄今尚没有阐明这种血管病变与ATM通路之间存在的联系。

(2) 肺血管重构的中心病理环节是VSMC的异常增殖。VSMC在中重度肺动脉高压(PAH)中的增殖具有明显的类癌特点<sup>[13-14]</sup>。对于严重PAH,研究显示,慢性宫内PAH的羊羔的肺部血小板源生长因子(PDGF)升高,提示PAH存在与肿瘤相似的自分泌促生长因子功能<sup>[15]</sup>;严重PAH的VSMC中可抑制细胞增殖的II型骨形态发生蛋

白受体 (BMPRII) 表达下降, 提示存在与肿瘤类似的对生长抑制信号不敏感<sup>[16]</sup>; VSMC 培养发现, PAH 原代培养的 VSMC 对 BMPR 诱导的细胞凋亡更具抵抗力, 具有抗凋亡作用的生存素 (survivin) 的表达明显增强, 提示存在于肿瘤相似的逃逸凋亡<sup>[17]</sup>; PAH 的 VSMC 线粒体代谢和氧化还原信号通路处于混乱状态, 导致膜去极化、胞质中钾离子和钙离子水平的升高和抗凋亡状态, 与肿瘤细胞类似<sup>[18]</sup>。以上研究结果都强烈提示 VSMC 过度增殖时分子水平信号通路的调控与肿瘤可能相似。

2008 年, Rai 等<sup>[13]</sup>报道了严重 PAH 病人的小血管病变从病因学上类似癌症发生过程的崭新发现, 两者的特征比较见表 1。

表 1 PAH 病人 VSMC 与癌症细胞特征比较

| 特征         | 癌症细胞 | PAH 病人 VSMC |
|------------|------|-------------|
| 自分泌促生长因子   | 有    | 有           |
| 对抑制生长信号不敏感 | 有    | 有           |
| 组织侵袭和转移    | 有    | 无           |
| 有限的复制潜能    | 有    | 有           |
| 持续性血管生成    | 有    | 无           |
| 逃逸凋亡       | 有    | 有           |
| 细胞代谢紊乱     | 有    | 有           |

(3) 2001 年, Yeager 等<sup>[19]</sup>发现 PAH 病人中的丛状损伤的肺动脉内皮细胞存在基因组微卫星片段不稳定现象, 该现象是结肠癌的重要标志之一, 提示基因组不稳定现象可能存在于 PAH 中。2010 年, 一项对于 PAH 病人肺动脉内皮细胞和 VSMC 的研究<sup>[20]</sup>证实了在这两种细胞中均出现了大片段 DNA 的变异, 这项研究确定了 PAH 中的血管内皮细胞和平滑肌细胞中存在基因组不稳定现象。

因此有理由认为, 肿瘤信号通路与 VSMC 过度增殖信号介导通路间存在相似性。为了解决临床上肺血管重构在不同的阶段由可逆状态转变为不可逆状态的发生机制问题, 我们提出一个全新的“ATM 表达的折点假说”: 在 PAH 初期, 由于外界刺激, 导致 VSMC 代偿性增殖, ATM 可能通过 ATM-Chk2-p53-p21 途径促使 VSMC 的细胞周期停滞并启动 DNA 修复, 此时, 正常的细胞周期调控保证遗传信息的稳定传递; 随着病情的发展, DNA 损伤应答体系受到影响, 引起 ATM-Chk2 信号通路的改变, 从而引起细胞周期监测点功能及激活 DNA 修复复合体信号通路失活, 导致了严重 PAH 时 VSMC 的过度增殖。这一假说能够较好地

解释临床上 PAH 的可逆性存在“拐点”的现象。这一假说是否成立? 如果成立, 是否不同时期 VSMC 增殖的信号介导机制存在差异? DNA 损伤应答调控机制在这一过程中可以起到多大作用? 细胞周期监测点的表达在这个过程中具有怎样的作用? 除了 ATM, DNA 损伤应答调控机制是否还可能通过其他通路起作用? 在整个过程中生物预警标志会是什么? 研究值得期待。

## 2 肿瘤药理学的拓展

沿循肿瘤学的研究思路, 抗肿瘤药物的应用对肺血管重构的治疗学研究也有借鉴作用。近年来抗肿瘤药物研究发现: 某些药物在较低的非细胞毒浓度下具有较强的抗血管生成特性, 这对于拓展抗肿瘤药物的应用具有极为重要的意义。紫杉醇 (Paclitaxel) 是美国的 Monroe Wall 博士在 1960 年从稀有的太平洋红豆杉树皮提取物中首先发现的, 具有独特的微管稳定作用而被广泛用于多种肿瘤的治疗。近年来, 国内外出现了针对紫杉醇作为非细胞毒药物的研究, 发现紫杉醇在低浓度 (非细胞毒浓度) 时具有与细胞毒浓度作用机制不同的抗血管生成作用<sup>[21]</sup>。一系列结果提示:

(1) 紫杉醇在低浓度时 (1~10 nmol/L) 呈现细胞周期抑制作用, 能够抑制细胞增殖但并不诱导细胞凋亡, 微管网络结构不受影响。可能的原因是: 紫杉醇可以触发细胞凋亡信号通路的变化, 包括线粒体复极电位增加、线粒体膜电位改变, P53 表达增加及 Bax/Bcl-2 比例增加等。但这一凋亡过程被线粒体通透性增加所致的离子逆流阻断, 因此并不会导致细胞凋亡<sup>[22-23]</sup>。

(2) 紫杉醇呈剂量依赖性抑制离体培养的人平滑肌细胞增生。在碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、血小板源衍生生长因子 (PDGF) 等有丝分裂原刺激条件下仍能抑制平滑肌细胞增生。其抗增生作用不受局部生长因子影响, 离体与在体实验中都有抑制增生作用<sup>[20,24-26]</sup>。

(3) 紫杉醇对新生血管有较强的抑制作用, 可抑制鸡胚尿囊膜血管形成模型 (CAM 模型) 的血管新生, 其抑制作用在 3.5~14 nmol/L 的浓度下明显并呈剂量依赖性<sup>[27-28]</sup>, 这一剂量最大仅等效于 70 kg 成人 16.8  $\mu$ g 紫杉醇的剂量, 远远低于常规化疗剂量。

(4) 紫杉醇进入细胞后很少外流, 作用持续时间长, 低浓度一次给药可产生持续的抗增生作用。研究发现紫杉醇洗脱球囊单次冠状动脉给药

后,在动脉组织内产生明显的药物积累效应,48 h后在动脉组织内仍然可以检测出25%的紫杉醇<sup>[29]</sup>。

这些研究目前仅局限在逆转肿瘤细胞和药物洗脱支架两个领域,研究结果发现紫杉醇在非细胞毒浓度时可使细胞增殖受抑,但不会导致细胞凋亡。

在降低抗肿瘤药物的毒副作用方面,靶向给药是极具前景的给药方式。它诞生于20世纪70年代,是指药物通过局部或全身血液循环而浓集定位于靶组织、靶器官、靶细胞的给药系统。靶向给药系统也是一种药物载体系统,具有将药物选择性地传输并释放于靶组织、靶器官或者靶细胞,使靶区药物浓度增大,降低其他非靶部位浓度以减少毒副作用的特性。因此,靶向给药系统研制已成为药剂学领域研究的热点问题。

本研究室自2011年起开始肺靶向给药系统的构建<sup>[30]</sup>。在构建单侧肺切除加野百合碱诱导的PAH大鼠模型基础上,给予在薄膜分散-探头超声条件下制备的八聚精氨酸R8修饰的紫杉醇脂质体。通过荧光活体成像观察紫杉醇脂质体分布。结果显示:紫杉醇脂质体在5 min内即可达到肺高度蓄积,且在24 h内维持较强的肺部蓄积量,达到了肺部靶向的作用。体视学指标结果显示:①模型组mPAP与对照相比差异有统计学意义。紫杉醇脂质体较游离紫杉醇可以明显降低mPAP,该组的mPAP与对照组已无显著差异。②模型组右心指数测定亦有类似结果。③模型组血管壁厚度较对照组显著增厚,游离紫杉醇与模型组无显著差异,仅紫杉醇脂质体组血管壁厚度明显变薄,与对照组无显著差异。提示紫杉醇脂质体靶向给药较传统给药方式更显著抑制肺血管重构。

综上所述,经历了三十多年的探索,肺血管重构的研究需要逐步摆脱停留在分子信号途径拓扑网中单线索研究的瓶颈局面。在学科交叉融合的医学大背景下,多学科借鉴将为发掘本领域的研究新热点提供新的视角。

#### [参 考 文 献]

- [1] Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension[J]. Hypertension, 1989, 13(6 Pt 2): 968-972.
- [2] Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 54(1 Suppl 1): S20-S31.
- [3] Yi ES, Kim H, Ahn H, Strother J, Morris T, Masliah E, et al. Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension. A morphometric and immunohistochemical study[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(4 Pt 1): 1577-1586.
- [4] Rosenblum WD. Pulmonary arterial hypertension: pathobiology, diagnosis, treatment, and emerging therapies[J]. Cardiol Rev, 2010, 18(2): 58-63.
- [5] Jonigk D, Golpon H, Bockmeyer CL, Maegel L, Hoepfer MM, Gottlieb J, et al. Plexiform lesions in pulmonary arterial hypertension composition, architecture, and microenvironment[J]. Am J Pathol, 2011, 179(1): 167-179.
- [6] Huang JB, Liang J, Zhou LY. Eisenmenger syndrome: not always inoperable[J]. Respir Care, 2012, 57(9): 1488-1495.
- [7] Aguilera A, Gomez-Gonzalez B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences[J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(3): 204-217.
- [8] Lukas J, Lukas C, Bartek J. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(10): 1161-1169.
- [9] Bhatti S, Kozlov S, Farooqi AA, Naqi A, Lavin M, Khanna KK. ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(18): 2977-3006.
- [10] Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(10): 759-769.
- [11] Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer[J]. Adv Cancer Res, 2010, 108: 73-112.
- [12] Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage[J]. Science, 2007, 316(5858): 1160-1166.
- [13] Rai PR, Cool CD, King JA, Stevens T, Burns N, Winn RA, et al. The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 178(6): 558-564.
- [14] Sakao S, Tatsumi K. Vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension: multiple cancer-like pathways and possible treatment modalities[J]. Int J Cardiol, 2011, 147(1): 4-12.
- [15] Balasubramaniam V, Le Cras TD, Ivy DD, Grover TR, Kinsella JP, Abman SH. Role of platelet-derived growth factor in vascular remodeling during pulmonary hypertension in the ovine fetus[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(5): L826-833.
- [16] Morrell NW. Pulmonary hypertension due to BMPR2 mutation: a new paradigm for tissue remodeling? [J]. Proc Am Thorac Soc, 2006, 3(8): 680-686.
- [17] McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G, et al. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension[J]. J Clin Invest, 2005, 115(6): 1479-1491.
- [18] Archer SL, Gombert-Maitland M, Maitland ML, Rich S, Garcia JG, Weir EK. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 $\alpha$ -Kv1.5 O<sub>2</sub>-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294(2): H570-578.
- [19] Yeager ME, Halley GR, Golpon HA, Voelkel NF, Tudor RM. Microsatellite instability of endothelial cell growth and apoptosis genes within plexiform lesions in primary pulmonary hypertension[J]. Circ Res, 2001, 88(1): E2-E11.
- [20] Aldred MA, Comhair SA, Varella-Garcia M, Asosingh K, Xu W,

- Noon GP, et al. Somatic chromosome abnormalities in the lungs of patients with pulmonary arterial hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182(9): 1153-1160.
- [21] Axel DI, Kunert W, Goggelmann C, Oberhoff M, Herdeg C, K ü ttner A, et al. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery[J]. *Circulation*, 1997, 96(2): 636-645.
- [22] Wang J, Lou P, Lesniewski R, Henkin J. Paclitaxel at ultra low concentrations inhibits angiogenesis without affecting cellular microtubule assembly[J]. *Anticancer Drugs*, 2003,14(1): 13-19.
- [23] Pasquier E, Carre M, Pourroy B, Camoin L, Rebai O, Briand C, et al. Antiangiogenic activity of paclitaxel is associated with its cytostatic effect, mediated by the initiation but not completion of a mitochondrial apoptotic signaling pathway[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(10): 1301-1310.
- [24] Choi BM, Kim YM, Jeong YR, Pae HO, Song CE, Park JE, et al. Induction of heme oxygenase-1 is involved in anti-proliferative effects of paclitaxel on rat vascular smooth muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 13, 321(1): 132-137.
- [25] Hemmer JD, Nagatomi J, Wood ST, Vertegel AA, Dean D, Laberge M. Role of cytoskeletal components in stress-relaxation behavior of adherent vascular smooth muscle cells[J]. *J Biomech Eng*, 2009, 131(4): 041001.
- [26] Wiskirchen J, Schober W, Schart N, Kehlbach R, Wersebe A, Tepe G, et al. The effects of paclitaxel on the three phases of restenosis: smooth muscle cell proliferation, migration, and matrix formation: an in vitro study[J]. *Invest Radiol*, 2004, 39(9): 565-571.
- [27] Tian W, Kuhlmann MT, Pelisek J. Paclitaxel delivered to adventitia attenuates neointima formation without compromising re-endothelialization after angioplasty in a porcine restenosis model[J]. *J Endovasc Ther*, 2006,13(5): 616-629.
- [28] Schwartz EL. Antivascular actions of microtubule-binding drugs[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(8): 2594-2601.
- [29] Posa A, Hemetsberger R, Petnehazy O, Petrasi Z, Testor M, Glogar D, et al. Attainment of local drug delivery with paclitaxel-eluting balloon in porcine coronary arteries[J]. *Coron Artery Dis*, 2008, 19(4): 243-247.
- [30] Yin Y, Wu X, Yang Z, Zhao J, Wang X, Zhang Q, et al. The potential efficacy of R8-modified paclitaxel-loaded liposomes on pulmonary arterial hypertension[J]. *Pharm Res*, 2013, 30(8): 2050-2062.

( 本文编辑: 邓芳明 )