

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)07-0591-03

内皮型一氧化氮合酶基因转染在兔颈静脉移植血管桥中的表达

陶登顺¹, 张仁福², 王辉山², 汪曾炜², 朱洪玉², 谭丽丽², 张铁铮²(¹ 第四军医大学西京医院心血管外科中心 陕西 西安 710033 ; ² 沈阳军区总医院心血管外科 辽宁 沈阳 110016)

Expression of transfected endothelial nitric oxide synthase transfer on carotid vein graft in rabbits

TAO Deng-Shun¹, ZHANG Ren-Fu², WANG Hui-Shan², WANG Zeng-Wei², ZHU Hong-Yu², TAN Li-Li², ZHANG Tie-Zheng²¹Center of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ²Department of Cardiovascular Surgery, General Hospital, Shenyang Military Area Command, Shenyang 110016, China

【Abstract】 AIM: To study the expression of adenoviral-mediated endothelial nitric oxide synthase gene (AdCMVeNOS) on carotid vein graft in rabbits and to find the way to prevent vein graft restenosis. METHODS: External jugular vein-common carotid artery bypass graft model was established. Eighteen rabbits were randomly divided into 3 groups: Control group (A), simple adenovirus infection group (B) and eNOS gene transfection group (C). After four weeks, the expression of exogenous eNOS mRNA and protein was detected by *in situ* hybridization and immunohistochemistry respectively. The proliferation of intima and media in vein graft was measured by computer graph-analyzing system. RESULTS: The expressions of exogenous eNOS mRNA and protein were detected in vein graft. There was no obvious difference in the thickness of intima and media between control group and simple adenoviral infection group. Compared with that in control group, the thickness of intima and media in eNOS gene transfection group decreased by 42.3% and 13.5% respectively. The ratio of the thickness of intima to media (I/M) decreased by 34.6%. CONCLUSION: The transfected eNOS gene can be expressed on carotid vein graft in rabbits. eNOS gene has some protective effect on vein graft restenosis.

收稿日期 2004-10-23; 修回日期 2004-11-10

基金项目 全军医药卫生科研基金(01H001)

通讯作者: 王辉山. Tel. (024) 23051212 Email. huishanwang@hotmail.com

作者简介: 陶登顺(1969-)男(汉族)黑龙江省宁安市人. 博士生(导师 张仁福), 主治医师. Tel. (024) 23051214 Email. taodengshun@hotmail.com

【Keywords】 restenosis; vein grafts; nitric oxide synthase; adenoviral vector

【摘要】目的: 研究腺病毒载体介导的人内皮型一氧化氮合酶基因在兔自体移植颈静脉中的表达, 寻找预防移植血管再狭窄的方法. 方法: 建立兔颈外静脉颈总动脉旁路移植模型, 18只兔随机等分为3组, A: 对照组, B: 空载腺病毒液感染组, C: eNOS基因转染组. 在兔颈外静脉颈总动脉旁路移植术中, 分别应用空载腺病毒液或AdCMVeNOS血管桥内注入法感染移植静脉1h. 术后4wk, 应用多聚核苷酸探针原位检测方法检测外源性基因mRNA的表达, 免疫组织化学染色方法检测eNOS蛋白的定位; HE及弹力纤维染色后, 应用计算机图像分析系统检测移植静脉内膜、中膜增生情况. 结果: 人内皮型一氧化氮合酶基因在自体移植静脉中表达出相应的mRNA和蛋白质, 术后4wk与对照组相比, 空载腺病毒液感染组移植静脉内膜和中膜厚度无明显变化; eNOS基因转染组移植静脉内膜和中膜厚度分别减少42.3%、13.5%, 内膜厚度/中膜厚度比值(I/M)减少34.6%. 结论: 腺病毒载体介导的人内皮型一氧化氮合酶基因成功转染兔自体移植颈静脉中并有效表达, eNOS基因具有防治移植静脉内膜增生作用.

【关键词】 再狭窄; 静脉移植; 一氧化氮合酶; 腺病毒载体

【中图分类号】 R322.123

【文献标识码】 A

0 引言

许多研究表明, 移植静脉血管桥再狭窄的发生与一氧化氮(NO)的功能异常相关^[1-5], 我们采用兔颈外静脉颈总动脉旁路移植模型, 应用腺病毒载体介导的人内皮型一氧化氮合酶基因转染兔自体移植颈静脉, 研究eNOS基因在兔自体移植颈静脉中的表达, 探索预防移植血管再狭窄的方法.

1 材料和方法

1.1 材料 健康家兔18只(沈阳军区总医院动物实验科提供), 雌雄不拘, 体质量(3.0±0.25)kg. 随机等分为3组(n=6). A组: 对照组; B组: 空载腺病毒液感染组; C组: eNOS基因转染组.

1.2 方法 建立自体静脉旁路移植模型. 家兔经1g/L戊巴比妥钠(10mg/kg, iv)麻醉后, 颈正中切口, 分离右颈外静脉2.5cm, 两端结扎, 应用含0.30g/L罂粟碱、0.15g/L肝素的生理盐水冲洗液冲洗, A组

应用冲洗液、B组应用空载腺病毒液(浓度为 5×10^{12} pfu/L)、C组应用人内皮型一氧化氮合成酶基因重组腺病毒(AdCMVeNOS,浓度为 5×10^{12} pfu/L)灌注用于移植的静脉段,室温保留1 h。分离同侧颈总动脉约2.5 cm,静脉注射肝素钠(1 mg/kg),全身体部分肝素化,动脉两端置无创血管夹夹闭,将动静脉平行并拢,两端血管对应处分别切长约3 mm纵切口,用8-0 Prolene线连续缝合,行动静脉侧侧吻合,吻合好后排气,恢复血流,然后将动脉两吻合口中部结扎,使动脉血流自静脉桥通过,确定血流通畅,彻底止血后缝合颈部切口。实验动物麻醉恢复后送动物实验中心饲养。肌肉注射青霉素(3×10^4 u/kg)预防感染,连续3 d。

术后动物饲养4 wk后取材。分离获取移植静脉血管段,以100 g/L多聚甲醛固定,每段血管三等分横断,石蜡包埋,连续切片,切片厚 $5 \mu\text{m}$,用多聚寡核苷酸探针和高敏感标记技术及使用敏感加强型的原位检测方法检测外源性基因mRNA的表达,用SABC免疫组织化学方法检测eNOS蛋白的定位表达(试剂盒均为武汉博士德公司产品,操作严格按说明进行);HE及弹力纤维染色,日本产Luzex-F显微图像分析系统测量移植静脉内膜、中膜厚度。

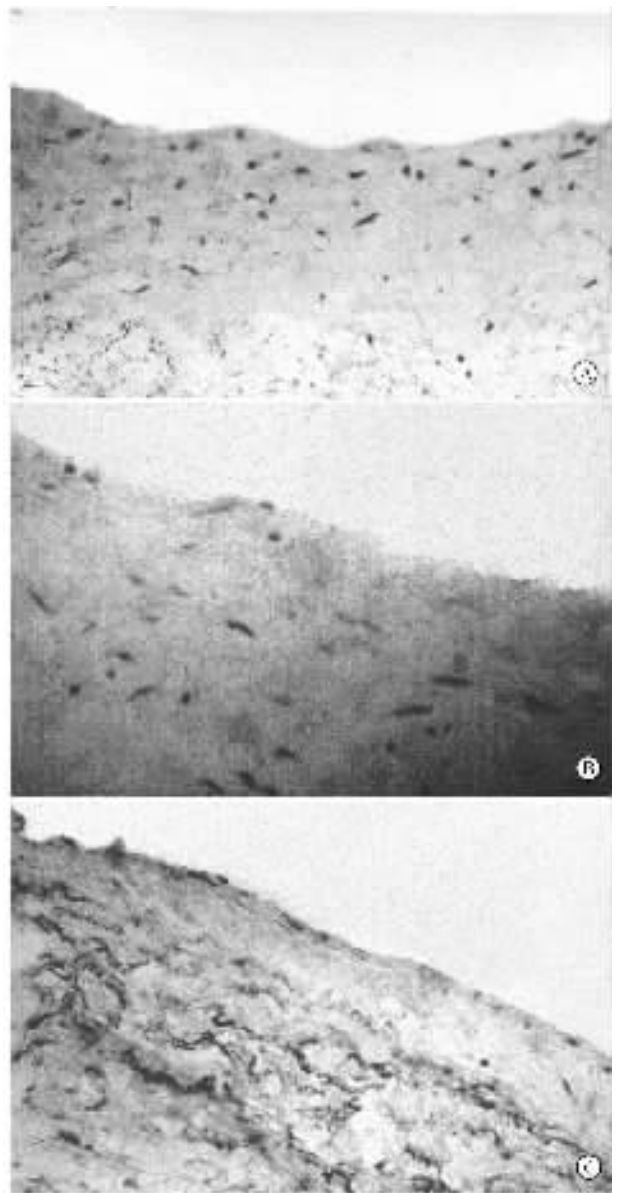
统计学处理:实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为结果有显著性差异。

2 结果

实验过程中无实验动物死亡。4 wk后取材,静脉桥均通畅。单纯手术对照组、空载腺病毒液感染组和eNOS基因转染组的颈静脉旁路移植血管在术后4 wk都出现新内膜形成和中膜增厚,应用原位杂交方法和免疫组织化学方法,C组移植静脉中膜和内膜可检测到大量eNOS mRNA的表达和eNOS蛋白的表达,其余两组未见明显表达(Fig 1 2)。各组移植静脉内膜、中膜厚度测量结果以及I/M比值见Tab 1。C组内膜、中膜面积与A组比较差别具有显著性意义($P < 0.01$),C组内膜/中膜面积比与A组比较差别具有显著性意义($P < 0.01$)。

3 讨论

静脉移植血管的再狭窄主要是因为血管平滑肌细胞过度增生与凋亡失去了平衡,形成新内膜和不断发展的血管粥样硬化^[6,7]。有研究表明,SMC的增殖、移行是血管再塑和重排,并最终导致移植静脉再狭窄的细胞学基础^{8]}。NO是内皮细胞产生的一种血



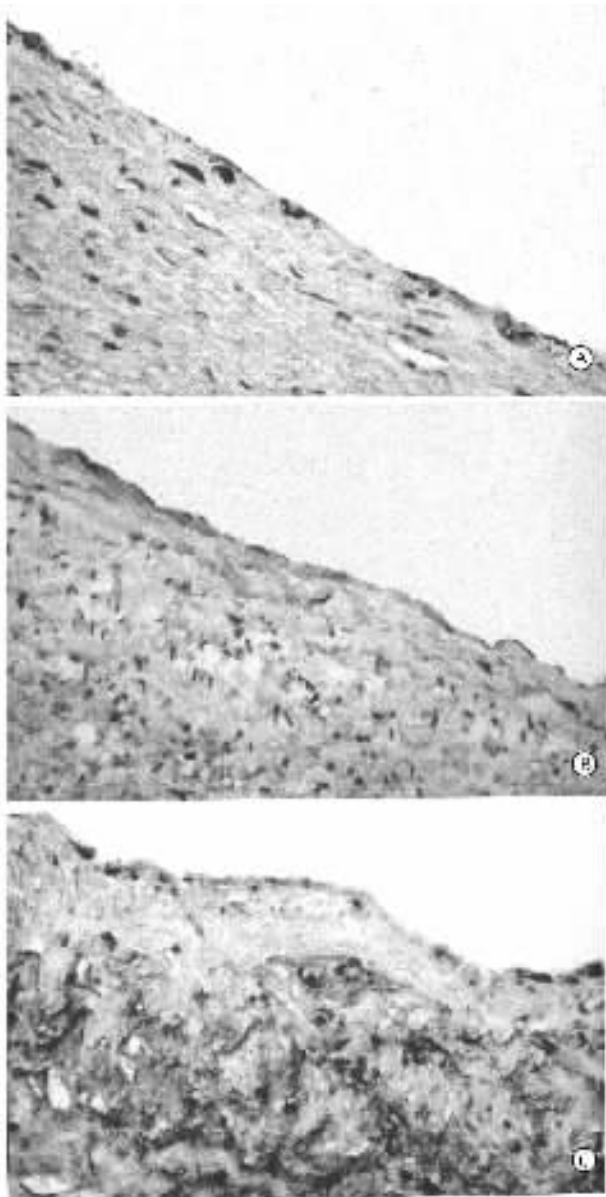
A: Control group; B: Adenovirus infection group; C: eNOS gene transfer group.

Fig 1 Expression of eNOS mRNA in intima and media of vein graft in eNOS gene transfection group detected by *in situ* hybridization SABC $\times 400$

图1 应用原位杂交方法 eNOS 基因转染组移植静脉中膜和内膜可检测到大量 eNOS mRNA 表达

管舒张因子,在体内作用十分复杂,能够抑制血小板聚集,白细胞黏附,血管内皮细胞增生,以及血管平滑肌细胞的迁移和增殖,还参与细胞凋亡的调节。本研究应用纯化的AdCMVNOS III和空载腺病毒液分别感染家兔颈静脉移植血管,并行兔颈外静脉颈总动脉旁路移植术。

AdCMVNOS III转染颈静脉移植血管用多聚寡核苷酸探针和高敏感标记技术及使用敏感加强型的原位检测方法检测外源性基因mRNA的表达,用SABC



A : Control group ; B : Adenovirus infection group ; C : eNOS gene transfer group.

Fig 2 Expression of eNOS protein in intima and media of vein graft in eNOS gene transfection group detected by immunohistochemistry SABC $\times 400$

图2 应用免疫组织化学方法 eNOS 基因转染组移植静脉中膜和内膜可检测到大量 eNOS 蛋白阳性表达

免疫组织化学方法检测 eNOS 蛋白的定位表达, 结果证实 移植静脉中膜和内膜可检测到大量 eNOS mRNA 的表达和 eNOS 蛋白的表达, 其余两组未见明显表达, 说明 eNOS 基因能够转入静脉移植血管, 并在移植静脉壁中膜和内膜细胞中超表达。术后 4 wk 观察新内膜增生情况, 发现未经处理、空载腺病毒液和

表1 各组移植静脉内膜、中膜厚度及 I/M 比较

Tab 1 Thickness of intima and media of vein graft in each group ($n=6, \bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

Group	Intima	Media	I/M
A	122.1 \pm 24.2	33.1 \pm 6.4	3.8 \pm 0.7
B	119.3 \pm 20.9	29.5 \pm 6.7	4.1 \pm 0.7
C	70.4 \pm 18.6 ^{ab}	28.7 \pm 7.5	2.5 \pm 0.7 ^{ab}

^a $P < 0.01$ vs A, ^b $P < 0.01$ vs B. A : Control group ; B : Adenovirus infection group ; C : eNOS gene transfection group.

AdCMVNOS III 分别感染处理的颈静脉移植血管都有不同程度新内膜形成和中膜增厚。移植静脉内膜和中膜厚度分别减少 42.3% , 13.5% , 内膜厚度/中膜厚度比值 (I/M) 减少 34.6%。I/M 比值降低, 说明血管内膜增生所受抑制更为明显。空载腺病毒液感染组与对照组比较各指标差异不明显。提示转染 eNOS 基因, 使之在移植静脉 VSMC 中超表达 eNOS 蛋白, 可抑制移植静脉内膜、中膜, 尤其是内膜的增生。

【参考文献】

- [1] Massion PB, Feron O, Dessy C, et al. Nitric oxide and cardiac function : Ten years after, and continuing [J]. *Circ Res*, 2003 ; 93(5) : 388 - 398.
- [2] Dzau VJ, Mann MJ, Ehsan A, et al. Gene therapy and cardiovascular surgery : The emerging field of surgenomics [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001 ; 121 : 206 - 216.
- [3] Cable DG, O'Brien T, Kullo IJ, et al. Expression and function of a recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in porcine coronary arteries [J]. *Cardiovasc Res*, 1997 ; 35 : 553 - 559.
- [4] Bourassa MG, Campeau L, Lesperance J. Changes in grafts and in coronary arteries after coronary bypass surgery [J]. *Cardiovasc Clin*, 1991 ; 21 : 83 - 100.
- [5] Silva JA, White CJ, Collins TJ, et al. Morphologic comparison of atherosclerotic lesions in native coronary arteries and saphenous vein grafts with intracoronary angiography in patients with unstable angina [J]. *Am Heart J*, 1998 ; 136 : 156 - 163.
- [6] Motawni JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease : Pathogenesis, predisposition, and prevention [J]. *Circulation*, 1998 ; 97 : 916 - 931.
- [7] Chiu-Pinheiro K, O'Brien T, Katusic S, et al. Gene transfer to coronary artery bypass conduits [J]. *Ann Thorac Surg*, 2002 ; 74 : 1161 - 1166.
- [8] Gaudino MD, Toesca B, Maggiano B, et al. Localization of nitric oxide synthase type III in the internal thoracic and radial arteries and the great saphenous vein : A comparative immunohistochemical study [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003 ; 125 : 1510 - 1515.

编辑 甄志强