

[文章编号] 1000-4718(2008)06-1047-04

## 心肌肌浆网 $\text{Ca}^{2+}$ - ATP 酶基因转导改善慢性心力衰竭犬心功能的研究\*

付治卿<sup>1</sup>, 李小鹰<sup>1△</sup>, 刘涛<sup>2</sup>, 米亚非<sup>1</sup>, 周声安<sup>1</sup>, 叶卫华<sup>3</sup>(中国人民解放军总医院<sup>1</sup>老年心内科,<sup>2</sup>老年超声科,<sup>3</sup>心外科,北京 100853)

**[摘要]** 目的:探讨以重组腺相关病毒(rAAV)为载体的心肌肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$  - ATP 酶(SERCA2a)基因转导对慢性心力衰竭犬心功能的影响。方法:选取成年比格犬 17 只,随机分为对照组 4 只和心力衰竭组 11 只。快速右心室起搏建立慢性心力衰竭犬模型并随机分为心力衰竭组 4 只、心力衰竭 + 绿色荧光蛋白(EGFP)组 4 只、心力衰竭 + SERCA2a 组 5 只(其中 1 只在开胸后死亡)。接受基因导入的心力衰竭犬行开胸术,分别向心肌内注射携带 EGFP 和 SERCA2a 基因的 rAAV 载体。于基因转导 30d 时停止起搏后进行超声心动图和血流动力学检查。结果:基因转导 30 d 时,心力衰竭 + SERCA2a 组犬的症状及超声心动图指标与心力衰竭 + EGFP 组相比有显著好转( $P < 0.05$ );与对照组相比无显著差别。血流动力学监测发现,转导 SERCA2a 的犬 LVSP、 $+dp/dt_{\max}$  和  $-dp/dt_{\max}$  明显升高,平均值较 EGFP 组分别增加 54.12% [(214.72 ± 31.74) mmHg vs (139.32 ± 36.79) mmHg]、146.81% [(6779.43 ± 217.58) mmHg/s vs (2746.85 ± 931.23) mmHg/s] 和 71.52% [(-4341.42 ± 322.02) mmHg/s vs (-2531.14 ± 616.15) mmHg/s], LVEDP 则降低了 63.43% [(21.86 ± 6.95) mmHg vs (59.78 ± 6.92) mmHg], 所有参数与对照组相比无显著差异。心力衰竭 + EGFP 组犬心肌冰冻切片在激光共聚焦显微镜下可见弥漫绿色荧光。结论:以 rAAV 为载体介导 SERCA2a 基因转导能够改善慢性心力衰竭犬心脏的收缩和舒张功能,是 1 种有前景的治疗慢性心力衰竭的方法。

**[关键词]** 心力衰竭,充血性;肌浆网; $\text{Ca}^{2+}$  转运 ATP 酶;基因转移

**[中图分类号]** R541.61; R540.45 **[文献标识码]** A

## Restoration of cardiac function in failing beagle hearts by recombinant adeno-associated viral gene transfer of sarcoplasmic reticulum $\text{Ca}^{2+}$ - ATPase

FU Zhi-qing<sup>1</sup>, LI Xiao-ying<sup>1</sup>, LIU Tao<sup>2</sup>, MI Ya-fei<sup>1</sup>, ZHOU Sheng-an<sup>1</sup>, YE Wei-hua<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Department of Geriatric Cardiology,<sup>2</sup>Department of Geriatric Ultrasound,<sup>3</sup>Department of Cardiac Surgery, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. E-mail: lixy@mx.cei.gov.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** Abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis is one basic cause of heart failure. Studies have recently shown that overexpression of sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase (SERCA2a) by adenoviral/adeno-associated viral gene transfer restores contractile function *ex vivo* and in murine or rabbit models. We therefore hypothesized that an increase in SERCA2a protein will improve cardiac function in a pacing-induced big animal model of heart failure. **METHODS:** 17 beagles were randomized into control group (CG,  $n=4$ ) and chronic heart failure group ( $n=11$ ). Four weeks after right ventricular rapid pacing (230 beats/min), 11 beagles all got heart failure (documented by >29.3% decrease in ejection fraction). 4 of 11 were used as heart failure group (HF,  $n=4$ ). 9 HF beagles were randomized to receive either a recombinant adeno-associated viral carrying the SERCA2a gene (HF + SERCA2a,  $n=5$ ) or the reporter gene enhanced green fluorescent protein (HF + EGFP,  $n=4$ ) by thoracotomy. All HF beagles paced by 180 beats/min in order to maintain failing state. Thirty days after infection, parameters of systolic and diastolic function were measured by doppler echocardiography and hemodynamic monitor in all beagles. **RESULTS:** At 30 days after gene transfer, symptoms of HF + SERCA2a dogs improved. Echocardiogram parameters were superior to those in HF + EGFP group ( $P < 0.05$ ). Cardiac hemodynamic parameters of HF + SERCA2a dogs strikingly improved: LVSP,  $+dp/dt_{\max}$  and  $-dp/dt_{\max}$  increased, mean value increased respectively 54.12% [(214.72 ± 31.74) mmHg vs (139.32 ± 36.79) mmHg], 146.81% [(6779.43 ± 217.58) mmHg/s vs (2746.85 ± 931.2) mmHg/s] and 71.52% [(-4341.42 ± 322.02) mmHg/s vs (-2531.14 ±

[收稿日期] 2006-12-29 [修回日期] 2007-04-27

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.30470716); 国家重点基础研究发展规划(973)资助项目(No. G2000056906)

△通讯作者 Tel:010-66876231; E-mail:lixy@mx.cei.gov.cn

616.15) mmHg/s]; LVEDP lowered 63.43% [(21.86 ± 6.95) mmHg vs (59.78 ± 6.92) mmHg] compared with the dogs in HF + EGFP group. No significant difference in all parameters compared with those of control group was observed. Under laser confocal microscopy, widespread green fluorescence was observed in the myocardial frozen section of dogs in HF + EGFP group. **CONCLUSION:** These results support the hypothesis that overexpression of SERCA2a improves cardiac function in big animal model of chronic heart failure. The study demonstrates that gene transfer of SERCA2a into cardiac with recombinant adeno-associated viral vector is a prospective therapy methods.

[**KEY WORDS**] Heart failure, congestive; Sarcoplasmic reticulum;  $Ca^{2+}$ -transporting ATPase; Gene transfer

慢性心力衰竭是1种严重危害人类健康的疾病,其发病率和死亡率高,正在成为21世纪重要的公共卫生问题。在心力衰竭的病理生理过程中, $Ca^{2+}$ 调节的改变是各种病因心力衰竭发展的必然通路<sup>[1]</sup>。在参与 $Ca^{2+}$ 循环的各种 $Ca^{2+}$ 调节蛋白中,心肌肌浆网 $Ca^{2+}$ -ATP酶(sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase 2a, SERCA2a)的蛋白水平和活化程度是细胞内 $Ca^{2+}$ 稳态的决定性因素。研究表明<sup>[2]</sup>:心力衰竭的心肌细胞中, SERCA2a活性明显下降,并伴有 $Ca^{2+}$ 转运障碍。离体和小动物在体实验<sup>[3,4]</sup>显示,通过基因转导的方法增加SERCA2a的表达能够改善衰竭心肌的收缩和舒张功能。而在接近临床的大动物体内过表达SERCA2a能否改善心功能,目前尚无报道。本研究以重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated viral, rAAV)为载体在犬体内评价SERCA2a基因转导治疗慢性心力衰竭的效果,为SERCA2a基因治疗迈向临床提供大动物水平的实验基础。

## 材 料 和 方 法

### 1 仪器与试剂

超声诊断仪:Acuson公司Sequoia-512超声诊断仪,探头频率2-4MHz。血流动力学检测装置:成都仪器厂RM6240多导生理记录仪。VOO型固定频率心脏起搏器:频率230 times/min和180 times/min、输出电压5.0 V、脉宽0.5 ms,由上海复旦大学电子工程系提供。C型臂X线数字减影机(DSA):Philips Maximus CM80血管造影机。心电图机、心电监护仪、5F穿刺针及动脉鞘、猪尾造影导管等自备。携带EGFP(enhanced green fluorescent protein)和SERCA2a基因的rAAV购自北京本元正阳基因技术股份有限公司,病毒滴度为 $1 \times 10^{15}$  v. g/L(病毒颗粒/升)。

### 2 犬慢性心力衰竭模型的制备

健康成年比格犬17只,体重10-15 kg,雌雄不限,由解放军总医院医学实验动物中心提供。在实验前1周引入动物房以适应环境,喂以标准饮食。动物术前12 h禁食、饮水自由。以3%戊巴比妥钠按25 mg/kg静脉注射麻醉。犬右侧颈部去毛,常规消毒铺巾,分离右颈外静脉。在X线引导下将起搏电极沿静脉系统送入右心室尖,使电极头嵌入肌小梁而固定,调整电极的位置,选择较低阈值,连接并开启起搏器,检查心电图以确认起搏器正常工作。

于切口处制作皮下囊袋,将起搏器埋置于囊袋内。1-2 d后通过磁铁在体外启动起搏器,起搏频率为230 times/min。持续起搏4周后更换频率为180 times/min的起搏器,以维持慢性心力衰竭状态<sup>[5]</sup>。

### 3 超声心动图参数的测定

于起搏4周、基因转导30 d时停止起搏30 min后,在犬清醒状态下行超声心动图检查。取胸骨旁长轴切面,在二维超声引导下用M型超声进行测量,计量资料连续测量3个心动周期取平均值。测定指标包括:左房内径(left atrial diameter, LA)、左室舒张末内径(left ventricular end diastolic dimension, LVEDD)。按校正的Teich-holtz公式计算每搏输出量(stroke volume, SV)、左室射血分数(ejection fraction, EF)及左室短轴缩短率(fractional shortening, FS)。所测图像及数据储存于机载光盘系统。

### 4 血流动力学参数的测定

超声测定后24-48 h内进行血液动力学测定。按上述方法麻醉,分离右股动脉后插入猪尾导管并与压力换能器相接,多导生理记录仪记录左室压力曲线,测定左室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)、左室内压最大上升/下降速度(maximal rate of left ventricular pressure rise/decline,  $\pm dp/dt_{max}$ )。每次测量均取连续10个心动周期的平均值。

### 5 基因转导

麻醉后建立气管插管,并连接机械通气机,通气流量为 $22 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,呼吸频率15 times/min。从左侧第4、5肋间心尖搏动最明显处逐层切开并暴露心脏,剪开心包,缝制心包吊床,选择前降支和心室左缘之间的左室前壁为注射区域。行网格状注射,每个注射点之间相隔约1 cm,注射深度5 mm,每次注射0.1 mL。

### 6 分组干预

将13只心力衰竭犬随机分为心力衰竭组(HF组,  $n=4$ )、心力衰竭+绿色荧光蛋白组(HF+EGFP组,  $n=4$ )、心力衰竭+SERCA2a组(HF+SERCA2a组,  $n=5$ )。HF组犬不接受开胸,其余2组犬均接受开胸术,分别向心肌内注射携带EGFP基因(rAAV<sub>2/1</sub>-EGFP)和携带SERCA2a基因的rAAV(rAAV<sub>2/1</sub>-SERCA2a)溶液1 mL( $1 \times 10^{12}$  v. g)。

### 7 绿色荧光蛋白表达

取 HF + EGFP 组犬心肌组织做冰冻切片,在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况。

### 8 统计学处理

计量资料用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,以 SPSS 10.0 统计软件进行分析,组间变量比较采用单因素方差分析。

## 结 果

### 1 临床表现

起搏组犬快速起搏 2 周后,逐渐出现食欲下降、运动减少症状;至起搏第 4 周末,所有犬都出现气促、4 肢浮肿、被毛色泽晦暗、皮屑增多等情况,并有不同程度的胸、腹腔积液。HF 组犬更换起搏器后、HF + EGFP 组犬在接受开胸注射术后上述症状仍持续存在。HF + SERCA2a 组在接受开胸注射携带 SERCA2a 基因的重组腺相关病毒溶液 2 周后,食欲逐渐好转,活动渐增加;到 30d 时已无剩食,见人后摆尾、跳跃频繁,4 肢水肿消退,皮屑减少,被毛光泽度较前好转。HF + SERCA2a 组中 1 只犬因心功能明显受损,在接受开胸后 12 h 内死亡。

### 2 EGFP 表达情况

血流动力学检测完毕后,取 HF + EGFP 组犬心肌组织行冰冻切片,在激光共聚焦显微镜下观察,可见弥漫的绿色荧光(图 1)。

### 3 基因导入 30 d 时各组超声心动图指标的比较

结果见表 1。与对照组相比,HF 组、HF + EGFP 组犬 LA、LV 显著增大( $P < 0.05$ );HF + SERCA2a 组也明显增大( $P < 0.05$ ),与 HF 组、HF + EGFP 组相比无差别。HF 组、HF + EGFP 组 SV、EF 及 FS 较对照组显著降低( $P < 0.01$ );HF + SERCA2a 组 SV、EF 及 FS 较 HF 组、HF + EGFP 组明显好转( $P < 0.01$ ),平均值较 EGFP 组分别增加 94.83%、52.93% 和 68.60%,与对照组相比无显著差别。

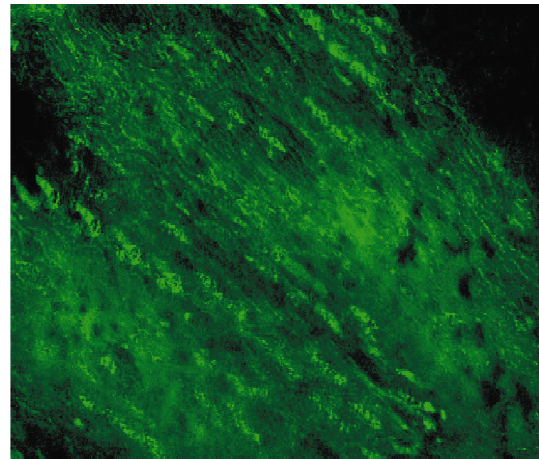


Fig 1 Expression of green fluorescent protein in beagles of HF + EGFP group under confocal microscopy ( $\times 200$ ).

图 1 激光共聚焦显微镜下可见 HF + EGFP 组犬心肌组织有绿色荧光蛋白表达

表 1 各组超声心动图指标的比较

Tab 1 The comparison of beagles' echocardiographic parameters in 4 groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

	Control group	HF group	HF + EGFP group	HF + SERCA2a group
LA(mm)	17.27 ± 0.87	23.32 ± 2.52 <sup>▲</sup>	21.97 ± 1.46 <sup>▲</sup>	21.27 ± 1.42 <sup>▲</sup>
LVEDD(mm)	30.25 ± 3.15	35.50 ± 1.85 <sup>△</sup>	35.55 ± 3.21 <sup>△</sup>	32.77 ± 2.10
SV(mL)	26.25 ± 4.88	16.30 ± 2.23 <sup>▲</sup>	14.50 ± 4.53 <sup>▲</sup>	28.25 ± 4.65 <sup>★♦</sup>
EF(%)	63.69 ± 5.54	45.03 ± 4.97 <sup>▲</sup>	37.84 ± 8.20 <sup>▲</sup>	57.87 ± 6.86 <sup>★◇</sup>
FS(%)	34.37 ± 4.25	21.61 ± 2.92 <sup>▲</sup>	17.68 ± 4.30 <sup>▲</sup>	29.81 ± 4.55 <sup>★♦</sup>

<sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>▲</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>★</sup> $P < 0.01$  vs HF group; <sup>◇</sup> $P < 0.05$ , <sup>♦</sup> $P < 0.01$  vs HF + EGFP group.

### 4 基因导入 30 d 时各组血流动力学指标及曲线的变化

结果见表 2、图 2。与对照组相比,HF 组、HF + EGFP 组 LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$  明显降低( $P < 0.01$ ),LV-EDP 则显著增大( $P < 0.05$ ),心率也明显加快( $P < 0.01$ )。HF + SERCA2a 组与 HF 组、HF + EGFP 组相比;LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$  明显升高( $P < 0.05$ ),LV-EDP 显

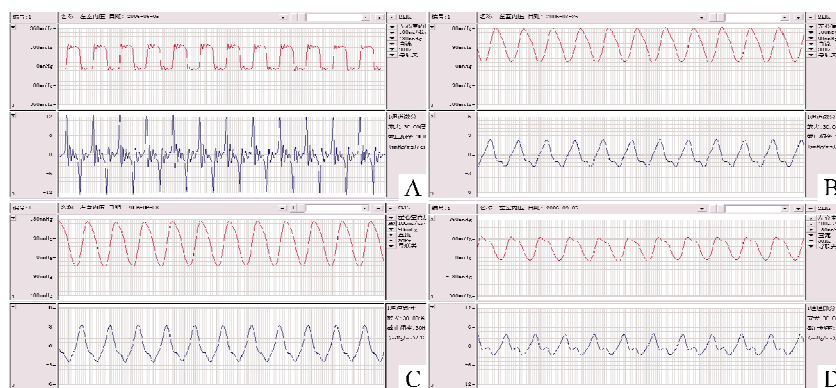


Fig 2 The pressuregraphs and differentiatinggraphs of beagles' left ventriculs in 4 groups. A: control group; B: HF group; C: HF + EGFP group; D: HF + SERCA2a group.

图 2 各组犬左室压力曲线及其微分图的变化

表2 各组血流动力学指标的比较

Tab 2 The comparison of beagles' hemodynamic parameters in 4 groups ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

	Control group	HF group	HF + EGFP group	HF + SERCA2a group
LVSP (mmHg)	234.07 ± 27.41	156.55 ± 18.78 <sup>▲</sup>	139.32 ± 36.79 <sup>▲</sup>	214.72 ± 31.74 <sup>*◇</sup>
LVEDP (mmHg)	21.08 ± 7.79	48.49 ± 3.21 <sup>▲</sup>	59.78 ± 6.92 <sup>▲</sup>	21.86 ± 6.95 <sup>*◇</sup>
+ dp/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	7 326.71 ± 667.02	2 826.08 ± 453.53 <sup>▲</sup>	2 746.85 ± 931.23 <sup>▲</sup>	6 779.43 ± 217.58 <sup>*◇</sup>
- dp/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	-5 955.66 ± 614.94	-3 087.75 ± 930.79 <sup>▲</sup>	-2 531.14 ± 616.15 <sup>▲</sup>	-4 341.42 ± 322.02 <sup>▲*</sup>
HR (beats/min <sup>-1</sup> )	162.00 ± 14.21	212.25 ± 14.08 <sup>▲</sup>	215.25 ± 17.21 <sup>▲</sup>	182.25 ± 7.14 <sup>*◇</sup>

<sup>▲</sup>P < 0.05, <sup>▲</sup>P < 0.01 vs control group; <sup>\*</sup>P < 0.05, <sup>\*</sup>P < 0.01 vs HF group; <sup>◇</sup>P < 0.05, <sup>◇</sup>P < 0.01 vs HF + EGFP group.

著降低 ( $P < 0.05$ ), 心率减慢 ( $P < 0.01$ ); 与对照组相比均无显著差别。HF 组犬的左室压力曲线与对照组相比: 峰值降低, 上升和下降斜率明显降低; 而 HF + SERCA2a 组左室压力曲线的峰值较 HF 组显著升高, 上升和下降的速度显著加快, 已恢复至接近对照组水平。

### 讨 论

心肌收缩和/或舒张功能障碍是心力衰竭的根本问题, 而心肌细胞胞浆中钙离子 ( $Ca^{2+}$ ) 的调节是心肌舒缩活动的中心环节。在细胞内  $Ca^{2+}$  的调节中, SERCA2a 起主要作用, 它的活性和功能直接影响心肌舒缩功能<sup>[6]</sup>。不论在离体细胞还是活体组织, 过表达 SERCA2a 均可使心肌收缩及舒张功能指标得到改善, 负性力 - 频率反应关系得以恢复。尽管增加肌浆网  $Ca^{2+}$  转运在心力衰竭动物模型及心肌病患者心肌细胞的研究中已显示出一定的治疗前景<sup>[7]</sup>, 但将这一技术应用于临床的路途仍很遥远。早期啮齿类动物的实验结果应用于相当于临床级别的大动物模型的有效性和安全性尚需进一步证实。因而, 我们选择了比格犬制作心衰模型, 期望为 SERCA2a 基因治疗迈向临床提供大动物水平的实验基础。

腺相关病毒是 1 类微小、无被膜线状单链 DNA 病毒。由于迄今未发现野生型 AAV 对人体致病, 安全性好; 宿主范围广泛; 既可感染分裂期细胞, 也可感染非分裂期细胞; 而且 rAAV 可长期稳定地表达外源基因<sup>[8]</sup>。本研究显示, 在基因转导 30d 时, rAAV 介导的 EGFP 仍在心肌稳定表达。

本研究发现 HF 组、HF + EGFP 组犬的心腔明显扩大, 并且 SV、EF、FS 及 LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$  等显著降低, LVEDP 明显升高, 表明这 2 组犬的收缩和舒张功能均显著受损; 表明快速起搏诱导心力衰竭的方法确实、可靠。HF + SERCA2a 组中 1 只犬因心功能明显受损, 在接受开胸后 12h 内死亡; 尸解发现大量的胸腔腔和心包腔积液, 可能由于心衰过重不能承受开胸创伤而亡。提示我们应该发展和利用接近临床且创伤小的基因导入手段。上述指标在 HF 组与 HF

+ EGFP 组之间无显著差异, 表明转导 EGFP 对心功能无明显影响。本研究结果表明, SERCA2a 导入组犬心脏的收缩和舒张功能较 HF 组和 HF + EGFP 组显著好转。以 rAAV 为载体介导 SERCA2a 在心肌过表达能够改善衰竭犬心脏的收缩和舒张功能, 是 1 种有前景的治疗方法。

### [参 考 文 献]

- [1] 胡厚祥, 高兴玉, 李治明, 等. 钙调神经磷酸酶参与心衰患者心肌重构的信号转导[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(9): 1717 - 1720.
- [2] Kogler H, Hartmann O, Leineweber K, et al. Mechanical load - dependent regulation of gene expression in monocrotaline - induced right ventricular hypertrophy in the rat [J]. Circ Res, 2003, 93(3): 230 - 237.
- [3] del Monte F, Harding SE, Schmidt U, et al. Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a [J]. Circulation, 1999, 100(23): 2308 - 2311.
- [4] Muller OJ, Lange M, Rattunde H, et al. Transgenic rat hearts overexpressing SERCA2a show improved contractility under baseline conditions and pressure overload [J]. Cardiovasc Res, 2003, 59(2): 380 - 389.
- [5] Okuda S, Yano M, Doi M, et al. Valsartan restores sarcoplasmic reticulum function with no appreciable effect on resting cardiac function in pacing - induced heart failure [J]. Circulation, 2004, 109(7): 911 - 919.
- [6] Wei J, Liu HC, Lee FY, et al. Role of the sarcoplasmic reticulum in altered action potential and contraction of myopathic human and hamster ventricle [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003, 30(4): 232 - 241.
- [7] Li XY, Hui HP, Lu XC, et al. Treatment of chronic heart failure by overexpressing sarcoplasmic reticulum calcium ATPase through gene therapy: an experiment with rats [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2006, 86(17): 1174 - 1178.
- [8] Su H, Arakawa - 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(14): 9480 - 9485.