

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2008)16-11-0844-05

构建高表达组织型纤溶酶原激活物基因质粒预防兔动脉粥样硬化血栓形成

姬尚义, 季军, 令文萍, 何霞, 施剑平, 王永红

(深圳市孙逸仙心血管医院, 广东省深圳市 518020)

[关键词] 生物工程学; 组织型纤溶酶原激活物; 动脉粥样硬化; 血栓形成

[摘要] 目的 探讨组织型纤溶酶原激活物基因质粒在预防动脉粥样硬化及血栓形成中的作用。方法 新西兰纯种兔 20只,分为基因治疗组和模型组,每组各 10只,基因治疗组双侧髂动脉内膜剥脱术+转基因治疗+高胆固醇饮食喂养;模型组双侧髂动脉内膜剥脱术+高胆固醇饮食喂养。4周后处死动物,观察动脉内粥样硬化病变和血栓形成;在处死动物的同时抽血检测 D-二聚体含量。结果 成功建立了兔髂动脉粥样硬化模型并获得了组织型纤溶酶原激活物在血管周围肌肉组织中的有效表达。构建的组织型纤溶酶原激活物基因质粒可显著抑制兔动脉血管损伤后平滑肌细胞增殖细胞核抗原表达 (13.55 ± 8.43 比 27.78 ± 12.35) 和血小板源生长因子 B mRNA 表达 (3.54 ± 1.78 比 20.40 ± 11.25), 显著减少血管内膜厚度 ($32.75 \pm 21.50 \mu\text{m}$ 比 $165.70 \pm 71.21 \mu\text{m}$) 和内膜面积 ($0.41 \pm 0.47 \text{mm}^2$ 比 $2.01 \pm 1.15 \text{mm}^2$), 且显著抑制了局部血管粥样硬化病变发展并使病变血管内血栓形成明显减少。结论 构建的组织型纤溶酶原激活物基因质粒可用于预防兔实验性动脉粥样硬化血栓形成。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

Study on Construction of Tissue-Type Plasminogen Activator Gene Plasmid to Prevent the Rabbit Artery Atherosclerosis

JI Shang-Yi, JI Jun, LING Wen-Ping, HE Xia, SHI Jian-Ping and WANG Yong-Hong

(Shenzhen Sun Yat-Sen Cardiovascular Hospital, Shenzhen 518020, China)

[KEY WORDS] Tissue-Type Plasminogen Activator; Atherosclerosis; Thrombosis

[ABSTRACT] **Aim** To elucidate the effect of tissue-type plasminogen activator (tPA) gene plasmid on prevention of the thrombosis after atherosclerosis. **Methods** Twenty New Zealand rabbits were divided into two groups (10 for experiment and 10 for control) randomly. All the animals were done with endarterectomy of the iliac arteries and with hypercholesterole feeding after the operation. In experimental group, a 10 cm long gene suture immersed with constructed tPA gene plasmid was sutured in the muscle around the injured arteries. All the rabbits were executed 4 weeks after the operation and the local artery pathology including atherosclerosis and thrombosis, the blood D-dimer concentration were observed. **Results** A model of rabbit iliac artery atherosclerosis was successfully constructed and the transfection of tPA gene plasmid and tPA expression in local muscle tissue around the injured arteries was obtained effectively. The constructed tPA gene plasmid could inhibit the expressions of PCNA (13.55 ± 8.43 vs 27.78 ± 12.35) and platelet-derived growth factor (PDGF-B) mRNA (3.54 ± 1.78 vs 20.40 ± 11.25) by vascular smooth muscle cell (VSMC) after vascular injury remarkably and could reduce the intimal thickness ($32.75 \pm 21.50 \mu\text{m}$ vs $165.70 \pm 71.21 \mu\text{m}$) and area ($0.41 \pm 0.47 \text{mm}^2$ vs $2.01 \pm 1.15 \text{mm}^2$), and restrict the development of atherosclerosis and lumen thrombosis successfully.

Conclusion Constructed tPA gene plasmid could be used for prevention of the thrombosis after rabbit experimental atherosclerosis.

尽管阿司匹林降低冠心病急性事件发生率、减少病死率已得到临床验证^[1],但它可能产生耐药性并可能有促进血栓形成的危险^[2]。组织型纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator, tPA)是纤维溶解系统主要激活因子,在纤维蛋白的作用下释放入血,作用于血浆素原使其转换为血浆素促进

纤维蛋白降解^[3],具有较强的抗血栓效应。临床上 tPA 已用于溶栓治疗且效果显著。我们构建了一种 tPA 高表达载体系统,通过转染机体组织细胞获得了 tPA 长期高效表达,试图应用于防止实验性动脉粥样硬化血栓形成。

1 材料和方法

1.1 动物与分组

新西兰纯种兔 20只,体重 2.5 kg 左右,雄性。

[收稿日期] 2008-06-17 [修回日期] 2008-09-28

[基金项目] 深圳市科技局资助项目(200104048)

[作者简介] 姬尚义,博士后,主任医师,博士研究生导师,主要研究方向为冠心病、先天性心脏病、瓣膜及血管外科和心脏移植, E-mail为 syxb_@126.com.

由广东省实验动物中心提供。将其随机分为基因治疗组(双侧髂动脉内膜剥脱术+转基因治疗+高胆固醇饮食喂养, 10只)和模型组(双侧髂动脉内膜剥脱术+高胆固醇饮食喂养, 10只)。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Hind* III、*Kpn* I、*Bam* H I 和 *Xho* I 购自宝生物工程有限公司, *Ven* DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自新英格兰 Biolabs 公司, QIAprep Spin Miniprep Kit、QIAquick Gel Extraction Kit 和 QIAGEN PCR Product Purification Kit 购自 QIAGEN 公司, DNA marker DL 2000 购自上海生工生物有限公司。寡核苷酸 3' 端地高辛标记试剂盒和地高辛标记核苷酸检测试剂盒均由德国 BOEHRINGER MANNHEIM 公司提供。兔抗人 tPA 抗体、FITC 耦合的羊抗兔 IgG 抗体和对照一抗(兔抗 β -catenin 抗体)由美国 Bumham 研究所提供。羊抗人 tPA 多克隆抗体和兔抗羊多克隆抗体由晶美生物工程有限公司提供。鼠抗平滑肌细胞 α -actin 单克隆抗体、鼠抗 PCNA 单克隆抗体和 LSAB 免疫组织化学试剂盒均系 DAKO 公司产品。

1.3 EST 克隆和引物

tPA 基因序列由网上 Blast 得到三段 EST 序列, 其 Clone ID 分别为 6251209、4861268 和 5190656。三个 EST 克隆购自 ATCC 公司。根据 tPA 基因及三段 EST 序列自行设计引物, 序列如下: tPA-1 上游 5' -CCC aag ctt ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG-3', 下游 5' -GGg gta ccA CGG TAG GCT GAC CCA TTC-3'; tPA-2 上游 5' -GGg gta ccC ACA GCC TCA CCG AGT CG-3', 下游 5' -CGg gat ccA GCA GGA GCT GAT GAG TAT GCC-3'; tPA-3 上游 5' -CGg gat ccT CTC TGC CGC CCA CTG CT-3', 下游 5' -CCc teg agG CGG TCG CAT GTT GTC AC-3' (小写部分为酶切位点)。

1.4 组织型纤溶酶原激活物基因质粒和 pSecTag2B 组织型纤溶酶原激活物重组质粒的构建

以三个 EST 克隆质粒为模板分别扩增三条 tPA 片段, 回收扩增产物并测序。质粒 pSecTag2B 和三条 tPA 片断 tPA-1、tPA-2 和 tPA-3 分别经 *Hind* III 和 *Xho* I、*Hind* III 和 *Kpn* I、*Kpn* I 和 *Bam* H I、*Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切消化, 经 QIAGEN PCR Product Purification Kit 纯化, T4 DNA 连接酶 14°C 连接过夜, 将连接产物转化 *E. Coli* JM109 感受态细胞, 经含氨苄青霉素 LB 平板挑出抗性菌落, PCR 检测重组质粒, 提取重组质粒测序鉴定。重组质粒经磷酸钙共沉淀法转染至中国仓鼠卵巢细胞, 间接免疫荧光反应检

测 tPA 抗原表达。

1.5 组织型纤溶酶原激活物基因缝线的制备

pSecTag2B-tPA 重组质粒经 LipoVec-1 阳离子脂质体标记, 方法按试剂盒说明进行。脂质体与 DNA 质粒的比率均为 1 mg 比 100 μ g。用 M199 细胞营养液(含 10% 猪血清)制备成基因药物, 使脂质体/DNA 质粒复合物终浓度为 10%。将 6/0 号涤纶缝线浸泡于 pSecTag2B-tPA 重组质粒药物中, 8 h 后取出缝线在无菌条件下吹干并反复数次, 使每厘米缝线含质粒 DNA 100 μ g 4°C 收藏备用。

1.6 兔髂动脉粥样硬化模型建立及转基因治疗

用 5% 戊巴比妥静脉麻醉 (25~35 mg/kg), 消毒后于大腿根部沿股动脉切开皮肤长约 1.5 cm, 钝性分离股浅动脉, 局部滴加 2% 利多卡因使血管扩张, 逆行插入直径 2.5 mm \times 20 的球囊导管至髂总动脉分叉以上, 用压力泵向球囊充气 (5~8 个大气压), 缓慢回拉至动脉切口处, 抽空球囊后再次插入充气, 共重复三次, 造成血管内皮剥脱, 常规结扎动脉, 缝合切口。基因治疗组于动脉内膜剥脱同时将 tPA 基因缝线约 10 cm 环行和蛇行缝合于剥脱血管周围的骨骼肌肌肉组织内, 并行局部肌肉超声波辅助转基因治疗(频率 1 kHz 强度 0.5 W/cm², 时间 30 min)。术后给予高胆固醇饮食喂养, 每日行转基因局部皮表超声波治疗, 条件同上, 共观察 4 周。分别于术中和术后 4 周抽静脉血检测凝血酶原时间和纤维溶解降解产物 D-二聚体含量。高胆固醇饮食配方为基础饲料 + 3% 胆固醇 + 5% 猪油。

1.7 标本制作和检测

各组于观察结束后, 空气栓塞处死, 立刻经静脉加压滴注 4% 多聚甲醛, 经适当固定后, 无菌取出髂动脉和基因缝线局部肌肉组织, 将每条髂动脉标本分为近端段、中段和远端段, 每段约 8~10 mm, 4% 多聚甲醛固定, 按不同的检测目的固定时间不同: 用作常规染色、特殊染色和免疫组织化学的标本固定 24 h 用作原位杂交的标本固定 2 h 后置于 15% 蔗糖缓冲液 (DEPC 水配制) 浸洗 24 h。常规石蜡包埋。将每个血管标本的近、中、远各段分别作连续切片, 切片厚度 5 μ m (原位杂交 4 μ m), 每段约切片 200 张, 每隔 15 张取切片做常规、特殊、免疫组化和原位杂交染色。

(1) 免疫组织化学法: 采用免疫组织化学间接法检测 tPA 抗原, 一抗为羊抗人 tPA 多克隆抗体 (1:100 稀释)。用 LSAB 法检测血管壁增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表达, 一抗为鼠抗 PCNA 单克隆抗体 (稀释度为 1:400)。

操作按试剂盒说明进行。选择人肺低分化腺癌作阳性对照,用 PBS 取代一抗作阴性对照。

(2)原位杂交检测:按照寡核苷酸探针的设计原则设计血小板源生长因子 B (platelet-derived growth factor B, PDGF-B) mRNA 寡核苷酸探针。序列为 91(位) 5'-GAT CGC ACC AAT GCC AAC TTC CTG GTG TGG CCG CCC TGC GTG GAG GTG CAG-3' (141 位),由上海细胞生物研究所 DNA 生物化学合成仪人工合成, PAGE 胶纯化。经地高辛 3' 端加尾标记后采用斑点杂交法检测探针标记效率和确定使用 (1.5 mg/L)。采用常规原位杂交法检测 PDGF-B mRNA 表达。阳性为在细胞浆内分布紫蓝色颗粒状沉淀物。

(3)测量与计数方法:采用多功能彩色病理图像分析系统直接测量动脉横切面内膜厚度和内膜面积;计数血管横切面内膜 200 个细胞中 PCNA 阳性细胞数;计数显微镜高倍视野 ($\times 400$) 下 $0.25 \text{ cm}^2 \times 4$ (即 1 cm^2) 内膜面积中的原位杂交阳性细胞数。

1.8 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验和 χ^2 检验检测各组之间的差异。

2 结果

2.1 pSecTag2B-tPA 重组质粒的构建与表达

本研究成功构建了 pSecTag2B-tPA 重组质粒,将其转染至中国仓鼠卵巢细胞后免疫荧光反应发现被转染的 CHO 细胞胞质荧光素呈强阳性反应,经延迟反应仍呈强阳性,模型组一抗用 β -caterin 抗体可见免疫荧光反应为阴性 (图 1)。

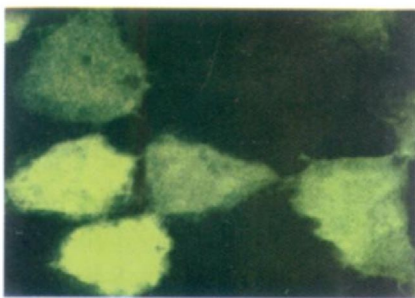


图 1 转染组织型纤溶酶原激活物基因质粒后免疫荧光显示 CHO 细胞呈强阳性反应 (1000 \times)

2.2 基因缝线转染效果

被转染并表达 tPA 的阳性信号分布于基因缝线内及其周围,在缝线内的阳性信号主要分布于反应增生的成纤维细胞、组织细胞和部分多核巨噬细胞;

在缝线周围分布的阳性信号包括成纤维细胞、部分血管壁,主要是周围的骨骼肌细胞,靠近基因缝线的肌肉细胞明显呈强阳性反应。模型组为阴性反应 (图 2)。

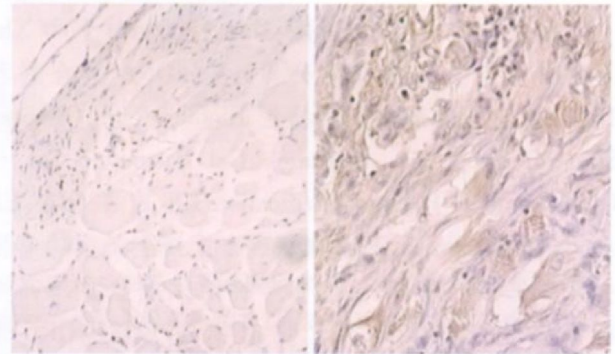


图 2 免疫组织化学检测模型组 (左, 100 \times) 和基因治疗组 (右, 200 \times) 肌肉组织组织型纤溶酶原激活物反应

2.3 血管局部病理改变

模型组 10 只兔双侧髂动脉 (共 20 支) 中 17 支腔内有血栓形成,血栓形成率为 85%;并可见血管内膜不同程度增厚使管腔变窄。基因治疗组 10 只兔共 20 支血管仅有 4 支血栓形成,血栓形成率 (20%) 明显低于模型组 ($P < 0.01$);内膜增厚较轻,未见明显血管狭窄。显微镜下见模型组血管内膜不规则明显增厚,沿管壁分布的粥样斑块,可见中心部坏死和堆积的胆固醇结晶,坏死周边和增生的间质中可见较多的泡沫细胞;粥样斑块周围的内膜中可见平滑肌细胞和纤维母细胞增殖并伴有胶原纤维形成和细胞基质堆积,偶可见少许炎细胞浸润;血管腔可见血栓形成,局部机化。基因治疗组血管内膜增厚较模型组明显减轻,粥样斑块形成较少且病变较轻,坏死不显著,泡沫细胞多堆积在内膜间质中,血管腔血栓明显较少,管腔狭窄大多不明显 (图 3)。

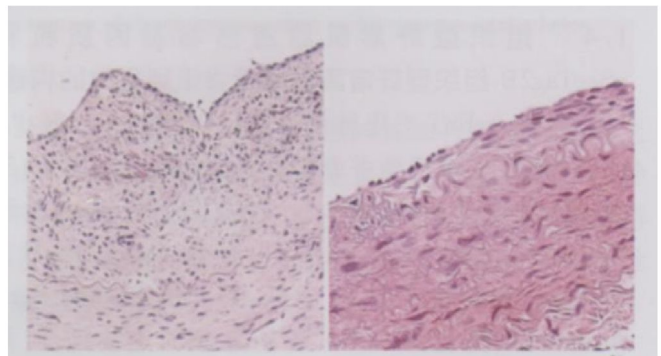


图 3 显微镜下观察模型组 (左, 100 \times) 和基因治疗组 (右, 200 \times) 血管局部病变 (HE 染色)

2.4 血管内膜厚度和内膜面积

对基因治疗组和模型组病变局部血管内膜的内膜厚度和内膜面积进行了形态测量并进行了比较,结果表明基因治疗组经过转基因治疗内膜增生明显比模型组减轻 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 两组冠状动脉内膜厚度和内膜面积对比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	内膜厚度 (μm)	内膜面积 (mm^2)
模型组	10	165.70 \pm 71.21	2.01 \pm 1.15
基因治疗组	10	32.75 \pm 21.50 ^a	0.41 \pm 0.47 ^a

a为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

2.5 血管内膜增殖细胞核抗原和血小板源生长因子 B mRNA 表达

模型组血管内膜 PCNA 和 PDGF-B mRNA 阳性细胞较多,主要分布于内膜增生明显处;基因治疗组内膜增生较轻,PCNA 和 PDGF-B mRNA 阳性表达的细胞明显减少 (表 2 和图 4 $P < 0.01$)。

表 2 各组股动脉内膜细胞增殖细胞核抗原和血小板源生长因子 B mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PCNA 阳性细胞数	PDGF-B mRNA 阳性细胞数
模型组	10	27.78 \pm 12.35	20.40 \pm 11.25
基因治疗组	10	13.55 \pm 8.43 ^a	3.54 \pm 1.78 ^a

a为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

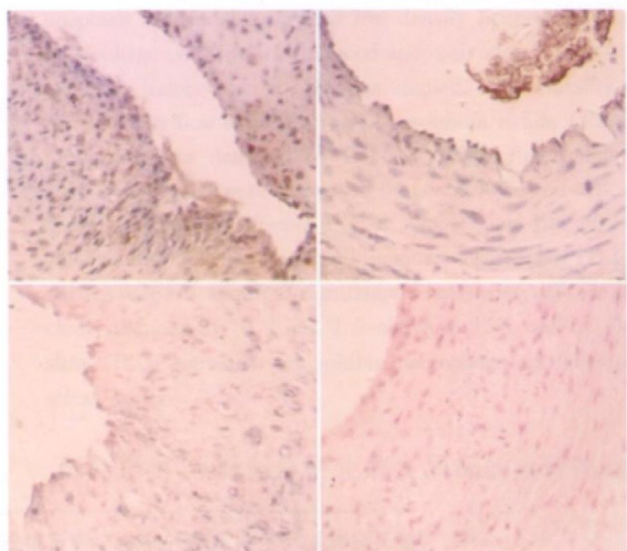


图 4 血管内膜增殖细胞核抗原 (上图, LSAB) 和血小板源生长因子 B mRNA (下图, 原位杂交) 表达 ($\times 200$) 左为模型组, 右为基因治疗组。

2.6 D-二聚体含量和凝血酶原时间的变化

20例兔在实验前抽血查 D-二聚体含量和凝血

酶原时间作正常值;模型组术后 4 周血 D-二聚体含量与实验前相比无明显变化 ($P > 0.05$), 而基因治疗组术后 4 周血 D-二聚体含量较实验前和模型组明显增高 ($P < 0.01$)。此外,同时检测凝血酶原时间并计算国际标准化比值 (international normalized ratio, NR), 术前和术后各组间均无明显变化 ($P > 0.05$, 表 3)。

表 3 血 D-二聚体含量和凝血酶原时间变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	D-二聚体含量 ($\mu\text{g/L}$)	凝血酶原时间 (s)	NR
实验前	20	127.31 \pm 64.50	9.62 \pm 0.27	0.83 \pm 0.06
模型组	10	131.00 \pm 83.72	9.90 \pm 0.38	0.80 \pm 0.05
基因治疗组	10	1336.28 \pm 451.43 ^a	9.53 \pm 0.50	0.82 \pm 0.03

a为 $P < 0.01$, 与实验前和模型组比较。

3 讨论

随着分子生物学研究进展,目前人们已能够构建 tPA 基因的逆转录病毒载体并在体外转导内皮细胞获得 tPA 蛋白的高表达。动物实验证实,将这种转导的内皮细胞贴附于球囊支架表面或动脉桥吻合口可防止支架术后或血管搭桥术后血栓形成和再狭窄的发生,明显提高手术的远期效果^[4]。人重组 tPA 作为生物制剂已在临床广泛应用于冠心病急性心肌梗死、脑栓塞和肺梗死等的溶栓治疗^[5]。血 tPA 含量测定以及相关纤维蛋白降解物如 D-二聚体含量检测已作为监测心、脑血管疾病和其急性事件发生的重要指标^[6]。我们构建了 tPA 基因高表达质粒,经凝胶电泳和测序结果表明完全符合实验要求;体外转染 CHO 细胞获得了 tPA 蛋白的高表达,为进一步体内实验提供了基因药物。

选择合适的基因转导系统对 tPA 基因质粒体内功能的发挥尤为重要。基因缝线技术是用构建的目的基因表达质粒或病毒载体的溶液浸泡外科手术缝线,经反复浸泡、凉干使手术缝线携带足够量的目的基因,并将其缝合于动物肌肉和其它组织中,借此将目的基因转导至局部细胞内达到基因治疗的目的^[7]。这种技术不仅可以使外源性基因在局部组织得到高表达,而且转导时间较长,一般可达 1 年,并具有安全、简便和易行等优点^[8]。本实验用外科手术涤纶缝线携带人工构建的高表达 tPA 基因质粒制备成基因缝线借以转导入实验模型血管周围骨骼肌组织,并利用超声波促进细胞摄取基因药物的能力,获得了 tPA 高转染率和高表达效果。检测血 D-二聚体含量,基因治疗组于术后 4 周明显增高而模型组仍维持在正常水平。伴随着血 D-二聚体含量

的变化两组凝血酶原时间和 NR 值并无明显改变,其重要性在于 tPA 仅激活纤维溶解系统并使已形成的纤维蛋白水解,并不影响机体总的凝血状态,这样可能防止因长期使用抗凝剂发生出血等并发症,用于预防和治疗血栓性相关疾病更具意义。

高胆固醇血症或/和血管内膜损伤使血管局部粘附性因子增高,血液单核细胞在损伤局部堆积并吞噬血管壁增多的脂质形成泡沫细胞,同时活化和释放多种细胞和生长因子。单核巨噬细胞集落刺激因子进一步吸引单核细胞,而 PDGF 等刺激血管中膜的平滑肌细胞向内膜迁移,它们吞噬脂质转变成泡沫细胞,后者是动脉粥样硬化形成的基础^[9]。局部血小板粘附和血栓形成,可释放较多的 PDGF 尤其是 PDGF-B 刺激内膜平滑肌细胞增殖,因此,血栓形成可加速粥样病变的形成并加重血管狭窄^[10]。抑制血栓可能减缓病变的发生或减轻病变。在本实验体系中,我们观察到 tPA 转基因治疗伴随血栓形成明显减少,内膜平滑肌细胞表达 PCNA 和 PDGF-B mRNA 的细胞数量减少,内膜增生受到显著抑制,这表明 tPA 可能用于防止动脉粥样硬化的发生。

[参考文献]

[1] Morimoto T, Nakayama M, Saito Y, et al. Aspirin for primary prevention

- of atherosclerotic disease in Japan [J]. *J Atheroscler Thromb* 2007; **14** (4): 159-166
- [2] Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection [J]. *J Thromb Haemost* 2007; **5** (Suppl 1): 230-237
- [3] Ekhterae D, Stanley JC. Retroviral vector mediated transfer and expression of human tissue plasminogen activator gene in human endothelial and vascular smooth muscle cells [J]. *J Vasc Surg* 1995; **12** (6): 953-961
- [4] Wu ZJ, Yang SF, Zheng SS, et al. To study the effects of local co-transfection vascular endothelial growth factor 165 and tissue-type plasminogen activator genes on inhibiting intimal hyperplasia after operation injury artery in rabbits [J]. *Zhonghua WaiKe Za Zhi* 2005; **43** (13): 861-865
- [5] Albers GW, Amarencu P, Easton JD, et al. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: the seventh ACCP Conference on antithrombotic and thrombolytic therapy [J]. *Chest* 2004; **126** (Suppl 3): 483-489
- [6] Pradhan AD, LaCroix AZ, Langer RD, et al. Tissue plasminogen activator antigen and D-dimer as markers for atherothrombotic risk among healthy postmenopausal women [J]. *Circulation* 2004; **110** (3): 292-299
- [7] 季军, 张浩伟, 张宗久, 等. 转染组织型纤溶酶原激活物基因质粒预防冠脉搭桥术吻合口再狭窄 [J]. *中国现代医学杂志*, 2007; **17** (14): 1683-686
- [8] 姬尚义, 季军, 杨晓涵, 等. 构建组织型纤溶酶原激活物基因质粒预防换机械瓣后血栓 [J]. *岭南心血管病杂志*, 2006; **2**: 61-64
- [9] Ibanez R, Vilahur G, Badimon JJ, et al. Plaque progression and regression in atherothrombosis [J]. *J Thromb Haemost* 2007; **5** (Suppl 1): 292-299
- [10] Weyrich A, Cipollone F, Mezzetti A, et al. Platelets in atherothrombosis: new and evolving roles [J]. *Curr Pharm Des* 2007; **13** (16): 1685-691

(此文编辑 许雪梅)