

·实验研究 Experiment research·

CT 导引下肝细胞生长因子基因治疗脑缺血的实验研究

张晓波, 金征宇, 李明利, 王任直, 李桂林, 孔燕国, 王建明, 高山,
关鸿志, 王德田, 罗玉凤

【摘要】 目的 探讨 CT 导引下肝细胞生长因子(HGF)基因治疗脑缺血的可行性。**方法** 采用基因重组技术构建携带 HGF 基因的真核表达质粒,通过脂质体介导法,在 CT 灌注扫描图像定位下将其多点注射到大鼠急性脑梗死模型的缺血半暗带区域;转染 7 d 后断颈取脑,切片观察 HGF 基因于大鼠脑内的表达情况及其生物学效应。**结果** 酶切鉴定及基因测序证实,HGF 基因片段已克隆到 pIRES₂-EGFP 的 BamH I 和 Sal I 位点之间。HGF 基因转染大鼠缺血半暗带区 7 d 后免疫组化方法证实实验组大鼠转染局部已有 HGF 表达,血管数量明显多于对照组($P < 0.01$);CT 灌注显示其梗死侧半球的脑血流量高于对照组($P < 0.01$);TTC 染色显示实验组大鼠脑梗死体积小于对照组($P < 0.01$)。**结论** 脂质体转染 HGF 基因能够在缺血半暗带区表达,其表达产物能够发挥生物学效应并促进局部侧支循环形成,从而改善脑缺血。

【关键词】 肝细胞生长因子;脑缺血;基因治疗

中图分类号:R743.3 文献标识码:A 文章编号:1008-794X(2006)-10-0615-05

The experimental study of CT-guided hepatocyte growth factor gene therapy for cerebral ischemic diseases ZHANG Xiao-bo, JIN Zheng-yu, LI Ming-li, WANG Ren-zhi, LI Gui-lin, KONG Yan-guo, WANG Jian-min, GAO Shan, GUAN Hong-zhi, WANG De-tian, LUO Yu-feng. Department of Radiology, Peking Union Hospital, China Union Medical University, China Medical Science Academy, Beijing 100730, China

【Abstract】 Objectives To investigate the feasibility of CT guided hepatocyte growth factor(HGF)gene therapy for cerebral ischemic diseases. **Methods** Human HGF cDNA was ligated to pIRES₂-EGFP vector. The recombinant plasmid was transfected into the penumbra tissue with liposome, guided by CT perfusion images. After seven days of transfer with recombinant plasmid, the cut sections of rat brain tissues of the treated and control groups were analyzed including immunohistochemistry, vessel count, cerebral blood flow and infarct volume etc. in order to investigate HGF gene expression and biological effect. **Results** Enzymatic digestion and electrophoresis confirmed that HGF fragments had been correctly cloned into the space between the BamH I and Sal I sites of pIRES₂-EGFP. After 7 days of HGF gene transfection, expression of HGF in transfected neurocytes of treated group was observed with immunohistochemistry. The number of vessels in penumbra tissues transfected with HGF vectors and the CBF measured by perfusion CT all were significantly increased than those of the controls($P < 0.01$). Simultaneously there was a significant reduction in the ratio of infarct volume as compared with the control group ($P < 0.01$). **Conclusions** Liposome/pIRES₂-EGFP-HGF complexes can transfect the penumbra tissues and definitely express HGF protein. The HGF gene products can stimulate angiogenesis, promote collateral circulation formation and reduce infarct volume *in vivo* and therefore is beneficial to the treatment of cerebral ischemia. (J Intervent Radiol, 2006, 15: 615-619)

【Key words】 Hepatocyte growth factor; Cerebral ischemia; Gene therapy

作者单位:100730 北京 中国医学科学院 中国协和医科大学
北京协和医院放射科(张晓波、金征宇、李明利);神经外科(王任直、李桂林、孔燕国);神经内科(王建明、高山、关鸿志);病理科(王德田、罗玉凤)

通讯作者:金征宇

研究表明,外周及心肌缺血的动物模型中应用血管生长因子可刺激血管生长,促进侧支循环形成,此现象被称为治疗性血管生成,也有人将其称为分子搭桥术^[1-4];最近,还有将血管生长因子基因用于治疗严重下肢缺血或心肌梗死的临床报道^[5,6]。因此,应用血

管生成因子促血管生成,已被认为是治疗缺血患者的新策略。

肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是一种间质来源的促有丝分裂剂,也能刺激细胞迁移、分化及内皮细胞的管状形成,故可作为治疗缺血性脑血管病的一种选择。已有报道 HGF 对脑缺血具有较好的治疗效果,持续向脑内灌注重组 HGF 能够使脑梗死体积减小^[7];但 HGF 价格昂贵,体内半衰期短,需要反复大量使用,因而限制了其临床应用。本项采用介入治疗技术与基因治疗相结合的急性脑卒中大鼠实验研究,旨在探讨 CT 灌注图像定位引导下,向缺血半暗带区转染 HGF 基因并通过其表达引起相应区域的新生血管增加,从而改善低灌注状态和减小脑梗死体积,以证实治疗脑缺血的可行性。

1 材料和方法

1.1 质粒构建

采用基因重组技术构建 PIREs₂-EGFP-HGF 质粒。HGF cDNA 全长为 2.2 kb,载体质粒 PIREs₂-EGFP 以 CMV 为启动子。

1.2 可控性急性大鼠脑卒中模型制作及实验分组

选用协和医科大学实验动物中心饲养的健康成年雄性 SD 大鼠,体重 300 ~ 350 g,线栓法制作急性大鼠脑卒中模型。实验大鼠分为 2 组:注射脂质体 PIREs₂-EGFP-HGF 质粒组和注射脂质体 PIREs₂-EGFP 空载质粒组。

1.3 多排螺旋 CT 灌注扫描

模型制作成功后 2 h,将大鼠仰卧于平板上并固定头部,消毒后剪开右后肢皮肤暴露股静脉,用眼科剪剪一“V”字形切口,插入 24 G 套管针,接高压注射器。采用西门子 16 层螺旋 CT,先以 1.5 cm 的层厚平扫确定扫描层面,然后以 0.75 mm 准直进行同层动态扫描 30 s。扫描参数为:80 kV,100 mA,球管旋转一圈 0.75 s,矩阵 512 × 512,FOV 5 cm;在动态扫描的同时,团注 1 ml (300 mg/ml) 优维显,注射速度 1 ml/s。继而将原始数据重建成 1.5 mm 层厚的图像 6 层(kernel 值 10),共 9 mm。再经 CT 灌注软件处理后,获得以脑血流量(cerebral blood flow, CBF)、脑血容积(cerebral blood volume, CBV)和达峰时间(time to peak, TTP)为参数的图像。保留原始数据用于测量栓塞侧脑血流量 (CBF)(以栓塞侧与健侧的比值表示)。

1.4 基因导入

在灌注 CT 图像定位下选取 3 点作为进针点。先正中剪开大鼠头部皮肤,刮开骨膜,使用牙科钻在选取的点上钻取小孔,按照已测量的进针深度,用微量注射器向实验组大鼠脑内缓慢注射 Lipofectamine™2000/PIRES₂-EGFP-HGF 质粒混合物(每孔注射 20 μl,脂质体与质粒按 2 μl 脂质体:1 μg 质粒的比例进行混合),向对照组大鼠脑内缓慢注射 Lipofectamine™2000/PIRES₂-EGFP 的混合物(剂量和混合比例同实验组);基因注射完成后,缝合切口,精心饲养。

1.5 大鼠脑血流量的变化

大鼠术后 7 d,于麻醉状态下进行脑灌注 CT 扫描,测量栓塞侧脑血流量(CBF)(结果以栓塞侧与健侧的比值表示)。扫描方法及参数同前。每组 $n = 7$ 。

1.6 HGF 表达的免疫组化染色

大鼠术后 7 d,开胸暴露心脏,经左心室灌注 4%多聚甲醛固定后取脑,标本再放置于 4%多聚甲醛中作外固定,以 10%蔗糖浸泡 24 h 后行 OCT 包埋后于恒冷切片机上行冠状位切片,厚 10 μm,然后按免疫组化试剂盒说明书行免疫组化染色。HGF 多克隆抗体购自 R&D 公司,免疫组化检测试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。每组 $n = 3$ 。

1.7 脑血管染色

大鼠术后 7 d 行脑灌注 CT 扫描完成后,开胸暴露心脏,经左心室灌注 4%多聚甲醛固定后取脑,标本再放置于 4%多聚甲醛中作外固定,以 10%蔗糖浸泡 24 h 后行 OCT 包埋后于恒冷切片机上行冠状位切片,厚 10 μm,然后采用 Santa Cruz 公司的兔抗人 VIII 因子相关抗原多克隆抗体进行免疫组化染色;镜下观察,于每只大鼠随机选取 5 个缺血半暗带区,高倍视野(40 ×)计数血管数。每组 $n = 7$ 。

1.8 脑梗死范围的测定

各组大鼠在梗死后 24 h 断颈取脑,除掉额极后行冠状切割成 6 片,每片厚 1.5 mm(与 CT 灌注扫描一致);然后置于 2%红四氮唑(TTC)溶液中,并在 37℃避光条件下孵育 30 min,缺血坏死组织呈苍白色,存活组织显示为深红色,继将染色后的脑切片放入 10%甲醛溶液中固定;之后采用数码相机照相并应用影像软件(DICOMWORKS1.3.5)计算每一脑切片的梗死面积,再乘以其厚度(1.5 mm)即得到每一脑切片的梗死体积;各个脑切片梗死体积相加,即可获得全脑梗死体积。结果以梗死体积与全脑体积的百分比表示。每组 $n = 7$ 。

1.9 统计学方法

各组数据均以平均值 ± 标准差表示,应用 SPSS 软件包进行独立样本 *t* 检验比较组间差异,*P* < 0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 HGF 蛋白表达的免疫组化染色结果

免疫组化结果显示:于转染 Lipofectamine™2000/PIRES₂-EGFP-HGF 的实验组大鼠的缺血半暗带可见许多含黄褐色颗粒的阳性细胞,而于梗死核心区及健侧大脑未见此阳性细胞。于转移 Lipofectamine™2000/PIRES₂-EGFP 的对照组,大鼠脑组织中未见阳性细胞存在(图 1)。

2.2 缺血半暗带区血管数量变化

对大鼠脑切片应用兔抗人Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体进行免疫组化染色,显示毛细血管内皮细胞呈深褐色。显微镜下每只大鼠随机选取 5 个半暗带区,于高倍视野下计数血管总数,发现实验组大鼠半暗带区的毛细血管密度明显高于对照组:PIRES₂-EGFP-HGF 组平均每只大鼠的血管数为 (46.71 ± 7.11)条,PIRES₂-EGFP 组为(20.43 ± 3.21)条,*P* < 0.01,详见表 1 和图 2。

2.3 大鼠脑血流量的变化情况

表 1 转基因 7 d 后缺血半暗带区血管密度
(单位:条/5 个高倍视野)

组别	动物序号							$\bar{x} \pm s$	<i>P</i> 值
	1	2	3	4	5	6	7		
PIRES ₂ -EGFP-HGF 组	51	42	53	39	48	56	38	46.71 ± 7.11	<0.01
PIRES ₂ -EGFP 组	21	18	23	25	16	18	22	20.43 ± 3.21	

转基因前及转基因后 7 d CT 灌注扫描脑血流量变化的比较发现:两组大鼠间于转基因前梗死侧 CBF 无明显差异,PIRES₂-EGFP-HGF 组为 (48.73 ± 5.07)%,PIRES₂-EGFP 组为 (48.70 ± 3.70)%,*P* > 0.05;而转基因 7 d 后,注射 PIREs₂-EGFP-HGF 组为 (63.82 ± 6.08)%,PIRES₂-EGFP 组为 (53.58 ± 4.19)%,*P* < 0.01,详见表 2 和图 3。

2.4 脑梗死体积比较

表 2 转基因前及转基因 7 d 后两组大鼠脑血流量比较(%)

动物序号	PIRES ₂ -EGFP-HGF 组		PIRES ₂ -EGFP 组	
	转染前	转染后	转染前	转染后
1	51.12	67.12	43.86	53.43
2	45.98	61.45	48.53	48.68
3	50.20	68.78	45.87	51.62
4	49.78	61.30	50.41	57.50
5	47.12	64.52	49.62	52.36
6	56.65	70.87	47.24	50.66
7	40.24	52.69	55.36	60.78
$\bar{x} \pm s$	48.73 ± 5.07	63.82 ± 6.08	48.70 ± 3.69	53.58 ± 4.19

转染前两组大鼠间缺血侧脑血流量无明显差异(*P* > 0.05),转染后实验组大鼠脑血流量增加较对照组明显(*P* < 0.01)。

TTC 染色结果显示:转移 PIREs₂-EGFP-HGF 质粒组的大鼠脑梗死体积 (22.02 ± 1.83%) 明显小于转移 PIREs₂-EGFP 空载质粒组大鼠脑梗死体积 (26.78 ± 2.42%),*P* < 0.01,详见表 3 和图 4。

3 讨论

通常情况下,成熟组织中血管的发育处于相对

表 3 TTC 染色后两组大鼠脑梗死体积(%)

组别	动物序号							$\bar{x} \pm s$	<i>P</i> 值
	1	2	3	4	5	6	7		
PIRES ₂ -EGFP-HGF 组	20.45	21.21	19.54	22.67	23.68	24.79	21.83	22.02 ± 1.83	<0.01
PIRES ₂ -EGFP 组	26.56	24.45	23.87	29.78	26.95	25.74	30.12	26.78 ± 2.42	

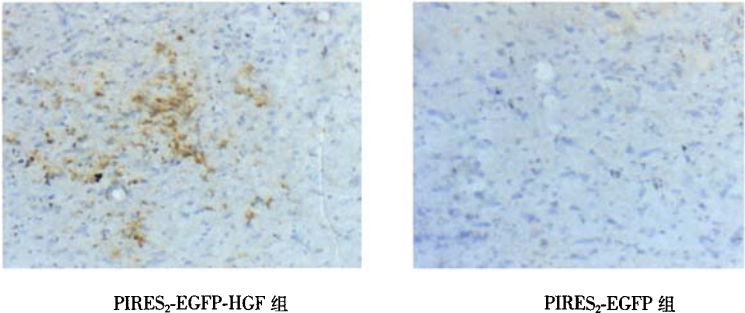


图 1 转基因 7 d 后免疫组化法鉴定 HGF 基因于大鼠脑内的表达(40 ×)

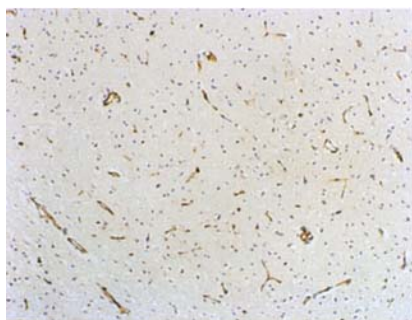
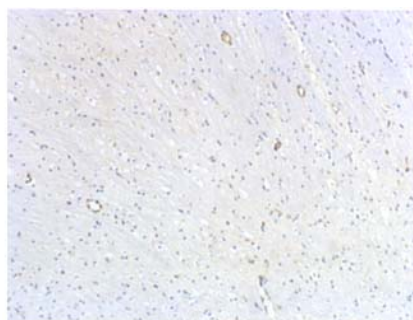
PIRES₂-EGFP-HGF 组PIRES₂-EGFP 组

图 2 大鼠脑转基因 7 d 后缺血半暗带区血管数量变化(被染成深褐色的细胞为血管内皮细胞)(40 ×)

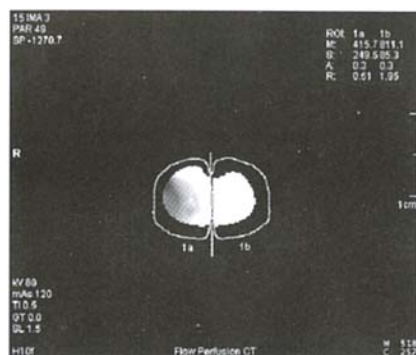


图 3 A 灌注 CT 扫描测量 CBF 示意图

静止的状态,但在低氧或某些病理状态下(如缺血状态),以激活血管内皮细胞生长为基础的血管新生即见恢复。由于血液供应不足引起的组织氧浓度降低,通常会导致血管新生以满足局部组织的氧需求。在中枢神经系统,曾有报道于脑缺血发作后很快就会诱导 HGF 基因表达,而持续向脑内灌注重组 HGF 能够使脑梗死体积减小^[7,8]。缺血性脑卒中时引起的血管生成,尤其在缺血半暗带区的血管新生,能够使脑卒中患者得以长期存活^[9];因此,血管生成在脑缺血的恢复和防止脑卒中方面将发挥重要作用。

在刺激血管生成方面,文献报道较多的是血管内皮生长因子(VEGF);但有人认为 VEGF 对血脑屏障具有明显的通透作用,能加重脑缺血症状或引起脑出血,故应慎用。于缺血性脑血管病的治疗^[10]。近期的研究表明 HGF 除具有很强的血管生成作用外,还具有神经营养活性以及对脑损伤的直接保护作用,且 HGF 在脑内不会引起脑水肿和血脑脊液屏障通透性增加,所以,HGF 更适用于缺血性脑血管病的治疗^[11,12]。重组 HGF 能发挥刺激血管生成和神经保护作用,但由于其制作复杂、价格昂贵和半衰期短,而不具备临床应用的可行性。以 HGF 基因取代之,即能克服 HGF 上述局限性。体外实验证



图 4 转基因 7 d 后治疗组与对照组间脑梗死体积的比较(连续冠状切片,白色部分表示梗死区域)

实,Lipofectamine™2000 介导的 PIRES₂-EGFP-HGF 真核表达质粒转染原代培养的大鼠神经细胞,能够表达出具有生物学活性的 HGF。

目前,在脑血管病的基因治疗研究中,基因的转运途径主要包括脑血管、脑脊液和脑实质。经脑血管的基因转运从理论上讲是使基因均匀分布于病变区域的最佳途径,但对于急性脑梗死患者,血管已完全闭塞,不可能通过血管途径进行基因转运。此外,由于血脑屏障的存在和目的基因在局部血管内不能长时间停留,使得基因转染效率较低;所以,就目前研究状况看,血管途径不尽适用于急性脑卒中基因治疗。曾有文献报道,经侧脑室途径或小脑延髓池途径注射外源基因,可于侧脑室周围、脉络丛、脑表面等部位观察到目的基因的表达,并于脑脊液中检测到目的基因的表达产物^[13,14]。然而,这些目的基因的表达产物却很难到达所需的治

疗部位——缺血半暗带区域;因此,其对脑缺血的治疗作用将不能得到充分发挥。另外,由于注入脑脊液中的外源基因将随着脑脊液循环到达健侧大脑半球和脊髓,从而导致外源基因在非目的区域广泛高效地表达,这无疑会增加基因治疗的不安全性。本实验采用 CT 灌注图像导引立体定向法,向缺血半暗带直接注射外源基因,增强了目的基因的靶向性和安全性。

在脑血管病基因治疗研究中,载体选择也是一个争论的焦点。可供选择的载体一般分为病毒载体和非病毒载体,其中病毒载体因其转染效率高而备受一些学者的青睐;但病毒载体同样存在制备复杂、免疫原性高、毒性大和目的基因容量小等缺点,尤其在中枢神经系统应用中,病毒载体的免疫原性和毒性所引起的不良反应不容忽视。本研究采用阳离子脂质体与质粒混合直接注射入缺血半暗带区域,既简便又安全,克服了病毒载体的缺点。

本研究结果证实 HGF 基因能够在大鼠缺血半暗带区表达,并起到促进缺血脑组织新血管形成、改善脑组织低灌注状态和降低脑缺血损伤的作用,为缺血性脑血管病的治疗提供了又一实验基础。相信随着基因导入途径以及基因转染载体等的不断改进,这项技术会给治疗脑缺血提供更大的帮助。

【参 考 文 献】

- [1] Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs[J]. *Circulation*, 1994, 89: 2183 - 2189.
- [2] Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model[J]. *J Clin Invest*, 1994, 93: 662 - 670.
- [3] Leberer C, von Degenfeld G, Karl A, et al. Therapeutic angiogenesis/arteriogenesis in the chronic ischemic rabbit hindlimb: effect of venous basic fibroblast growth factor retroinfusion [J]. *Endothelium*, 2003, 10: 257 - 265.
- [4] Aviles RJ, Annex BH, Lederman RJ. Testing clinical therapeutic angiogenesis using basic fibroblast growth factor (FGF-2)[J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 140: 637 - 646.
- [5] Rajagopalan S, Mohler ER 3rd, Lederman RJ, et al. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor in 121 patients with disabling intermittent claudication[J]. *Circulation*, 2003, 108: 1933 - 1938.
- [6] Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, et al. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT)[J]. *Circulation*, 2003, 107: 2677 - 2683.
- [7] Tsuzuki N, Miyazawa T, Matsumoto K, et al. Hepatocyte growth factor reduces the infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats[J]. *Neurol Res*, 2001, 23: 417 - 424.
- [8] Hayashi T, Abe K, Sakurai M, et al. Inductions of hepatocyte growth factor and its activator in rat brain with permanent middle cerebral artery occlusion[J]. *Brain Res*, 1998, 799: 311 - 316.
- [9] Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, et al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke[J]. *Stroke*, 1994, 25: 1794 - 1798.
- [10] Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain[J]. *J Clin Invest*, 2000, 106: 829 - 838.
- [11] Okura Y, Arimoto H, Tanuma N, et al. Analysis of neurotrophic effects of hepatocyte growth factor in the adult hypoglossal nerve axotomy model[J]. *Eur J Neurosci*, 1999, 11: 4139 - 4144.
- [12] Shimamura M, Sato N, Oshima K, et al. Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model[J]. *Circulation*, 2004, 109: 424 - 431.
- [13] Yamada K, Moriguchi A, Morishita R, et al. Efficient oligonucleotide delivery using the HVJ-liposome method in the central nervous system[J]. *Am J Physiol*, 1996, 271: 1212 - 1220.
- [14] Hayashi K, Morishita R, Nakagami H, et al. Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor: in vivo gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons [J]. *Gene Ther*, 2001, 8: 1167 - 1173.

(收稿日期:2006-04-05)