论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0936-04

# 脉冲电场介导AT2R基因在血管局部表达及其对血管新生内膜的影响

刘德峰,屈小玲,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** 研究脉冲电场对血管紧张素2型受体(AT2R)基因在血管局部表达的作用,探讨AT2R基因在体转染对大鼠颈动脉球囊损伤后新生内膜增生的作用。**方法** 大鼠颈动脉球囊损伤后,用脉冲电穿孔法介导AT2R cDNA真核表达质粒或空质粒载体在动脉局部表达,于术后3、7 d和21 d用免疫组织化学、HE染色等方法,进行AT2R在颈动脉壁中表达的变化及定量组织形态学分析。**结果** 免疫组织化学染色结果显示:脉冲电场介导AT2R cDNA真核表达质粒表达后,3 d时可见内膜、中膜、外膜大量AT2R的棕色阳性着色,7 d时可见少量棕色阳性着色,21 d棕色阳性着色几乎消失,未转染组及空质粒转染组未见AT2R的棕色阳性着色,表明脉冲电穿孔能有效导入AT2R基因,并在动脉壁获得稳定表达。在21 d时,AT2R cDNA真核表达质粒组的内膜面积与中膜面积比显著低于未转染组和空质粒载体组[分别为(0.76±0.08)、(1.39±0.08)、(1.32±0.10),$P<0.01$],空质粒转染组和未转染组间无统计学差异($P>0.01$)。**结论** 脉冲电穿孔可介导AT2R基因在血管局部有效表达,AT2R在体转染可抑制球囊损伤后大鼠颈动脉平滑肌细胞增殖和新生内膜增生。

【关键词】 电穿孔;血管紧张素2型受体;再狭窄

【中图法分类号】 R322.12;R363.124;R394.2 【文献标志码】 A

# Electroporation-mediated angiotensin Ⅱ type 2 receptor expression improves neointimal hyperplasia of carotid arteries in rats after balloon angioplasty

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

【**Abstract**】 **Objective** To determine the effects of electroporation on the transfection of angiotensin Ⅱ type 2 receptor (AT2R) gene into rat carotid arteries and predict its role in neointimal hyperplasia of carotid arteries after balloon angioplasty. **Methods** After the establishment of rat carotid balloon injury restenosis model, 18 SD rats were divided into AT2R transfection group, empty plasmid transfection group (GFP), and non-transfection group ($n=6$). AT2R gene plasmid or empty plasmid was transfected by electroporation into rat carotid arteries. Their arteries were harvested at 3, 14 and 21 d after gene transfer, with 2 rats at each time points. The expression of AT2R and morphology of the arteries were evaluated by immunohistochemistry and HE staining respectively. **Results** Electroporation-mediated transfection of AT2R gene into injured rat carotid arteries significantly up-regulated the levels of AT2R mRNA in the neointima in a time dependent manner from day 3 to day 14 (strong to moderate to mild expression). But no expression of AT2R was found in the other 2 groups at these 3 time points. At day 21, AT2R transfection significantly reduced intimal/medial area ratio as compared with non-transfection group and GFP transfection group ($0.76\pm0.08$ *vs* $1.39\pm0.08$ and $1.32\pm0.10$, $P<0.01$). No significant difference was found between non-transfection group and GFP transfection group. **Conclusion** Our results indicate that electroporation is an effective means to introduce naked AT2R DNA into the blood vessel wall, and gene transfer of AT2R in vessel wall may effectively inhibit VSMC proliferation and neointimal hyperplasia in the rat carotid arteries after balloon angioplasty.

【**Key words**】 electroporation; angiotensin Ⅱ type 2 receptor; restenosis

Corresponding author: Liu Jianping, E-mail: liujianping1022@hotmail.com

【通信作者】 刘建平,E-mail:liujianping1022@hotmail.com

随着经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty,PTCA)在临床上的普遍应用,再狭窄(restenosis,RS)的发生率也随之增多。这主要是由于术中球囊损伤血管后新生内膜形成,新生内膜则是由于血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMC)的增殖及内膜下迁移,并发生表型变化[1-2]。目前至少发现3种血管紧张素受体(angiotensin receptor,ATR),分别命名为AT1R、AT2R和AT3R。目前AT1R及AT2R已被克隆测序。现在认为AT1R介导了AngⅡ主要的生物作用,如引起醛固酮及血管加压素的分泌、肾小管尿钠的重吸收等传统作用,而且AT1R还介导AngⅡ促进新生内膜形成。而AT2R的作用无论是对细胞增殖、迁移的影响,还是对胞外基质合成的影响,都与AT1R相拮抗[3]。

本课题组对体外培养的VSMC及血管组织进行了AT2R基因表达研究,结果表明AT2R对体内外VSMC有明显的抑制其增殖、迁移和促进其凋亡的作用,可有效地抑制血管再狭窄的发生[4]。目前体内转染常用病毒载体介导,转染效率比较高,但由于病毒对人体产生安全隐患,影响其应用于临床,而裸质粒转染表达率较低。因此,本研究利用脉冲电场介导AT2R受体基因在病变血管局部表达,并研究其对血管再狭窄的影响作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

成年SD大鼠45只,雌雄各半,体质量300~400 g,购于第三军医大学实验动物中心。AT2R cDNA真核表达质粒由本科左玉梅硕士构建。PTCA球囊导管购于Cordis公司。LN-01型脉冲基因导入仪购自天津理工大学,血管电极片由本课题组自制,该电极片由两张1 cm×0.3 cm的金属铂片组成,分别为正负极,将两张铂片电焊在绝缘塑料外壳上,将塑料外壳制成夹子装,可以调节夹子的松紧,夹子的另一端由电极线接LN-01型基因脉冲导入仪。

### 1.2 方法

1.2.1 实验分组 分为未转染组、空质粒转染组、重组AT2R质粒转染组,每组15只;每组设3个时相点,电穿孔后3、7、21 d,每个时相点5只。

1.2.2 大鼠颈动脉球囊损伤动物模型的建立[5] 取SD成年大鼠,戊巴比妥30 mg/kg腹腔注射麻醉大鼠,消毒后颈部做正中切口,分离颈总动脉和颈内动脉、颈外动脉分叉,自颈外动脉向近心端插入PTCA导管至颈总动脉,球囊冲水0.1 ml,自远心端慢速回拉至颈内外动脉分叉处,重复共3次,完成后结扎颈外动脉,恢复颈内动脉血流。将对侧颈总动脉未作任何处理作为对照。

1.2.3 脉冲电场介导大鼠颈动脉AT2R基因导入[6-7] 内膜损伤后,撤出球囊,暂时夹闭颈总动脉近心端,盐水冲洗管腔后各组分别注入50μl重组AT2R质粒悬液(1 mg/μl)、空质粒(2 mg/μl),快速夹闭颈总动脉分叉处,将正负电极片贴在血管壁两侧,调整脉冲电场参数包括电压、脉冲时间、脉冲次数,放电后保持血管阻断20 min以利于质粒转染,让质粒与内膜充分接触,经颈动脉注射肝素100 U/kg,结扎颈外动脉近端,恢复颈总动脉至颈内动脉血流。关闭切口,术后注射青霉素80万U。

对另一侧未损伤的颈总动脉进行电穿孔转染,于术后3、7、21 d检测各组AT2R在颈动脉内膜的表达情况。

### 1.3 取材和切片

术后3、7、21 d,用戊巴比妥钠麻醉大鼠,游离其颈总动脉段,阻断颈总动脉两端血流,用眼科剪在颈总动脉分叉处及颈总动脉近心端处剪取标本,标本长1.5 cm,用肝素生理盐水冲洗血管段,部分组织以4%多聚甲醛固定另一部分置入液氮罐。标本切片后经HE染色在光学显微镜下进行形态观察及测量。

### 1.4 HE染色及计算内膜/中层面积比

将标本石蜡切片,常规HE染色,用计算机图像分析软件测量血管内膜、中膜横断面的面积,计算内膜/中膜面积比(I/M),测量者为与实验无关者。

### 1.5 免疫组织化学染色

采用S-P kit进行免疫组织化学染色,按试剂盒说明操作,将标本冰冻切片,4 ℃平衡,封闭液室温孵育10 min,1% BSA-0.5% Triton X-100室温30 min,正常羊血清封闭室温孵育10 min,1∶100Ⅰ抗工作液孵育1 h后过夜,生物素标记的Ⅱ抗工作液37 ℃孵育30 min,辣根酶标记Ⅱ抗工作液37 ℃孵育30 min,DAB显色,苏木精复染,脱水,中性树胶封片,AT2R特异性抗体为一抗,显微镜下阳性细胞质着色呈棕褐色。

### 1.6 统计学分析

用SPSS 18.0统计软件进行分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较行方差分析,两组间比较行 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 AT2R在血管壁的表达

免疫组织化学染色结果显示:对未损伤的大鼠颈总动脉进行电穿孔转染,术后3 d时可见内膜、中膜、外膜大量AT2R的棕色阳性着色,7 d时可见少量棕色阳性着色,21 d棕色阳性着色消失,未转染组及空质粒转染组未见AT2R的棕色阳性着色,表明脉冲电穿孔能有效导入AT2R基因,并在动脉壁获得稳定表达。见图1。

### 2.2 AT2R基因表达对大鼠颈动脉损伤后新生内膜增殖的影响

术后21 d,HE染色可见未转染组、空质粒转染组的损伤动脉血管新生内膜明显向管腔内增生,造成管腔明显狭窄,转染组损伤动脉也发现有较明显的新生内膜增生,但增生程度较未转染组和空质粒转染组显著减轻。见图2。与未转染组相比,转染组的新生内膜/中膜面积比降低了约45%;与空质粒转染组相比,转染组的新生内膜/中膜面积比降低了约42%。见表1。




A:未转染组;B:空质粒转染组;C:重组AT2R质粒转染组术后3 d;D:重组AT2R质粒转染组术后7 d;E:重组AT2R质粒转染组术后21 d

**图1 电穿孔介导AT2R在各组大鼠未损伤颈动脉局部表达后免疫组织化学染色观察** (S-P×400)




A:未转染组;B:空质粒转染组;C:重组AT2R质粒转染组

**图2 AT2R基因转染后各组大鼠颈动脉球囊损伤后新生内膜形成变化**

**表1 术后21 d各组大鼠颈动脉新生内膜和中膜面积比**

| 组别 | $n$ | 内膜面积($mm^2$) | 中膜面积($mm^2$) | 内膜/中膜面积比 |
|---|---|---|---|---|
| 未转染组 | 5 | 0.16±0.02 | 0.12±0.01 | 1.39±0.08 |
| 空质粒转染组 | 5 | 0.18±0.03 | 0.13±0.01 | 1.32±0.10 |
| 重组AT2R质粒转染组 | 5 | 0.12±0.01 | 0.16±0.01 | 0.76±0.08[ab] |

a:$P<0.01$,与未转染组比较;b:$P<0.01$,与空质粒转染组比较

## 3 讨论

PTCA术后血管内膜在修复过程中大量细胞增殖,引起血管腔再狭窄。其中VSMC增殖最明显。AngⅡ通过AT1R介导有明显促进VSMC增殖和迁移的作用,而一些研究[8-10]发现用AT2R能抑制VSMC增殖和迁移,并促进VSMC凋亡,因此我们猜测在内膜修复过程中,人为的增加血管局部AT2R的表达能抑制VSMC增殖、迁移,可以抑制内膜增生,从而抑制RS。

目前实验中常用病毒载体包装基因进行转染,这种转染方式虽然表达率较高,但是由于病毒本身的传染性、致病性,限制其应用于临床,而电穿孔法由于其独特的优势越来越受到科学家的关注,活体电穿孔法是将外源基因通过电场作用,导入目标组织或器官,其原理是在直流电场作用的瞬间,细胞膜表面产生疏水或亲水的微小通道105~115 μm。这种通道能维持到几毫秒到几秒,然后自行恢复,在此期间生物大分子如DNA可通过这种微小的通道进入细胞。其优点有:①可使用于各种组织器官中;②效率较高;③对导入的外源基因片段的大小没有限制;④操作简单快速,安全性高。研究[11-12]发现对大鼠颈动脉进行不可逆的电穿孔,工作参数为3 800 V/cm,100 ms,10次,所有的大鼠存活,而且没有副反应,28 d后组织学研究发现动脉血管壁完整,平滑肌细胞未受损,没有形成动脉瘤、血栓和坏死。进行电穿孔要对其工作参数特别注意,电压过低或过高都会影响外源基因的表达。电压过低时,无法造成细胞膜表面状态的改变,因而外源基因不能进入细胞内。电压过高时,局部组织积聚过多热量,造成细胞的死亡或组织失去功能,即使外源基因导入细胞,也无法进行正常的表达。大鼠常用的活体电压大多为20~100 V/cm,最高750 V/cm,电穿孔次数应控制在10次以内,否则会对局部的细胞组织造成不可逆的损害,每组电穿孔时间应在10~100 ms,由于电穿孔瞬间在局部会产生大量热,因此操作过程中,DNA转染试剂应保持4 ℃,同时电穿孔操作部位的温度也应适当降低,Muramatsu等[13]证明温度较低的情况下,外源基因的转移表达效率会有明显的提高。DNA的浓度应控制在1~40 mg/ml范围内。

本研究用电穿孔法介导AT2R基因在大鼠颈动脉损伤内膜表达,电穿孔的参数设置为,电压200 V/cm,脉冲次数5次,每组电穿孔持续时间10 ms,DNA浓度为1.2 mg/ml,结果发现,脉冲电穿孔能有效介导AT2R基因在大鼠颈动脉损伤内膜表达,并明显抑制球囊损伤后新生内膜形成。表明该方法能有效提高血管局部AT2R基因表达,同时AT2R基因在血管局部表达能抑制VSMC增殖,抑制新生内膜形成。

电穿孔法介导质粒表达比较安全,表达率较高,可以成为今后临床上基因转染的有效方法。由于目前实验条件有限,仅能用外加的电极片对大鼠颈总动脉进行电穿孔,这样需要对大鼠进行颈部血管的分离和缝合,如果将PTCA球囊和脉冲电极二者有效结合,改制成球囊电极导管[14],可以通过血管介入的方法进行电穿孔,对今后应用于临床有重大意义。

## 参考文献:

[1] Spertus J A, Nerella R, Kettlekamp R, *et al*. Risk of restenosis and health status outcomes for patients undergoing percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass graft surgery[J]. Circulation, 2005, 111(6):768-773.

[2] Karthikeyan G, Bhargava B. Prevention of restenosis after coronary angioplasty[J]. Curr Opin Cardiol, 2004, 19(5):500-509.

[3] Volpe M, Musumeci B, De-Paolis P, *et al*. Angiotensin Ⅱ AT2 receptor subtype:an uprising frontier in cardiovascular disease?[J]. J Hypertens, 2003, 21(8):1429-1443.

[4] 刘建平,何国祥,景涛. 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.

[5] 王金林,谭小进,谢志娟. 大鼠颈动脉再狭窄模型的建立及其病理机

制的初步研究[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(6): 1042 - 1045.
[6] 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.
[7] Dev N B, Hofmann G A, Dev S B, *et al*. Intravascular electroporation markedly attenuates neointima formation after balloon injury of the carotid artery in the rat[J]. J Interv Cardiol, 2000, 13(5): 331 - 338.
[8] Jing T, Wang H, Srivenugopal K S, *et al*. Conditional expression of type 2 angiotensin Ⅱ receptor in rat vascular smooth muscle cells reveals the interplay of the angiotensin system in matrix metalloproteinase 2 expression and vascular remodeling[J]. Int J Mol Med, 2009, 24(1): 103 - 110.
[9] 景涛, 何国祥, 刘建平, 等. AT2R 基因可调控表达对体外培养 VSMC 纤维黏连蛋白表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(11): 999 - 1002.
[10] Lemarie C A, Schiffrin E L. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2010, 11(1): 19 - 31.
[11] Maor E, Ivorra A, Mitchell J J, *et al*. Vascular smooth muscle cells ablation with endovascular nonthermal irreversible electroporation[J]. J Vasc Interv Radiol, 2010, 21(11): 1708 - 1715.
[12] Maor E, Ivorra A, Leor J, *et al*. The effect of irreversible electroporation on blood vessels[J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6(4): 307 - 312.
[13] Muramatsu T, Ito N, Tamaoki N, *et al*. *In vivo* gene electroporation confers nutritionally-regulated foreign gene expression in the liver[J]. Int J Mol Med, 2001, 7(1): 61 - 66.
[14] Dean D A. Nonviral gene transfer to skeletal, smooth, and cardiac muscle in living animals[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 289(2): C233 - C245.

(收稿 2010-12-21 修回 2011-01-19)
(编辑 王小宾)

(上接 923 页)

充分,撅嘴、龇牙范围增大,唇力度较前增加,鼓腮无漏气,吞咽相关器官运动协调性、稳定性、控制力较前好转。饮水试验 1 级,喉头运动充分,呕吐反射阳性,吞咽反射阳性。

## 2 讨论

吞咽障碍是指各种原因所致食物不能由口腔到胃的过程,大约 51% 脑卒中患者发病后伴有不同程度的吞咽障碍[2]。根据损伤部位分为真性球麻痹性吞咽困难和假性球麻痹性吞咽困难。真性球麻痹是因疑核、舌下神经核及其神经的下运动神经元损害引起的。其吞咽困难症状重,延髓神经支配的咽、喉、腭、舌的肌肉瘫痪、萎缩,障碍主要发生在咽期,吞咽反射微弱或消失,误咽突出,环咽肌功能障碍,食团在咽部滞留,进食时食物可由鼻孔呛出,声音嘶哑,构音不清。假性球麻痹是因双侧大脑皮质及皮质脑干束的上运动神经元损害引起的。其口腔期障碍明显,康复效果较好。本例患者不能经口进食任何食物包括唾液,吞咽反射消失,咽喉期障碍明显,伴有构音障碍,言语表达欠清晰。颅脑 MRI 示:左侧小脑半球及延髓梗死灶并少量渗血。因此,诊断为真性球麻痹。

通常认为真性球麻痹性吞咽障碍恢复很慢。药物治疗疗效多不理想[3],而多以物理疗法,饮食上予以糊状或黏稠状食物,定时刺激咽喉部肌肉、训练患者对口型、缓慢分次吞咽口水等[4]。临床多用鼻饲或胃造口成形术来维系患者的生命,久之,不但患者产生营养失调、腹胀便秘等副作用,而且使延髓神经支配的咽、喉、腭、舌肌废用性萎缩,不利于吞咽功能的重建。患者可因吞咽障碍不能进食同时伴有部分感觉、运动障碍等症状而产生悲观、失望和厌世的绝望心理,致使生活质量下降,死亡率增高[5]。本例患者经过药物静滴、吞咽训练、球囊扩张、针刺等综合治疗 3 周,吞咽功能恢复良好。这可能与以下因素有关:①在间接训练以增加吞咽相关器官运动力量与控制性基础上,反复吞咽冰水训练,可帮助患者重建吞咽模式,锻炼咽喉肌力量。②采用环咽肌球囊扩张技术。窦祖林等[6]报道导尿管球囊扩张治疗环咽肌失迟缓收到较好疗效。纪红等[7]研究认为导尿管球囊扩张法对环咽肌失弛症导致的吞咽障碍进行治疗,患者痛苦少,无明显不良反应,耐受性好。该例患者住院期间共给予了 5 次环咽肌球囊扩张术,扩张过程顺利,均无头晕、恶心、疼痛等不适,无呛咳、窒息等意外发生。③采用醒脑开窍针法。天津中医学院第一附属医院应用石学敏醒脑开窍针刺法治疗球麻痹获得了满意的临床疗效[8]。脑梗死属于中医“中风”范畴,故采用“醒脑开窍”针法以开窍醒神。针刺风府、风池、完骨、天柱可以直接促进脑干侧支循环的建立,加强局部血流,减轻局部水肿,缩小坏死面积。从局部解剖来看,风府深部为环枕后膜和小脑延髓池,再深即为延髓[8]。④患者康复愿望强烈,积极配合治疗。由于以上几种原因,本例患者在较短时间内恢复了吞咽功能。因此,对此类患者的康复治疗,医患双方要摆脱固有观念的影响,积极采取综合的治疗措施。

## 参考文献:

[1] 沈正国, 曹先斌, 熊辉, 等. 真性球麻痹 1 例[J]. 罕少疾病杂志, 2000, 7(3): 38 - 39.
[2] 赵成三, 马兰, 向明清, 等. 家属协作简易被动运动疗法对卒中急性期的康复作用[J]. 中国康复, 1998, 13(1): 20 - 22.
[3] 陈传, 姜华琦, 王启典. 深刺廉泉穴辅以药物治疗脑卒中引起的球麻痹 17 例报告[J]. 中医药临床杂志, 2005, 17(2): 191.
[4] 黄立安, 黄舜韶, 蒋亚宾. 球麻痹的诊断与治疗[J]. 现代临床医学生物工程学杂志, 2000, 6(2): 56.
[5] 刘悦, 凌方明, 梁宏宇. 针刺治疗脑卒中吞咽障碍的疗效观察[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24(6): 373 - 374.
[6] 窦祖林, 万桂芳, 王小红, 等. 导尿管球囊扩张治疗环咽肌失弛缓症 2 例报告[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28(3): 166 - 170.
[7] 纪红, 茆红霞. 导尿管球囊扩张法治疗环咽肌失弛缓引起吞咽障碍的疗效观察[J]. 中国康复医学杂志, 2010, 25(4): 357 - 359.
[8] 汪振宇, 李琳. 石学敏醒脑开窍法针灸治疗 wallenberg 综合征[J]. 中医药通报, 2005, 4(6): 22 - 23.

(收稿 2011-03-09 修回 2011-03-23)
(编辑 王小宾)