

包裹支架转移治疗基因到猪冠状动脉的实验研究

吴隐雄¹, Thomas Johnson², Christian Herdeg³, Andreas Baumbach², Andrew C Newby²,
Karl K Karsch², Martin Oberhoff²

(1. 广西壮族自治区医院心血管内科, 广西 南宁 530021; 2. 英国布里斯托大学心脏研究所, 布里斯托 BS2 8HW 英格兰;
3. 图比根大学附属医院心内科, 图比根 72076 德国)

摘要:【目的】寻找一种有效转送治疗基因到扩张冠状动脉的靶部位的运载工具, 用于预防冠状动脉损伤后再狭窄。【方法】治疗组用高分子聚合物 phosphorylcholine (PC) 包裹不锈钢丝的包裹支架, 对照组用非包裹支架。①体外研究: 经用复制缺陷的重组腺病毒 β -Gal (1×10^9 pfu/ml) 处理后, 将支架植入刚获得的新鲜猪冠状动脉内, 植入了支架的冠状动脉分别用一种液体冲洗, 共分成 5 组, 每组 5 例, 1 组无冲洗、2 组生理盐水、3 组造影剂、4 组血液、5 组培养液。对照组用生理盐水冲洗。然后培养 48 h 后固定, X-Gal 染色, 进行组织学分析。②在体研究: 支架经用复制缺陷的重组腺病毒 RvdTIMP3 处理后, 植入猪的冠状动脉, 7 d 后处死猪, 取血标本作血液学检验。心脏、脑、肺、肝、脾组织、部分冠状动脉靶部位置入液氮保存, 作 PCR 分析。【结果】①体外包裹支架转移率分别为: 无冲洗组 $6.9\% \pm 3.7\%$, 生理盐水组 $6.6\% \pm 3.6\%$, 培养液组 $7.2\% \pm 2.5\%$, 造影剂组 $7.4\% \pm 1.9\%$, 血液组 $16.2\% \pm 9.3\%$ 。对照组 $1.9\% \pm 0.5\%$, 与生理盐水冲洗的治疗组比较差异有显著性, $P = 0.025$ 。②仅治疗组在治疗部位的冠状动脉及远端血管组织中有 TIMP3 出现, 其他器官组织中均未发现有 TIMP3。【结论】经 PC 包裹的支架可有效地输送含有治疗基因的腺病毒到冠状动脉靶部位, 液体的冲洗对转移率无明显影响, 这种 PC 包裹的支架可作运载工具用于支架内再狭窄的治疗。

关键词: 冠状动脉; 再狭窄; 包裹支架; 腺病毒

中图分类号: R543.305

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)05-0471-04

Novel Biosynthetic Stent Coating Capable of Local Gene Delivery in Porcine Coronary Artery

WU Yin-xiong¹, Thomas Johnson², Christian Herdeg³, Andreas Baumbach², Andrew C Newby²,
Karl K Karsch², Martin Oberhoff²

(1. Guangxi Provincial Hospital, Nanning 530021, China; 2. Bristol Heart Institute, University of Bristol, Bristol BS2 8HW UK;
3. Department of Cardiology University of Tubingen, 72076 Tübingen Germany)

Abstract: 【Objective】To develop a suitable vehicle for local delivery of adenovirus to coronaries, offering promise for the use of therapeutic viruses to prevent restenosis. 【Methods】A novel coated stent, PC-2028 (Biocompatibles, Farnham, U. K.) was tested. Uncoated stents were used in the control groups. ① *In-vitro* Work: Freshly harvested porcine coronary arteries were stented with b-Gal pre-treated PC-2028 coated stents and flushed with one of five solutions ($n = 5$ for each group)-no flush, 0.9% saline, contrast medium, culture medium or blood. Uncoated stents were used as control and flushed with 0.9% Saline. Stented segments were then cultured for 48 hours, prior to fixation and X-Gal staining. Transduction was quantified both macroscopically (% area stained blue) & histo-

收稿日期: 2002-09-02

基金项目: 英国心脏基金会资助项目

作者简介: 吴隐雄(1959-), 男, 江西丰城人, 副主任医师, 2002—2003 年在英国布里斯托大学心脏研究所做访问学者, 主要从事冠心病介入治疗后再狭窄的防治研究, 本研究是作者在此期间完成。E-mail: wiyiyu@hotmail.com

logically using Image Pro 4. 1. ② *In-vivo* Work: TIMP3 virus treated PC-2028 stents were deployed in porcine coronary arteries under radiographic control. Blood, coronaries and major organs were then harvested following 7 days. In addition to transduction quantification (as with *in vitro* experiments), PCR was performed on all harvested tissue samples to assess the systemic distribution of the virus and confirm local delivery to the stented coronary artery.【Results】① PC-stainless steel coupons showed superior transduction compared to uncoated coupons. Transduction rates for the *in vitro* PC-stents were quantified at a macroscopic level: no flush 6. 9% ± 3. 7%, 0. 9% saline 6. 6% ± 3. 6%, culture media 7. 2% ± 2. 5%, contrast media 7. 4% ± 1. 9%, and blood 16. 2% ± 9. 3%. Transduction rate for uncoated stent was 1. 89% ± 0. 47%, significantly lower than that of PC stent, $P = 0. 025$. ② *In vivo*, we could demonstrate localized transduction within the stented area, without systemic distribution of the virus.【Conclusion】Our results demonstrate effective and targeted, *in vitro* and *in vivo*, transduction of adenovirus from a stent using a novel biosynthetic coating to coronaries. With the advent of highly specific viral vectors and an increasing library of genetic targets for the manipulation of vascular pathology, this coated stent could be a suitable vehicle for future management of in-stent restenosis.

Key words: coronary artery; restenosis; coated stent; adenovirus

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(5): 471 ~ 474, 478]

目前防治冠状动脉介入治疗后再狭窄的尝试有很多,基因治疗是一个很有前途的方法。基因转移是基因治疗的关键之一,我们用有生物合成物质作包裹层的包裹支架,来传递作为基因载体的腺病毒感染猪的冠状动脉,观察其病毒转染基因转移的效果,试图找到一种转送腺病毒到冠状动脉的运送工具,用于预防再狭窄的基因治疗,报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

包裹支架是英国 Biocompatible 公司生产的 phosphorylcholine (PC) 包裹支架,其包裹层带阳离子正电荷,提高了对负电荷的腺病毒的转移效果。腺病毒 β -Gal 及 RadTIMP3 取自 Bristol Heart Institute, University of Bristol。大白猪购自 Bristol 当地指定饲养场。

1.2 体 外 研 究

以非包裹支架和 PC 包裹支架用腺病毒 β -Gal 处理,然后以球囊扩张的方法将支架植入刚获得的新鲜猪冠状动脉内。非包裹支架作对照,5 例,植入了非包裹支架的冠状动脉用生理盐水冲洗;PC 包裹支架的共分成 5 组,每组 5 例,植入了包裹支架的冠状动脉分别用 1 种液体冲洗,1 组无冲洗、2 组用生理盐水、3 组用造影剂、4 组用血液、5

组用培养液,将各组分别置入有培养液的培养皿中,置于 CO₂ 培养箱中培养 48 h,纵行切开冠状动脉,移去支架,体积分数为 10% 福尔马林固定 24 h, X-Gal 染色,标本数码摄影,用数字显微镜 (Image Pro4. 1 软件) 测量染色的面积。将标本作病理切片,用数字显微镜 (Image Pro4. 1 软件) 测量切片染色的面积。

1.3 在 体 研 究

大白猪 10 只, 12. 5 ~ 15. 7 kg, 随机分包裹支架组和非包裹支架组, 每组 5 只, 经肌肉注射肌松剂赛拉嗪后, 以氟烷面罩吸入麻醉, 行气管插管, 然后行右侧股动脉穿刺, 选用与左前降支中段管腔的比值为 1. 1 ~ 1. 2: 1 大小的包裹支架或非包裹支架, 置入已解冻的 RadTIMP3 病毒悬液中浸泡 15 min, 用常规方法植入左前降支, 送回饲养室后, 以标准的环境、条件饲养, 观察、记录各种异常情况。术前 2 d 开始给阿司匹林 2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 持续至术后 7 d, 术中肝素化 50 U/kg。植入支架后 7 d, 猪再次行左冠状动脉造影, 然后放血处死动物, 同时收集血标本作常规检验。冠状动脉、心肌、脑、肺、肝、脾各取一小块组织置入液氮保存, 作 PCR 分析, 另一小块组织作病理切片, 以观察是否有病理改变。

1.4 RT-PCR

为检测冠状动脉植入支架段及其远端、所供血

的心肌,及脑、肝、脾中有无 Rad TiMP-3 病毒基因的表达,对这些组织做 TIMP-3 的 cDNA PCR 检测。取每种器官组织 20 mg,以异硫氰胍进行溶解,用 CsCL 梯度离心分离出所有的 mRNA,加入 1 × 反转录缓冲液,以 1 mg 组织对 1 份反转录缓冲液的比例进行逆转录,在建立 cDNA 池以后,10 μL 的 cDNA 加入 TIMP-3 引物进行扩增,共扩增 35 个循环,变性 94 °C 30 s (第 1 循环 2 h),退火 62 °C 40 s,延伸 72 °C 90 s。然后进行琼脂胶电泳 2 h (电压 100V),溴乙啶染色,数码摄影。

1. 5 统计学处理

所有的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较分析用双尾不对称 *t* 检验, $P < 0.05$ 被认为有显著性差异。

2 结果

2. 1 RT-PCR

从图 1 可见,治疗组仅在治疗部位的冠状动脉(左起第 3 箭头)、远端血管(长箭头)及心肌组织(左起第 1 箭头)中有 TiMP-3 的 mRNA 反转录的 cDNA 出现(左起第 2 箭头为 TiMP-3 阳性对照),而其他器官组织,包括脑、肺、肝、脾中均未发现有反转录的 cDNA,说明此包裹支架输送的,经腺病毒作载体的 TiMP-3 基因主要转移到靶部位,而在其

他组织没有检查出这一基因的转录表达。对照组中,所有组织均未发现这一基因转录的 mRNA 反转录的 cDNA(照片略)。

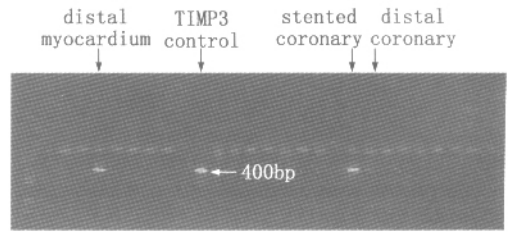


图 1 各种组织 TiMP3-cDNA 琼脂胶电泳

Fig. 1 The Electrophoresis of TIMP3-cDNA of tissues

RT-PCR for mRNA of TIMP-3 shows that TIMP3's cDNA has been found only on the coronaries (Third arrow), which were TIMP3 stented, it's distal coronary (Long arrow) and distal myocardium (First arrow), but not on other tissues (The second arrow is TIMP-3 positive control, the marker was DRIGest III, TIMP3 fragment we detect is ~400 bp)

2. 2 转染率

结果如图 2 所示,测量大体标本(A 行)和切片(B 行)染成蓝色(有 β-Gal 表达)的面积,以%表示。以较低的腺病毒浓度(10⁹pfu)达到表达 β-Gal,显微镜下体外包裹支架转移率分别为:无冲洗组 6.9% ± 3.7% (列 1),生理盐水组 6.6% ± 3.6% (列 2),造影剂组 7.4% ± 1.9% (列 3),培养液组 7.2% ± 2.5% (列 4),血液组 16.2% ± 9.3% (列 5)。

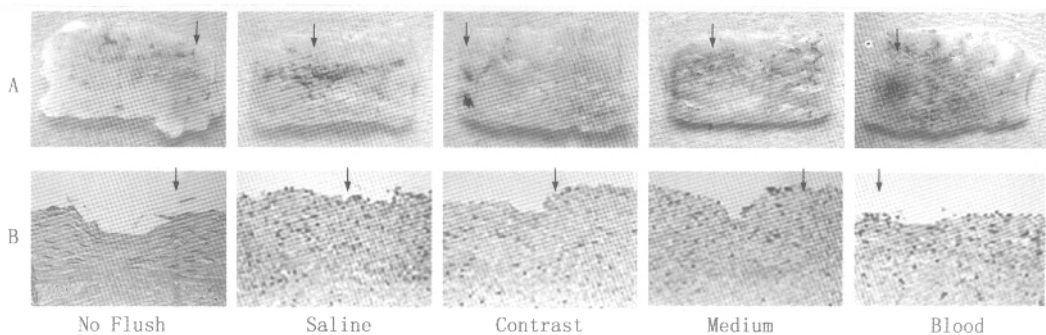


图 2 无冲洗和不同冲洗液的标本和切片 β-Gal 表达

Fig. 2 The expression of β-Gal in macroscopy and histology (Arrow-Blue)

The expression of β-Gal both macroscopically (row A) and histologically (row B). no flush 6.9% ± 3.7%, saline 6.6% ± 3.6%, contrast 7.4% ± 1.9%, culture medium 7.2% ± 2.5%, blood 16.2% ± 9.3%

PC 包裹支架转染腺病毒能力明显高于非包裹支架,生理盐水冲洗的非包裹支架组转染率 1.9% ± 0.5%,而同为生理盐水冲洗的包裹支架组转染率 6.6% ± 3.6%,两组比较差异有显著性, $P = 0.025$ 。

2. 3 毒副作用观察

动物的观察(外观、体温、食欲及大小便情况)及处死动物后血液检验及多个器官组织切片检查未发现明显的毒副作用及组织学改变。

3 讨 论

许多研究已经显示,基因治疗用于抑制冠状动脉球囊/支架扩张后的新生内膜形成、增厚所导致的再狭窄,具有光明的前景^[1, 2]。

用于转移基因的载体常用的有病毒、质粒和脂质体等^[3]。病毒作为载体转移基因的效率^[3-5],但因易引起炎症和免疫反应等问题^[4, 5],其使用的安全性受到普遍的重视^[6]。天然的腺病毒经改良后毒性已明显降低,但仍具有较高的转移基因的能力^[7]。将腺病毒改良,使其直接结合到宿主的腺病毒受体(此病毒改良后编有一半乳糖苷酶的基因并含有特殊的纤维蛋白)可提高 10~15 倍转染效果^[8],因而已成为最常用的基因治疗的载体^[9, 10]。本研究正是基于这一优点,应用腺病毒作载体,结果显示基因转移的效果好,未发现明显的毒副作用及组织学改变。

局部基因治疗可以达到高效,低毒副作用^[11]。局部基因治疗的关键是找到有效的基因和有效的传送方法。腔内传送基因物质可分经外科手术或经导管^[12]。导管转移损伤少,在双球囊技术中,治疗部位的两端被封闭(双球囊),中间则注射含基因物质液体,可以达到较好的转移基因效果,但如有分支存在则受到一定的影响。一种球囊导管含有两个同轴球囊,在球囊扩张时,基因物质通过外球囊上的小孔转入到血管壁中。水凝胶球囊的水凝胶含有基因物质,当球囊扩张时,这些物质就被转送和黏附于血管壁上。灌注球囊也可用于这一目的^[13],但动脉硬化限制了细胞的摄取。带有微小针头的球囊在扩张时,可通过小针头注射基因物质到中层和外层^[14]。包裹支架可提供一个有效的基因转送平台,已显示出其良好的效果^[11]。本研究应用以高分子聚合物 phosphorylcholine 包裹不锈钢丝的包裹支架,作为含 β -Gal 基因的腺病毒的运载工具,将腺病毒转送到扩张后的猪冠状动脉靶部位,进行局部基因转移。结果显示:①仅靶部位及远端的冠状动脉有 TIMP3 基因的表达,其他组织器官未发现有 TIMP3 基因的表达。这提示经包裹支架的输送治疗基因主要转移到了靶部位的细胞。②PC 包裹支架转运腺病毒能力显著高于非包裹支架,这是因为高分子聚合物 phosphorylcholine 的包裹层带有正电荷,腺病毒带有负电荷。

我们的研究证明,用有生物合成物质包裹的支架,在体外和体内试验中,能有效地将腺病毒这个广泛用转移基因的有效载体转送到靶部位-冠状动脉,此包裹支架可作为一个有效的运工具,进行以腺病毒介导的基因转移用于介入治疗后再狭窄的基因治疗中。

本研究未能明确血液冲洗组明显高于其他液体组的原因,有待后续的研究予以解决。

参考文献:

- [1] Chang M W, Barr E, Liu M M, *et al.* Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(5): 2260.
- [2] Asahara T, Bauters C, Pastore C, *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.
- [3] Morishita R, Aoki M, Kaneda Y, *et al.* Gene therapy in vascular medicine: recent advances and future perspectives [J]. *Pharmacol Ther*, 2001, 91(2): 105.
- [4] Elkon K B, Liu C C, Gall J G, *et al.* Tumor necrosis factor plays a central role in immune-mediated clearance of adenoviral vectors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(18): 9814.
- [5] Zhang H G, Zhou T, Yang P, *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor alpha decreases inflammation and prolongs adenovirus gene expression in lung and liver[J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(13): 1875.
- [6] Muul L M, Tuschong L M, Soenen S L, *et al.* Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for twelve years and immune reaction to gene transfer components: Long-term results of the first clinical gene therapy trial[J]. *Blood*, 2003, 101(7): 2563.
- [7] Minter R M, Ferry M A, Murday M E, *et al.* Adenoviral delivery of human and viral IL-10 in murine sepsis [J]. *J Immunol*, 2001, 167(2): 1053.
- [8] Su E J, Stevenson S C, Rollence M, *et al.* A genetically modified adenoviral vector exhibits enhanced gene transfer of human smooth muscle cells [J]. *J Vasc Res*, 2001, 38(5): 471.
- [9] Yoshimura I, Ikegami S, Suzuki S, *et al.* Adenovirus

(下转第 478 页 to page 478)

VEGF 与子宫内膜癌预后的关系。

参考文献:

- [1] 曹泽毅. 妇科肿瘤学 [M]. 北京: 北京出版社, 1998. 740 ~ 775.
- [2] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 80(1): 4.
- [3] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density with breast carcinoma and other solid tumors [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36(2): 169.
- [4] Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor with intratumoral microvessel density and tumor cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 1996, 73(7): 931.
- [5] Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182.
- [6] Obermair A, Wanner C, Bilgi S, *et al.* Tumor angiogenesis in stage IB cervical cancer: Correlation of microvessel density with survival [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1998, 178(2): 314.
- [7] Hollingsworth H C, Koha E C, Steinberg S M, *et al.* Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(1): 33.
- [8] Kaku T, Kamura T, Kinukawa N, *et al.* Angiogenesis in endometrial carcinoma [J]. *Cancer*, 1997, 80(4): 741.
- [9] 崔金全, 马楠, 孙丽君. 血管生成在子宫内膜癌发生发展中的作用 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2001, 17(2): 109.
- [10] Yokoyama Y, Sato S, Futagami M, *et al.* Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and its receptors in endometrial carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2000, 77(3): 413.
- [11] Salvesen H B, Akslen L A. Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas [J]. *Int J Cancer*, 1999, 84(5): 538.
- [12] Chen C A, Cheng W F, Lee C N, *et al.* Serum vascular endothelial growth factor in epithelial ovarian neoplasms: correlation with patient survival [J]. *Gynecol Oncol*, 1999, 74(2): 235.
- [13] 李德川, 冯海洋, 徐笑红. 大肠癌患者血清 VEGF 水平的临床研究 [J]. *癌症*, 2001, 20(3): 314.

(编辑 张恩健)

(上接第 474 页 form page 474)

- mediated prostate specific enzyme prodrug gene therapy using prostate specific antigen promoter enhanced by the Cre-loxP system [J]. *J Urol*, 2002, 168(6): 2659.
- [10] Zhang W, Lu D, Kawazu S, *et al.* Adenoviral insulin gene therapy prolongs survival of IDDM model BB rats by improving hyperlipidemia [J]. *Horm Metab Res*, 2002, 34(10): 577.
- [11] Harvey B G, Maroni J, O'Donoghue K A, *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.
- [12] Willard J E, Landau C, Glamann D B, *et al.* Genetic modification of the vessel wall: Comparison of surgical and catheter-based techniques for delivery of recombinant adenovirus [J]. *Circulation*, 1994, 89(5): 2190.
- [13] Laitinen M, Makinen K, Manninen H, *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer to lower limb artery of patients with chronic critical leg ischemia [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(10): 1481.
- [14] Barath P, Popov A, Dillehay GL, *et al.* Infiltrator angioplasty balloon catheter: A device for combined angioplasty and intramural site-specific treatment [J]. *Cathet Cardiovasc Diagn*, 1997, 41(3): 333.

(编辑 黄小延)