

重组腺相关病毒载体介导成纤维细胞生长因子 2 基因诱导缺血心肌血管新生

袁 洪¹, 黄志军¹, 吴小兵², 彭建强², 闫宏伟¹, 阳国平¹, 唐晓鸿¹

(1. 中南大学湘雅三医院医学实验中心, 湖南省长沙市 410013;

2. 863 计划生物领域病毒基因载体研发基地, 北京市 100052)

[关键词] 病理学与病理生理学; 腺相关病毒; 成纤维细胞生长因子; 缺血心肌; 血管新生; 基因治疗

[摘要] 探讨重组 2 型腺相关病毒载体介导 2 型成纤维细胞生长因子基因诱导家兔缺血心肌血管生成的作用。实验对象为 20 只新西兰兔, 手术建立心肌缺血模型后随机分为成纤维细胞生长因子基因治疗组和对照组, 分别向缺血区域心肌注射成纤维细胞生长因子腺相关病毒或磷酸盐缓冲液。4 周后取心肌及肝、肾等器官组织标本, 采用逆转录聚合酶链反应检测目的基因 mRNA 的表达; 制作组织学切片以观察组织病理改变, 于高倍镜下计数缺血区域微血管数目。结果发现转染的 2 型成纤维细胞生长因子基因在缺血心肌中有表达, 成纤维细胞生长因子基因治疗组缺血区域单个高倍视野内的微血管数为 12.0 ± 1.4 条, 对照组为 4.5 ± 1.5 条, 二者差异具有显著性 ($P < 0.01$)。2 型成纤维细胞生长因子基因治疗组的肝脏、肾脏、脾脏、角膜和睾丸标本中均未发现 2 型成纤维细胞生长因子基因的表达, 病理检查也未发现组织结构异常。说明腺相关病毒载体介导的 2 型成纤维细胞生长因子基因可以有效地转染入家兔缺血心肌, 并具有明显的诱导缺血心肌血管生成的作用, 且基因表达仅限于心肌。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Recombinant Adeno-associated Viral Vector 2-Mediated Fibroblast Growth Factor 2 Gene Transfer Induces Angiogenesis in Ischemic Heart

YUAN Hong, HUANG Zhi-Jun, WU Xiao-Bin, PENG Jian-Qiang, LU Hong-Wei, YANG Guo-Ping, and TANG Xiao-Hong
(The Center of Experimental Medical Research in the Third Xiangya Hospital, Centre South University, Changsha, 410013, China)

[KEY WORDS] Adeno-associated Virus; Fibroblast Growth Factor 2; Myocardial Ischemia; Angiogenesis; Gene Therapy

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of fibroblast growth factor 2 (FGF2) cDNA mediated by recombinant adeno-associated viral vector 2 (rAAV-2) on ischemic myocardium. **Methods** 20 rabbit myocardial ischemic models were generated by ligation of the anterior descending coronary artery. All these models were randomly divided into 2 groups: FGF2 gene therapy group (1012 v. g./kg) and control group. rAAV-2/FGF2 or PBS was injected into the ischemic myocardium respectively. After 4 weeks, the expression of objective gene mRNA was evaluated by RT-PCR. The histological changes of myocardium and other organs were observed through histological sections. Myocardial capillary counts were calculated to evaluate the proangiogenic effects. **Results** FGF2 gene expression was observed in rAAV-2/FGF2 treatment group. The microvessel counts of this group and control group were $(12.0 \pm 1.4)/\text{HPF}$ and $(4.5 \pm 1.5)/\text{HPF}$ respectively. There was significant difference between two groups ($P < 0.01$). In rAAV-2/FGF2 1012 v. g./kg treatment group, there was no FGF2 gene expression in liver, kidney, spleen, cornea or testis. And no abnormality was detected in tissues structure through histopathological detection. **Conclusions** FGF2 gene mediated by rAAV-2 can be efficiently transferred into rabbit ischemic heart and induce angiogenesis of myocardium successfully. FGF2 gene expression is limited in myocardium.

心血管疾病基因治疗的研究热点则主要集中在基因载体和治疗基因的选择上, 腺相关病毒 (AAV) 具有免疫原性低、表达时间长、宿主范围广等特点, 是目前较理想的基因治疗载体^[1]。而成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 具有促内皮细胞和平滑肌细胞增殖、迁移、分化的作用, 是一种强效

的促血管生成物质^[2]。本研究拟通过注射重组 2 型腺相关病毒 (rAAV-2) 介导的 FGF2 cDNA 到兔缺血心肌, 探讨 rAAV-2/FGF2 的促血管生成作用。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性新西兰兔 20 只, 体重 2.0~2.5 kg, 由中南大学动物实验学部提供。无菌手术建立心肌缺血模型成功后, 随机分为 rAAV-2/FGF2 治疗组 (简称

[收稿日期] 2004-09-20 [修回日期] 2004-11-09

[基金项目] “863” 高科技发展计划 (863-BH03-05-02) 资助项目

[作者简介] 袁洪, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向是心血管疾病的基因治疗。黄志军, 硕士, 主要研究方向是冠心病的基因治疗。

FGF2 基因治疗组) 和手术对照组(简称对照组), 每组 10 只。rAAV-2/FGF2 由 863 计划病毒基因载体研发基地构建, 采用“一种病毒感染一个载体细胞株”的方法生产^[3], 滴度为 $1 \times 10^{15}/L$ 。

1.2 动物模型的建立

参考文献[4]复制家兔心肌缺血模型。并作心肌酶学指标检查, 以鉴定心肌缺血模型是否成功。

1.3 基因导入方法

参考文献[4], 向治疗组家兔缺血区心肌分 6 点注射 rAAV-2/FGF2 $10^{12}/kg$, 对照组家兔注射磷酸盐缓冲液。

1.4 缺血心肌形态及新生血管数目的观察

参考文献[4]观察缺血心肌形态和计数新生血管密度。

1.5 半定量逆转录聚合酶链反应检测 2 型成纤维细胞生长因子基因的表达

参考文献[4]进行 PCR。FGF2 mRNA PCR 扩增产物为 281 bp, 引物序列为: 上游 5'-CCCAGT-TCGTTTTCAGTGC-3'; 下游 5'-CTTCCTCCTGCGCATCCAC-3'。GAPDH 的 PCR 扩增产物为 437 bp, 引物序列为: 上游 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAA-3'; 下游 5'-GCATGGACTGTGGTCATGAGT-3'。

1.6 统计学分析

所有数据均采用 SPSS10.0 统计软件包统计; 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 新西兰兔心肌缺血模型建立情况

20 只新西兰兔在模型制作过程中, 因气胸死亡 2 只, 因室颤死亡 2 只, 其余 16 只均顺利完成模型制作, 成功率为 80%。CK-MB 在各组间无显著性差异($P > 0.05$), 说明各组模型的心肌缺血程度一致。

2.2 成纤维细胞生长因子 mRNA 的表达

治疗组标本 PCR 产物电泳可见 281 bp 和 437 bp 两条带(图 1, Figure 1), 提示 FGF2 mRNA 在心肌中有表达; 而对照组心肌只发现 437 bp 的内对照 GAPDH 基因条带, 提示无 FGF2 基因表达。

2.3 成纤维细胞生长因子腺相关病毒载体的促血管生成效应

治疗组缺血区域单个高倍视野内的微血管数为 12.0 ± 1.4 条, 而对照组为 4.5 ± 1.5 条, 两组间差异具有显著性($P < 0.01$)。病理切片发现, 基因治疗组心肌缺血区域可见较多的微血管生成, 心肌细胞

形态趋于正常, 在心肌纤维间伴有中性粒细胞浸润; 而对照组心肌肌纤维坏死仍很明显, 伴有较广泛的肌溶解及心肌细胞空泡变性, 周边部炎症细胞浸润明显, 心肌纤维间小血管结构明显较少, 有胶原形成(图 2, Figure 2)。

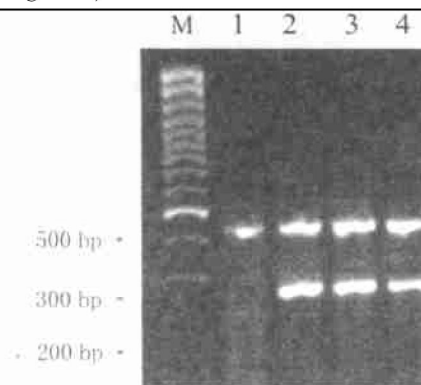


图 1. 缺血心肌中成纤维细胞生长因子 mRNA 的表达 M 为 DNA 标记, 1 为对照组心肌标本, 2、3 和 4 为治疗组心肌标本

Figure 1. Expression of FGF2 mRNA in ischemic myocardium

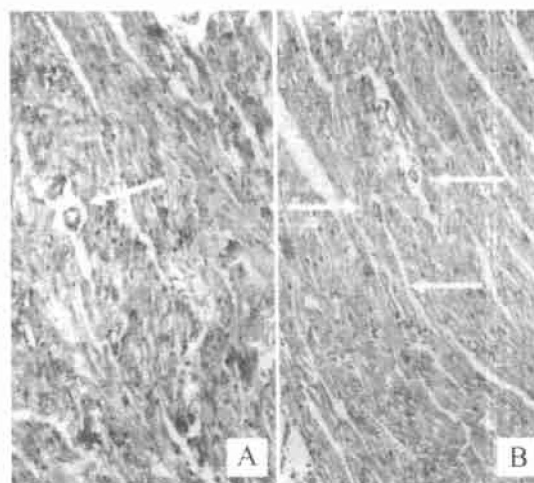


图 2. 各组缺血心肌的病理学改变 (HE $\times 400$) A 为 FGF2 基因治疗组心肌切片, 可见心肌纤维紊乱; B 为对照组心肌切片, 可见新生血管较多(箭头所指即新生血管)。

Figure 2. Pathological changes of ischemic myocardium in different groups

2.4 成纤维细胞生长因子基因在其他器官的表达

治疗组的肝脏、肾脏、脾脏、睾丸和角膜标本 PCR 产物电泳未发现 281 bp 大小的条带(图 3, Figure 3), 表明未检测到 FGF2 mRNA 的表达。病理检查未发现组织结构异常。

3 讨论

病毒载体在心血管病基因治疗中的应用占据优

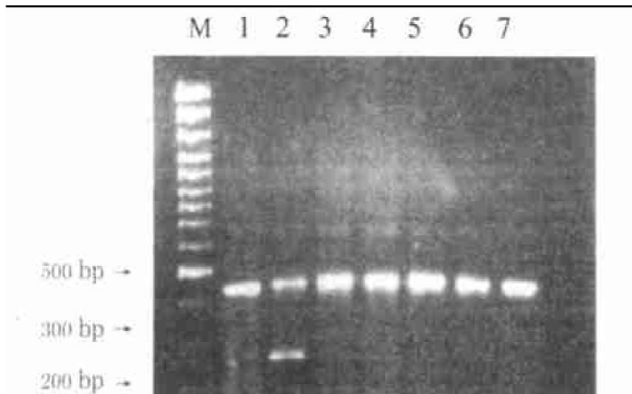


图3. 治疗组其它器官成纤维细胞生长因子 mRNA 的表达

M 为 DNA 标记, 1 为阴性对照, 2 为心肌, 3~7 分别为肝脏、肾脏、脾脏、睾丸和角膜标本。

Figure 3. Expression of FGF2 mRNA in different organs of treated group

势地位, 目前以病毒为载体的方案占 53%^[5]。但原来常用的病毒载体存在一定缺陷: 逆转录病毒随机插入宿主基因组, 有使受体细胞恶变的可能, 而且只能转染处于分裂期的细胞; 腺病毒可转染各种细胞, 但易引起机体的免疫反应, 影响基因的有效表达。AAV 结构简单, 在自然界中广泛存在, 几乎 90% 的成年人都受过其感染, 但从未表现出任何的疾病症状和细胞恶化。它既能感染分裂细胞又能感染包括肌肉^[6,7]在内的非分裂细胞; 文献[8]报道 rAAV 携带目的基因在动物体内表达可以超过 2 年; 而重组的 AAV 已经完全去除了病毒基因组中的编码序列, 不表达病毒自身蛋白, 免疫原性更低。全球已有多项 AAV 载体介导的临床试验和临床前试验正在进行中, 它被誉为是将来五年中最重要的病毒载体。

以往的基因治疗多以携带 FGF cDNA 的腺病毒或者裸质粒作为研究对象, 而以携带 FGF 基因的 rAAV 作为载体治疗家兔心肌缺血模型的研究尚未见文献报道。本研究结果显示导入 rAAV-2/FGF2 的局部心肌组织可以较持久地表达 FGF。在注射部位, 可以见到明显的新血管生成, 未见因过度表达 FGF 而引起的血管瘤样病变。各主要脏器病理检查未发现肿瘤等新生物。在心脏以外的脏器中未检测到 rAAV-2/FGF2 基因组序列, 提示本研究采用的心肌注射方法和 rAAV 载体的剂量是安全的。

2 型成纤维细胞生长因子 (FGF2) 是血管生长因子家族重要成员, 它具有促进血管内皮再生、侧枝循环建立、抑制内膜增生和改善内皮依赖性舒张等作用。但 FGF 基因治疗一直存在争议, 因为 FGF 除了能促内皮细胞增殖以外, 还能促平滑肌细胞 (SMC) 增殖, 引起血管再狭窄而导致不利重塑, 甚至有报道

说抑制 FGF 可防止再狭窄^[9]。但国内外多数报道认为只要 FGF 剂量控制得当, 就可以发挥其有利重塑的作用, 而不会引起血管再狭窄^[10,11]。

有研究对心肌内注射 FGF 基因和蛋白进行对比研究, 发现心肌内注射蛋白和基因均有促缺血心肌血管新生的作用, 而基因的促血管新生作用更强。这说明同样剂量的基因和蛋白前者可持续表达, 作用较蛋白显著, 表明心肌内注射 FGF 基因可以发挥更强的生物学效应, 促进血管新生, 从而对缺血心肌产生保护作用^[12]。

本研究结果表明 rAAV-2 介导的 FGF2 基因可以有效地转染入家兔缺血心肌, 并具有明显的诱导缺血心肌血管生成的作用, 且基因表达仅限于心肌。

[参考文献]

- [1] Baker AH. Designing gene delivery vectors for cardiovascular gene therapy. *Prog Biophys Mol Biol*, 2004, **84** (2-3): 279-299
- [2] Ninomiya M, Koyama H, Miyata T, Hamada H, Miyatake S, Shigematsu H, et al. Ex vivo gene transfer of basic fibroblast growth factor improves cardiac function and blood flow in a swine chronic myocardial ischemia model. *Gene Ther*, 2003, **10** (14): 1 152-160
- [3] 吴小兵, 董小岩, 伍志坚, 屈建国, 侯云德. 一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴随病毒载体的方法. *科学通报*, 2000, **45** (19): 2 071-075
- [4] 黄志军, 袁洪, 曾钧发, 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. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (6): 627-631
- [5] Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*, 1998, **101** (11): 2 567-578
- [6] Isner JM, Vale PR, Symes JF, Losordo DW. Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ Res*, 2001, **89** (5): 389-400
- [7] Herzog RW, Yang EY, Couto LB, Hagstrom JN, Elwell D, Fields PA, et al. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adenovirus-associated viral vector. *Nat Med*, 1999, **5** (1): 56-63
- [8] Snyder RO, Spratt SK, Lagarde C, Bohl D, Kaspar B, Sloan B, et al. Efficient and stable adenovirus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum Gene Ther*, 1997, **8** (16): 1 891-900
- [9] Favre D, Provost N, Blouin V, Blanco G, Cherel Y, Salvetti A, et al. Immediate and long-term safety of recombinant adenovirus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol Ther*, 2001, **4** (6): 559-566
- [10] Tappr-Brethaudiere J, Drouet B, Matou S, Mourao PA, Bros A, Letourneur D, et al. Modulation of vascular human endothelial and rat smooth muscle cell growth by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. *Thromb Haemost*, 2000, **84** (2): 332-337
- [11] 谭强, 李易, 张小勇, 光雪峰, 孙林, 熊国昌, 等. 碱性成纤维细胞生长因子基因对心肌梗死后冠状血管新生及血管结构的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 291-294
- [12] Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti V, Kitsiou AN, et al. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation*, 1996, **94** (5): 1 074-082
- [13] 李易, 谭强, 张小勇, 孙林, 光雪峰, 马雁冰, 等. rhbFGF 基因及其蛋白促兔缺血心肌血管新生的对比研究. *中国微循环*, 2003, **7** (3): 143-145

(此文编辑 胡必利)