

· 论 著 ·

腺病毒介导的可溶性 I 型补体受体基因转染对急性心肌缺血的保护作用的实验研究

黄盛东¹, 崔勇¹, 陆方林¹, 陈和忠¹, 徐静², 龚德军¹, 徐志云¹

(1. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433; 2. 长海医院超声科)

[摘要] **目的:**探讨腺病毒介导的可溶性 I 型补体受体(soluble complement receptor type 1, sCR1) 基因转染对急性心肌缺血的保护作用。**方法:**开胸阻断小鼠左冠状动脉前降支起始部 30 min 后开放, 实验组(14 只)在开放冠状动脉前 5 min 于缺血区注射携带 sCR1 和 LacZ 的混合腺病毒液(100 μ l, 10^{10} 噬斑形成单位); 对照组(13 只)注射 LacZ 腺病毒液(100 μ l, 10^{10} 噬斑形成单位)。术后 2 周时利用超声心动图检查心功能, 并于检查后立即取标本行病理检查。**结果:**术后 2 周时, 各项超声指标实验组都明显优于对照组($P < 0.05$); 尤其是反映梗死范围大小的梗死范围率, 差异非常显著($P < 0.01$)。病理检查见实验组动物心肌梗死区域小于对照组, H-E 染色显示实验组注射 sCR1 腺病毒的范围内存活心肌细胞明显多于对照组。**结论:**缺血心肌再灌注前注射 sCR1 腺病毒可以明显减小梗死范围, 提高远期心脏功能。

[关键词] 心肌缺血; 可溶性 I 型补体受体; 腺病毒; 转染

[中图分类号] R 542.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0237-03

Protective effects of adenovirus-mediated gene transfer of soluble complement receptor type 1 on acute myocardium ischemia: an experimental study

HUANG Sheng-dong¹, CUI Yong¹, LU Fang-lin¹, CHEN He-zhong¹, XU Jing², GONG De-jun¹, XU Zhi-yun¹ (1. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Ultrasonography, Changhai Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the protective effects of adenovirus-mediated gene transfer of soluble complement receptor type 1 (sCR1) on acute myocardium ischemia in mice. **Methods:** Twenty-seven SD rats were subjected to left anterior descending coronary artery (LAD) occlusion(30 min) and reperfusion. In the treatment group($n=14$), a mixture of adenovirus carrying sCR1 and LacZ was injected into the ischemic zone(100 μ l, 10^{10} pfu)5 min before reperfusion; in the control group, only adenovirus carrying LacZ was injected ($n=13$). Echocardiography was performed 2 weeks later, followed immediately by pathologic examination. **Results:** Echocardiographic results of the treatment group were better than those of the control group ($P < 0.05$) 2 weeks after the operation, especially when it comes to the size of infarction area ($P < 0.01$). H-E staining showed more surviving myocardial cells in the treatment group than in the control group. **Conclusion:** Transfer of sCR1 gene by adenovirus can reduce the size of infarction area and preserve heart function in a long-term period.

[KEY WORDS] myocardial ischemia; soluble complement receptor type 1; adenovirus; transfection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 237-239]

急性心肌梗死是一种高发性疾病, 及时的再灌注治疗是提高疗效的关键。但部分患者由于梗死范围较大, 重建血液循环后晚期仍会发生充血性心力衰竭, 所以尽可能的保护缺血心肌、减小梗死范围十分重要^[1]。可溶性 I 型补体受体(soluble complement receptor type 1, sCR1) 具有抑制补体反应、阻断炎症细胞黏附活化的作用, 能够减轻缺血再灌注造成的心肌损害^[2]。因此, 本实验将携带 sCR1 基因的腺病毒注射于急性心肌缺血区, 评价它对再灌注后心肌的保护作用以及对远期心功能的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雄性 10 周龄 SD 大鼠(中国科学

院上海细胞研究所), 体质量 250~300 g。

1.2 动物模型的建立 大鼠乙醚诱导后, 气管插管, 呼吸机支持呼吸, 思氟烷持续吸入麻醉。左外侧第 4 肋间开胸, 在左心耳下缘水平, 用 6-0 丙纶线阻断左冠状动脉前降支造成急性心肌缺血, 30 min 后开放恢复灌注, 循环稳定后关胸。

1.3 实验分组 成功建立模型的大鼠随机分成 2 组, 实验组(14 只)在开放冠状动脉前 5 min 于缺血区注射携带 sCR1 和 LacZ 的混合腺病毒液(100 μ l, 10^{10} 噬斑形成单位); 对照组(13 只)注射 LacZ 病毒

[作者简介] 黄盛东, 副教授, 副研究员, 硕士生导师。

* Corresponding author. E-mail: huangsd@public6. sta. net. cn

液(100 μl, 10¹⁰噬斑形成单位)。实验所用腺病毒均为第二军医大学长海医院胸心外科实验室提供^[3]。

1.4 超声心动图检查 术后第2周时利用超声心动图(西门子 Sequoia 512 彩超仪)检测心功能。选取乳头肌水平左室短轴切面,利用M型测量左室舒张、收缩末期内径(end diastolic diameter, EDD; end systolic diameter, ESD)。在同一切面利用二维超声计算短轴缩短分数(ejection fraction, EF)、梗死范围率(infarction size, IS=舒张期梗死区长度/舒张期周长×100%)。

1.5 组织病理学检查 行超声检查后,以过量戊巴比妥钠(100 mg/kg)腹腔注射处死动物,心脏标本立即行连续冰冻切片(5 μm),用0.5%戊二醛固定10 min, PBS清洗2次,用含1 mmol/L MgCl₂的PBS清洗2次,15 min/次,加X-gal (1 mg/ml)染液,37℃过夜,用PBS清洗2次,1%戊二醛固定15 min,再行H-E染色。结果判定:镜检细胞核呈蓝染者为LacZ阳性,即该细胞成功表达外源LacZ基因。

根据LacZ阳性范围即可判断实验组sCR1病毒作用的范围。存活心肌细胞计数方法:每只实验动物随机选取5张切片,每张切片在LacZ阳性区随机选取5个200倍视野,计数每个视野(0.1 mm²)内的心肌细胞个数,求其平均值。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较以t检验进行。所有统计计算由SAS 8.0软件完成。

2 结果

2.1 大体情况 共34只大鼠接受了实验,其中7只在术中由于急性心衰、室颤等原因死亡,有27只大鼠成功建模。

2.2 超声心动图结果 术后2周时,实验组的左室舒张末期内径与收缩末期内径(EDD、ESD)值明显小于对照组($P < 0.05$);反映左室收缩功能的EF也有显著差异($P < 0.05$);特别是反映梗死范围大小的IS值实验组明显小于对照组,差异非常显著($P < 0.01$),见表1。

表1 实验组和对照组小鼠超声心动图结果

Tab 1 Results of echocardiography examination of mice in control and experiment group

Group	EDD(l/mm)	ESD(l/mm)	EF(%)	IS(%)
Control	10.45±1.71	8.35±1.85	34.33±4.72	21.36±2.34
Experiment	8.97±1.97*	6.77±1.86*	39.77±7.35*	17.89±3.67**

($\bar{x} \pm s$)

EDD: End diastolic diameter; ESD: End systolic diameter; EF: Ejection fraction; IS: Infarction size; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.3 病理学检查 大体标本可见,术后第2周时,对照组动物心脏的梗死区明显变薄、瘢痕化,范围较大;而实验组的瘢痕区相对较小(图1F)。X-gal染色结果表明LacZ基因在两组中都得到了很好的表达。H-E染色可见在实验组的LacZ阳性区域(即sCR1基因表达区域)心肌细胞明显多于对照组,两组间心肌细胞计数结果有明显统计学差异($P < 0.01$),实验组为26.23±5.40,对照组为17.62±6.70(图1A~1E),说明sCR1对急性缺血、再灌注损伤具有很好的保护作用。

3 讨论

sCR1具有补体受体I型的膜外结构,在抑制补体介导的炎症和脏器超急性排斥反应,减轻缺血再灌注组织损伤上有显著疗效。1990年Weisman等人首次用sCR1在体内验证了对心肌缺血再灌注的作用,其依据是组织缺血再灌注时损伤的内皮细胞能激活旁路途径,而sCR1通过阻断该过程来保护

组织免受损伤,从而避免了炎症细胞在内皮细胞的黏附与蓄积,以及最终发生的缺血再灌注的心肌坏死^[4,5]。但由于sCR1蛋白的半衰期短,作用时间有限,难以研究它对急性缺血再灌注心脏功能远期的影响,故本实验将携带sCR1基因的重组腺病毒注射于急性心肌缺血区。因为复制缺陷的重组腺病毒载体安全性高,易制备,其转染后外源表达的时间长,可持续30 d,能够产生长期的治疗效应^[6]。

本研究通过随访急性缺血再灌注后2周时的超声心动图,发现在给予携带sCR1的重组腺病毒后,缺血心脏的功能得到了保护,表现为梗死范围、心腔体积明显减小,收缩功能明显提高。并且病理检查也发现注射sCR1的范围内,存活的心肌细胞较对照组显著增多。考虑到临床实际情况,如果能在患者急性心梗发作后早期给予sCR1的重组腺病毒,并结合及时的再灌注治疗,有望进一步改进急性心肌梗死的远期疗效。

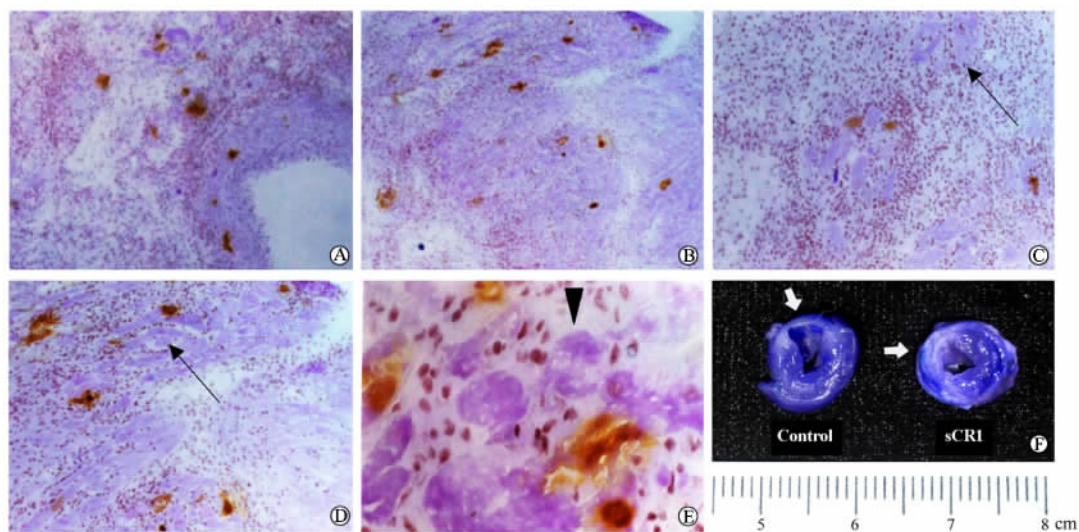


图1 实验组和对照组小鼠病理学检查结果

Fig 1 Results of pathologic examination in experimental and control mice

A,B (X-gal, $\times 40$): LacZ gene was expressed in both groups (blue stained dots). Inflammatory cells were more in control group (A) than in sCR1 group (B). C,D (H-E, $\times 100$): More myocardial cells were found in sCR1 group (D) than in control group (C) as indicated by black arrows; E was a magnified view of myocardial cells (H-E, $\times 400$). F showed that the infarction area in control group was larger and thinner than that in sCR1 treated group

目前存在的不足之处是腺病毒仍主要以局部注射的方式给药,对于适合内科介入治疗的患者十分不便。如果对病毒进行改进,导入心肌特异性的启动子,增加其对心肌细胞的靶向性,则可以通过静脉的途径进行给药,会极大拓展 sCR1 在缺血性心脏病治疗方面的应用前景^[7]。我们实验室在改进腺病毒心肌靶向性方面已经取得了一定的成果,今后将进一步进行相关的深入研究。

[参考文献]

- [1] Bogaert J, Maes A, Van de Werf F, et al. Functional recovery of subepicardial myocardial tissue in transmural myocardial infarction after successful reperfusion: an important contribution to the improvement of regional and global left ventricular function[J]. *Circulation*, 1999,99:36-43.
- [2] Zacharowski K, Otto M, Hafner G, et al. Reduction of myocardial infarct size with sCR1sLe^x, an alternatively glycosylated form of human soluble complement receptor type 1 (sCR1), possessing sialyl Lewis^x[J]. *Br J Pharmacol*, 1999,128:945-

952.

- [3] 黄盛东, 龚德军, 徐志云, 等. 人 I 型补体受体重组腺病毒的构建和鉴定[J]. *中华中西医杂志*, 2003,4:641-642.
- [4] Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, et al. Soluble human complement receptor type 1: *in vivo* inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis[J]. *Science*, 1990,249:146-151.
- [5] Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, et al. Recombinant soluble CR1 suppressed complement activation, inflammation, and necrosis associated with reperfusion of ischemic myocardium[J]. *Trans Assoc Am Physicians*, 1990,103:64-72.
- [6] Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Alvira M, et al. Quantitative determination of Adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 11498-11502.
- [7] 张裕东, 张宝仁, 梅 举, 等. 腺病毒介导的血管内皮生长因子体外靶向性转染心肌细胞[J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25: 759-762.

[收稿日期] 2005-09-30

[修回日期] 2006-01-16

[本文编辑] 曹 静

《第二军医大学学报》被 EMBASE 收录

至 2006 年 2 月,国际重要的生物医学和药理学数据库 EMBASE(The *Excerpta Medica* Database)收录了中国(含港台地区)期刊 106 种,其中高等院校学报 11 种,《第二军医大学学报》是被收录的 11 种学报之一。读者进入 <http://www.embase.com>,在期刊列表(Journals)中点击刊名 *Academic Journal of Second Military Medical University*,即可查看《第二军医大学学报》刊出论文的英文摘要。