

• 实验研究 •

rAAV-CD151 基因在大鼠缺血后肢血管再生中的作用及血管造影评分

黄畦, 刘正湘, 蓝荣芳, 宋玉娥, 刘晓春, 张欣, 汪道文

【摘要】 目的:研究肌肉转染重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)介导的 CD151 基因在大鼠后肢缺血模型中促血管再生和血运重建的作用。**方法:**分别包装携带有 CD151 基因和 GFP 基因的重组腺相关病毒(rAAV-CD151, rAAV-GFP)。Wistar 大鼠 12 只, 随机分为实验组和对照组, 每组各 6 只。实验组大鼠左下肢肌肉注射局部转染 rAAV-CD151, 对照组注射 rAAV-GFP, 基因转染 2 周后行股动脉切除术建立左侧大鼠后肢缺血模型。通过后肢血管造影和缺血肌肉组织毛细血管密度检测, 观察缺血肢体血管再生和评价血运重建情况。Western blot 检测两组大鼠局部缺血肢体 CD151 表达。**结果:**股动脉切除术 4 周(基因转染 6 周)后, 后肢血管造影结果显示实验组缺血侧血管评分平均为 2.56 ± 0.37 , 对照组平均为 1.57 ± 0.39 ; 实验组缺血后肢肌肉组织毛细血管密度为 $(609.00 \pm 83.89) / \text{mm}^2$, 对照组为 $(517.00 \pm 70.65) / \text{mm}^2$; 两组比较差异均有显著性意义($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示实验组大鼠缺血侧肌肉组织 CD151 表达为对照组的 2.96 倍。**结论:**局部高表达 CD151 基因能够提高缺血组织的血管再生能力, 促进缺血组织的血运重建; CD151 将为缺血性疾病的血管再生治疗提供新的靶点。

【关键词】 血管造影术; 模型, 动物; 重组腺相关病毒; 血管再生;

【中图分类号】 R815; R655 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2005)12-1093-04

Effects of rAAV-CD151 Gene on the Neovascularization and Angioscore of Angiography in the Model of Rat Hind-limb Ischemia HUANG Qi, LIU Zheng-xiang, LAN Rong-fang, et al. Department of Cardio-thoracic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, P. R. China

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of AAV-mediated CD151 gene on neovascularization and the angioscore of angiography in the model of rat hind-limb ischemia. **Methods:** The recombinant adeno-associated virus vector containing CD151 gene (rAAV-CD151) and the recombinant adeno-associated virus vector containing sense GFP gene (rAAV-GFP) were produced. 12 Wistar rats were randomly divided into two groups, The rats of experimental group and control group were intramuscularly injected rAAV-CD151 and rAAV-GFP (1×10^{10} pfu/rat) respectively. After 2 weeks of transfection, the femoral arteries of the rats were excised to establish the model of left hind-limb ischemia. The contrast angiography of the hind-limb and the capillary density of the ischemic muscular were detected to measure the formation of new blood vessels. The expression of the CD151 in the ischemic tissue was detected by Western blot. **Results:** The hind-limb angiography showed that the average angiographic score was 2.56 ± 0.37 in experimental group and 1.57 ± 0.39 in control group. The capillary density was $609 \pm 83.89 / \text{mm}^2$ in experimental group and $517 \pm 70.65 / \text{mm}^2$ in control group. All the differences between the two groups were statistically significant ($P < 0.05$). The expression of CD151 in ischemic hind-limb of experimental group was 2.96 times as high as control group. **Conclusion:** High expression of CD151 in the ischemic tissue can stimulate the formation of the new blood vessels and promote the foundation of the blood flow. The CD151 may be a new target of the neovascularization therapy in the ischemic disease.

【Key words】 Angiography; Models, animal; Recombinant adeno-associated virus (rAAV); Neovascularization;

近年来, 心血管疾病的外科和介入治疗均取得了很大进展, 但仍然不能彻底解决肢端缺血和心肌缺血性疾病治疗中的诸多问题。有些研究者开始考虑利用

分子生物学手段增强局部缺血组织侧支循环建立, 促进器官功能恢复。体外实验证实, CD151 在整合素促细胞迁移和血管形成信号转导中起着重要的作用^[1,2], 但其在整体水平的效应尚未可知。在缺血性疾病中增强 CD151 的表达, 能否促进缺血组织的血管生成, 进而达到改善血运重建及恢复缺血组织器官功能的效果目前尚未见报道。本研究旨在经动物实验观察高表达 CD151 基因增强整合素来源信号的转导促

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院心胸外科(黄畦), 心内科(刘正湘、蓝荣芳、宋玉娥、汪道文); 430030 华中科技大学同济医学院神经生物学系(刘晓春); 美国田纳西大学分子科学部(张欣)

作者简介: 黄畦(1966—), 男, 湖北人, 副教授, 博士, 主要从事心胸外科学研究工作。

通讯作者: 刘正湘, E-mail: liuzhengxiang@hotmail.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270563)

进缺血组织血管生成和血运重建能力,即 CD151 分子在活体水平能够发挥促血管生成及血运重建的作用。

材料和方法

1. 材料

PzeoSV-CD151 质粒由美国田纳西大学分子科学部赠送,包装质粒 pAAV-GFP 和辅助质粒 PXX2、pXX6 均由美国北卡罗莱那州立大学基因治疗中心惠赠。大肠杆菌 DH5 α 菌株购自美国 Invitrogen 公司,各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自大连宝生物有限公司。N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid (BES)和 CaCl₂·2H₂O 购自 Sigma 公司;蛋白质提取试剂 Trizol 购自美国 Life technologies 公司。Western 杂交显影用增强的化学发光试剂(SuperSignal substrate, ECL)购自美国 Pierce 公司,核酸预杂交液(Hybrisol solution)购自 Intergen 公司,PVDF 膜和尼龙膜购自德国 Schleicher and Schuell 公司,[α -32P]-dCTP(3000 Ci/mmol)购自北京亚辉同位素公司,探针标记试剂盒(随机引物标记试剂盒,Primer-It II Random Primer Labeling Kit)购自美国 Stratagene 公司。鼠抗人 CD151 多克隆抗体购于美国 Serotec 公司,抗Ⅷ因子多克隆抗体购自北京中山公司。雄性成年 Wistar 大鼠 12 只,每只重(150 $\pm$ 10) g,清洁级,购于华中科技大学同济医学院动物学部。

2. 重组包装质粒 pAAV-CD151 的构建

以 PzeoSV-CD151 质粒为模板,设计合成一对引物。For: 5'-GAGATCTATGGGTGAG TTCAAC-GAG-3' 划线处为 BamHI 酶切位点,Rev: 5'-GGAATTCCTCAGTAGTGCT CCAGCTTGAG-3' 划线处为 NotI 酶切位点。PCR 扩增 CD151 基因片段,并将其插入到包装质粒 pAAV 的 CMV 启动子下游,构建重组包装质粒 pAAV-CD151,酶切鉴定,并测序。

3. 重组腺相关病毒 rAAV-CD151 和 rAAV-GFP 的包装及滴度测定

碱裂解法分别大量提取 pAAV-CD151、pAAV-CD151、pXX6 和 pXX2 质粒,氯化铯超速离心纯化。用磷酸钙法将包装质粒(pAAV-CD151 或 pAAV-GFP)、pXX6 和 pXX2 共同转染 293 细胞,包装并收获 rAAV-CD151 和 rAAV-GFP 病毒原液。

斑点杂交确定病毒的滴度。病毒原液用 DNase I (0.125 U/ μ l)和 RNase A(0.2 μ g/ μ l)于 37℃ 消化 1 h,蛋白酶 K(1 mg/ml)于 37℃ 消化 1 h。酚/氯仿抽提纯化后加入 0.4 M NaOH/10 mM EDTA,沸水煮

10 min 使其变性后立即置于冰上。梯度稀释后的病毒原液经多孔过滤加样器聚集在尼龙膜上,将膜于 80℃ 干烤 2 h 后依次进行预杂交和杂交,洗膜,最后曝光,洗片,即可观察结果。

4. 大鼠后肢局部转染重组腺相关病毒

成年 Wistar 雄性大鼠 12 只,随机分成实验组和对照组,每组各 6 只,分别经肌肉多点注射转染 rAAV-CD151 和 rAAV-GFP(每只注射 1 $\times$ 10¹⁰ pfu)。注射位点分别为:股内收肌(3 点)、股四头肌(3 点)、半膜肌(2 点)、腓肠肌(2 点),每个注射位点 100 μ l。基因转染 2 周后制备大鼠后肢缺血模型。

5. 大鼠后肢缺血模型的建立

2%乌拉坦 0.6 ml/100 g 麻醉大鼠,1%活力碘消毒左后肢皮肤 2 次。行大鼠后肢纵行切口从腹股沟韧带向下延伸至膝关节。在股动脉起始部和远端隐动脉与腿弯动脉分叉之间游离股动脉,结扎所有游离段股动脉分支,切除股动脉,建立大鼠后肢缺血模型。

6. 后肢血管造影与新生血管评分

股动脉切除术 4 周(基因转染 6 周)后,乌拉坦麻醉待造影大鼠(2%乌拉坦 0.6 ml/100 g)。剥去后肢皮肤减少皮肤血管影像的干扰。行腹部纵行切口,在肾动脉分叉处以下切开腹主动脉,将塑料导管(20#)顺向插管至左右髂总动脉分叉处,注入 1 ml 肝素抗凝。泛影葡胺以 40 ml/min 流率注入动脉内。实时监测血管影像,在显影后的第 4 秒拍摄照片行新生血管评分。

参照常用血管评分方法^[3],将大鼠后肢血管造影片以网格覆盖,每格大小为 1 cm $\times$ 1 cm。在缺血侧大腿股骨大转子至股骨下端区域计数每格内的血管数。

$$\text{新生血管评分} = \frac{\text{总血管数}}{\text{格子数}}$$

7. 免疫组化检测毛细血管密度

股动脉切除术 4 周(基因转染 6 周)后,处死两组大鼠。取大鼠后肢缺血侧肌肉组织,经 10%甲醛固定,石蜡包埋,3 μ m 厚连续横断面切片。采用免疫组化 SP 法,主要实验步骤:切片脱蜡至水;微波煮沸抗原修复 2 次,每次 5 min,正常山羊血清封闭 30 min,抗Ⅷ因子多克隆抗体(1:50)37℃ 水浴 3 h,抗兔二抗室温孵育 30 min,链霉亲和素室温孵育 30 min 后用 DAB 底物液显色,苏木精复染。上述步骤中不加一抗、二抗作为阴性对照,血管内皮细胞胞浆呈棕褐色。每张切片在高倍镜($\times$ 400)下随机摄取 25 个视野(每视野 0.04 mm²),每只大鼠观察 3 张切片。参照 Weidner 微血管计数法计数每平方毫米的内皮细胞数即为毛细

血管密度^[4]。

8. Western blot 检测局部肌肉组织 CD151 的表达

在非变性条件下检测两组样本的 CD151 蛋白表达情况,以 β -actin 为内参照,分别提取两组大鼠缺血后肢肌肉组织蛋白。取含等量蛋白质的裂解液加等体积 $2\times$ 加样缓冲液(不含 2-巯基乙醇)进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后在 25 V、4 °C 条件下过夜,将凝胶上的蛋白质转移到 PVDF 膜(Millipore, 美国),37 °C 1% 脱脂奶粉封闭 2 h,1:500 的 CD151 多抗 4 °C 孵育过夜,1:5000 的辣根过氧化物酶标记的抗小鼠二抗室温孵育 1.5 h。最后经 ECL (Luminol, Fluka, 美国)显色检测结果。

9. 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计学软件。数据用均数 $\pm$ 标准差表示,组间差异性比较采用方差分析和 t 检验。

结 果

1. dsAAV-CD151 质粒的构建与 rAAV-CD151 的包装

将 799bp 的 CD151 基因片断(Bgl II / NotI)克隆至重组腺相关病毒包装质粒 pAAV(BamHI/NotI),构建成 pAAV-CD151 重组体,其中 Bgl II 与 BamHI 为同裂酶。CD151 基因的第 500bp 处为 BamHI 酶切位点。pAAV-CD151 重组体经 BamHI/NotI 酶切后可得 300bp 的部分 CD151 基因片断,证实 CD151 与载体正向连接。测序证实 CD151 基因序列正确。

斑点杂交结果证实,rAAV-CD151 的滴度为 $2.0 \text{ pfu/ml} \times 10^{11} \text{ pfu/ml}$,rAAV-GFP 滴度为 $1.0 \text{ pfu/ml} \times 10^{11} \text{ pfu/ml}$ 。

2. 缺血后肢 CD151 的表达

Western blot 结果显示,转染 rAAV-CD151 的实验组大鼠其缺血后肢 CD151 蛋白的表达比转染 rAAV-GFP 的对照组明显增加,相对积分吸光度值显示实验组为对照组的 2.96 倍(图 1)。

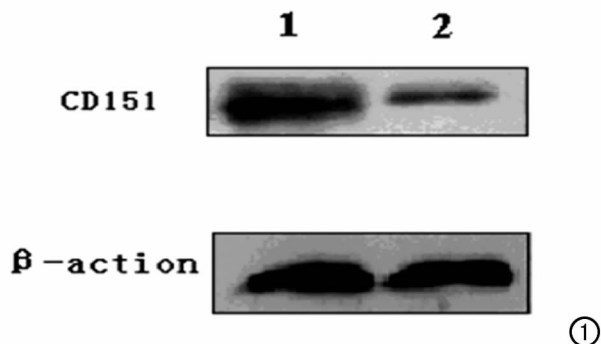


图 1 Western blot 检测 CD151 表达。1 rAAV-CD151 实验组,2 rAAV-GFP 对照组。

3. 后肢动脉造影

造影显示实验组大鼠缺血侧后肢大腿部从股骨大转子至股骨下段区域内的新生血管明显比对照组增多(图 2)。血管评分实验组平均为 2.56 ± 0.37 ,对照组平均为 1.57 ± 0.39 ,两组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)(图 3)。结果表明,高表达 CD151 能促进缺血后肢血管新生和侧支循环建立。

4. 缺血后肢毛细血管密度

显微镜下可见染色成棕褐色的血管内皮细胞散在于肌束之间。实验组缺血后肢肌肉组织毛细血管密度为 $(609.00 \pm 83.89) / \text{mm}^2$,明显高于对照组 $(517.00 \pm 70.65) / \text{mm}^2$,两组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。实验结果证明,高表达 CD151 能促进缺血后肢微血管的形成(图 4)。

讨 论

血管阻塞后的血管再生及血运重建是一个复杂的病理生理过程。其中整合素与细胞外基质(ECM)中相应配体结合,经 CD151 分子激活细胞内 PKC(inte-



图 2 大鼠后肢动脉造影图像。a) 转染 rAAV-GFP 的对照组; b) 转染 rAAV-CD151。箭所示为新生血管。

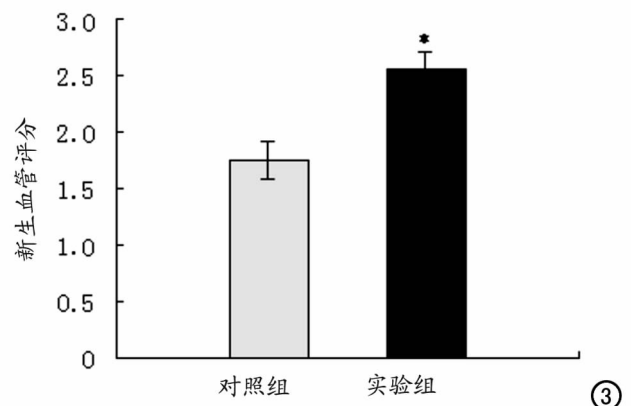


图 3 大鼠后肢血管造影新生血管评分比较。

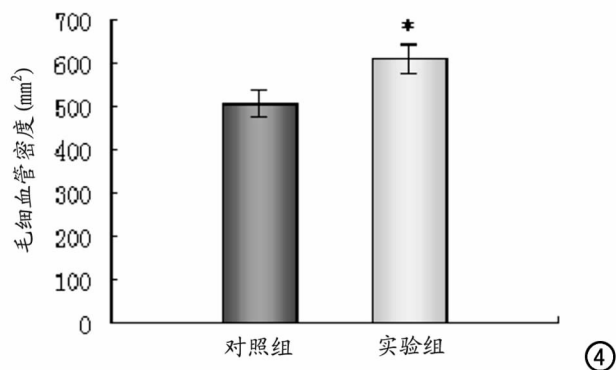


图 4 缺血后肢肌肉组织毛细血管密度比较, * $P < 0.05$ 。

grin-CD151-PKC 信号转导模式)将细胞迁移和血管形成信号转导到细胞内,引发血管生成级联反应是血管生成的重要环节之一^[5]。

体外实验证实,增强 CD151 的表达将明显增强细胞的迁移能力和在 ECM 上形成条索状血管样结构的能力^[6]。但在缺血性疾病中增强 CD151 的表达,能否促进缺血组织的血管生成,进而达到改善血运重建及恢复缺血组织器官功能的效果目前尚未可知。

腺相关病毒(AAV)载体具有广泛的转基因范围、无免疫原性、感染效率高以及能驱动基因在体内长期、稳定的表达等优良特性^[7]。本实验选择 AAV 作为载体,通过肌肉注射方式局部转染携带有 CD151 基因的重组腺相关病毒,使大鼠后肢局部高表达 CD151。在此基础上通过股动脉切除术建立大鼠后肢缺血模型。4 周后大鼠后肢血管造影显示局部高表达 CD151 基因的大鼠缺血后肢的侧支循环明显比对照组(局部转染 rAAV-GFP)丰富,免疫组化检测结果同样显示缺

血肢体肌肉组织的毛细血管密度比对照组增高。以上结果表明增强局部缺血组织 CD151 表达,可以使其毛细血管再生和动脉血管形成能力得到显著提高。

总之,本研究结果证实了腺相关病毒介导的 CD151 基因经肌肉注射能在局部有效高表达。rAAV-CD151 能够显著提高局部缺血组织的血管再生能力,促进缺血肢体功能的恢复。该研究结果表明在缺血性疾病基因治疗中,CD151 将成为促血管再生的重要备选基因。

参考文献

- [1] Kazarov AR, Yang X, Stipp CS, et al. An Extracellular Site on Tetraspanin CD151 Determines $\alpha 3$ and $\alpha 6$ Integrin-dependent Cellular Morphology[J]. J Cell Biol, 2002, 158(7):1299-1309.
- [2] Berditchevski F. Complexes of Tetraspanins with Integrins; More than Meets the Eye[J]. J Cell Sci, 2001, 114(23):4143-4151.
- [3] Brevetti LS, Chang DS, Tang GL, et al. Overexpression of Endothelial Nitric Oxide Synthase Increases Skeletal Muscle Blood Flow and Oxygenation in Severe Rat Hind Limb Ischemia[J]. J Vasc Surg, 2003, 38(4):820-826.
- [4] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor Angiogenesis and Metastasis—Correlation in Invasive Breast Carcinoma [J]. N Engl J Med, 1991, 324(1):1-8.
- [5] Zhang XA, Bontrager AL, Hemler ME, et al. Transmembrane-4 Superfamily Proteins Associate with Activated Protein Kinase C (PKC) and Link PKC to Specific $\beta 1$ Integrins[J]. J Biol Chem, 2001, 276(27):25005-25013.
- [6] Kohno M, Hasegawa H, Miyake M, et al. CD151 Enhances Cell Motility and Metastasis of Cancer Cells in the Presence of Focal Adhesion Kinase[J]. Int J Cancer, 2002, 97(3):336-343.
- [7] Monahan PE, Samulski RJ. AAV: is Clinical Success in the Horizon[J]. Gene Ther, 2000, 7(1):24-30.

(收稿日期:2005-07-14 修回日期:2005-10-30)

南京医学会举办国家级数字成像 图像质量保证和质量控制继续教育学习班

南京医学会影像技术专科分会于 2005 年 11 月 11 日至 11 月 14 日在南京举办国家级数字成像图像质量保证和质量控制继续教育学习班,与会代表近 80 名听取江苏省质控中心负责人、南京中大医院储成凤教授的"江苏省医学影像科质量控制中心工作策略和展望",江苏人民医院张维林主任的"数字 X 线摄影技术科研选题的思考",南京军区南京总医院王骏讲师的"CR、DR 原理及其质控"、"CR 在头颈部的临床应用"、"乳腺影像学检查及其质控"、"影响 PET/CT 影像质量的相关因素",鼓楼医院刘广月主任的"16 排螺旋 CT 泌尿系的三维重建技术",江苏省人民医院陈玉勤主任的"PET/CT 成像及临床应用",江苏省中医院祝新主任的"MRA 对动脉硬化性闭塞及主动脉夹层的诊断价值",南京第一医院吴前芝主任的"PACS 和 RIS 系统介绍"的专题报告。南京医学会耿秘书长与会讲话并听取了学术报告,南京医学影像技术专科分会主任委员袁仁松主任作了开幕辞,鼓楼医院影像科主任陈君坤教授设宴招待了与会的全体代表,最后医学会对全体学员进行了考试及问卷调查。

(王骏)