DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.12.014
第26卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 12
1068 2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)12-1068-03

CD154胞外区基因局部修饰对大鼠移植肾存活的影响

冯嘉瑜[1],张艮甫[1],王平贤[1],范明齐[1],贺伟峰[2] (第三军医大学:[1]新桥医院泌尿外科,全军肾脏病中心,重庆 400037;[2]西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察CD154胞外区基因局部修饰大鼠供肾对延长移植肾存活的效能。方法 以CD154基因重组腺病毒为载体,将CD154胞外区基因转入BN大鼠供肾,以Lewis大鼠为受体,行同种肾移植为转染组,并以未转染BN供肾移植给Lewis受体为对照组;观察移植肾存活时间和术后肾功能变化。结果 转染组移植肾存活(28±7.3)d,较对照组移植肾存活时间(8.6±1.2)d明显延长;移植组术后血清肌酐较同期对照组明显为低。结论 CD154基因局部转染可明显延长移植肾存活时间。

关键词:CD154;基因治疗;肾脏移植;共刺激信号
中图法分类号:R394.3;R699.2 文献标识码:A

Effects of local gene transfection in CD154 extracellular domain on the survival of renal allografts

FENG Jia-yu[1], ZHANG Gen-fu[1], WANG Ping-xian[1], FAN Ming-qi[1], HE Wei-feng[2] ([1]Department of Urology, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the efficacy of local gene transfection in CD154 extracellular domain on the survival of renal allografts. **Methods** The kidneys of Brown-Norway (BN) rats were transfected with CD154 extracellular domain gene-recombined adenovirus. The transfected kidneys were transplanted to Lewis rats (transfection group). BN→Lewis kidney transplantation with non-transplanted kidneys served as the controls. The allograft survival time and the allograft function between the two groups were compared. **Results** The allograft survival time of the transfection group was longer than that of the controls significantly [(28±7.3)d *vs* (8.6±1.2)d, $P<0.05$]. The serum creatinine of the transfection group at 8 d after operation was lower than that of the controls at 8 d after operation [(67.4±8.1) μmol/L *vs* (514.9±67.4) μmol/L, $P<0.001$]. **Conclusion** Local transfection of CD154 extracellular domain gene can prolong the survival time of renal allografts significantly.

Key words: CD154; gene therapy; kidney transplantation; costimulatory signal

CD40-CD154是除B7-CD28之外又一个重要的共刺激信号分子[1]。研究显示,使用CD154单克隆抗体可以显著的延长移植物的存活时间[2,3],但是CD154单克隆抗体全身应用会导致不可预料的血栓性并发症[1],而且全身应用CD154单克隆抗体特异性较差。本实验用CD154基因转染的大鼠肾脏进行同种移植,对CD154胞外区基因局部修饰大鼠供肾延长移植肾存活的效能进行观察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 重组腺病毒AdvCD154-IRES2-EGFP 由本实验室构建,滴度为5.4×10^9 pfu/ml。

1.1.2 近交系大鼠 BN大鼠(Brown Norway, RT.1n),购自中国医学科学院实验动物繁育场,为肾移植供体,共10只;Lewis大鼠(RT.11),购自北京维通利华实验动物种子中心(国家级实验动物种子中心),为肾移植受体,共10只;所有大鼠体质量为270~300 g,雌雄不拘。

1.1.3 手术器材 手术显微镜为江苏镇江中天光学仪器厂生产的XTS-6A手术显微镜。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200264),国家自然科学基金资助重点项目(39934302)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200264) and the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (39934302)
作者简介:冯嘉瑜(1974-),男,四川省南充市人,硕士,医师,主要从事器官移植的移植耐受的基础研究,肾脏移植免疫耐受诱导策略方面的研究。电话:(023)68774624
通信作者:贺伟峰,E-mail:heweifeng7412@yahoo.com.cn
收稿日期:2004-03-23;修回日期:2004-05-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.1.4　药品　　1%戊巴比妥钠、肝素、青霉素钠针、0.9%生理盐水。

1.2　方法

1.2.1　供肾转染和检测　　参考黄赤兵等[4]的方法, 略加改进: 供体 BN 大鼠在 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(40 mg/kg)下开腹, 夹闭肾血管以下腹主动脉、下腔静脉、肝门血管, 经腹主动脉插管向肾动脉内注入 AdvCD154-IRES2-EGFP 转染液 1~2 ml, 每隔 1 h 加注 AdvCD154-IRES2-EGFP 转染液 1~2 ml, 共转染 3 h。摘取左肾作为转染组供肾; 摘取右肾检测转染效率。经肾动脉灌注肝素生理盐水将双肾血管中血液冲洗干净。右肾移植给 Lewis 大鼠受者 2 d 后切取移植肾, 冰冻切片, 以免疫荧光法在激光共聚焦显微镜下观察荧光染色部位及强度, 以明确转染效率, 以未经转染的供肾作为转染效率检测对照。

1.2.2　肾移植　　按照黄赤兵等[5]介绍的大鼠肾移植模型[6], 采用显微外科技术进行。以基因转染的 BN 供肾移植给 Lewis 受体大鼠为转染组(n=10), 以未转染的 BN 供肾脏移植给 Lewis 受体大鼠为对照组(n=10), 计算从肾移植至受体大鼠停止排尿的时间为移植肾存活时间。移植肾停止排尿后第 1 天将其切除, 行病理学检查。手术失败者未纳入统计。

1.2.3　移植肾功能测定　　所有受体分别于移植前第 4 天、移植后第 8、20 天在手术显微镜下经股静脉穿刺抽血 0.5~1 ml 检查血清肌酐(Scr)浓度。

1.2.4　移植肾病理检测标准　　参考人 Banff'97 标准[7]。

1.3　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 软件行重复测量的 F 检验及均数间多重比较, 独立 t 检验。

2　结果

2.1　腺病毒对移植肾的转染

免疫荧光检测显示: 对照组肾脏内未见特异性荧光; 转染组肾小管可见明显的 EGFP 绿色荧光, 肾小球绿色荧光稍弱。

2.2　移植肾存活时间

对照组大鼠在移植 1 周后即出现萎靡并停止排尿; 而同时转染组大鼠饮食、活动、排尿正常, 至移植 20 d 以后才陆续出现以上表现, 对照组大鼠平均存活时间为 8.6 d, 转染组大鼠平均存活时间为 28 d, 移植肾存活时间较对照组明显延长(t=−19.17, P<0.001)。

2.3　移植肾功能变化

对照组大鼠术后第 8 天移植肾功能已衰竭, 术后第 13 天已全部死亡; 对照组大鼠第 8 天血清肌酐浓度较转染组第 8 天明显升高(F=41.478, P<0.001)(表 1)。

表 1　移植前后大鼠血肌酐的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Rat serum creatinine before and after transplantation ($\bar{x}\pm s$)

Group	Serum creatinine (d)	
	4 d before transplantation	8 d after transplantation
Transfection	50.1±6.0$^{\triangle}$	67.4±8.1**
Control	51.3±6.2	514.9±67.4

$\triangle$: P>0.05 *vs* control; **: P<0.01 *vs* control

2.4　病理学检查

光镜下, 两组移植肾的 HE 染色切片均显示肾小管区和间质区广泛淋巴细胞浸润。对照组见部分小动脉出现透壁性坏死, 伴有大量淋巴细胞浸润(Banff 分级 III级); 转染组血管排斥反应轻于对照组, 但也可见内皮细胞脱落坏死和淋巴细胞浸润现象(Bnaff 分级 II 级)。

3　讨论

尽管本实验采用了转染效率较高的腺病毒作为 CD154 胞外区基因转染载体, 但采用单纯经肾动脉注射的方法, 腺病毒难以有效转染离体或在体肾脏, 而肝脏是转染效率最高的器官[8]。黄赤兵等[4]通过转染前阻断肝脏血流使在体肾脏获得了有效转染。本实验在阻断肝脏血流的基础上, 进一步阻断了肾血管以下的躯体血流, 减少了腺病毒的消耗, 结果使供肾中肾小管获得了有效转染。肾小球转染效果欠佳, 表明在体血管内皮细胞对腺病毒具有转染抗性。本实验中重组腺病毒可能通过内皮细胞间隙进入肾小管。

CD40-CD40L 和 B7-CD28/CTLA4 是协同刺激信号中最重要的两对分子[1,6,9]。CD40L (CD154)作为 CD40 的配体, 主要表达于活化的 T 细胞表面, 它与 B 细胞表面 CD40 的结合, 对 B 细胞产生抗体及抗体的类别转换有重要作用[3]。新近的研究表明, CD40L 分子不仅与移植排斥、而且还与多种免疫性疾病的发生有关[1], 已通过封闭 CD40-CD40L 通路在多种动物模型中诱导了移植耐受[2,10,11], 但在全身使用 CD154 单克隆抗体时出现了血栓性并发症, 导致 CD154 单克隆抗体的应用受到限制, 本研究所使用的 CD154 胞外区作为该信号通路的阻断剂在局部对供肾进行基因修饰, 提高了特异性, 避免了上述并发症。

肾脏内树突状细胞(DC)、以及血管内皮细胞具有抗原提呈功能。由于啮齿类动物内皮细胞不表达 MHC II类抗原, 无抗原提呈功能, 因此本组肾脏内抗原提呈细胞主要是 DC。推测其机制为: 肾脏表达的 CD154 胞外区与其中 DC 表面 CD40 结合, 阻断 CD40-CD154 共刺激信号, 诱导 T 细胞发生无能或凋亡, 使排斥反应延迟发生或程度减弱, 移植肾存活时间延长。但目前对 CD154 胞外区基因局部转染延长移植物肾存活的确切机制了解不多, 有待深入研究。

参考文献:

[1] Yamada And A, Sayegh M H. The CD154-CD40 costimulatory pathway in transplantation[J]. Transplantation, 2002, 73(1 Suppl): S36—39.

[2] Xu H, Tadaki D K, Elster E A, *et al*. Humanized anti-CD154 antibody therapy for the treatment of allograft rejection in nonhuman primates[J]. Transplantation, 2002, 74(7): 940—943.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[3] Yin D, Ma L, Varghese A, *et al*. Intact active bone transplantation synergizes with anti-CD40 ligand therapy to induce B cell tolerance[J]. J Immunol, 2002, 168(10): 5352—5358.
[4] 黄赤兵, 吴 军, 方玉华, 等. 共刺激信号阻断剂基因局部转染对大鼠移植肾存活的影响[J]. 中华器官移植杂志, 2003, 24(6): 354—355.
[5] 黄赤兵, 方玉华, 吴 军, 等. 应用新技术建立大鼠肾移植模型[J]. 中华器官移植杂志, 2001, 22(2): 114.
[6] 姜 庆, 方玉华, 吴 军. CTLA4Ig 在诱导小鼠心脏移植免疫耐受中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(11): 1050—1052.
[7] Racusen L C, Solez K, Colvin R B, *et al*. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology[J]. Kidney Int, 1999, 55(2): 713—723.
[8] Fechner H, Haack A, Wang H, *et al*. Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting *in vivo* indicating anatomical vector barriers[J]. Gene Ther, 1999, 6(9): 1520—1535.
[9] 李 彦, 吴 军, 易绍宣, 等. CD40 及 CTLA4 模拟小分子肽诱导免疫耐受的实验研究[J]. 重庆医学, 2002, 31(8): 650—654.
[10] Pearson T C, Trambley J, Odom K, *et al*. Anti-CD40 therapy extends renal allograft survival in rhesus macaques[J]. Transplantation, 2002, 74(7): 933—940.
[11] Xu H, Elster E A, Blair P J, *et al*. Effects of combined treatment with CD25- and CD154-specific monoclonal antibodies in non-human primate allotransplantation[J]. Am J Transplant, 2003, 3(11): 1350—1354.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)12-1070-02

腹腔镜全结肠切除术治疗慢传输性便秘的围手术期护理

Perioperative nursing of total colectomy with laparoscope for treating slow transit constipation

雷 英, 刘宝华, 张连阳, 童 卫东 （第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科, 重庆 400042）

我科自 2002 年 5 月以来采用腹腔镜全结肠切除治疗慢传输性便秘 8 例, 取的了良好效果。现就 8 例病人术前、术后护理经验总结如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

2002 年 4 月至 2003 年 10 月行腹腔镜全结肠切除术治疗慢传输性便秘 8 例, 男 1 例, 女 7 例, 年龄 29～67 岁, 平均年龄 48 岁。

1.2 手术方法

手术常规采用全麻, 截石位。建立 CO_2 气腹。8 例中 6 例采用手助腹腔镜方式。其中伴随有直肠内脱垂的 5 例患者术中同时行直肠悬吊、子宫前位固定术, 切除全结肠, 回肠、直肠一期吻合。

1.3 结果

平均住院时间 10～15 d, 术后发生左胸腔积血 1 例, 无吻合口漏发生, 无死亡。术后肛门排便后用异蒙停 2 mg, 1～2 次/日, 可将大便控制在 1～5 次/日, 此后逐渐减少。无肛门湿疹发生。

2 术前护理

2.1 心理护理

慢传输性便秘患者一般病程长, 经长期内科保守治疗无效致使患者表现出焦虑、抑郁等心理状态, 且因对手术效果不了解, 治疗信心不足, 故应耐心的做好思想工作, 向患者介绍该手术的特点及同种疾病的治疗效果, 以取得患者的信任和合作。

2.2 肠道准备

饮食和一般肠道准备与普通开腹手术相同, 术前 3～5 d 进食少渣饮食, 术前 3 d 口服肠道抗生素(甲硝唑、硫酸卡那霉素)。术前 1 日上午口服蓖麻油 30 ml, 下午予 20% 甘露醇 250 ml＋温开水 1 000 ml, 45 min 内服完, 密切观察病员有无过度脱水、晕厥、虚脱症状, 8 例无上述症状出现。排出大便清亮无渣, 则肠道准备完毕。对于年老体弱、心肾功能不全者, 术前 3 d 口服缓泻剂, 术前 1 d 及术晨清洁灌肠直至排出大便清亮无渣为止。

3 术后护理

3.1 术后常规护理

全麻术后常规护理: 吸氧 2～3 L/min; 平卧 6 h 后, 病情平稳去取半卧位。监测生命体征 2 h 至病情平稳。本组病人术后 1～2 d 生命体征平稳; 术后 3～4 d 下床活动。术后常规补液、抗感染治疗。由于全结肠切除后影响水分吸收, 术后早期腹泻严重, 可丢失大量体液及电解质, 应加强临床观察, 监测血生化, 随时调整。

3.2 病情观察与护理

3.2.1 腹腔出血 术后 24～48 h 易发生出血, 应密切观察有无腹痛、腹胀、压痛、反跳痛、移动性浊音; 观察有无口渴、面色苍白、脉速、血压下降等休克症状; 观察腹部切口敷料有无渗血、渗液; 腹腔引流液的量、性状。术后 3 d 每日查血常规, 观察有无内在出血。

作者简介: 雷 英(1974—), 女, 四川省自贡市人, 护师, 主要从事大肠肛门疾病护理方面的研究。电话: (023)68757248

收稿日期: 2004-03-15; 修回日期: 2004-05-30

（下转 1078 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net