论著

文章编号:1000-5404(2010)14-1516-04

微囊化腺病毒介导的 Bcl-2 基因转染对缺血再灌注损伤肠黏膜的保护作用

伊远学[1,2],刘晓平[1],李宝金[1],张 超[1],冷希圣[1],刘 筑[2],罗效梅[2],杨瑞兵[2] (518036 广东 深圳,北京大学香港科技大学医学中心,北京大学深圳医院肝胆腔镜外科[1]; 400061 重庆,武警重庆总队医院检验科[2])

[摘要] **目的** 研究微囊化重组腺病毒 AdCMV/Bcl-2 转染对缺血再灌注损伤肠黏膜的保护作用及其机制。**方法** 利用气体雾化技术将携带 Bcl-2 基因的复制缺陷型重组腺病毒 AdCMV/Bcl-2 微囊化,检测其在人工胃、肠液中的融出率;将等量的重组腺病毒通过静脉注射、腹腔注射与口服微囊 3 种转染途径转染大鼠,应用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测目的基因 Bcl-2 在小肠中的表达,并检测各组大鼠伤后血浆内毒素、二胺氧化酶(DAO)、D-乳酸含量和肠上皮细胞凋亡数量的变化。**结果** 制备的微囊在人工胃液中仅有少量崩解,而在肠液中40 min 崩解融出率即达到(57.2±3.9)%,肠溶性良好;AdCMV/Bcl-2 转染后 48 h 大鼠肠黏膜 Bcl-2 基因的表达显著增强,其中,口服微囊组 Bcl-2 表达最强;AdCMV/Bcl-2 转染使大鼠肠上皮细胞凋亡减少,伤后血浆 D-乳酸、DAO 及内毒素水平显著降低($P<0.01$)。**结论** 复制缺陷型重组腺病毒微囊化可保护其免受胃液损伤,并在肠道中被释放吸收。AdCMV/Bcl-2 转染提高肠黏膜组织 Bcl-2 的表达在缺血再灌注损伤过程中可显著保护肠黏膜屏障功能。

[关键词] 小肠; 缺血再灌注损伤; 基因转染;Bcl-2;微囊;腺病毒载体

[中图法分类号] R364.12;R574;R966 **[文献标志码]** A

Microencapsulated adenovirus-mediated gene transfer of Bcl-2 protects rat intestinal mucosa after ischemia-reperfusion injury

Yi Yuanxue[1,2], Liu Xiaoping[1], Li Baojin[1], Zhang Chao[1], Leng Xisheng[1], Liu Zhu[2], Luo Xiaomei[2], Yang Ruibing[2] ([1]Department of Hepatobiliary and Laparoscopic Surgery, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen PKU-HKUST Medical Center, Shenzhen, Guangdong Province, 518036; [2]Department of Clinical Laboratory, Chongqing Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Chongqing, 400061, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effects of microencapsulated adenovirus-mediated gene transfer of Bcl-2 on intestinal mucosa in rats after ischemia-reperfusion injury and underlying mechanism. **Methods** Alginate microcapsules containing the recombinant adenovirus AdCMV/Bcl-2 was prepared by using air atomization technique. Its acid resistance and dissolution in intestinal fluid were tested in artificial gastric juice and intestinal fluid. After the microencapsulated adenovirus (5×10^9 PFU) were injected by venous and intraperitoneal injection, and oral taking into the rats in 48 h before ligating superior mesenteric artery for 1 h followed by reperfusing for 6 h (ischemia-reperfusion injury), the expression of Bcl-2 in intestinal mucosa was detected by RT-PCR and Western blot analysis. The protective role of Bcl-2 in the intestinal mucosa in rats was analyzed by measuring plasma levels of endotoxin, D-lactic acid, and DAO. **Results** The recombinant adenovirus AdCMV/Bcl-2 contained in microcapsules was still survivable *in vitro* and also could transfect and proliferate in 293 cells. The prepared microcapsule was almost insoluble in the simulated gastric juice but soluble in the simulated intestinal fluid in which the solution ratio arrived to 57.2% at 40 min. The AdCMV/Bcl-2 transfection *in vivo* successfully induced Bcl-2 over-expression in the intestinal mucosa, which protected the intestinal mucosa against ischemia and reperfusion injury. The AdCMV/Bcl-2 transfection *in vivo* attenuated intestinal epithelial cell apoptosis and structural mucosal damages, and decreased plasma endotoxin, DAO and D-lactic acid content following ischemia and reperfusion. **Conclusion** The AdCMV/Bcl-2 transfection *in vivo* successfully induces Bcl-2 over-expression in the intestinal mucosa, and protects the intestinal mucosa against the ischemia and reperfusion injury through attenuating intestinal epithelial cell apoptosis and decreasing plasma contents of

[基金项目] 广东省自然科学基金博士启动项目(06300934);广东省医学科研基金(A2007595)

[通信作者] 刘晓平,电话:(0755)83923333-8707,E-mail:ninliu@163.com

endotoxin, D-lactic acid, and DAO. The microencapsulated adenovirus taken orally circumvents the injury in the stomach and exerts protective effect during the ischemia and reperfusion injury in intestinal mucosa. Our results suggest the microcapsulation of adenovirus might provide an effective means for the gene therapy in clinical application.

[Key words] intestinal mucosa; ischemia and reperfusion; gene transfection; microcapsule; adenovirus vector; bcl-2 gene

Supported by the Starting Foundation for Doctor of Natural Science Foundation of Guangdong Province (06300934), and the Medical Sci & Tech Research Foundation of Guangdong Province (A2007595). Corresponding author: Liu Xiaoping, Tel: 86-755-83923333-8707, E-mail: ninliu@163.com

B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B-Lymphoma/Leukemia-2 gene, Bcl-2)是目前研究最多、最受关注的抗凋亡基因。近年研究表明,利用转基因手段诱导 Bcl-2 的高表达可保护心、脑、肝等重要器官免于缺血缺氧性凋亡[1-3]。而在正常小肠组织中 Bcl-2 基因不表达或微弱表达[4]。在缺血再灌注损伤中,小肠 Bcl-2 表达上调,但其幅度显著低于心、肝等器官。人们自然考虑到在小肠增加此抗凋亡蛋白的生成可能是治疗肠缺血再灌注损伤的有效途径[5,6]。

在体外转染实验中我们通过 AdCMV/Bcl-2 转染肠上皮细胞,证实了重组腺病毒 AdCMV/Bcl-2 能诱导 Bcl-2 高表达并对肠上皮细胞的缺氧再复氧损伤有保护作用。在此基础上,本研究拟将 AdCMV/Bcl-2 进行大鼠体内转染,观察其对肠缺血再灌注损伤的保护作用,并比较 AdCMV/Bcl-2 静脉注射、腹腔注射及口服微囊化腺病毒 3 种转染途径在诱导 Bcl-2 表达及保护效应方面的差异,明确口服微囊化腺病毒这种新的转染方法是否具有临床应用可行性。

1 材料与方法

1.1 微囊化腺病毒的制备

复制缺陷型重组腺病毒 AdCMV/Bcl-2 的构建、鉴定、扩增、纯化、滴度测定由本实验室完成。AdCMV/Bcl-2 微囊化采用气体雾化技术,微囊囊材为 1.5 g/L 海藻酸钠与 0.2 mol/L 氯化钙溶液。

1.2 动物模型及分组

1.2.1 实验动物 健康 Wistar 雄性大鼠 30 只,体质量(220±20)g,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。

1.2.2 实验分组 按随机数字表法将动物分为 5 组,每组 6 只。对照组:仅分离肠系膜上动脉而不夹闭,其余处理均与单纯损伤组相同;单纯损伤组:阻断肠系膜上动脉 1 h 后再灌注 6 h;AdCMV/Bcl-2 腹腔注射转染损伤组(腹腔注射组):于损伤前 48 h 取腺病毒液进行腹腔注射,每只大鼠 5×10^9 PFU;AdCMV/Bcl-2 静脉注射转染损伤组(静脉注射组):于损伤前 48 h 取腺病毒液进行静脉注射,每只大鼠 5×10^9 PFU; AdCMV/Bcl-2 微囊口服转染损伤组(口服微囊组):大鼠于损伤前 48 h 口服重组腺病毒微囊,每只大鼠 5×10^9 PFU。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 微囊融出度的测定 参照李晓鲁等[7]的方法。①在人工胃液中的融出度:称取 0.2 g 微囊,置于盛有 30 ml 人工胃液(0.2 mol/L NaCl, 0.08 mol/L HCl, pH=2.0)的三角瓶中,于 37.0 ℃恒温水浴中搅拌,搅拌速度不超过 200 r/min,分别于 0、20、40、60、80 min 时取样,测其光密度值,以 0.2 g 微囊完全融出时光密度值为参照,根据光密度值变化,分析人工胃液中微囊的融出崩解率。② 在人工肠液中的融出度:称取 0.2 g 微囊,置于盛有 30 ml 人工肠液(0.8 mol/L NaH_2PO_4, 0.2 mol/L NaOH,10 mmol/L 胆汁盐,pH=7.6)的三角瓶中,分别于 0、5、10、15、20、25、30、35、40 min 时取样,测其光密度值,分析方法同人工胃液中的融出度。

1.3.2 组织 RNA 的提取及 RT-PCR 检测大鼠组织中 Bcl-2 基因的表达 按 Roche 公司试剂盒说明书操作。Bcl-2 特异性上游引物:5′-GGTGCCACCTGTGGTCCACCT-3′,下游引物:5′-CTTCACTTGTGGCCCAGATAGG-3′,扩增产物大小 458 bp 。内参照 GAPDH 特异性上游引物:5′-GCTGATGCCCCCATGTTT-GT-3′,下游引物:5′-GGGTGGTCCAGGGTTTCTTA-3′,扩增产物大小 650 bp。PCR 扩增循环系数为 94 ℃,4 min→98 ℃, 30 s; 55 ℃,30 s;72 ℃,30 s ,共 30 个循环→72 ℃延伸 2 min →4 ℃保存 。

1.3.3 蛋白表达的检测 称取约 0.1 g 肠黏膜组织并用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 2 次,加入 1 ml 预冷蛋白裂解液[RIPA,内含 50 mmol/L Tris-HCl、pH=7.4,150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),体积分数为 1% NP-40,质量分数为 1% 的脱氧胆酸钠,0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS), 20 pg/ml 抑肽酶、PePstatin 和苯甲基磺酰氟化物(PMSF)用用玻璃匀浆器匀浆。15 000×g 离心 10 min,收集上清。以牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量测定。50 μg 总蛋白经 8% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离,用半干转移电泳仪将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上;之后用 50 g/L 脱脂奶粉-Tris 缓冲液(TBS 溶液)在室温下封闭 1 h,加入特异性 Bcl-2(Mouse IgG)在 4 ℃条件下保温过夜;TBS 洗膜,每次 10 min,洗 3 次;二抗使用羊抗鼠 IgG-HRP,于 37 ℃孵育 1 h,再用洗涤液洗 3 次;之后用化学发光底物孵育,硝酸纤维素膜于暗室中用感光胶片感光、冲洗。所得结果经扫描后用 Quantity One 软件进行统计分析,计算积分光密度。将实验组与正常组的光密度值的比值作为实验组 Bcl-2 的相对表达量。

1.3.4 大鼠血浆内毒素、DAO 及 D-乳酸含量检测 大鼠血

浆内毒素采用鲎实验法,大鼠血浆D-乳酸含量检测参照Brandt等[8]的方法,大鼠血浆DAO含量的检测参照Hosoda等[9]的方法。

1.3.5　肠黏膜上皮细胞凋亡的原位检测　采用TUNEL法,按Roche公司试剂盒说明书操作。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5统计软件进行 t 检验和单因素方差分析。

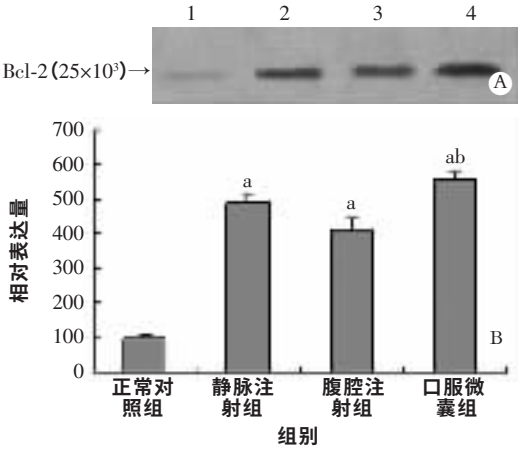
2　结果

2.1　微囊化腺病毒的生物活性及肠溶性

制备的海藻酸微囊为表面光滑的球形微囊,大小形态规则,粒径均匀,直径为(289 ± 22) μm 。AdCMV/Bcl-2微囊化后仍然保持较高的生物活性,可成功转染HEK293细胞并进行病毒扩增。经检测,微囊含重组腺病毒 2.06×10^{10} PFU/g。海藻酸微囊在人工胃液中融出极慢,经人工胃液处理20 min后始有(2.5 ± 0.3)%微囊融出,80 min后微囊融出率仅为(9.9 ± 1.2)%;微囊在人工肠液里融出快,融出率高。在人工肠液中5 min即有(9.7 ± 1.2)%融出,于40 min崩解融出率即达到(57.2 ± 3.9)%,肠溶性良好。制备的微囊具有较好的肠溶性和储存稳定性。

2.2　AdCMV/Bcl-2转染后肠黏膜组织Bcl-2的表达

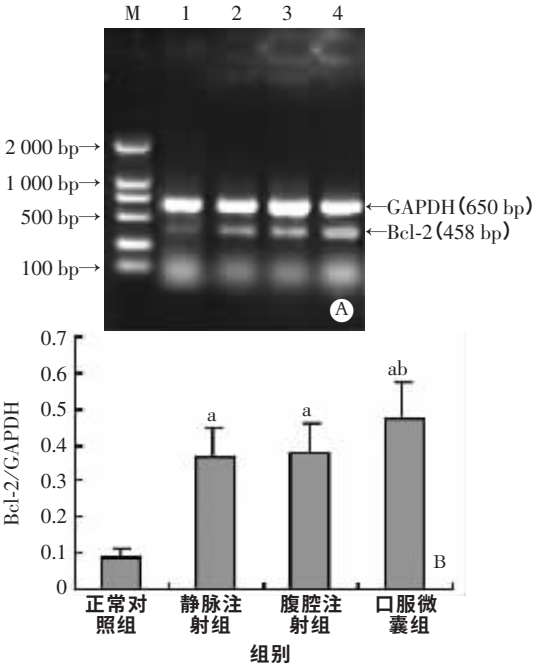
2.2.1　Western blot检测AdCMV/Bcl-2转染后Bcl-2蛋白的表达　正常对照组大鼠肠黏膜组织Bcl-2呈微量表达,AdCMV/Bcl-2转染后48 h肠黏膜组织内Bcl-2表达显著增加。其中,口服微囊转染AdCMV/Bcl-2后大鼠肠黏膜组织Bcl-2蛋白表达高于静脉注射组和腹腔注射组($P<0.01$)。见图1。



A: Western blot检测结果　1: 对照组; 2: 静脉注射组;3: 腹腔注射组; 4: 口服微囊组;B:半定量分析结果　a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与静脉注射组和腹腔注射组比较

图1　AdCMV/Bcl-2转染后大鼠肠黏膜Bcl-2蛋白表达变化

2.2.2　RT-PCR检测AdCMV/Bcl-2转染后Bcl-2 mRNA的表达　正常对照组大鼠肠黏膜组织Bcl-2 mRNA呈少量表达,AdCMV/Bcl-2转染后48 h大鼠肠黏膜组织内Bcl-2转染mRNA表达显著增加,其中,口服微囊转染AdCMV/Bcl-2后大鼠肠黏膜组织Bcl-2基因的特异性表达高于静脉注射组和腹腔注射组($P<0.05$)。见图2。



A:RT-PCR检测结果　M: DNA标准(DL 2 000);1:对照组;2: 静脉注射组; 3: 腹腔注射组; 4:口服微囊组; B:半定量分析结果　a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与静脉注射组和腹腔注射组比较

图2　AdCMV/ Bcl-2转染后大鼠肠黏膜Bcl-2 mRNA表达变化

2.3　肠黏膜上皮细胞凋亡TUNEL检测结果

TUNEL法检测凋亡阳性的肠黏膜上皮细胞表现为核呈深棕黄色,核形态较清楚、完整。对照组大鼠仅在肠绒毛顶端有少数上皮细胞出现凋亡,而在缺血再灌注损伤后肠黏膜上皮细胞凋亡数明显增加,AdCMV/Bcl-2转染大鼠肠黏膜上皮细胞凋亡在伤后显著少于单纯损伤组。

2.4　血浆D-乳酸、DAO及内毒素含量变化

大鼠缺血再灌注损伤后血浆D-乳酸、DAO及内毒素含量均显著高于对照组($P<0.01$),AdCMV/Bcl-2转染组大鼠缺血再灌注损伤后血浆D-乳酸、DAO及内毒素含量均明显低于单纯损伤组($P<0.01$);与静脉注射组和腹腔注射组比较,口服微囊组大鼠门静脉血浆内毒素有进一步下降的趋势。见表1。

表1　大鼠血浆D-乳酸、DAO及内毒素含量变化 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	D-乳酸(mmol/L)	血浆DAO (kU/L)	血浆内毒素(EU/L)
对照组	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.03	91.3 ± 10.7
单纯损伤组	0.61 ± 0.06[a]	0.69 ± 0.19[a]	299.3 ± 34.3[a]
静脉注射组	0.39 ± 0.04[ac]	0.46 ± 0.06[ac]	177.0 ± 45.0[ac]
腹腔注射组	0.38 ± 0.05[ac]	0.49 ± 0.10[ab]	159.3 ± 31.5[ac]
口服微囊组	0.35 ± 0.04[ac]	0.43 ± 0.08[ac]	146.0 ± 23.4[ac]

a: $P<0.01$,与对照组比较; b: $P<0.05$, c: $P<0.01$ 与单纯损伤组比较

3　讨论

肠缺血再灌注损伤是外科实践中常见的组织器官损伤之一,在严重创伤、休克、感染、心肺功能不全等疾患的病理演变过程中起重要作用。它不仅可引起局部

的组织损害,而且肠黏膜机械屏障功能受损可以导致肠内细菌和毒素移位,引起网状内皮系统发生系列反应,导致大量炎症介质和细胞因子的释放,在全身性炎症反应综合征(systematic inflammatory response syndrome,SIRS)、多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的发生中起关键作用。有学者甚至将肠道称为"应激条件下的中心器官"[10]。因此近年来肠缺血再灌注越来越受到重视,其发生、发展机制及防治措施的研究也成为外科领域的重点课题之一。

对缺血再灌注损伤的肠组织及肠腔脱落细胞的大量研究表明:细胞凋亡与坏死共存于其中,细胞凋亡是主要的细胞死亡形式;缺血诱导凋亡,再灌注加剧凋亡。近年来,许多学者开始尝试利用转基因手段,将抑制凋亡基因 Bcl-2 的过度表达用来保护缺血缺氧细胞免于凋亡,并取得一定效果[11]。本实验发现,肠缺血再灌注损伤后 DAO 显著升高,表明肠黏膜上皮细胞大量受损,引起肠黏膜通透性增加,D-乳酸和内毒素因此进入循环系统引起血中浓度的升高;AdCMV/Bcl-2 转染可抑制 DAO、D-乳酸和内毒素的升高,表明 AdCMV/Bcl-2 转染可保护肠黏膜上皮细胞,因而维持正常的肠黏膜屏障功能。

肠道疾病的基因治疗以往多通过远端动脉或静脉途径进行基因转染,存在着靶向性、特异性缺乏和毒副作用大等问题。近年来有学者尝试通过喂饲法进行基因转染,也提出了腺病毒载体在酸性环境中不稳定问题[12]。为让腺病毒载体能逃避胃酸作用,顺利到达肠道并与肠黏膜上皮细胞结合,我们尝试用微囊技术解决这一问题。微囊具有保护物质免受环境条件的影响,改善物质的可加工性和稳定性,延长物质储存时间,延缓或控制囊心物的释放,将不可混的化合物隔离等功能[13]。在肠道疾病的基因治疗中还可起到将腺病毒载体隔离,避免胃液损伤而在肠道控释等作用。

本实验通过口服途径、静脉注射和腹腔注射 3 种途径转染大鼠,应用 Western blot 和 RT-PCR 方法检测了大鼠肠黏膜组织 Bcl-2 的表达变化情况,结果发现 AdCMV/Bcl-2 转染后 48 h 大鼠肠黏膜 Bcl-2 基因的表达显著增强,其中,口服微囊组 Bcl-2 表达最强,因此可以认为在等量腺病毒转染肠道时,口服微囊的转染效率优于静脉注射和腹腔注射。

口服微囊克服了传统转染途径存在的靶向性、特异性缺乏和毒副作用大等问题。在方法上利用了体内外自然、生理的处理机制, 将外源基因十分简易、巧妙地导入机体细胞中,模仿了自然的感染过程,因而要相对安全;它的给药途径是口服,护理简单方便,成本相对较低,比较容易得到推广。微囊化腺病毒可在 -20 ℃冰箱中保存(而不需要 -80 ℃保存),贮存 6 个月的微囊腺病毒存活率仍高达 79.0%,便于临床储存及使用。

综上所述,我们认为在消化道基因治疗中,将腺病毒载体微囊化可缩短其实验研究与临床应用的距离,为 Bcl-2 转染防治肠缺血再灌注损伤提供安全、高效的基因转染方法。

参考文献:

[1] 王国鹏, 谢静, 刘英鹏, 等. 腺病毒介导 bcl-2 基因转染对顺铂所致大鼠螺旋神经节细胞损伤的拮抗作用[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2009, 44(11): 930 -934.

[2] Takahashi H, Honma M, Ishida Yamamoto A, *et al*. *In vitro* and *in vivo* transfer of bcl-2 gene into keratinocytes suppresses UVB-induced apoptosis[J]. Photochem Photobiol, 2001, 74(4): 579 -586.

[3] Borodin Y I, Michurina S V, Arkhipov S A, *et al*. Expression of Intracellular Molecular Apoptosis Regulator Bcl-2 in the Liver in Isolated and Combined Exposure to 24-h Illumination and Industrial Frequency Magnetic Field[J]. Bull Exp Biol Med, 2008, 145(4): 511 -513.

[4] Inoue S, Unsinger J, Davis C G, *et al*. IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis[J]. J Immunol, 2010, 184(3): 1401 -1409.

[5] Nakao A, Kimizuka K, Stolz D B, *et al*. Carbon monoxide inhalation protects rat intestinal grafts from ischemia/reperfusion injury[J]. Am J Pathol, 2003, 163(4): 1587 -1598.

[6] Fujino Y, Suzuki Y, Kakinoki K, *et al*. Protection against experimental small intestinal ischaemia-reperfusion injury with oxygenated perfluorochemical [J]. Br J Surg, 2003, 90(8): 1015 -1020.

[7] 李晓鲁, 彭毅志, 袁志强 . 热休克蛋白 70 基因重组腺病毒载体微胶囊化及口服转染的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2003, 19(3): 145 -147.

[8] Brandt R B, Siegel S A, Waters M G, *et al*. Spectrophotometric assay for D-(-)-lactate in plasma[J]. Anal Biochem, 1980, 102(1): 39 -46.

[9] Hosoda N, Nishi M, Nakagawa M, *et al*. Structural and functional alterations in the gut of parenterally or enterally fed rats[J]. J Surg Res, 1989, 47(2): 129 -133.

[10] Madesh M, Ramachandran A, Pulimood A, *et al*. Attenuation of intestinal ischemia/reperfusion injury with sodium nitroprusside: studies on mitochondrial function and lipid changes[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1500(2): 204 -216.

[11] Isaka Y, Suzuki C, Abe T, *et al*. Bcl-2 protects tubular epithelial cells from ischemia/reperfusion injury by dual mechanisms [J]. Transplant Proc, 2009, 41(1): 52 -54.

[12] St-Hilaire R C, Kadowitz P J, Jeter J R Jr. Adenoviral transfer of vasoactive intestinal peptide (VIP) gene inhibits rat aortic and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation[J]. Peptides, 2009, 30(12): 2323 -2329.

[13] 王雷, 蒋电明. 微囊化神经组织联合脱细胞神经移植修复犬坐骨神经缺损[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(24): 2311 -2315.

(**收稿**:2010-06-01;**修回**:2010-07-01)

(编辑 王小宴)