

动脉导管未闭形成的分子机制

吉 炜 李 奋

【摘要】 动脉导管未闭(PDA)是最常见的小儿先天性心脏病之一,动脉导管的关闭过程涉及到血管平滑肌细胞(VSMCs)的增殖和迁移、内膜垫的形成、血管的收缩和重构等多个环节。研究表明前列腺素 E(PGE)、环氧合酶(COX)、MHY11、Jag1、TFAP2B 等基因的表达产物参与了动脉导管闭合的多个环节,以上这些基因的异常往往导致了 PDA 的形成。

【关键词】 动脉导管未闭;分子机制;基因;信号通路

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2012.03.005

动脉导管(DA)是连接主动脉和肺动脉之间一条特殊的动脉通道,在胚胎期由于胎儿肺血管阻力很大,进入肺动脉的大部分血液将经动脉导管流入主动脉再经脐动脉到达胎盘。出生后由于血氧张力升高,DA 平滑肌收缩,产生功能性关闭,随后内膜下层出现结缔组织增生,导管纤维化,最终导致 DA 的解剖性闭合。婴儿出生 3 个月后 DA 仍然持续开放,则为动脉导管未闭(PDA),该疾病在足月生产的新生儿中发病率为 0.05%,约占有先天性心脏病发病率的 5%~10%^[1]。PDA 如未得到及时处理,常可造成充血性心力衰竭、心内膜炎等疾病的发生。

DA 闭合的组织学过程大致如下^[2]:(1)内皮与内弹力膜的分离;(2)内皮下积聚细胞外基质;(3)血管平滑肌细胞通过内弹力膜从中膜迁移至内皮下;(4)内皮下形成的内膜垫增厚并堵塞血管腔。多种基因表达产物参与了 DA 胚胎期的发育形成,出生后 DA 的收缩、重构乃至最终的解剖学关闭过程,这些基因产物发生任何异常均有可能造成 DA 不能闭合。

1 前列腺素 E

DA 的开放和闭合是由收缩因子和舒张因子共同发挥作用的结果,在宫内前列腺素 E (PGE)是维持妊娠后期 DA 开放最主要的因素^[3]。胎儿 DA 自身以及血液循环中均能够产生前列腺素(PGs),并且宫内胎儿肺血流较少,PGs 的分解代谢低,因此胎儿血液循环中维持在较高水平,尤其 PGE₂ 是使 DA 开放最主要的舒张因子。PGE₂ 与受体结合后激活胞内的腺苷酸环化酶,胞内 cAMP 浓度上升,

促进 DA 产生 NO 等血管舒张因子^[4]。出生后,随着肺循环血量的增加,在 PG 脱氢酶等的作用下血液中 PGE₂ 的水平很快下降,引起动脉导管强烈收缩^[5],从而出现功能性关闭。

虽然,一般认为 PGE 主要的作用为在胎儿期维持 DA 的开放,然而也有研究发现,靶向敲除 PG 受体不仅不影响胎儿 DA 的开放,反而对出生后 DA 的闭合造成了影响,Nguyen 等^[6]发现,对 PGE₂ 受体 EP4 基因敲除的小鼠出生后 DA 均未能进行重构,DA 维持开放并出现左向右分流。可能是:在 EP4^{-/-}小鼠胚胎中由于 PGE₂ 受体的敲除,PGs 信号的转导受到了抑制,但其他舒张 DA 的通路却得到了激活,故胚胎 DA 仍维持开发,EP4 显然在出生后引发 DA 重构以及解剖闭合中发挥了不可或缺的作用。Yokoyama 等^[7]的研究进一步解释了可能的原因,他们发现 PGE₂ 与 EP4 受体结合后激活了 cAMP/PKA 信号通路,PKA 抑制了肌球蛋白轻链激酶从而导致了血管的舒张;与此同时,PKA 活化了透明质酸酶合酶 2,进而引起内皮下透明质酸的积聚、加速了内膜垫的形成和增厚,最终促进了 DA 的闭合。从这个意义上讲,PGs 通路在维持 DA 的开放和最终 DA 的解剖闭合中发挥了双重的作用。

2 环氧合酶

环氧合酶(COX)-1 和 2 是与 PGs 密切相关的两个独立的基因,均能催化花生四烯酸合成 PGs;吲哚美辛是 COX 的抑制剂,能够抑制 PGs 的合成。静脉注射吲哚美辛能够促进早产儿 PDA 的关闭^[8]。然而在产前母亲接受吲哚美辛安胎后,吲哚美辛治疗出生后早产儿的 PDA 的成功率则下降 24%^[9]。

有研究发现,COX-1 或 COX-2 单个或全部敲除未能造成宫内 DA 的提前闭合,并且 35%的 COX-2^{-/-}小鼠在出生后的 48 h 内由于 PDA 而死亡,而缺失

作者单位:200127 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心 心内科

通信作者:李 奋,Email:lifen_88@yahoo.com.cn

COX-1 异构体的小鼠出生后 DA 的闭合不受影响。当合并有一个拷贝 COX-1 失活时, COX-2^{-/-}小鼠 PDA 的发生率则从 35% 上升到 79%。如果两种 COX 均全部敲除时, 所有小鼠在出生后 12 h 内由于 PDA 而死亡。说明在 COX-2 缺失小鼠, COX-1 对 DA 的闭合具有基因剂量效应^[10]。COX, 尤其是 COX-2 敲除后新生小鼠出现 PDA 可能有 2 个方面的原因: (1) COX 的代谢产物中包含了具有促血管收缩的 PGs 产物, 比如 PGH₂, 该产物触发了出生后 DA 的收缩; (2) COX 产生的 PGE₂ 激活了 EP4 受体, 从而引发了 DA 血管壁的重构^[7]。

3 MYH11

人 MYH11 基因编码了平滑肌细胞主要的收缩蛋白——肌球蛋白重链, 其定位于 16p13.11。由于平滑肌细胞的收缩和分化在 DA 生理性闭合中起了重要的作用, MYH11 亦自然成为 PDA 研究的高度关注对象。Zhu 等^[11]对胸主动脉瘤和夹层(TAAD)合并 PDA 的法国人家系 MYH11 基因测序发现了 2 种类型的突变。一种突变(IVS32 + 1G → T)位于第 32 内含子的剪接位点, 这个位点的突变造成了 mRNA 在剪接时失去整个第 32 个外显子, 最终产生了 C 端 71 个氨基酸被截断的蛋白; 另一个突变是位于第 37 外显子的错义突变(G5361 → A), 产生了 R1758Q。此外, 对另一个 TAAD 合并 PDA 的美国人家的 MYH11 测序发现了一个在第 28 外显子缺失 72 个碱基的突变, 该突变造成了 mRNA 的移码, 从而翻译出 C 端截短 24 个氨基酸的蛋白。这些突变均发生在肌球蛋白的 α 螺旋所在的 C 端, 肌球蛋白通过该结构域形成二聚体, 因此这些部位的突变抑制了平滑肌肌球蛋白的装配, 从而对血管收缩功能产生重要影响。在对这一法国人家系组织样本进一步研究发现, 两种基因突变均使突变型肌球蛋白与野生型肌球蛋白产生比野生型二聚体更加疏松的结合力, 这样不仅突变型肌球蛋白不能发挥作用, 而且也使部分野生型肌球蛋白失去活性, 因此, 这些突变通过显性抑制的方式参与了 TAAD 和 PDA 的发生。

Zhu 等^[12]也对散发孤立性 PDA 患者的 MYH11 基因进行测序分析, 结果发现了 2 个功能性的错义突变 R669C 和 E1290Q。其中 R669C 突变位于肌球蛋白重链 α 螺旋, 可能影响了与肌动蛋白的结合, 从而抑制了平滑肌细胞的收缩。在卷曲螺旋的 7 肽重复区域内部发现了 E1290Q 突变, 其可能影响了平滑肌肌球蛋白重链杆部装配成粗肌丝。因此, MYH11 的错义突变也可能为一部分散发孤立性 PDA 的发生原因。

4 Jag1

人类 Jag1 基因定位在 20p12, 具有 26 个外显子, 编码 Notch 信号通路上的配体蛋白, 其在内皮细胞和血管平滑肌细胞(VSMCs)上均有表达, 进化上高度保守的 Notch 信号通路在哺乳动物血管的发育上起了重要的作用^[13,14]。相邻细胞的膜上表达了 Notch 信号通路的配体和受体, 当配体和受体识别后, Notch 受体的胞内段在酶的作用下裂解后进入核内, 与 DNA 结合蛋白 CSL 结合成具有活性的转录复合物促进 DNA 转录^[15]。靶向干扰 Notch 信号通路中一些成分往往导致动物胚胎的心血管发育异常, 对于 Jag1 确切的功能研究近年才刚刚兴起, 目前发现内皮细胞膜上表达的 Jag1 在 VSMCs 的分化中起了关键的作用^[16]。

Feng 等^[17]特异性地敲除小鼠平滑肌组织 Jag1, 发现新生小鼠在出生后早期即因 PDA 而死亡, 出现 PDA 的比例为 95% (53/56), 在出生后 12 h 内注射吡啶美辛能够关闭约 50% 的 DA, 发现这些小鼠 DA 管壁中的血管平滑肌组织出现分化上的缺陷, 不能形成足够具有收缩功能的 VSMCs, 这被认为是出现出生后 PDA 的主要原因。目前认为, Jag1 介导的 Notch 信号诱导了神经嵴细胞分化为收缩型而不是合成型 VSMCs^[16,18]。Jag1 调节下游细胞的方式为侧向诱导: 内皮细胞膜上表达的 Jag1 通过异源相互作用的方式与下一层 VSMCs 上 Notch 受体结合, 接收到 Jag1 信号的 VSMCs 自身 Jag1 得以诱导表达并通过同源相互作用的方式将信号进一步传递给下一层平滑肌细胞。因此平滑肌特异性敲除 Jag1 的某些小鼠, DA 保留了受到内皮细胞激活具有收缩功能的 VSMCs, 从而在吡啶美辛的作用下部分小鼠 DA 能够出现收缩反应并且关闭 DA。而对于内皮细胞特异性敲除 Jag1 的小鼠, 由于内皮细胞不能将 Notch 信号传递给相邻的 VSMCs, DA 上的平滑肌细胞将分化成合成型而不是收缩型的平滑肌细胞, 从而失去收缩功能, 最终导致 DA 的开放^[17]。

5 TFAP2B

TFAP2B 是目前研究较多的 PDA 相关基因, 编码了长度为 460 个氨基酸的心脏神经嵴细胞来源的转录因子, 其 N 端为转录激活区域, C 端为 DNA 结合区域以及 TFAP2 转录因子之间形成同源或异源二聚体相互结合的区域。Satoda 等^[19]发现, Char syndrome 的发病与 TFAP2B 基因突变有关, 他们对 Char syndrome 患者 TFAP2B 测序发现第 264 及 289 位氨基酸出现错义点突变, 并均对正常 TFAP2B 转录因子起了负性的调节作用, 从而认为在 PDA 的发病过程中这两位点突变

起了显性抑制的作用。

Mani 等^[20]对 Char syndrome 家系的测序研究,在 TFAP2B 基因第 3 和 4 内含子侧翼序列中发现了基因序列变化,这些变化引起了其 mRNA 剪接的异常,从而产生了移码突变,这些移码突变或使 mRNA 降解或产生了无功能的蛋白,最终在 DA 的发育过程中出现了转录因子 TFAP2B 基因的单倍剂量不足。

最近,Chen 等^[21]对 2 个家族性非综合症 PDA 的家系 TFAP2B 进行了测序,发现同样的第 3 内含子侧翼序列的基因突变,该突变造成了 mRNA 第 3 外显子在剪接过程中丢失,从而产生移码突变;此外还发现了位于 N 端的 CCGG 缺失突变,该缺失也造成了 mRNA 的移码突变。

TFAP2B 在 DA 和主动脉弓的发育过程中呈现出时空特异性的表达^[22],其被认为对细胞周期进行了负性调控。这些突变或通过显性抑制或通过单倍剂量不足的方式负性调节了 TFAP2B 的转录功能,干扰了心脏神经嵴来源细胞的分化从而影响 DA 的发育,导致了 PDA 的发生。

综上所述,PDA 形成的分子机制相当复杂,各因素之间相互渗透相互交织,形成非常精密的调控网络,共同参与了疾病的发生。可以预见的是随着第二代测序技术的推广应用,越来越多的 PDA 致病基因将得以呈现,在整合这些研究数据后,会有力地推动 PDA 致病机制的揭示,从而保护胎幼儿的健康发育和成长。

参 考 文 献

- [1] Schneider DJ, Moore JW. Patent ductus arteriosus[J]. *Circulation*, 2006, 114(17): 1873-1882.
- [2] Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y. Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus[J]. *J Smooth Muscle Res*, 2010, 46(2): 77-87.
- [3] Clyman RI. Mechanisms regulating the ductus arteriosus[J]. *Biol Neonate*, 2006, 89(4): 330-335.
- [4] Bouayad A, Kajino H, Waleh N, et al. Characterization of PGE2 receptors in fetal and newborn lamb ductus arteriosus [J]. *Am J Physiol*, 2001, 280(5): H2342 - H2349.
- [5] Coggins KG, Latour A, Nguyen MS, et al. Metabolism of PGE2 by prostaglandin dehydrogenase is essential for remodeling the ductus arteriosus[J]. *Nat Med*, 2002, 8(2): 91-92.
- [6] Nguyen M, Camenisch T, Snouwaert JN, et al. The prostaglandin receptor EP4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth[J]. *Nature*, 1997, 6(390): 78-81.
- [7] Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, et al. Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(11): 3026-3034.
- [8] Jones LJ, Craven PD, Attia J, et al. Network meta-analysis of indomethacin versus ibuprofen versus placebo for PDA in preterm infants[J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2011, 96(1): F45-F52.
- [9] Soraisham AS, Dalgleish S, Singhal N, et al. Antenatal indomethacin tocolysis is associated with an increased need for surgical ligation of patent ductus arteriosus in preterm infants[J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2010, 32(5): 435-442.
- [10] Loftin CD, Trivedi DB, Tianio HF, et al. Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(3): 1059-1064.
- [11] Zhu L, Vranckx R, Khau Van Kien P, et al. Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(3): 343-349.
- [12] Zhu L, Bonnet D, Boussion M, et al. Investigation of the MYH11 gene in sporadic patients with an isolated persistently patent arterial duct[J]. *Cardiol Young*, 2007, 17(6): 666-672.
- [13] Villa N, Walker L, Lindsell CE, et al. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels[J]. *Mech Dev*, 2001, 108(1-2): 161-164.
- [14] Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis; a team effort coordinated by Notch[J]. *Dev Cell*, 2009, 16(2): 196-208.
- [15] Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(9): 678-689.
- [16] High FA, Lu MM, Pear WS, et al. Endothelial expression of the Notch ligand Jagged1 is required for vascular smooth muscle development[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6): 1955-1959.
- [17] Feng X, Krebs LT, Gridley T. Patent ductus arteriosus in mice with smooth muscle-specific Jag1 deletion [J]. *Development*, 2010, 137(24): 4191-4199.
- [18] Benedito R, Roca C, Sørensen I, et al. The Notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis[J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1124-1135.
- [19] Satoda M, Zhao F, Diaz GA, et al. Mutations in TFAP2B cause Char syndrome, a familial form of patent ductus arteriosus[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 42-46.
- [20] Mani A, Radhakrishnan J, Farhi A, et al. Syndromic patent ductus arteriosus: evidence for haploinsufficient TFAP2B mutations and identification of a linked sleep disorder[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(8): 2975-2979.
- [21] Chen YW, Zhao W, Zhang ZF, et al. Familial nonsyndromic patent ductus arteriosus caused by mutations in TFAP2B[J]. *Pediatr Cardiol*, 2011, 32(7): 958-965.
- [22] Zhao F, Bosserhoff AK, Buettner R, et al. A heart-hand syndrome gene: Tfp2b plays a critical role in the development and remodeling of mouse ductus arteriosus and limb patterning[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22908.

(收稿:2012-02-21 修回:2012-04-05)

(本文编辑:金谷英)