文章编号:1000-5404(2007)10-0903-04

论著

基于流体动力学的mA20质粒及其突变体转染对实验性小鼠内毒素血症的治疗作用

左云龙[1,2],匡凤梧[1],吴丽娟[2],蒋建新[2] ([1]重庆医科大学附属儿童医院ICU,重庆 400016;[2]第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 研究mA20及其突变体mA20-ZnF4-7质粒对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)攻击所致实验性内毒素血症小鼠的治疗作用。**方法** 用LPS攻击小白鼠制备内毒血症动物模型。按10 μg质粒/1.6 ml生理盐水比例溶于生理盐水中,采用基于流体动力学基因转染方法对实验组小鼠进行质粒注射。以ELISA检测各组血浆和组织TNF-α、IL-1β表达。12 h观察组织病理变化。**结果** ①mA20质粒治疗组、mA20-ZnF4-7质粒治疗组的TNF-α在各时间点的表达分别为:6 h:(201.797±4.789)、(235.710±6.108) pg/ml,12 h:(236.580±7.497)、(255.130±7.827) pg/ml,24 h:(154.551±16.460)、(223.246±11.316) pg/ml;两组间无显著性差异($P>0.05$);与单纯内毒素组、空质粒组的TNF-α表达比较有显著性降低($P<0.05$)。②mA20质粒治疗组、mA20-ZnF4-7质粒治疗组的IL-1β在各时间点的表达分别为:6 h:(87.103±3.840)、(101.586±2.486) pg/ml,12 h:(83.655±4.973)、(94.460±3.110) pg/ml,24 h:(77.678±6.555)、(87.103±4.826) pg/ml;该两组间无显著性差异($P>0.05$);与单纯内毒素组、空质粒组的IL-1β表达比较有显著性降低($P<0.05$);各时间点之间比较无明显差别($P>0.05$)。③病理学观察结果显示:mA20治疗组、mA20-ZnF4-7治疗组的肝、肺损伤均较单纯内毒素组、空质粒组轻;与生理盐水对照组相比,肝、肺损伤无明显差别($P>0.05$)。**结论** "基于血流动力学的基因转染方法"能有效地把目的质粒DNA转入肝、肺;对实验性类毒素血症小鼠体外转染mA20-ZnF4-7和mA20有相似的治疗作用,这为临床应用提供一定的实验基础。

关键词:A20;内毒素;转染;基因治疗
中图法分类号:R341;R392.1;R631.105 **文献标识码**:A

Effect of hydrodynamics-based delivery of mA20 and its mutant plasmid on experimental endotoxemia in mice

ZUO Yun-long[1,2], KUANG Feng-wu[1], WU Li-juan[2], JIANG Jian-xin[2] ([1]Pediatric Intensive Care Unit, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the therapic effect of mA20 and its mutant mA20-ZnF4-7 plasmid on endotoxemia induced by lipopolysaccharide (LPS) in mice. **Methods** We prepared the endotoxemia animal model by assaulting mice with LPS (2.5 mg/kg). Using the method of hydrodynamics-based gene transfection, we intravenously injected mice with 10 g of plasmid DNA in 1.6 ml saline through the tail vein. The contents of TNF-α, IL-1β in blood plasma were detected by ELISA, and inflammatory reaction was also observed pathologically. **Results** The TNF-α expressions of mA20 plasmid treated group and mA20-ZnF4-7 plasmid treated group in each time point were (201.797±4.789) and (235.710±6.108) pg/ml in 6 h, (236.580±7.497) and (255.130±7.827) pg/ml in 12 h, (154.551±16.460) and (223.246±11.316) pg/ml in 24 h, which were significantly lower than those of LPS assaulting group and empty plasmid group. The IL-1β expressions of mA20 plasmid treated group and mA20-ZnF4-7plasmid treated group in each time point were (87.103±3.84) and (101.586±2.486) pg/ml in 6 h, (83.655±4.973) and (94.460±3.110) pg/ml in 12 h, (77.678±6.555) and (87.103±4.826) pg/ml in 24 h, which also significantly lower than those of LPS assaulting group and empty plasmid group. The inflammatory damage in mA20 plasmid treated group and

基金项目:全军"十一五"面上课题(06MA189)
Supported by the General Program of the "Eleventh Five-Year Plan" of PLA (06MA189)
作者简介:左云龙(1976-),男,江西省余干县人,博士研究生,主要从事脓毒症的分子机制及其临床方面的研究。电话:13102300826,E-mail:zuoyunlong31@163.com
通讯作者:吴丽娟,电话:(023)68757972,E-mail:wulijuan1638@126.com
收稿日期:2006-11-09;修回日期:2007-01-23

mA20-ZnF4-7 plasmid treated group was lighter than those of LPS assaulting group and empty plasmid group, but of no significant difference in comparison with normal saline group. **Conclusion** The method of hydrodynamics-based gene transfection can efficiently deliver plasmid DNA into liver and lung. *In vitro* transfection of mA20-ZnF4-7 plasmid showed the similar therapeutic effect on experimental endotoxemia in mice as that of mA20 plasmid, which provides some experimental base for its clinical application.

Key word: A20; endotoxin; transfection; gene therapy

内毒素血症是由于血中细菌或病灶内细菌释放出大量内毒素至血液,或输入大量内毒素污染的液体,引起炎症的激活及细胞介质的释放,导致全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、多器官功能不全综合征(multiorgan disfunction syndrome, MODS)甚至多脏器功能衰竭(multiorgan failure, MOF),是儿科创伤和感染患者死亡的主要原因之一。尽管治疗措施不断更新进展,对危重病的支持治疗已取得很大进步,但内毒素血症依然是医药工作者久攻不克但又必须攻克的堡垒。锌指蛋白 A20 是一种存在胞液中的泛素修饰蛋白,通过特定信号通路抑制 NF-κB 活性,进而降低炎症介质和细胞因子的释放,从而参与对机体炎症反应调节和凋亡抑制[1]。本研究旨在通过动物实验从基因水平,体外给予 mA20 及其突变体 mA20-ZnF4-7 质粒抑制内毒素血症时过多的炎症介质的产生,纠正炎性失衡,阻止内毒素血症的恶化发展,为临床应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

质粒小量提取试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,质粒大量提取试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司,ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。*E. coli*. JM109 为本实验室保存,pCAGGS-Flag-mA20, pCAGGS-Flag-mA20-ZnF4-7 质粒由本实验室构建并保存。

1.2 质粒的转化、小量提取及其鉴定

将 pCAGGS-Flag、mA20 质粒、mA20-ZnF4-7 质粒转化 JM109 感受态。取 37 ℃振摇培养过夜的 3 ml 菌液,按照质粒小量提取试剂盒购各提取 1 管质粒,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定之。送检测序鉴定正确。

1.3 动物分组及模型

选用清洁型健康昆明种小白鼠 45 只,5 ~ 6 周龄,体质量 18 ~ 22 g,雌雄不拘,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。实验前 12 h 禁食,可自由饮水。随机数字表法分为 5 组:生理盐水对照组;单纯内毒素组;空质粒组;mA20 治疗组;mA20-ZnF4-7 治疗组;每组 9 只,并设 6、12、24 h 时间点。动物在清醒状态下尾静脉注射脂多糖(LPS. *E. coli* 026:B6,美国 Difco 公司)2.5 mg/kg 制备动物模型。

1.4 据于流体动力学快速尾静脉基因转染

按照质粒大量提取试剂盒提取足量 pCAGGS-Flag、mA20 质粒、mA20-ZnF4-7 质粒,根据 Liu 等[2] 建立的"基于流体动力学快速尾静脉注射的基因转染技术",采用每只小鼠 10 μg 质粒,并溶于 1.6 ml 生理盐水中。尾静脉注射 LPS30 min 后,5 s 内分别注射 pCAGGS-Flag、mA20 质粒、mA20-ZnF4-7 质粒10 μg · 1.6 ml NS^{-1} · $只^{-1}$,之后 6、12、24 h 各杀小鼠 3 只。同时在 5 s 内注射 1.6 ml 生理盐水做阴性对照;以注射 LPS 作为阳性对照。取血并取肝、肺组织。

1.5 ELISA 实验

用抗凝管收集血液,稍旋转摇匀,1 200 r/min 离心5 min,吸取上清即血浆,采用 ELISIA 试剂盒检测 TNF-α、IL-1β 的表达。

1.6 肝、肺组织 HE 染色

进行常规病理学观察。

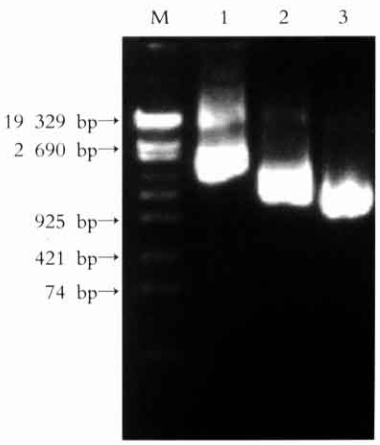
1.7 统计学分析

血浆 TNF-α、IL-1β 表达量均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 统计软件,行样本单因素方差分析及组间 t 检验。

2 结果

2.1 质粒电泳鉴定

小量提取的 pCAGGS-Flag、mA20 质粒、mA20-ZnF4-7 质粒用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果见图 1。



M:λ-EcoT14I digest 标准;1:mA20 全长质粒;2:mA20-ZnF4-7 质粒;3:pCAGGS-Flag 空质粒

图 1 质粒的 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定

2.2 ELISA 检测血浆 TNF-α、IL-1β 表达

各因素处理后 TNF-α、IL-1β 在各组的水平比较:单纯内毒素组、空质粒组、mA20 质粒治疗组、mA20-ZnF4-7 质粒治疗组

与生理盐水组相比，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。A20 质粒治疗组、mA20-ZnF4-7 质粒治疗组与单纯内毒素组、空质粒组相比，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；单纯内毒素组与空质粒组相比，差异无统计学意义（$P>0.05$）；mA20 质粒治疗组与 mA20-ZnF4-7 质粒治疗组相比，差异无统计学意义；同组别各时间点之间相比差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 1、2。

表 1　TNF-α 在各组的表达值（pg/ml，$n=9$，$\bar{x}\pm s$）

组别	时间		
	6 h	12 h	24 h
生理盐水对照组	71.127 ± 19.329[a]	69.978 ± 19.412[a]	70.203 ± 18.039
单纯内毒素组	398.029 ± 16.089[ab]	444.696 ± 12.631[ab]	471.652 ± 11.503[ab]
空质粒组	388.464 ± 10.003[a]	455.420 ± 8.882[a]	476.870 ± 5.431[a]
mA20 质粒治疗组	201.797 ± 4.789	236.580 ± 7.497	154.551 ± 16.460
mA20-ZnF4-7 质粒治疗组	235.710 ± 6.108[a]	255.130 ± 7.827[a]	223.246 ± 11.316[a]

a：$P<0.05$，与 mA20-ZnF4-7 质粒治疗组比较；b：$P<0.05$，与生理盐水对照组比较

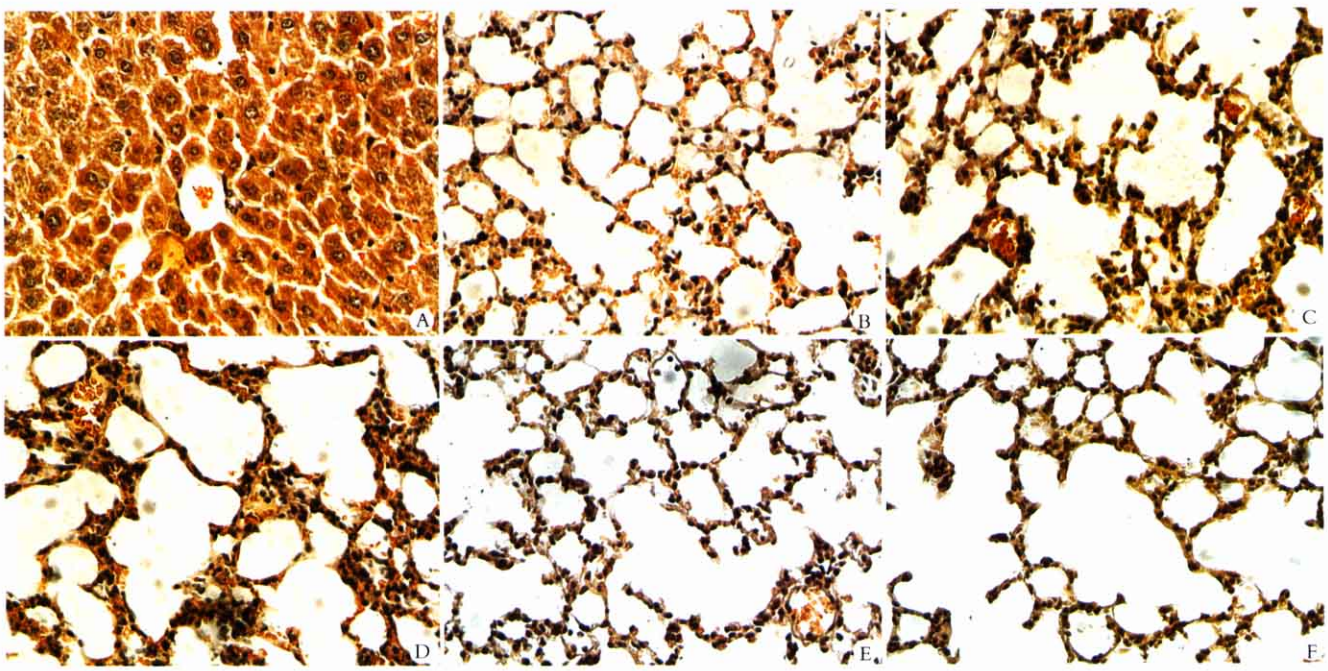
2.3　肝、肺组织常规病理学观察

生理盐水对照组的肝、肺：无明显炎性细胞浸润，无充血水肿（图 2A、2B）；单纯内毒素组的肝：细胞有变性、水肿、坏死，血管周围炎性浸润明显，肝小叶不规则；肺：细胞浸润明显，肺泡壁增厚，塌陷（图 2C）等；空质粒组的肝：细胞有变性、水肿、坏死，血管周围炎性细胞浸润明显，肝小叶不规则；肺：细胞浸润明显，肺泡壁增厚，肺塌陷（图 2D）等；mA20 治疗组的肝：细胞较完整，少见坏死、空泡变性等，无明显炎性浸润，无明显充血水肿，肝小叶较完整；肺：细胞浸润减轻，泡壁无明显增厚，可见少数肺大泡（图 2E）；mA20-ZnF4-7 治疗组的肝：细胞仍较完整，少见坏死、空泡变性等，无明显炎性浸润，无充血水肿，肝小叶较完整；肺：细胞浸润减轻，泡壁无明显增厚，可见少数肺大泡（图 2F）。

表 2　IL-1β 在各组的表达值（pg/ml，$n=9$，$\bar{x}\pm s$）

组别	时间		
	6 h	12 h	24 h
生理盐水对照组	98.823 ± 11.953[a]	99.375 ± 12.119[a]	99.517 ± 12.661[a]
单纯内毒素组	418.115 ± 23.217[ab]	425.494 ± 9.184[ab]	453.540 ± 4.695[ab]
空质粒组	382.736 ± 7.751[a]	436.299 ± 7.045[a]	453.310 ± 4.307[a]
mA20 质粒治疗组	87.103 ± 3.840	83.655 ± 4.973	77.678 ± 6.555
mA20-ZnF4-7 质粒治疗组	101.586 ± 2.486[a]	94.460 ± 3.110[a]	87.103 ± 4.826[a]

a：$P<0.05$，与 mA20-ZnF4-7 质粒治疗组比较；b：$P<0.05$，与生理盐水对照组比较



A：生理盐水组肝；B：生理盐水组肺；C：单纯内毒素组肺；D：空质粒组肺；E：mA20 治疗组肺；F：mA20-ZnF4-7 治疗组肺

图 2　各组小鼠肝肺组织病理学观察（HE ×400）

3　讨论

我们使用裸质粒作为载体进行基因治疗，研究 mA20 及其突变体 mA20-ZnF4-7 质粒对实验性内毒素血症小鼠的影响。结果显示 A20 及其突变体 mA20-ZnF4-7 质粒不仅能明显改善组织病理学形态：细胞较完整，炎性细胞浸润减少，抑制了细胞的充血、水肿、坏死等，还能显著性降低实验性内毒素血症小鼠血浆中的 TNF-α、IL-1β 表达，即促炎因子水平降低，从而使“抑炎”大于“促炎”，达到对炎性反应的控制。以往的

研究多集中在抑制细菌内毒素合成和释放、中和内毒素以及针对内毒素血症中细胞因子和炎性介质的治疗。而本研究中的基因治疗有其明显的优点：从分子水平抑制内毒素所致炎症因子产生的瀑布样效应，达到治疗炎性反应疾病。锌指蛋白 A20 在以往的体外研究[3-6]中被证实是一种存在胞液中的泛素修饰蛋白，对 NF-κB 有负调控作用，参与负调控炎症反应。对 mA20 基因结构与功能的研究表明：mA20 有 2 个功能结构域：mA20 的 N 末端半区（1～385）和 C 末端半区（386～775）；C 半区是锌指区，有 7 个重复的 Cys2/Cys2 型锌指结构。Klinkenberg 等[1]构建了一系列 A20 突变体表达质粒并转染炎症细胞模型，发现 A20 对 NF-κB 活性抑制与它 C 半区的 7 个锌指（ZnF）有关，与 N 半区无关，而且只要突变体含有 4 个或 4 个以上的 ZnF，对 NF-κB 活性的抑制程度就能与含有 7 个 ZnF 的野生型 mA20 基本相同。因此作者认为 A20 对 NF-κB 活性的抑制存在“功能丰余性”（function redundancy）。基于此研究，我们亦采用前期工作已构建好的 mA20 突变体 mA20-ZnF4-7（只含 C 端后 4 个锌指结构）进行基因治疗研究，证实其效应同野生型的 mA20 无明显差异。这也为后续真核表达结构更为简单的人型 A20 蛋白突变体做好了铺垫。以往对 mA20 的研究多集中在体外细胞实验，与此不同的是：我们着重采用体内动物实验研究 mA20 及其突变体的抗炎活性，有其独创性。在基因治疗研究中使用的载体有腺病毒[7,8]、脂质体等。然而，与病毒、脂质体介导的基因转染系统相比，以裸 DNA 的形式将外源基因转入细胞有许多明显的优势。因为 DNA 的制备在许多实验室已成为常规操作；DNA 在化学、生物上较稳定，不需要复杂、特殊的储藏条件；大量高纯度的质粒 DNA 很容易获得，而且不贵。同时腺病毒作为载体有病毒整合入机体染色体的危险；脂质体的毒性较强而且较贵。“基于流体动力学的裸基因注射技术”是由 Liu 等[2]于 1999 年首次推出，并证实该方法简单、方便、有效。Higuchi 等[9]研究指出使用基于流体动力学的基因转染技术，转染编码病毒性白介素-10 质粒能抑制大鼠实验性新月体性肾小球肾炎；同样 Abe 等[10]注射编码 CTLA4-Ig 嵌合体的质粒能显著性的防治实验性自身免疫性心肌炎；Chang 等[11]注射编码白介素-22 免疫球蛋白融合基因质粒能改善大鼠实验性自身免疫性心肌炎；同样。因此在目前研究中，我们试着采用该技术进行基因治疗研究，已经证实使用这种方法能明显改善内毒素血症。基于流体动力学的转染技术是非常容易而强大的技术（在我们的前期预实验中，LPS 攻击后 3 天的阳性对照组和空质粒对照组中的血流动力学无明显差异，这就暗示了最初的容量负荷并不会影响内毒素血症的血流动力学状态），这个技术弥补了使用腺病毒、脂质体等进行基因转染的缺点。

总之，我们证明静脉注射编码 mA20 和 mA20-ZnF4-7 的质粒能治疗实验性内毒素血症，表现为显著性下调炎性细胞因子和组织病理学的改善。mA20 和 mA20-ZnF4-7 质粒治疗实验性内毒素血症无明显差别，为后续真核表达结构简单、分子质量低的人型锌指蛋白 A20 突变体的细胞实验奠定基础。也为临床应用提供了一定的实验基础。

参考文献：

[1] Klinkenberg M, Van-Huffel S, Heyninck K, *et al*. Functional redundancy of the zinc fingers of A20 for inhibition of NF-kappaB activation and protein-protein interactions[J]. FEBS Lett, 2001, 498(1): 93-97.

[2] Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA[J]. Gene Ther, 1999, 6(7): 1258-1266.

[3] Evans P C, Ovaa H, Hamon M, *et al*. Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity[J]. Biochem J, 2004, 378(Pt 3): 727-734.

[4] Wertz I E, O'Rourke K M, Zhou H, *et al*. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling[J]. Nature, 2004, 430(7000): 694-699.

[5] Boone D L, Turer E E, Lee E G, *et al*. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses[J]. Nat Immunol, 2004, 5(10): 1052-1060.

[6] Onose A, Hashimoto S, Hayashi S, *et al*. An inhibitory effect of A20 on NF-kappaB activation in airway epithelium upon influenza virus infection[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 541(3): 198-204.

[7] Alexander S, Bramson J, Foley R, *et al*. Protection from endotoxemia by adenoviral-mediated gene transfer of human bactericidal/permeability-increasing protein[J]. Blood, 2004, 103(1): 93-99.

[8] Li C, Li J, Lv Z, *et al*. Protection of mice from lethal endotoxemia by chimeric human BPI-Fcgamma1 gene delivery[J]. Cell Mol Immunol, 2006, 3(3): 221-225.

[9] Higuchi N, Maruyama H, Kuroda T, *et al*. Hydrodynamics-based delivery of the viral interleukin-10 gene suppresses experimental crescentic glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats[J]. Gene Ther, 2003, 10(16): 1297-1310.

[10] Abe S, Hanawa H, Hayashi M, *et al*. Prevention of experimental autoimmune myocarditis by hydrodynamics-based naked plasmid DNA encoding CTLA4-Ig gene delivery[J]. J Card Fail, 2005, 11(7): 557-564.

[11] Chang H, Hanawa H, Liu H, *et al*. Hydrodynamic-based delivery of an interleukin-22-Ig fusion gene ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats[J]. J Immunol, 2006, 177(6): 3635-3643.

（编辑 龙 亮）