维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2005年第14卷第5期
J Regional Anat & Operative Surg, 2005, Vol.14, No.5

介导CTLA4Ig及IκBα重组腺病毒载体对烧伤创面皮片移植的影响

李 宁[1], 吴 军[2] (1.西安体育学院运动解剖教研室, 西安 710068, 2.第三军医大学附属西南医院烧伤研究所, 重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨重组CTLA4Ig及IκBα重组腺病毒载体延长烧伤创面皮片移植存活情况。**方法** 采用Wistar大鼠36只, 随机分为3组, 1组:正常对照组, 2组:用AdCTLA4Ig液室温浸泡转染1 h, 3组:用Adv CD40LIg-IRES2-CTLA4Ig液室温浸泡转染1 h。麻醉后常规背部备皮, 在4 cm×4 cm面积上涂3%凝固汽油2 ml, 燃烧20 s, 致大鼠背部皮肤Ⅲ度烧伤, 于烧伤后第3天, 将所制备1.0 cm×2.0 cm大小长方形皮瓣移植于创面, 加压包扎。观察重组腺病毒载体转染移植物后, 在大鼠背部烧伤创面移植人断层皮肤的存活情况的影响。**结果** 重组腺病毒载体能延长大鼠烧伤创面移植人断层皮肤的存活时间。**结论** 重组腺病毒可用于延长烧伤创面异基因移植皮肤的存活期。

[关键词] CTLA4Ig; IκBα; 腺病毒, 重组; 异体移植
[中图分类号] R373 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2005)05-0314-02

Prolonging the survival of transplanted xenoskin by transfected the CTLA4Ig and IκBαlocally with recombinant adenovirus vector in rats

LI Ning, WU Jun (Department of Anatomy, Xi'an Institute of Physical Education, Xi'an 710068, China)

Abstract: Objective To observe the effect of recombinant expression vector of CTLA4Ig and IκBα on the survival time of xenoskin graft on burn wound. **Methods** A total of 36 Wistar rats established as Ⅲ degree burn on the back were randomly divided into 3 groups (n = 12 in each group): normal control (the xenoskin without any special treatment), AdCTLA4Ig group (the xenoskin was transfected with AdCTLA4Ig), and Adv CD40LIg-IRES2-CTLA4Ig group [the xenoskin was transfected with the recombinant adenovirus expression vector of CTLA4Ig and IκBα (Adv CD40LIg-IRES2-CTLA4Ig) that was constructed by means of homorecombination]. After the human skin grafts were transplanted to the burned rats, the survival time and biopsy of grafted skins were observed. **Results** The recombinant adenovirus expression vector of CTLA4Ig and IκBα could prolong the survival time of the grafted xenoskins on burn wounds in rats. **Conclusion** The recombinant Ad-CTLA4Ig-IRES$_2$ IκBα could be used to prolong the survival time of the grafted xenoskins on burn wounds.

Keywords: CTLA4Ig; IκBα; xenoskin; survival

烧伤治疗的最终目标是及时有效地覆盖封闭创面[1]。覆盖封闭创面除自体皮肤外, 异基因(异体/异种)移植皮肤是烧伤创面最佳覆盖物, 异体皮虽能暂时有效地覆盖封闭创面, 但在较短时间内被排斥。CTLA4Ig是细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4)与IgGFc段的基因重组融合蛋白, 可阻断抗原特异性T细胞活化过程起重要作用的B72CD28共刺激通路, 从而导致这类T细胞的无能或凋亡, 对控制器官移植排斥反应的发生具有重要作用。本文探讨重组CTLA4Ig及IκBα重组腺病毒载体延长烧伤创面皮片移植存活情况, 为临床及实验研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 组腺病毒载体的制备

重组腺病毒载体的制备见参考文献[1], AdCTLA4Ig由第三军医大学附属西南医院烧伤研究所提供。

1.2 烧伤创面的制备

采用Wistar大鼠36只, 体重220~250 g, 随机分为3组, 麻醉后常规背部备皮, 在4 cm×4 cm面积上涂3%凝固汽油2 ml, 燃烧20 s, 致大鼠背部皮肤Ⅲ度烧伤(经病理检查证实[3])。伤后腹腔注射生理盐水抗休克。

1.3 供皮的制备

取自无菌条件下自意外死亡健康人新鲜尸体取厚约0.4 mm断层皮肤, 用无菌生理盐水冲洗后浸入含青、链霉素各200 u/ml抗菌素生理盐水中备用, 使用前用酒精漂洗皮肤三次, 生理盐水漂洗一次。1组:正常对照组, 不做特殊处理。2组:用AdCTLA4Ig液室温浸泡转染1 h。3组:用Adv CD40LIg-IRES2-CTLA4Ig液室温浸泡转染1 h。用前将皮肤修成约1.0 cm×2.0 cm大小长方形皮瓣。

1.4 烧伤创面异基因皮肤移植

于烧伤后第3天, 将大鼠再次麻醉, 完全切除大鼠背部烧伤坏死变性组织, 彻底止血、冲洗后, 将所制备相应大小的待移植皮肤缝植于创面, 常规打包加压包扎。

1.5 术后观察指标

于术后第5天去除包扎的敷料后半暴露, 开始每天从颜

[作者简介] 李 宁(1973-), 女, 山东省济南市人, 讲师, 博士, 主要从事免疫学方面的研究。电话:(029)88409551

[收稿日期] 2005-07-12 [修回日期] 2005-08-20

维普资讯 http://www.cqvip.com

色、充盈、温度、质地等方面观察记录移植皮肤的存活情况，以坏死总面积≥90%定义为排斥反应。

1.6 统计学处理

每组动物的存活时间均用SPSS软件处理，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，$P<0.05$ 为相差显著，并行ANOVA单因素方差分析

2 结果

由实验中发现，重组腺病毒能明显延长大鼠烧伤创面异基因皮肤移植后存活时间，与阴性对照组比较有显著差异，与CTLA4Ig组比较有显著差异（$P<0.05$）。

表1 重组腺病毒对大鼠烧伤创面皮片移植的影响

组别	存活时间
对照组	9.33±1.28
CTLA4Ig group	20.83±5.71
CTLA4Ig-IRES$_2$-IκBα	28.75±6.24*#

*：与对照组比较，$P<0.05$；#：与CTLA4Ig组比较，$P<0.05$

3 讨论

如何及时有效地覆盖封闭创面，重建或恢复皮肤屏障是烧伤治疗的最终目标。除自体皮肤外，异基因（异体/异种）移植皮肤是烧伤创面最佳覆盖物，异体皮虽能暂时有效地覆盖封闭创面，但在较短时间内被排斥，如能延长异体皮在烧伤创面上的成活期，烧伤治疗水平将得到极大提高[1-3]。CTLA4Ig是细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4（CTLA4）与IgGFc段的基因重组融合蛋白，可阻断抗原特异性T细胞活化过程起重要作用的B72CD28共刺激通路，从而导致这类T细胞的无能或凋亡，对控制器官移植排斥反应的发生具有重要作用，目前国内用于诱导免疫耐受的基因治疗多采取目的基因转染腺病毒的方法，但这样的方法用于体内就存在一定的缺陷，问题在于腺病毒可以激活NF-κB从而激活DC成熟，诱导了对移植物的杀伤，利用IκBα有效的抑制NF-κB的途径可以大大的加强CTLA4Ig基因诱导免疫耐受的效果，并对CTLA4Ig在体内的表达无明显影响，因此二者在免疫耐受的诱导方面具有明显的协同作用。目前尚无类似的文献报道。

烧伤的根本问题是创面问题，大面积深度烧伤创面和焦痂的存在造成了机体体液大量的丢失，而且是多种有害介质释放及导致全身侵袭性感染的滋生地，也是引发机体超高代谢及多种器官功能衰竭的重要原因[3]。因此，临床上尽早切痂后自体微粒+大张异体皮移植已成为当今烧伤治疗领域的成功经验，然而，异体皮肤由于免疫排斥反应而坏死脱落引发创面感染，从而严重影响了自体皮肤的进一步生长扩展，使治疗效果受到极大限制。而应用免疫抑制剂虽能有效地减弱排斥反应的发生，延长移植物存活，但极易诱发因烧伤后本身机体免疫功能低下的烧伤病人发生严重的全身感染[4]。

研究表明，在免疫耐受中的抗原呈递过程中，细胞之间的信号转导是启动和维持免疫反应的关键。研究表明：体内注射CTLA4Ig阻断B7/CD28通路可以延长皮片的存活期，减轻排斥反应的发生[5]，并在部分临床实验中取得了成功[6]。NF-κB为机体基因转录过程中重要的转录激活因子，NF-κB主要是与IκB结构形成三聚体以无活性方式存在于细胞质中，当细胞受到多种外界信号的刺激进而启动第二信使系统，IκB在IκB激酶的作用下发生磷酸化并降解，NF-κB被激活并移位进入细胞核内发生一系列的基因转录，在肿瘤细胞凋亡，机体应激，炎症等方面都有重要作用。利用IκBα有效的抑制NF-κB的途径可以大大的加强CTLA4Ig基因诱导免疫耐受的效果，并对CTLA4Ig在体内的表达无明显影响，因此二者在免疫耐受的诱导方面具有明显的协同作用，重组腺病毒产生的蛋白可明显抑制NF-κB的活性，减少了相应炎症因子的表达，通过CTLA4Ig-IRES2-IκBα双基因治疗增强对移植物的保护可以同时抑制这两种因素，从而极大地促进移植物的长期存活。

[参考文献]

[1] 李 宁，袁育康，吴 军. 人CTLA4Ig，IκBα双基因共表达腺病毒载体的构建[J]. 第三军医大学学报，2005，27(2)：102－105.

[2] 易绍萱，吴 军. 人CTLA24胞外区cDNA的克隆及Ig融合蛋白表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报，2000，22(9)：834.

[3] CormackBP. FACS optimized mutants of the Aequor eavictoria green fluorescent protein [J]. Gene，1992，111(2)：229－233.

[4] Chalfie M，Tu Y，Euskirchen G，et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. Science，1994，263(5148)：802－805.

[5] Uchikoshi F，Yang ZD，Rostami S，et al. Prevention of autoimmune recurrence and rejection by adenovirus-mediatedCTLA4Ig gene transfer to the pancreatic graft in B rat [J]. Diabetes，1999，48(3)：652－657.

[6] 杨世昕，吴 军，罗高兴，等. 一种从培养上清获得高滴度腺病毒的方法[J]. 局解手术学杂志，2003，12(5)：339－340.

（编辑：郭光金）