

·临床研究·

[文章编号] 1007-3949(2001)-04-0328-04

## 血管内皮细胞生长因子基因治疗严重肢体缺血

王家宁<sup>1,2</sup>, 张群林<sup>1</sup>, 葛永贵<sup>1</sup>, 王玮<sup>1</sup>, 黄永章<sup>2</sup>, 王俊峰<sup>1</sup>, 李瑞明<sup>2</sup>, 王卫民<sup>2</sup>

( 郧阳医学院附属太和医院 1. 心内科; 2. 生命科学研究所以, 湖北省十堰市 442000)

[关键词] 基因治疗; 血管内皮细胞生长因子; 动脉阻塞性疾病, 外周

[摘要] 观察缺血肢体肌肉内注射编码血管内皮细胞生长因子的裸露质粒的安全性、可行性及有效性。对 3 例 (4 条肢体) 严重肢体缺血患者在肢体缺血部位随机选择 4 个位点, 注射编码血管内皮细胞生长因子 165 的真核表达质粒 pUC-CAGGS/h 血管内皮细胞生长因子 165 4 mg, 每两周注射一次。肌肉内注射裸露质粒后每天观察患者的临床情况。治疗后 1~3 个月重复血管造影以观察有无新生血管的形成。结果发现缺血性溃疡愈合或明显改善, 静息性疼痛缓解, 血管造影发现有新生血管形成和侧枝循环的建立。所有患者均在治疗后出现一过性下肢水肿, 一周内自然消退, 水肿的出现与血管内皮细胞生长因子增加血管通透性相一致。结果提示, 肌肉内注射编码血管内皮细胞生长因子 165 的裸露质粒 DNA 可诱导严重肢体缺血患者的治疗性血管生成, 是一种安全有效的治疗肢体缺血的方法。

[中图分类号] Q789, R543.5

[文献标识码] A

### Intramuscular Gene Transfer of Vascular Endothelial Growth Factor for Patients with Critical Limb Ischemia

WANG Jia-Ning<sup>1,2</sup>, ZHANG Qun-Lin<sup>1</sup>, GE Yong-Gui<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, HUANG Yong-Zhang<sup>2</sup>, WANG Jun-Feng<sup>1</sup>, LI Rui-Ming<sup>2</sup>, and WANG Wei-Min<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Institute of Life Sciences, Taihe Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China)

**MeSH** Gene Therapy; Vascular Endothelial Growth Factor; Arterial Occlusive Disease, Peripheral**ABSTRACT** **Aim** To document the safety and feasibility of intramuscular gene transfer by use of naked plasmid DNA encoding vascular endothelial growth factor and to observe potential therapeutic benefits in patients with critical limb ischemia.**Methods** Gene transfer was performed in 4 limbs of 3 patients with rest pain and nonhealing ischemic ulcers due to peripheral arterial disease. Four milligrams of naked plasmid DNA encoding the 165 amino acid isoform of human vascular endothelial growth factor (pUC-CAGGS/h VEGF165) was injected directly into the muscles of the ischemic limb at 4 arbitrarily selected sites, two weeks apart. After 1~3 months after gene transfer, contrast angiography was repeated to document newly visible collateral blood vessels. Clinical status was recorded per day after gene transfer. **Results** Ischemic ulcers healed or markedly improved in 4 of 4 limbs, rest pain was relieved in all patients. Angiography confirmed newly visible collateral blood vessels in 4 of 4 limbs.Complications were limited to transient lower extremity edema in all patients, consistent with VEGF enhancement of vascular permeability. **Conclusions** This findings may indicate that intramuscular injection of plasmid DNA expressing VEGF165 is sufficient to induce therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. It may be a safe and effective strategy for patients with critical leg ischemia.

缺血性疾病的治疗性血管生成是目前心血管领域研究的热点。人们希望通过基因治疗的方法促进新生血管的形成和侧枝循环的建立而达到改善缺血的目的。美国已采用此方法治疗严重肢体缺血和难治性冠心病<sup>[1~6]</sup>。Isner 等<sup>[1]</sup>首次报道了血管内皮

细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 基因治疗肢体缺血患者获得成功。国内血管生成的基因治疗在恒河猴肢体缺血模型上也取得了令人兴奋的结果<sup>[7]</sup>, 但尚未有临床应用的报道。本文采用肌肉注射的方法将表达 VEGF165 的真核表达质粒注射于患者肢体缺血部位, 旨在观察血管生成基因治疗的临床安全性、可行性和有效性, 为较大规模的临床试验奠定基础。

[作者简介] 王家宁, 男, 1967 年出生, 副教授, 北京医科大学心血管专业博士, 从事缺血性疾病血管生成的基因治疗研究, 目前承担课题 3 项, 发表论文 10 余篇。

## 1 对象和方法

### 1.1 病例选择

病例为 1999 年 8 月~2000 年 2 月经我院心血管内科基因治疗且行下肢动脉造影复查的 3 例严重肢体缺血患者。这 3 例患者均符合下列标准: 静息性疼痛和/或肢体缺血性溃疡、坏疽, 经一个月以上保守治疗无效; ④肝、肾功能, 肝、胆、脾 B 超, 胸部 X 线, 血液、尿液分析均无异常; ④视网膜无血管增生; 外周动脉造影证实存在一支或多支动脉血管闭塞性病变; 基因治疗获得患者本人及其家属的书面知情同意。

1.1.1 例 1 王 X X, 男性, 64 岁, 右下肢疼痛 1 月余入院。疼痛为持续性刀割样疼痛, 不能行走, 夜间疼痛更为严重, 不能入睡, 失去生活自理能力。体检发现右下肢皮温低, 肢体变细, 皮肤及腓肠肌有明显触压痛, 右侧大拇趾末端破溃, 右下肢血压测不出, 右侧股动脉、足背动脉搏动消失。眼底检查示眼底动脉硬化, 冠状动脉造影示冠状动脉双支血管病变(累及前降支及右冠状动脉)。双下肢动脉造影示双侧髂内动脉弥漫性动脉硬化, 右髂外动脉自髂总动脉分叉处完全闭塞, 股动脉未显影。诊断为动脉粥样硬化性右髂外动脉闭塞, 高血压病、糖尿病、冠心病, 给予降血压、降血糖、扩张血管、抗凝、抗血小板治疗, 在动脉造影后进行基因治疗, 每半月注射基因一次, 三个月后复查造影。

1.1.2 例 2 张 X X, 男性, 36 岁, 双下肢疼痛 1 年入院。疼痛以夜间为甚, 左足背部、趾端皮肤发绀, 皮温降低, 左第二足趾近端可见 1 cm<sup>2</sup> 的溃疡, 左、右大拇趾末端可见溃疡且并发感染, 双侧足背动脉搏动不明显。动脉造影示左侧胫腓干及胫后动脉闭塞, 右侧胫腓干闭塞, 并有侧枝循环形成。诊断为双下肢动脉闭塞性脉管炎, 入院后给予静滴复方丹参、低分子右旋糖酐及抗血小板治疗。造影当天给予基因肌肉注射, 每半月注射一次, 三个月后复查造影。

1.1.3 例 3 樊 X X, 男, 67 岁, 双下肢疼痛 1 年余, 以左侧为甚。既往有糖尿病 10 年, 高血压病 17 年。左下肢股动脉搏动消失, 右股动脉搏动减弱, 左下肢皮温减低, 左足底、大拇趾发绀, 大腿以下疼痛。造影结果示右侧髂内动脉 99% 多处节段性狭窄, 左髂外动脉中段 90% 局限性狭窄, 左股动脉完全闭塞, 未见侧枝循环。造影结束后即行基因治疗, 每半月注射一次, 一月时复查造影并行左髂外动脉经皮腔内血管成形术加支架植入术。

### 1.2 下肢动脉造影

常规消毒、铺巾, 1% 利多卡因局麻, 穿刺健侧股动脉, 置入 7F 鞘管, 送入 6F 猪尾导管至腹主动脉远端, 导管尾端连接高压注射器以注入 76% 泛影葡胺, 采用连续电影摄影记录造影结果, 摄影速度为 25 帧/秒, 观察新生血管形成和侧枝循环建立情况。血管造影机为美国 GE 公司 1 250 mA X 光机。造影结束后由不知情的放射科医师选择侧枝循环显影最充分的时相照相, 将照相结果扫描入电脑, 比较基因治疗前后侧枝循环的变化。

### 1.3 质粒的制备与纯化<sup>[8]</sup>及质粒注射方法

pUC-CAGGS/h VEGF165 是由日本九州大学医学院病理系 Yoshikazu 博士惠赠<sup>[9]</sup>。pUC-CAGGS/h VEGF165 是一种可表达 VEGF165 的真核载体, 含有促使外源基因表达的 CAG 增强子/启动子(CMV-IE 增强子, 鸡  $\beta$ -actin 启动子, 兔  $\beta$ -珠蛋白聚腺苷尾和杂交内含子)、SV40 起始位点、pUC 19 骨架和氨苄青霉素抗性基因, 人 VEGF165 cDNA 插入在 pUC-CAGGS 的 EcoR I 位点上。通过绿色荧光素蛋白(GFP)转基因小鼠证实, 以 CAG 为增强子/启动子者 GFP 表达水平明显高于以 CMV 为启动子者(Personal Communication with Y Yonemitsu)。采用碱裂解法提取质粒, 采用 PEG-8000 纯化后复溶于高压消毒三蒸水备用。采用 752 型紫外分光光度计测量 260 nm 和 280 nm 的光吸收值, 以估计所提质粒的含量和纯度。股动脉或髂外动脉闭塞患者, 基因注射部位为患侧大腿内侧肌群近端; 若为腘动脉以下闭塞, 注射部位在膝关节上下任意选择 4 个位点。基因注射剂量为 4 mg, 用生理盐水稀释为 8 mL, 每个位点 2 mL (含 1 mg 质粒)。每半月重复注射一次, 基因治疗后观察疼痛缓解、溃疡愈合情况, 治疗后 1~3 月重复动脉造影。

## 2 结果

### 2.1 有效性

例 1 患者右侧大腿内侧基因注射后第 8 天患肢疼痛减轻, 原来因肢体静息性疼痛夜间不能入睡转为夜间可以入睡, 右下肢尤其是足背温度较治疗前升高, 皮肤颜色由紫绀开始转为红润。治疗后半月患者可拄着拐杖下地行走, 可自行上厕所大小便, 生活已能自理, 右股动脉搏动可触及, 但较对侧为弱。一月后患者可无需借助拐杖在室内行走 30 min 而不感到疼痛, 右侧股动脉搏动明显增强, 右大拇趾破溃处已经愈合。基因肌肉内注射三个月后, 患者已

能自行上、下三层楼, 仅偶尔感到疼痛。造影结果显示右髂外动脉周围有大量侧枝循环形成, 右侧股动脉通过侧枝循环逆行显影, 进一步证实了 VEGF165 基因治疗对血管生成的促进作用。

例 2 患者治疗后 2 周双侧下肢疼痛明显减轻, 夜间开始能入睡, 治疗后 3 月双侧足趾末端紫绀明显减轻, 大拇趾两侧的溃疡已经愈合, 左第二足趾的近端溃疡也明显变小, 夜间静息性疼痛消失。重复造影显示左、右两侧闭塞的胫腓干周围有大量的新生血管形成和侧枝循环的建立。

例 3 患者基因治疗 3 天后疼痛有所减轻, 皮肤

开始变得红润, 治疗后 1 个月疼痛范围由原来的大腿以下缩小到末梢趾节, 左侧股动脉搏动较治疗前增强。1 个月造影时左侧髂总动脉, 髂内、外动脉及闭塞的股动脉周围有大量的新生血管形成, 如图 1 (Figure 1) 所示。为了进一步改善患者症状, 增加侧枝血管的血流灌注压, 遂进行左髂外动脉狭窄部位的经皮腔内血管成形术加支架植入术, 试图开通股动脉, 但因导引导丝不能通过闭塞部位未能成功。患者出院时原来鞭子抽打样的缺血性疼痛已经消失。左侧足背部呈游走性一过性针刺样疼痛, 考虑为糖尿病合并末梢神经病变, 给予神经营养治疗。

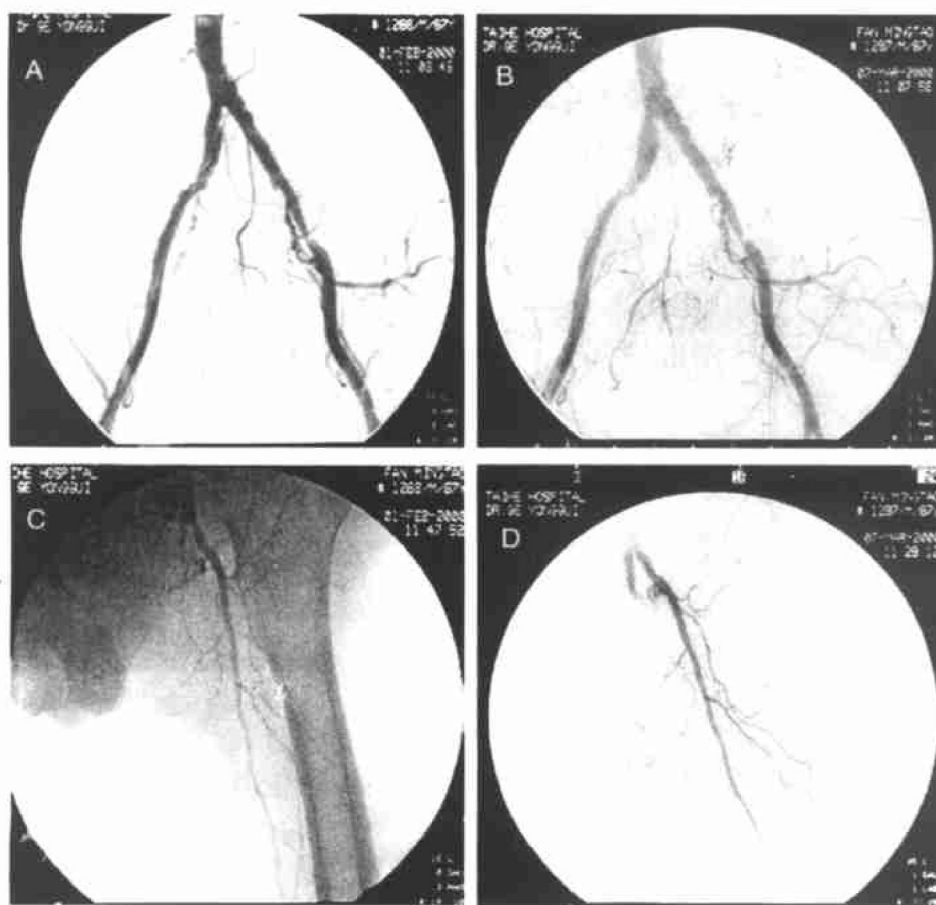


图 1. 病例 3 血管内皮细胞生长因子 165 基因注射前和注射后 1 个月的左下肢动脉造影结果。A: 基因注射前造影显示双侧髂内动脉高度狭窄, 左髂外动脉 80%~90% 狭窄; B: 基因注射后 1 个月重复造影显示髂动脉周围有大量新生血管形成; C: 基因注射前造影显示股浅动脉完全闭塞; D: 基因注射后 1 个月重复造影显示股深动脉周围有大量新生血管形成

**Figure 1.** Angiograms performed in the patient of case 3 with critical left limb ischemia due to occlusion of superficial femoral artery immediately prior to (A, C) and 1 month (B, D) post gene therapy with the naked DNA encoding VEGF 165, demonstrating the newly visible collateral vessels (B, D) around the left iliac artery (A, B) and femoral artery (C, D)

## 2.2 安全性

3 例患者局部注射基因后, 生命体征无明显变化, 无发热及过敏反应, 肝、肾功能无明显变化, 大小便无异常。这 3 例患者在注射 pUC-CAGGS/hVEGF165 后 3 天左右患侧肢体出现了轻微水肿, 一

周内自然消退, 无需特别处理。在患侧肢体未见血管瘤的形成。

## 3 讨论

慢性严重肢体缺血患者的预后较差<sup>[2]</sup>, 对这些

患者的心理学测试表明其生活质量指标与晚期肿瘤患者相似。虽然对肢体缺血患者进行了多种药物干预,包括给予静脉使用 PGE1,但尚无药物能改变这些患者的自然病程。这些严峻的统计学数字说明目前对肢体缺血缺乏有效的治疗措施,因此对慢性严重肢体缺血患者寻找新的治疗策略迫在眉睫。

近年来对血管生成发生机制的研究已发现了数种关键的促进血管生成的生长因子,虽然促进血管生成的生长因子很多,但以 VEGF 研究得最为深入。VEGF 具有内皮细胞作用的特异性,VEGF 仅作用于内皮细胞,而不作用于血管平滑肌细胞,这就避免了因加速动脉粥样斑块中平滑肌细胞的增殖而加重病变的危险。VEGF 可促进内皮细胞的增殖、迁移,是血管生成所必需的细胞因子之一,在治疗性血管生成的基因治疗中有其独到之处。人们希望通过治疗性血管生成的基因治疗攻克肢体缺血顽症。

血管内皮细胞生长因子有四种同源蛋白质(isoform),其中以 VEGF165 在人体中表达水平最高。国外将表达 VEGF165 的裸露质粒通过肌肉注射和水凝胶包被的球囊导管导入肢体缺血部位,以治疗动脉粥样硬化和血栓闭塞性脉管炎所致的严重肢体缺血,取得了较满意的效果,国内亦在恒河猴动物模型上取得了理想的效果。本文采用携带 VEGF165 cDNA 的真核表达载体 pUC-CAGGS/hVEGF165 直接肌肉注射于肢体缺血部位,取得了与国外报道类似的效果。所有患者在转基因后一周左右疼痛明显减轻,1~3 个月左右疼痛基本消失,原溃疡的部位愈合或范围明显缩小,缺血症状明显改善,提高了患者的生活质量及生活自理能力,避免了因肢体缺血而不得不选择的截肢治疗。

本文基因治疗后 3 天左右 3 例患者均出现了肢体的轻微水肿,但均在一周内消退而无需特别处理,是因为 VEGF 又称血管通透因子,它可使毛细血管的通透性增高,导致局部水肿,水肿的出现是基因治疗有效的一个间接证据。虽然 VEGF 能促进肿瘤的生长和转移,尚无证据表明 VEGF 能促使肿瘤的发生。为安全起见,基因治疗前应排除机体内潜在的隐性肿瘤。本文之所以采用肌肉注射裸露的质粒,是因为肌肉组织可摄取质粒 DNA,虽然转染效率较低,但 VEGF 是内皮细胞强大的丝裂原,少量表达的

VEGF 仍能发挥其临床作用,而且肌肉注射简便,创伤小、安全,易于推广。而血管壁局部基因导入更具有挑战性,需用特制的导管,创伤性大,血管壁常因动脉粥样硬化致转染效率不一致。

本文结果初步表明缺血局部肌肉内注射 pUC-CAGGS/hVEGF165 是一种疗效好,安全性高,简便易行且易于推广的治疗肢体缺血的新方法。但在其广泛推广应用之前,尚需大规模有安慰剂对照的临床试验来确定该方法的安全性、可行性和有效性。

#### 参考文献

- [1] Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb [J]. *Lancet*, 1996, **348**: 370-374
- [2] Isner JM, Walsh K, Symes J, et al. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease [J]. *Circulation*, 1995, **191** (11): 2687-692
- [3] Lee LY, Patel SR, Hackett NR, et al. Focal angiogen therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121 [J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, **69**: 14-24
- [4] Symes JF, Losordo DW, Vale PR, et al. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease [J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, **68**: 830-837
- [5] Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, et al. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease [J]. *Circulation*, 1999, **100**: 468-474
- [6] Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 1998, **97**: 2800-804
- [7] 盛琴慧,朱国英,周爱儒,等. 血管内皮生长因子基因治疗肢体动脉阻塞病的实验研究 [J]. *中华医学杂志*, 1999, **79** (2): 129-132
- [8] 李尹雄. 核酸的分离与纯化. 见: 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 95-154
- [9] Yonemitsu Y, Kaneda Y, Morishita R, et al. Characterization of in vivo gene transfer into the arterial wall mediated by the sendai virus (Hemagglutinating virus of Japan) liposomes: an effective tool for the in vivo study of arterial diseases [J]. *Lab Invest*, 1996, **175** (3): 313-323

(此文 2000-06-16 收到, 2000-11-03 修回)

(此文编辑 朱雯霞)