

## · 短篇论著 ·

VEGF<sub>165</sub>基因联合抗细胞间黏附分子-1单克隆抗体对内膜损伤后血管重塑的影响Influence of VEGF<sub>165</sub> gene combined with monoclonal antibody against intercellular adhesion molecule-1 on vascular reconstruction after intimal damage成业东<sup>1</sup>, 肖建如<sup>1</sup>, 方平<sup>2</sup>, 蔡丽萍<sup>2</sup>

(1. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003; 2. 长征医院体检中心超声室, 上海 200003)

[摘要] 目的: 探讨 VEGF<sub>165</sub> 基因联合抗细胞间黏附分子-1(ICAM-1)单克隆抗体对大鼠股动脉内膜损伤后血管重塑的影响。

方法: 采用球囊拉伤术制备 SD 大鼠(40 只)股动脉内膜损伤模型, 将动物随机分为联合组、基因组、抗体组及手术对照组(各 10 只), 通过尾静脉分别注射加有 VEGF<sub>165</sub> cDNA+抗 ICAM-1 单克隆抗体、VEGF<sub>165</sub> cDNA、抗 ICAM-1 单克隆抗体的生理盐水 1 ml, 手术对照组仅注射生理盐水 1 ml。分别于注射后 24 h 或 14 d 观察各组动物注射后股动脉内膜的变化, 并应用免疫组织化学染色、光镜和电镜等方法检测损伤局部血管内膜的变化情况。结果: 注射后 24 h, 联合组损伤血管内膜处有极少量中性粒细胞浸润, 抗体组次之, 基因组有较多中性粒细胞浸润, 而手术对照组损伤内膜有大量的中性粒细胞浸润。注射后 14 d, 联合组损伤血管内膜厚度明显小于其他各组( $P < 0.05$ ), 且内膜有大量 VEGF 蛋白表达。结论: VEGF 基因与抗 ICAM-1 单克隆抗体联合应用可减轻损伤血管内皮细胞的再损伤, 抑制损伤血管内膜的增生。提示两者联合有利于防止血管病理性狭窄的发生。

[关键词] 血管内皮生长因子类; 胞间黏附分子 1; 抗体, 单克隆; 血管重构

[中图分类号] R 543 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2006)09-1020-03

血管内膜损伤后发生狭窄, 是血管内膜损伤后修复过程稳态失衡的结果。血管平滑肌细胞(vessel smooth muscle cells, VSMC)移行、增殖及分泌是血管内膜增生的三个重要环节, 其中内皮细胞损伤是内膜增厚、血管重塑的始动因素, 内膜增生与血管重塑形之间的平衡决定了血管狭窄的程度。同时由于内皮细胞的损伤可以产生单核细胞趋化因子等炎症因子, 促进炎细胞黏附、浸润, 引起局部的炎症反应。血管内皮生长因子(VEGF)是一种血管内皮细胞的促丝裂原, 其特异的丝裂原作用, 可明显抑制损伤内膜增生, 加速损伤内膜内皮修复, 抑制血管平滑肌细胞增殖<sup>[1,2]</sup>, 且抗 ICAM-1 单克隆抗体可有效对抗中性粒细胞对受损内皮细胞的浸润<sup>[3,4]</sup>, 本实验联合应用 VEGF<sub>165</sub> cDNA 基因和抗 ICAM-1 单克隆抗体来观察血管内膜修复的情况, 以探讨两者在防治血管病理性重塑方面的作用。

## 1 材料和方法

1.1 VEGF<sub>165</sub> cDNA 的获取和 pcDNA4/VEGF<sub>165</sub> cDNA 表达载体的构建、提取、纯化及鉴定 取小块人肝组织, 抽提总 RNA, 逆转录得到肝组织 cDNA 并以之为模板; 设计含 BamHI 酶切位点的 5'端和含 EcoRI 切点的 3'端引物(序列分别为: 5'-CGG GAT CCA CAC CAT GAA CTT TCT GCT GTC TTG GGT G-3'; 5'-CGG AAT TCT CAC CGC CTC GGC TTG TCA CA-3'), PCR 扩增基因条带。将 VEGF<sub>165</sub> cDNA 插入真核表达载体 pcDNA4/Myc-His A, 选择 BamHI 和 EcoRI 作为内切酶, 构建 pcDNA4VEGF<sub>165</sub>。转化大肠杆菌(DH5), 扩增, 碱变性大量提取质粒, 用聚乙二醇 8000 纯化方法纯化, 酶切鉴定后并经分光光度计测定浓

度及电泳检测。

1.2 抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体的制备 分泌抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体杂交瘤细胞株(由长海医院检验科沈茜教授提供), 常规培养后接种于 BALB/c 小鼠腹腔诱发产生腹水。收集腹水后, 用辛酸-硫酸铵法纯化单抗, 采用刀豆素 A(Con A)活化阻断实验鉴定单抗活性。

1.3 股动脉内膜损伤动物模型的制备 40 只雄性 SD 大鼠(购自第二军医大学实验动物中心), 体质量 200~250 g, 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉, 仰卧固定于手术台上, 沿股动脉走向作纵切口, 钝性分离股动脉, 提拉近侧端, 将股动脉剪一小口, 逆行插入自制简易微型球囊导管, 插入深度为 1~2 cm, 向球囊内充气 0.5 ml 使其膨胀, 并缓慢回拉导管至切口处, 抽出气体, 再将导管送入, 反复 3 次, 退出导管, 缝扎切口, 继续饲养。

1.4 动物分组 将 SD 大鼠随机分为联合组(10 只)、基因组(10 只)、抗体组(10 只)、手术对照组(10 只), 分别于术后即刻从尾静脉注射混合有 VEGF<sub>165</sub> cDNA 及抗 ICAM-1 单克隆抗体(含量分别为 2 mg、1.2 mg)、VEGF<sub>165</sub> cDNA(含量为 2 mg)、抗 ICAM-1 单克隆抗体(含量 1.2 mg)的生理盐水 1 ml; 手术对照组从尾静脉注射生理盐水 1 ml。

1.5 电镜观察 注射后 24 h 及 14 d, 各组分别处死动物各

[基金项目] 上海市科委科研计划基金(034119870)。Supported by Science Research Foundation of Shanghai Science and Technology Committee(034119870)。

[作者简介] 成业东, 硕士, 主治医师。现在解放军第 82 医院骨科, 淮安 223001。E-mail: chengyedong22@163.com

5只,在电镜下观察损伤血管内膜表面的变化。

1.6 损伤内膜中性粒细胞计数 注射后24h,切取内膜损伤处血管约1.5cm经4%甲醛液固定,石蜡包埋切片,H-E染色,高倍镜(10×40)下取内膜下3点、6点、9点、12点位置,计数中性粒细胞总数,取平均值。

1.7 血管内膜厚度测定 注射后14d,将损伤血管平均切取3段,H-E染色后,于高倍镜下测定内膜厚度,取3段的平均值。

1.8 内膜VEGF蛋白表达 注射后14d,将受损局部血管经4%甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,行ABC法VEGF免疫组织化学染色(试剂盒购自中山生物技术有限公司),观察VEGF蛋白的表达。

1.9 统计学处理 利用SAS统计软件作统计处理,采用组间 $t$ 检验。

## 2 结果

2.1 损伤内膜的内膜化程度 电镜观察,大鼠动脉拉伤后

24h,联合组及抗体组血管内膜表面较粗糙,有极少量白细胞和红细胞黏附,基因组血管内膜表面较粗糙有较多的中性粒细胞浸润,手术对照组血管内膜表面粗糙,有大量的白细胞和红细胞黏附并可见血小板毯状聚集和微血栓形成。正常血管内膜表面光滑,内皮细胞形状规则,呈梭形,沿血流方向排列。动脉拉伤14d后,联合组血管内膜内皮细胞呈岛状分布,形状较正常内皮细胞略饱满,处于增殖活跃期,血管内膜较光滑,抗体组及基因组血管内膜表面粗糙,手术对照组血管内膜表面较其他组明显粗糙,且可见血管平滑肌细胞过度增殖。

2.2 血管内膜厚度的测定 14d观察组中,联合组内膜厚度与同期手术对照组比较明显减小。联合组、基因组、抗体组及手术对照组内膜厚度(mm)分别为 $(1.16 \pm 0.14) \times 10^{-2}$ 、 $(1.27 \pm 0.16) \times 10^{-2}$ 、 $(1.55 \pm 0.19) \times 10^{-2}$ 、 $(2.63 \pm 0.33) \times 10^{-2}$ ,联合组血管内膜厚度明显小于其他各组( $P < 0.05$ ,图1)。

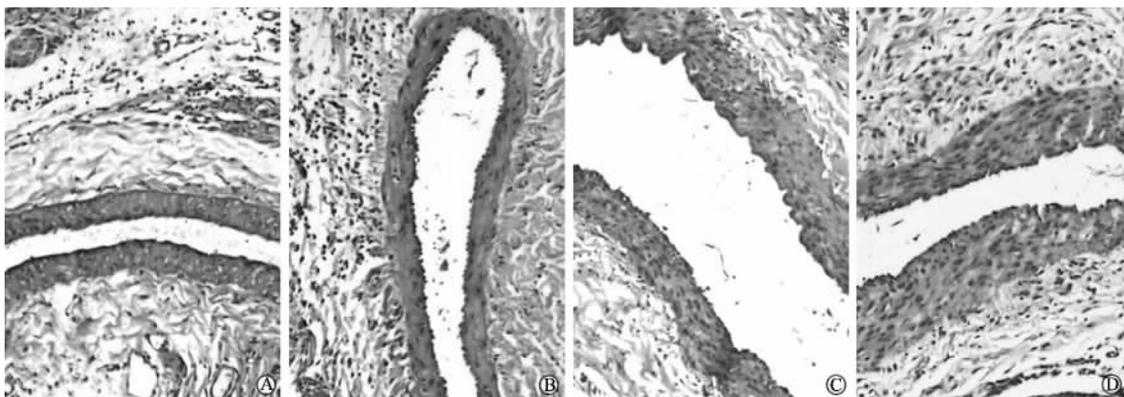


图1 注射后14d各组大鼠股动脉内膜H-E染色结果(×400)

A:联合组,股动脉管腔通畅、内膜较光滑、内膜层未增厚;B:基因组,股动脉管腔通畅、内膜较联合组欠光滑、内膜层未增厚;C:抗体组,股动脉管腔通畅、内膜不光滑、内膜层增厚;D:手术对照组,股动脉管腔通畅、内膜不光滑、内膜层明显增厚

2.3 损伤内膜VEGF蛋白表达 14d时观察可见,联合组中内膜处可见大量VEGF阳性反应的棕褐色颗粒(图2A),依次多于基因组(图2B)、抗体组(图2C),而手术对照组(图

2D)仅见少量的阳性反应的棕褐色颗粒,并可见大量过度增殖的血管平滑肌细胞。

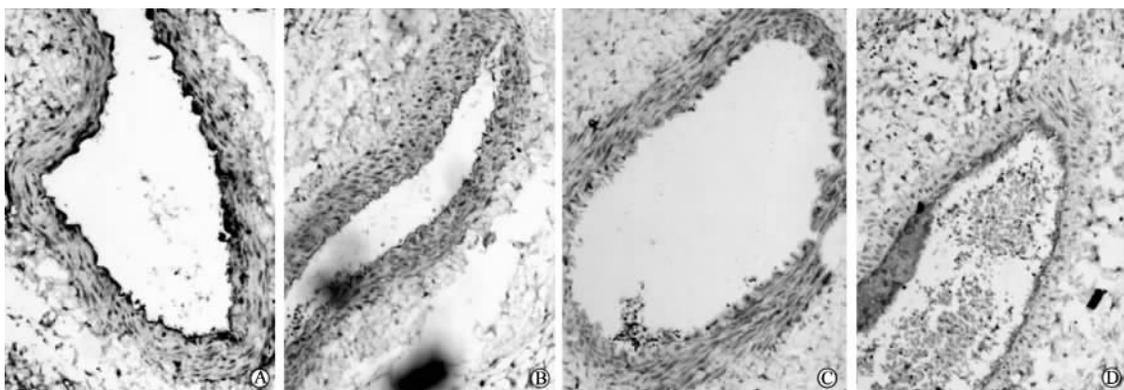


图2 各组治疗14d后内膜VEGF蛋白表达免疫组化染色(×400)

A:联合组,VEGF蛋白表达阳性反应的棕褐色颗粒较多,背景深;B:基因组,VEGF蛋白表达阳性反应的棕褐色颗粒较多,但较联合组略减少;C:抗体组,阳性反应颗粒较少;D:手术对照组,阳性反应颗粒极少,仅于内膜面有少量表达

2.4 中性粒细胞浸润 24 h 观察组,联合组、抗体组、基因组、手术对照组损伤血管内膜中性粒细胞浸润计数(每高倍视野下,×400)分别为 27.55±3.62、29.30±1.51、30.90±4.92、34.25±1.64,各组间两两比较  $P<0.05$ ,差异有统计学意义。

### 3 讨论

血管内膜损伤后存在着血管病理性重塑<sup>[5]</sup>,随着人们对组织及细胞分子水平的研究,发现内皮细胞损伤是内膜增厚、血管重塑的始动因素,正常的血管内膜,小量的内皮细胞损伤,恢复很快,大约在 48 h 内即开始,7~14 d 完全恢复正常。Jenkins 等<sup>[6]</sup>通过大鼠球囊扩张模型,发现术后 1 d 可见血管平滑肌细胞复制,4 d 后可见 VSMC 移至内膜。所以当内膜损伤较大时,内膜逐渐被修复的增殖平滑肌细胞和细胞外基质堆积,使内膜增厚,出现血管狭窄<sup>[7]</sup>。Laitinen 等<sup>[8,9]</sup>发现 VEGF 可以明显地抑制新生内膜平滑肌的过度增生,保护内皮细胞的完整性。因此,应用内皮细胞丝裂原 VEGF,促进损伤内膜的内皮化,是防止血管再狭窄的新策略。由于血管内皮生长因子蛋白制品半衰期较短( $<6$  min),易在体内降解而降低其效价,故我们采用 VEGF<sub>165</sub> cDNA 基因经尾静脉导入受损血管内皮细胞,观察到其有促进内皮细胞内皮化的作用,起到减少血管病理性狭窄的发生,实验同时也发现,在受损的内膜处有大量的中性粒细胞浸润,而中性粒细胞不仅能产生大量氧自由基,氧化细胞膜及各种蛋白质,还能释放各种炎性介质及溶酶体等有害物质直接损伤细胞。研究发现中性粒细胞浸润与细胞间黏附分子 ICAM-1 密切相关<sup>[10]</sup>,正常情况下,血管内皮细胞表面仅表达少量的 ICAM-1<sup>[11]</sup>,但在炎症、受损、缺氧等情况下,内皮细胞表面则大量表达 ICAM-1<sup>[12]</sup>,而 ICAM-1 参与介导中性粒细胞与受损血管内皮细胞的黏附,本实验也正是利用抗 ICAM-1 单克隆抗体来对抗白细胞向受损血管内皮细胞的浸润,减少血管内皮细胞的进一步损伤,再加之 VEGF<sub>165</sub> cDNA 基因有促进损伤内膜的内皮化作用,利用两者共同作用来观察受损血管内膜的修复情况。因为血管内皮损伤后,炎性细胞局部浸润在 24~48 h 达到高峰,到 72 h 后基本消失。本实验设计 24 h 实验组,主要目的是观察抗 ICAM-1 单克隆抗体是否能够抑制炎性细胞的局部浸润。而 VEGF<sub>165</sub> cDNA 基因在内膜表达并产生促内膜修复增生是在 7~14 d 达到高峰,本实验选择 14 d 为观察点。实验发现,14 d 观察组中,联合组内膜有大量的 VEGF 阳性反应的棕褐色颗粒,内皮化程度较高,基因组次之,抗体组也有少量 VEGF 阳性反应的棕褐色颗粒,而手术对照组中极少。在我们的实验中还发现,基因组中性粒细胞浸润相对手术对照组较少,反映出 VEGF 可能有抑制白细胞与受损内皮细胞结合的作用,从而保护了内皮细胞免受白细胞浸润的再损伤。14 d 观察组中,联合组内膜厚度较基因组及抗体组有不同程度的减小,较手术对照组明显减小,内皮化程度也明显好于手术对照组,提示联合治疗的有效性,有可能为临床治疗血管损伤后血管重塑提供了可靠的治疗及预防方法。

**致谢:**本课题研究过程中得到长海医院检验科沈茜教授及复旦大学生物工程系窦同海博士的大力支持与指导,在此再次表示衷心的感谢!

### [参考文献]

- [1] Pels K, Deiner C, Coupland E, et al. Effect of adventitial VEGF<sub>165</sub> gene transfer on vascular thickening after coronary artery balloon injury[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 60: 664-672.
- [2] Moromizato Y, Stechschulte S, Miyamoto K, et al. CD18 and ICAM-1-dependent corneal neovascularization and inflammation after limbal injury [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157:1277-1281.
- [3] Gong C, Hoff JT, Keep RF. Acute inflammatory reaction following experimental intracerebral hemorrhage in rat [J]. *Brain Res*, 2000, 871:57-65.
- [4] Garcia-Penarrubia P, Lorenzo N, Galvez J, et al. Study of the physical meaning of the binding parameters involved in effector-target conjugation using monoclonal antibodies against adhesion molecules and cholera toxin[J]. *Cell Immunol*, 2002, 215:141-150.
- [5] Geary RL, Nikkari ST, Wagner WD, et al. Wound healing: a paradigm for lumen narrowing after arterial reconstruction[J]. *J Vasc Surg*, 1998, 27: 96-106.
- [6] Jenkins GM, Crow MT, Bilato C, et al. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries [J]. *Circulation*, 1998, 97: 82-90.
- [7] Shohet RV, Chen S, Zhou YT, et al. Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium[J]. *Circulation*, 2000, 101: 2554-2556.
- [8] Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical as sole therapy for myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 1998, 98:2800-2804.
- [9] Laitinen M, Zachary I, Breier G, et al. VEGT gene transfer reduces intimal thickening *via* increased production of nitric oxide in carotid arteries [J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8:1737-44.
- [10] Hartman JC, Anderson DC, Wiltse AL et al. Protection of ischemia/reperfusion canine myocardium by CL 18/6, a monoclonal antibody to adhesion molecule ICAM-1[J]. *Cardiovasc Res*, 1995, 30: 47-54.
- [11] Zhao ZQ, Lefer DJ, Sato H, et al. Monoclonal antibody to ICAM-1 preserves postischemic blood flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rabbit[J]. *Leukoc Biol*, 1997, 62:292-300.
- [12] Hayashi T, Hasegawa K, Morimoto M, et al. Effect of antibodies to intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 on cytokine mRNA expression in reovirus type-2-triggered autoimmune insulinitis in suckling DBA/1 mice[J]. *J Comp Pathol*, 2003, 128: 283-288.

[收稿日期] 2006-03-20

[修回日期] 2006-08-22

[本文编辑] 邓晓群