

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.06.012

载紫杉醇脂质体微泡联合低频超声 干预低龄兔血管结构重建对肝肾功能的影响

郭 军¹, 余更生¹, 计晓娟¹, 白永虹¹, 杨汝铃¹, 王 宇²

(1. 重庆医科大学附属儿童医院心脏中心, 儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014; 2. 重庆医科大学药学院药物化学教研室, 重庆 400014)

【摘要】目的: 评价载紫杉醇脂质体微泡(Paclitaxel-carrying liposome microbubbles, PLM)联合低频超声干预低龄兔血管结构重建对肝肾功能的影响。方法: 新西兰大白兔 24 只, 日龄(60±15) d, 随机平均分为正常组、手术组及干预组, 经球囊扩张术建立髂动脉狭窄模型, 术后 3 周采用 PLM 联合低频超声对狭窄段血管进行处理, 处理后 1 周观察其髂动脉血管管腔面积及内-中膜面积变化情况, 并对肝功能及肾功能进行检测。结果: 与正常组相比, 手术组髂动脉内-中膜增厚, 细胞排列紊乱, 狭窄率高达(80.22±6.7)%, 与正常组相比具有显著差异性($P<0.05$); 干预组髂动脉部分内膜增厚, 中膜细胞排列整齐, 狭窄率为(16.17±10.45)%, 与手术组及正常组相比均具有显著差异($P<0.05$); 各组肝功能及肾功能检测比较均未见统计学差异($P>0.05$)。结论: PLM 联合低频超声对低龄兔血管狭窄具有一定干预作用, 同时对其肝功能及肾功能无影响。

【关键词】紫杉醇; 血管结构重建; 新西兰大白兔幼兔; 肝肾功能

【中国图书分类法分类号】R725.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-02-16

Effects of vascular reconstruction by Paclitaxel-carrying liposome microbubbles combined with low-frequency ultrasound on the liver and kidney function in young rabbits

GUO Jun¹, YU Gengsheng¹, JI Xiaojuan¹, BAI Yonghong¹, YANG Ruling¹, WANG Yu²

(1. Department of Cardiology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University, Key Laboratory of Child Development and Disorders Co-founded by Provincial Government and Ministry of Education Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders; 2. Department of Pharmacochimistry, College of Pharmacy, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To evaluate the effects of vascular reconstruction by Paclitaxel-carrying liposome microbubbles (PLM) combined with low-frequency ultrasound on the liver and kidney function in young rabbits. **Methods:** Twenty-four young New Zealand rabbits aged (60±15) d were randomly divided into normal group, operation group and intervention group. The iliac artery stenosis model was established by balloon dilatation and the intervention model by PLM combined with low-frequency ultrasound at three weeks after the operation. The changes in the lumen area and tunica media-intima area of the iliac artery were measured at one week after the intervention. The liver and kidney function was tested in all groups. **Results:** The tunica media-intima area of the iliac artery was magnified in operation group compared with that in normal group ($P<0.05$), with disarranged cells and stenosis rate of (80.22±6.7)%. Part of the intima of the iliac artery was thickened in intervention group than in normal group and operation group ($P<0.05$), with arranged cells in tunica media and stenosis rate of (16.17±10.45)%. There was no difference in the liver and kidney function among all groups ($P>0.05$). **Conclusion:** PLM combined with low-frequency ultrasound can exert intervention effect on the angiostenosis in young rabbits without influencing the liver and kidney function.

【Key words】Paclitaxel; vascular reconstruction; young New Zealand rabbits; liver and kidney function

紫杉醇 (Paclitaxel, PTX) 在抗肿瘤药物领域已经得到了深入的研究, 在临床上被广泛用于乳腺癌、

肺癌、卵巢癌等的治疗, 因其特殊的作用机制近年来被用于抗血管再狭窄 (Restenosis, RS) 的研究。但是由于其在水中的溶解度极小, 口服无法吸收, 且具有多种毒副作用^[1,2], 而限制了其临床应用。本实验通过改变 PTX 剂型, 在探索其对低龄兔血管结构重建的干预作用的同时, 观察其对低龄兔肝功能及

作者介绍: 郭 军 (1985-), 女, 硕士,
研究方向: 小儿心血管。

通信作者: 计晓娟, 女, 副主任医师, Email: jixiaojuan2003@163.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (编号: 2009BB5267)。

肾功能的影响,为临床防治血管 RS 提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

新西兰大白兔 24 只,日龄(60 ± 15) d,体重(0.7 ± 0.2) kg,雌雄不限,由重庆医科大学实验动物中心提供[许可证号:SCXK(渝)2007-0002]。随机平均分为正常组($n=8$),手术组($n=8$),干预组($n=8$)。普通饲料喂养,由重庆医科大学附属儿童医院动物中心提供,饲养和实验均在普通级动物实验室内进行[许可证号:SYXK(渝)2007-0016]。

1.2 仪器及试剂

重庆海扶(HIFU)技术有限公司提供低频超声治疗仪,美国 Edwards Lifesciences 公司 2F 球囊导管,奥林巴斯 BX-51 光学显微镜,Meta Morph 图像分析系统。自制载紫杉醇脂质体微泡(Paclitaxel-carrying liposome microbubbles,PLM)试剂,平均粒径(772.9 ± 6.2) nm,表面电位(-13.2 ± 0.3) mV,包封率(93.51 ± 4.55)%,浓度 8.6×10^9 个/ml,分布均匀。

1.3 动物建模及干预

手术组及干预组实验兔均采用球囊损伤内皮细胞法^[4],随机损伤一侧髂动脉,清创缝合,术后常规肌注青霉素 8 万 U 连续 3 d 预防感染。至术后 3 周,将干预组实验兔固定于实验台上,经耳缘静脉推注 PLM 约 1 ml/kg,同时将低频超声探头于狭窄段血管对应的体表部位进行辐照,辐照参数:频率 1 MHz,声强 0.5 W/cm²,辐照时间:10 s。

1.4 观察指标

分别于手术前、手术后 3 周及治疗后 1 周,取实验兔静脉血约 2 ml,检测肝功能及肾功能。相应时间段麻醉兔后,立即剖腹行腹主动脉插管,10%多聚甲醛冲洗、固定血管,取手术侧髂动脉,固定,常规脱水,石蜡包埋、切片,行 HE 染色,测量管腔面积及内-中膜厚度。

1.5 统计学方法

统计分析所有结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,实验数据采用方差分析,组间分析采用 LSD 检验,统计处理由 SPSS 17.0 统计软件完成,以 $P < 0.05$ 为结果有统计学意义。

2 结果

2.1 实验各组髂动脉形态学观察

髂动脉 HE 染色结果见图 1~3,正常组血管壁被内弹力纤维板及外弹力纤维板分为内膜层、中膜层及外膜层,内膜面附一层扁椭圆形内皮细胞,中膜层以扁平的血管平滑肌细胞(Vascular smooth muscle cells,VSMC)为主,排列整齐见图 1。手术组可见管腔狭窄,内膜层及中膜层明显增厚,细胞排列紊乱见图 2。干预组管腔不规则,内膜层部分增厚,细胞排列不规则,中膜层细胞排列较规则见图 3。

2.2 髂动脉管腔面积及内-中膜面积变化

病理测量结果见表 1,术后管腔面积明显小于正常组($P < 0.001$),内-中膜面积明显增大($P < 0.001$),管腔狭窄显著,干预后管腔面积较治疗前扩大($P < 0.001$),内-中膜面积减小($P < 0.001$),管腔狭窄率降低($P < 0.001$),但较正常组比较仍有狭窄($P < 0.05$)。

表 1 实验各组髂动脉狭窄段血管腔面积及内-中膜面积变化
Tab.1 Changes in the lumen area and tunica media-intima area of the iliac artery in each group

	管腔面积(μm^2)	内-中膜面积(μm^2)	狭窄率(%)
正常组	$2\,800.33 \pm 158.79$	331.91 ± 39.19	0
手术组	553.25 ± 195.34	$1\,288.63 \pm 82.36$	80.22 ± 6.70
干预组	$2\,337.03 \pm 206.05$	606.52 ± 134.36	16.17 ± 10.45
P1 值	0.000	0.000	0.000
P2 值	0.002	0.001	0.004

注:P1 值,手术组与正常组比较;P2 值,干预组与正常组比较

2.3 实验各组肝功能检测

肝功能各指标检查结果见表 2,手术组肝功能各指标与正常组比较未见明显统计学差异($P > 0.05$),经 PLM 联合低频超声干预后低龄兔肝功能各指标未见明显变化($P > 0.05$)。

2.4 实验各组肾功能检测

肾功能各指标检查结果见表 3,术后 3 周低龄兔肾功能未出现显著异常($P > 0.05$),经 PLM 联合低频超声干预后肾功能各指标未见明显变化($P > 0.05$)。

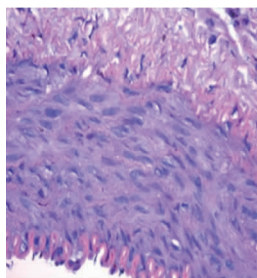


图 1 正常组髂动脉未见内膜增生
(HE,400 $\times$)

Fig.1 Iliac artery in normal group without endometrial hyperplasia
(HE,400 $\times$)

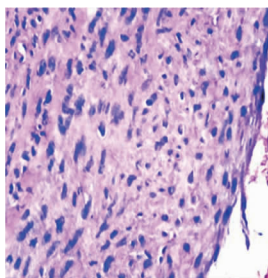


图 2 手术组髂动脉内膜层明显增生
(HE,400 $\times$)

Fig.2 Iliac artery in operation group with evident endometrial hyperplasia
(HE,400 $\times$)

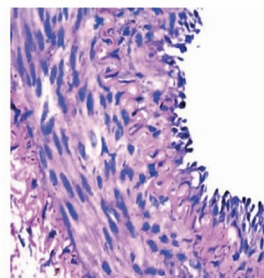


图 3 干预组髂动脉内膜层轻度增生
(HE,400 $\times$)

Fig.3 Iliac artery in intervention group with mild endometrial hyperplasia (HE,400 $\times$)

表 2 实验各组肝功能检测

	总蛋白 (TP) (g/L)	谷丙转氨酶 (ALT) (U/L)	谷草转氨酶 (AST) (U/L)	AST/ALT	碱性磷酸酶 (ALP) (U/L)	谷酰转氨酶 (GGT) (U/L)	乳酸盐脱氢酶 (LDH) (U/L)
正常组	50.94 ± 4.02	11.60 ± 5.59	102.40 ± 90.64	9.63 ± 9.09	116.42 ± 27.47	3.80 ± 2.77	1 165.16 ± 764.84
手术组	45.28 ± 4.84	15.40 ± 3.65	26.00 ± 17.68	1.87 ± 1.40	129.18 ± 28.85	5.00 ± 2.00	419.74 ± 326.97
干预组	48.80 ± 5.15	14.60 ± 3.65	91.80 ± 90.53	6.85 ± 7.21	103.98 ± 27.53	2.40 ± 1.52	769.62 ± 632.86
P1 值	0.081	0.196	0.132	0.061	0.484	0.397	0.075
P2 值	0.485	0.301	0.826	0.524	0.495	0.326	0.320

注: P1 值, 手术组与正常组比较; P2 值, 干预组与正常组比较

表 3 实验各组肾功能检测

	血尿素氮 (BUN) (mmol/L)	肌酐 (CREA) (μmol/L)	血清尿酸 (URCA) (μmol/L)
正常组	18.58 ± 23.88	53.94 ± 30.76	45.02 ± 69.59
手术组	15.63 ± 10.74	63.10 ± 39.77	41.86 ± 36.70
干预组	18.76 ± 16.01	48.16 ± 9.61	32.28 ± 26.94
P1 值	0.176	0.633	0.462
P2 值	0.296	0.762	0.214

注: P1 值, 手术组与正常组比较; P2 值, 干预组与正常组比较

3 讨 论

PTX 是一种新的抗微管药物, 能特异性地结合到小管的 G 位上, 促进微管双聚体装配成微管, 使微管超稳定, 最终使细胞增殖停止在有丝分裂期的 G₂/M 期, 其独特的作用机制和确切疗效, 已成为迄今发现的最具有应用价值的抗癌药之一^[4]。血管 RS 的机制主要认为是内皮损伤导致的以 VSMC 增殖、迁移以及内膜增生为主的血管结构重建^[5], 故调节血管重构是目前干预血管 RS 的研究热点^[6]。由于 PTX 的特殊作用机制, 可以抑制 VSMC 迁移和增生, 在 RS 模型中能明显减轻新生内膜增生^[7]。

目前临床上使用的 PTX 主要是用聚氧乙基蓖麻油和乙醇作溶剂^[8], 全身直接用药在儿童具有毒副作用大、影响生长发育等缺点, 尤其是聚氧乙基蓖麻油具有非常明显的致过敏作用^[9]。也有报道使用载 PTX 支架^[10]或者载 PTX 球囊^[11,12]干预血管结构重建, 但是其均为创伤性治疗, 且对药物的局部释放与监测无法控制, 因而其临床应用受到限制。目前, 国内已可将 PTX 制成脂质体^[13], 并投放临床使用, 相同剂量下, 其疗效与普通 PTX 注射液比较没有显著性差异, 但溶剂相关的毒副作用明显减少。

本研究采用自制 PLM, 其具有形态稳定、体积较小、包封率高等特点, 经低龄兔耳缘静脉给药, 通过体表低频超声辐照产生的空化效应^[14], 使微泡在治疗局部爆破并释放治疗药物, 同时由于空化效应产生的微射流、冲击波等物理机械能^[15]可以使药物

定向进入局部血管组织内发挥药物效应, 提高局部药物浓度。研究结果表明, 经 PLM 联合低频超声干预后, 狭窄段髂动脉管腔面积明显较手术组扩大, 内 - 中膜厚度较手术组减小, 管腔狭窄率明显低于手术组, 表明 PLM 联合低频超声可以有效干预血管结构重建。但是本研究也存在不足之处, 即干预后仍有一定的狭窄率, 一方面可能是由于研究对象为建模 3 周以后的低龄兔, 部分增生的 VSMC 已经分化成熟, 并伴有纤维蛋白增生, 降低了干预效果, 提示早期干预可能效果更为显著, 另一方面可能是由于治疗药物剂量或者超声辐照时间不足所致, 也可能与干预后观察时间较短有关, 需进一步研究明确。

脂质体微泡由于相对浓度较大, 可能聚集于微小血管内部, 甚至阻塞肝、肾微小血管, 从而可能进一步损伤肝、肾功能。本实验采用自制 PLM, 微泡内径为纳米级, 且在常态下形态结构稳定, 经低频超声在局部辐照后破裂并释放药物。通过对各组肝功能及肾功能各指标进行比较, 均未见明显统计学差异, 表明其可以顺利通过肝、肾微小血管, 且对低龄兔肝肾功无明显机械性损伤作用。同时由于局部释放药物, 不仅提高了药物的局部治疗浓度, 也降低了对全身系统的毒副作用, 较传统的单纯使用药物干预具有更好的临床使用价值, 为临床干预血管结构重建提供了新的途径。

参 考 文 献

[1] Mu L, Feng S. A novel controlled release formulation for the anti-cancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS[J]. J Control Release, 2003, 86(1):33-48.

[2] Lundberg B B, Risovic V, Ramaswamy M, et al. A lipophilic paclitaxel derivative incorporated in a lipid emulsion for parenteral administration[J]. J Control Release, 2003, 86(1):93-100.

[3] Takeuchi H, Ohmori K, Kondo I, et al. Potentiation of C-type natriuretic peptide with ultrasound and microbubbles to prevent neointimal formation after vascular injury in rats[J]. Cardiovascular Research, 2003, 58(1):231-238.

[4] Zhang J A, Anyarambhatla G, Ma L, et al. Development and characterization of a novel Cremophor® EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation[J]. Euro J Pharm Biopharm, 2005, 59(1):177-187.

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.06.013

腺相关病毒载体介导 ZsGreen 基因通过 3 种转染途径 在心肌组织转染效果的比较

谭文鹏, 杨侃, 李安莹, 杨琼

(中南大学湘雅三医院心内科, 长沙 410013)

【摘要】目的: 采用腺相关病毒(Adeno-associated virus, AAV)-9 为载体, 比较 3 种转染方法对 ZsGreen 基因在大鼠心肌组织表达的影响。方法: 30 只雄性 SD 大鼠随机分为尾静脉(Tail vein, TV)注射组、心肌(Intramyocardium, IM)注射组、冠脉(Intracoronary, IC)灌注组, 采用相应方法在体转染携带报告基因 ZsGreen 的腺相关病毒-9 型(Adeno-associated virus 9-ZsGreen, AAV9-ZsGreen)。2 周后荧光显微镜下观察绿色荧光在大鼠 IM 组织的表达情况。结果: TV 组 IM 有少量绿色荧光分布; IM 组绿色荧光表达主要局限在 IM 注射位点, 注射点周边有少量分布; IC 组大量绿色荧光在 IM 广泛均匀表达。IM 及 IC 组荧光强度均显著高于 TV 组($P < 0.01$), IC 组荧光强度高于 IM 组($P < 0.01$)。结论: IC 灌注法可使 AAV 介导的外源基因在 IM 组织高效、广泛、均匀表达, 优于 TV 注射法及 IM 注射法。

【关键词】转染; 心肌; 腺相关病毒; 基因治疗

【中国图书分类法分类号】Q78; R363

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-01

Comparison on three transfection methods for ZsGreen gene expression mediated by adeno-associated virus in the myocardium of rats

TAN Wenpeng, YANG Kan, LI Anying, YANG Qiong

(Department of Cardiology, the Third Xiangya Hospital, Central South University)

【Abstract】Objective: To compare the effect of three transfection methods on ZsGreen gene expression in rats myocardium mediated

作者介绍: 谭文鹏(1983-), 男, 博士,

研究方向: 心室重构及基因治疗。

通信作者: 杨侃, 男, 教授, Email: yangkan@medmail.com.cn。

by adeno-associated virus 9(AAV9). Methods: Totally 30 male SD rats were divided into tail vein(TV) injection group, intramyocardium(IM) injection group and intracoronary(IC) infusion

[5] Maeng M, Olesen P G, Emmertsen N C, et al. Time course of vascular remodeling, formation of neointima and formation of neoadventitia after angioplasty in a porcine model[J]. Coron Artery Dis, 2001, 12(4): 285-293.

[6] 周晓莉, 雷寒. 罗格列酮对血管球囊损伤后新生内膜增生及 c-Fos 和 p27kip1 表达的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(8): 924-928.

Zhou X L, Lei H. Effects of rosiglitazone on neointimal hyperplasia and the expression of c-Fos and p27 kip1 in rat carotid arteries after balloon injure [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2011, 36(8): 924-928.

[7] Tepe G, Zeller T, Albrecht T, et al. Local delivery of Paclitaxel to inhibit restenosis during angioplasty of the leg[J]. N Engl J Med, 2008, 358(7): 689-699.

[8] 康艳敏, 吴燕, 杨长青, 等. 紫杉醇脂质体的制备及质量考察[J]. 中国药房, 2008, 19(28): 2208-2210.

Kang Y M, Wu Y, Yang C Q, et al. Preparation and quality study of Paclitaxel liposome[J]. China Pharmacy, 2008, 19(28): 2208-2210.

[9] 邓联东, 孙多先, 董岸杰. 紫杉醇注射剂的研究[J]. 药学进展, 2002, 26(3): 152-155.

Deng L D, Sun D X, Dong A J. Advances in the research of injection of anticancer agent Paclitaxel[J]. Progress in Pharmaceutical Science, 2002, 26(3): 152-155.

[10] Tomai F, Reimers B, De L L, et al. Head-to-head comparison of sirolimus- and paclitaxel-eluting stent in the same diabetic patient with multiple coronary artery lesions: a prospective, randomized, multicenter study[J]. Diabetes Care, 2008, 31(1): 15-19.

[11] Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, et al. Two year follow-up after treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter[J]. Clin Res Cardiol, 2008, 97(10): 773-781.

[12] Werk M, Langner S, Reinkensmeier B, et al. Inhibition of restenosis in femoropopliteal arteries: paclitaxel-coated versus uncoated balloon: femoral paclitaxel randomized pilot trial[J]. Circulation, 2008, 118(13): 1358-1365.

[13] 钱思源. 申报细胞毒类抗肿瘤药物脂质体的立题考虑和临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2006, 22(6): 472-474.

Qian S Y. Clinical trial method and point on development plans on the cytotoxic oncology drugs[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2006, 22(6): 472-474.

[14] Fitzgerald P J, Takagi A, Moore M P, et al. Intravascular sonotherapy decreases neointimal hyperplasia after stent implantation in swine[J]. Circulation, 2001, 103(14): 1828-1831.

[15] Hashiya N, Aoki M, Tachibana K, et al. Local delivery of E2F decoy oligodeoxynucleotides using ultrasound with microbubble agent (Optison) inhibits intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 317(2): 508-514.

(责任编辑: 关蕴良)