

技术与方法

Poloxamer 407-胰蛋白酶混合凝胶提高腺病毒转染移植静脉组织效率的研究

王小文^{1,2*} 李送¹ 钟昌明¹ 张诚^{1,3} 黄春¹ 冯波² 吕志前⁴⁽¹⁾重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016; ⁽²⁾香港中文大学, 生物医学研究院, 再生医学重点实验室,香港 999077; ⁽³⁾伦敦大学玛丽皇后学院, 威廉哈维研究所, 伦敦 EC1M 6BQ;⁽⁴⁾上海交通大学附属第六人民医院心血管外科, 上海 200233)

摘要 安全高效地将治疗基因导入移植静脉组织是移植静脉再狭窄基因治疗研究的重要内容。该研究探讨应用Poloxamer 407-胰蛋白酶混合凝胶局部转染提高移植静脉的腺病毒转染效率的可行性。构建大鼠移植静脉再狭窄模型, 应用Poloxamer 407-胰蛋白酶混合凝胶涂染法, 通过增加腺病毒载体与血管组织的接触时间以及改善血管壁的渗透性, 提高移植静脉的腺病毒转染效率。分别在术后7、14、28天采集标本, 应用冰冻切片、免疫组化染色和qRT-PCR检测移植静脉中EGFP的表达以评估转染效率。Poloxamer 407-胰蛋白酶混合凝胶局部转染能够显著提高移植静脉的腺病毒转染效率, 其中0.25%的胰蛋白酶转染效率最佳, 并且不影响移植静脉血管的组织抗拉性。Poloxamer 407-胰蛋白酶混合凝胶涂染是一种简单、安全和高效的局部基因转染方法, 可用于移植静脉再狭窄的防治研究。

关键词 基因治疗; 腺病毒; 转染效率; 移植静脉; 再狭窄; 内膜增生

Improved Efficiency of Adenovirus-mediated Vein Grafts Gene Transfer by Use of Poloxamer 407-Trypsin Gel

Wang Xiaowen^{1,2*}, Li Song¹, Zhong Changming¹, Zhang Cheng^{1,3}, Huang Chun¹, Feng Bo², Lü Zhiqian⁴⁽¹⁾Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;⁽²⁾Key Laboratory for Regenerative Medicine, School of Biomedical Sciences, The Chinese University of Hong Kong, HongKong 999077, China;⁽³⁾Centre for Clinical Pharmacology, William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London, London EC1M 6BQ, UnitedKingdom; ⁽⁴⁾Department of Cardiovascular Surgery, Shanghai JiaoTong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

Abstract Safe and effective vein grafts gene transfer remains elusive in vascular gene therapy. The aim of the present study was to investigate whether poloxamer 407-trypsin gel enhances the efficiency of adenovirus-mediated locally vein grafts gene transfection *in vivo*. Rat model of vein graft restenosis was established interposition bypass grafting from the autologous jugular vein to the carotid artery. We applied recombinant adenovirus encoding the reporter gene EGFP directly onto vein grafts with poloxamer 407 gel to increase virus contact time, and mild trypsinization to

收稿日期: 2018-07-05 接受日期: 2018-12-29

国家自然科学基金青年科学基金项目(批准号: NSFC81700320)和重庆市科学技术委员会基础科研项目(批准号: CSTC2015JCYA10099)资助的课题

*通讯作者。Tel: 17783079545, E-mail: xiaowenwang@cqmu.edu.cn

Received: July 5, 2018 Accepted: December 29, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.SFC81700320) and Chongqing Science and Technical Commission Basic Research Funding (Grant No.CSTC2015JCYA10099)

*Corresponding author. Tel: +86-17783079545, E-mail: xiaowenwang@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-04-02 12:40:41 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190402.1240.004.html>

increase virus penetration. The expression of EGFP in vein grafts walls was determined by frozen section, qRT-PCR and immunohistochemistry staining at 7, 14 and 28 days after vein graft surgery. Structural integrity of the tissue was evaluated by measurement of tissue tensile strength. Transfection efficiency was significantly higher in vein grafts in poloxamer 407 gel contained varying concentrations of trypsin group versus control group. Trypsin at a concentration of 0.25% allowed marginally better penetration, and tissue tensile strength was not affected. These findings suggest that poloxamer 407-trypsin gel may be a safe and effective method to improve the efficiency of adenovirus-mediated vein grafts gene transfer.

Keywords gene therapy, adenovirus, transfection efficiency; vein graft; restenosis; eointimal hyperplasia

移植静脉再狭窄是影响冠状动脉旁路移植术(coronary artery bypass grafting, CABG)术后远期疗效最常见和最主要的原因, 目前尚无有效的防治措施。随着分子生物学技术的发展和移植静脉再狭窄发病机制的深入研究, 基因治疗成为一种具有广阔应用前景的有效方法。在基因治疗的常用病毒载体中, 腺病毒载体具有非致病性, 对宿主免疫原性弱, 能转染分裂和非分裂细胞, 并能够长期稳定表达目的基因等诸多优势。但是, 如何将携带有目的基因的腺病毒载体高效地导入静脉组织仍是制约移植静脉再狭窄基因治疗的一个尚未解决的难题。为此, 本研究探讨应用不同浓度胰蛋白酶与Poloxamer 407的混合凝胶是否可以提高移植静脉腺病毒转染效率, 以筛选出一种简单、稳定和高效的移植静脉局部基因导入方法, 为移植静脉再狭窄的防治研究提供方法学参考。

1 材料方法

1.1 主要实验材料

清洁级SD雌性大鼠32只, 体重(250±50) g, 由香港中文大学动物实验中心提供。实验材料和仪器包括: 体式动物手术显微镜(Olympus公司), 荧光显微镜(Olympus公司), 显微外科手术器械(World Precision Instruments公司), 10/0、11/0 Polypropylene缝线(Ethilon公司), 冰冻切片器(CM305S, Leica公司), 免疫组化试剂盒(Roche公司), Poloxamer 407(BASF公司), 胰蛋白酶(Gibco公司), EGFP抗体(Abcam公司), qRT-PCR试剂盒(TaKaRa公司)。EGFP引物由深圳华大基因公司合成以及重组腺病毒EGF表达载体(recombinant adenovirus encoding the reporter gene EGFP, Ad-GFP)由香港中文大学生物医学研究院冯波教授课题组提供。按照实验手册经扩增和纯化后,

获得滴度为 4×10^{12} pfu/mL的病毒液^[1]。

1.2 移植静脉再狭窄动物模型构建

大鼠移植静脉再狭窄模型建立的方法采用我们之前报道的端-端吻合法^[2], 即将自体颈外静脉移植至同侧颈总动脉, 其简要操作步骤如下。首先, SD大鼠10%水合氯醛水溶液(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉。然后, 取颈前正中切口, 显露右颈总静脉和颈外静脉。全身肝素化(150 U/kg, 皮下注射)后, 仔细分离两端结后切断颈外静脉1~2 cm, 立即用肝素生理盐水液(4 500 U/L)冲洗干净, 于正中切口继续向右侧钝性分离颌下腺及胸锁乳突肌、胸骨舌骨肌, 显露颈动脉鞘, 游离颈总动脉约3 cm。修剪去除干净颈动脉断端处的血管外膜, 用11-0 Polypropylene缝线间断端-端吻合动静脉, 先近心端, 后远心端。开放两端血管夹, 排气并检查吻合口, 少量渗血可用脂肪组织垫或纱布轻压止血, 出血较多时, 需加缝一针。吻合完毕, 移植静脉充盈并随心律而搏动, 颈动脉远端搏动良好, 吻合口无出血、渗血, 生理盐反复水冲洗伤口, 缝合切口。

1.3 实验分组和转染液的配置

将大鼠随机分为4组: 对照组(control, $n=8$): Ad-GFP(200 μ L)+0.9% NaCl(100 μ L); A组($n=8$): Ad-GFP(200 μ L)+20% Poloxamer 407+0.1%胰蛋白酶; B组($n=8$): Ad-GFP(200 μ L)+20% Poloxamer 407+0.25%胰蛋白酶; C组($n=8$): Ad-GFP(200 μ L)+20% Poloxamer 407+1%胰蛋白酶, 分别经血管外膜涂染。Poloxamer 407凝胶制备采用冷溶法, 在冷PBS溶液中加入Poloxamer 407搅拌均匀, 将其放入4 $^{\circ}$ C冰箱中保存12 h使其完全溶解。使用前根据实验分组分别加入Ad-GFP病毒液、1%的转染液(Qiagen公司)和不同浓度的胰蛋白酶。

1.4 移植静脉原位基因转染

游离并离断颈外静脉后, 将其浸泡在Ad-GFP

病毒液中30 min。待静脉血管成功移植至颈动脉后,用生理盐水将吻合周围冲洗干净,并用无菌纱布沾拭干静脉血管吻合口周围。将4℃保存的20% Poloxamer 407含有不同胰蛋白酶浓度的Ad-GFP混合凝胶溶液局部涂抹在移植静脉及其吻合口周围。

1.5 移植静脉标本的采集

大鼠分别在术后7、14、28天应用过量麻醉法分批处死,处死后迅速取出移植静脉,4℃预冷的PBS液冲洗干净,按照不同实验组分别存入液氮和4%多聚甲醛固定。

1.6 冰冻切片荧光显微镜评估转染效率

移植静脉标本采集后,4℃预冷的PBS液冲洗干净,立即用包埋剂中低温成形,冰冻切片连续切片(厚度8 μm),于倒置荧光显微镜下观察EGFP荧光蛋白的表达情况,荧光蛋白表达的绿色荧光强度越强表示转染效率越高,同时可以观察血管组织的内膜、中膜及外膜的不同荧光表达强度。

1.7 免疫组化检测EGFP蛋白的表达

移植静脉标本4%多聚甲醛固定后,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、制成蜡块,连续切片(8 μm)后行HE和免疫组化染色(EGFP抗体稀释1:500),在高倍镜下随机计数5个视野,以细胞内出现棕黄色颗粒为阳性,计数阳性细胞率。

1.8 qRT-PCR测定EGFP表达水平

组织匀浆,TRIZOL法提取总RNA并逆转录成cDNA,反应程序为:25℃,30 min;42℃,30 min;85℃,5 min;4℃保存。采用ABI 7900HT RT-PCR仪进行PCR,反应体系共20 μL,包括:SYBR Mix 10 μL,上下游引物各0.4 μL,ROX reference dye 0.4 μL,cDNA 2 μL。反应体系为:95℃预变性30 s;95℃5 s,60℃30 s,40个循环。EGFP引物F:5'-GCT AGC GCT ACC GGT CGC CAA CCA TG-3',R:5'-GAA TTC CTT GTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT G-3';内参GAPDH引物:F:5'-ACA GCA ACA GGG TGG TGG AC-3',R:5'-TTT GAG GGT GCA GCG AAC TT-3'。扩增后应用SDS 2.3软件对结果进行分析,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算EGFP mRNA的相对含量。

1.9 移植静脉抗拉强度检测

为了评估Poloxamer 407-胰蛋白酶混合凝胶局部转染法是否影响移植静脉血管组织本身的生物学特性,故对不同实验组的静脉血管标本行抗拉强度检测。用小型英斯特朗测试仪,加载力度为0.015 N/s,

在室温,生理盐水湿润的条件下,测定个组织样本的最大负荷。

1.10 统计学方法

计量资料以均数±标准差表示,采用SPSS 17.0统计学软件进行数据分析,组间比较采用方差分析,组内两两比较采用LSD-*t*检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 移植静脉手术的情况

手术过程中大鼠无死亡,均顺利完成静脉血管的移植手术,吻合成功后观察各吻合口均通畅,搏动有力、无出血、狭窄及血管扭曲等情况(图1)。分别在术后7、14、28天取材观察,移植静脉均通畅,无坏死和血栓形成等。

2.2 荧光显微镜观察结果

冰冻切片荧光检查显示,Ad-GFP转染移植静脉术后7天,即可观察到EGFP表达所产生的明显的团块状绿色荧光;14天表达更为显著,静脉血管各层组织中荧光表达的强度不等,主要集中在外膜和中膜,少部分集中在内膜。随着表达强度的增加;28天荧光强度更加显著,移植静脉全层组织都表达绿色荧光(图1)。

2.3 形态组织学检查结果

HE染色结果显示,正常大鼠颈外静脉血管壁薄,内膜仅为单层内皮细胞,无增生内膜。实验组术后7天,即可见移植静脉的血管内膜开始出现增生,14天可见明显增生,随着内膜增生逐渐加重,至28天管壁逐渐增厚致移植静脉出现显著狭窄,并伴有细胞基质的沉积,胶原增多及炎症细胞浸润等(图2)。

免疫组化染色显示,EGFP蛋白在移植静脉组织中均表达,且Poloxamer 407-胰蛋白酶混合凝胶组在术后7、14、28天均高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);C组移植静脉中EGFP蛋白的表达量在术后14、28天略高于A、B组,差异具有统计学意义($P<0.05$);A、B组间在术后各个时间点差异无统计学意义($P>0.05$)(图3)。

2.4 qRT-PCR定量检测结果

qRT-PCR定量检测显示,对照组中有少量的EGFP mRNA的表达,Poloxamer 407-胰蛋白酶混合凝胶各组在术后7、14、28天均显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);C组移植静脉中EGFP蛋白的表达量在术后14、28天略高于A、B组,差异

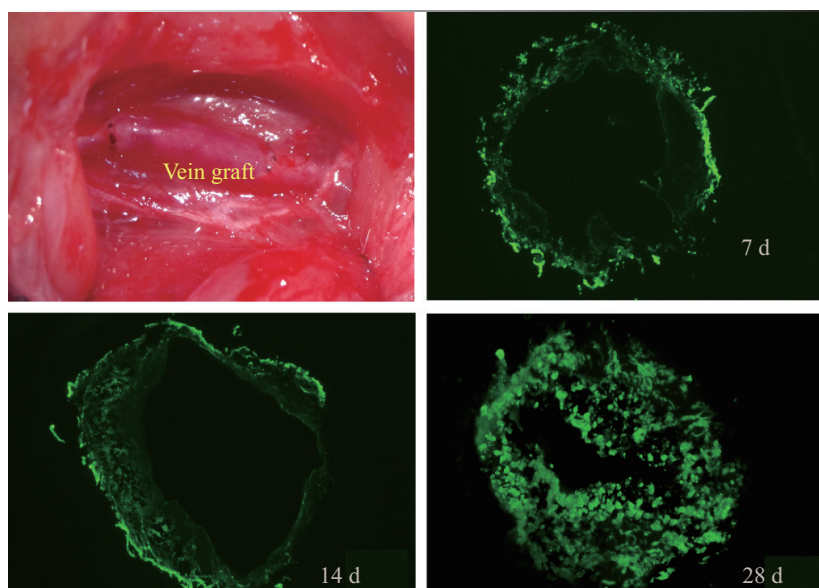
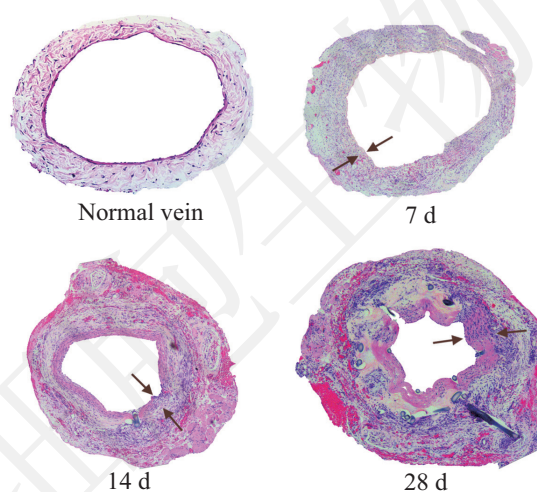


图1 移植静脉及其EGFP表达(100×)

Fig.1 Vein graft and its EGFP expression (100×)



箭头指示内膜增生。

Arrow indicates neointimal hyperplasia.

图2 移植静脉的内膜增生情况(100×)

Fig.2 Neointimal hyperplasia in vein graft (100×)

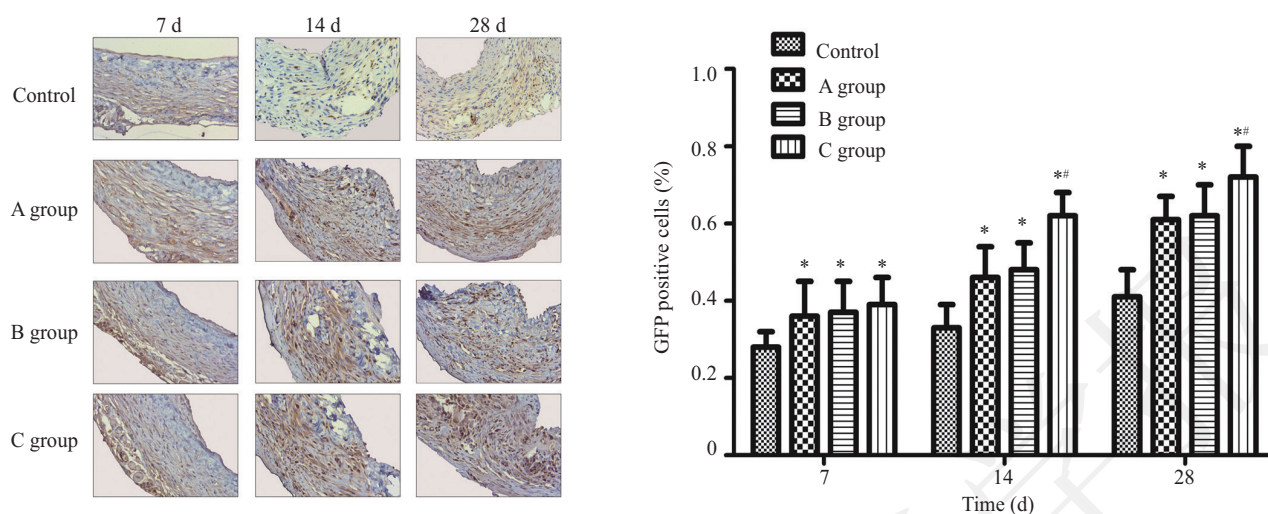
具有统计学意义($P < 0.05$); A、B组间在术后各时间点差异无统计学意义($P > 0.05$)(图4)。

2.5 抗拉强度检测结果

Poloxamer 407-胰蛋白酶混合凝胶中的胰蛋白酶对移植静脉的血管抗拉强度稍有影响, 胰蛋白酶浓度为0.1%的A组和0.25%的B组与对照组相比其抗拉强度在术后7天的减少并无统计学差异($P > 0.05$), 但1%的C组中较对照组显著减弱, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 其余时间点, 实验组间及其与对照组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)(图5)。

3 讨论

基因治疗在移植静脉再狭窄防治研究中是具有广阔应用前景的有效方法, 其优势在于可以在CABG术中, 从大隐静脉采集完成到开始移植吻合的窗口期(40~60 min)内, 只针对移植静脉血管进行局部基因治疗, 而不会干扰其他器官以及整个循环系统。但是, 如何将携带有目的基因的表达载体高效安全地导入静脉组织尚无最佳解决方案。本研究应用不同浓度胰蛋白酶与Poloxamer 407混合凝胶血管外膜涂染的方法可以有效提高移植静脉血管组织

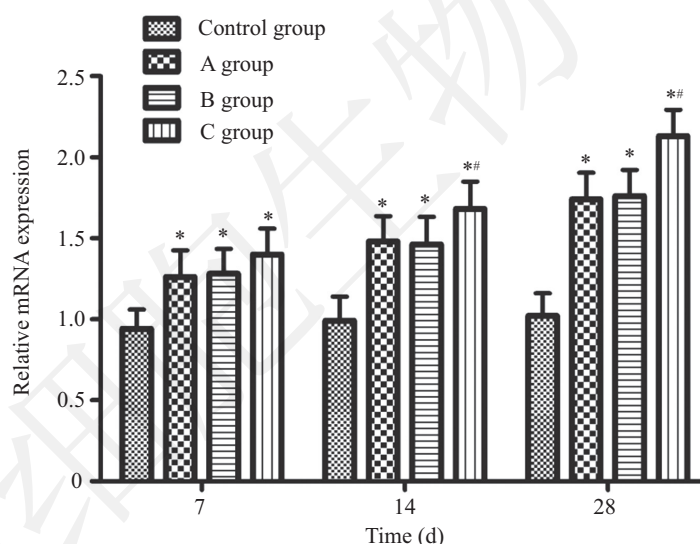


* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与B组相比。

* $P < 0.05$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with B group.

图3 免疫组化检测移植静脉的EGFP蛋白表达(400×)

Fig.3 EGFP expression in vein graft by immunohistochemical staining (400×)



* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与B组相比。

* $P < 0.05$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with B group.

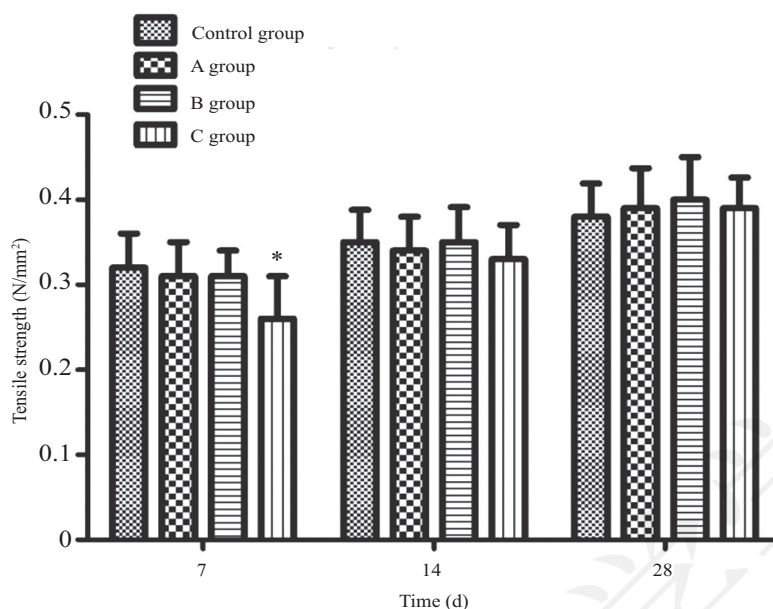
图4 qRT-PCR检测移植静脉的EGFP mRNA水平

Fig.4 EGFP mRNA levels in vein graft by qRT-PCR

的腺病毒转染效率。

Poloxamer 407在低温时以液体的形式存在,局部应用后当温度升高时转变成凝胶凝结,形成具有良好的黏附性和缓释性能的温敏性凝胶^[3-4]。由于其良好的生物稳定性和安全性、组织相容性好,且易获得,在温敏性凝胶领域研究和应用最为广泛。March等^[5]首次报道,应用Poloxamer 407可有效提高腺病毒载体转染VSMC(vascular smooth muscle cells)的效率约10倍。Feldman等^[6]通过颈动脉球囊损伤大

鼠模型实验进一步验证,含有腺病毒液的Poloxamer 407凝胶包裹在血管组织周围,能够持续地释放腺病毒,增加术后血管组织与腺病毒的接触时间,从而提高基因转染效率。血管外膜组织致密,而影响携带目的基因的病毒载体通过血管外膜到达血管组织内部,从而大大影响基因转染效率,这也是目前制约血管组织局部基因治疗研究的主要难题。因此,我们应用一定浓度的胰蛋白酶在不影响静脉组织结构的前提下可以显著提高血管组织的通透性,有利于病



* $P=0.018$, 与对照组相比。

* $P=0.018$, compared with control group.

图5 静脉移植术后移植静脉抗拉力检测

Fig.5 Tensile strength test of vein graft

毒载体通过血管外膜进入血管组织提高转染效率。Poloxamer 407-胰蛋白酶混合凝胶有效增加腺病毒载体与血管组织的接触时间,从而更进一步提高转染效率。

腺病毒是目前用于防治移植静脉再狭窄基因治疗研究中最常用病毒载体之一。Wan等^[7]在小型猪模型通过腺病毒介导转染p53基因,可有效抑制内膜增生从而防止术后静脉狭窄,增加术后桥血管的内径。研究表明,通过腺病毒介导NOS基因转染,可有效抑制桥血管的重塑和血管表型转化,改善内皮细胞的功能和减少VSMC所致的内膜增生,NOS其他亚型的基因治疗亦可有效地防治桥血管内膜增生^[8-10]。Zhou等^[11]通过腺病毒转染Jagged1基因增加平滑肌球蛋白重链蛋白的表达,减弱VSMC由静止型向增值型转化,从而防止移植静脉术后狭窄的发生。Xiang等^[12]通过腺病毒诱导移植静脉过表达SOCS3蛋白表达,可抑制JAK2/STAT3信号通路激活,下调炎症细胞因子的表达水平,减轻炎症反应,抑制VSMC增殖和内膜增生。根据本研究结果,Poloxamer 407-胰蛋白酶混合凝胶局部转染系统,其中0.25%的胰蛋白酶转染效率最佳,且并不影响静脉血管组织的生物学特性,为以腺病毒为载体用于移植静脉术后再狭窄的基因治疗研究提供了重要的方

法学内容。

参考文献 (Reference)

- 1 Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, *et al.* A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc* 2007; 2(5): 1236-47.
- 2 Wang XW, He XJ, Lee KC, Huang C, Hu JB, Zhou R, *et al.* MicroRNA-221 sponge therapy attenuates neointimal hyperplasia and improves blood flows in vein grafts. *Int J Cardiol* 2016; 208: 79-86.
- 3 Feldman LJ, Pastore CJ, Aubailly N, Kearney M, Chen D, Perricaudet M, *et al.* Improved efficiency of arterial gene transfer by use of poloxamer 407 as a vehicle for adenoviral vectors. *Gene Ther* 1997; 4(3): 189-98.
- 4 Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release* 2002; 82(2/3): 189-212.
- 5 March KL, Madison JE, Trapnell BC. Pharmacokinetics of adenoviral vector-mediated gene delivery to vascular smooth muscle cells: modulation by poloxamer 407 and implications for cardiovascular gene therapy. *Hum Gene Ther* 1995; 6(1): 41-53.
- 6 Fromes Y, Salmon A, Wang X, Collin H, Rouche A, Hagege A, *et al.* Gene delivery to the myocardium by intrapericardial injection. *Gene Ther* 1999; 6(4): 683-8.
- 7 Wan S, George SJ, Nicklin SA, Yim AP, Baker AH. Overexpression of p53 increases lumen size and blocks neointima formation in porcine interposition vein grafts. *Mol Ther* 2004; 9(5): 689-98.
- 8 West NE, Qian H, Guzik TJ, Black E, Cai S, George SE, *et al.* Nitric oxide synthase (nNOS) gene transfer modifies venous bypass graft remodeling: effects on vascular smooth muscle cell differentiation and superoxide production. *Circulation* 2001;

- 104(13): 1526-32.
- 9 Cooney R, Hynes SO, Sharif F, Howard L, O'Brien T. Effect of gene delivery of NOS isoforms on intimal hyperplasia and endothelial regeneration after balloon injury. *Gene Ther* 2007; 14(5): 396-404.
- 10 陶登顺, 张仁福, 王辉山, 汪曾炜, 朱洪玉, 谭丽丽, 等. 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. 第四军医大学学报(Tao Dengshun, Zhang Renfu, Wang Huishan, Wang Zengwei, Zhu Hongyu, Tan Lili, *et al.* Expression of trans-
- fect endothelial nitric oxide synthase transfer on carotid vein graft in rabbits. *J Fourth Mil Univ*) 2005; 26: 591-3.
- 11 Zhou X, Xiao Y, Mao Z, Huang J, Geng Q, Wang W, *et al.* Soluble Jagged-1 inhibits restenosis of vein graft by attenuating Notch signaling. *Microvasc Res* 2015; 100: 9-16.
- 12 Xiang S, Liu J, Dong N, Shi J, Xiao Y, Wang Y, *et al.* Suppressor of cytokine signaling 3 is a negative regulator for neointimal hyperplasia of vein graft stenosis. *J Vasc Res* 2014; 51(2): 132-43.