



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101695587 B

(45) 授权公告日 2012. 08. 29

(21) 申请号 200910197458. X

1-7.

(22) 申请日 2009. 10. 21

CN 101066477 A, 2007. 11. 07, 权利要求

(73) 专利权人 上海中山医疗科技发展公司

1-5.

地址 200032 上海市徐汇区枫林路 186 号

US 2004/0267349 A1, 2004. 12. 30, 权利要求

专利权人 复旦大学附属中山医院

1-47.

CN 101318032 A, 2008. 12. 10, 权利要求

(72) 发明人 葛均波 沈雳 钟伟 杨巍

1-6.

吴轶喆

审查员 柯少剑

(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司

31001

代理人 翁若莹

(51) Int. Cl.

A61L 31/10 (2006. 01)

A61L 31/02 (2006. 01)

A61L 31/16 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101195047 A, 2008. 06. 11, 权利要求

权利要求书 1 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

一种基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法,其特征在于,具体步骤为:第一步:裸支架的预处理;第二步:内皮祖细胞抗体支架的制备;第三步:将 Caspase 基因与平滑肌细胞分化的特异启动子基因片段通过基因重组方式结合后,再与真核表达载体 pEGFPC2 或 pcDNA3. 1 通过基因重组方式结合得到融合基因;第四步:将第三步所得融合基因溶于去离子水溶液得到融合基因浓度为 10-100mg/ml 的溶液,将第二步得到的内皮祖细胞抗体支架置于该溶液中,4℃ 共孵育 120 分钟后取出,在超净台中自然风干 2-6 小时后,4℃ 保存。本发明的优点是具有抗再狭窄和保护内皮修复的双重功能。

CN 101695587 B

1. 一种基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法,其特征在于,具体步骤为:

第一步:将血管内支架在 1wt%氨基硅烷偶联剂乙醇溶液中以频率 53kHz 超声处理 2 小时,依次用 0.1wt%稀盐酸和蒸馏水冲洗后烘干;将 316L 不锈钢支架、镁合金支架或钴镍金属支架置于 0.1wt%壳聚糖的 0.2wt%盐酸水溶液中浸泡 5 分钟后取出,用蒸馏水反复冲洗;再置于 0.1wt%肝素水溶液中浸泡 5 分钟后取出,用去离子水冲洗,重复 3-10 次,在 60°C 烘干;

第二步:在 4°C 冰箱内将第一步处理后的血管内支架浸入 50-100  $\mu$ g/mL CD34 或 CD133 抗体溶液中 12 小时后,用蒸馏水浸泡洗涤 1min,重复洗涤 3 次,自然晾干后,得到内皮祖细胞抗体支架,于 4°C 冰箱保存待用;

第三步:通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 AseI 酶切位点和 3' 端 NheI 酶切位点的平滑肌细胞分化的特异启动子基因片段;通过酶切及酶接反应将 pEGFPc2 或 pcDNA3.1 中的原有启动子 CMV 切除,并在原位酶接上述平滑肌细胞分化的特异启动子基因片段的 5' 端;通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 NheI 酶切位点的 Caspase 基因,通过酶切及酶接反应将上述平滑肌细胞分化的特异启动子基因片段的 3' 端与 Caspase 基因结合得到融合基因;

第四步:将第三步所得融合基因与腺病毒载体 Ad 结合后与阳离子脂质体以体积比 1:1 混合、4°C 孵育 30 分钟后,溶于去离子水溶液得到融合基因浓度为 10-100mg/mL 的溶液,将第二步得到的内皮祖细胞抗体支架置于该溶液中,4°C 共孵育 120 分钟后取出,在超净台中自然风干 2-6 小时后,4°C 保存。

2. 如权利要求 1 所述的基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法,其特征在于,所述第一步中的血管内支架为 316L 不锈钢支架、镁合金支架或钴镍金属支架。

3. 如权利要求 1 所述的基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法,其特征在于,所述第三步中的平滑肌细胞分化的特异启动子为 sm22 $\alpha$ 、Caldesmon、Calponin、desmin、smooth muscle  $\alpha$ -actin、SM-MHC 或 telokin。

4. 如权利要求 1 所述的基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法,其特征在于,所述第三步中的 Caspase 基因为 Caspase-8。

## 一种基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明提供了一种基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法,属于生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 冠心病是危害人类健康最常见、最严重的疾病之一,经皮冠状动脉内成形术(PTCA)和支架植入术已成为冠心病介入治疗的主要手段,然而即便是药物洗脱支架仍不能根本解决术后再狭窄的难题。目前的药物洗脱支架均是通过药物的释放来抑制局部血管的内膜增殖,但同时抑制了血管损伤后的生理愈合进程,减缓了内皮的修复,而内皮的快速愈合是抑制内膜平滑肌细胞增殖的关键。重新审视再狭窄的发生机制,恰恰是目前的治疗手段造成了不同程度的内皮损伤——药物支架抗再狭窄是以内皮损伤或修复延迟为代价的。本研究通过对内皮祖细胞(Endothelial Progenitor Cells, EPCs)的分化特点的研究,探讨其向内皮分化的调控机制以及EPCs捕捉支架的功能化研究,最终通过基因调控手段使EPCs捕捉支架的功能得到优化,最大限度的抑制再狭窄的发生。其意义在于基因水平阐明EPCs的分化机制,并通过基因水平调控其内皮化,寻求抑制平滑肌细胞增殖和加速内皮修复的平衡点,探索具有我国自主知识产权并优越于已有药物支架的生物工程化支架。

[0003] 全球每年实施2百多万例冠脉血管成形术,临床再狭窄病例将超过25万例,其中一半是复发的再狭窄,防治再狭窄是提高疗效的关键。2002年国际上开始应用紫杉醇、雷帕霉素洗脱支架防治再狭窄,疗效显著,但仍然存在5~10%的再狭窄率,且出现内皮覆盖延迟,亚急性血栓形成等并发症,2005年出现的EPCs捕捉支架,旨在通过在支架上固定EPCs特异性抗体来吸附循环中EPCs,并通过其进一步分化为内皮细胞而促进支架的内皮愈合从而防止因内皮愈合延迟而导致的支架内血栓。其功效在动物实验和临床试验中均发现具有一定的促进内皮愈合的作用,但同时有研究报道:该类支架在快速吸附EPCs同时也会非特异性的吸附大量炎症细胞,同时体内的EPCs亦有部分具有平滑肌前体细胞的特性,故这些细胞都可能在支架吸附后向平滑肌细胞分化,从而加重再狭窄,部分研究的结果也证实目前商用的EPCs捕捉支架的再狭窄率高于药物支架甚至也不能完全避免血栓形成的风险。而目前抑制再狭窄通常利用药物如雷帕霉素、紫杉醇等其他细胞“毒性”药物,均有非特异性杀伤细胞作用从而也抑制内皮细胞的增殖导致内皮修复延迟。本发明旨在用EPCs捕获支架的基础上,尽可能少用具有“毒性”的抗增殖药物,而是加用平滑肌细胞分化的特异启动子靶向调控平滑肌细胞的分化和增殖,该基因修饰和调控使捕获支架在吸附更特异的EPCs基础上,靶向阻断其向平滑肌细胞分化潜能,从而减少再狭窄的发生,同时保持内皮细胞的正常分化和增殖,进一步提高EPCs捕获支架的功效。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法,通过基因调控提高支架抗再狭窄的效率并保存其促进内皮修复的功能。

[0005] 为了达到上述目的,本发明的技术方案是提供一种基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法,其特征在于,具体步骤为:

[0006] 第一步:将血管内支架在 1wt%氨基硅烷偶联剂乙醇溶液中以频率 53kHz 超声处理 2 小时,依次用 0.1wt%稀盐酸和蒸馏水冲洗后烘干;将 316L 不锈钢支架、镁合金支架或钴镍金属支架置于 0.1wt%壳聚糖的 0.2wt%盐酸水溶液中浸泡 5 分钟后取出,用蒸馏水反复冲洗;再置于 0.1wt%肝素水溶液中浸泡 5 分钟后取出,用去离子水冲洗,重复 3-10 次,在 60℃烘干;

[0007] 第二步:在 4℃冰箱内将第一步处理后的血管内支架浸入 50-100ug/ml CD34 或 CD133 抗体溶液中 12 小时后,用蒸馏水浸泡洗涤 1min,重复洗涤 3 次,自然晾干后,得到内皮祖细胞抗体支架,于 4℃冰箱保存待用;

[0008] 第三步:通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 AseI 酶切位点和 3' 端 NheI 酶切位点的平滑肌细胞分化的特异启动子基因片段;通过酶切及酶接反应将 pEGFPC2 或 pcDNA3.1 中的原有启动子 CMV 切除,并在原位酶接上述平滑肌细胞分化的特异启动子基因片段的 5' 端;通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 NheI 酶切位点的 Caspase 基因,通过酶切及酶接反应将上述平滑肌细胞分化的特异启动子基因片段的 3' 端与 Caspase 基因结合得到融合基因;

[0009] 第四步:将第三步所得融合基因与腺病毒载体 Ad 结合后与阳离子脂质体以体积比 1:1 混合、4℃孵育 30 分钟后,溶于去离子水溶液得到融合基因浓度为 10-100mg/ml 的溶液,将第二步得到的内皮祖细胞抗体支架置于该溶液中,4℃共孵育 120 分钟后取出,在超净台中自然风干 2-6 小时后,4℃保存。

[0010] 进一步地,所述第一步中的血管内支架为 316L 不锈钢支架、镁合金支架或钴镍金属支架。

[0011] 所述第三步中的平滑肌细胞分化的特异启动子为 sm22 $\alpha$ 、Caldesmon、Calponin $\alpha$ 、smooth muscle  $\alpha$ -actin、SM-MHC 或 telokin。

[0012] 所述第三步中的 Caspase 基因为 Caspase-8。

[0013] 本发明的原理是:本发明在基因水平对平滑肌细胞的增殖进行定向调控,以 caspase 基因族为基础,通过其与平滑肌细胞特异表达的启动子 sm22 $\alpha$  特异结合(sm22 $\alpha$ -caspase-8 等基因),一旦内皮祖细胞有向平滑肌细胞分化的趋势——开始表达平滑肌细胞特异启动子 sm22 $\alpha$ ,即自动进入该启动子的后续表达序列,启动平滑肌细胞的自动凋亡过程,从而抑制支架内平滑肌细胞的过度增殖,达到抑制支架内再狭窄的作用,并最大限度的保护正常内皮细胞的生长。

[0014] 本发明的优点是:

[0015] 1. 从分子水平研究 EPCs 向内皮细胞分化的调控机制,并采用基因调控手段防止 EPCs 向平滑肌细胞分化。

[0016] 2. 从细胞水平,并通过示踪手段研究 EPCs 吸附到捕捉支架后的分化过程,为支架的应用提供理论和实验的依据。

[0017] 3. 设计开发将 EPCs 捕获功能和基因涂层相结合的抗再狭窄支架,其技术核心在通过特异性的启动子激活,适时的开启平滑肌细胞的自身凋亡开关,从而有效的特异性的抑制平滑肌细胞增殖,并保护内皮细胞的正常增殖,使基因涂层支架具有抗再狭窄和保护

内皮修复的双重功能。

### 具体实施方式

[0018] 下面结合实施例来具体说明本发明。

#### [0019] 实施例 1

[0020] 一种基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法,具体步骤为:

[0021] 第一步:将 316L 不锈钢支架在 1wt% 氨基硅烷偶联剂乙醇溶液中以频率 53kHz 超声处理 2 小时,依次用 0.1wt% 稀盐酸和蒸馏水冲洗后烘干;将 316L 不锈钢支架、镁合金支架或钴镍金属支架置于 0.1wt% 壳聚糖的 0.2wt% 盐酸水溶液中浸泡 5 分钟后取出,用蒸馏水反复冲洗;再置于 0.1wt% 肝素水溶液中浸泡 5 分钟后取出,用去离子水冲洗,重复 3-10 次,在 60℃ 烘干;

[0022] 第二步:在 4℃ 冰箱内将第一步处理后的 316L 不锈钢支架浸入 50ug/ml CD34 或 CD133 抗体溶液中 12 小时后,用蒸馏水浸泡洗涤 1min,重复洗涤 3 次,自然晾干后,于 4℃ 冰箱保存待用;

[0023] 第三步:通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 AseI 酶切位点和 3' 端 NheI 酶切位点的平滑肌细胞分化的特异启动子 sm22 $\alpha$  基因片段;通过酶切及酶接反应将 pEGFPC2 或 pcDNA3.1 中的原有启动子 CMV 切除,并在原位酶接上述平滑肌细胞分化的特异启动子 sm22 $\alpha$  基因片段的 5' 端;通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 NheI 酶切位点的 Caspase-8 基因,通过酶切及酶接反应将上述平滑肌细胞分化的特异启动子 sm22 $\alpha$  基因片段的 3' 端与 Caspase-8 基因结合得到融合基因;

[0024] 第四步:将第三步所得融合基因与腺病毒载体 Ad 结合后或与阳离子脂质体以体积比 1:1 混合、4℃ 孵育 30 分钟后,溶于去离子水溶液得到融合基因浓度为 50mg/ml 的溶液,将第二步得到的内皮祖细胞抗体支架置于该溶液中,4℃ 共孵育 120 分钟后取出,在超净台中自然风干 2-6 小时后,4℃ 保存。

#### [0025] 实施例 2

[0026] 一种基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法,具体步骤为:

[0027] 第一步:将镁合金支架在 1wt% 氨基硅烷偶联剂乙醇溶液中以频率 53kHz 超声处理 2 小时,依次用 0.1wt% 稀盐酸和蒸馏水冲洗后烘干;将镁合金支架、镁合金支架或钴镍金属支架置于 0.1wt% 壳聚糖的 0.2wt% 盐酸水溶液中浸泡 5 分钟后取出,用蒸馏水反复冲洗;再置于 0.1wt% 肝素水溶液中浸泡 5 分钟后取出,用去离子水冲洗,重复 3-10 次,在 60℃ 烘干;

[0028] 第二步:在 4℃ 冰箱内将上述处理后的镁合金支架浸入 100ug/ml CD34 或 CD133 抗体溶液中 12 小时后,用蒸馏水浸泡洗涤 1min,重复洗涤 3 次,自然晾干后,于 4℃ 冰箱保存待用;

[0029] 第三步:通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 AseI 酶切位点和 3' 端 NheI 酶切位点的平滑肌细胞分化的特异启动子 Caldesmon 基因片段;通过酶切及酶接反应将 pEGFPC2 或 pcDNA3.1 中的原有启动子 CMV 切除,并在原位酶接上述平滑肌细胞分化的特异启动子 Caldesmon 基因片段的 5' 端;通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 NheI 酶切位点的 Caspase-8 基因,通过酶切及酶接反应将上述平滑肌细胞分化的特异启

动子 Caldesmon 基因片段的 3' 端与 Caspase-8 基因结合得到融合基因；

[0030] 第四步：将第三步所得融合基因与腺病毒载体 Ad 结合后或与阳离子脂质体以体积比 1 : 1 混合、4℃ 孵育 30 分钟后，溶于去离子水溶液得到融合基因浓度为 50mg/ml 的溶液，将第二步得到的内皮祖细胞抗体支架置于该溶液中，4℃ 共孵育 120 分钟后取出，在超净台中自然风干 2-6 小时后，4℃ 保存。

[0031] 实施例 3

[0032] 一种基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法，具体步骤为：

[0033] 第一步：将钴镍金属支架在 1wt% 氨基硅烷偶联剂乙醇溶液中以频率 53kHz 超声处理 2 小时，依次用 0.1wt% 稀盐酸和蒸馏水冲洗后烘干；将钴镍金属支架、镁合金支架或钴镍金属支架置于 0.1wt% 壳聚糖的 0.2wt% 盐酸水溶液中浸泡 5 分钟后取出，用蒸馏水反复冲洗；再置于 0.1wt% 肝素水溶液中浸泡 5 分钟后取出，用去离子水冲洗，重复 3-10 次，在 60℃ 烘干；

[0034] 第二步：在 4℃ 冰箱内将上述处理后的钴镍金属支架浸入 80ug/ml CD34 或 CD133 抗体溶液中 12 小时后，用蒸馏水浸泡洗涤 1min，重复洗涤 3 次，自然晾干后，于 4℃ 冰箱保存待用；

[0035] 第三步：通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 AseI 酶切位点和 3' 端 NheI 酶切位点的平滑肌细胞分化的特异启动子 Calponin $\alpha$  基因片段；通过酶切及酶接反应将 pEGFPC2 或 pcDNA3.1 中的原有启动子 CMV 切除，并在原位酶接上述平滑肌细胞分化的特异启动子 Calponin $\alpha$  基因片段的 5' 端；通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 NheI 酶切位点的 Caspase-8 基因，通过酶切及酶接反应将上述平滑肌细胞分化的特异启动子 Calponin $\alpha$  基因片段的 3' 端与 Caspase-8 基因结合得到融合基因；

[0036] 第四步：将第三步所得融合基因与腺病毒载体 Ad 结合后或与阳离子脂质体以体积比 1 : 1 混合、4℃ 孵育 30 分钟后，溶于去离子水溶液得到融合基因浓度为 50mg/ml 的溶液，将第二步得到的内皮祖细胞抗体支架置于该溶液中，4℃ 共孵育 120 分钟后取出，在超净台中自然风干 2-6 小时后，4℃ 保存。

[0037] 实施例 4

[0038] 一种基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法，具体步骤为：

[0039] 第一步：将钴镍金属支架在 1wt% 氨基硅烷偶联剂乙醇溶液中以频率 53kHz 超声处理 2 小时，依次用 0.1wt% 稀盐酸和蒸馏水冲洗后烘干；将钴镍金属支架、镁合金支架或钴镍金属支架置于 0.1wt% 壳聚糖的 0.2wt% 盐酸水溶液中浸泡 5 分钟后取出，用蒸馏水反复冲洗；再置于 0.1wt% 肝素水溶液中浸泡 5 分钟后取出，用去离子水冲洗，重复 3-10 次，在 60℃ 烘干；

[0040] 第二步：在 4℃ 冰箱内将上述处理后的钴镍金属支架浸入 80ug/ml CD34 或 CD133 抗体溶液中 12 小时后，用蒸馏水浸泡洗涤 1min，重复洗涤 3 次，自然晾干后，于 4℃ 冰箱保存待用；

[0041] 第三步：通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 AseI 酶切位点和 3' 端 NheI 酶切位点的平滑肌细胞分化的特异启动子 Smooth muscle  $\alpha$ -actin 基因片段；通过酶切及酶接反应将 pEGFPC2 或 pcDNA3.1 中的原有启动子 CMV 切除，并在原位酶接上述

平滑肌细胞分化的特异启动子 Smooth muscle  $\alpha$ -actin 基因片段的 5' 端 ;通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 NheI 酶切位点的 Caspase-8 基因,通过酶切及酶接反应将上述平滑肌细胞分化的特异启动子 Smooth muscle  $\alpha$ -actin 基因片段的 3' 端与 Caspase-8 基因结合得到融合基因 ;

[0042] 第四步 :将第三步所得融合基因与腺病毒载体 Ad 结合后或与阳离子脂质体以体积比 1 : 1 混合、4℃ 孵育 30 分钟后,溶于去离子水溶液得到融合基因浓度为 50mg/ml 的溶液,将第二步得到的内皮祖细胞抗体支架置于该溶液中,4℃ 共孵育 120 分钟后取出,在超净台中自然风干 2-6 小时后,4℃ 保存。

[0043] 实施例 5

[0044] 一种基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法,具体步骤为 :

[0045] 第一步 :将钴镍金属支架在 1wt% 氨基硅烷偶联剂乙醇溶液中以频率 53kHz 超声处理 2 小时,依次用 0.1wt% 稀盐酸和蒸馏水冲洗后烘干 ;将钴镍金属支架、镁合金支架或钴镍金属支架置于 0.1wt% 壳聚糖的 0.2wt% 盐酸水溶液中浸泡 5 分钟后取出,用蒸馏水反复冲洗 ;再置于 0.1wt% 肝素水溶液中浸泡 5 分钟后取出,用去离子水冲洗,重复 3-10 次,在 60℃ 烘干 ;

[0046] 第二步 :在 4℃ 冰箱内将上述处理后的钴镍金属支架浸入 80ug/ml CD34 或 CD133 抗体溶液中 12 小时后,用蒸馏水浸泡洗涤 1min,重复洗涤 3 次,自然晾干后,于 4℃ 冰箱保存待用 ;

[0047] 第三步 :通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 AseI 酶切位点和 3' 端 NheI 酶切位点的平滑肌细胞分化的特异启动子 SM-MHC 基因片段 ;通过酶切及酶接反应将 pEGFPC2 或 pcDNA3.1 中的原有启动子 CMV 切除,并在原位酶接上述平滑肌细胞分化的特异启动子 SM-MHC 基因片段的 5' 端 ;通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 NheI 酶切位点的 Caspase-8 基因,通过酶切及酶接反应将上述平滑肌细胞分化的特异启动子 SM-MHC 基因片段的 3' 端与 Caspase-8 基因结合得到融合基因 ;

[0048] 第四步 :将第三步所得融合基因与腺病毒载体 Ad 结合后或与阳离子脂质体以体积比 1 : 1 混合、4℃ 孵育 30 分钟后,溶于去离子水溶液得到融合基因浓度为 100mg/ml 的溶液,将第二步得到的内皮祖细胞抗体支架置于该溶液中,4℃ 共孵育 120 分钟后取出,在超净台中自然风干 2-6 小时后,4℃ 保存。

[0049] 实施例 6

[0050] 一种基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的制备方法,具体步骤为 :

[0051] 第一步 :将钴镍金属支架在 1wt% 氨基硅烷偶联剂乙醇溶液中以频率 53kHz 超声处理 2 小时,依次用 0.1wt% 稀盐酸和蒸馏水冲洗后烘干 ;将钴镍金属支架、镁合金支架或钴镍金属支架置于 0.1wt% 壳聚糖的 0.2wt% 盐酸水溶液中浸泡 5 分钟后取出,用蒸馏水反复冲洗 ;再置于 0.1wt% 肝素水溶液中浸泡 5 分钟后取出,用去离子水冲洗,重复 3-10 次,在 60℃ 烘干 ;

[0052] 第二步 :在 4℃ 冰箱内将上述处理后的钴镍金属支架浸入 80ug/ml CD34 或 CD133 抗体溶液中 12 小时后,用蒸馏水浸泡洗涤 1min,重复洗涤 3 次,自然晾干后,于 4℃ 冰箱保存待用 ;

[0053] 第三步 :通过提取人类基因组后进行 PCR 扩增得到含有 5' 端 AseI 酶切位点和 3'

端NheI酶切位点的平滑肌细胞分化的特异启动子Telokin基因片段;通过酶切及酶接反应将pEGFPC2或pcDNA3.1中的原有启动子CMV切除,并在原位酶接上述平滑肌细胞分化的特异启动子Telokin基因片段的5'端;通过提取人类基因组后进行PCR扩增得到含有5'端NheI酶切位点的Caspase-8基因,通过酶切及酶接反应将上述平滑肌细胞分化的特异启动子Telokin基因片段的3'端与Caspase-8基因结合得到融合基因;

[0054] 第四步:将第三步所得融合基因与腺病毒载体Ad结合后或与阳离子脂质体以体积比1:1混合、4℃孵育30分钟后,溶于去离子水溶液得到融合基因浓度为10mg/ml的溶液,将第二步得到的内皮祖细胞抗体支架置于该溶液中,4℃共孵育120分钟后取出,在超净台中自然风干2-6小时后,4℃保存。

[0055] 实施例1-6中所用氨基硅烷偶联剂为百灵威化学技术有限公司生产的95%,CS号13822-56-5试剂。实施例1-6中第三步中所述提取人类基因组后进行PCR扩增的方法、酶切及酶接反应方法以及将第三步所得融合基因与腺病毒载体Ad结合的方法皆为本领域技术人员公知方法。所述将第三步所得融合基因与腺病毒载体Ad结合的方法为将融合基因构建T-A克隆,酶切亚克隆到穿梭质粒pAdtrack-CMV上,在BJ5183菌内和pAdeasy同源重组,筛选阳性克隆,酶切鉴定,线性化后脂质体法转染HEK293细胞进行包装、扩增,得到含有融合基因的重组腺病毒。

[0056] 本发明所得基因修饰及调控的内皮祖细胞捕获支架的性能如下:

[0057] 1) 基因修饰的EPCs捕获支架对平滑肌细胞增殖的影响(体外研究):将平滑肌细胞培养在培养皿内( $10^6/\text{cm}^2$ ),将实施例1中的支架与平滑肌细胞共培养24,36,48,72小时(37℃、5% CO<sub>2</sub>)。24小时后可检测到转染基因的表达,转染阳性的平滑肌细胞在荧光显微镜下显绿光,转染效率为60-70%,36-72小时通过细胞MTT计数和TUNEL检测,平滑肌细胞逐渐凋亡,至72小时细胞基本全部凋亡。

[0058] 2) 基因修饰捕捉支架与平滑肌细胞及内皮细胞共培养,将平滑肌细胞和内皮细胞(各 $10^6/\text{cm}^2$ )与实施例1)中支架共培养,方法同1),检测两种细胞的目的基因(sm22 $\alpha$ -caspase-8)的表达量。检测平滑肌细胞及内皮细胞的凋亡比例及增殖情况。24小时后可检测到转染基因的表达:平滑肌细胞转染率为50-70%,内皮细胞转染率为5%,说明通过特异基因启动子的调控使基因大多在平滑肌细胞中表达,36-72小时通过细胞MTT计数和TUNEL检测,平滑肌细胞逐渐凋亡,至72小时平滑肌细胞基本全部凋亡。

[0059] 3) 基因修饰的EPC捕捉支架对支架后再狭窄的防治作用(体内研究):

[0060] 动物实验:将基因修饰的EPCs捕捉支架(实例1中),EPCs捕捉支架,药物洗脱支架(雷帕霉素支架,对照支架1),裸支架(对照支架2)分别植入小型猪冠脉,作1天,1周,1月,6月后的病理分析及血管组织行Western蛋白表达。动物实验结果证实该基因安全有效。基因修饰支架在1天的猪血管中有Caspase基因的表达,1周中仍见表达。1月各组分析,基因修饰支架组和EPCs捕捉支架以及裸支架组的内皮基本覆盖完全,但EPCs捕捉支架以及裸支架组出现轻度内膜增生,电镜分析有大量平滑肌细胞增殖而基因修饰支架组未见内膜增生,电镜下见主要为内皮覆盖而未见平滑肌细胞增殖。同时药物支架组电镜提示内皮覆盖不完全,部分见血栓形成。6月随访,基因修饰的EPCs捕捉支架未见支架内再狭窄,内皮覆盖完全,EPCs捕捉支架和裸支架均出现不同程度的再狭窄,而药物洗脱支架组在6月随访中有数例出现支架内血栓而死亡,少数出现6个月内皮仍未完全覆盖。



[0061] 综合各实验结果：基因修饰支架组安全有效，较药物支架具有更强的内皮修复作用，而较 EPCs 捕捉支架以及裸支架比有较强的抑制再狭窄的功能。