泌尿外科学专题 文章编号:0253-3626(2009)09-1162-04

FasL 基因转染诱导大鼠肾移植免疫耐受的实验研究

徐光勇[1],张唯力[1],张荣贵[1],于圣杰[1],龚建平[2]
(重庆医科大学附属第二医院 1. 泌尿外科;2. 肝胆外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨 Fas 配体(Fas ligand,FasL)在大鼠肾移植免疫耐受中的作用及意义。方法:首先建立大鼠同种肾移植模型。实验组供肾移植前用 1 ml 含重组腺病毒 Ad-FasL 的肾脏冷保存液经肾动脉灌注;建立同种大鼠肾移植模型。分别观察电镜、免疫组织化学法、肾功能测定、生存期,比较各组间的不同。结果:Ad-FasL 治疗组肾移植受体大鼠平均存活天数为 31.3 d,与对照组的平均 9.1 d 存活时间比较,平均存活天数增加了 22 d,差异显著。Ad-FasL 治疗组的移植肾功能基本保持稳定,对照组在术后 5 d 切除对侧肾脏后血清肌酐浓度迅速上升。结论:腺病毒载体可成功介导 FasL 基因对大鼠肾脏的转染,并对移植肾起免疫保护作用、延长移植肾的存活时间。

【关键词】肾移植;基因转染;免疫耐受;大鼠
【中国图书分类法分类号】R392.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-11

The test of fas ligand gene transfection on inducing renal transplant immunotolerance in rats

XU Guang-yong, et al
(*Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of Fas ligand (FasL) gene transfection to renal allograft in rats. *Methods*: Firstly Establish renal transplantation model of rat. Secondly FasL recombinant adenovirus vector was contruccted and transduced into rat renal allografts by renal artery perfusion. Immunohistochemistry were used to detect the expression of exogenous FasI gene. Electronic microscopy was used to observe the changes in the ultrastructure. At the same time, mean survival of animals and the level of serum creatinine were observed. *Results*: Through animal experiment, we found: the mean survival time was 31.3 days in Ad-FasL treated group, whereas the the mean survival time of without treatment group was 9.1 days. The mean survival time increased 22 days in Ad-FasL treated group. There has significant difference. *Conclusions*: Adenoviral vector can successfully transfection rat kidneys with the FasL cDNA. FasL gene transfection can protect rat renal allografts from immunologic attack and prolong the allograft survival.

【Key words】Kidney transplantation; Gene transfection; Immunotolerance; Rat

FasL 基因与其受体 Fas(APO-1、CE95)在维持机体免疫系统稳定中起重要作用,Fas 为肿瘤坏死因子受体/神经生长因子受体(tumor necrosis factor receptor/nerve growth factor receptor)家族的跨膜蛋白,在不同来源的细胞上广泛表达,包括 T、B 淋巴细胞;而 FasL 仅在睾丸、眼等免疫赦免器官及一些肿瘤细胞上表达。FasL 与表达 Fas 的 T 淋巴细胞结合可诱导其凋亡。将胰岛与睾丸 Sertoli 细胞或转染 FasL 的成肌细胞共同移植,则可延长胰岛的生存时间。说明 FasL 的表达对移植物起免疫保护作用[1,2]。本试验在成功大鼠肾移植模型的基础上,观察了 Ad-FasL 治疗对肾移植大鼠存活时间、移植肾功能、排斥反应发生的影响。并采用体外 MLR 法探讨长期存活大鼠的供体特异性免疫耐受状态。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 供体为健康近交系 Lewis 大鼠,购自北京大学实验动物学部;受体为健康近交系 Wistar 大鼠,无关大鼠 SD 大鼠;购自本校动物实验中心。大鼠重 300~350 g,供体雌雄不拘,受体为雄性大鼠。室内恒温、恒湿,定期消毒。每周

作者介绍:徐光勇(1966-),男,副教授,博士,
研究方向:器官移植及前列腺疾病。
通讯作者:龚建平,男,教授,E-mail:gongjianping11@hotmail.com。

在无菌操作条件下定期更换无菌笼具、垫料和饮用水等。

1.1.2 主要试剂 质粒 pORF-FasL、pShuttle-CMV 均购自晶美生物公司;戊巴比妥钠,美国 SIGMA 公司产品;丝裂霉素 C 为日本协和发酵工业株氏会社产品;3H-TdR 为上海原子核研究所生产;RPMI-1640 为 Gibco 公司产品。新生小牛血清购自本校分子生物学教研室。血清肌酐检测试剂盒,Roche 公司产品。

1.1.3 重组 FasL cDNA 腺病毒载体的构建与鉴定 通过磷酸钙沉淀法将质粒 pACCMVpLpA-FasL 与 5 型腺病毒基因组 DNA 转染包装细胞(239 细胞)进行同源重组,获得重组腺病毒 AdVFasL, 经 PCR 鉴定后再转染 239 细胞进行病毒扩增,通过分离、纯化获得阳性重组体 AdV—FasL,而后进行空斑纯化和病毒滴度分析。得到高滴度的重组病毒 AdV_FasL(9×10^9 pfu/ml)。

1.2 方法

1.2.1 试验分组 分 2 组: Ad-FasL 治疗组;AdV-5(Pfg140)组(对照组)。每组 8 只。给药方法:Ad-FasL 局部灌注,大鼠麻醉好后,开腹,夹闭肾血管以下腹主动脉、下腔静脉、肝门血管,经腹主动脉插管先向肾动脉内注入 5 ml UW 液、随后注入 9×10^9 pfu/ml Ad-FasL 液 1 ml,灌注时间为 3 min,取左肾作为供肾,取右肾检测转染效率;对照组同 Ad-FasL 治疗组。

1.2.2 术后观察指标

1.2.2.1 一般状况 体重、生活状态,生存天数。

1.2.2.2 肾移植术后肾功能测定 所有受体大鼠分别于移植前 1 d、移植后 7 d、14 d、21 d,经尾静脉穿刺抽血 0.5~1 ml 检查血清肌酐(Scr)。

1.2.2.3 移植肾病理检查 活检移植肾须在全麻下进行。在术后第 7 d,各组大鼠随机取 2 只,以活检针穿刺移植肾脏组织,每次取肾组织 1、2 条。每次穿刺部位均固定在移植肾的下极。以上各组大鼠活检移植肾组织分别作常规病理切片检查,光镜观察并拍照。

1.2.2.4 电镜检查 取上述各组术后 7 d 的大鼠活检移植肾组织,戊二醛固定,作常规透射电镜检查。

1.2.2.5 移植肾存活期间受体大鼠免疫反应状态 供体 LEWIS 大鼠和无关 SD 大鼠脾细胞作为刺激细胞,存活至术后 21 d 的 Ad-FasL 治疗组大鼠脾细胞作为反应细胞,进行混合培养,以 H3-TdR 法检测前二者刺激后者的增殖反应;以供体大鼠和无关 SD 大鼠脾细胞刺激正常 Wistar 大鼠(n=5)脾细胞的增殖反应作为对照,3H-TdR 掺入法观察受体大鼠对供体大鼠及无关大鼠免疫反应状态的变化。

1.2.2.6 免疫组织化学检测 大鼠肾移植术后 7 d,取移植物标本,固定包埋,行苏木精 - 伊红(HE)染色。卵白素—生物素—过氧化物酶复合物(SABC)法测定 FasL 表达情况。

1.3 统计处理

采用 SPSS 统计软件对移植肾存活时间采用方差分析;同组肾功能前后比较采用配对 t 检验;组间肾功能以及脾细胞增殖反应比较采用非配对 t 检验。

2 结 果

2.1 受体大鼠存活天数

Ad-FasL 治疗组的同种异体肾移植受体大鼠平均存活天数为 31.3 d,与对照组的平均 9.1 d 存活时间比较,平均存活天数增加了 22 d,差异显著。见表 1、图 1。

表 1 Ad-FasL 对大鼠移植肾存活时间的影响

组别	鼠数	每只大鼠存活天数(d)	$\bar{x}\pm s$
Ad-FasL 组	8	9,19,25,28,33,36,49,51	31.3 ± 14.3
对照组	8	6,7,8,8,9,10,12,13	9.1 ± 2.4

注:P<0.01,与对照组相比

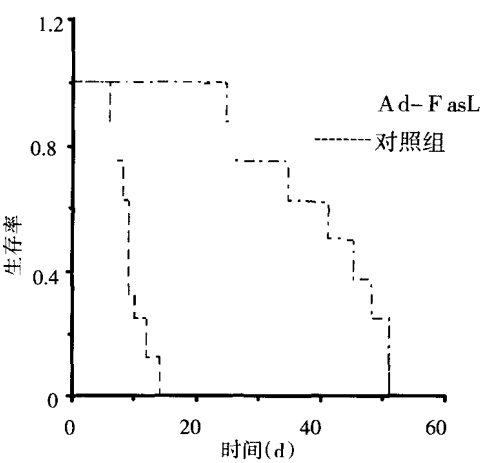


图 1 大鼠移植肾的 Kaplan-Meier 生存曲线

2.2 移植肾功能测定

Ad-FasL 治疗组的移植肾功能基本保持稳定,对照组在术后 5 d 切除对侧肾脏后血清肌酐浓度迅速上升。见表 2。

2.3 移植肾组织光镜改变

取同一时相点(术后 7 d)移植肾活检组织进行 HE 染色观察到,对照组可见严重的排斥反应和局部缺血损害:组织充血、水肿,淋巴细胞浸润,近曲小管上皮变性、坏死常见; Ad-FasL 组移植肾组织结构完整,未见到明显的排斥反应组织病理学特征表现。见图 2、3。

2.4 移植肾组织电镜改变

透射电镜观察显示对照组移植肾间质水肿、淋巴细胞浸润明显;肾小球系膜区基质丰富,系膜细胞增生;小管上皮空泡变性、坏死常见。Ad-FasL 治

表 2　Ad-FasL 对大鼠移植肾功能的影响

组别	各时间段血清肌酐浓度（μ mol/L）			
	术前 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
Ad-FasL 组	43.1 ± 12.1	43.6 ± 11.7	49.1 ± 8.7	-
对照组	41.4 ± 10.4	373.1 ± 111	-	55.1 ± 13.5

注：术后 7 d，$P<0.01$，与对照组相比

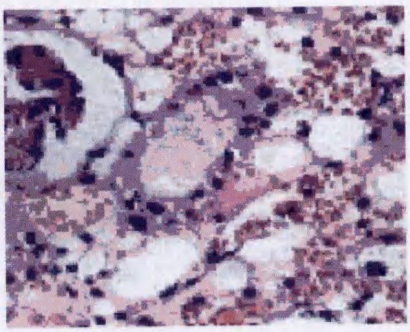


图 2　对照组大鼠移植肾组织 HE 染色结果，淋巴细胞浸润、间质出血（HE，×100）

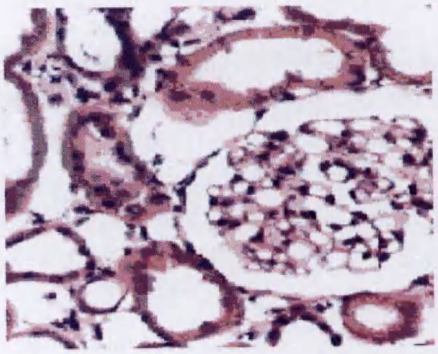


图 3　Ad-FasL 治疗组大鼠移植肾组织 HE 染色结果（HE，×100）

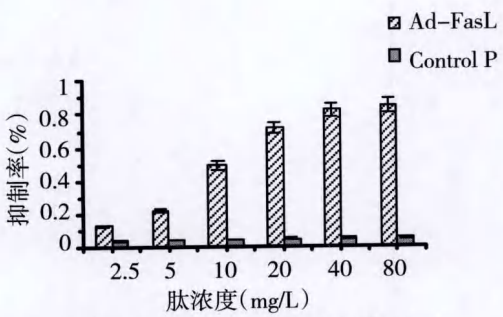


图 4　Ad-FasL 对体外大鼠脾细胞 MLR 增殖的影响

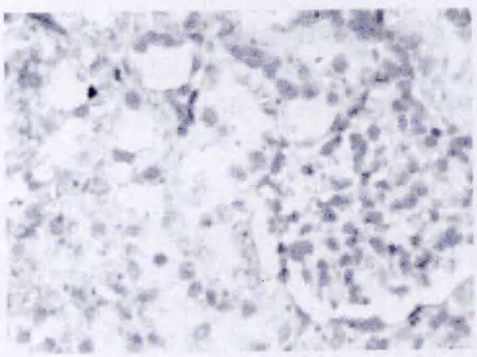


图 5　对照组大鼠肾组织 FasL 表达免疫组化染色，胞膜呈弱阳性着色（×100）

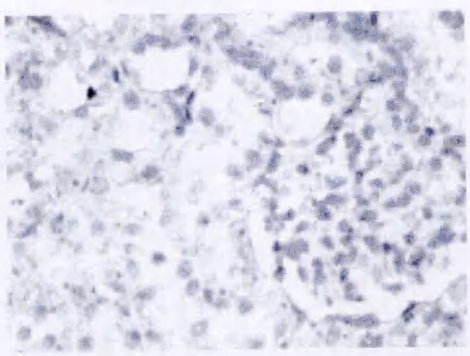


图 6　Ad-FasL 组大鼠肾组织 FasL 表达免疫组化染色，胞膜呈强阳性着色（×100）

疗组显示基底膜正常，小管上皮改变轻，未见明显间质淋巴细胞浸润。

2.5　长期存活受体大鼠免疫状态的检测

Ad-FasL 对大鼠脾细胞 MLR 的影响：图 4 可见。Ad-FasL 对淋巴细胞增殖具有明显的抑制作用，无关对照肽对 MLR 没有影响，二者相差有统计学意义（$P<0.01$）。Ad-FasL 的抑制率大约是 Control p 的 6 倍以上。图 4 Ad-FasL 对体外大鼠脾细胞 MLR 增殖的影响

混合淋巴细胞培养结果提示，长期存活的受体鼠脾细胞对供体脾细胞不表现出明显细胞增殖反应，而对第三方脾细胞仍能产生较明显的增殖反应，表明已经诱导出供体特异性的移植免疫耐受。

2.6　免疫组织化学检测

Ad-FasL 转染组在移植术后 7 d，抗 FasL 抗体检查见肾脏中 FasL 表达呈强阳性。见图 5、6。

3　讨　论

有研究表明，Fas/FasL 系统介导的凋亡引起移植排斥反应，参与了移植物的损害[3]。可能的过程

为:浸润移植物的单核细胞,包括 T 细胞表达 FasL,诱导 Fas 阳性的移植物细胞凋亡。睾丸作为免疫豁免部位,可接受异体组织,是因为浸润移植物的活化淋巴细胞表达有 Fas,睾丸中表达 FasL 的 Sertoli 细胞可以诱导介导移植物排斥活化的 T 细胞凋亡[4]。Korbutt[5]将足够数量的 Lewis 鼠睾丸细胞聚合物与同种胰岛一起移植,可使移植胰岛获得免疫豁免。如果通过转基因技术使移植的组织表达 FasL 分子,这样可使进入移植物内活化的表达 Fas 的 T 细胞凋亡,从而模拟体内天然的免疫豁免组织,免遭免疫细胞的攻击[6]。

本研究在成功建立大鼠肾移植模型的基础上,通过构建成的 Ad-FasL 腺病毒重组体,探讨其抑制排斥反应的作用。结果显示:单剂量局部灌注 9×10^9 pfu/ml Ad-FasL,可在受体大鼠诱导形成供体特异性的耐受。在移植术后第 21 d,受体脾细胞对供体脾细胞的应答显著降低,而对无关第三者应答正常;而且,耐受大鼠细胞毒 T 细胞对供体脾细胞的细胞毒活性显著降低。其原因可能是减小同种反应性 T 细胞库,从而抑制急性排斥反应发生,促进移植物存活期延长。

FasL 诱导移植免疫耐受具有两重性。FasL 如果能适量地表达,对维持机体内环境的稳定具有重要作用,而一旦其过量或过低地表达,将带来危害。FasL 表达过低会引起淋巴细胞增殖,易患白血病、淋巴瘤;而当 FasL 过量表达时会出现明显的组织损伤[7]。故转 FasL 基因时必须考虑其表达产物的浓度,过量表达将导致移植物的损伤。以上两重性提示在应用 FasL 诱导移植免疫耐受时要注意 FasL 的可控性;在转基因治疗中要严格掌握转染的方式及剂量。我们在研究中采用供体肾局部灌注转染 Ad-FasL,经检测能有效地转染肾脏,较好地解决了 Ad-FasL 的过量表达所引起的毒性反应。

本实验在成功建立大鼠肾移植模型的基础上观察到,围手术期应用腺病毒重组 FasL 基因(Ad-FasL),能显著延长同种大鼠移植肾脏的存活时间,平均 31.3 d,与对照组的平均 9.1 d 存活时间比较,平均存活天数增加了 22 d。差异非常显著。组织学检查发现,与对照组比,Ad-FasL 组发生动脉炎较轻,有人认为可能与排斥反应有关,但其确切原因还需进一步研究[8]。

从以上结果得知,腺病毒介导的 Ad-FasL 基因转移可有效延长异基因大鼠肾脏移植物的存活,其机制与同种反应性 T 细胞的删除及调节性 T 细胞有关。但值得注意的是,本研究中虽有个别异基因肾脏移植物存活超过了 40 d,但多数存活时间依然不够理想,究其原因可能是:(1)T 细胞活化的多途径和多时相,使 Ad-FasL 不能从完全意义上删除受体体内同种反应性 T 细胞;(2)随着时间推移,Ad-FasL 在受体体内表达水平下降,不足以维持有效浓度,从而不能删除新生的反应性 T 细胞,最终导致异基因肾脏移植物被排斥。总之,FasL 应用于临床器官移植,亟待解决的是寻找控制中性粒细胞反应及浸润粒细胞凋亡的方法。以及如何使其诱导的耐受长期维持,还有待进一步的深入研究。

参 考 文 献

[1] Xiao S, Marshak-Rothstein A, Ju S T. Spl is the major fasl gene activator in abnormal CD4(-)CD8(-)B220(+)T cells of lpr and gld mice [J].Eur J Irmmunol, 2001, 31: 3339-3348.

[2] Turvey S E, Gonzalez-Nicolini V, Kingsley C I, et al.Fas ligand transfected myoblasts and islet cell transplantation[J]. Transplanta-tion, 2000, 69: 1972-1976.

[3] Kabelitz D. Apoptosis, graft rejection, and transplantation toler-rice [J]. Tran splantation, 1998, 65: 869-875.

[4] Yamagami S, Kawashima H, Tsuru T, et al.Role of Fas-Fas ligand interactions in the immunorejection of allogeneic mouse corneal transplants[J]. Transplantation, 1997, 64: 1107-1111.

[5] Korbutt G S, Elliott J F, Raiotte R V.Cotransplantation of allogeneicislets with allogeneic testicular cell aggregates allows long-term graft survival without systemic immunosuppression[J]. Diabetes, 1997, 46: 317-322.

[6] Reddy S, Ross J M. Fas and Fas ligand immunoexpression in pancreatic islets of NOD mice during spontaneous and cyclophosphamide-accelerated diabetes[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1005(1): 166-169.

[7] Ke B, Buelow R, Shen X D, et al. Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway[J]. Hum Gene Ther, 2002, 13 (10): 1189-1199.

[8] Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M.Immunohistochemical study of endothelin-1 (ET-1) in human acute renal allograft rejection[J]. Pol J Pathol, 2003, 54(2): 95-100.

(责任编辑:冉明会)