

Gax 基因对血管平滑肌细胞生物学行为的调控作用

王家宁 综述, 胡大一¹ 审校

(郧阳医学院十堰市人民医院临床医学研究所, 湖北省十堰市 442000;

1. 北京大学人民医院心内科, 北京市 100044)

[主题词] 同源异形盒; 肌, 平滑, 血管; 细胞增殖; 迁移; 凋亡

[摘要] 血管平滑肌细胞增殖、迁移和凋亡异常是血管再狭窄发生的重要机制。血管平滑肌细胞多年来一直是再狭窄防治针对的靶点。Gax 基因是一种同源异形盒基因, 其编码产物是一种核转录因子, 可以激活或抑制其下游基因的表达。Gax 基因对血管平滑肌细胞增殖、迁移和凋亡有调控作用, 提示 Gax 基因是一理想的再狭窄基因治疗的候选基因。

[中图分类号] R394

[文献标识码] A

冠状动脉成形术后再狭窄的发生是目前心血管领域研究的热点。再狭窄的发生有多个因素、多个环节的参与, 其中血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 在再狭窄的病变中起重要作用。在再狭窄的发生中, 血管平滑肌细胞表型发生改变, 细胞增殖、迁移并产生大量细胞外基质, 导致新生内膜的形成。血管平滑肌细胞的生物学行为异常是由一系列基因表达调控异常引起的。关于生长因子、生长因子受体及其信号传导通路在血管平滑肌细胞生物学行为异常中的作用研究得较为深入^[1-3]。但关于核转录因子如何将这些信号进行整合并启动级联调节反应研究得较少。Gax 基因 (growth arrest-specific homeobox gene) 是近年来发现的调节血管平滑肌细胞生物学行为的核转录因子基因之一。本文就 Gax 对血管平滑肌细胞增殖、迁移和凋亡的调控进行综述。

1 关于 Gax 基因

Gax 基因属于同源异形盒基因 (homeobox) 家族中的一员。同源异形盒基因是一类与胚胎发育及细胞分化调节相关的基因。自从 1984 年发现同源异形盒基因以来^[4,5], 关于同源异形盒基因在动物胚胎发育中表达的研究已有很大进展。同源异形盒基因是在研究果蝇同形异位突变中发现的。如果蝇触须足基因 (antennapedia) 突变, 将导致果蝇的触须被正常发育的腿所取代。在目前已知的 300 多个同源异形盒基因中, 都存在一个高度保守的同源区域, 约 180 bp, 编码 60 个氨基酸, 这个区域即称为同源异形盒。同源异形盒基因产物基本上都是转录因子, 定位于细胞核, 通过螺旋-转折-螺旋 (helix-turn-helix) 的结构模式与启动子或增强子序

列相结合, 从而实现基因调控作用。大多数同源异形盒基因串联排列成簇, 但也有许多同源异形盒基因位于串联簇之外, Gax 基因即属于后一种。同源异形盒基因在调节个体发育、器官形成、细胞生长、分化和迁移中起重要作用。某些同源异形盒基因促进细胞的失控性增殖和去分化, 而另一些同源异形盒基因则抑制细胞生长和促进分化。同源异形盒基因可作为细胞生长的正性和负性调节基因。同源异形盒基因也是血管平滑肌细胞生长和分化的重要调节基因。Gax 同源异形盒基因首先是从大鼠主动脉 cDNA 文库中分离出来的^[6]。大鼠 Gax 基因位于 12 号染色体, 其 cDNA 全长为 2 244 bp, 编码 303 个氨基酸。随后, 采用锚定聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的方法克隆出人 Gax cDNA, 采用荧光原位杂交 (FISH) 方法标测人 Gax 基因位于人 7 号染色体的短臂 p21^[7], 其 cDNA 全长为 941 bp, 编码 302 个氨基酸。人与大鼠 Gax 基因在核苷酸序列上有 83% 同源性, 在氨基酸序列上有 98% 同源性。

2 Gax 基因与血管平滑肌细胞增殖

Gax 基因在体内、体外静止的血管平滑肌细胞中表达。Gorski 等^[6]用血小板源生长因子和血清生长因子刺激静止的大鼠血管平滑肌细胞诱导其增殖, 2 h 内 Gax mRNA 水平下调了 15 倍, 这种表达下调是一过性的。静止的血管平滑肌细胞在丝裂素刺激后 8~24 h Gax mRNA 开始回升, 在 24~48 h 恢复至接近正常水平。丝裂素引起的 Gax 表达下调具有剂量依赖性, 且与丝裂素刺激 DNA 合成的能力有相关性。例如血小板源生长因子-AA, 是一种弱的大鼠血管平滑肌细胞的丝裂素, 不影响 Gax 的转录水平; 而血小板源生长因子-AB、-BB 则是血管平滑肌细胞强的丝裂素, 可有效地抑制 Gax 的表达。处于增殖状态的血管平滑肌细胞在去除血清后, Gax mRNA 表达在 24 h 内增加 5 倍。这些资料提示 Gax 可能在 G0 至 G1 过渡中起调节功能。

Yamashita 等^[8]观察了血管紧张素 (angiotensin, Ang) 和 C 型钠尿肽 (C-type natriuretic peptide, CNP) 对 Gax 基因

[收稿日期] 2001-10-08 [修回日期] 2002-02-10

[作者简介] 王家宁, 男, 1967 年出生, 医学博士, 副教授, 副主任医师, 多年来一直从事血管再狭窄防治的研究。胡大一, 男, 1947 年出生, 北京大学人民医院心内科主任, 博士研究生导师, 中华医学会心血管分会副主任委员, 长期从事心血管疾病的临床、教学和科研工作。

表达的影响。血管紧张素 ① 促进血管平滑肌细胞增殖, C型钠尿肽抑制血管平滑肌细胞增殖。静止期的大鼠主动脉平滑肌细胞在加入血管紧张素 ① (10^{-6} mol/L)后6 h Gax mRNA表达水平可忽略不计, 血管紧张素 ① 对Gax mRNA表达的抑制作用几乎完全被AT1R拮抗剂阻滞。C型钠尿肽(10^{-6} mol/L)在加入血管平滑肌细胞后12 h, Gax mRNA表达水平增加了1.8倍。血管紧张素 ① 和C型钠尿肽同时加入培养的血管平滑肌细胞中, C型钠尿肽显著减弱了血管紧张素 ① 对Gax mRNA表达的抑制作用。此研究提示Gax是血管紧张素 ① 和C型钠尿肽信号通路中关于血管平滑肌细胞增殖的共同转录因子, 可调节细胞周期和血管平滑肌细胞表型。

Weir等^[9]采用大鼠颈动脉球囊损伤模型, 观察了血管内皮剥脱后血管平滑肌细胞Gax mRNA的表达变化。采用RT-PCR方法检测Gax mRNA的动态变化, 结果显示Gax mRNA表达在血管损伤后2 h显著降低(与对照未损伤血管比较 $P < 0.001$), 4 h时Gax mRNA表达水平为未损伤动脉的 0.23 ± 0.027 , 24 h Gax mRNA水平开始回升, 7天时与对照组无差别。此研究说明大鼠颈总动脉损伤后Gax表达下调, 且是一过性, 其动态变化与体外血管平滑肌细胞受丝裂素刺激后Gax mRNA表达时程相类似。本研究还显示Gax的下调与许多早期反应基因(early response gene)如 $c\text{-myc}$ 、 $c\text{-fos}$ 的表达上调呈镜像关系。Gax的这种表达特性提示Gax在维持血管平滑肌细胞的非增殖或收缩表型相关的基因表达中起调节作用。

在血管平滑肌细胞, 因为Gax的独特表达特性, 人们需进一步确定Gax是否为体内、体外血管平滑肌细胞增殖的负性调节剂。首先, Smith等^[10]将重组产生的GST-Gax融合蛋白采用显微注射的方法注射到血管平滑肌细胞中, 发现Gax重组蛋白能显著抑制血管平滑肌细胞进入S期。当将Gax蛋白显微注射到静止的(G0)或G1早期的血管平滑肌细胞, 其抑制了血管平滑肌细胞增殖, 对血管平滑肌细胞增殖的抑制具有剂量依赖性, 且其抑制程度与重组的MyoD蛋白或抗ras抗体引起的血管平滑肌细胞增殖抑制作用相类似。这些工作提示Gax是血管平滑肌细胞生长的负性调节剂。为进一步证实Gax对血管平滑肌细胞增殖的负性调控作用, 构建了可表达Gax的重组腺病毒载体(Ad-Gax)。Ad-Gax转染静止的大鼠血管平滑肌细胞用15% FBS刺激, 24 h后采用流式细胞术测定Ad-Gax对血管平滑肌细胞生长的抑制作用, 结果发现Ad-Gax转染的血管平滑肌细胞G0~G1细胞为 $79\% \pm 3\%$, 而Ad β gal转染的血管平滑肌细胞和未处理血管平滑肌细胞G0~G1细胞分别占 $35\% \pm 5\%$ 和 $39\% \pm 9\%$ 。在Ad-Gax组, G2/M和S期细胞所占比例下降。这些结果进一步验证了Gax重组蛋白显微注射的结果, Gax使细胞停滞于G1期。Gax通过p53非依赖性方式激活细胞周期抑制性蛋白p21, 因为Gax过度表达对p21基因敲除的小鼠细胞无生长抑制作用。Gax所致cdk2抑制剂p21表达上调可解释其抗血管平滑肌细胞增殖作用。

腺病毒载体的高转染效率使得观察Gax基因对在体血管平滑肌细胞的调控作用成为可能。Perlman等^[11]观察了大

鼠颈总动脉损伤模型后局部导入Ad-Gax对术后3天血管中膜血管平滑肌细胞PCNA表达的变化。结果显示Ad-Gax组中膜PCNA阳性细胞数分别比生理盐水组、Ad β gal组降低了67%和65%。Gax过度表达通过对细胞周期抑制在损伤后早期减少了血管平滑肌细胞数。Smith等^[10]将Ad-Gax局部导入球囊损伤的大鼠颈动脉, 14天后处死动物, 观察内膜增生情况。Ad β gal组新生内膜面积与生理盐水组相比无显著差别(Ad β gal = $0.186 \pm 0.02 \text{ mm}^2$), 管腔狭窄程度达 $40\% \pm 4\%$, I/M(Intima/Media)面积之比为 1.51 ± 0.1 ; Ad-Gax组新生内膜面积为 $0.076 \pm 0.02 \text{ mm}^2$, 管腔狭窄程度为 $17\% \pm 5\%$, I/M面积之比为 0.47 ± 0.1 。Ad-Gax组I/M面积之比Ad β gal组减少了69%($P < 0.0001$), 内膜面积减少了59%($P < 0.001$), 管腔狭窄程度减轻了56%($P < 0.003$)。说明局部转染的Gax腺病毒抑制了内膜形成和腔狭窄。Maillard等^[12]采用隧道球囊导管(channel balloon catheter)对兔髂动脉进行经皮球囊成形术后局部导入Ad-Gax或Ad β gal, 以观察Gax过度表达对新内膜形成、管腔直径、再内皮化和内皮依赖性舒张功能的影响。在血管损伤后1个月进行血管造影, Ad β gal组管腔直径为 $1.39 \pm 0.16 \text{ mm}$, 而Ad-Gax组为 $1.84 \pm 0.14 \text{ mm}$, Ad-Gax组管腔狭窄减轻了36%($P = 0.006$), 而Ad β gal组与生理盐水组管腔直径无显著差别。定量形态分析显示I/M面积之比Ad-Gax组比Ad β gal组减少了56%(Ad-Gax = 0.35 ± 0.15 ; Ad β gal = 0.80 ± 0.18 ; $P < 0.02$), 而Ad β gal组与生理盐水组I/M面积之比无显著差别(Ad β gal = 0.81 ± 0.19 ; saline = 0.84 ± 0.21 , $P = \text{NS}$)。这些研究说明腺病毒介导的Gax过度表达可减弱血管平滑肌细胞对球囊损伤的反应, Gax可作为血管平滑肌细胞增殖的抑制剂调节损伤诱导的血管形态变化。

3 Gax基因与血管平滑肌细胞迁移

Gax控制血管平滑肌细胞对趋化性生长因子诱导的迁移, 是通过整合素(integrin)的表达来实现的。Witzenbichler等^[13]采用改良的Boyden小室方法, 观察了过度表达的Gax对血小板源生长因子-BB诱导的血管平滑肌细胞迁移的影响。血小板源生长因子-BB趋化作用于血管平滑肌细胞5 h后, 刮去聚碳酸酯膜表面未迁移的细胞, 甲醇固定, Giemsa染色。在光学显微镜下随机取3个视野(100倍)计数细胞数。结果显示Ad-Gax组 24 ± 2 细胞/100HPF, Ad β gal 152 ± 13 细胞/100HPF, 未处理组 170 ± 2 细胞/100HPF, Ad-Gax与Ad β gal组比显著抑制了血管平滑肌细胞迁移($P < 0.001$)。Ad-Gax对血小板源生长因子-BB诱导血管平滑肌细胞的迁移具有剂量依赖性。Ad-Gax对bFGF、HGF/Scatter Factor诱导的血管平滑肌细胞迁移的影响与对血小板源生长因子诱导的血管平滑肌细胞迁移的影响相似。细胞周期停滞(cell cycle arrest)对Gax的抗迁移作用是必需的。因为Gax过度表达对cdk抑制剂p21基因缺失的细胞(P21 $^{-/-}$ 细胞)的迁移无影响。尽管细胞周期抑制本身不足以引起迁移的抑制, 但在P21 $^{-/-}$ 细胞中, 若表达外源性p21或p16诱导细胞周期停滞时, Gax的抗迁移作用可恢复。Gax对细胞迁移的抑制作用与其调

节整合素的表达有关。Gax 过度表达对细胞迁移的作用与其抑制体内、体外整合素 $\alpha\beta 3$ 、 $\alpha\beta 5$ 的表达相平行。除非通过表达外源性 p21 和 p16 来诱导细胞周期停滞, 在 P21^{-/-} 细胞 Gax 过度表达并不诱导整合素的表达下调。这些资料提示 Gax 以细胞周期依赖方式通过调节整合素的表达来协调血管平滑肌细胞生长与迁移。

4 Gax 基因与血管平滑肌细胞凋亡

Perlman 等^[11] 采用 2F 球囊导管损伤大鼠颈总动脉并局部导入 Ad-Gax 后第 3 天、7 天和 14 天分别计数中膜血管平滑肌细胞数和 TUNEL 阳性细胞数, 以观察 Gax 过度表达对血管平滑肌细胞凋亡的影响。结果显示动脉损伤后第 3 天、第 7 天、第 14 天 Ad-Gax 组中膜血管平滑肌细胞数较对照组明显减少(第 3 天减少 54%, $P < 0.01$; 第 7 天减少 41%, $P < 0.003$; 第 14 天减少 49%, $P < 0.02$)。Ad-Gax 组中膜 TUNEL 阳性的血管平滑肌细胞明显增加(第 7 天增加了 9.2 倍, $P < 0.03$; 第 14 天增加了 17.2 倍, $P < 0.03$); 而第 3 天 Ad-Gax 组与 Ad- β gal 组 TUNEL 阳性细胞数无显著差异。该结果说明 Gax 表达首先诱导细胞周期停滞, 然后诱导血管平滑肌细胞凋亡。

高速增殖的组织通常伴随高频率的凋亡, 但其机制不明。Gax 蛋白在静止的血管平滑肌细胞受到丝裂素刺激增殖时表达下调, 而 Gax 过度表达则以 p21WAF/CIP 依赖性方式抑制细胞增殖。为了解丝裂素诱导的增殖是如何影响凋亡过程的, Perlman 等^[14] 观察了 Gax 过度表达对血管平滑肌细胞存活性的影响。Gax 过度表达可诱导丝裂素刺激的血管平滑肌细胞凋亡, 而不诱导静止的血管平滑肌细胞凋亡。尽管丝裂素刺激血管平滑肌细胞对 Gax 诱导的凋亡是必需的, 但 cdk 抑制剂 p21WAF/CIP 和 p53 肿瘤抑制基因并不参与 Gax 诱导的血管平滑肌细胞凋亡。采用化学抑制剂使细胞周期停滞于 G1 期或 S 期, 也不影响 Gax 诱导的血管平滑肌细胞凋亡, 进一步说明 Gax 诱导的细胞凋亡不依赖于细胞周期活性。Gax 过度表达导致丝裂素刺激的血管平滑肌细胞但非静止的血管平滑肌细胞 Bcl-2 表达下调, Bax 表达上调, Gax 过度表达并不诱导 Bax 基因敲除的小鼠胚胎成纤维细胞发生凋亡, 说明 Bax 基因介导了 Gax 基因诱导的凋亡。这些资料提示细胞生长与死亡的稳态平衡是绕过细胞周期改变 Bcl-2 家族蛋白表达的丝裂素依赖性途径控制的。因为 Gax 过度表达可下调整合素 $\alpha\beta 3$ 、 $\alpha\beta 5$ 的表达^[13], 而整合素信号是细胞存活性的重要调节因子^[15], 推测 Gax 过度表达诱导血管平滑肌细胞凋亡是通过调节增殖的血管平滑肌细胞中整合素信号通路来介导的。

5 Gax 在防治血管再狭窄中的价值

再狭窄是对损伤反应的过程。在这过程中, 血管平滑肌细胞扮演了重要角色。血管平滑肌细胞增殖、迁移并产生大量细胞外基质导致新生内膜形成。近年来研究发现血管平滑肌细胞凋亡异常也参与了再狭窄过程。因为同源异形盒结构域蛋白既可以激活下游基因又能抑制下游基因而表现出多种生物学功能, 推测 Gax 过度表达在血管损伤后对中膜血管平滑肌细胞有多种生物学作用。Gax 既能抑制增殖又能抑制迁移和诱导凋亡, 而且 Gax 只能诱导增殖的血管平滑肌细胞凋亡, 不诱导静止的血管平滑肌细胞凋亡。因为 Gax 对静止的血管平滑肌细胞无毒性作用, Gax 基因对于治疗血管平滑肌细胞增殖性疾病如再狭窄有许多优点。Gax 基因为防治再狭窄理想的候选基因。

[参考文献]

- [1] 熊一力, 王宏伟, 赵华月. API0134 对血管平滑肌细胞增殖和血小板源生长因子 B 链碱性纤维母细胞生长因子及相关癌基因表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5 (2): 95-98
- [2] 李朝红, 邓漪平, 尹小川, 等. 反义 ras 寡聚脱氧核苷酸对血管平滑肌细胞生物学行为的影响. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5 (3): 217-221
- [3] 刘启功, 陆再英, 周洪莲, 等. 血管内皮生长因子预防血管成形后再狭窄的机理. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (3): 209-212
- [4] McGinnis W, Gaber RL, Wirz J, et al. A homologous protein coding sequence in drosophila homeotic genes and its conservation in other metazoans. Cell, 1984, 37: 403-408
- [5] Scott MP, Weinert AJ. Structural relationship among genes that control development: sequence homology between the antennapedia, ultrabithorax, and Fushi Tarazu loci of drosophila. Proc Natl Acad Sci, 1984, 81: 4 115-119
- [6] Gorski DH, LePage DF, Patel CV, et al. Molecular cloning of a diverged homeobox gene that is rapidly downregulated during the G0/G1 transition in vascular smooth muscle cells. Mol Cell Biol, 1993, 13: 3 722-733
- [7] LePage DF, Altomare DA, Testa JR, et al. Molecular cloning and localization of the human GAX gene to 7p21. Genomics, 1994, 24: 535-540
- [8] Yamashita J, Itoh H, Ogawa Y, et al. Opposite regulation of Gax homeobox expression by angiotensin 2 and ϵ -type natriuretic peptide. Hypertension, 1997, 29: 381-387
- [9] Weir L, Chen D, Pastore C, et al. Expression of gax, a growth arrest homeobox gene, is rapidly downregulated in the rat carotid artery during the proliferative response to balloon injury. J Biol Chem, 1995, 270: 5 457-461
- [10] Smith RC, Branellec D, Gorski DH, et al. p21CIP1-mediated inhibition of cell proliferation by overexpression of the gax homeodomain gene. Genes Dev, 1997, 11: 1 674-689
- [11] Perlman H, Luo Z, Krasinski K, et al. Adenoviral mediated delivery of the Gax transcription factor to rat carotid arteries inhibits smooth muscle proliferation and induces apoptosis. Gene Ther, 1999, 6: 758-763
- [12] Maillard L, Van Belle E, Smith RC, et al. Percutaneous delivery of the gax gene inhibits vessel stenosis in a rabbit model of balloon angioplasty. Cardiovasc Res, 1997, 35: 536-546
- [13] Witzensbichler B, Kureishi Y, Luo Z, et al. Regulation of smooth muscle cell migration and integrin expression by the Gax transcription factor. J Clin Invest, 1999, 104: 1 469-480
- [14] Perlman H, Sata M, Le Roux A, et al. Bax-mediated cell death by the Gax homeoprotein requires mitogen activation but is independent of cell cycle activity. EMBO J, 1998, 17: 3 576-586
- [15] Shattil SJ, Ginsberg MH. Perspective series: cell adhesion in vascular biology: integrin signaling in vascular biology. J Clin Invest, 1997, 100: 1-5

(此文编辑 朱雯霞)