

• 短篇论著 •

# 靶向超声介导 VEGF<sub>165</sub> cDNA 联合抗细胞间黏附分子 1 单克隆抗体治疗大鼠心肌缺血

Targeted ultrasound delivered VEGF<sub>165</sub> cDNA gene combined with monoclonal antibody against intercellular adhesion molecule-1 in treatment of myocardial ischemia in rats

方平<sup>1\*</sup>, 蔡丽萍<sup>2</sup>, 谭跃萍<sup>1</sup>, 宋维<sup>1</sup>, 刘增波<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长征医院康健苑超声室, 上海 200003; 2. 解放军第 82 医院超声室, 淮安 223001)

**[摘要]** 目的: 探讨靶向超声介导 VEGF<sub>165</sub> 基因联合抗细胞间黏附分子-1(ICAM-1)单克隆抗体治疗大鼠心肌缺血的有效性。

**方法:** 60 只雄性 SD 大鼠经冠状动脉左前降支阻断法制备急性心肌缺血模型后, 随机分为 3 组, 每组各 20 只。超声介导治疗组采用超声破坏微泡造影剂的方法, 经大鼠尾静脉输入含 VEGF<sub>165</sub> cDNA 及抗 ICAM-1 单克隆抗体的造影剂 1 ml; 单纯联合治疗组仅输入等量的 VEGF<sub>165</sub> cDNA 及抗 ICAM-1 单克隆抗体混合物; 对照组注射生理盐水 1 ml。每组分别于 24 h 和 14 d 后处死动物, 分别行坏死区中性粒细胞计数、梗死心肌质量百分比测定, 免疫组织化学法检测坏死区心肌 VEGF 蛋白表达, 毛细血管染色法对坏死心肌进行新生血管计数。**结果:** 心肌缺血 24 h 后, 坏死边缘区中性粒细胞计数超声介导治疗组 < 单纯联合治疗组 < 对照组 ( $P < 0.01$ ); 心肌缺血 24 h 和 14 d 后, 超声介导治疗组梗死心肌质量百分比均低于单纯联合治疗和对照组 ( $P < 0.05$ ); 心肌缺血 14 d 后, 超声介导治疗组中可见大量 VEGF 阳性反应的棕褐色颗粒, 而单纯联合治疗组相对减少, 对照组心肌中仅有极少量。心肌缺血 14 d 后, 超声介导治疗组毛细血管密度 > 单纯联合治疗组 > 对照组 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 靶向超声介导 VEGF<sub>165</sub> cDNA 联合抗 ICAM-1 单克隆抗体可明显提高缺血心肌局部药物浓度, 促进心肌功能恢复。

**[关键词]** 超声检查, 介入性; 血管内皮生长因子类; 胞间黏附分子 1; 抗体, 单克隆; 心肌缺血

**[中图分类号]** R 541.47

**[文献标识码]** B

**[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1375-02

血管内皮生长因子(VEGF)在预防和治疗缺血性疾病中的作用已得到肯定<sup>[1,2]</sup>, 其中应用 VEGF 基因治疗心肌缺血已有不少报道<sup>[3-5]</sup>。但如何有效地将外源性 VEGF 导入体内, 使高浓度 VEGF 定向黏附至受损血管内皮并促进血管内皮细胞增殖仍是值得探讨的课题。另一方面, 由于心肌缺血造成局部炎性细胞积聚而导致的心肌损伤也是一个不容忽视的问题。为此, 本研究在前期工作<sup>[6]</sup>的基础上, 利用心肌缺血动物模型, 通过靶向超声介导 VEGF<sub>165</sub> cDNA 联合抗细胞间黏附分子 1(ICAM-1)单克隆抗体作用于受损心肌局部, 使受损心肌局部药物浓度增高, 从而将 VEGF<sub>165</sub> cDNA 及抗 ICAM-1 单克隆抗体特异性地结合至受损血管内皮上, 达到靶向治疗的目的。

## 1 材料和方法

**1.1 动物、主要仪器及试剂** 60 只雄性 SD 大鼠(体质量 250~300 g), 购自第二军医大学实验动物中心; 含氟碳气体声振白蛋白微泡造影剂全氟显(C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>)由第一军医大学南方医院药学基地提供; Acuson Sequoia 512 彩色多普勒超声诊断仪; VEGF<sub>165</sub> cDNA 由本室与复旦大学生物工程研究室制备并行活性鉴定; 分泌抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体杂交瘤细胞株、VEGF 免疫组化试剂盒购自中山生物技术有限公司, CD34 抗体购自福州迈新生物试剂有限公司。

**1.2 大鼠急性心肌缺血模型的建立** 采用冠状动脉左前降支阻断法制备大鼠急性心肌缺血模型, 参照文献<sup>[6]</sup>方法进行。

**1.3 含 VEGF<sub>165</sub> cDNA 基因及抗 ICAM-1 单克隆抗体超声造影剂微泡的制备** 将 VEGF<sub>165</sub> cDNA 基因及抗 ICAM-1

单克隆抗体与全氟显以 1:1:3 的体积比例在 4℃ 下混合 2 h, 使黏附于微泡造影剂的外壳所形成的混合物中 VEGF<sub>165</sub> cDNA 基因浓度为 2 mg/ml, 抗 ICAM-1 单克隆抗体的浓度为 1.5 mg/ml。

**1.4 实验分组及靶向介导治疗** 60 只心肌缺血大鼠随机分为对照组、单纯联合治疗组、超声介导治疗组, 每组各 20 只动物。超声介导治疗组经大鼠尾静脉输入含 VEGF<sub>165</sub> cDNA 及抗 ICAM-1 单克隆抗体的造影剂 1 ml, 用二维超声监控心肌显影, 并用超声波在大鼠胸壁照射至造影剂显影消失。使用仪器为 Acuson Sequoia 彩色多普勒超声诊断仪, 4V1 探头, 启用二次谐波模式使发射频率和接受频率分别为 1.75 MHz 和 3.5 MHz, 将机械指数调至最大, 聚焦深度为 4 cm。采用心电触发, 每 6~8 个心动周期触发一次, 约 10 min。单纯联合治疗组仅直接从尾静脉输入 VEGF<sub>165</sub> cDNA 基因及抗 ICAM-1 单克隆抗体混合物 1 ml; 对照组只注射生理盐水 1 ml。

**1.5 疗效评价** 各组分别于心肌缺血 24 h 和 14 d 后处死大鼠, 取心脏标本, 用 4% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 沿心脏左室短轴进行切片, 参照文献<sup>[6]</sup>方法进行下列观察: (1) 坏死区中性粒细胞计数; (2) 梗死心肌质量百分比的测定; (3) 梗死

**[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]** 方平, 博士, 教授、主任医师, 硕士生导师。

\* Corresponding author. E-mail: fangping@sohu.com

区域心肌 VEGF 蛋白表达;(4)心肌毛细血管染色检测坏死心肌新生血管计数。

1.6 统计学处理 采用 SAS 统计软件进行统计学处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用组间 *t* 检验。

2 结果

2.1 坏死区中性粒细胞计数 心肌缺血 24 h 后,对照组坏死边缘区有大量的中性粒细胞浸润,细胞计数为(83.50 ± 2.08)个/高倍视野;单纯联合治疗组有少量中性粒细胞浸润,细胞计数为(32.03 ± 8.49)个/高倍视野;超声介导治疗组有少量中性粒细胞浸润,细胞计数为(26.10 ± 2.66)个/高倍视野。各组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。心肌缺血 14 d 后观察,各组坏死区中性粒细胞无明显浸润。

2.2 梗死心肌质量百分比 心肌缺血 24 h 后,超声介导治疗组梗死心肌质量百分比为(14.05 ± 2.55)%,单纯联合治疗组为(15.31 ± 1.64)%,对照组为(35.23 ± 2.75)%;心肌缺血 14 d 后,超声介导治疗组梗死心肌质量百分比为(12.54 ± 0.76)%,单纯联合治疗组为(13.85 ± 2.20)%,对照组为(34.50 ± 1.30)%,各组间两两比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.3 梗死区域心肌 VEGF 蛋白表达 心肌缺血 14 d 后,所有接受抗 ICAM-1 单克隆抗体及 VEGF 基因治疗的心肌组织中均有不同程度的 VEGF 蛋白表达,其中超声介导治疗组中可见大量 VEGF 阳性反应的棕褐色颗粒,而单纯联合治疗组心肌 VEGF 阳性反应的棕褐色颗粒相对减少,对照组心肌中仅有极少量的 VEGF 阳性反应颗粒。而心肌缺血 24 h 后观察,各组中 VEGF 阳性反应的颗粒均较少。

2.4 坏死心肌新生血管计数 以 CD34 标记,微血管染为棕黄色,心肌缺血 14 d 后,超声介导治疗组毛细血管密度(MDV)为(269.52 ± 6.21)个/高倍视野,单纯联合治疗组为(245.24 ± 21.08)个/高倍视野,而对照组为(112.04 ± 33.56)个/高倍视野,各组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 1)。

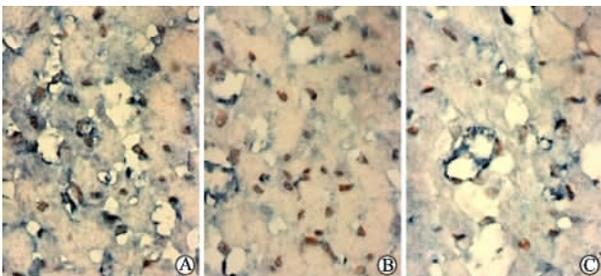


图 1 心肌缺血 14 d 后各组大鼠坏死心肌微血管免疫组化染色结果(×400)

A:超声介导治疗组;B:单纯联合治疗组;C:对照组

3 讨论

研究表明,VEGF 可促进侧支循环形成,发挥自身搭桥作用;并具有促进内皮细胞再生和减轻内膜增厚,防止再狭窄,恢复内皮依赖性功能,以及减轻心肌缺血再灌注损伤及防止血栓形成等作用<sup>[1]</sup>。另有研究表明:在大多数的血管内

皮细胞中都有 ICAM-1 的分布,在缺血损伤所致炎症时,血管内皮细胞的 ICAM-1 表达达到高峰<sup>[7]</sup>,而淋巴细胞和白细胞的黏附分子受体的表达也明显增高,促进血液中的白细胞向炎症局部组织的浸润,加重病变组织的损伤。据此,我们设想在心肌缺血动物模型中利用抗 ICAM-1 单克隆抗体对抗白细胞向炎症局部组织浸润所致的损伤,防止再狭窄;同时利用 VEGF<sub>165</sub> cDNA 作用于受损的血管内皮细胞上,促进内皮细胞的修复与新生血管的再生;外加超声联合微泡造影剂的靶向作用,使药物更高浓度更特异地吸附于心肌缺血区域,达到心肌缺血区域内皮细胞的修复及新生血管的再生,促进侧支循环,防止再狭窄,且可避免药物的浪费。

本研究结果显示,心肌缺血 24 h 后,中性粒细胞在坏死心肌边缘区浸润程度以超声介导治疗组最少,其次为单纯联合治疗组,而对照组坏死区边缘有大量的中性粒细胞浸润,说明抗 ICAM-1 单克隆抗体能对抗中性粒细胞的浸润,同时也证明了超声介导的有效性。心肌缺血 14 d 后观察,超声介导治疗组 VEGF 蛋白表达量较单纯联合治疗组显著增多,新生毛细血管较单纯联合治疗组增多,较对照组明显增多,提示抗 ICAM-1 单克隆抗体有对抗白细胞的浸润,减少内皮细胞的损伤,保护心肌细胞及促进受损细胞恢复的功能,并可协同 VEGF<sub>165</sub> cDNA 促进新生血管生成,减少心肌梗死的面积,促进心肌功能的恢复。心肌缺血 14 d 后观察,超声介导治疗组心肌梗死面积较单纯联合治疗组减少,且较对照组明显减少,也证明了两组协同作用较单独使用效果更佳,从而为心肌缺血治疗又提供了一种新的治疗手段。

[参考文献]

[1] 陈少萍,顾洪.血管内皮细胞生长因子治疗缺血性疾病的研究现状[J].国外医学·心血管疾病分册,2000,27:10-12.

[2] Rajagopalan S,Trachtenberg J,Mohler E,et al. Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the vascular endothelial growth factor cDNA (CI-1023) to patients with claudication[J]. Am J Cardiol, 2002,90:512-516.

[3] Su H,Arakava-Hoyt J,Kan YW. Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia response element-regulated gene expression in mouse ischemic heart model[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2002,99:9480-9485.

[4] 张裕东,张宝仁,黄盛东,等.腺病毒介导的血管内皮生长因子体外转染心肌细胞的研究[J].第二军医大学学报,2004,25:485-488.

[5] 单志新,符永恒,余细勇,等.VEGF<sub>165</sub>和 Angiopoietin-1 cDNA 治疗缺血性心肌的实验研究[J].心肺血管病杂志,2006,25:114-117.

[6] 蔡丽萍,方平,谭跃萍,等.靶向超声介导 VEGF<sub>165</sub> cDNA 基因治疗大鼠心肌缺血的实验研究[J].中华超声影像学杂志,2005,14:854-857.

[7] Sato H,Zhao ZQ,Jordan JE,et al. Basal nitric oxide expresses endogenous cardioprotection during reperfusion by inhibition of neutroopil-mediated damage after surgical revascularization [J]. J Throac Cardiovasc Surg,1997,113:339-409.

[收稿日期] 2006-09-07

[修回日期] 2006-12-05

[本文编辑] 贾泽军,邓晓群