

两种基因转染方法对外源基因在心肌组织中表达的影响

雷娟¹, 伍卫^{2*}, 薛声能¹, 郑韶欣¹

(中山大学 1. 附属第二医院心血管内科, 广东 广州 510120, 2. 附属第五医院心血管内科, 广东 珠海 519000)

摘要:【目的】比较两种基因转染方法对外源基因在心肌组织中表达的影响。【方法】20只SD大鼠随机分为尾静脉注射(IV)组和心肌内注射(IM)组各10只,分别于冠状动脉结扎前后在体转染携带绿色荧光蛋白报告基因的腺病毒,荧光显微镜下观察绿色荧光在心肌组织中的表达情况。【结果】术后存活的6只IV组大鼠心肌组织在腺病毒转染后24h和14d均观察不到绿色荧光,但在其肝脏组织中检测到大量绿色荧光表达。术后存活的7只IM组大鼠注射部位心肌在腺病毒转染后24h和14d均检测到绿色荧光表达,而肝脏组织内未见绿色荧光。【结论】心肌内注射法能够使外源基因在心脏组织中特异性地高表达,而静脉注射法却不能。

关键词: 静脉注射法; 心肌内注射法; 基因治疗

中图分类号: R542.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)01-0056-03

Effect of Two Transfection Methods on Foreign Gene Expression in Myocardium

LEI Juan¹, WU Wei^{2*}, XUE Sheng-neng¹, ZHENG Shao-xin¹

(1. Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;

2. Department of Cardiology, The Fifth Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Zhuhai 519000, China)

Abstract: 【Objective】 To compare the effect of two transfection methods on foreign gene expression in myocardium. 【Methods】 Twenty SD rats were randomized to tail intravenous injection group (IV) and intramyocardial injection group (IM). There were 10 rats in each group. Adenovirus carrying green fluorescence protein (AdGFP) was transferred into rats before and after coronary artery ligation. Green fluorescence expressing in myocardium was observed by fluorescent microscopy after transferring AdGFP. 【Results】 There were six rats survived after operation in IV group. No green fluorescence could be observed in myocardium. However, there were abundant green fluorescence in liver 24 hours and 14 days after AdGFP transfection. There were seven rats survived after operation in IM group. Green fluorescence could be observed in myocardium, while little could be observed in liver 24 hours and 14 days after AdGFP transfection. 【Conclusion】 Intramyocardial injection makes exogenous gene highly express in myocardium specifically, while tail intravenous injection can not.

Key words: intravenous injection; intramyocardial injection; gene therapy

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(1): 56-58]

基因治疗作为一种新的治疗策略,在心血管疾病的治疗中显示出广阔的前景^[1]。如何选择合适的方法对体内心肌细胞进行有效转染,使外源基因表达局限在心肌细胞等靶细胞内,从而达到心脏疾病基因治疗的目的,又避免目的基因在其他组织器官表达引起副作用,以确保基因治疗的

安全,成为目前医学研究的热点^[2]。本研究选用重组缺陷腺病毒作为基因转移载体,比较当前主流的两种在体基因转染方法对外源基因在心肌组织中表达的影响,为今后合理选择基因转染方法提供实验依据。

收稿日期: 2008-07-08

基金项目: 广东省科技计划(2008B030301333)

作者简介: 雷娟, 博士生, 主治医师, E-mail: lejjuan_1@hotmail.com; * 通讯作者: 伍卫, 博士生导师, E-mail: Wu.wei@medmail.com.cn

1 材料与方 法

1.1 实验材料与分组

清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 20 只, 体质量 $250 \sim 300 \text{ g}$ ($275 \pm 15.3 \text{ g}$), 由广州中医药大学实验动物中心提供。随机分为尾静脉注射 (IV) 组和心肌内注射 (IM) 组。携带绿色荧光蛋白报告基因的腺病毒 (adenovirus carrying green fluorescent protein, AdGFP) 购于北京诺赛基因组研究中心有限公司。

1.2 心肌梗死动物模型的制作

参照文献[3]制作大鼠心肌梗死模型, 根据心电图和心肌组织颜色确定冠脉结扎成功。

1.3 腺病毒在体转染

①IV 组: 冠脉结扎术前, 取 $100 \mu\text{L}$ 滴度为 2×10^{10} PFU 的 AdGFP, 用生理盐水稀释至 1 mL , 于尾静脉内注入, 随后结扎冠状动脉^[4]。②IM 组: 冠脉结扎术后, 取 $100 \mu\text{L}$ 滴度为 2×10^{10} PFU 的 AdGFP, 用微量注射器沿梗死边缘区选取 10 个点行心肌内注射 (每点 $10 \mu\text{L}$)^[5]。

1.4 心肌及肝脏组织绿色荧光表达的检测

分别于转染后 24 h 时和 14 d 处死大鼠, 立即取出心脏和肝脏, 冰盐水洗净血迹后行冰冻切片, 荧光显微镜下观察绿色荧光表达情况 (操作过程注意避光)。

2 结 果

2.1 大鼠生存情况

10 只 IV 组大鼠, 尾静脉注射时死亡 1 只, 冠脉结扎术中死于心室颤动和心跳呼吸骤停 3 只, 存活 6 只。10 只 IM 组大鼠, 冠脉结扎术中死亡 2 只, 心内注射时死亡 1 只, 存活 7 只。

2.2 两组大鼠心肌组织绿色荧光表达情况的比较

IV 组大鼠心肌在 AdGFP 转染后 24 h 和 14 d 均未检测到绿色荧光表达。IM 组大鼠心肌在 AdGFP 转染后 24 h 即可检测到绿色荧光, 主要集中在病毒注射部位; AdGFP 转染后 14 d 仍可检测到绿色荧光表达, 但较前有所减弱 (图 1)。

2.3 两组大鼠肝脏组织绿色荧光表达情况的比较

IV 组大鼠肝脏组织在 AdGFP 转染 24 h 后可见大量绿色荧光表达; IM 组大鼠肝脏组织在

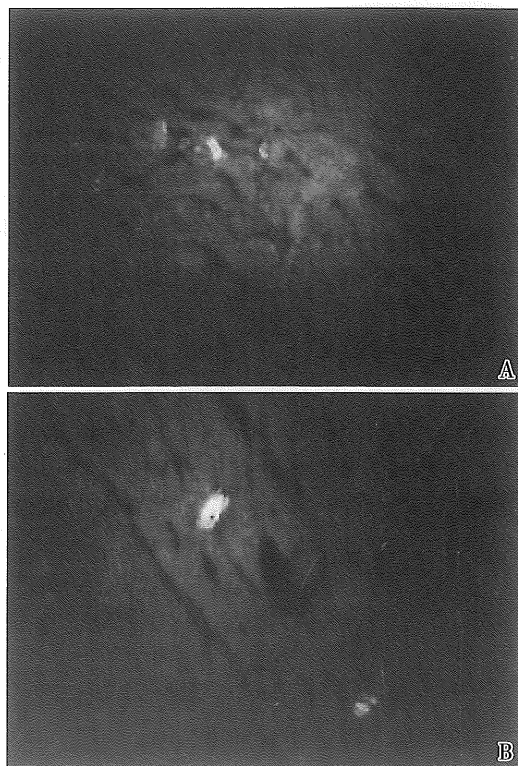


图 1 大鼠心肌组织冰冻切片

Fig.1 Ice slice of myocardium of the rats

A: IM group 24 hours; B: IM group 14 days (fluorescence microscope, $\times 400$)

AdGFP 转染 24 h 未见绿色荧光表达 (图 2)。

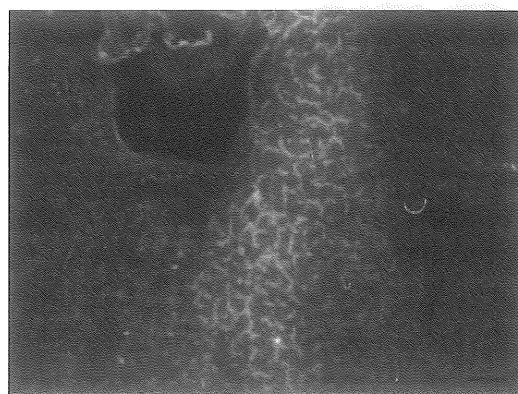


图 2 大鼠肝脏组织冰冻切片

Fig.2 Ice slice of liver of rats

IV group 24 hours (fluorescence microscope, $\times 200$)

3 讨 论

众所周知, 基因治疗成功的关键在于外源基因能够在心肌组织中特异性地高表达。然而, 由于

心脏结构和血流动力学的特殊性,并非每一种转染方法都能够实现心肌细胞的基因转移。选择何种方法对体内心肌细胞进行有效转染,成为心脏疾病基因治疗研究的热点。

在体基因转染的方法有多种,但由于心脏结构的特殊性,并非每一种方法都适用于心脏疾病的基因治疗。静脉注射法虽然操作简便、易行,符合临床应用的要求,但由于目前所用的载体对心肌细胞的靶向性不强,经血液稀释后对心肌细胞的转染效率很低,使其在心脏疾病的基因治疗中受到限制。有学者通过静脉注射重组腺病毒的方法对小鼠体内的骨骼肌和心肌进行长期基因转染,注射15 d仅有0.2%的新生鼠心肌细胞得到了转染^[6]。冠状动脉注入法虽然可以较高的滴度实现对心肌的基因转移^[7],但只适用于大动物。心包注射法虽然符合心肌靶向性的要求,但由于存在心包脏层肌膜的屏障,使载体对心肌的感染仅局限在心外膜下。研究证实^[8],将载体注射入心包腔内进行对心肌的转染,在心包壁层和左心房组织可观察到外源基因的表达,而在左、右心室仅见低水平的表达。

心肌内注射法不但操作简单,而且很容易实现心肌细胞的基因转移,对局部的心肌具有较高的转染效率,是体内心肌基因转染的理想途径。虽然有学者认为,心肌内注射时外源基因仅局限于注射部位,不能实现心肌广泛的基因转移,使其在基因治疗中受到限制^[9]。但由于心脏结构和病变的特殊性,常常并不需要外源基因在心肌内广泛表达。例如在病态窦房结综合征和心肌梗死的基因治疗中,治疗者希望导入的外源基因集中表达在窦房结和梗死边缘区,此时心肌内注射法显示出其它基因转染法不能与之比拟的独到优势。

本研究结果显示,尾静脉注射法虽然可以将外源基因转入体内,并在体内加以表达,但是外源基因主要集中在肝脏,基本不在心肌组织中表达,这样难以达到心脏疾病基因治疗的目的。与国外研究结果一致^[10]。心肌内注射法能够按照实验者的意愿,严格控制外源基因表达的部位,使其在目标部位特异性地高水平表达,而其他部位和心脏外组织不表达或者少表达,从而达到减少副作用,确保基因治疗安全的目的。心肌内注射法是某些心脏疾病基因治疗时体内基因转染的理想途径。

考虑到心肌细胞是终末分化细胞,本实验还

选用了重组缺陷腺病毒作为基因转移载体。腺病毒具有转染效率高、对外源DNA片段容量大的特性。它不仅能感染分裂期的细胞,而且能感染终末分化的细胞,非常适合对体内外心肌细胞的感染^[11]。心肌内注射法与腺病毒载体的联合应用,更有助于提高外源基因在心肌组织中的表达,提高基因治疗的成功率。

参考文献:

- [1] Levonen AL, Vähäkangas E, Koponen JK, et al. Antioxidant gene therapy for cardiovascular disease: current status and future perspectives [J]. *Circulation*, 2008, 117(16):2142-2150.
- [2] Vinge LE, Raake PW, Koch WJ. Gene therapy in heart failure [J]. *Circ Res*, 2008, 102(12):1458-1470.
- [3] Zhang YL, Zhou SX, Lei J, et al. Effects of perindopril on left ventricular remodeling and osteopontin expression in rats with myocardial infarction [J]. *South China journal of cardiology*, 2007, 8(3):159-165.
- [4] Vanhoutte D, Schellings MW, Götte M, et al. Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2007, 115(4):475-482.
- [5] 胡承恒, 杨燕华, 王小庆, 等. 人脐血单个核细胞移植对大鼠急性心肌梗死后血管再生的作用 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(4):391-395.
- [6] Stratford-Perricaudet LD, Makeh I, Perricaudet M, et al. Widespread long-term gene transfer to skeletal muscles and heart [J]. *J Clin Invest*, 1992, 90(2):626-630.
- [7] Meluzín J, Vlašín M, Groch L, et al. Intracoronary delivery of bone marrow cells to the acutely infarcted myocardium. Optimization of the delivery technique [J]. *Cardiology*, 2008, 112(2):98-106.
- [8] Cunningham JT, Bruno SB, Higgs KA, et al. Intrapericardial procaine affects volume expansion induced fos immunoreactivity in unanesthetized rats [J]. *Exp Neurol*, 2002, 174(2):181-192.
- [9] 高文谦, 李小鹰. 心肌基因转导研究进展 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2001, 3(3):200-203.
- [10] Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(10):1735-1737.
- [11] 李德, 伍卫, 周淑娴. FK BP12.6 重组腺病毒载体的构建及其心肌细胞感染效率测定 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(3):271-275.

(编辑 孙慧兰)