

超声微泡造影剂对心肌组织的生物学效应及介导 VEGF 基因转染大鼠心肌的实验研究

王志刚¹, 凌智瑜¹, 冉海涛¹, 任红², 黄爱龙², 黄晶¹, 刘杞², 赵春景³,
唐海林¹, 宫琳¹, 蒲世玉¹, 彭明利², 钱妍³

(1. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所;
3. 重庆医科大学附属第二医院药剂科)

[摘要] 目的 探讨超声微泡造影剂对心肌组织的生物学效应及其介导 VEGF 基因转染大鼠心肌的有效性。方法 18 只健康雄性 Wistar 大鼠, 取 3 只采用超声波在鼠胸壁破坏微泡造影剂, 观察对心肌组织显微结构的影响。将另 15 只急性心肌梗死 3 天后的雄性 Wistar 大鼠分为 3 组, 每组 5 只。第一组采用超声破坏微泡造影剂的方式, 将 pcD₂ VEGF₁₂₁ 基因转染大鼠心肌至造影剂不再显影(约 6min); 第二组尾静脉输入同等剂量携 pcD₂ VEGF₁₂₁ 基因的造影剂; 第三组为对照。2 周后, 取缺血心肌组织行 VEGF 免疫组织化学染色, 观察心肌组织血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达情况。结果 超声波破坏微泡造影剂能使心肌组织充血, 产生大量空泡, 并有部分心肌细胞坏死。采用超声微泡造影剂介导的 VEGF 基因转染, 能明显增强大鼠心肌组织 VEGF 蛋白的表达。结论 超声微泡造影剂能明显增强对组织的空化效应, 其介导的 VEGF 基因治疗是一种无创、新型、高效的基因转移方法。

[关键词] 超声; 微泡; 生物效应; 基因治疗

[中图分类号] R445.1; R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2003)06-0656-03

Experimental Study on Ultrasound-Mediated Microbubble Destruction Deliver VEGF Gene to Myocardium of Rats and Its Biological Effects

WANG Zhi-gang, LING Zhi-yu, RAN Hai-tao, et al

(Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether ultrasound mediated microbubble destruction could be effectively deliver vascular endothelial growth factor (VEGF) gene to myocardium of rats and its biological effects. **Methods** Eighteen male Wistar rats were included in this study. Three of them were subject to ultrasound irradiation through the chest wall with simultaneous intravenous administration contrast microbubble (QuanFuXian), tissueslices of the heart were collected for microscope investigation. The remaining fifteen rats were subjected to left anterior descending coronary artery ligation. Three days after surgery, the rats were divided into 3 groups. Microbubbles attached with pcD₂ VEGF₁₂₁ gene were infused into the tail vein of rats with or without simultaneous echocardiographic destruction microbubbles. The third group used as control group. Rats were killed after 2 weeks and examined for VEGF protein expression by immunohistochemical technique. **Results** Microscope findings showed that myocardium tissue conducted with ultrasound-mediated microbubble destruction became congestive, lots of gas bubbles were seen in it, and myocardiolysis was seen in parts of the heart tissue. VEGF protein expression was higher in ischemic myocardium of rats received ultrasound-mediated microbubble destruction for gene delivery than in ischemic myocardium of rats in the controls. **Conclusion** Ultrasound contrast agents lower the threshold for cavitation by ultrasound energy. Ultrasound microbubbles may be used as cavitation nuclei for drug and gene delivery. Ultrasound-mediated microbubble destruction is a promising method for noninvasive and effective delivery targets genes to the heart.

[Key words] Ultrasound; Microbubble; Biological effects; Gene therapy

[基金项目] 本课题得到重庆市科技攻关项目(渝科发计字[2002]28号)及重庆市应用基础研究项目(渝科发计字[2001]74号)资助。

[作者简介] 王志刚(1945—), 男, 重庆人, 教授, 博士生导师。研究方向: 心血管超声。

[收稿日期] 2003-02-07

虽然冠心病的防治已取得重大进展, 许多病人也已经接受药物治疗, 并通过血管成形术和外科手术进行机械血管再通, 但是仍有许多病人未得到有效的治疗, 改善这些病人局部心肌缺血状况的挑战已经在分子生物学、药物治疗等领域引起了广泛的关注。近年的研究发现, 血管内皮生长因子(VEGF)有促进内皮增生, 增强血管通透性, 加速新血管形成

的作用。VEGF 基因治疗梗死性血管病已经开始应用于临床。但目前基因治疗仍存在不少尚未解决的问题,如缺乏安全有效的转载系统,缺乏稳定的基因表达,转录后的宿主免疫反应等^[1]。基因导入的方式多为将目的基因直接注射于靶组织,在某些疾病,如心血管疾病多采用心肌内直接注射或心导管注入质粒 DNA 或腺病毒载体^[2],存在有创性,限制了其临床应用。本文应用动物实验,观察超声微泡造影剂对心肌组织的生物学效应,并将诊断用超声微泡造影剂做为基因转移的载体,以超声波在靶组织将微泡击碎。旨在探索一种无创、新型、高效的基因转移方法,为缺血性心脏病的基因治疗提供一种新的基因转移途径及治疗方法。

1 资料与方法

1.1 动物模型的建立 健康雄性 Wistar 大鼠 18 只,体重 300~350g。戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔麻醉,胸部脱毛。取 3 只用于观察超声微泡造影剂对心肌组织显微结构的影响。第一只经股静脉输入含氟碳气体声振白蛋白微泡造影剂——全氟显(第一军医大学南方医院药学基地提供)约 0.5ml。微泡大小 2.0~4.0μm,浓度(0.8~1.8)×10⁹个/ml。并采用超声治疗仪(电子工业部 26 所和重庆医科大学超声影像学研究所共同研制)在鼠胸壁以 0.5W/cm² 功率辐照约 2min。第二只单纯采用超声治疗仪以同等条件辐照,静脉不输入造影剂。第三只用于对照。照射完毕后,取心肌组织行 10% 福尔马林固定,石蜡切片,HE 染色观察心肌组织显微结构的改变。

另 15 只大鼠,麻醉后,气管插管并用呼吸机辅助通气,于左胸骨旁切口打开胸腔,暴露心脏,在动脉起始点下方约 3mm 处结扎左冠状动脉前降支(LAD),建立心肌梗死模型,以心电图 ST 段损伤型持续抬高作为模型复制成功的标志。术后腹腔内注射青霉素 10 万 IU/天,连续 3 天抗感染。

1.2 携 pcD₂ VEGF₁₂₁ 基因微泡造影剂的制备 将 pcD₂ VEGF₁₂₁ 基因(由北京大学医学部心血管病基础研究所提供)1ml(6mg/ml)与 3ml 全氟显在 4℃ 下混合 2h,使 VEGF 基因粘附于微泡的外壳。形成混合物中 pcD₂ VEGF₁₂₁ 基因的浓度为 1.5mg/ml。

1.3 转基因的方法 将心肌梗死 3 天后的大鼠分为三组,每组 5 只。一组经尾静脉输入含 pcD₂ VEGF₁₂₁ 基因的造影剂 1.33ml(含 pcD₂ VEGF₁₂₁ 基因 2mg),用二维超声监控心肌显影,并用超声在鼠胸壁照射至造影剂显影消失(约 6min)。使用仪器为 HP-5500,S_i 探头,启用二次谐波模式使发射频率和接收频率分别为 1.8MHz 和 3.6MHz,将机械指数调至最大,聚焦深度为 3~4cm。采用电触发,每 6~8 个心动周期触发一次。第二组经尾静脉输入含 pcD₂ VEGF₁₂₁ 基因 2mg 的微泡造影剂,不采用超声波照射。第三组既不输入基因,也不采用超声波照射,用于对照。

1.4 VEGF 蛋白质表达及心肌毛细血管染色 转基因后 14 天取受损局部心肌组织,用 10% 福尔马林固定,石蜡切片,行 ABC 法 VEGF 免疫组织化学染色,观察 VEGF 蛋白表达情况。光镜下定性及定位,采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图像测量系统,在 400× 视野下,测定平均灰度值用于 VEGF 蛋白表达半定量。VEGF 免疫组化试剂盒购自中山生

图 1 心肌组织 HE 染色病理图片(放大倍数×400) A. 为正常心肌组织; B. 为单纯采用 0.5W/cm² 超声辐照 2min,大鼠心肌组织轻度充血; C. 为超声辐照同时,静脉输入微泡造影剂,心肌组织充血明显,炎症细胞浸润,心肌细胞内及细胞间隙均可见大量空泡形成,同时有部分心肌细胞横纹消失及坏死

图 2 VEGF 免疫组化染色图片(放大倍数×400) A. 显示第一组大鼠心肌组织有大量 VEGF 表达阳性颗粒; B. 显示第二组大鼠心肌组织 VEGF 阳性颗粒较少; C. 显示对照组大鼠心肌组织 VEGF 阳性颗粒更少

物技术有限公司。

1.5 统计学分析 所得计量资料用均数±标准差表示,采用方差分析进行三组动物心肌组织 VEGF 免疫组化强度比较。

2 结果

2.1 超声微泡造影剂对心肌组织显微结构的影响 结果发现,采用 0.5W/cm² 功率辐照 2min 的大鼠心肌组织仅有少量充血,未见心肌细胞坏死及空泡形成。而经静脉输入造影剂,同时采用超声照射的大鼠心肌组织充血明显,心肌细胞内及细胞间隙均可见大量空泡形成,同时有部分心肌细胞横纹消失及坏死(图 1)。

2.2 心肌组织 VEGF 蛋白的表达 所有接受 pcD₂ VEGF₁₂₁ 基因治疗的鼠,心肌组织中均有不同程度的 VEGF 蛋白表达,其中,以超声触发破坏微泡方式行基因转染的鼠心肌组织中可见大量 VEGF 阳性反应的棕褐色颗粒,采用 HPIAS-1000 彩色病理图像测量系统测得其平均灰度值为 130.3±12.6;而单纯静脉注射 pcD₂ VEGF₁₂₁ 基因组鼠的心肌中,

VEGF 阳性反应的棕褐色颗粒较少,相应其平均灰度值增高为 165.0 ± 9.7 ; 对照组心肌中,仅有极少量的 VEGF 阳性反应的棕褐色颗粒,平均灰度值为 200.9 ± 13.4 (表 1 及图 2)。

表 1 VEGF 蛋白表达结果

		平均灰度值
超声波照射+VEGF 基因治疗组	(A)	130.3 ± 12.6
单纯静脉注射 VEGF 基因组	(B)	$165.0 \pm 9.7^{\triangle}$
对照组	(C)	$200.9 \pm 13.4^{\triangle\triangle}$

$\triangle$: A 组与 B 组相比, $P < 0.01$; $\triangle\triangle$: A 组与 C 组相比较, $P < 0.01$

3 讨论

近几年,超声造影剂的发展取得了明显进展,主要表现在造影剂微泡的直径缩小($< 8\mu\text{m}$),使其能经外周静脉注射后通过肺循环最终到达靶器官或靶组织,实现感兴趣区组织回声增强;另一方面,造影剂微气泡的稳定性有一定的提高,我们可观察到造影剂在感兴趣区组织中的情况。超声能量作用于造影剂中的微气泡,可引起微气泡大小的变化,即在低声压时膨胀,在高声压时萎缩,声强较高时,气泡呈压缩性破坏。

超声波介导微泡造影剂行药物或基因进行疾病治疗是一种新型的靶向治疗技术。基本原理为:声场内的超声波破坏微泡造影剂后,其产生的空化或机械效应可使细胞膜通透性增加^[3],并致直径 $\leq 7\mu\text{m}$ 的微血管破裂,内皮细胞间隙增宽。药物或基因可通过破裂的微血管和内皮细胞间隙到达组织细胞内。同时,利用超声波在特定时间和空间内击碎靶组织内的微泡,可提高基因治疗的靶向性。

国外的初步研究结果表明,超声波破坏微泡可使基因的转染率和表达提高^[4-7]。超声波破坏微泡造影剂增强空化效应后,可使裸露 DNA 的转染率提高 3000 倍,极大地提高了基因的转染率。研究表明,在输入微泡前,超声照射并不引起微血管的破坏;同样,输入微泡不使用超声照射也不引起微血管破坏。而在输入造影剂并超声照射后,发现直径 $\leq 7\mu\text{m}$ 的微血管发生了损伤。并发现微血管的破坏可引起血管新生和血管重构,有助于梗死性血管病的治疗。

本实验采用超声治疗仪,经胸壁辐照静脉输入造影剂后的大鼠心脏,发现高能量的超声联合造影剂的输入能明显增强超声波的空化效应。使心肌细胞及细胞间隙内产生大量空泡,并可使部分心肌细胞坏死。而单纯采用超声照射的大鼠心肌组织仅有少量充血,未见明显空泡形成及心肌细胞坏死。

本实验采用的 pcD₂ VEGF₁₂₁ 基因,是由北京大学医学部心血管病基础研究所构建的真核表达基因,经实验证明能在哺乳动物体内表达 VEGF 蛋白^[8],促进血管新生。以往的心血管病转基因研究,多为将基因直接注射于心肌,操作较为复

杂。本实验采用超声触发破坏含靶基因的微泡造影剂的方式,在心肌梗死后的大鼠心肌中实现了转基因的高效表达。而单纯静脉注射基因和对照组心肌中 VEGF 蛋白表达较弱,采用彩色病理图像分析仪测得反映 VEGF 表达的平均灰度值也有统计学差异。本课题组采用该方法进行的绿色荧光蛋白转染肝脏的研究也获得了成功^[9]。

VEGF 有很强的促进血管内皮细胞增殖、分裂的作用,少量的 VEGF 表达仍能发挥治疗缺血性疾病的作用。本文的初步研究结果发现,采用高能量的超声破坏微泡可明显增强空化效应,可使心肌组织充血,产生大量空泡,瞬间的“爆破”作用还可使部分心肌细胞坏死。采用超声触发破坏含靶基因的微泡造影剂的方式,可使基因的表达增强,该方法是一种新型、高效、简便易行的基因转移新技术。同时,我们正在探索超声微泡造影剂增强基因转染的最佳条件,以及微泡造影剂与药物或基因的连接研究,以探索最小组织损伤而达到最佳靶向治疗的新方法。

[参考文献]

[1] Verma IM, Somia N. Gene therapy: promises, problems, and prospects[J]. Nature, 1997,389(6648):239-242.

[2] Kornowski R, Fuchs S, Leon MB, et al. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis[J]. Circulation, 2000, 101(4):454-458.

[3] Skyba DM, Price RJ, Linka AZ, et al. Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue[J]. Circulation, 1998,98(4):290-293.

[4] Lawrie A, Briskin AF, Francis SE, et al. Microbubble-enhanced ultrasound for cardiovascular gene delivery[J]. Gene Ther, 2000, 7(23):2023-2027.

[5] Shohet RV, Chen SY, Zhou YT, et al. Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium[J]. Circulation, 2000,101(22):2554-2556.

[6] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle[J]. Gene Ther, 2002,9(6):372-380.

[7] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound[J]. Circulation, 2002,105(10):1233-1239.

[8] 刘艳秋,周爱儒,朱小君,等.大鼠心肌缺血的血管内皮生长因子基因治疗[J].北京医科大学学报,1999,31(6):489-492.

[9] 张大志,任红,王志刚,等.超声微泡造影剂促进腺病毒载体感染肝细胞的实验研究[J].临床超声医学杂志,2002,4(6):321-323.