论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0562-04

AT2R基因在体电穿孔转染抑制大鼠颈总动脉新生内膜增生

屈小玲,刘德峰,刘建平 (400038 重庆,第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所)

【摘要】 **目的** 探讨AngⅡ2型受体(AT2R)基因局部电穿孔转染对大鼠颈总动脉球囊损伤后新生内膜增生的影响。**方法** 建立大鼠颈总动脉球囊损伤模型,用局部电穿孔方法转染AT2R真核表达载体(pEGFP-AT2R)或空载体(pEGFP-N_2),分别于术后7、14 d和21 d采用HE染色及RT-PCR方法进行AT2R、AngⅡ1型受体(AT1R)在颈动脉壁中表达的变化和组织形态学分析,检测其对在体血管新生内膜的影响作用。**结果** 球囊损伤21 d后,pEGFP-AT2R组大鼠颈动脉AT2R mRNA表达为(1.262±0.317),pEGFP-N_2组为(0.396±0.100),单纯损伤组为(0.410±0.053),pEGFP-AT2R组与pEGFP-N_2组和单纯损伤组相比差异有统计学意义($P<0.01$);球囊损伤后21 d时AT1R的表达,pEGFP-AT2R组为(0.469±0.065)、pEGFP-N_2组为(0.363±0.046)、单纯损伤组为(0.373±0.045),pEGFP-AT2R组较pEGFP-N_2组和单纯损伤组相比差异有统计学意义($P<0.05$),pEGFP-N_2组和单纯损伤组间无统计学差异($P>0.05$);球囊损伤后21 d,pEGFP-AT2R组的内膜面积与中膜面积比(I/M)为(0.828±0.101),pEGFP-N_2组为(1.432±0.086),单纯损伤组为(1.515±0.078),pEGFP-AT2R组较pEGFP-N_2组和单纯损伤组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。pEGFP-AT2R组与单纯损伤组相比,使实验动物新生内膜增生平均受抑制率达45.35%。**结论** 在体血管局部电穿孔转染AT2R基因可使AT2R在损伤血管组织表达较单纯损伤组明显增加。AT2R基因与AT1R基因之间在表达量上不存在此消彼长的关系。

【关键词】 基因;AT2R;基因转染;内膜增生;损伤

【中图法分类号】 R543.402;R364.31;R394.2 【文献标志码】 A

Electroporation-mediated *in vivo* AT2R gene transfection inhibits neointimal hyperplasia after balloon angioplasty in rat common carotid arteries

Qu Xiaoling, Liu Defeng, Liu Jianping (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the effect of electroporation-mediated *in vivo* local transfection of angiotensin Ⅱ type 2 receptor (AT2R) gene on neointimal hyperplasia in rat common carotid arteries after balloon angioplasty. **Methods** Seventy-two healthy SD rats were randomly and evenly divided into a control group, an injured group, an empty plasmid group (pEGFP-N_2 group), and an AT2R transfection group (pEGFP-AT2R group). Balloon catheter denudation of the endothelia of rat common carotid arteries was routinely used to construct a restenosis model. The transfection of plasmids pEGFP-AT2R and pEGFP-N_2 was carried out by local electroporation. The injured arteries were collected 7 d, 14 d, and 21 d after transfection. AT2R and angiotensin Ⅱ type 1 receptor (AT1R) expression levels in the carotid artery walls as well as histomorphological characteristics were analyzed with RT-PCR and HE staining. The effect of AT2R on neointimal hyperplasia of *in vivo* arteries was evaluated. **Results** The AT2R mRNA expression level in the injured rat common carotid arteries of the pEGFP-AT2R group was (1.262±0.317), indicating remarkable difference from those of the pEGFP-N_2 group (0.396±0.100) and injured group (0.410±0.053) 21 d after transfection ($P<0.01$). The AT1R mRNA expression level in the pEGFP-AT2R group was 0.469±0.065, statistically higher than those of the pEGFP-N_2 group (0.363±0.046) and injured group (0.373±0.045) 21 d after transfection ($P<0.05$). The intima-to-media (I/M) area ratio of the pEGFP-AT2R group (0.828±0.101) showed obvious difference from those of the pEGFP-N_2 group (1.432±0.086) and injured group (1.515±0.078) 21 d after transfection ($P<0.01$). Compared with the injured group, AT2R transfection in the pEGFP-AT2R group inhibited neointimal hyperplasia in experimental animals at a rate as high as 45.35%. **Conclusion** Electroporation-mediated *in*

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30670521)

【通信作者】 刘建平,电话:(023)68773050,E-mail:liujianping1022@hotmail.com

vivo AT2R gene transfection can significantly up-regulate AT2R expression in injured common carotid artery tissues of rats. There is no negative correlation between the expression levels of AT2R and AT1R.

[Key words] angiotensin Ⅱ type 2 receptor; gene transfection; neointimal hyperplasia; injured; common carotid artery

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(30670521). Corresponding author: Liu Jianping, Tel: 86-23-68773050, E-mail: liujianping1022@hotmail.com

经皮冠状动脉介入(percutaneous coronary intervention, PCI)治疗后血管再狭窄是一个困扰临床的棘手问题,其突出病理改变是新生内膜形成[1]。许多生长因子和细胞因子参与了此过程,其中血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ,AngⅡ)参与了新生内膜发生的全过程,是促进血管再狭窄发生的重要因素之一[2-3]。AngⅡ受体主要有两型:AngⅡ1型受体(angiotensinⅡtype 1 receptor,AT1R)和AngⅡ2型受体(angiotensinⅡtype 2 receptor,AT2R)。AngⅡ的促进新生内膜形成的作用主要是由AT1R介导的[4]。关于AT2R的功能目前尚未完全阐明。AT2R所介导的作用与AT1R相拮抗。由于目前常用的病毒转染目的基因的方法用于在体研究存在一定的危险,本研究以血管局部电穿孔联合球囊加压方法将大鼠AT2R基因转移至大鼠颈动脉球囊损伤动物模型中,观察其对新生内膜形成及AT1R表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

含有大鼠AT2R基因编码序列的真核表达载体(pEGFP-AT2R)和空载真核表达载体(pEGFP-N_2)由本室构建,经PCR和测序鉴定,载体中含有的外源基因片段完全正确;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自TOYOBO公司,PCR引物由上海生工工程技术服务有限公司合成。SD大鼠由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,批号:SCXK(渝)2007-0005。2.0 F PTCA球囊导管购自Cordis公司。

1.2 实验动物及分组

健康SD大鼠72只,雌雄不限,3~4月龄,体质量300~350 g。使用随机数字表法将大鼠随机分为正常组、单纯损伤组、空转组(pEGFP-N_2组)、转染组(pEGFP-AT2R组),每组18只。

1.3 大鼠颈动脉球囊损伤模型的制作及AT2R基因转染

动物模型制作参考Clowes等[5]的方法。电穿孔的参数设置为:电压200~300 V,5个矩形脉冲,脉宽1~10 ms[6-8]。盐水冲洗管腔后各组分别注入50 μl pEGFP-AT2R转染液(206 μg/ml)或pEGFP-N_2转染液(116 μg/ml),留置15 min,其间以2.0 F PTCA球囊导管加压,以促进转染液中的载体向靶血管段组织中转染。结扎颈外动脉近端,恢复颈总动脉至颈内动脉血流,缝合颈部切口。

1.4 取材和切片

术后7、14 d和21 d麻醉大鼠,取下颈总动脉损伤段血管组织,用于HE染色标本,常规行OCT包埋,石蜡切片;用于RT-PCR检测标本,于-80 ℃冰箱保存。

1.5 RT-PCR检测血管中AT1R、AT2R mRNA的表达

用Tripure(Roche公司)一步法提取组织总RNA,取1 μg总RNA逆转录成cDNA。引物设计:AT1R(309 bp)上游5′-CCAAAGTCACCTGCATCATC-3′,下游5′-CACAATCGCCATAATTATCCTA-3′;AT2R(237 bp)上游5′-TGGCTCTTTGGACCTGTGATGTG-3′,下游AT2R-2:5′-CGGAAATAAAATGTTGGCAATGA-3′;以β-actin(249 bp)作为内参对照,上游5′-ACCCCGTGCTGCTGACCGAG-3′,下游5′-TCCCGGCCAGCCAGGTCCA-3′。反应体系(20 μl),AT1R反应条件:94 ℃预变性5 min后进入PCR循环;94 ℃变性30 s,56 ℃退火,72 ℃延伸30 s,共30个循环;72 ℃再延伸10 min。AT2R反应条件基本同AT1R,仅退火条件变为61 ℃,30 s。反应完后1%琼脂糖凝胶电泳。用美国Image Pro Plus 5.0图像分析处理系统分析电泳带灰度,计算出内参β-actin灰度值比行半定量分析。每个样本做3次,取平均值。

1.6 HE染色及计算内膜与中膜的面积比

将石蜡切片进行HE染色,在光学显微镜下观察。利用计算机图像分析处理系统,以内弹力膜区别内膜和中膜,分别测量血管内膜和中膜横断面的面积,计算内膜与中膜的面积比(I/M)。

1.7 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件处理,以$\bar{x} \pm s$表示,各时相点各组之间比较行方差分析,各时相点各组之间两两比较行Tukey或Thame T2检验。

2 结果

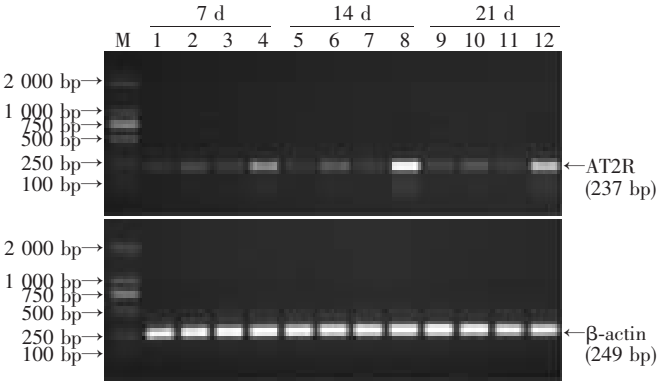
2.1 颈动脉球囊损伤后颈动脉中AT2R mRNA的表达

RT-PCR检测结果显示,正常组动脉壁中有极微量AT2R的mRNA表达,单纯损伤组、pEGFP-N_2组和pEGFP-AT2R组在球囊损伤后7 d表达较正常组略有增加,14 d达高峰后表达下降。单纯损伤组和pEGFP-N_2组间各时相点AT2R的mRNA表达无统计学差异($P>0.05$);而pEGFP-AT2R组AT2R的表达水平则在转染后各时相点显著高于正常组、单纯损伤组和pEGFP-N_2组($P<0.01$)。见表1,图1。表达平均增加约284.29%、187.07%和197.13%。

表1　pEGFP-AT2R转染大鼠颈动脉后AT2R mRNA的表达变化（灰度值，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	7 d	14 d	21 d
正常组	0.270±0.102	0.337±0.088	0.322±0.094
单纯损伤组	0.396±0.121	0.442±0.039	0.410±0.053
pEGFP-N_2组	0.379±0.099	0.430±0.037	0.396±0.100
pEGFP-AT2R组	0.896±0.160^{abc}	1.446±0.344^{abc}	1.262±0.317^{abc}

a：$P<0.01$，与正常组比较；b：$P<0.01$，与单纯损伤组比较；c：$P<0.01$，与pEGFP-N_2组比较



M：DNA标准（DL 2000）；1，5，9：正常组；2，6，10：单纯损伤组；3，7，11：pEGFP-N_2组；4，8，12：pEGFP-AT2R组

图1　RT-PCR检测颈动脉球囊损伤后pEGFP-AT2R转染大鼠颈动脉不同时间AT2R mRNA的表达变化

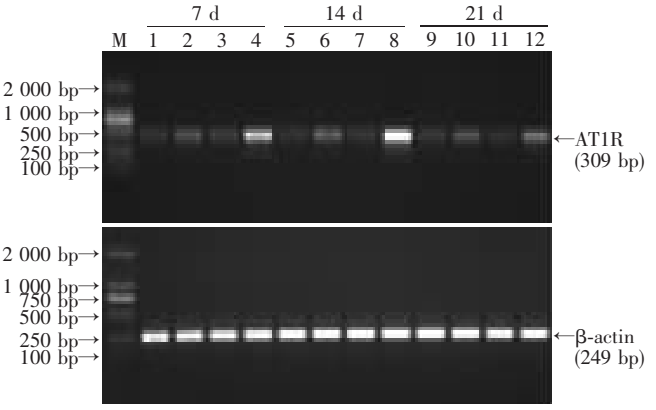
2.2　pEGFP-AT2R转染对颈动脉AT1R mRNA表达的影响

RT-PCR检测结果显示，正常组可见AT1R mRNA有少量表达；单纯损伤组和pEGFP-N_2组损伤后7 d表达增加，14 d表达至高峰，21 d可见少量表达（$P<0.05$，$P<0.01$）；而pEGFP-AT2R组AT1R表达水平较正常组、pEGFP-N_2组和单纯损伤组有显著增加（$P<0.05$，$P<0.01$）。见表2，图2。

表2　pEGFP-AT2R转染大鼠颈动脉后AT1R mRNA的表达变化（灰度值，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	7 d	14 d	21 d
正常组	0.243±0.047	0.221±0.022	0.210±0.015
单纯损伤组	0.420±0.082^{a}	0.486±0.062^{b}	0.373±0.045^{b}
pEGFP-N_2组	0.399±0.080^{a}	0.466±0.059^{b}	0.363±0.046^{b}
pEGFP-AT2R组	0.979±0.176^{bdf}	1.242±0.160^{bdf}	0.469±0.065^{bce}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与单纯损伤组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与pEGFP-N_2组比较



M：DNA标准（DL 2000）；1，5，9：正常组；2，6，10：单纯损伤组；3，7，11：pEGFP-N_2组；4，8，12：pEGFP-AT2R组

图2　RT-PCR检测颈动脉球囊损伤后pEGFP-AT2R转染不同时间大鼠颈动脉AT1R mRNA的表达变化

2.3　pEGFP-AT2R转染对大鼠颈动脉损伤后新生内膜增生的影响

大鼠颈动脉球囊损伤后7～21 d，单纯损伤组、pEGFP-N_2组和pEGFP-AT2R组损伤动脉的新生内膜均明显向管腔内增生。pEGFP-AT2R组损伤动脉虽可见明显的管腔狭窄，但增生程度显著低于单纯损伤组和pEGFP-N_2组（$P<0.01$）。见表3，图3。

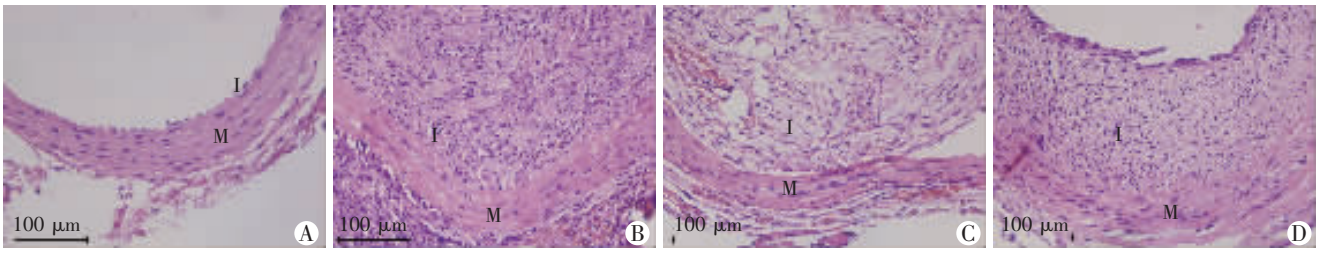
表3　pEGFP-AT2R转染大鼠颈动脉后血管内膜与中膜的面积比（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	7 d	14 d	21 d
正常组	0.004±0.000	0.004±0.000	0.004±0.000
单纯损伤组	0.164±0.006^{a}	0.791±0.112^{a}	1.515±0.078^{a}
pEGFP-N_2组	0.160±0.009^{a}	0.757±0.045^{a}	1.432±0.086^{a}
pEGFP-AT2R组	0.109±0.003^{abc}	0.421±0.007^{abc}	0.828±0.101^{abc}

a：$P<0.01$，与正常组比较；b：$P<0.01$，与单纯损伤组比较；c：$P<0.01$，与pEGFP-N_2组比较

3　讨论

新生内膜形成是血管介入损伤后再狭窄主要的病理改变之一，是临床目前难以克服的困难，严重影响PCI治疗的远期预后。血管损伤之后，血管平滑肌细胞（vascular smooth muscle cell，VSMC）从血管中膜增殖、迁移到内皮下间隙，同时分泌大量的细胞外基质，



A：正常组；B：单纯损伤组；C：pEGFP-N_2组；D：pEGFP-AT2R组　I：血管内膜；M：血管中膜

图3　颈动脉球囊损伤21 d pEGFP-AT2R转染大鼠颈动脉后血管内膜与中膜的病理学观察（HE）

形成新生内膜[9-10]。这一复杂过程中涉及许多生长因子和细胞因子[11-12]。局部肾素-血管紧张素系统(RAS)是参与其中并且起着关键性的促进作用的因素之一[13-14]。已有研究表明,AngⅡ诱导血管平滑肌细胞增殖、迁移、分泌细胞外基质的生物学效应是通过AT1R来介导的。AT1R在动物整个生长发育过程中稳定高表达,当血管损伤后,表达量进一步增加,可显著促进VSMC的增殖、迁移。而AT2R主要在血管胚胎发育阶段起作用,成年动物AT2R表达较少或不表达,其功能还不甚了解。研究表明,AT2R介导的许多生物学效应与AT1R相拮抗,因此在VSMC增殖、迁移及细胞外基质分泌中可能起负性调节作用[4]。刘建平等[15-16]在体外实验中证实AT2R的转染表达可明显抑制体外培养的VSMC的增殖、迁移,也显著抑制VSMC分泌血小板衍生生长因子、成纤维细胞生长因子及金属基质蛋白等。在体条件下,AT2R的表达受机体多种因素影响,基因转染较难成功,表达率也较低,表达后所产生的效应也受多种因素限制,因此目前多种转染的方法及其影响作用均在探索。

本实验在本室唐兵等[17]研究的基础上,以电穿孔的方法将大鼠AT2R基因转移至损伤血管壁中,观察其对新生内膜形成及AT1R表达的影响。为增强在体转染表达的表达率,本研究选用了具有较高表达效率的真核表达质粒pEGFP作为AT2R基因载体,避免了病毒载体等对机体的影响作用和机体对病毒载体的免疫应答作用。我们用电穿孔方法介导其在血管局部的转染,同时用球囊加压的方法增加载体向靶组织中“渗入”,实验中我们观察到,通过上述转染方法,可明显增加AT2R在实验动物模型血管组织中的表达,表达率较正常组及损伤组增加约284.29%和187.07%,获得了较高的转染率。转染后,损伤血管的新生内膜形成受到显著抑制,与单纯损伤组相比,新生内膜受抑制率约45.35%。同时,实验中AT2R转染后的增强表达并未对AT1R表达产生抑制作用。提示二者之间不存在此消彼长的关系,AT2R不是通过抑制AT1R表达产生对新生内膜的抑制作用的。这与刘建平等[15]体外实验结果相似,提示AT2R抑制新生内膜形成可能是通过其他更复杂的机制完成的,而不是直接抑制AT1R的表达。局部电穿孔联合球囊加压的方法可显著增加AT2R基因转染表达率,上调实验动物模型血管局部的AT2R表达,并显著抑制新生内膜增生。这一结果初步提示AT2R基因转染技术与心血管介入技术相结合可用于血管损伤后再狭窄的防治,但在方法和转染技术等方面还需要进行更深入的研究。

参考文献:

[1] Burzotta F, Siviglia M, Altamura L, *et al*. Outcome of overlapping heterogenous drug-eluting stents and of overlapping drug-eluting and bare metal stents[J]. Am J Cardiol, 2007, 99(3): 364-368.
[2] Crook M F, Akyurek L M. Gene transfer strategies to inhibit neointima formation[J]. Trends Cardiovasc Med, 2003, 13(3): 102-106.
[3] Berk B C, Corson M A. Angiotensin Ⅱ signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases[J]. Circ Res, 1997, 80(6): 607-616.
[4] Hsieh P S, Tai Y H, Loh C H, *et al*. Functional interaction of AT1 and AT2 receptors in fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats[J]. Metabolism, 2005, 54(2): 157-164.
[5] Clowes A W, Reidy M A, Clowes M M. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium[J]. Lab Invest, 1983, 49(3): 327-333.
[6] Seidler R W, Allgauer S, Ailinger S, *et al*. *In vivo* human MCP-1 transfection in porcine arteries by intravascular electroporation[J]. Pharm Res, 2005, 22(10): 1685-1691.
[7] Martin J B, Young J L, Benoit J N, *et al*. Gene transfer to intact mesenteric arteries by electroporation[J]. J Vasc Res, 2000, 37(5): 372-380.
[8] 巨兴达, 俞华莉, 王兴智, 等. 体内电穿孔法转基因技术的应用[J]. 神经解剖学杂志, 2009, 25(1): 105-110.
[9] Zargham R, Thibault G. alpha8beta1 integrin expression in the rat carotid artery: involvement in smooth muscle cell migration and neointima formation[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(4): 813-822.
[10] Lee S, Lim H J, Park H Y, *et al*. Berberine inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation and migration *in vitro* and improves neointima formation after balloon injury *in vivo*. Berberine improves neointima formation in a rat model[J]. Atherosclerosis, 2006, 186(1): 29-37.
[11] Deng W, St-Hilaire R C, Chattergoon N N, *et al*. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation *in vitro* by genetically engineered marrow stromal cells secreting calcitonin gene-related peptide[J]. Life Sci, 2006, 78(16): 1830-1838.
[12] Vendrov A E, Madamanchi N R, Hakim Z S, *et al*. Thrombin and NAD(P)H oxidase-mediated regulation of CD44 and BMP4-Id pathway in VSMC, restenosis, and atherosclerosis[J]. Circ Res, 2006, 98(10): 1254-1263.
[13] Okumura M, Iwai M, Ide A, *et al*. Sex difference in vascular injury and the vasoprotective effect of valsartan are related to differential AT2 receptor expression[J]. Hypertension, 2005, 46(3): 577-583.
[14] Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer C A, *et al*. Angiotensin Ⅱ stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells *via* nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner[J]. J Vasc Res, 2005, 42(5): 415-423.
[15] 刘建平, 何国祥, 景涛, 等. 血管紧张素Ⅱ2型受体转染表达对血管平滑肌细胞增殖及迁移的影响[J]. 高血压杂志, 2001, 9(2): 127-130.
[16] 景涛, 何国祥, 王海东, 等. 血管紧张素Ⅱ2型受体基因可调控体外培养的血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶2的表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(4): 256-260.
[17] 唐兵, 何国祥, 李德, 等. 大鼠血管紧张素Ⅱ2型受体基因转染对颈动脉球囊损伤后新生内膜形成的影响[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2005, 13(2): 108-110.

(收稿 2010-08-29 修回 2010-12-19)
(编辑 王 红)