

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2004)12-04-0430-03

内皮型一氧化氮合酶基因转移预防移植血管狭窄

王晓明¹, 吴树明², 郭兰敏²

(1. 浙江省人民医院心胸外科, 浙江省杭州市 310014;

2. 山东省立医院心外科, 山东省济南市 250021)

[关键词] 外科学; 基因转移预防移植血管狭窄; 基因治疗; 一氧化氮合酶; 腺病毒载体; 血管移植; 再狭窄

[摘要] 探讨内皮型一氧化氮合酶基因转移防治移植静脉血管桥再狭窄的可行性。构建带有内皮型一氧化氮合酶基因的复制缺陷型重组腺病毒载体和腺病毒空载体。采用山羊自体颈静脉作血管桥, 在体外转染带有内皮型一氧化氮合酶基因的腺病毒载体(实验组)和腺病毒空载体(对照组), 然后旁路移植法端—侧吻合到颈动脉上。术后30天, 通过免疫组织化学染色, 测定静脉桥³H-TDR的掺入量和静脉桥内膜厚度及管腔狭窄面积百分比, 观察内皮型一氧化氮合酶基因在静脉桥中的功能表达和静脉桥新生内膜的增生情况。结果发现, 与对照组相比, 转染后30天, 实验组静脉桥中外源性内皮型一氧化氮合酶仍有功能表达, 静脉桥³H-TDR掺入量明显减少($P < 0.01$); 静脉桥平均内膜增生厚度和管腔狭窄面积百分比明显低于对照组($P < 0.01$)。结果提示, 内皮型一氧化氮合酶基因转移可以有效抑制移植血管新生内膜的增生, 对预防移植血管狭窄有一定的作用。

[中图分类号] R6

[文献标识码] A

Adenovirus-Mediated Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Transfer Prevents Restenosis of Vein Grafts

WANG Xiao-Ming¹, WU Shu-Ming², and GUO Lan-Min²

(Department of Cardiac Surgery, Zhejiang Provincial Hospital, Hangzhou 310014, China)

[KEY WORDS] Nitric Oxide Synthase; Adenovirus Vector; Vessel Transplant; Restenosis; Gene Therapy; Intimal Hyperplasia

[ABSTRACT] **Aim** To explore the possibility of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene transfer preventing restenosis of vein grafts. **Methods** We constructed the recombinant adenovirus vector that coding eNOS, AdCMV eNOS and adenovirus vector (AdCMV). Artery bypass animal model was constructed: we took jugulars of goat as grafts, infected AdCMV eNOS and AdCMV in vitro, then anastomosed the vein grafts between carotids of goats. The functional expression of eNOS in vein grafts was assessed using immunohistochemical staining and measurement of NO concentration. The inhibition of intimal hyperplasia in vein grafts transduced AdCMV eNOS was assessed using assay of ³H-TDR incorporation, histologic analysis, measurement of intimal thickness and area percentage of stenosis of vein grafts. **Results** Expression of eNOS gene in vein grafts began on 48 h after transduced with AdCMV eNOS. Levels of NO in vein grafts: AdCMV eNOS transduced veins yielded $1724.1 \pm 312.2 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{g})$, whereas AdCMV yielded $245.8 \pm 17.4 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{g})$ ($P < 0.001$, $n = 3$). Levels of ³H-TDR Incorporation: Incorporation in AdCMV veins was $487.7 \pm 51.1 \text{ cpm}/\text{mg vessel}$, and $140.8 \pm 32.5 \text{ cpm}/\text{mg vessel}$ in AdCMV eNOS veins ($P < 0.01$, $n = 3$). Mean thickness of intimal was $125.7 \pm 30.60 \mu\text{m}$ in AdCMV veins, and $28.8 \pm 5.24 \mu\text{m}$ in AdCMV eNOS veins; area percentage of stenosis was $52.18\% \pm 8.46\%$ in AdCMV veins, and $23.6\% \pm 4.71\%$ in AdCMV eNOS veins.

Conclusions Adenovirus-mediated eNOS gene transfer could inhibit intimal hyperplasia effectively. This work lay a foundation in gene therapy of grafts restenosis after CABG.

一氧化氮(nitric oxide, NO)是体内重要的生物信使分子和效应分子^[1], 它具有舒张血管, 抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖、迁移, 抑制血小板聚集、粘附, 抑制白细胞粘附等功能^[2]。而一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)是

NO合成的关键酶, 通过将内皮型 NOS(endothelial, eNOS)基因局部转移, 恢复或增加受损血管 NO的合成, 可能是防止移植血管狭窄的有效手段。本研究将 eNOS 基因转入到静脉桥中, 观察其在静脉桥中的表达和对新生内膜增生的抑制作用, 探讨 eNOS 基因转移对血管桥再狭窄的防治作用。

[收稿日期] 2003-11-14

[修回日期] 2004-04-01

[作者简介] 王晓明, 博士, 主治医师, E-mail 为 wangxiaoming1@hzcnc.com。吴树明, 硕士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师。郭兰敏, 主任医师, 教授, 博士研究生导师。

1 材料与方法

1.1 材料

含牛 eNOS cDNA 的质粒 eNOS-pBluescript 由美国 Emory 大学 Harrison 教授惠赠;腺病毒穿梭质粒 pCA14 和腺病毒拯救质粒 pBHG10 均购于加拿大 Microbix 公司;eNOS 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品;HIGH-SABC 试剂盒及 DAB 为武汉博士德公司产品。

1.2 内皮型一氧化氮合酶基因重组腺病毒载体的构建

根据质粒的酶切位点图谱, EcoR I 酶切、回收 eNOS cDNA 片段, 然后克隆到质粒 pCA14 的 EcoR I 酶切位点上, 构建成重组质粒 pCA14-CMV-eNOS。采用 DNA-磷酸钙共沉淀法^[3] 将 pCA14-CMV-eNOS 与 pBHG10 共转染 293 细胞(含有腺病毒 E1 区的人胚肾细胞), 10~14 天后经同源重组即可观察到病毒蚀斑的出现, 经透射电镜观察和 PCR 鉴定构建正确。在 293 细胞中扩增, CsCl 梯度低速超速离心纯化, 得到重组的腺病毒(AdCMVeNOS)。同法构建腺病毒空载体(AdCMV)。滴度均为 4.8×10^{13} PFU/L。

1.3 基因转染

山羊 10 只, 体重 12~15 kg, 雌雄不限, 手术前 12 h 禁食。1% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 静脉注射麻醉, 颈部正中切口, 游离并切下一侧颈内静脉约 6 cm, 平均分成两段, 用肝素生理盐水冲洗, 管腔内分别注入不同的病毒液, 两端结扎, 然后分别放入相应的病毒液中, 室温下浸泡 30 min。放入 AdCMVeNOS 中的为实验组, 放入 AdCMV 中的为对照组。游离两侧颈动脉各约 4 cm, 肝素化 (2 mg/kg)。而后取出转染后的静脉桥, 生理盐水冲洗 3 遍, 修剪血管两端成斜面, 先结扎一侧颈动脉, 在结扎的颈动脉两端纵行切开血管, 长度约静脉桥内径的 1.5 倍, 手术放大目镜下端一侧吻合, 7-0 滑线外翻连续缝合, 实验组静脉桥旁路吻合于右侧颈动脉, 对照组静脉桥吻合于左侧颈动脉。吻合期间, 间断用罂粟碱滴注血管吻合口。山羊清醒后 6 h 开始进食。术后两天内肌肉注射肝素 1 mg/kg, 1 次/6 h; 而后改口服肠溶阿司匹林 25 mg, 1 次/天; 术后三天肌肉注射 400 ku 青霉素, 2 次/天。术后 30 天处死山羊, 其中 6 只切取两侧静脉桥标本, 常规制作石蜡切片。另 4 只山羊无菌条件下取出静脉桥, 用于 $^3\text{H-TDR}$ 掺入量测定。

1.4 内皮型一氧化氮合酶基因在静脉桥的表达

将制作好的石蜡切片进行免疫组织化学染色, 采用 SABC 法, 严格按试剂盒方法操作。

1.5 静脉桥 $^3\text{H-TDR}$ 掺入量测定

无菌条件下取转染后 30 天的静脉桥切成小块, 放入盛有 DMEM 培养基的试管中, 加入 $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H-}$

TDR, 37°C 、5% CO_2 条件下孵育 24 h。然后甲酸消化 2 h 至血管透明。取消化液 200 μL 及闪烁液 6 mL 加入闪烁瓶中, 液体闪烁计数仪上测定放射性。

1.6 病理学观察及内膜厚度和管腔面积的测量

取石蜡切片, 分别进行 HE 和 VG 染色。镜下观察切片, 并测量内膜厚度和管腔狭窄面积百分数。内膜厚度以内弹力膜为界, 取其断面的 0、2、4、6、8 及 10 六个点测量内膜厚度, 再取六个点的平均值做为一个标本的内膜厚度。管腔狭窄面积百分数以血管内弹力膜为界, 测量原管腔面积 S_0 , 以新生内膜表面为界测量现有管腔面积 S_1 , 狭窄面积百分数 $(\%) = 100 \times (1 - S_1 \div S_0)$ 。

1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 内皮型一氧化氮合酶在静脉桥中的表达

免疫组织化学染色后, 实验组血管内皮细胞呈明显黄褐色, 为阳性改变(图 1, Figure 1)。

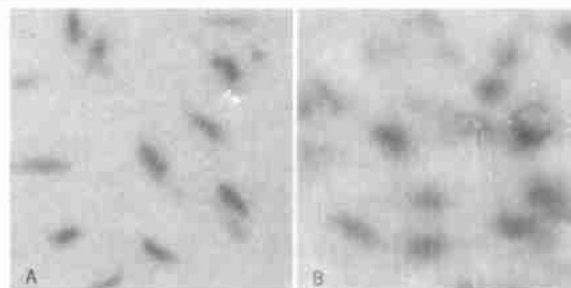


图 1. 静脉桥免疫组织化学染色 A 为对照组, B 为实验组。

Figure 1. Immunohistochemical staining in vein grafts ($\times 100$)

2.2 静脉桥 $^3\text{H-TDR}$ 掺入量

对照组为 487.7 ± 51.1 cpm/mg; 实验组为 140.8 ± 32.5 cpm/mg, 两组间比较有明显差异 ($P < 0.01$)。

2.3 静脉桥内膜的变化

转染 30 天后, 对照组内皮细胞增殖明显, 内膜增厚, 表面凹凸不平; 实验组内膜光滑, 内皮细胞轻度增殖(图 2, Figure 2)。

2.4 静脉桥血管内膜厚度和管腔面积

实验组静脉桥的内膜增生和管腔狭窄明显低于对照组(表 1, Table 1)。

3 讨论

许多在体和离体实验已经证明 eNOS 基因在血

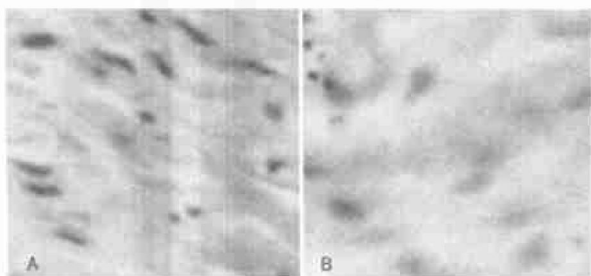


图 2. 静脉桥 HE 染色 A 为对照组, B 为实验组。

Figure 2. HE staining in vein grafts ($\times 100$)

表 1. 基因转染对静脉桥狭窄的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1. Effect of gene transfer on restenosis of vein grafts

分 组	平均内膜增生 厚度 (μm)	狭窄面积 百分数
实验组	28.8 ± 5.24^b	$23.6\% \pm 4.71\%^a$
对照组	125.7 ± 30.6	$52.18\% \pm 8.46\%$

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.001$, 与对照组比较。

管中可以有效的转染和表达^[47]。但是离体实验毕竟不能真实反映基因在体内的表达情况。而在体实验的动物模型都是采用球囊损伤动脉血管内皮的实验模型,与冠状动脉旁路移植的情况不同。本实验的动物模型模拟自体静脉做血管桥的冠状动脉旁路移植术。用羊做实验动物,是因为羊的颈动脉远较其他小动物如兔和鼠的粗,更接近于人的冠状动脉;血管吻合的精细程度亦与人的冠状动脉旁路移植术接近。另外,颈动脉离心脏较近,其血流变化也与冠状动脉相似。用山羊的两侧颈血管分别做实验组和对照组,抛去了个体的差异,使结果的对比性更强。采用体外转染体内表达的基因转移方式,既可以使 eNOS 基因能够在体内的环境下表达,又能控制基因转移的范围,避免其扩散到不相关的部位。

本实验中,免疫组织化学染色证明腺病毒介导的 eNOS 基因在静脉桥中转染 30 天后仍有功能表达。通过对静脉桥³H-TDR 掺入量的测定和病理学观察,对照组细胞的增殖明显高于实验组,对照组静脉桥内膜的厚度大于实验组,管腔面积小于实验组。这充分说明 eNOS 基因表达后可有效抑制静脉桥血管新生内膜的增生。

腺病毒介导的基因转移表达时间较短,可持续约 30 天。其原因之一是腺病毒不整合进宿主细胞的染色体组中^[8],在宿主细胞的增殖过程中逐渐丢失;另一方面,腺病毒所引起宿主的免疫反应可能是导致腺病毒载体表达短暂的另一关键因素^[9]。因

此,腺病毒介导的 eNOS 基因转染要应用于临床还面临几个问题需要解决:第一,腺病毒载体的表达时间短,但由于早期血栓形成是影响静脉桥通畅率的一个重要因素;另一方面,最初一个月是移植血管新生内膜增生的重要阶段,在此期间基因的表达同样能够有效抑血栓形成并制移植血管再狭窄的发生。第二,腺病毒载体进入人体后,由于细胞和体液的免疫反应所引起的排斥和炎症反应,可能会影响外源性基因在体内的作用^[10];另外,高效价的腺病毒也会对刺激血管新生内膜增生^[11]。第三, eNOS 基因在体内过度表达所产生的 NO 自由基过多,对组织的损害有可能会超过其有益的作用^[12]。

因此,在以后的实验研究中需要进一步发展和完善腺病毒载体,建立更为有效和安全的腺病毒载体系统,使 eNOS 基因治疗移植血管再狭窄在临床的应用成为现实。

[参考文献]

- [1] Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med*, 1993, **329**: 2002-2012
- [2] Vassalli G, Dichek DA. Gene therapy for arterial thrombosis. *Cardiovasc Res*, 1997, **35**: 459-469
- [3] FitzGibbon GM, Leach AJ, Keon WJ, Burton JR, Kafka HP. Coronary bypass grafts fate: angiographic study of 1,179 vein grafts early, one year, and five years after operation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1986, **91**: 773-778
- [4] Von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang L, Nakajima M, et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: In vivo transfer of endothelial nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 1137-1141
- [5] Kullo IJ, Mozes G, Schwartz RS, Gloviczki P, Tsutsui M, Katusic ZS, et al. Enhanced endothelium-dependent relaxations after gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to rabbit carotid arteries. *Hypertension*, 1997, **30**: 314-320
- [6] Cable DG, O'Brien T, Kullo IJ, Schwartz RS, Schaff HV, Pompili VJ. Expression and function of a recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in porcine coronary arteries. *Cardiovasc Res*, 1997, **35**: 553-559
- [7] Cable DG, O'Brien T, Schaff HV, Pompili VJ. Recombinant endothelial nitric oxide synthase-transduced human saphenous veins gene therapy to augment nitric oxide production in bypass conduits. *Circulation*, 1997, **96** (Suppl ③): 173-178
- [8] Lemarchand P, Jaffe HA, Danel C, Cid MC, Kleinman HK, Stratford-Perricaudet LD, et al. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant human alpha 1-antitrypsin cDNA to human endothelial cells. *PNAS USA*, 1992, **89**: 6482-486
- [9] Schneider MD, French BA. The advent of adenovirus gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation*, 1993, **88**: 1937-942
- [10] Ueno H, Li JJ, Tomita H, Yamamoto H, Pan Y, Kanegae Y, et al. Quantitative analysis of repeat adenovirus-mediated gene transfer into injured canine femoral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 2246-253
- [11] Newman KD, Dunn PF, Owens JW, Schulick AH, Vimani R, Sukhova G, et al. Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and neointimal hyperplasia. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 2955-965
- [12] Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*, 1992, **257**: 387-389

(此文编辑 文玉珊)