

·综述 General review·

支架内再狭窄非编码核糖核酸靶向治疗研究进展

丁婷婷, 畅智慧, 刘兆玉

【摘要】 血管内支架植入术作为一种微创、安全有效的方法,近年来广泛应用于下肢动脉硬化闭塞症(ASO)治疗,但支架内再狭窄(ISR)(血管直径缩小至参考血管直径 50%以上)发生率仍然很高。因此,如何治疗 ISR 成为临床主要问题。非编码核糖核酸(ncRNA)是一类不编码蛋白质核糖核酸(RNA)分子,如微 RNA(microRNA,miRNA)、环状 RNA(circRNA)、长链非编码 RNA(lncRNA)的统称,可调节 ncRNA 中血管平滑肌细胞表型转化,如增殖、迁移、凋亡、新生内膜增殖等。该文举例说明了 ncRNA 作为 ISR 治疗可能的生物标志物或潜在治疗靶标,并阐述了相关新思想和新发现。

【关键词】 非编码核糖核酸;下肢动脉硬化闭塞症;支架内再狭窄;血管平滑肌细胞

中图分类号:R543.5 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2022)-02-0210-04

Advances in non-coding ribonucleic acid-targeted therapy for in-stent restenosis DING Tingting, CHANG Zhihui, LIU Zhaoyu. Department of Radiology, Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning Province 110004, China

Corresponding author: LIU Zhaoyu, E-mail: liuzy@sj-hospital.org

【Abstract】 Being a minimally invasive, safe and effective therapy, endovascular stenting has been widely used in the treatment of lower limb arteriosclerosis obliterans (ASO) in recent years, but the incidence of in-stent restenosis (ISR, i.e. the reduction of the vascular diameter > 50% of the reference vessel diameter) is rather high. Therefore, how to treat ISR has become a major clinical issue. Non-coding ribonucleic acid (ncRNA) is a generic term for a group of RNA molecules that do not encode proteins, such as microRNA (miRNA), circle RNA (circRNA), long-chain non-coding RNA (lncRNA), which can regulate the phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells in ncRNA, e.g. proliferation, migration, apoptosis, neointimal proliferation, etc. This paper aims to illustrate the value of ncRNA (as a possible biomarker or potential therapeutic target) and to expound the relevant new ideas and discoveries in the treatment of ISR. (J Intervent Radiol, 2021, 31: 210-213)

【Key words】 non-coding ribonucleic acid; lower limb arteriosclerosis obliterans; in-stent restenosis; vascular smooth muscle cell

下肢动脉硬化闭塞症(arteriosclerosis obliterans, ASO)是由动脉粥样硬化引起的动脉闭塞性疾病^[1]。血管内支架植入术可明显改善下肢 ASO 患者缺血引发的间歇性跛行和静息痛等症状。然而支架作为外源性物质,植入体内会造成血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)异常增殖和迁移、内皮细胞(endothelial cell, EC)损伤、炎症反应和新内膜形成等一系列并发症,导致支架内再狭窄(in-stent restenosis, ISR)形成^[2]。研究显示,非编码

核糖核酸(non-coding ribonucleic acid, ncRNA)在调节 VSMC 和 EC 生物学功能及炎症反应等方面具有巨大潜力。通过调节靶区域 ncRNA 分布进而调节 VSMC 和 EC 功能,可减少支架植入引起的损伤,降低 ISR 发生率^[3]。

ncRNA 共同特征是,可从基因组中转录,但不能翻译成蛋白质,并可在核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)水平发挥生物学功能^[4]。根据 ncRNA 大小,通常可分小分子 ncRNA 和大分子 ncRNA 两类。小分子

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2022.02.021

基金项目:国家自然科学基金(81470086)

作者单位:110004 沈阳 中国医科大学附属盛京医院放射科

通信作者:刘兆玉 E-mail: liuzy@sj-hospital.org

ncRNA 包括微 RNA(miRNA)、Piwi 蛋白相互作用 RNA (Piwi-interacting RNA, piRNA)、环状 RNA (circular RNA, circRNA)、小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 和小核 RNA (small nuclear RNA, snRNA) 等, 大分子 ncRNA 包括核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA)、天然反义转录物 (natural antisense transcript, NAT) 和长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)^[5]。近年研究证明, ncRNA 在 ISR 过程中对白细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等炎性细胞有调节作用, 可调控 VSMC 和 EC 等细胞增殖、迁移、凋亡及免疫反应等过程, 对治疗 ISR 也具有潜在的临床干预靶点^[6]。但目前 ncRNA 作为生物标志物用于 ISR 治疗仍有很多研究要做。

1 ISR 病理生理

支架植入通过物理学方法对动脉内膜造成功能性和器质性损伤, 动脉内膜损伤后通过血管内膜增生、血管重塑、凝血激活和血栓形成等病理生理过程引起 ISR^[7]。VSMC 增殖、从中膜迁移到内膜、细胞外基质形成和外膜瘢痕形成等是 ISR 形成关键环节。支架植入术后数小时内细胞因子、中性粒细胞可聚集产生炎症反应, 1 周后巨噬细胞活化, 7~14 d 时在各种因子刺激下, 热休克蛋白、抗凋亡 Bcl-2 蛋白、胶原特异性分子伴侣蛋白、肌球蛋白重链蛋白等表达增加^[8-9]。Giacoppo 等^[10]临床研究显示, 药物洗脱支架 (drug eluting stent, DES) 通过释放抗增殖药物明显降低 ISR 发生率。支架内新生动脉粥样硬化 (in-stent neoatherosclerosis, ISNA) 是导致 ISR 的另一个因素。ISNA 是指在伴或不伴坏死核形成情况下, 支架附近新生内膜富含脂质的泡沫细胞聚集。Zou 等^[11]研究显示, 颈内动脉 ISR 患者病变血管支架剥除后支架内充满新生动脉粥样硬化和内膜组织。此外, 研究发现金属裸支架植入术后 ISNA 主要发生在支架近端组织, 在支架中段及远端发生率较低^[12]。ISR 发生机制还可能与支架植入术后持续慢性炎症及延迟愈合有关。支架植入术后内皮覆盖不全、EC 缺陷导致血液中白细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、血小板等黏附及渗透作用增强, 炎性细胞因子和血管活性物质作用加剧了脂质浸润。其中炎性介质和细胞因子, 如白细胞介素-8、基质细胞衍生因子、血管内皮细胞生长因子、肿瘤坏死因子、基质金属蛋白酶-2、基质金属蛋白酶-9 等, 可作为 ISR 独立预测指标^[13]。

2 ncRNA 与 ISR

2.1 miRNA 与 ISR

miRNA 长度为 20~25 个核苷酸, 可通过碱基互补配对方式识别信使 RNA (mRNA), 不同程度地促使其衰变或抑制其翻译。支架植入术后, 不同细胞类型 miRNA 有不同程度上调或下调, 其在血流中浓度甚至也可反应其水平变化, 因此了解 miRNA 对了解 ISR 机制及维持血管完整性至关重要。为发现更有效的治疗 ISR 策略, miRNA 提供了一个先进知识框架^[14]。

miR-21 在 VSMC 和内皮细胞中高表达, 可通过调节不同信号转导通路发挥作用^[15]。Huang 等^[16]研究表明, 熊去氧胆酸 (UDCA) 通过阻断 miR-21/PTEN/AKT/mTOR 信号通路抑制 VSMC 增殖。miR-21 还可靶向多个分子, 包括骨形态发生蛋白受体 (BMPR)-2、含 WW 域 E3 泛素蛋白连接酶 (WWP) 1、特异 AT 序列结合蛋白 (SATB) 1, 最终导致慢性缺氧, 引起血管重塑^[17]。miR-126 参与 ISR 过程中炎症反应, 靶向血管细胞黏附分子 (VCAM)-1, 降低白细胞和 EC 黏附性^[18]。miR-221/222 通过靶向 E2F-1 间接调节 EC 中炎症因子表达。miR-221/222 在 EC 中具有相反作用, 可能归因于中间靶基因 p27 (Kip1) 和 p57 (Kip2) 差异表达谱^[19]。

还有许多 miRNA, 如 miR-125a^[20]、miR-130a^[21]、miR-146a^[22] 和 miR-342-5p^[23], 通过靶向信号转导通路调控 VSMC 功能和表型。miR-21 还明确与药物涂层支架 ISR 发生密切相关^[10]。miRNA 可作为生物标志物或治疗靶标, 在 ISR 诊断和治疗中发挥重要作用。

2.2 lncRNA 与 ISR

lncRNA 是一类长度超过 200 个核苷酸的 RNA, 作为重要的 RNA 转录物, 在血管对机械损伤适应中起着重要作用。lncRNA 作用机制大致分为两类, 顺式作用的 lncRNA 对同一基因组位点内靶基因或染色质结构进行调控^[4], 其机制包括转录增强、组蛋白修饰、染色质折叠、剪接修饰和翻译调节; 反式 lncRNA 离开转录位点, 通过远端调控靶点改变细胞机制。

lnc-RNCR3 和 lncRNA-430945 最近被确定为 VSMC 增殖和迁移调节因子, 下肢 ASO 患者中这两种 lncRNA 水平均升高。lncRNA-430945 主要通过促进受体酪氨酸激酶样孤儿受体 (ROR) 2 表达激活 RhoA 信号通路^[24]。lnc-RNCR3 作为 miR-185-5p 竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA),

促进 EC 增殖,进而导致 Krüppel 样转录因子(KLF) 2 水平升高。然而在 VSMC 中是否存在类似调控网络尚待观察^[25]。

lncRNA-00113 在下肢 ASO 患者血清中高表达,沉默 lncRNA-00113 可抑制 VSMC 增殖,但促进 VSMC 和 EC 迁移。lncRNA-00113 被认为是通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路促进 EC 增殖。但这些发现尚未在 VSMC 中得到证实。血小板衍生长因子(PDGF)刺激 VSMC 后,ceRNA、生长阻滞特异性转录因子(GAS)5 下调。GAS5 过度表达可通过充当 miR-21“分子海绵”阻止 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖和迁移^[26]。GAS5 过度表达的 EC 释放胞外体可减少 VSMC 增殖和迁移,反之亦然,突显 GAS5 在 VSMC-EC 串扰中的重要作用。此外,GAS5 通过 β -肌动蛋白(actin)在 VSMC 和 EC 中的核定位调节 β -actin 信号通路^[27]。这项研究表明 lncRNA 并非仅具有细胞特异性。这既为多细胞靶向治疗 ISR 提供机会,也增加靶向效应的风险。

2.3 circRNA 与 ISR

circRNA 分子呈封闭环状结构,不受 RNA 外切酶影响,表达更稳定,不易降解。circRNA 分子富含 miRNA 结合位点,在细胞中可解除 miRNA 对其靶基因的抑制作用,升高靶基因表达水平。这使 circRNA 有可能成为 ISR 临床诊断和治疗新靶点,CZNF609 在 EC 中高表达,下调 CZNF609 可促进 EC 迁移并保护 EC 免受氧化应激损伤。circRNA-心脏相关 circRNA(HRCR)通过调控 miR-223 影响心力衰竭^[28]。

2.4 其他 ncRNA 与 ISR

siRNA 是 20~25 个核苷酸长度的双链 ncRNA, 能与 mRNA 结合并促使其裂解, 以沉默特定 mRNA 翻译过程。它可通过多种转染技术引入细胞和组织影响靶基因^[29]。piRNA 与 Piwi 蛋白相互作用, 对转座子进行调控, 保护生殖细胞不受转座元件失调影响。piRNA 是一种生殖细胞特有的小 ncRNA^[30]。这两种 ncRNA 在 ISR 形成中的作用研究仍处于初步阶段, 机制尚不明确。

ncRNA 在 ISR 中的机制见图 1。

3 ncRNA 在 ISR 临床的应用

不同支架属性、支架直径、支架数量、支架重叠、支架膨胀不全等,均会影响血管壁完整性和血流动力学,进而导致 ISR 发生。临床证据表明球囊扩张时间和所施压力与 miR-92a 有关^[31]。金属裸支

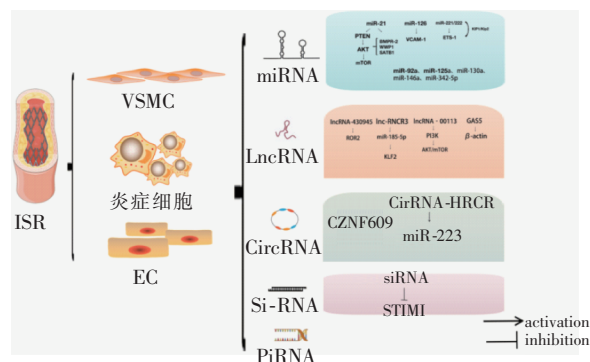


图 1 ncRNA 在 ISR 中的机制

架植入术后 ISR 发生率为 17%~41%,药物球囊及 DES 术后 ISR 发生率<10%,说明支架不同属性也对 ISR 有影响^[32]。目前研究显示临床应用 DES 可降低裸金属支架引起的 ISR 发生率,但会导致动脉延迟愈合和晚期血栓形成,而基因洗脱支架可克服这些缺点。有文献报道,可通过多种递送系统结合纳米技术将基因递送至目标区域持续释放基因,干扰 VSMC、EC 生物学功能,从而预防 ISR^[33]。抗 miR-21 洗脱支架在动物模型中已证实可减少 VSMC 增殖,且对 EC 无不利影响^[15]。近年来,ncRNA 已整合到微球集成支架、腺病毒或纳米颗粒中,准备进入临床试验阶段。

综上所述,基因洗脱支架是支架技术的一项重大突破,为解决 ISR 和晚期血栓形成提供了思路。该支架不仅可携带抗炎药和抗血栓药,还可携带 ncRNA,将基因固定在生物材料表面,送达阻塞部位持续释放,通过影响易感区域中基因表达降低 ISR 和晚期血栓发生率。但基因洗脱支架仍处于探索阶段,明确其发生机制,评估其治疗有效性、长期效果等,还需进行更多研究。

[参考文献]

- [1] 刘文导,冯柳迁,孟凡喆等. 下肢动脉硬化闭塞症介入治疗效果及影响术后复发因素分析[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26: 514-517.
- [2] 王海瑞,刘兆玉. 炎症因子及血生化指标在支架内再狭窄中作用的研究进展[J]. 中国临床医学影像杂志, 2017, 28:294-297.
- [3] Chen YC, Lin FY, Lin YW, et al. Platelet microRNA 365-3p expression correlates with high on-treatment platelet reactivity in coronary artery disease patients[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2019, 33: 129-137.
- [4] Maguire EM, Xiao Q. Noncoding RNAs in vascular smooth muscle cell function and neointimal hyperplasia[J]. FEBS J, 2020, 287: 5260-5283.
- [5] Bao S, Guo Y, Diao Z, et al. Genome-wide identification of lncRNAs

- and mRNAs differentially expressed in human vascular smooth muscle cells stimulated by high phosphorus[J]. *Renal Failure*, 2020, 42:437-446.
- [6] Zhang J, Gao F, Ni T, et al. Linc-POU3F3 is overexpressed in in-stent restenosis patients and induces VSMC phenotypic transformation via POU3F3/miR-449a/KLF4 signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11:4481-4490.
- [7] Shimono H, Kajiya T, Takaoka J, et al. Characteristics of recurrent in-stent restenosis after second- and third-generation drug-eluting stent implantation[J]. *Coron Artery Dis*, 2020, 32: 36-41.
- [8] Yang YB, Shen J, Wang SH, et al. A risk predictor of restenosis after superficial femoral artery stent implantation: relevance of mean platelet volume[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2020, 20:361.
- [9] 尹晶, 吴清华, 王鹏, 等. 下肢动脉硬化闭塞症患者介入术后白细胞介素-8、白细胞介素-18、血管内皮细胞生长因子检测及意义[J]. *介入放射学杂志*, 2021, 30:132-135.
- [10] Giacoppo D, Alfonso F, Xu B, et al. Drug-coated balloon angioplasty versus drug-eluting stent implantation in patients with coronary stent restenosis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75:2664-2678.
- [11] Zou Y, Huang X, Feng L, et al. Localization of in-stent neoatherosclerosis in relation to curvatures and bifurcations after stenting[J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8:3530-3536.
- [12] Jiang F, Zhang X, Lu YM, et al. Elevated level of miR-17 along with decreased levels of TIMP-1 and IL-6 in plasma associated with the risk of in-stent restenosis[J]. *Biosci Trends*, 2019, 13:423-429.
- [13] Liu W, Liu Y, Jiang H, et al. Plasma levels of interleukin 18, interleukin 10, and matrix metalloproteinase-9 and -137G/C polymorphism of interleukin 18 are associated with incidence of in-stent restenosis after percutaneous coronary intervention[J]. *Inflammation*, 2013, 36:1129-1135.
- [14] Feng S, Gao L, Zhang D, et al. MiR-93 regulates vascular smooth muscle cell proliferation, and neointimal formation through targeting Mfn2[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15:2615-2626.
- [15] Zhu J, Liu B, Wang Z, et al. Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation[J]. *Theranostics*, 2019, 9:6901-6919.
- [16] Huang R, Huang Y, Zeng G, et al. Ursodeoxycholic acid inhibits intimal hyperplasia, vascular smooth muscle cell excessive proliferation, migration via blocking miR-21/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19: 918-932.
- [17] Zhao J, Schnitzler GR, Iyer LK, et al. MicroRNA-offset RNA alters gene expression and cell proliferation[J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0156772.
- [18] Chen M, Peng W, Hu S, et al. miR-126/VCAM-1 regulation by naringin suppresses cell growth of human non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16:4754-4760.
- [19] Qin B, Cao Y, Yang H, et al. MicroRNA-221/222 regulate ox-LDL-induced endothelial apoptosis via Ets-1/p21 inhibition[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 405:115-124.
- [20] Wang J, Wu Q, Yu J, et al. miR-125a-5p inhibits the expression of NLRP3 by targeting CCL4 in human vascular smooth muscle cells treated with ox-LDL[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18:1645-1652.
- [21] Calvier L, Chouvarine P, Legchenko E, et al. PPARgamma links BMP2 and TGFbeta1 pathways in vascular smooth muscle cells, regulating cell proliferation and glucose metabolism[J]. *Cell Metab*, 2017, 25:1118.e7-1134.e7.
- [22] Zhao XS, Zheng B, Wen Y, et al. Salvianolic acid B inhibits Ang II-induced VSMC proliferation in vitro and intimal hyperplasia in vivo by downregulating miR-146a expression[J]. *Phytomedicine*, 2019, 58:152754.
- [23] 杜自忠, 王晨, 张明星, 等. 下肢动脉硬化闭塞症患者介入治疗后血清 miR-342-5p 水平及其意义[J]. *介入放射学杂志*, 2020, 29:894-898.
- [24] Cui C, Wang X, Shang XM, et al. lncRNA 430945 promotes the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells via the ROR2/RhoA signaling pathway in atherosclerosis[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19: 4663-4672.
- [25] Shan K, Jiang Q, Wang XQ, et al. Role of long non-coding RNA-RNCR3 in atherosclerosis-related vascular dysfunction[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2248.
- [26] Yao X, Yan C, Zhang L, et al. LncRNA ENST00113 promotes proliferation, survival, and migration by activating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in atherosclerosis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97: e0473.
- [27] Liu K, Liu C, Zhang Z. lncRNA GASS acts as a ceRNA for miR-21 in suppressing PDGF-bb-induced proliferation and migration in vascular smooth muscle cells[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120: 15233-15240.
- [28] Wang K, Long B, Liu F, et al. A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223[J]. *Eur Heart J*, 2016, 37:2602-2611.
- [29] Liu B, Zhang B, Roos CM, et al. Upregulation of Orai1 and increased calcium entry contribute to angiotensin II-induced human coronary smooth muscle cell proliferation: running title: angiotensin II-induced human coronary smooth muscle cells proliferation[J]. *Peptides*, 2020, 133:170386.
- [30] Wu W, Zhang W, Choi M, et al. Vascular smooth muscle-MAPK14 is required for neointimal hyperplasia by suppressing VSMC differentiation and inducing proliferation and inflammation[J]. *Redox Biol*, 2019, 22:101137.
- [31] Zhang L, Zhou M, Wang Y, et al. miR-92a inhibits vascular smooth muscle cell apoptosis: role of the MKK4-JNK pathway[J]. *Apoptosis*, 2014, 19:975-983.
- [32] Li L, Wang X, Yang B, et al. Validation and comparison of drug eluting stent to bare metal stent for restenosis rates following vertebral artery ostium stenting: a single-center real-world study[J]. *Interv Neuroradiol*, 2020, 26:629-636.
- [33] Thipparaboina R, Khan W, Domb AJ. Eluting combination drugs from stents[J]. *Int J Pharm*, 2013, 454:4-10.

(收稿日期:2020-10-01)

(本文编辑:边 佑)