

[文章编号] 1007-3949(2006)14-07-0569-04

·实验研究·

脱氢表雄酮对氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞中血管细胞粘附分子 1 表达的影响

胡晓静, 阮秋蓉, 朱敏, 瞿智玲

(华中科技大学同济医学院基础医学院病理学系, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 脱氢表雄酮; 氧化型低密度脂蛋白; 血管平滑肌细胞; 血管细胞粘附分子 1

[摘要] 目的 探讨脱氢表雄酮对氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞分泌血管细胞粘附分子 1 的影响。方法 用脱氢表雄酮(5 μ mol/L)作用于氧化型低密度脂蛋白(50 mg/L)诱导的体外培养的 SD 大鼠血管平滑肌细胞,采用免疫细胞化学、免疫蛋白印迹法、逆转录聚合酶链反应检测其血管细胞粘附分子 1 蛋白及 mRNA 的表达。结果 当细胞培养基中加入氧化型低密度脂蛋白后,血管平滑肌细胞血管细胞粘附分子 1 的分泌明显升高($P < 0.05$),而同时加入脱氢表雄酮可使血管细胞粘附分子 1 的分泌降低($P < 0.05$)。结论 脱氢表雄酮能够抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞血管细胞粘附分子 1 的分泌,而且可能是脱氢表雄酮抗动脉粥样硬化的机制之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Dehydroepiandrosterone on Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein in Vascular Smooth Muscle Cells

HU Xiaojing, RUAN Qiu-Rong, ZHU Min, and QU Zhiling

(Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Dehydroepiandrosterone; Oxidized Low Density Lipoprotein; Vascular Smooth Muscle Cells; Vascular Cell Adhesion Molecule-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of dehydroepiandrosterone (DHA) on expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in vascular smooth muscle cells (VSMC).

Methods In vitro cultured VSMC from sprague dawley rat induced by ox-LDL (50 mg/L) were effected by DHA (5 μ mol/L).

The expressions of VCAM-1 protein and mRNA were determined by immunocytochemistry, Western blot analysis and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results Ox-LDL stimulation significantly induced VCAM-1 expression in VSMC ($P < 0.05$). When DHA was added into the medium simultaneously, ox-LDL inducing VCAM-1 expression was obviously decreased ($P < 0.05$).

Conclusions DHA showed inhibiting effects on ox-LDL-induced VCAM-1 expression in VSMC. That may be one of the mechanisms of antiatherosclerotic effect of DHA.

临床流行病学研究发现血浆脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHA)水平与男性冠心病发病呈负相关^[1],动物实验证实 DHA 可抑制高脂血症动物模型动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发展^[2],但关于 DHA 作用机制还不清楚。而血管细胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 通过与其相应配体作用,促使单核细胞在血管内皮下聚集,

吞噬脂质形成泡沫细胞,从而在 As 发生发展过程中具有重要作用,DHA 能否通过抑制单核细胞局部募集过程中重要趋化因子 VCAM-1 表达来减少 As 脂纹的面积,目前尚未见报道。本研究拟从细胞水平研究 DHA 对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)分泌 VCAM-1 的影响,从而探讨其抗 As 可能机制。

[收稿日期] 2005-07-20 [修回日期] 2006-06-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30300135),湖北省自然科学基金资助(2005ABA167)

[作者简介] 胡晓静,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化发病机制,E-mail 为 steffi4017@hotmail.com。通信作者阮秋蓉,教授,博士生导师,主要从事动脉粥样硬化发病机制及防治的研究,E-mail 为 ruanqiu-rong@sina.com。朱敏,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化发病机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

胎牛血清、M199 培养基、DMEM/F12 培养基购自 Gibco 公司;低密度脂蛋白(low density lipoprotein,

LDL) 购自 Sigma 公司; DHA 购自 Fluka 公司; 羊抗大鼠 VCAM-1 多克隆抗体、SP 法免疫组织化学试剂盒购自北京中山公司; VCAM-1 引物和 Trizol 购自 Invitrogen 公司, M-MLV 逆转录酶和 Olig(dT) 购自 Promega 公司。

1.2 血管平滑肌细胞的原代培养与分组

取 4~6 周龄雄性 SD 大鼠(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供), 断头处死后, 无菌条件下打开胸腔, 取出胸主动脉, 于 PBS 中剥去外膜, 刮下内膜, 贴壁法培养 VSMC。培养基为含 10% 胎牛血清、0.03% 谷胺酰胺的 $1 \times$ M199 培养基, 光镜以及相差显微镜下观察细胞呈梭形, 生长至汇合状态时呈现特有的峰与谷特点, 同时, 运用免疫组织化学特异抗 α actin 单抗鉴定 VSMC。细胞纯度达 95% 以上, 第 3~4 代细胞用于实验。按实验设计将培养细胞分 4 个组: 正常对照组换为无血清 DMEM/F12 培养基; ④ox-LDL 刺激组为无血清 DMEM/F12 培养基 + 50 mg/L ox-LDL; ④ox-LDL + DHA 组为无血清 DMEM/F12 培养基 + 50 mg/L ox-LDL + 5 μ mol/L DHA; DHA 组为无血清 DMEM/F12 培养基 + 5 μ mol/L DHA, 以上各组均用药物作用 24 h。

1.3 氧化型低密度脂蛋白的制备与鉴定

Sigma 公司购得的 LDL 粉剂用 PBS 溶为 1.6 g/L 浓度的溶液, LDL 的体外氧化修饰采用 Cu^{2+} 介导法, 制备本实验中的 ox-LDL 时所用 Cu^{2+} 浓度为 10 μ mol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中孵育 24 h, 并以 0.5 mmol/L 浓度的依地酸二钠透析 24 h 终止氧化, 去除 Cu^{2+} 和可溶性的过氧化产物。用琼脂糖电泳和硫代巴比妥酸反应物质的量测定 LDL 的修饰程度。浓缩过滤后避光保存待用。用 Lowry 法进行蛋白质定量检测。

1.4 免疫细胞化学

在各组培养瓶内预先放置洗净的盖玻片, 将生长至汇合状态的 VSMC 用胰酶消化法进行传代接种于内。待长满时, 按上述分组加入不同药物, 继续孵育 24 h, 用 1:1 乙醇+ 丙酮固定, 自然风干后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。采用 SP 法, 用山羊抗大鼠 VCAM-1 多克隆抗体和相应的免疫细胞化学检测试剂盒进行细胞化学染色, 采用 HPIAS-1000 高清晰度图像处理系统, 对各组细胞片进行图像分析, 用细胞内棕黄色阳性颗粒的平均吸光度值(A 值) 代表各组细胞 VCAM-1 蛋白的含量。

1.5 免疫蛋白印迹法

提取各组 VSMC 的蛋白, 用 Lowery 法测定样品蛋白的浓度, 然后在 7.5% SDS-PAGE 凝胶上电泳

分离, 再将蛋白转移至硝酸纤维膜上, 室温振荡封闭后, 加入山羊抗大鼠 VCAM-1 多克隆抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。充分洗涤后, 滴加辣根过氧化物酶标记的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。充分洗涤后, 加入 ECL 反应体系, 曝光, 显影。用英国 UVP 公司 GDS8000 型凝胶成像系统及 HPIAS-1000 彩色图像分析系统检测硝酸纤维膜上蛋白质条带的积分吸光度值(A 值)。

1.6 逆转录聚合酶链反应

用 Trizol 一步法提取各组 VSMC 的 RNA, 每组取 4 μ g 总 RNA 逆转录成为 cDNA 后, 取 1 μ L DNA 产物进行 PCR 循环。反应体系为 20 μ L, 10 \times Tag 酶 buffer 2 μ L, DNTP 0.4 μ L, 上、下游引物各 0.4 μ L, MgCl_2 1.2 μ L, Tag 酶 0.2 μ L, 模板 1 μ L, 剩余用无菌的三次蒸馏水补足。VCAM-1 引物序列如下: 正义为 5' CGG TCA TGG TCA AGT GIT TG 3'; 反义为 5' GAG ATC CAG GGG AGA TGT CA 3', 预计扩增产物长度 570 bp。内参照 β -actin 引物序列: 正义为 5' CGT TGA CAT CCG TAA AGA 3'; 反义为 5' AGC CAC CAA TC2 CAC ACA G 3', 预计扩增产物长度 173 bp。反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min \rightarrow 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 32 次循环, 末次循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 5 min。取 10 μ L 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外线下扫描记录电泳结果。继用 SQ9636 型扫描系统扫描, HPIAS-1000 型图像分析系统检测各组目的基因及内参照的积分吸光度值(A 值), 并以两者比值作为各组 mRNA 的相对表达量。

1.7 统计学分析

实验数据使用 SPSS v13.0 软件处理, 各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), 组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管细胞粘附分子 1 蛋白的表达

2.1.1 免疫细胞化学法 各组 VSMC 均有 VCAM-1 蛋白表达。阳性信号为细胞内棕黄色粗细不均匀的颗粒。与正常对照组(图 1A) 相比, ox-LDL 刺激组 VCAM-1 蛋白表达明显增强($P < 0.01$), 表现为细胞着色明显加深(图 1B); 与 ox-LDL 刺激组相比, ox-LDL + DHA 组 VCAM-1 蛋白表达明显受到抑制($P < 0.01$), 表现为着色明显变浅(图 1C); DHA 组(图 1D) 与正常对照组相比差异无显著性($P > 0.05$, 表 1)。

2.1.2 免疫蛋白印迹法 各组 VSMC 均有 VCAM-1 蛋白的表达(图 2)。与正常对照组相比, $\alpha\omega$ -LDL 能明显诱导 VCAM-1 蛋白的表达 ($P < 0.01$); 与 $\alpha\omega$ -LDL 刺激组相比, $\alpha\omega$ -LDL+ DHA 组 VCAM-1 蛋白表达明显受到抑制 ($P < 0.01$); DHA 组与正常对照组差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 1. 免疫细胞化学法检测各组血管平滑肌细胞血管细胞粘附分子 1 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

| 分 组 | 平均吸光度值 |
|----------------------------|------------------------------------|
| 正常对照组 | 0.086 7 \pm 0.018 1 |
| $\alpha\omega$ -LDL 刺激组 | 0.251 9 \pm 0.027 9 ^a |
| $\alpha\omega$ -LDL+ DHA 组 | 0.179 1 \pm 0.021 8 ^b |
| DHA 组 | 0.096 1 \pm 0.013 4 |

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与氧化型低密度脂蛋白刺激组比较。

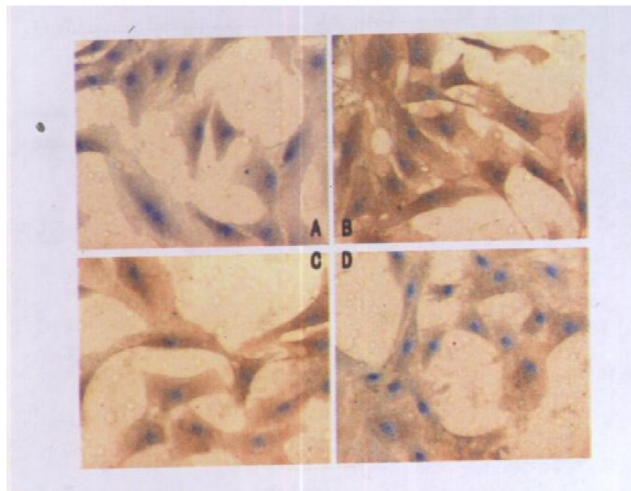


图 1. 免疫细胞化学法示各组血管平滑肌细胞表达血管细胞粘附分子 1 的变化 (10 \times)

表 2. 免疫蛋白印迹法检测各组血管平滑肌细胞血管细胞粘附分子 1 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

| 分 组 | 积分吸光度值 |
|----------------------------|-----------------------------|
| 正常对照组 | 1 105 \pm 71 |
| $\alpha\omega$ -LDL 刺激组 | 1 920 \pm 97 ^a |
| $\alpha\omega$ -LDL+ DHA 组 | 1 148 \pm 71 ^b |
| DHA 组 | 1 013 \pm 109 |

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与氧化型低密度脂蛋白刺激组比较。

2.2 血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达

用美国 Invitrogen 公司的 Trizol reagent 提取的各组平滑肌细胞总 RNA 经核酸蛋白仪纯度鉴定, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值范围在 1.6~ 2.0 之间, 经琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色紫外灯下观察可见清晰的

RNA 条带(图 3), 据 DNA Marker 显示为 570 bp 的 VCAM-1 条带和 173 bp 的内参条带。根据电泳结果发现, 各组细胞均表达 VCAM-1 mRNA, $\alpha\omega$ -LDL 刺激组 mRNA 表达明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 而 $\alpha\omega$ -LDL+ DHA 组其 mRNA 表达则有所下降 ($P < 0.05$), DHA 组与正常对照组 mRNA 表达差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 3)。

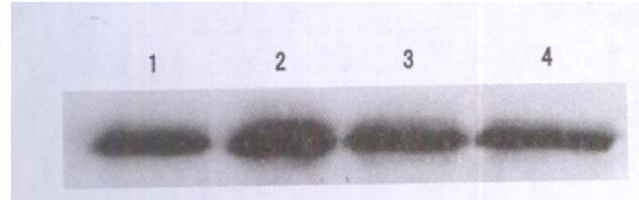


图 2. 免疫蛋白印迹法检测血管平滑肌细胞中血管细胞粘附分子 1 蛋白表达 1 为正常对照组; 2 为氧化型低密度脂蛋白刺激组; 3 为氧化型低密度脂蛋白+ 脱氢表雄酮组; 4 为脱氢表雄酮组。

表 3. 逆转录聚合酶链反应检测各组血管平滑肌细胞血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

| 分 组 | VCAM-1/ β -actin |
|----------------------------|------------------------------------|
| 正常对照组 | 0.480 6 \pm 0.028 6 |
| $\alpha\omega$ -LDL 刺激组 | 1.999 3 \pm 0.108 9 ^a |
| $\alpha\omega$ -LDL+ DHA 组 | 1.746 8 \pm 0.0514 ^b |
| DHA 组 | 0.532 4 \pm 0.070 8 |

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与氧化型低密度脂蛋白刺激组比较。

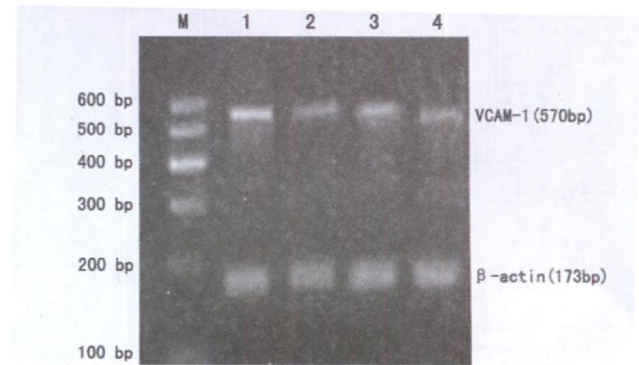


图 3. 逆转录聚合酶链反应产物电泳结果 M 为相对分子质量, 1 为氧化型低密度脂蛋白组, 2 为正常对照组, 3 为氧化型低密度脂蛋白+ 脱氢表雄酮组, 4 为脱氢表雄酮组。

3 讨论

动脉粥样硬化(As)是引起心、脑血管疾病的重要因素, 其发病率和病死率均位居前列, 因此, 其发病机制已越来越多地引起人们的关注。已有大量研究表明, As 是一种多因素、多基因引起的复杂的慢性炎症性疾病, 涉及损伤的内皮细胞与单核巨噬细

胞、平滑肌细胞之间的相互作用,以及局部产生的大量细胞因子、生长因子的网络调控,其中粘附分子、趋化因子、生长因子等在As发生发展过程中具有重要作用。ox-LDL可能通过调节多种细胞因子和生长因子的分泌,而发挥促As形成的作用,是普遍承认的致As的重要因素。DHA的化学名称为3 β -羟基雄甾-5-烯-17-酮,是由肾上腺皮质细胞合成的C19肾上腺甾类化合物。它是一种弱雄激素,是血清中含量最多的一类类固醇激素,其在血浆中的浓度在青春期达高峰,而后随年龄的增加而迅速递减。虽然体内许多激素水平都随年龄的增长而发生变化,但DHA水平的变化最为明显,因此被称为“青春激素”^[3]。许多研究发现DHA与许多老年性疾病关系密切。另外,近年来研究发现DHA在抗As方面也发挥重要作用。临床流行病学研究显示,As以及由此引发的心、脑血管意外的发生与血浆中低水平的DHA有密切关系^[4]。Furutama等^[5]发现DHA可通过抗细胞分裂、抑制细胞增殖而达到抗As的作用。在培养的人脐静脉内皮细胞中加入不同浓度的DHA后,随着DHA浓度的增加,超氧化物歧化酶水平上升,而丙二醛含量降低,提示DHA可以减轻内皮细胞过氧化损伤,增加血管内皮细胞的抗氧化能力,从而抗As^[6]。Bednarek等^[7]也发现,DHA可减少高胆固醇喂饲兔的动脉壁脂纹的面积,而且这种作用并不依赖于血脂水平的改变,说明DHA可在体内抑制As的发生发展,但是关于它的作用机制尚不清楚。

本实验以ox-LDL作为刺激因素造成体外As模

型,通过细胞水平来观察DHA对As发生过程中平滑肌细胞中VCAM-1水平表达的影响,来阐明DHA作用的可能机制。结果发现,50 mg/L的ox-LDL作用于VSMC 24 h后,可显著促进VCAM-1蛋白及mRNA的表达,而同时给予DHA可显著降低VCAM-1蛋白和mRNA的表达。另外,DHA组与正常对照组VCAM-1的表达差异无显著性,表明DHA单独存在时对VSMC中VCAM-1的表达无明显影响。由此我们推断DHA可能通过抑止VSMC中VCAM-1的表达而发挥抗As作用。

[参考文献]

- [1] Herrington DM. DHEA and coronary atherosclerosis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, **774** (2): 2 717-722
- [2] Eich DM, Nestler JE, Johnson DE, Dworkin GH, Ko D, Wechsler AS, et al. Inhibition of accelerated coronary atherosclerosis with dehydroepiandrosterone in the netrotropic rabbit model of cardiac transplantation [J]. *Circulation*, 1993, **84** (1): 261-269
- [3] Zdrojewicz Z, Ciszko B. Dehydroepiandrosterone (DHEA)-structure, clinical importance and the role in human body [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2001, **55** (6): 835-854
- [4] Vatalas IA, Diony-Asteriou A. Adrenal C19 steroids and lipoprotein levels in healthy men [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2001, **1** (6): 388-393
- [5] Furutama D, Fukui R, Amakawa M, Ohsawa N. Inhibition of migration and proliferation of vascular smooth muscle cells by DHEA sulfate [J]. *Biophys Acta*, 1998, **1403** (1): 107-114
- [6] 赵志明, 黄志新, 王晶, 郝亚荣, 李庚山. 去氢表雄酮对培养的人脐静脉血管内皮细胞抗氧化能力的影响[J]. *医学新知杂志*, 2001, **11** (2): 76-77
- [7] Bednarek-Tupikowska G, Gosk I, Szuba A, Bohdanowicz PA, Kosowska B, Bidzinska B, et al. Influence of dehydroepiandrosterone on platelet aggregation, superoxide dismutase activity and serum lipid peroxide concentration in rabbits with induced hypercholesterolemia [J]. *Med Sci Monit*, 2000, **6** (1): 40-45

(此文编辑 许雪梅)

• 征稿征订 •

《中华现代影像学杂志》稿约

《中华现代影像学杂志》为中华临床医药学会主办的影像专业学术刊物。本刊为月刊,具有ISSN/CN标准刊号,ISSN 1681-2824 CN 98-2821/R。被《中文生物医学期刊文献数据库》、国家科技部《中文科技期刊数据库》、中华首席医学网等收录,国内外读者均可以在中华首席医学网(www.shouxi.net)免费阅读杂志全文。

主要栏目:论著、综述、影像论坛、影像教育(影像管理)、影像与医学伦理、误诊分析、病例报告、经验交流、CT专栏、肿瘤与影像、影像维修、影像与介入治疗、影像与临床等。

本刊欢迎如下稿件:

1、反映X线诊断学、CT、MRI、DSA、介入放射学、超声检查新技术、超声介入治疗、核医学新技术、PET的临床应用、热成像、内镜、远程医学会诊、医学影像网络建立与发展、计

算机辅助诊断、影像科室数字化管理等专业及学科发展方向的论著、综述及述评等。

2、反映21世纪医学影像技术的发展远景,我国医学影像技术当前热点问题,医学影像技术临床及实验研究报告。

本刊发表周期短,免收审稿费。论文发表后颁发论文证书。对省部级以上部门科研基金资助项目的论文优先刊登。欢迎投稿!

投稿邮箱:北京市海淀区83-106信箱《中华现代影像学杂志》编辑部

邮编:100083 E-mail:xdyingxiang@sohu.com

电话:010-62228937 传真:010-62221930

网址:www.shouxi.net&www.cmmj.net

网络实名:首席医学网

冠状动脉支架固定化抗体携带基因和靶向基因投递

金旭¹, 宋存先¹, Robert J Levy², Bruce D Klugherz², Suzanne DeFelicce²

(1. 中国协和医科大学 中国医学科学院生物医学工程研究所, 天津市 300192;

2. 费城儿童医院心血管研究所, 宾夕法尼亚州 19104, 美国)

[关键词] 生物医学工程学; 支架载基因治疗血管再狭窄; 基因治疗; 载体; 抗体; 再狭窄; 腺病毒

[摘要] 目的 通过化学和免疫学双重偶联, 构建支架结合基因的血管内基因转运体系, 评价其可行性及效果。方法 采用双官能偶联剂 N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶二硫基) 丙酸酯将特异性抗腺病毒六位体 (Fab) 2' 片段以化学键结合在胶原涂层的支架上, 编码绿色荧光蛋白的腺病毒作为报告基因载体, 通过免疫作用连接在结合了 (Fab) 2' 的支架上, 分别在体外和体内实验中验证其效果。结果 体外实验结果发现, 实验组支架胶原涂层的表面有大量编码绿色荧光蛋白的腺病毒转染的细胞浸润生长, 与支架接触的培养皿表面生长的细胞转染率高达 92.8% ± 2.5%, 而未与支架直接接触的周边细胞几乎没有被转染。转染率与编码绿色荧光蛋白的腺病毒的反应用量在 10⁷ ~ 10¹⁰ 病毒粒子范围内呈直线关系, 有明显的量效对应性。猪冠状动脉支架植入实验中, 回收的支架上和与支架接触的血管组织内有广泛的绿色荧光蛋白表达, 血管组织中总的转染率占细胞总数的 5.9% ± 1.1%, 转染细胞主要集中在新生内膜 (> 17%) 和中膜 (> 7%), 外膜几乎没有转染。远隔器官 (肺、肝、肾) 和下冠冠状动脉样本未见绿色荧光蛋白 DNA 表达。结论 通过化学偶联的方法在支架上固定抗腺病毒特异性抗体结合腺病毒的基因转运体系可局部靶向、高效地进行血管内介入性基因转运。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

Gene Delivery System Based on Antibody Immobilized Coronary Stent for Intravascular Site-Specific Gene Therapy

JIN Xu¹, SONG CUNXIAN¹, Robert J Levy², Bruce D Klugherz², and Suzanne DeFelicce²

(1. Institute of Biomedical Engineering, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China; 2. The Division of Cardiology, Children's Hospital of Philadelphia, PA 19104, USA)

[KEY WORDS] Gene Therapy; Vector; Antibody; Restenosis; Adenovirus; Stent

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the possibility and efficiency of stent-based gene delivery system using antibody-tethered adenoviral vector. **Methods** Stents were formulated with a collagen coating. An anti-adenoviral monoclonal antibodies' (Fab) 2' were covalently bound to the collagen surface by reactions with a bifunctional cross linker N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP). These antibodies enabled tethering of replication defective adenovirus encoding green fluorescent protein (Ad-GFP). The function of this novel stent based on gene delivery system was evaluated in cell culture and in animal test.

Results Gene delivery from stents carrying antibody-tethered Ad-GFP demonstrated efficient, site-specific and highly localized Ad-GFP transduction in cell culture (transduction efficiency was 92.8% ± 2.5% vs about 10% in control group). In pig coronary artery stent deployment studies, GFP-positive cells were only observed in the site that direct contact with the antibody-tethered Ad-GFP stent. Most of these cells were neointimal smooth muscle cells (transduction efficiency was more than 17% of total cells in neointimal region and the average transduction efficiency was 5.9% ± 1.1% for the whole section). No distal spread of vector was detectable by polymerase chain reaction. **Conclusion** Gene delivery system based on antibody immobilized coronary stents provided localized and highly efficient gene delivery for intravascular site-specific gene therapy.

经皮腔内冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 及放置血管腔内支

架是治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的主要手段, 但术后再狭窄的发病率非常高, 尚没有有效的预防和治疗措施。转基因技术为再狭窄基因治疗奠定了基础, 但是血管内靶向基因转运是临床基因治疗面临的主要技术难关。传统的方法是通过灌注导管把病毒载体悬浮液注入血管内, 但灌注到血管中的病毒颗粒大部分随血液进入全身循环系统, 很难在冠状动脉病灶局部血管中达到有效的基因浓度, 此外病毒在体内器官中的广泛扩散, 可能潜在着致命的

[收稿日期] 2005-07-04 [修回日期] 2006-05-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (50473059), 教育部博士点基金 (20030023004), 天津市重点项目 (043803011)

[作者简介] 金旭, 博士, 从事心血管支架基因治疗载体体系及载药、载基因纳米粒子的研究, E-mail 为 jinxudl2000@163.com。通讯作者宋存先, 研究员, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物缓释和控释, 纳米粒子及基因治疗和心血管疾病的研究, E-mail 为 sexian@tom.com。Robert J Levy, 教授, 主要从事药物缓释和控释及心血管疾病治疗, E-mail 为 levyr@email.chop.edu。

全身毒副作用,无论安全性还是有效性都不符合临床应用要求^[1]。用血管支架携带基因可在介入治疗的同时将基因定位转运,我们利用抗原抗体结合的高效性和特异性,通过化学偶联将抗腺病毒抗体结合在支架的胶原涂层上,成功构建了化学偶联特异性抗体并免疫结合腺病毒基因载体的血管支架基因转运体系,用体内、体外实验评价了其用于血管内局部定位基因递送的可行性及效果。

1 材料与方法

1.1 材料

316L 不锈钢冠状动脉支架由微创医疗器械上海有限公司友情赠送。iv型牛胶原蛋白[Vitrogen 100 (r)] 购于 Vitrogen 聚合技术公司。鼠源性的抗腺病毒六位体单克隆抗体的(Fab) 2' 片段由 Selective Genetics 提供。编码绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的复制缺陷型腺病毒 (replication defective adenovirus encoding GFP, Ad-GFP) (Ⅲ型, E1、E3 删除) 原液 (5×10^{15} 病毒粒子/L) 购于宾夕法尼亚大学人类基因治疗中心。N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶二硫基) 丙酸酯 [N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate, SPDP] 购于 Pierce 化学公司。鼠动脉平滑肌细胞株 (A10) 由美国 Tissue Type Collection 提供。小鼠抗大鼠 IgG 的非特异的 (Fab) 2' 片段购于 Pierce 化学公司。1-乙基-3-(3-N,N 二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 [1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide, hydrochloride, EDAC] 购于 Sigma 公司。Yorkshire 小型猪 (雄性, 20~25 kg) 购于指定饲养场。

1.2 在冠状血管支架上固定化抗体和偶联编码绿色荧光蛋白的复制缺陷型腺病毒的方法

将 Vitrogen 100(r) 胶原按操作说明书调至 pH 为 7.4, 加入交联剂 EDAC (0.1 g/g 胶原), 将支架浸于该胶原溶液片刻后取出, 置于 37℃ 干燥后, 反复数次至每一支架表面包被了约 1.0 mg 胶原。包被后支架置于 SPDP 溶液 (20 mmol/L, DMSO: PBS= 1:1), 室温反应 2 h, 连接了 SPDP 的支架经磷酸缓冲液 (PBS) 冲洗后再放入含有特异性抗腺病毒六位体 (Fab) 2' 片段的溶液 (100 μL PBS 中含 5 μg 抗体) 中室温放置过夜。结合了 (Fab) 2' 的支架经 PBS 充分冲洗后再放入 Ad-GFP 悬浮液中, 在 37℃ 孵育 1 h 后取出, PBS 应充分洗涤, 除去未结合的 Ad-GFP。PBS 中 4℃ 保存待用, 使用时间一般限制在 1 周。

1.3 细胞转染试验

将病毒连接支架浸于 1 mL 含有 1×10^6 A10 细

胞悬液中, 37℃ 孵育 1 h 后, 置于 35 mm 培养皿, 加入 1×10^5 A10 细胞悬浮液, 于 37℃、5% CO₂ 中培养 (DMEM 培养基+ 10% 胎牛血清+ 1% 青链霉素)。对照性细胞分四个组, 通过上述化学和免疫偶联制备的 SPDP-抗腺病毒特异性 (Fab) 2'-Ad-GFP 支架为实验组, 简称为 SPDP-SAb-Ad-GFP; 同时设三个对照组: 对照 1 是用非特异性 IgG 取代抗腺病毒六位体的特异性 (Fab) 2' (SPDP-IgG-Ad-GFP); 对照 2 是抗腺病毒六位体的特异性 (Fab) 2' 物理吸附在支架上 (不通过 SPDP 连接) (SAb-Ad-GFP); 对照 3 不使用抗体, Ad-GFP 直接与 SPDP 活化的支架连接 (SPDP-Ad-GFP)。在进行对照性细胞转染效率实验时, 统一用 2.5×10^{10} 病毒粒子/支架。另外用相同的 SPDP-SAb-Ad-GFP 支架与不同浓度的 Ad-GFP 溶液 [$8.5 \times (10^7 \sim 10^{10})$ 病毒粒子/支架] 反应, 用细胞转染试验研究病毒浓度与转染率的关系, 从而找出支架偶联病毒载体的最大容量。培养 48 h 后, 含支架培养皿用 PBS 洗 2 次后, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 用含有 DAPI (核染色剂, 可提示细胞总数) 的封片剂封片, 倒置荧光显微镜下计数支架贴附细胞总数 (DAPI 细胞核呈蓝色荧光), 每一支架随机选取 5 个高倍镜视野计数后取平均值。将 GFP 阳性细胞占总细胞数的百分比记为转染率。

1.4 在体实验研究

9 只 Yorkshire 猪全身麻醉后, 分别在冠状动脉左前降支中段和左旋支置入 SPDP-SAb-Ad-GFP 支架和包被胶原但不含 Ad-GFP 支架。另有 5 只 Yorkshire 猪在冠状动脉左前降支中段置入连结 SPDP-IgG-Ad-GFP 支架作为对照。手术中及术后用药、处理方法同文献[2]。术后 7 天处死动物, 收集动脉标本, 小心纵向剖开动脉, 取出支架后, 将此动脉标本按近端、支架置入处、远端标记区分, 冰冻切片。部分切片用 4% 多聚甲醛固定, 用含 DAPI 封片剂封片, 荧光显微镜下观察, 每条动脉的 3 个不同切片分别计数 3 个视野, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。其余部分进行常规固定、HE 染色, 使用 GFP 特异性抗体进行免疫组织化学染色检测 GFP 的表达部位, 方法同文献[2]。回收的支架立即于荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况。同时取心肌、肺、肝、肾组织, 经液氮冷冻后匀浆, 常规抽提 DNA, 进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR), 检测 GFP DNA 在器官中是否有表达。使用 GFP 特异性引物 (上游引物为 5'-GGC TGC TGC AAA ACA GAT AG-3'; 下游引物为 5'-CGG ATC CTC TAG AGT CGA C-3'), 扩增 35 个循环。PCR 结果用琼脂糖凝胶电泳分析, 以 Ad-GFP 转

染的猪心肌细胞作为在体阳性对照。

1.5 统计学处理

使用 SPSS 软件包对数据进行分析, 数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间用单因素 ANOVA 分析, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 细胞培养试验

鼠动脉平滑肌细胞培养表明实验组支架胶原涂层的表面有大量 GFP 转染的细胞浸润生长, 与支架接触的培养皿表面生长的细胞大量转染, 而未与支架直接接触的周边细胞几乎没有被转染(图 1)。转染率与 Ad-GFP 的反应用量在 $10^7 \sim 10^{10}$ 病毒粒子范围内呈直线关系, 有明显的量效对应性。当 Ad-GFP 的反应用量为 2.5×10^{10} 病毒粒子时, 对应最大的转染率为 $92.8\% \pm 2.5\%$, 继续提高 Ad-GFP 的反应用量转染率不再提高(图 2)。而三个对照组的转染率与 Ad-GFP 的反应用量没有量效关系, 与实验组相比转染率显著降低(分别为 $13.2\% \pm 2.7\%$, $10.2\% \pm 1.3\%$, $10.8\% \pm 3.1\%$; $P < 0.01$), 而且转染细胞分散在整个培养皿中。

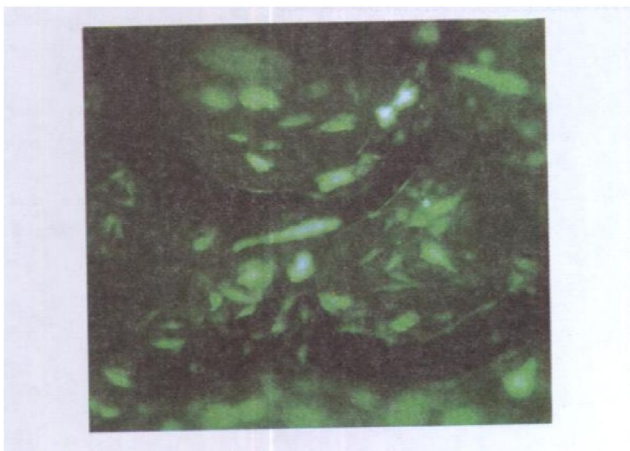


图 1. 实验组支架转染鼠动脉平滑肌细胞荧光显微照片($\times 100$)

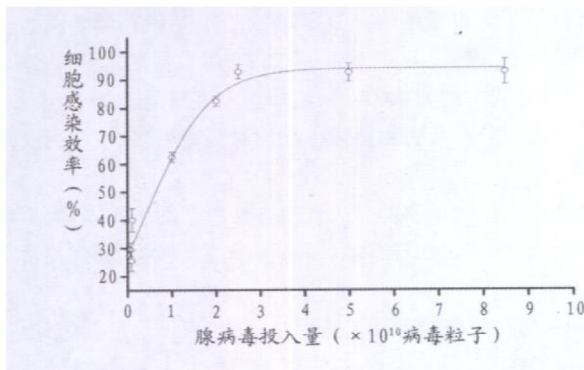


图 2. 实验组编码绿色荧光蛋白的腺病毒反应剂量与细胞转染率的量效关系图

2.2 动物在体实验结果

实验组回收的支架和血管荧光显微镜检查发现 GFP 在支架和靶部位组织内有广泛的表达, 但分布不均(图 3)。形态学研究发现血管组织中总的转染率占细胞总数的 $5.9\% \pm 1.1\%$, 转染细胞主要集中在内膜和中膜, 内膜的转染率大于 17%, 中膜的转染率超过 7%, 外膜的转染率较低, 几乎没有转染。应用抗-GFP 抗体进行免疫组织化学分析进一步证明了靶部位血管中 GFP 的表达, 而对照组动脉 GFP 荧光显示为阴性, 免疫组织化学也为阴性(图 4)。HE 染色切片发现大多数 GFP 阳性细胞为动脉平滑肌细胞, 这些细胞多粘附在支架的支撑点接触的血管处, 回收的支架上附着大量的 GFP 阳性细胞。远隔器官(肺、肝、肾)和下游冠状动脉样本进行 PCR 分析未见 GFP DNA 表达。

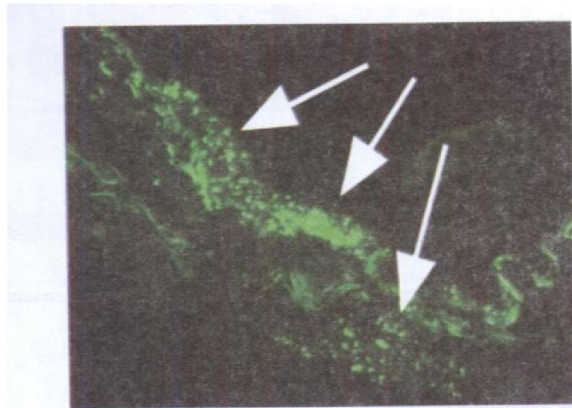


图 3. 回收猪冠状动脉荧光显微镜下观察转染情况($\times 100$)

3 讨论

研究显示, 基因治疗对于 PTCA 和/或支架置入术后新生内膜形成、增厚所致再狭窄有明确治疗作用, 已进入临床试验阶段^[3-5]。目前, 血管内基因治疗多采用导管作为基因的转运体系, 但是, 导管体系存在着作用时间短, 基因易于播散等缺点, 即使不断改进导管类型也不能有效解决。研究者们开始把目光投向高效、低毒副作用的局部基因治疗, 以支架为转运体系的研究方兴未艾^[2, 5-7]。本研究通过双官能偶联剂 SPDP 将特异性抗腺病毒六位体(Fab) 2' 片段以化学键结合在胶原涂层的支架上, 以 Ad-GFP 作为报告基因载体, 成功地实现了以支架为转运体系的血管局部靶向、高效的基因转染。细胞实验中实验组支架及支架接触部位大量阳性转染细胞, 而未与支架接触的周边细胞几乎无转染, 表明通过化学和免疫学双重偶联得到的载基因支架具有高效和局部定位的转染能力。对照组转染率低, 且转染阳性细胞分散在整个培养皿中, 不具备局部特征, 证明通

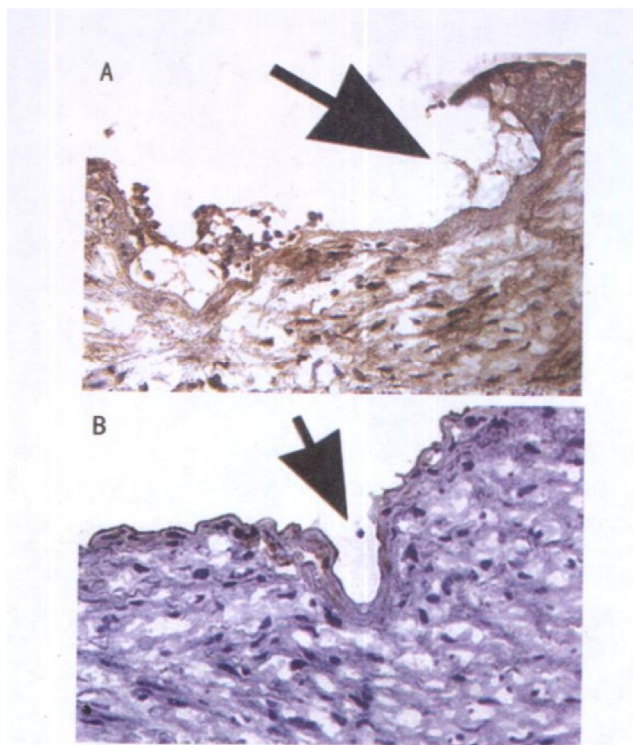


图4. 置入支架处猪冠状动脉抗绿色荧光蛋白抗体免疫组织化学结果 A为实验组, B为对照组; 箭头所指为支架支撑处与血管壁形成的凹陷。

过化学和免疫学双重偶联的 A α -GFP 与支架的结合是牢固和稳定的, 而未使用特异性抗体组只是通过胶原基质物理吸附结合, 在 PBS 冲洗后只有极少 A α -GFP 留在支架上, 在细胞培养过程中, 迅速从支架上脱离。动物实验的结果也充分证明了这一点。

本研究使用胶原作为支架包被基质, 是利用其为生物体本身具有的, 兼具可生物降解和良好生物相容性的双重优势。实验证明, 胶原包被足够结实,

• 征稿征订 •

《中国药学术语词表》2007 年征订启事

《中国药学术语词库与主题词表》是科技部的重点科技基础性项目, 由国家食品药品监督管理局信息中心组织完成。是我国第一部涵盖药学及其相关学科主题词的主题词表, 填补了多年来国内药学术语词表领域的空白。该书的问世, 使药学术语的统一和标准化得以实现, 对于药学术语知识传播, 图书文献的编辑、出版、标引、编目、建库、查新、文献数据库建设、数据库检查、咨询服务、信息交换和国内外学术交流等起着重要的作用。共收录正式主题词 34000 多条, 非正式主题词近 20000 条。包括字顺表(主表)、树型结构表以及以下五个附表: 英汉主题词对照表、拉汉中草药及药用植物主题词对照索引表、主题词汉语拼音索引表、副主题词表和文献出版物类型表。

读者对象为医药文献工作者, 医药期刊编辑, 科研、临床、教学、情报人员及广大用户群。适合于各大中型图书馆、各大中专院校、医药科研事业单位、医药专业媒体、医院图书馆、医药研发及制药企业图书馆和资料室、医药情报信息机构、医药网站等单位收藏和使用。

《中国药学术语词表》精装本上、中、下三册总计 570 元。欢迎向国家食品药品监督管理局信息中心订购, 通讯地址: 北京市西城区北礼士路甲 38 号, 邮编: 100810, 联系电话: 010-62214715, 传真: 010-62214866; 开户银行: 中国建设银行北京展览支行, 开户名称: 国家食品药品监督管理局信息中心, 帐号: 6510003042610002517。

不会出现胶原包被同支架的分离。胶原基质几乎不引起炎症反应^[2,8]。

本实验证明了使用抗体结合腺病毒载体, 可建立一个高效的冠状血管支架基因转运体系。而且, 本研究中抗体偶联病毒载体支架显示出高效和局部定位的特征, 未出现基因的远处播散, 尤其适用于血管内局部定位及肿瘤等疾病的靶向基因治疗。本研究采用的是报告基因, 同样适用于广泛的治疗基因的转运。

[参考文献]

- [1] Sharif F, Daly K, Crowley J, O'Brien T. Current status of catheter- and stent-based gene therapy [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, **64** (2): 208-216
- [2] Klugherz BD, Jones PL, Cui X, Chen W, Meneveau NF, DeFelice S, et al. Gene delivery from a DNA controlled-release stent in porcine coronary arteries [J]. *Nature Biotechnol*, 2000, **18** (11): 1181-1184
- [3] Mann MJ, Whittmore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, et al. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the prevent single centre, randomised, controlled trial [J]. *Lancet*, 1999, **354** (9189): 1493-498
- [4] Asahara T, Banters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery [J]. *Circulation*, 1995, **91** (11): 2793-801
- [5] 金旭, 宋存先, 朱文玲. 载基因支架治疗血管再狭窄[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (1): 83-85
- [6] Harvey BG, Maroni J, O'Donoghue KA, Chu KW, Muscat JC, Pippo AL, et al. Safety of local delivery of low- and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of morbid conditions [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, **13** (1): 15-63
- [7] Takahashi A, Palmer-Opolski M, Smith RC, Walsh K. Transgene delivery of plasmid DNA to smooth muscle cells and macrophages from a biostable polymer-coated stent [J]. *Gene Ther*, 2003, **10** (17): 1471-478
- [8] Chandler LA, Doukas J, Gonzalez AM, Hoganson DK, Gu DL, Ma C, et al. FGF2-targeted adenovirus encoding platelet-derived growth factor-B enhances de novo tissue formation [J]. *Mol Ther*, 2000, **2** (2): 153-160

(此文编辑 许雪梅)