中国科学 C辑:生命科学 2008 年 第 38 卷 第 7 期: 606 ~ 611
www. scichina. com life. scichina. com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

腺病毒介导肝细胞生长因子基因转移治疗小型猪慢性心肌缺血的实验研究

袁彪[①†], 张友荣[②†], 赵忠[①], 吴丹莉[②], 袁丽珍[②], 吴彬[②], 王立生[②], 黄峻[①*]

① 南京医科大学第一附属医院, 南京 210029;
② 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850
† 同等贡献
* 联系人, E-mail: yuan.biao@live.cn

收稿日期: 2008-02-27; 接受日期: 2008-03-01
国家高技术研究发展计划(批准号: 2003AA216080 和 2007AA021007)资助项目

摘要 血管生长因子基因转移诱导的血管新生已成为治疗心肌缺血的一种新的思路. 重组腺病毒介导的肝细胞生长因子基因转移能够有效诱导治疗性血管新生. 为评价重组腺病毒肝细胞生长因子基因(*Ad-HGF*)转移治疗冠心病效果, 本实验利用 Ameroid 缩窄环建立了小型猪慢性心肌缺血的研究模型, 并评价了 *Ad-HGF* 对慢性心肌缺血的治疗作用. 18 只小型猪随机分成 3 组: 手术对照组、模型组和治疗组. 模型组和治疗组分别在回旋支近端放置 Ameroid 缩窄环, 模型成功后分别直接注射安慰剂和 *Ad-HGF* 到缺血心肌部位进行治疗. 治疗 4 周后对心功能和血液供应的改善进行了评价. 结果表明, 与对照组和模型组相比, *Ad-HGF* 组的心肌灌注有了明显改善. 在治疗后 4 周, *Ad-HGF* 组新形成的血管密度和血管数量明显高于模型组. *Ad-HGF* 组心肌缺血面积明显减少, 左心室射血分数显著改善. 这些结果为肝细胞生长因子基因治疗慢性心肌缺血提供了直接的证据.

关键词
基因治疗
肝细胞生长因子
腺病毒
慢性心肌缺血
治疗性血管生成

冠心病的主要病理特征是冠状动脉阻塞导致心肌缺血. 目前多种手术治疗措施包括经皮冠状动脉腔内成形术、冠状动脉搭桥手术、激光心肌血运重建术等已有效地用于治疗冠心病[1,2]. 此外, 应用血管生长因子的基因转移策略, 也可有效诱导治疗性血管新生, 这些血管生长因子基因包括血管内皮生长因子(VEGF)[3]、碱性成纤维细胞生长因子(FGF)[4]和肝细胞生长因子(HGF)[5]等. 血管生长因子基因转移方法已经成为治疗冠心病的一种潜在手段.

HGF又称扩散因子, 是一种具有强促血管生长活性的多功能生长因子[6]. HGF通过激活一系列的信号途径促进血管的新生, 包括有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPKs家族成员)、磷酸肌醇-3 激酶信号(PI3K)以及磷酸鞘氨醇激酶[7,8]. HGF在急性心肌梗死中可减少心肌细胞的坏死[9,10]. 急性心肌缺血时, 血液循环中HGF的浓度和心脏中c-Met受体mRNA水平都显著升高[11,12]. HGF在急性心肌缺血再灌注期间也发挥保护作用, 直接注射HGF蛋白能减少梗塞面积和改善心脏功能. 与此相反, 阻断内源性HGF会导致梗塞面积扩大而增加死亡率[13]. 上述结果表明, HGF对缺血性心肌梗死的治疗效果是通过保护心肌细胞和促进血管的形成实现的.

在急性心肌缺血的动物模型中, 观察到*HGF*基因转移到大鼠心脏可以减少缺血心肌再灌注时的急

性损伤[14]. 此外, 高表达*HGF*的骨髓间充质干细胞对缺血心肌也有治疗效果[15]. HGF对缺血心肌的治疗作用归功于它促进血管生成、抗纤维化和抑制细胞凋亡的作用[16,17]. 国外的研究表明, *HGF*基因转染到小鼠与犬的心脏模型中, 也有利于治疗慢性心肌缺血[18,19]. 但在上述动物模型中, 心脏侧枝循环较多, 并不能够较好预见对人慢性心肌缺血的治疗效果. 因为小型猪心脏的解剖生理学和人类很相似, 本研究通过建立小型猪的慢性心肌缺血模型, 并评价腺病毒介导*HGF*基因转移的疗效. 该研究结果可为Ad-HGF的临床应用提供直接的药效学依据.

1 材料和方法

1.1 材料

携带人肝细胞生长因子基因的重组腺病毒为复制缺陷型*Ad-HGF*, 由军事医学科学院构建和制备. 根据国家医药和生物制品研究所检定标准, *Ad-HGF*病毒滴度高于 1.0×10^{10} pfu/mL.

18 只环江系小型猪雌雄不限, 购自中国农业大学实验动物中心. 体重介于 20~30 kg. 随机分成 3 组: (i) 对照组(5 只), 其中每只猪接受两次开关胸手术, 间隔 3 周; (ii) 模型组(5 只), 其中在第 1 次开胸手术中将Ameroid环(Research Instruments @ MFG, 美国)套入左冠状动脉回旋支起始处, 3 周后第 2 次开胸手术中将 1 mL生理盐水分十点均匀注射到缺血和正常心肌移行区[20]; (iii) *Ad-HGF*组(8 只)实验流程同模型组, 以 1×10^9 pfu *Ad-HGF*代替生理盐水进行心肌注射. 在整个实验期内密切观察该组动物. 对动物一般状况、水和饲料摄入量、体重、精神状态、呼吸频率, 活动性、步态和体温进行了监测和记录.

1.2 方法

(1) 慢性心肌缺血模型的建立. 氯胺酮(10~15 mg/kg 体重)肌注诱导麻醉. 插入气管内导管, 机械辅助呼吸, 持续静脉注射戊巴比妥麻醉, 前外侧开胸经左第四肋间纵切心包, 在模型组和 *Ad-HGF* 组的动物手术中, 暴露左回旋支游离血管近端放置 Ameroid 环(内径: 2.0~2.5 mm), 关闭心包及胸腔. 术后的恢复自主呼吸, 拔除气管插管, 注射青霉素(8000 单位), 随后送到动物房, 喂标准饲料, 进行严密监测. 第一次手术 3 周后, 进行第 2 次开胸行心肌注射. 本实验在南京医科大学实验动物中心完成.

(2) SPECT 显像. 每只动物分别在第 2 次开胸手术前和观察期末进行单光子发射型计算机断层扫描(SPECT)显像. 采用五点计分法进行心肌放射性分布评价, 其中没有放射性为 0 分; 放射性显著减少为 1 分; 放射性适度减少为 2 分; 放射性略有减少为 3 分; 正常的辐射为 4 分. 因为研究只针对左回旋支, 所以在这项研究中, 放射性分布只对左心室的侧壁进行评价.

(3) 超声心动图. 每只动物分别在第 2 次开胸手术前和观察期末进行超声心动图检查各一次, 观察心脏收缩和舒张功能. 收缩功能包括参数: 左室短轴缩短率(FS)、射血分数(EF)、节段性室壁收缩期增厚率(RSWT)、收缩的速度和幅度. 舒张功能参数包括: EF 斜率、EPSS、左室舒张末压(LVEDP)、E 波与 A 波流速比(E*v*/A*v*).

(4) 冠脉造影. 与 SPECT 显像相同时点进行冠脉造影. 仰卧位经颈动脉插入造影导管, 确定左回旋支闭塞的程度及侧支循环情况. 采用 Rentrop 方法进行侧支循环分级.

(5) 病理检查. 第 2 次开胸手术 4 周后的实验终点, 所有动物放血处死移出心脏, 自心尖向心底部每隔 2 mm 横断, 从每一节段取 3 个心肌标本, 分为缺血区(短轴, 30°~120°)、移行区(短轴, 120°~135°)、与正常区(短轴, 135°~180°). 标本用 40%中性甲醛固定后石蜡包埋. 每一个 5 μm 的病理切片分别进行 HE 染色和苏木素碱性品红苦味酸染色.

(6) 血管Ⅷ因子免疫组化染色. 常规组织切片经脱蜡和水化后入蒸馏水. 柠檬酸缓冲液高温高压抗原修复. Elivision^{TM}试剂盒用于鉴别血管Ⅷ因子阳性的内皮细胞.

(7) 统计分析. 所有数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm$ SD)表示, 组间比较采用 *t* 检验.

2 结果

2.1 造模结果和生存率

植入缩窄环 3 周后, 左回旋支完全闭塞, 但左前降支仍然开放. 在观察末期处死模型组和 *Ad-HGF* 组动物时, 整个 Ameroid 环仍定位于左回旋支(LCX)分叉部位, 并造成左回旋支完全闭塞(图 1). 在观察末

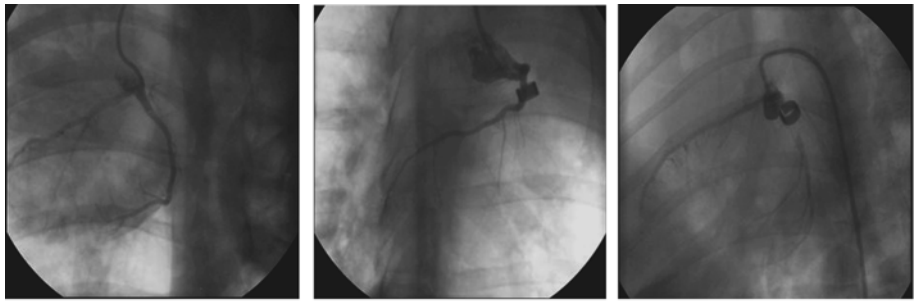


图 1　第二次开胸手术后 4 周冠脉造影

(a) 对照组 LCX 和 LAD 正常显影; (b) 模型组缩窄环位置 LCX 闭塞 LAD 正常; (c) 治疗组缩窄环位置 LCX 近段闭塞但远段显影表明侧支循环形成 LAD 正常

期, 模型组有 1 只动物在第 2 次手术后 3 周死于左心功能不全, 对照组和 *Ad-HGF* 组均存活.

2.2　Ad-HGF 改善慢性心肌缺血

在冠状动脉造影结果中采用 Rentrop 方法进行血管密度的评价. 对照组血管密度在第 2 次手术前明显高于其他两组. 然而, 在 *Ad-HGF* 治疗组血管密度明显高于仅有轻微增多的模型组(表 1).

对照组心肌微血管的数量为(12.5 ± 1.92)个/视野, 而模型组缺血区为(4.36 ± 2.52)个/视野. 二者有显著性差异(P<0.01). 此外, 在模型组的移行区血管密度为(7.74 ± 3.99)个/视野; 与对照组和模型组缺血区相比有显著差异(P<0.05). Ad-HGF 组缺血区和移行区的血管密度分别为(22.81 ± 4.80)和(31.93 ± 3.53)个/视野, 均显著高于对照组和模型组(P<0.01). 另外, 在 Ad-HGF 组中移行区血管密度明显高于缺血区(P<0.05) (图 2).

对照组的特殊病理染色呈黄色或黄棕色, 缺血区表现为血管稀疏的红色区. 对照组红色总面积为

表 1　冠状动脉造影侧支血管生成半定量评价[a)]

第一次手术后时间/周	对照组 (n=5)	模型组 (n=4)	Ad-HGF 治疗组 (n=8)
3	3.00±0.00	0.25±0.50**	0.50±0.58**
7	3.00±0.00	0.50±0.58**	2.12±0.23*$^{\Delta}$

a), 与对照组比* P < 0.05 和 ** P < 0.01; 在同一时间点与模型组比 Δ P < 0.05

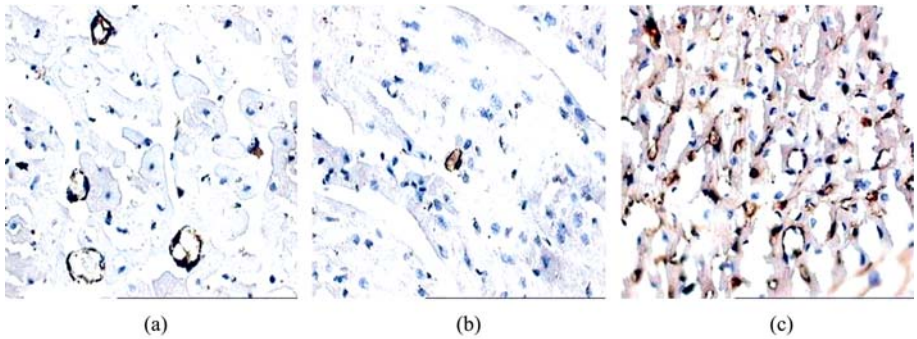


图 2　Ⅷ因子免疫组化染色

(a), 对照组正常心肌血管密度; (b), 模型组中密度明显低于正常组; (c), Ad-HGF 治疗组中微血管增加. 单个的或者棕色内皮细胞簇为一个血管计数

(2.7±1.5)%. 在模型组的缺血区大片红色总面积为(77±4.6)%, 而在 *Ad-HGF* 组中, 只有红色的小病灶, 总面积为(41.7±2)%($P < 0.01$)(图 3).

2.3 SPECT 心肌灌注显像

对照组心肌灌注正常(图 4(a)), 模型组第一次手术后 3 周心肌放射性分布异常, 左心室侧壁可见固定性缺损(图 4(b)). Ad-HGF 组也表现为第一次手术后 3 周心肌放射性分布异常, 左心室侧壁可见固定性缺损, 但第 2 次手术后 4 周, 放射性分布有显著改善(图 4 (c), 表 2).

2.4 心脏超声检查

体表超声心动图显示, 对照组第一次手术 3 周和 7 周后心脏功能没有明显的变化; 模型组无论收缩和舒张功能在第一次手术 3 周后均显著降低, 第一次手术 7 周后仍处于低水平. *Ad-HGF* 组第一次手术 7 周后左心室壁明显增厚, 运动幅度增强, 心内膜回声降低, 左心室功能明显的提高(表 3) .

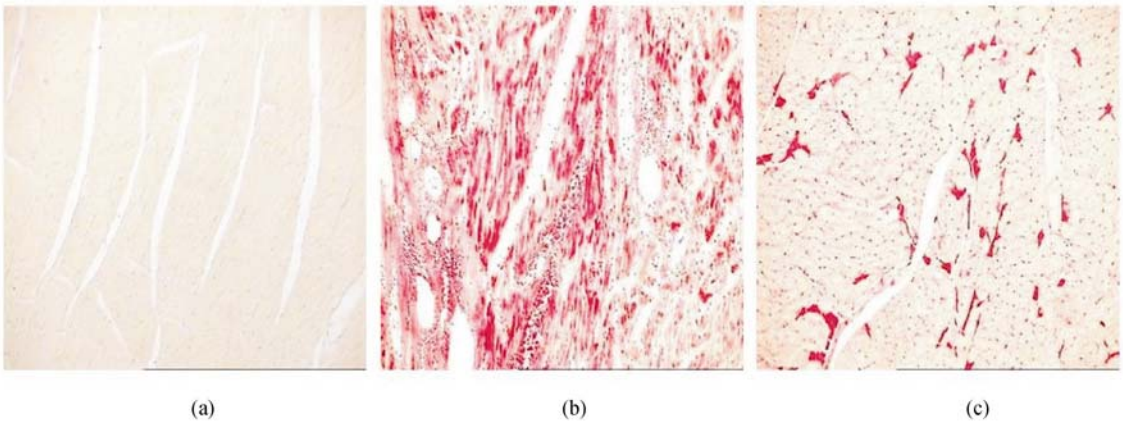


图 3 移行区的缺血心肌细胞的特殊染色

(a), 对照组缺血心肌细胞无红色染色显示; (b), 模型组有大量的缺血心肌细胞; (c), Ad-HGF 治疗组中仅观察到部分缺血心肌细胞

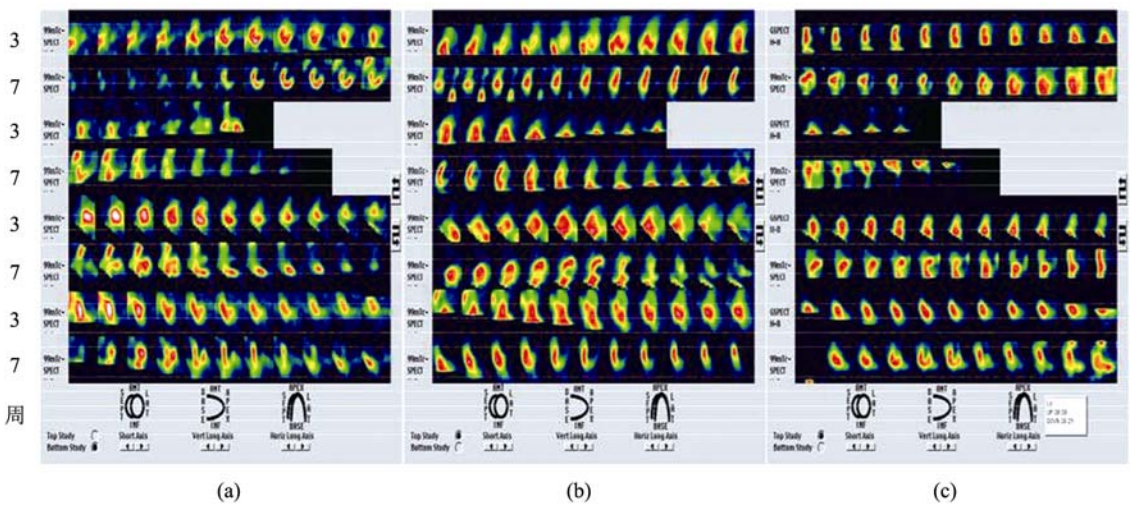


图 4 第一次手术后第 3 周和第 7 周 SPECT 显像

(a), 对照组中心肌灌注正常; (b), 模型组第一次手术 3 周后左室侧壁心肌放射性分布减少, 7 周后分布仍然低; (c), Ad-HGF 组第一次手术 3 周后左室侧壁心肌放射性分布减少, 但 7 周后明显改善

表 2　SPECT显像结果[a)]

第一次手术后时间	对照组(n=5)	模型组(n=4)	Ad-HGF 治疗组(n=8)
3 周	19.60±0.55	10.50±0.58**	9.63±0.82**
7 周	19.20±0.45	10.00±0.82**	15.25±0.27**△

a) 与对照组比* $P < 0.05$ 和** $P < 0.01$; 在同一时间点与模型组比 $\Delta P < 0.05$

表 3　第一次手术后 7 周的超声心动图[a)]

项目	对照组(n=5)	模型组(n=4)	Ad-HGF 治疗组(n=8)
射血分数, EF (%)	66.00±6.40	47.10±4.00**	66.40±1.84△△
短轴缩短率 (%)	36.70±4.60	24.60±2.10**	34.40±1.45△△
心脏 EF 斜率变化(cm/s)	12.50±2.50	5.90±1.30**	11.30±0.78△△
EPSS 变化	0.76±0.12	1.29±0.26*	0.79±0.06△
Ev/Av	1.38±0.19	0.89±0.14**	1.24±0.09△△

a) 与对照组比* $P < 0.05$ 和** $P < 0.01$; 在同一时间点与模型组比 $\Delta P < 0.05$ 和 $\Delta\Delta P < 0.01$

3　讨论

治疗性血管生成已经成为治疗心肌缺血的一种新思路. 以往的研究表明血管生长因子基因转移能够增强血管新生继而改善心脏功能. 肝细胞生长因子是一种多功能因子, 具有促进心脏血管生成和抗纤维化的作用, 业已证明对心肌缺血有治疗作用[16]. 国内外许多研究者观察了*HGF*基因转移对小鼠、大鼠、犬等动物模型的急性和慢性心肌缺血的治疗效果[21]. 在小鼠模型的慢性心肌缺血中, *Ad-HGF*基因转移通过促进心肌细胞肥大、增厚的心室壁、保护血管、抗纤维化等病理生理过程改善心脏重塑和功能[18]. 在犬模型的心肌慢性缺血实验中, *HGF*基因转移通过诱导血管的形成和抑制心肌细胞凋亡改善了心肌的缺血状态[19]. 上述结果表明, 肝细胞生长因子基因转移对急性和慢性心肌缺血均有保护作用, 进而支持其在临床治疗冠心病中的应用.

但上述模型在评价 Ad-HGF 治疗缺血性心脏病的疗效方面存在缺陷, 并不能够很好预见其对人心肌缺血的治疗效果. 另外, 人心肌缺血多为慢性血管病变, 很难利用血管结扎等模拟. 小型猪心脏的解剖和生理学与人类相似, 其自然形成侧支血管的能力低. 因此, 小型猪是最理想的用来评估 *Ad-HGF* 基因转染治疗慢性心肌缺血效果的模型. 本实验通过植入 Ameroid 缩窄环进行慢性缺血诱导建立了动物模型, 2 周后导致左回旋支完全闭塞但左前降支保持正常开放. 将 Ad-HGF 直接注射到局部心肌, 观察其对血管的形成和心脏机能的作用. 因此, 这种模型适用于评价由血管生长因子诱导的血管生成. 研究结果表明, 腺病毒介导的 *HGF* 基因表达能增强局部心肌血液灌注, 显著增加血管密度, 并显著改善心脏收缩和舒张功能. 主要机制是基因转移的心肌细胞可表达并分泌肝细胞生长因子, 促进微血管的新生并形成侧枝循环, 增强了缺血心肌的血液灌注, 改善了缺血心肌细胞的功能. 在小型猪慢性心肌缺血模型的结果表明, *HGF* 基因转移是一种有效的促血管新生策略, 可用于治疗心肌梗死等缺血性心脏病.

基因治疗的基本要求是安全、高效、具有特异性. 为避免基因治疗药物的毒副作用, 减少用药剂量和提高疗效, 慎重选择体内基因药物给药途径至关重要. 本研究中, 还探讨了在小型猪模型中肌肉直接注射Ad-HGF的安全性. 在健康小型猪后肢一次肌内注射Ad-HGF 5×10^{10} pfu (5 倍治疗剂量), 14 次注射后观察动物的生存状况、心电图、心功能、外周血细胞计数、血清生化指标、主要器官和组织病理变化, 没有发现异常结果. 预示应用重组腺病毒*HGF*基因治疗缺血性心脏病是安全的.

总之, 利用小型猪慢性心肌缺血的模型, 观察到 *Ad-HGF* 基因转移对慢性心肌缺血模型的治疗效果, 并验证了直接注射 Ad-HGF 的安全性. 研究结果表

明 *Ad-HGF* 有望成为一种治疗慢性心肌缺血的新型 药物, 应进一步开展临床研究.

参考文献

1 Houser F, Culler S D, Becker E R, et al. A retrospective study of 6,671 patients comparing coronary stenting and balloon angioplasty. J Invasive Cardiol, 2000, 12: 354—362

2 Horvath K A. Transmyocardial laser revascularization in the treatment of myocardial ischemia. J Card Surg, 2000,15: 271—277

3 Su H, Lu R, Kan Y W. Adeno-associated viral vector-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer induces neovascular formation in ischemic heart. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 13801—13806[DOI]

4 Udelson J E, Dilsizian V, Laham R J, et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 improves stress and rest myocardial perfusion abnormalities in patients with severe symptomatic chronic coronary artery disease. Circulation, 2000, 102: 1605—1610

5 Funatsu T, Sawa Y, Ohtake S, et al. Therapeutic angiogenesis in the ischemic canine heart induced by myocardial injection of naked complementary DNA plasmid encoding hepatocyte growth factor. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 124: 1099—1105[DOI]

6 Furlong R A. The biology of hepatocyte growth factor/scatter factor. Bioessays, 1992, 14: 613—617[DOI]

7 Sengupta S, Sellers L A, Li R C, et al. Targeting of mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3 kinase inhibits hepatocyte growth factor/scatter factor-induced angiogenesis. Circulation, 2003, 107: 2955—2961[DOI]

8 Duan H F, Wu C T, Lu Y, et al. Sphingosine kinase activation regulates hepatocyte growth factor induced migration of endothelial cells. Exp Cell Res, 2004, 298(2): 593—601[DOI]

9 Chen X H, Minatoguchi S, Kosai K, et al. *In vivo* hepatocyte growth factor gene transfer reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through its multiple actions. J Card Fail, 2007, 13: 874—883[DOI]

10 Ryugo M, Sawa Y, Ono M, et al. Myocardial protective effect of human recombinant hepatocyte growth factor for prolonged heart graft preservation in rats. Transplantation, 2004, 78: 1153—1158[DOI]

11 Yasuda S, Goto Y, Baba T, et al. Enhanced secretion of cardiac hepatocyte growth factor from an infarct region is associated with less severe ventricular enlargement and improved cardiac function. J Am Coll Cardiol, 2000, 36: 115—121[DOI]

12 Suzuki H, Murakami M, Shoji M, et al. Hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in ischaemic heart disease. Coron Artery Dis, 2003, 14: 301—307[DOI]

13 Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, et al. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. J Clin Invest, 2000, 106: 1511—1519[DOI]

14 Jin H, Wyss J M, Yang R, et al. The therapeutic potential of hepatocyte growth factor for myocardial infarction and heart failure. Curr Pharm Des, 2004, 10: 2525—2533[DOI]

15 Duan H F, Wu C T, Wu D L, et al. Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor. Mol Ther, 2003, 8: 467—474[DOI]

16 Azuma J, Taniyama Y, Takeya Y, et al. Angiogenic and antifibrotic actions of hepatocyte growth factor improve cardiac dysfunction in porcine ischemic cardiomyopathy. Gene Ther, 2006, 13: 1206—1213[DOI]

17 Jayasankar V, Woo Y J, Pirolli T J, et al. Induction of angiogenesis and inhibition of apoptosis by hepatocyte growth factor effectively treats postischemic heart failure. J Card Surg, 2005, 20: 93—101[DOI]

18 Li Y, Takemura G, Kosai K, et al, Postinfarction treatment with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor relieves chronic left ventricular remodeling and dysfunction in mice. Circulation, 2003, 107: 2499—2506[DOI]

19 Ahmet I, Sawa Y, Yamaguchi T, et al. Gene transfer of hepatocyte growth factor improves angiogenesis and function of chronic ischemic myocardium in canine heart. Ann Thorac Surg, 2003, 75: 1283—1287[DOI]

20 Roth D M, Maruoka Y, Rogers J, et al. Development of coronary collateral circulation in left circumflex Ameroid-occluded swine myocardium. Am J Physiol, 1987, 253(5Pt 2): H1279—H1288

21 吴丹莉, 张友荣, 劳妙芬, 等. 携带肝细胞生长因子基因的重组腺病毒对犬心肌缺血的基因治疗. 科学通报, 2004, 49(13): 1278—1282