

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-04-0248-05

促血管生成素 1 和血管内皮生长因子基因 合适剂量配比有效促进血管生成

郭艳红^{1,2}, 祖凌云¹, 高 炜^{1,2}, 陈 莉², 汤 健²

(北京大学 1. 第三医院心内科, 2. 分子心血管学教育部重点实验室, 北京市 100083)

[关键词] 内科学; 血管生成; 基因治疗; 血管内皮细胞生长因子; 促血管生成素

[摘要] 目的 在大鼠后肢缺血模型中, 探讨联合转染促血管生成素 1 和血管内皮生长因子基因治疗对新生血管数量和侧支循环形成的影响, 并观察不同基因剂量对比对新生血管形态和功能的影响。方法 制备大鼠后肢血管闭塞病变模型, 采用电脉冲法介导转基因, 按不同剂量配比进行肌肉组织转染携带促血管生成素 1 基因的质粒和/或携带血管内皮生长因子基因的质粒。采用逆转录聚合酶链反应检测外源基因的表达、免疫组织化学染色检测缺血局部毛细血管和小动脉的数量和分布、通过后肢血管造影检测侧支循环建立的情况。结果 单独转促血管生成素 1 基因或血管内皮生长因子基因治疗组血管生成数量略有增加, 联合基因治疗组中, 血管内皮生长因子质粒剂量为 100 μg 时, 随着促血管生成素 1 质粒剂量的增加, 小动脉计数较同期空载质粒对照组分别增加 0.90 倍、1.40 倍和 1.45 倍; 当促血管生成素 1 质粒剂量为 100 μg 时, 随着血管内皮生长因子质粒剂量的增加, 小动脉计数较同期空载质粒对照组分别增加 1.90 倍、1.07 倍和 1.39 倍。血管通透性检测表明, 随着血管内皮生长因子质粒剂量的增加, 血管通透性渐增加, 促血管生成素 1 质粒能降低新生血管的通透性; 其中促血管生成素 1 质粒 200 μg 联合血管内皮生长因子质粒 100 μg 组在有效促进小动脉形成的同时血管通透性与正常对照组最为接近。结论 联合血管生成素 1 和血管内皮细胞生长因子基因治疗能更有效促进小动脉形成, 其中血管内皮生长因子质粒与促血管生成素 1 质粒比例为 1:2 时血管通透性最接近生理状态, 是比较理想的联合基因治疗剂量配比。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Combination of Angiopoietin-1 and Vascular Endothelial Growth Factor at Proper Ratio Promoted Functional Neovascularization in Rats with Experimental Limb Ischemia

GUO Yan-Hong, ZU Ling-Yun, GAO Wei, CHEN Li, and TANG Jian

(Department of Cardiology, Third Hospital, Key Laboratory of the Ministry of Education on Molecular Cardiology, Peking University, Beijing 100083, China)

[KEY WORDS] Angiogenesis; Gene Therapy; Vascular endothelial growth factor; Angiopoietin-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of combined gene transfer of angiopoietin-1 (Ang-1) gene and vascular endothelial growth factor (VEGF) gene, with different proportions, on angiogenesis, arteriogenesis and neovascular structure and function in a rat model of hindlimb ischemia. **Methods** Expression plasmid, pcD2 (control plasmid), pcD2/Ang-1, pcD2/VEGF, or pcD2/Ang-1+ pcD2/VEGF at different proportions, was injected intramuscularly into ischemic hindlimb rat model, followed by electroporation. VEGF and Ang-1 expressions were evaluated by RT-PCR. Angiogenesis and arteriogenesis were assessed by capillary density, arteriole density and angiography. Vascular permeability was evaluated by Evans blue uptake assays.

Results Collateral vessel development was assessed at 14 days after treatment. Vessel numbers increased slightly in the rat transfected with pcD2/Ang-1 or pcD2/VEGF compared with that in the rats transfected with pcD2 alone ($P < 0.05$). In the rats transfected with pcD2/Ang-1+ pcD2/VEGF, with the increase of pcD2/Ang-1 during the pcD2/VEGF at 100 μg , the number of artery increased and was 1.9, 2.4 and 2.45 times higher than that of control rats after gene delivery. With the increase of pcD2/VEGF during the pcD2/Ang-1 at 100 μg , the number of artery increased and was 2.9, 2.07 and 2.39 times higher than that of control. Evans blue amount in skeletal muscle increased accompanied with the dosages of pcD2/VEGF. Combination with pcD2/Ang-1 decreased the vessel leakage. Evans blue uptake in group of pcD2/VEGF 100 μg + pcD2/Ang-1 200 μg was the closest to that of the normal group ($P > 0.05$). **Conclusions** The current study demonstrated that co-expression of Ang-1 and VEGF genes in the ischemic muscle effectively develop leakage-resistant vessels in rat model. At a ratio of pcD2/VEGF to pcD2/Ang-1 by 1:2 is the optimal dosage. Therefore, this approach may provide a more appropriate therapeutic strategy in ischemic vascular diseases.

[收稿日期] 2006-09-26 [修回日期] 2007-04-01

[基金项目] 国家“863”高技术发展计划(2002AA2Z3324)资助

[作者简介] 郭艳红, 博士, 研究方向为心血管疾病发病机制及生物治疗, 联系电话为 010-82802819, E-mail 为 guoyh@bjmu.edu.cn。祖凌云, 博士, 研究方向为冠心病的临床和基础研究, 联系电话为 010-82802819, E-mail 为 zulingyun@sohu.com。通讯作者高炜, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病、高血压和心力衰竭的基础与临床, E-mail 为 dr-gaowei@yahoo.com。

采用促血管生成因子基因治疗作为治疗缺血性疾病的新方法,即治疗性血管生成,已广泛应用于肢体和心脏缺血性疾病的实验和临床研究,并取得了较好效果^[1,2]。但血管新生的过程是一个精密复杂的过程,需要多种生长因子在时间、空间和剂量等方面协调互补以形成结构和功能完整的血管^[3]。本实验观察了联合血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和促血管生成素 1(angiotensin-1, Ang-1)基因治疗在新生血管形成中的作用,并进一步探讨了不同基因剂量配比在血管生成方面的差异,以寻找合适的联合基因治疗的剂量比例。

1 材料与方法

1.1 试剂

真核表达载体 pcD2/Ang-1 和 pcD2/VEGF 由本室构建^[4,5]。质粒提取纯化柱购自 QIAGEN 公司;Trizol 逆转录试剂盒购于 Invitrogen 公司;Taq 酶购于 Takara 公司。抗血管平滑肌特异性肌动蛋白单克隆抗体购自 Sigma 公司;抗 CD31 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 动物及其处理

81 只体重 250~300 g 雄性 Wistar 大鼠购自北京大学医学部实验动物研究中心,行大鼠左后肢股动脉及其分支切断术,同时进行转基因^[6]。在股动脉截断局部肌肉注射质粒载体,立即在注射部位两侧插入两根电极,插入深度 5 mm,电极间距 5 mm,给予直流方波电脉冲刺激,参数为:场强 200 V/cm,脉冲波宽 40 ms,频率 1 Hz,作用时间 6 s。

1.3 实验分组

实验分为假手术组、空载体质粒对照组和 7 个转基因治疗组,各治疗组所用转基因种类和剂量见表 1。注射总体积为 100 μ L,空载质粒对照组注射 100 μ g pcD2 载体。

表 1. 7 个治疗组质粒剂量及配比

分 组	pcD2/VEGF (μ g)	pcD2/Ang-1 (μ g)	VEGF/Ang-1
治疗 A 组	100	0	/
治疗 B 组	0	100	/
治疗 C 组	100	400	1:4
治疗 D 组	100	200	1:2
治疗 E 组	100	100	1:1
治疗 F 组	200	100	2:1
治疗 G 组	400	100	4:1

1.4 外源基因在骨骼肌中的表达

转基因后 7 天取局部肌肉组织,用一步法提取组织总 RNA,各组取 1 μ g 逆转录合成 cDNA。VEGF 引物的正链 5'-GCT ACT GCC ATC CAA TCG AG-3', Ang-1 引物的正链 5'-AAA GGT CAC ACA GGG ACA GC-3',为了检测外源基因的表达,设计下游引物序列与质粒下游 PolyA 尾以上区域序列互补,5'-CAC CTT CCA GGG TCA AGG AA-3'。采用 β -actin 作为内参照,引物序列为:正链 5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC-3',负链 5'-AGC CAG GTC CAG ACG CA-3'。取 2 μ L 逆转录产物进行 PCR(94 $^{\circ}$ C 变性 1 min \rightarrow 56 $^{\circ}$ C 退火 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 30 个循环,末次循环后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min)。

1.5 免疫组织化学染色

转基因后 14 天取局部肌肉组织,OCT 包埋,冰冻切片,分别进行抗 CD31 及血管平滑肌特异性肌动蛋白免疫组织化学染色来检测毛细血管和小动脉的数量,免疫组织化学染色步骤按试剂盒说明进行。参照文献[7],每只动物组织切片随机选择 10 个视野计数毛细血管数或小动脉数(n/mm^2),取均值代表该样本。

1.6 大鼠后肢血管造影

于转基因即刻及转基因后 28 天进行后肢动脉造影,参照文献[2],采用腹主动脉插管,加压 1 s 内注入 2 mL 泛影葡胺造影剂,采用连续电影摄影记录造影结果,观察侧支循环建立情况。

1.7 血管通透性检测

转基因后 2 周,从大鼠后肢股静脉注射 1% 伊文思蓝 0.5 mL,3 h 后取后肢转基因局部骨骼肌组织 1.0 g,置于甲酰胺 3 mL 中,于 60 $^{\circ}$ C 萃取 24 h 后于 620 nm 测定吸光度。标准曲线由溶于 1% 白蛋白溶液的不同浓度伊文思蓝绘制,根据标准曲线换算出组织中伊文思蓝浓度。

1.8 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据间比较采用 ANOVA 和 Dunnett 法 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 外源基因在骨骼肌中的表达

转基因治疗 A 组(单独转 pcD2/VEGF)未检测到外源 Ang-1 的表达,转基因治疗 B 组(单独转 pcD2/Ang-1)未检测到外源 VEGF 的表达。联合转基因治疗组中,随着外源转入 pcD2/VEGF 基因量的增加,

VEGF mRNA 表达递增;随着外源转入 pcD2/Ang-1 基

因量的增加,Ang-1 mRNA 表达递增(图 1)。

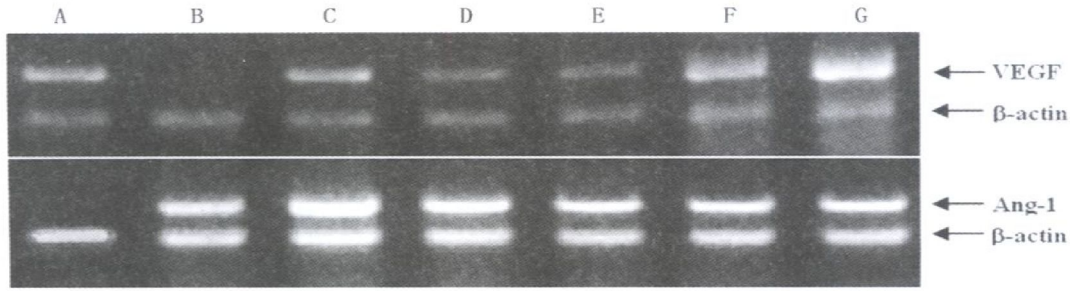


图 1. 逆转录聚合酶链反应检测外源基因在注射局部肌肉组织中的表达

2.2 毛细血管计数

对照组缺血局部肌肉组织内可见到一些以内皮细胞被染成紫色为标志的微血管,转基因治疗各组的毛细血管数明显多于同期空载质粒对照组($P < 0.05$;表 2 和图 2)。联合转基因治疗组中,pcD2/VEGF 基因剂量为 100 μg 时,随着 pcD2/Ang-1 基因剂量的增加,毛细血管计数较同期空载质粒对照组比分别增加 1.27 倍、2.03 倍、3.35 倍;当 pcD2/Ang-1 基因剂量为 100 μg 时,随着 pcD2/VEGF 基因剂量的增加,毛细血管计数较同期空载质粒对照组分别增加 1.27 倍、4.99 倍、5.35 倍。

2.3 小动脉计数

免疫组织化学染色显示,单独转 pcD2/Ang-1 或 pcD2/VEGF 基因组的小动脉计数较同期空载质粒对照组无明显差异。联合基因治疗组(C~G 组)小动脉计数明显多于同期空载质粒对照组($P < 0.05$)。其中,pcD2/VEGF 基因剂量为 100 μg 时,随着 pcD2/Ang-1 基因剂量的增加,小动脉计数较同期空载质粒对照组分别增加 0.90 倍、1.40 倍、1.45 倍;pcD2/Ang-1 基因剂量为 100 μg 时,随着 pcD2/VEGF 基因剂量的增加,小动脉计数较同期空载质粒对照组分别增加 1.90 倍、1.07 倍、1.39 倍(表 2 和图 3)。

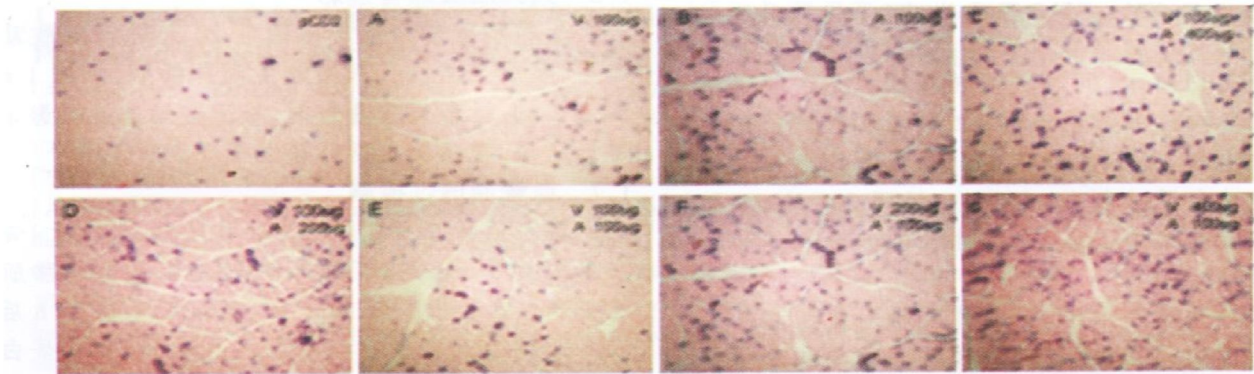


图 2. 毛细血管密度检测 (×100)

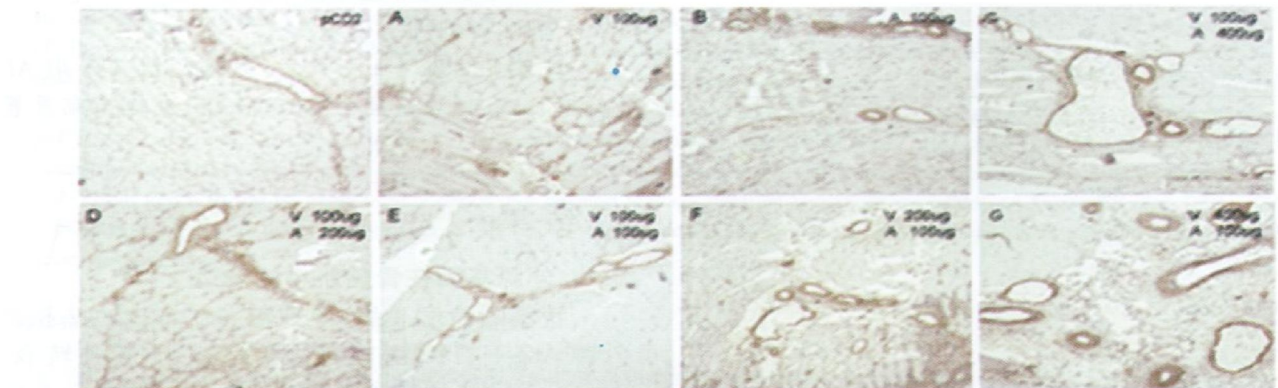


图 3. 小动脉密度检测(×100)

2.4 大鼠后肢血管造影

左侧股动脉离断后,远端几乎没有血流分布。单独转 pcD2/Ang-1 或 pcD2/VEGF 基因组肌肉局部组织可见部分新生血管,而联合转基因组新生血管数目更多。在不同剂量配比的联合转基因组,后肢灌注没有显著差异。

2.5 血管通透性评估

假手术组后肢组织伊文思蓝含量为 8.1 ± 0.8 mg/L,单独 pcD2/VEGF 基因治疗组伊文思蓝含量增加,提示血管通透性增加,单独 pcD2/Ang-1 基因治疗组血管通透性降低。在 E、F、G 组,pcD2/Ang-1 剂量为 100 μ g,随着 pcD2/VEGF 剂量从 100、200、400 μ g 递增,组织中伊文思蓝量逐渐增加,提示血管通透性增高;而当 pcD2/VEGF 剂量为 100 μ g,随着 pcD2/Ang-1 剂量递增,伊文思蓝量逐渐减少,提示血管通透性降低(表 2)。

表 2. 大鼠下肢转基因后 2 周局部肌肉毛细血管和小动脉计数及组织中伊文思蓝浓度

分 组	毛细血管 计数	小动脉 计数	伊文思蓝 浓度 (mg/L)
假手术组	70 \pm 25	2.1 \pm 0.9	8.10 \pm 0.82
治疗 A 组	163 \pm 49 ^a	2.5 \pm 0.8	14.92 \pm 2.39 ^a
治疗 B 组	118 \pm 76 ^a	2.6 \pm 1.2	7.68 \pm 1.58
治疗 C 组	305 \pm 75 ^a	5.0 \pm 1.2 ^a	6.90 \pm 1.78
治疗 D 组	212 \pm 60 ^a	4.9 \pm 0.9 ^a	8.57 \pm 0.74
治疗 E 组	160 \pm 54 ^a	4.9 \pm 0.8 ^a	9.74 \pm 0.32
治疗 F 组	421 \pm 87 ^a	4.3 \pm 1.3 ^a	12.62 \pm 1.29 ^a
治疗 G 组	446 \pm 163 ^a	4.9 \pm 0.9 ^a	17.39 \pm 0.45 ^a

注:以上每组动物 9 只,其中 6 只用于免疫组织学检测血管生成情况;3 只用于伊文思蓝测定检测血管通透性。a 为 $P < 0.05$,与对照组相比。

3 讨论

血管内皮细胞生长因子,又被称为血管通透因子,是最早发现的具有增加血管通透性和促进内皮细胞增殖与迁移的细胞因子,参与血管生成过程,是目前治疗性血管生成研究中应用最多效果亦较肯定的一个因子。但 VEGF 强大的血管通透作用,可能会出现引起治疗局部水肿等副作用。促血管生成素 1 及其受体 Tie-2 是近年发现与胚胎和成体血管生成有重要关系的又一系统。Ang-1 的主要功能是保证新生血管内皮细胞的正确组装、促进内皮周围支持细胞的聚集和血管重塑,从而维持新生血管的完整性和稳定性,有效防止炎症及血管通透性增加。

单独应用这两个因子中的任何一个均可有效促进血管新生^[2,8],但所形成的血管结构略有不同,二者联合基因治疗能更有效形成小动脉血管,有助于改善缺血组织的血液供应^[9,10]。缺血组织的血管新生过程非常精密复杂,需要多种生长因子在时间、空间和剂量等方面协调和互补作用^[3]。联合两个或多个作用于血管生成不同阶段的生长因子较单一因子会更有效的促进血管生成,改善组织血流,减少单一因子治疗可能引起的副作用,如单纯 VEGF 治疗引起的血管通透性增高而造成的一过性局部水肿等^[11]。既往的研究表明,联合 VEGF 和 Ang-1 基因治疗可有效促进大鼠下肢缺血组织新生血管形成和侧支循环建立,恢复闭塞部位的血供,并减轻新生血管的通透性^[11,12]。但联合基因治疗时所应用基因的剂量配比以及不同剂量对比对新生血管结构和功能的影响尚不清楚。

本研究在大鼠下肢动脉闭塞模型上,按照不同的剂量配比通过电脉冲介导的肌肉内电转 VEGF 和 Ang-1 基因,pcD2/Ang-1 及 pcD2/VEGF 的剂量从 100 μ g、200 μ g 和 400 μ g 递增,二者比例从 1:4 到 4:1。术后 1 周在转基因局部检测到 VEGF 和 Ang-1 在 mRNA 的有效表达,表达效应随转入基因的剂量递增。本实验将 VEGF 与 Ang-1 联合应用,我们应用了两种不同的血管抗原标记,CD31 和血管平滑肌肌动蛋白特异性抗体。CD31 是一种内皮细胞标记,肌肉组织内的大小血管都可着色;血管平滑肌肌动蛋白是一个识别动脉平滑肌细胞的特异性抗原。通过这两种染色,不仅观察了血管新生的效果(毛细血管计数),还观察了动脉生成的效果(小动脉计数),更注重功能性动脉生成,弥补了以往治疗性血管生成实验的不足。

既往治疗性血管生成中应用 VEGF 等因子的研究多偏向于血管生成而不是动脉生成,血管生成对伤口愈合和其他组织的修复过程至关重要,但它是否可以在周围血管病或冠状动脉闭塞性疾病时充分代偿近端主要动脉分支的供血尚不清楚。本实验中发现,在 pcD2/VEGF 为 200 μ g 和 400 μ g 的分组,尽管毛细血管计数较其它各组明显增高,但其小动脉计数并无明显优势,通透性较对照组明显增高。可见,过度的毛细血管生长在促进动脉生成上不但无优势,还会出现血管渗漏的副作用。综合毛细血管计数、小动脉计数及血管通透性评估结果显示,联合转 pcD2/VEGF 100 μ g+ pcD2/Ang-1 200 μ g 组能够促进毛细血管增生,在促进小动脉生成方面与 VEGF 剂量较大的两组有相同的效果,已经能够达到促进

缺血肢体侧支循环建立的目的,此剂量配比下局部组织的血管通透性最接近生理状态,目前看来可能是比较理想的剂量配比。根据本研究中缺血肌肉组织局部新生血管的形态结构,综合分析通透性指标,发现联合 Ang-1 后更能有效得刺激动脉生成(功能性血管的生成),且避免 VEGF 增加血管通透性的作用。在本实验条件下,这种 VEGF 和 Ang-1 的联合治疗在 pcD2/VEGF 100 μg + pcD2/Ang-1 200 μg 时效果最为满意,从而为下一步实验奠定了理论和实验基础。

[参考文献]

- [1] Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease [J]. *Circulation*, 2004, **109** (22): 2 692-697.
- [2] Kastrup J, Jurgensen E, Røck A. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the euroinject one trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, **45** (7): 982-988.
- [3] Kutryk MJ, Stewart DJ. Angiogenesis of the heart [J]. *Microsc Res Tech*, 2003, **60** (2): 138-158.
- [4] 姜宁,高炜,王日胜,等. 肌肉电转促血管生成素1基因治疗大鼠下肢血管闭塞病[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2001, **9** (2): 101-103.
- [5] 蒋捷,高炜,王日胜,等. 血管内皮生长因子基因治疗小型猪冠状动脉闭塞的实验研究[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2001, **9** (4): 220-223.
- [6] 祖凌云,蒋捷,姜宁,等. 联合促血管生成素1及血管内皮细胞生长因子基因治疗对大鼠新生血管通透性的影响[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2004, **12** (2): 107-110.
- [7] 黄志军,袁洪,曾均发,吴小兵,彭建强,易斌,等. 重组腺相关病毒载体介导人血管内皮生长因子165基因对缺血心肌血管新生的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, **12** (6): 627-631.
- [8] Bhardwaj S, Roy H, Karpanen T, He Y, Hi Y, Jauhiainen S, et al. Periaortical angiopoietin1 gene transfer induces angiogenesis in rabbit carotid arteries [J]. *Gene Ther*, 2005, **12** (5): 388-394.
- [9] Benest AV, Salmon AH, Wang W, Glover CP, Uney J, Harper SJ, et al. VEGF and angiopoietin1 stimulate different angiogenic phenotypes that combine to enhance functional neovascularization in adult tissue [J]. *Microcirculation*, 2006, **13** (6): 423-437.
- [10] Ryu JK, Cho CH, Shin HY, Song SU, Oh SM, Lee M, et al. Combined angiopoietin1 and vascular endothelial growth factor gene transfer restores cavernous angiogenesis and erectile function in a rat model of hypercholesterolemia [J]. *Mol Ther*, 2006, **13** (4): 705-715.
- [11] Jho D, Mehta D, Ahmed G, Gao XP, Tirupathi C, Broman M, et al. Angiopoietin1 opposes VEGF-induced increase in endothelial permeability by inhibiting TRPC1-dependent Ca^{2+} influx [J]. *Circ Res*, 2005, **96** (12): 1 282-290.
- [12] Jiang J, Jiang N, Gao W, Zhu J, Guo Y, Shen D, et al. Augmentation of revascularization and prevention of plasma leakage by angiopoietin1 and vascular endothelial growth factor cotransfection in rats with experimental limb ischaemia [J]. *Acta Cardiol*, 2006, **61** (2): 145-153.

(此文编辑 胡必利)