

内皮型一氧化氮合酶基因体内转染对大鼠颈总动脉损伤后血管狭窄程度的影响

盛 净, 蔡文玮, 王士强

(上海第二医科大学附属第九人民医院老年科, 上海市 200011)

[关键词] 分子生物学; 动脉损伤后血管狭窄; 基因转染; 颈总动脉内膜球囊损伤术; 内皮型一氧化氮合酶; 基因表达; 大鼠

[摘要] 目的 将内皮型一氧化氮合酶基因转染至球囊损伤后的大鼠颈总动脉中, 观察其对血管狭窄程度的影响。方法 将大鼠分为正常对照组、空白对照组、pcDNA3.1(-)组和内皮型一氧化氮合酶组。除正常对照组外均行颈总动脉内膜球囊损伤术, 术中采用脂质体载体 FuGENE 6 分别介导真核表达载体 pcDNA3.1-内皮型一氧化氮合酶和 pcDNA3.1(-)转染至损伤后的内皮型一氧化氮合酶组和 pcDNA3.1(-)组大鼠血管中。于术后 2 周处死大鼠, 以逆转录-聚合酶链反应法检测转染后体外培养的血管平滑肌细胞中内皮型一氧化氮合酶 mRNA 的表达, 并于术后 1 月和 2 月处死大鼠, 检测颈总动脉血管狭窄的程度。结果 2 周后转染 pcDNA3.1-内皮型一氧化氮合酶基因的血管平滑肌细胞中可以检测出内皮型一氧化氮合酶 mRNA 的表达, 1 月和 2 月后转染 pcDNA3.1-内皮型一氧化氮合酶基因的颈总动脉狭窄程度明显小于空白对照组和 pcDNA3.1(-)组 ($P < 0.01$)。结论 内皮型一氧化氮合酶基因体内转染可以在血管平滑肌细胞中成功表达, 且可以明显改善球囊损伤后颈总动脉狭窄的程度。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

The Influence of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Transfection in Vivo on the Stenosis Degree of the Injured Rats' Common Carotid Arteries

SHENG Jing, CAI Wen-Wei, and WANG Shi-Qiang

(Department of Geriatrics of Shanghai 9th People's Hospital Affiliated to Shanghai Second Medical University, Shanghai 200011, China)

[KEY WORDS] Vascular Stenosis; Gene Transfection; Intimal Catheter Surgery of the Common Carotid; Endothelial Nitric Oxide Synthase; Gene Expression; Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To transfect the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene into the rats' common carotid arteries injured by catheter, then to observe the influence of the transfection on the stenosis degree of the vessels. **Methods** 55 male Wistar rats of 3 months age were divided into normal control group ($n = 10$), blank control group ($n = 15$), pcDNA3.1(-) transfection group ($n = 15$) and eNOS transfection group ($n = 15$). 45 rats were accepted the intimal catheter surgery of the left common carotid except the normal control group. After operation, pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1-eNOS were transfected respectively into pcDNA3.1(-) and eNOS transfection groups by carrier of FuGENE 6. The rats were executed 2 weeks, 1 and 2 month after the operation, the transfected common carotid arteries were took out and stenosis degree of the arteries were measured.

Results The eNOS mRNA could be detected in cultured smooth muscle cell and the stenosis degree was significantly decreased in eNOS transfection group ($P < 0.01$).

Conclusions eNOS gene could be transfected in vivo into the smooth muscle cell successfully and the transfection also could obviously decrease the stenosis degree of the catheter injured arteries.

经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)是目前冠状动脉粥样硬化性心脏病的主要治疗措施之一,然而 PTCA 术后的高再狭窄率(30%~50%)严重限制其广泛应用^[1],虽然冠状动脉内支架植入术可以减少再狭窄的发生率,但其发生率仍在 15%~20%左右。研究

发现,PTCA 时由于内皮细胞受损,内皮源性一氧化氮(nitric oxide, NO)水平下降,导致血管内皮和平滑肌细胞功能障碍。本实验应用基因工程技术将内皮型 NO 合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)转染至球囊损伤后的 Wistar 大鼠颈总动脉血管平滑肌细胞中,观察大鼠血管狭窄程度的变化。

[收稿日期] 2004-07-11

[修回日期] 2005-03-10

[作者简介] 盛 净, 硕士, 主任医师, 从事老年心血管疾病研究, 联系电话为 021-63138341-5194, E-mail 为 shj60@163.net。蔡文玮, 硕士, 副主任医师, 从事老年内分泌疾病研究, 联系电话为 021-63138341-5193, E-mail 为 alonhuc@sohu.com。王士强, 研究员, 从事老年高血压研究, 联系电话为 021-63138341-5507, E-mail 为 wshq75@sohu.com。

1 材料与方法

1.1 质粒、试剂和仪器

真核表达载体 pcDNA3.1-eNOS 质粒由本实验室构建, 高效真核表达载体 pcDNA3.1(-) 由 Invitro-

gen 公司购得 (V795-20)。DMEM 培养基 (Gibco, USA)、胰蛋白酶 (GIBCOBRL)、胎牛血清 (FBS, HYCLONE, 美国)、绵羊血清 (自制)、单克隆鼠抗人平滑肌细胞 α actin 抗体 (DAKO 公司)、脂质体 FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemicals 公司)、PCR 引物由上海申能博彩生物工程公司合成、TRIzol RNA 抽提试剂盒 (GibcoBRL)、逆转录—聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒 (TaKaRa, Japanese)、GeneRuler™ 100 bp/1 kb DNALadder (Fermentas, MBI)、其余试剂均为进口分装或国产分析纯。动脉取血栓导管 (120602F 爱德华生命科学有限公司, 美国)、低温台式高速离心机 (Beckman, 美国)、紫外分光光度计 (BECKMAN DU-600 型, 美国)、PCR 仪 (Germany, Biometer)、倒置显微镜 (Olympus, 日本)、生物显微镜 (Nikon, 日本)、PCR 扩增仪 (Genius, 美国)、CO₂ 培养箱 (Napco, 美国)、低温高速离心机 (Beckman, 美国)、核酸分析仪 (Beckman, 美国)、GIS-2800 型凝胶图像处理系统 (上海天能科技公司)、电泳仪 (Hoeter, 美国)。

1.2 动物和分组

三月龄雄性 Wistar 大鼠 55 只, 体重 300 g 左右, 由中科院上海实验动物中心提供, 为清洁级动物。分为正常对照组 ($n=10$)、空白对照组 ($n=15$)、pcDNA3.1(-) 组 ($n=15$) 和 eNOS 组 ($n=15$)。

1.3 颈总动脉内膜球囊损伤后狭窄模型的建立

除正常对照组外, 45 只大鼠均施行颈总动脉内膜球囊损伤术。大鼠 (氯胺酮 40 mg/kg, 速眠新 1.0 mL/kg 肌肉注射) 麻醉后, 腹部向上固定于手术台上, 新洁尔灭消毒颈部皮肤, 然后由颈部正中切口进入, 逐层分离软组织, 分离出左颈总动脉、左颈内、外动脉, 结扎左颈内动脉, 从左颈外动脉置入 2F 取栓导管至颈总动脉处, 球囊内注入生理盐水以扩张球囊, 向远心端牵拉导管剥脱内膜, 抽去生理盐水, 再送向近心端, 重复上述操作 3 次, 然后撤出导管。

1.4 FuGENE 6 介导全 pcDNA3.1-内皮型一氧化氮合酶的体内转染

采用脂质体载体 FuGENE 6 介导真核表达载体 pcDNA3.1-eNOS 和空载 pcDNA3.1(-) 分别转染 eNOS 组和 pcDNA3.1(-) 组。在无菌离心管中先加入 PBS, 取适量的脂质体 FuGENE 6 加入离心管中并混匀, 按 FuGENE 6 与质粒之比为 3:1 (体积与质量之比) 的比例分别加入 pcDNA3.1-eNOS 和 pcDNA3.1(-) 质粒并混匀, 室温孵育 30 min。在大鼠颈总动脉被球囊导管剥脱撤出导管后, 活结结扎近心端的颈总动脉, 从导管入口处注入混匀后的转染液, 保留

灌注 30 min 后, 血管再通, 然后缝合伤口, 继续饲养。

1.5 血管平滑肌细胞培养与鉴定

正常对照组、空白对照组、pcDNA3.1(-) 组和 pcDNA3.1-eNOS 组各 5 只在施行手术 2 周后全部处死, 取出左颈总动脉在无菌条件下将血管内血块冲洗干净, 纵向剖开血管, 剪成 1 mm² 的小组织块, 平铺于培养皿中央, 以少量 DMEM 条件培养基 10% 胎牛血清、DMEM 培养基、37℃ 5% CO₂ 环境中培养使贴壁, 24 h 后再加入部分培养基继续培养, 每周换液 2 次。细胞生长增殖形成单层细胞, 镜下观察 90% 汇合后, 加入胰酶消化, 然后在 37℃ 5% CO₂ 环境中继续传代培养。应用单克隆鼠抗人平滑肌细胞 α actin 抗体 (DAKO 公司) 将培养至第 3 代的平滑肌细胞作 α actin 鉴定。该抗体只与血管平滑肌细胞中 actin 的 α 异构体特异性结合, 而与成纤维细胞中的 β 、 γ -actin 则不能结合, 因而可以作为血管平滑肌细胞的鉴定。

1.6 逆转录—聚合酶链反应

大鼠手术二周后, 每组各取 5 只大鼠处死, 取其左颈总动脉, 进行平滑肌细胞培养至第 3 代, 应用 TRIZOL 抽提细胞总 RNA, 取 1 μ g 总 RNA, 加 2 μ L 10 \times 逆转录缓冲液, 4 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 2 μ L Oligo dT-Adaptor Primer, 0.5 μ L RNA 酶抑制剂, 1 μ L AMV 逆转录酶, 加水补足至 20 μ L 体系, 按以下条件行逆转录反应: 37℃ 10 min \rightarrow 42℃ 1 h \rightarrow 99℃ 5 min \rightarrow 5℃ 5 min。反应结束后取逆转录产物 3 μ L 用于聚合酶链反应扩增 eNOS 目的基因, PCR 反应条件: dNTP 0.6 μ L, 2 μ L 10 \times 逆转录缓冲液, 1.2 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), TaKaRa Taq™ 酶 0.25 μ L, eNOS 上下游引物各 0.3 μ L, 补足水至 20 μ L, 按下述参数进行 PCR 反应: 95℃ 3 min \rightarrow 95℃ 1 min \rightarrow 55℃ 1 min \rightarrow 72℃ 1 min, 36 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min, 取 5 μ L PCR 产物上样于 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳鉴定, 70 V 1.5 h。天能凝胶图像处理系统摄片保存。引物序列: 人 eNOS (450 bp) 上游引物 5'-CCT GAG CAG CTG CTG A-3', 下游引物 5'-AAT GCA GAG CTC GGT GA-3'。如果细胞中存在 eNOS mRNA, 则在聚合酶链反应结束后, 将反应产物进行电泳时在 450 bp 附近会出现阳性条带; 反之则为阴性结果。

1.7 颈总动脉血管狭窄程度的测定

pcDNA3.1(-) 组和 pcDNA3.1-eNOS 组大鼠在施行手术后继续饲养, 分别于手术后 1 月和 2 月各取 5 只处死, 处死前 20 min 每只大鼠先从尾静脉注入 Evans Blue 15 mg 溶解于 0.5 mL 生理盐水中以标

记左颈总动脉的损伤处, 取其左颈总动脉立即放入 4% 多聚甲醛中固定, 然后进行石蜡包埋, 以 8 μ m 距离行横断面切片, 然后进行 HE 染色和 Verhoeff 铁苏木精染色, 中性树脂封片后, 显微镜下观察。每个样本选取 3 张切片, 在计算机上应用 Image 45 pro 分析程序测定血管内膜的厚度。

1.8 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据检验用 SPSS 11.0 统计分析软件分析。

2 结果

2.1 平滑肌细胞的鉴定

所有经组织块贴壁法培养的 4 组平滑肌细胞经应用单克隆鼠抗人平滑肌细胞 actin 抗体鉴定, 均被证实为平滑肌细胞。

2.2 各组平滑肌细胞中内皮型一氧化氮合酶 mRNA 表达的比较

重组真核表达载体 pcDNA3.1-eNOS 经 FuGENE 6 介导体内转染损伤后血管平滑肌细胞, 经 PCR 检测发现, 在每只重组 pcDNA3.1-eNOS 质粒体内转染的大鼠中, 均能在其体外培养的损伤后血管平滑肌细胞中高效表达 eNOS mRNA, 而体内对照组及空载 pcDNA3.1(-) 体内转染组则无 eNOS mRNA 的表达 (图 1, Figure 1)。这表明重组 pcDNA3.1-eNOS 质粒体内转染平滑肌细胞后可以获得 eNOS 在 mRNA 水

平的有效表达。

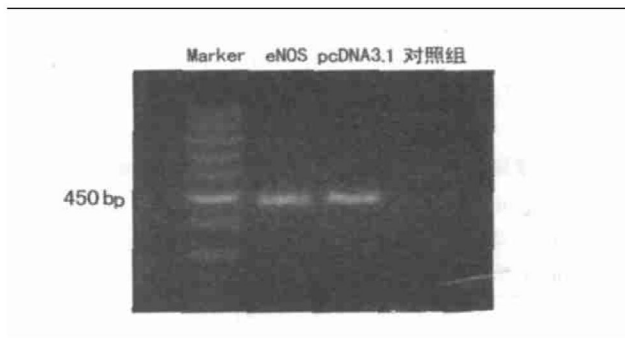


图 1. pcDNA3.1-内皮型一氧化氮合酶体内转染的聚合酶链反应结果

Figure 1. PCR results after the gene transfection in vivo by pcDNA3.1-eNOS

2.3 内皮型一氧化氮合酶 cDNA 基因转染对大鼠颈总动脉损伤后狭窄的影响

正常对照组中动脉内膜无增厚。PTCA 术后 1 月 pcDNA3.1-eNOS 基因体内转染组与空白对照组及 pcDNA3.1(-) 基因体内转染组血管内膜的增厚程度之间差异有显著性 ($P < 0.01$) (图 2A, Figure 2A)。PTCA 术后 2 月 pcDNA3.1-eNOS 基因体内转染组与空白对照组及 pcDNA3.1(-) 基因体内转染组血管内膜的增厚程度之间差异有显著性 ($P < 0.01$) (图 2B, Figure 2B)。

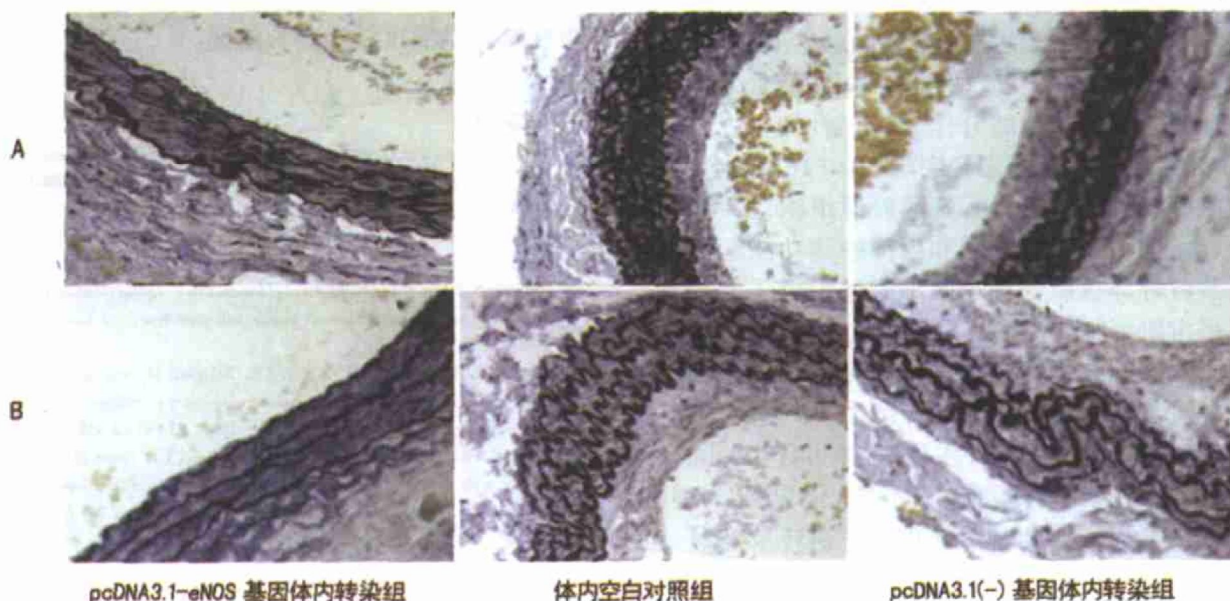


图 2. 一氧化氮合酶 cDNA 基因转染对各组大鼠球囊损伤术后动脉内膜的影响 ($\times 400$)

Figure 2. The influence of nitric oxide synthase gene transfection on the injured rats' carotid arteries after intimal catheter surgery

从表 1(Table 1) 可见, 体内 eNOS 组的血管狭窄程度显著低于体内空白对照组和空载 pcDNA3. 1 (-) 组 ($P < 0.01$), 而后二者之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表 1. 球囊损伤术后各组大鼠狭窄血管管壁增厚程度的比较 ($\bar{x} \pm s$, μm)

Table 1. The comparison of the vascular stenosis degree after catheter injury

分 组	n	术后 1 月	术后 2 月
正常对照组	5	47.7 \pm 2.9	47.7 \pm 2.9
空白对照组	10	110.9 \pm 11.4 ^a	166.9 \pm 13.9 ^a
pcDNA3. 1-eNOS 基因转染组	10	75.9 \pm 3.9 ^{ab}	79.7 \pm 9.5 ^{ab}
pcDNA3. 1(-) 基因转染组	10	112.4 \pm 10.0 ^a	166.7 \pm 12.1 ^a

a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b: $P < 0.01$, 与空白对照组和 pcDNA3. 1(-) 基因转染组比较。

3 讨论

正常状态下, 血管内皮细胞层完整, 其内含有的 eNOS 催化 L-精氨酸生成 NO。NO 弥散至周围的血管平滑肌细胞中, 激活可溶性鸟苷酸环化酶, 使 GTP 转化为 cGMP, 从而介导了血管的松弛效应, NO 的其他生物学效应还包括抑制血小板粘附和平滑肌细胞的增殖与迁移^[2]。完全分化的平滑肌细胞其增殖和迁移的潜能较小, 而合成表型的平滑肌细胞发生退化, 从而较易发生增殖和迁移。内皮衍生的 NO 可以诱导 cGMP 依赖的血管舒张并抑制平滑肌细胞的增殖、迁移及细胞外基质的形成^[3], 同时 NO 还可以刺激血管平滑肌细胞的分化, 其机制可能也是通过 cGMP 依赖的蛋白激酶途径实现的。PTCA 使血管壁内皮细胞剥落, 中层损伤, 暴露胶原组织, 引起炎症反应、血管收缩、血栓形成和内皮细胞功能紊乱, 不仅导致各种抑制血管平滑肌细胞增殖因子的缺失, 造成平滑肌细胞增殖的大环境, 而且激活了引起血管平滑肌细胞分裂和迁移的多种信号传递途径^[4]。文献[5]报道在 PTCA 术后内皮源性 NO 生成是减少的。基因转染的方式有许多种, 大体可分为: 非病毒介导的基因转染——脂质体介导法、化学法、物理法等和以病毒为载体的基因转染——逆转录病毒、腺

病毒等介导方法。其中逆转录病毒具有相对较高的 DNA 整合率, 可较长时间地表达目的基因, 但可转染的 DNA 片段较小, 且经包装后可用于转染的病毒浓度较低, 限制了它的应用。与重组逆转录病毒比较, 腺病毒的病毒滴度较高, 而且可转染分化细胞, 然而其缺陷是具有较大的毒性, 易引起机体的免疫反应, 从而影响转染效果。脂质体可以用于各种组织细胞, 其主要优点是对基因片段大小的限制较少, 而且转导细胞相对无害, 重复性好, 因此目前脂质体被认为是有效的体内转染载体之一, 由于 PTCA 术后再狭窄有一个时效的问题, 因此我们应用无抗原性、安全高效的脂质体 Eugene 6 为载体, 来介导 pcDNA3. 1-eNOS 基因的转染。

本实验将 eNOS 基因转染于球囊损伤后的大鼠颈总动脉平滑肌细胞中, 在转染后 2 周, 每只转染了 pcDNA3. 1-eNOS 基因的大鼠其体外培养的血管平滑肌细胞在 mRNA 水平上均能测出 eNOS 基因的充分表达, 这可能是由于在转染中采用了含饱和浓度 pcDNA3. 1-eNOS 质粒的转染液, 同时也说明采取保留灌注的转染方法是成功的, 转染后的 eNOS 基因在大鼠的平滑肌细胞中得到了成功的表达。另外, 转染了 eNOS 基因的大鼠在继续饲养 1~2 个月后处死, 发现其颈总动脉在球囊损伤后动脉血管壁的狭窄程度较未转染者及 pcDNA3. 1(-) 转染者均显著减少 ($P < 0.01$), 说明应用脂质体 Eugene 6 介导 pcDNA3. 1-eNOS 基因的体内转染不仅成功表达, 而且发挥了抗狭窄作用, 这为临床上防治 PTCA 术后再狭窄提供了可靠的实验依据。

[参考文献]

- [1] Horlitz M, Sigwart U, Niebauer J. Fighting restenosis after coronary angioplasty: contemporary and future treatment options. *Int J Cardiol*, 2002, **83** (3): 199-205
- [2] Gattullo D, Pagliaro P, Marsh NA, Losano G. New insights into nitric oxide and coronary circulation. *Life Sci*, 1999, **65** (21): 2 167-174
- [3] Boerth NJ, Dey NB, Cornwell TL, Lincoln TM. Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates vascular smooth muscle cell phenotype. *J Vasc Res*, 1997, **34** (4): 245-259
- [4] Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, von der Leyen H, Zhang L, et al. Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense cdk 2 kinase oligonucleotides. *J Clin Invest*, 1994, **93** (4): 1 458-464
- [5] Chang MW, Barr E, Seltzer J, Jiang YQ, Nabel GJ, Nabel EG, et al. Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. *Science*, 1995, **267** (5197): 518-522

(此文编辑 朱雯霞)