文章编号:1000-5404(2006)18-1833-04

论著

不同剂量不同载体不同途径的肝再生增强因子重组质粒抗大鼠肝纤维化疗效比较

李 青,刘殿武,肖永红,刘 辉,何海艳 (河北医科大学公共卫生学院流行病学教研室,石家庄 050017)

提 要:目的 筛选肝再生增强因子重组质粒基因治疗时较优的载体、途径和剂量及三者的最佳组合。**方法** 制备肝纤维化大鼠模型,$L_9(3^3)$正交设计分组,用3种不同的载体(裸基因、脂质体、多聚物)携带不同量(50、100、200 μg/kg)的肝再生增强因子重组质粒,采用3种给药途径(肌肉注射、静脉注射、腹腔注射)对模型大鼠进行干预,通过肝组织病理学、肝纤4项等指标来判断疗效并进行对照。**结果** 剂量因素:200 μg/kg组纤维化半定量计分和肝纤4项综合得分明显低于50 μg/kg组和100 μg/kg组,但50 μg/kg组和100 μg/kg组的结果无显著性差异。载体因素:裸基因组、脂质体组和多聚赖氨酸组3组之间的纤维化半定量计分均无显著性差异。脂质体组和多聚赖氨酸组的肝纤4项综合得分均明显低于裸基因组。途径因素:肌肉注射组、静脉注射组和腹腔注射组3组之间的纤维化半定量计分均无显著性差异。腹腔注射组的肝纤4项综合得分明显高于肌肉注射组和静脉注射组。**结论** 200 μg/kg的肝再生增强因子重组质粒的抗大鼠免疫性肝纤维化的疗效优于100 μg/kg和50 μg/kg;由脂质体携带DNA和由多聚物携带DNA的疗效明显优于裸DNA。肌肉注射和静脉注射的疗效明显优于腹腔注射。由脂质体或多聚物携带、静脉或肌肉注射200 μg/kg的肝再生增强因子重组质粒,能取得较好的抗大鼠免疫性肝纤维化的疗效。

关键词: 肝纤维化;肝再生增强因子;基因治疗;脂质体;多聚赖氨酸;正交设计
中图法分类号: Q78;R575.3 **文献标识码:** A

Comparison of different doses, carriers and introducing routes of augmenter of liver regeneration recombinant plasmids in their anti-fibrosis effects in Wistar rats

LI Qing, LIU Dian-wu, XIAO Yong-hong, LIU Hui, HE Hai-yan (Department of Epidemiology, College of Public Health, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Objective To select an optimal combined set of carrier, introducing route and dose of recombinant plasmid of augmenter of liver regeneration (ALR) for ALR gene therapy. **Methods** A total of 40 Wistar rats received intraperitoneal porcine serum administering to develop the immune hepatic fibrosis, and then were divided into 9 groups with orthogonal design $L_9(3^3)$, each representing one time of test. Hepatic fibrosis rats were given 3 different doses (50, 100, and 200 g/kg) pcDNA3-ALR recombinant plasmids carried by 3 different carriers [naked plasmid, liposomes and glyco-poly-L-lysine (GPLL)] through 3 different introducing routes (intramuscular, intravenous and intraperitoneal injection). The effects were estimated and compared with histopathological changes of liver tissue and 4 fibrosis serum markers, such as hyaluronicacid (HA), precollagen Ⅲ (PCⅢ), collagen Ⅳ (ⅣC), and laminin (LN). **Results** The semiquantitative scoring system (SSS) of liver tissue and the general scoring of 4 fibrosis serum markers were significantly low in 200 g/kg group compared with the other 2 dose groups, but no significantly difference between these 2. No significant difference in the SSS was found among naked gene, liposomes and GPLL group. The general scoring of 4 fibrosis serum markers were lower in liposomes and GPLL group than naked gene group but no significantly difference between liposomes and GPLL group. There was no significantly difference in the SSS among intramusclar,

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(302489)
Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (302489)

作者简介: 李 青(1965-),男,河北省藁城市人,博士,主任医师,主要从事肝纤维化的基因治疗方面的研究,发表论文9篇。电话:(0311)87887103,E-mail:lq65@yahoo.com.cn

通讯作者: 刘殿武,电话:(0311)86265531, E-mail: liudianw@hebmu.edu.cn

收稿日期: 2005-10-13;**修回日期:** 2006-03-28

intravenous and intraperitoneal injection group. The general scoring of 4 fibrosis serum markers was higher in intraperitoneal injection group than in other 2 routes, but no significant difference was seen between the later 2. **Conclusion** The anti-fibrosis effects of 200 g/kg ALR recombinant plasmid are more adaptive than 100 g/kg and 50 g/kg. The liposomes and GPLL are more excellent carrier than naked gene. The intramusclar and intravenous injection are more appropriate gene delivery route than intraperitoneal injection. The optimal combination is a set of 200 μg/kg pcDNA3-ALR recombinant plasmids carried by liposomes or GPLL through intramusclar or intravenous injection.

Key words: hepatic fibrosis; augmenter of liver regeneration; gene therapy; liposomes; glycol-poly-L-Lysine; orthogonal design

目前用于基因转移的载体有病毒载体和非病毒载体,后者包括裸露 DNA、脂质体和多聚物载体等,尽管转移效率较病毒载体低,但由于免疫原性低、安全性高,因而发展非常迅速。另外,DNA 药物可经肌肉、静脉、黏膜、皮内等多种途径给药,那么,哪种载体、何种途径可使基因的转移效率更高?不同的搭配是否产生不同的效果?本实验采用正交设计对实验动物进行分组,用 3 种不同的载体携带不同量的肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)重组质粒,采用 3 种给药途径对免疫性肝纤维化大鼠进行干预,通过重要的判定指标来判断疗效,以筛选较优的载体、途径和剂量,并确定三者的最佳组合。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 ALR 重组质粒 pcDNA3-ALR 由本实验室构建并转化于大肠杆菌 *E. coli.* DH5α 中冻存[1]。

1.1.2 引物 SP6:5′-CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3′;T7:5′-TAATACGACTCACTATAGGGCGA-3′;β-actin(234 bp)上游引物:5′-GGAGAAGATGACCCAGATCA-3′,下游引物:5′-GATCTTCATGAGGTAGTCAG-3′。以上引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.1.3 主要试剂、试剂盒及仪器 Lipofectamine(美国 Invitrogen corporation);Poly-L-lysine(Sigma 公司分装);质粒 DNA 大量提取试剂盒(北京鼎国生物公司);肝纤 4 项放免检测试剂盒(上海海军医学研究所生物技术中心);RT-PCR 酶混合物试剂盒(洛阳华美生物工程公司);凝胶图像分析系统(北京赛智创业科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 提取 试剂盒法大量提取质粒 DNA,方法参照说明。

1.2.2 动物模型制备及分组 健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,体质量 120~150 g,由河北医科大学实验动物中心提供。所有大鼠参照黄志刚等[2]采用猪血清腹腔注射的方法制备免疫性大鼠肝纤维化模型,至注射第 8 周随机处死 4 只大鼠进行肝组织病理学检查证实肝纤维化形成。本实验有 3 个因素,每个因素有 3 个水平,应进行 9 次实验。故将成模的 36 只大鼠根据正交设计 L9(33) 随机分成 9 个组,每个组为 1 次实验,每 1 个实验重复 4 次,即每组 4 只大鼠,并根据分组进行相应的处理。

具体分组为:1 组:腹腔注射(ip)裸(NK)pcDNA3-ALR,100 μg/kg。2 组:腹腔注射(ip)多聚物(PLL)携带的 pcDNA3-ALR,200 μg/kg。3 组:肌肉注射(im)脂质体(LP)携带的 pcDNA3-ALR,200 μg/kg。4 组:静脉注射(iv)裸(NK)pcDNA3-ALR,200 μg/kg。5 组:静脉注射(iv)多聚物(PLL)携带的 pcDNA3-ALR,50 μg/kg。6 组:腹腔注射(ip)脂质体(LP)携带的 pcDNA3-ALR,50 μg/kg。7 组:静脉注射(iv)脂质体(LP)携带的 pcDNA3-ALR,100 μg/kg。8 组:肌肉注射(im)多聚物(PLL)携带的 pcDNA3-ALR,100 μg/kg。9 组:肌肉注射(im)裸(NK)pcDNA3-ALR,50 μg/kg。

1.2.3 注射用 ALR 重组质粒的配制

1.2.3.1 裸 pcDNA3-ALR 注射液 加入 5% 等渗葡萄糖 PBS 溶解质粒 DNA,配置成 1 g/L 浓度备用。

1.2.3.2 脂质体包埋的 pcDNA3-ALR 注射液 参照 Lipofectamine 的说明书,质粒 DNA 与 Lipofectamine 的配比为(μg/μl) 1:0.5~1:5,本实验选择的是 1:0.5。用前将上述质粒 DNA-PBS 液 50 μl(50 μg),加入到 25 μl Lipofectamine 中,静置 30 min,再加入等渗 PBS 液 125 μl,总量 200 μl。

1.2.3.3 多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine)包埋的 pcDNA3-ALR 注射液 根据文献[3],0.3 μg 多聚赖氨酸可以完全携带 1 μg 重组质粒 DNA。取多聚赖氨酸 10 mg,用 PBS 液溶解成 10% 的浓度 1 ml。取 ALR 重组质粒 75 μl(75 μg),加入到 25.2 μl 的 1% 多聚赖氨酸中,静置 30 min,再加入等渗 PBS 液 99.8 μl,总量 200 μl。

1.2.4 肝组织病理学检测 由 3 名病理医师在共览显微镜下按中华肝脏病学会肝纤维化学组制定的慢性肝炎纤维化程度分期标准分期,并按肝纤维化半定量计分系统(SSS)分别计分[4]。

1.2.5 肝纤维化 4 项(HA、LN、PCⅢ、IVC)指标检测 方法参照试剂盒。

1.2.6 RT-PCR 检测肝组织 ALR mRNA 的表达 提取肝组织总 RNA,以 SP6 和 T7 两个特定的序列作引物用 RT-PCR 酶混合物试剂盒直接反转录并进行 PCR 扩增,1.5 % 的琼脂糖凝胶电泳鉴定结果,凝胶图像分析系统测得电泳条带密度值,用 ALR/β-actin 比值表示 ALR 的表达水平。

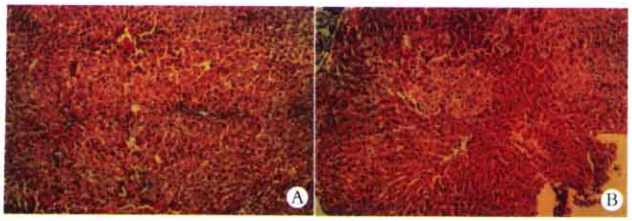
1.3 统计学处理方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnet t 检验。所有数据均利用 SPSS 11.5 软件包分析。

2　结果

2.1　几组大鼠的肝组织病理学变化

各组大鼠经 ALR 处理后，肝组织病理学均有不同程度的改善，可见小叶周边肝细胞再生和胆小管再生。见图 1。

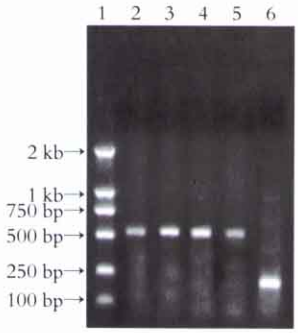


A：第 1 组，肝板结构不清，小叶内肝细胞再生，小叶周边有轻度的纤维间隔形成；B：第 7 组，肝板结构基本存在，肝小叶大片变性坏死，肝细胞再生，部分区域形成肝细胞索，间质淋巴细胞增生。

图 1　大鼠肝组织病理学变化　（HE×400）

2.2　ALR mRNA 在各组大鼠肝组织中的表达

1.5% 琼脂糖凝胶电泳，各组均在约 550 bp 处出现了特异的基因条带。见图 2。



1：标准；2：第 1 组；3：第 3 组；4：第 7 组；5：第 9 组；6：β-actin

图 2　RT-PCR 测定 ALR mRNA 在几组大鼠肝组织中的表达

2.3　剂量因素

200 μg/kg 组 SSS 得分明显低于 50 μg/kg（$P<0.01$）组和 100 μg/kg 组（$P<0.05$），但 50 μg/kg 组和 100 μg/kg 组的结果无显著性差异（$P>0.05$）。肝纤 4 项综合得分（Scoring of four serum fibrosis markers，GSFHF）与 SSS 得分相似，200 μg/kg 组明显低于 50 μg/kg 组和 100 μg/kg 组（$P<0.05$），但 50 μg/kg 组和 100 μg/kg 组的结果无显著性差异（$P>0.05$）。结果见表 1。

表 1　各剂量组的实验结果（$n=12$）

组别	SSS	GSFHF	ALR mRNA/β-actin
50 μg/kg	7.99 ± 6.7[a]	14.50 ± 2.84[a]	0.86 ± 0.08
100 μg/kg	5.93 ± 4.5[b]	14.00 ± 3.91[a]	0.83 ± 0.15[b]
200 μg/kg	1.58 ± 1.7	8.33 ± 2.69	0.97 ± 0.26
F	5.714	17.222	2.909
P	0.008	0.000	0.071

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与 200 μg/kg 组比较

100 μg/kg 组的 ALR mRNA 表达明显低于 200 μg/kg 组（$P<0.05$），但 50 μg/kg 组和 200 μg/kg 组之间、50 μg/kg 组和 100 μg/kg 组之间的 ALR mRNA 表达无显著性差异（$P>0.05$）。结果见表 1。

2.4　载体因素

裸基因组、脂质体组和多聚赖氨酸组 3 组之间及相互之间的 SSS 得分均无显著性差异（$P>0.05$）。脂质体组和多聚赖氨酸组的肝纤 4 项综合得分均明显低于裸基因组（$P<0.01$，$P<0.05$），但脂质体组和多聚赖氨酸组的结果无显著性差异（$P>0.05$）。结果见表 2。

多聚赖氨酸组的 ALR mRNA 表达明显强于裸基因组和脂质体组，但裸基因组和脂质体组的结果无显著性差异（$P>0.05$）。结果见表 2。

表 2　不同载体组的实验结果（$n=12$）

组别	SSS	GSFHF	ALR mRNA/β-actin
NK	3.52 ± 3.0	14.42 ± 4.27	0.88 ± 0.07[c]
LP	5.44 ± 6.0	11.17 ± 3.86[a]	0.83 ± 0.23[c]
PLL	6.52 ± 6.4	11.75 ± 3.52[b]	0.91 ± 0.12
F	1.235	5.253	8.911
P	0.306	0.011	0.001

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与 NK 组比较；c：$P<0.05$，与 PLL 组比较

2.5　途径因素

肌肉注射组、静脉注射组和腹腔注射组 3 组之间及相互之间的 SSS 得分无显著性差异（$P>0.05$）。腹腔注射组的肝纤 4 项综合得分明显高于肌肉注射组和静脉注射组（$P<0.01$，$P<0.05$），但肌肉注射组和静脉注射组的结果无显著性差异（$P>0.05$）。结果见表 3。

肌肉注射组的 ALR mRNA 表达明显强于静脉组和腹腔组，但静脉组和腹腔组的结果无显著性差异（$P>0.05$）。结果见表 3。

表 3　不同途径组的实验结果（$n=12$）

组别	SSS	GSFHF	ALR mRNA/β-actin
im	3.63 ± 4.9	11.25 ± 4.65[a]	0.96 ± 0.22[b]
iv	5.43 ± 5.3	11.75 ± 3.05[b]	0.87 ± 0.14
ip	6.41 ± 5.9	14.33 ± 3.89	0.83 ± 0.17
F	1.067	4.791	2.538
P	0.357	0.016	0.096

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与 ip 组比较

3　讨论

目前临床上尚缺乏统一的抗肝纤维化治疗的疗效判定标准[5]。肝组织病理学检查是判定药物疗效的重要依据[4]，也是肝纤维化诊断的金标准[6,7]。病理学指标除对肝纤维化程度进行分期（Stage）外，我国学者王泰龄等[8]还建立了肝纤维化半定量计分系统（SSS），对说明同一期内纤维化程度的差异方面具有显著优越性，是分期的良好补充。

非创伤性指标分为临床评估指标和生物化学评估指标[4]，后者包括血清标志物、相关肝功能和免疫功能以及影像学评估。本研究为动物实验，无临床资料及影像学资料，所以选择与肝纤维化程度密切相关的肝纤4项为疗效判定指标。

肝纤4项指标中4项指标的变化幅度并不完全一致，以哪项指标为依据判定效果均不能全面反映整体趋势。为了综合评价，必须计算出一个统一的得分。我们采用综合评分法中的百分位数法进行评分[9]：即分别以肝纤4项检验值的25%分位数、50%分位数、75%分位数值划分评价等级，分别赋以10、20、30、40分的分值。

在肝纤4项指标中，HA对诊断肝纤维化的特异性和敏感性最高，最能反映肝纤维化程度，是肝纤维化和肝硬化最好的诊断标志物[6,10-13]，对其他3项指标的认识虽不一致，但诊断意义都不及HA却是共识。因此，我们与肝病临床专家及统计学专家共同分析后对HA、LN、PCⅢ、IVC的重要程度分配权重为2∶1∶1∶1，每组肝纤4项综合得分=2HA +LN+ PCⅢ+IVC，得出总分后，用方差分析，9组之间3个因素都有意义，其中肌肉注射、静脉注射优于腹腔注射；多聚物、脂质体组优于裸基因；200 μg/kg优于其他2个剂量。

半乳糖基化多聚赖氨酸(G-PLL)是一种目前常用于肝脏的靶向导入多聚物载体[14,15]，肝细胞表面存在特异性去唾液酸糖蛋白受体，G-PLL既含有能与该受体结合的半乳糖基成分，又含有能与DNA紧密结合的阳离子多聚赖氨酸，所以能够将目的DNA高效、稳定地靶向导入肝脏。杨长青等[16]认为，G-PLL的肝脏靶向导入作用优于脂质体Lipofectamine。

pcDNA3-ALR重组质粒是pcDNA3空质粒和ALR通过*Hind* Ⅲ与*Eco*RⅠ双酶切构建的[1]。pcDNA3含有2个特殊的启动子T7和Sp6，多酶切位点就位于二者之间，本研究就是利用这2个特殊的序列作引物，扩增其间的ALR序列。因大鼠体内无这2个基因序列，所以阳性扩增产物肯定是外源的基因表达。本实验从疗效指标观察，没有发现Lipofectamine与G-PLL的统计学差异。但从重组质粒在肝组织的表达指标分析，G-PLL的肝脏靶向导入效果优于脂质体，二者的性能比较还有待于今后进一步研究。

本研究没有显示肌肉注射与静脉注射之间的疗效差异，发现二者优于腹腔注射途径，这与杨长青等[17,18]的研究结果基本一致。

由于3个因素之间不存在交互作用，所以较佳组合是，由脂质体或多聚物携带ALR重组质粒、通过静脉或肌肉注射200 μg/kg，能取得较好的抗大鼠免疫性肝纤维化的疗效。

参考文献：

[1] 张丽梅，刘殿武，杨 洁，等. 大鼠肝再生增强因子真核表达质粒的构建及其抗急性肝功能衰竭作用的研究[J]. 河北医科大学学报，2004，25(2)：68-70.

[2] 黄志刚，翟为溶，张月娥，等. 异种动物血清诱导的大鼠肝纤维化模型及其机制[J]. 上海医科大学学报，1997，24(5)：351-354.

[3] 杨长青，王吉耀，方国汀，等. 静脉途径时脂质体和糖化多聚赖氨酸对基因表达肝脏靶向定位效果的比较[J]. 胃肠病学和肝病学杂志，2000，9(1)：3-7.

[4] 中华肝脏病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识[J]. 中华肝脏病杂志，2002，10(5)：327-328.

[5] 陆伦根，曾民德. 肝纤维化的疗效评估[J]. 现代医药卫生，2003，19(7)：805-806.

[6] 曾民德. 肝纤维化的诊断和治疗[J]. 肝脏，2001，6(增刊)：11-14.

[7] 贾继东，尹珊珊. 肝纤维化的诊断和治疗进展[J]. 临床内科杂志，2002，19(4)：244-247.

[8] 王泰龄，刘 霞，周元平，等. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案[J]. 中华肝脏病杂志，1998，6(4)：195-197.

[9] 孙振球，王乐三. 综合评分法[M]//孙振球. 医学统计学. 北京：人民卫生出版社，2003：381-383.

[10] PLEVRIS J N，HAYDON G H，SIMPSON K J，*et al*. Serum hyaluronan--a non-invasive test for diagnosing liver cirrhosis[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol，2000，12(10)：1121-1127.

[11] 张世兰，杨永平，陈德永，等. 血清透明质酸、Ⅲ型胶原氨基肽、Ⅳ型胶原及层粘蛋白与PGA指数对肝纤维化的诊断意义[J]. 中华传染病杂志，1999，17(4)：261-262.

[12] 罗瑞虹，杨绍基，谢俊强，等. 五项血清学指标在诊断肝纤维化中的应用和筛选[J]. 中华内科杂志，2000，39(6)：415-416.

[13] 张定凤. 肝纤维化非创伤性指标的综合诊断[J]. 中华肝脏病杂志，2001，9(5)：260,270.

[14] TAGAWA M，YOKOSUKA O，IMAZEKI F，*et al*. Gene expression and active virus replication in the liver after injection of duck hepatitis B virus DNA into the peripheral vein of ducklings[J]. J Hepatol，1996，24(3)：328-334.

[15] YAMAMOTO M，HAYASHI N，MIYAMOTO Y，*et al*. *In vivo* transfection of hepatitis C virus complementary DNA into rodent liver by asialoglycoprotein receptor mediated gene delivery[J]. Hepatology，1995，22(3)：847-855.

[16] 杨长青，王吉耀，温守明，等. 不同载体和不同导入途径对外源基因肝脏靶向导入效果的比较[J]. 中华肝脏病杂志，2000，8(4)：227-229.

[17] 杨长青，王吉耀，方国汀，等. 不同注射途径对糖化多聚赖氨酸偶联的表达质粒在大鼠肝脏靶向分布表达的影响[J]. 胃肠病学，1999，4(4)：230-233.

[18] 李 青，张丽梅，刘殿武，等. 肝再生增强因子重组质粒对肝纤维化大鼠的实验治疗作用[J]. 第三军医大学学报，2005，27(8)：760-763.

(编辑 陈聪连)