

靶向超声介导 VEGF165 基因治疗左向右分流肺动脉高压兔模型的实验性研究

尹帆, 陈剑, 丁云川, 王庆慧, 苏璇, 罗庆祎
(昆明医科大学附属延安医院影像科, 云南昆明 650051)

[摘要] **目的** 探讨靶向超声介导 VEGF165 基因治疗左向右分流兔模型肺动脉高压的可行性. **方法** 将 30 只肺动脉高压兔随机分为实验 1 组、实验 2 组和对照组各 10 只, 实验 1 组采用超声破坏微泡造影剂的方法将 VEGF165 基因转染兔, 实验 2 组静脉输入同等量携带 VEGF165 基因的造影剂, 对照组静脉输入同等量单纯造影剂, 14 d 后处死. 处死后免疫组织化学检测肺组织中的 VEGF 蛋白表达及毛细血管计数. **结果** 实验 1 组中可见大量 VEGF 阳性反应的棕褐色颗粒, 而实验 2 组、对照组肺组织中仅有极少量的 VEGF 阳性反应的颗粒, 其差异具有明显统计学意义 ($P < 0.05$). 实验 1 组平均毛细血管密度 (MDV) 为 (387.35 ± 12.80) 个/高倍视野, 组间比较具有显著差异. 实验 1 组 (WT%)、(WA%) 比对照组和实验 2 组明显减小, 其差异有统计学意义 ($P < 0.05$). **结论** 超声介导微泡造影剂携带 VEGF165 基因能提高基因转染率, 促进肺内毛细血管再生.

[关键词] 靶向超声; VEGF163; 肺动脉高压; 微血管密度

[中图分类号] R540.45 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 02 - 0020 - 03

Experimental Study on Targeted Ultrasound Mediated VEGF165 Gene Therapy for Rabbit Model of Pulmonary Hypertension Caused by Left to Right Shunt

YIN Fan, CHEN Jian, DING Yun - chuan, WANG Qing - hui, SU Xuan, LUO Qing - yi
(Dept. of Ultrasound, The Affiliated Yan'an Hospital of Kunming Medical University,
Kunming Yunnan 650051, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the feasibility of targeted ultrasound-mediated VEGF165 gene therapy for rabbit model of pulmonary hypertension caused by left to right shunt. **Methods** 30 rabbits with pulmonary hypertension were randomly divided into 3 groups: experimental group 1, experimental group 2 and control group, 10 animals in each group. Targeted ultrasound-mediated VEGF165 gene therapy was given to rabbits in experimental group 1, the same amount of contrast agent carrying VEGF165 gene was intravenously infused to rabbits in experimental group, and the same amount of contrast agent without VEGF165 gene was intravenously infused to rabbits in control group. All animals were sacrificed after 14 days. The VEGF protein expression was detected by immunohistochemistry and the number of capillary in lung was counted. **Results** Numerous VEGF positive brown particles were found in the lung tissues of rabbits in the experimental group 1, while only few VEGF positive brown particles were found in the lung tissues of rabbits in the experimental group 2 and control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The mean capillary density (MDV) in lungs of rabbits in experimental group 1 was (387.35 ± 12.80) / high power field, and had significant differences with other groups. The WT% and WA% was significantly reduced in experimental group 1, and had significant differences with other groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Ultrasound-mediated microbubble contrast agent carrying VEGF165 gene can improve gene

[基金项目] 云南省应用基础研究基金资助项目 (2010CD205)

[作者简介] 尹帆 (1963~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事超声诊断工作

[通讯作者] 陈剑. E-mail: 7529064@qq.com

transfection efficiency, and promote the regeneration of lung capillary.

[**Key words**] Targeted ultrasound; VEGF163; Pulmonary hypertension; Microvascular density

肺动脉高压是一种以肺血管阻力增加、肺动脉压 (pulmonary arterg pressure, PAP) 升高为主要特征的疾病, 是以肺血管受累为起点, 以右心衰竭为终点的一类诊断复杂、治疗棘手、预后极差的多系统疾病^[1]。治疗肺动脉高压的药物多为传统的吸入和普通静脉给药, 特异性较差, 半衰期较短; 基因治疗则多以腺病毒为载体, 普遍存在基因转移载体进入人体后的安全性问题即载体进入体内后, 容易引起炎症或免疫性反应^[2]。本研究拟以脂质体微泡靶向肺动脉高压动物模型传输治疗基因, 进行初步实践, 为超声介导微泡空化靶向传输基因治疗肺动脉高压寻找一种方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 左向右分流肺动脉高压兔模型建立: 选 2.5 ~ 3.0 kg 雄性新西兰大白兔 30 只, 在动脉韧带水平于主动脉与肺动脉直接置入塑料导管连接主动脉与肺动脉, 4 周后即可建立左向右分流肺动脉高压的兔模型, 30 只兔随机分为实验 1 组、实验 2 组和对照组各 10 只。采用超声破坏微泡造影剂的方法将 VEGF165 基因转染兔。

1.1.2 仪器和试剂 采用 Aloka- α 10 彩色多普勒超声显像仪, 心脏探头, 频率为 3.5MHz。全氟丙烷气体, 卵磷脂、胆固醇, 血管内皮生长因子 165 即 VEGF165 片段 (由英国 Serotec 公司出品), FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (北京中山生物技术有限公司出品)。

1.2.3 超声微泡制备 携带药物超声造影微泡的制备卵磷脂、胆固醇 3:1 混匀, 旋转蒸发制成冻干脂质体, 通入全氟丙烷气体后, 用超声振荡法制成脂质体微泡; 取血管内皮生长因子 165 原液以 1:100 稀释, 取自制全氟丙烷脂质超声造影剂与 VEGF165 稀释液 1:1 混合, 加入 0.1%戊二醛置于 4 摄氏度冰箱孵育 2 h, 促使抗体与微泡外壳充分交联, 后以 PBS 洗涤、离心、分层。取上浮泡沫悬液, 即得携 VEGF165 的超声造影剂。与 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 稀释液 1:1 混合后, 收获抗 ICAM-1 及 FITC 双重标记的白蛋白靶向超声造影剂, 立即置于荧光显微镜下观察, 确定造影微泡已携带 VEGF165。

1.2 方法

1.2.1 肺动脉压测定 运用超声测量其三尖瓣反流频谱, 估测肺动脉压力。

1.2.2 超声造影检查 兔模型经耳缘静脉输入对应超声造影剂 1 mL, 4V1 探头, 启用 2 次谐波模式使发射频率和接受频率分别为 1.75 MHz 和 3.5 MHz, 将机械指数调至最大, 聚焦深度为 4 cm, 焦点选取心底短轴肺动脉主干处。采用心电触发, 每 6 ~ 8 个心动周期触发 1 次约 10 min。14 d 后处死, 取肺动脉及远端肺组织, 放置于 -80 °C 低温冰箱保存备用。

1.2.3 肺组织 VEGF 蛋白表达 将石蜡包埋切片后的肺组织行 VEGF 免疫组织化学染色, 观察 VEGF 蛋白表达情况, 阳性染色物质定位出现于细胞胞浆内, 以胞浆内出现清晰淡黄色至棕褐色颗粒为阳性, 以无色或模糊淡黄色颗粒为阴性, 分别计数 5 个高倍镜视野细胞阳性率。

1.2.4 毛细血管染色检测用 CD34 标记 进行免疫组织化学检测各组肺组织石蜡切片中的血管内皮细胞, 观察毛细血管新生的情况, 并记数肺组织中微血管密度。记数方法为每张切片选择 5 个血管最高的区域, 在 400 倍视野下进行记数, 求其平均数; 微血管判定标准: 凡染成棕黄色的数个内皮细胞或内皮细胞簇均为 1 个血管计数。

1.2.5 肺血管组织学检查 取肺组织用 10% 中性福尔马林液固定 1 d, 沿肺门横断取材, 石蜡包埋切片, 行 HE 染色, 显微镜下观察, 测量与呼吸性细支气管和肺泡管伴行的肺小动脉外径、管壁厚度、血管总面积和血管壁面积, 计算出管壁厚度占外径的百分比 (WT%) 管壁面积占总面积的百分比 (WA%)。

1.3 统计学分析

各项原始数据软件自动导入 Excel 表格, 采用 SPSS 统计软件分析数据。各组数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较, 计量资料采用方差分析, 计数资料采用 χ^2 检验; 各相关参数的关系采用 logistic 回归分析。分别对比各组间各参数的差异做对比分析。

2 结果

2.1 VEGF 蛋白表达

14 d 实验组所有接受 VEGF165 基因治疗的肺组织中均有不同程度的 VEGF 蛋白, 其中超声介导实验 1 组中可见大量 VEGF 阳性反应的棕褐色颗粒, 5 个高倍镜视野细胞阳性率为 67.6%, 而单纯基因实验 2 组 VEGF 阳性反应的棕褐色颗粒较少, 5 个高倍镜视野细胞阳性率为 11.4%; 对照组肺组织中仅有极少量的 VEGF 阳性反应的颗粒, 5 个高倍镜视野细胞阳性率为 4.3%, 超声介导实验 1 组细胞阳性率明显高于单纯基因实验组和对照组, 其差异有统计学意义 ($P < 0.05$).

2.2 肺组织中新生血管记数

以 CD34 标记, 微血管染为棕黄色, 超声介导基因实验 1 组平均毛细血管密度 (MDV) 为 (387.35 ± 12.80) 个 / 高倍视野, 实验 2 组为 (163.64 ± 25.67) 个 / 高倍视野, 而对照组为 (101.04 ± 34.55) 个 / 高倍视野, 组间比较有显著差异 ($P < 0.05$).

2.3 肺血管组织学检查

实验 1 组管壁厚度占外径的百分比 (WT%) 为 (15.1 ± 1.5) 、管壁面积占总面积的百分比 (WA%) 为 (30.4 ± 4.1) , 实验 2 组管壁厚度占外径的百分比 (WT%) 为 (29.3 ± 2.2) 、管壁面积占总面积的百分比 (WA%) 为 (51.4 ± 9.1) , 对照组管壁厚度占外径的百分比 (WT%) 为 (33.5 ± 2.5) 、管壁面积占总面积的百分比 (WA%) 为 (56.7 ± 9.9) , 实验 1 组 (WT%)、(WA%) 比对照组和实验 2 组明显减小, 其差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 对照组与实验 2 组相比较其 WT%、WA% 稍大, 但其差异无统计学意义 ($P > 0.05$).

3 讨论

肺动脉高压的发生主要机制包括血管收缩、肺血管重构和原位血栓形成. 肺动脉高压的细胞和分子机制研究进展目前主要表现在细胞和分子机制等多个方面, 目前认为多种细胞因子参与的炎症机制是肺动脉高压发生的重要原因. 缺氧、自身免疫性抗体、病原微生物等多种因素可以导致促炎症因子表达升高, 激活炎症细胞和下游的信号传导通路启动增殖过程和炎性病变. 传统的治疗 PAH 的方法分别针对肺动脉高压多种发病机制及其不同环节, 这些药物主要通过阻断发病机制的某个环节发挥作用, 可以起到改善作用, 但其离改善肺动脉高压患者长期预后的目的还很远. 人类基因组计划的完成和后基因组计划的实施为肺动脉高压的治疗提供了新思路, 因而基因治疗肺动脉高压的研究也成为目

前肺动脉高压治疗研究的热点. 基因治疗具有作用特异性强、效果稳定、持续时间长、毒副作用小等优点. Mata-Greenwood 等^[3]观察先天性心脏病所致高肺血流量导致的肺高压模型羊肺组织中的 VEGF 及其受体 Flt-1 and Flk1/KDR 的表达, 结果表明高肺血流量导致的肺高压模型羊肺组织中的 VEGF 及其受体 Flt-1 and Flk-1/KDR 水平明显高于对照组. 提示 VEGF 及其受体可能在肺血管重建过程中起重要作用.

1996 年 Unger^[4]开创了利用超声介导微泡空化靶向传输系统定向释药的先河, 并且发明了组织特异性强, 可用于心血管、肝、脾及肾靶向传输药物的脂质微泡. 2000 年 Lawrie^[5]报告超声波辐射可使单纯裸质粒基因在心血管的转染效率增加 10 倍; 可使质粒脂质体法的转染效率再增加 3 倍; 如果使微气泡与质粒混合则比单纯裸质粒的转染效率增加 300 倍 (有空化效应); 如果使用的微泡是脂质体微泡则基因转染效率将比单纯裸质粒基因的转染效率增加 3000 倍. 程文等^[6]报道, 超声引导下瘤体内注射超声造影剂和 p53 基因后用超声波照射, 既可有效地控制肝癌基因治疗的靶向性, 又能提高外源基因的表达量.

本实验研究发现, VEGF165 基因微泡治疗组中, 14 d 时 VEGF 蛋白表达量增加, 新生微血管明显增加, 而实验 2 组与对照组 VEGF 蛋白表达量及新生血管较少; 本研究还发现 VEGF165 基因微泡治疗组 (试验 1 组) 肺组织中新生血管记数有显著增加, 肺血管组织学检查: 管壁厚度占外径的百分比 (WT%)、管壁面积占总面积的百分比 (WA%) 明显减小, 与其余 2 组比较其差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 说明超声介导含 VEGF165 基因的方式可以实现转基因的高效表达和促肺组织血管新生. 本研究以上述理论、研究背景为依据, 利用分子生物学、细胞生物学及声学造影技术, 以脂质含氟烷气体微泡在动物肺组织水平探索超声介导微泡空化靶向传输投送放射性核素标记大分子物质的可行性, 以脂质体微泡在细胞水平初步探索超声介导微泡空化促内皮细胞基因转染的条件; 最后以脂质体微泡靶向肺动脉高压动物模型传输治疗基因和药物, 并在肺动脉高压动物模型进行初步实践; 为超声介导微泡空化靶向传输系统的深入研究及肺动脉高压的基因治疗提供提供一新的基因转移途径和治疗方法.

(下转第 26 页)

的. 当然, 还需要进一步研究证实其安全性.

[参考文献]

- [1] 胡涛, 曾祥富, 张晓海, 等. 高渗盐水降低颅脑损伤后高颅内压的临床效果观察[J]. 中国临床神经外科杂志, 2010, 15(05):305-306.
- [2] 管宇航, 沈峰, 潘庆刚, 等. 7.5%高渗盐水与20%甘露醇治疗颅高压的对比研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2009, 30(3):261-262.
- [3] 秦川. 医学实验动物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:257-259.
- [4] 梁楠, 王仙凤, 张晓. 颅脑损伤动物模型的制备及评价[J]. 创伤外科杂志, 2008, 10(4):376-378.
- [5] 刘书琴, 章科娜, 郑慧霞, 等. 甘露醇和高渗盐水缓解家兔颅内高压的效果比较[J]. 浙江大学学报(医学版), 2012, 41(2):166-170.
- [6] 贾宏彬, 朱四海, 周志强, 等. 高渗盐水复合液对兔颅脑损伤后颅内压及脑水肿的实验研究[J]. 医学研究生学报, 2009, 22(4):359-362.

(2012-12-04 收稿)

(上接第22页)

[参考文献]

- [1] YUAN J X, ALDINGERAM, JUHASZOVAM, et al. Dysfunctional voltagegated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension[J]. Circulation, 1998, 98 (14):1 400-1 406.
- [2] GOMBERG MAITLANDM, OLSCHESKI H. Prostacyclin therapies for the treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. Eur Respir J, 2008, 31:891.
- [3] MATA-GREENWOOD E, MEYRICK B, SOIFER S J, et al. Expression of VEGF and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR is altered in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285(1): 222-231.
- [4] UNGER E C, MCCREERY T P, SWEITZER R H, et al. Ultrasound enhances gene expression of liposomal transfection[J]. Invest Radiol, 1997, 32(12):723-727.
- [5] LAWRIE A, BRISKEN A F, FRANCIS S E, et al. Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery [J]. Gene therapy, 2000, 7:2 023-2 027.
- [6] 程文, 张青萍, 贡雪灏, 等. 超声引导下瘤体内注入超声造影剂和p53基因治疗大鼠肝癌的初步研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2004, 13(7):543-546.

(2012-12-07 收稿)

版权声明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文, 作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意编辑部上述声明.

《昆明医科大学学报》编辑部