DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.05.006

论著

文章编号:1000-5404(2004)05-0390-03

腺病毒介导CTLA-4Ig基因转染对大鼠移植肾存活的影响

黄赤兵[1],吴 军[2],易绍萱[2],罗高兴[2],贺伟峰[2],陈希炜[2],方玉华[2],张银甫[1] (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,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨CTLA-4Ig基因重组腺病毒(AdvCTLA-4Ig)有效转染大鼠肾脏的方法并初步观察该基因转染对移植肾存活的影响。方法 AdvCTLA-4Ig对大鼠肾脏分别转染3 h,包括:4 ℃下转染(A组)、经肾动脉注射在体转染(B组)、阻断肝脏血流以及肾血管以下躯体血流后经肾动脉注射在体转染(C组)以及对照;以免疫荧光法检测基因转染效率;以转染效率最高组肾脏行同种移植,未转染组为对照,观察移植肾存活时间。结果 A组、B组以及对照组肾脏内未见荧光显示,C组肾小管显示阳性荧光,肾小球内未见荧光显示;各组肾脏光镜下结构正常;转染组移植肾存活时间较对照组明显延长(26.6±6.9) d *vs* (8.1±1.60) d, $P<0.01$。结论 高滴度CTLA-4Ig基因重组腺病毒可使在体肾脏中肾小管获得有效转染;该基因转染的肾脏移植后存活时间明显延长。

关键词:基因;转染;肾脏移植

中图法分类号:R392.2;R617;R692 文献标识码:A

Effects of adenovirus-mediated CTLA-4Ig gene transfection into rat kidney on the survival rate of kidney as donor for transplation

HUANG Chi-bing[1], WU Jun[2], YI Shao-xuan[2], LUO Gao-xing[2], HE Wei-feng[2], CHENG Xi-wei[2], FANG Yu-hua[2], ZHANG Yin-fu[1]([1]Department of Urology, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the methods of effective transfection of CTLA-4Ig gene into rat kidneys and the effects of gene transfection on the survival time of renal allografts. Methods BN (Brown Norway, RT.1n) rats were randomized into 4 groups according to the methods of kidney transfection by CTLA-4Ig gene-recombinant adenovirus (AdvCTLA-4Ig, 5×10^9 pfu/ml): transfection at 4 ℃ *in vitro* (group A), transfection *via* renal artery injection of AdvCTLA-4Ig (group B), transfection *via* renal artery injection of AdvCTLA-4Ig after ligation of the liver vessel and the aorta and the vena cava below the renal vessel (group C) and the control group (D). The transfection efficiency of AdvCTLA-4Ig was determined by immunofluorescence method. The kidneys with the highest transfection efficiency were transplanted into Lewis rats (transfection group). BN→Lewis kidney transplantation with non-transplanted kidneys served as the controls. The allograft survival time was observed. Results The results showed that no specific fluorescence was observed in kidneys in group A, group B, and the control group. However, evident specific fluorescence was observed in kidneys in group C. The transfection occurred in tubular cells, but no transfection was observed in glomerular structure. The allograft survival time in transfection group was significantly longer than that of the controls [(26.6±6.9) d *vs* (8.1±1.6) d, $P<0.01$]. Conclusion The rat kidney (mainly the tubular cells) could be transfected efficiently by high titer AdvCTLA-4Ig *in vivo*, and the survival time of renal allografts could be prolonged by local transfection of CTLA-4Ig gene.

Key words: gene; transfection; kidney transplantation

免疫调节分子CTLA-4Ig可以阻断T细胞激活过程中所需的B7-CD28共刺激通路,诱导移植抗原特异性免疫反应低下状态,延长移植物存活。近年研究表明,将免疫调节分子基因导入移植器官,使其仅在移植器官局部表达同样可以明显延长移植物的存活,甚至达到较全身应用免疫调节分子更好的效果[1]。本研究

作者简介:黄赤兵(1963-),男,江西省南昌市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肾脏移植方面的研究,发表论文23篇。电话:(023)68755141

收稿日期:2002-12-10;修回日期:2003-08-12

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

观察了不同条件下 CTLA-4Ig 基因重组腺病毒转染移植肾的效率, 以筛选出有效转染的方法, 并初步观察了该基因转染延长移植肾存活的效能。

1　材料与方法

1.1　实验材料

重组腺病毒 AdvCTLA-4Ig, 西南医院烧伤实验室构建[2], 滴度为 5×10^9 pfu/ml。近交系大鼠 BN (Brown Norway, RT.1n) 32 只, 购自中国医学科学院实验动物繁育场, 为肾移植供体; Lewis (RT.11) 12 只, 购自北京医科大学实验动物学部, 为肾移植受体; 所有大鼠重 300～350 g, 雌雄不拘。FITC 标记的 V 型腺病毒抗体购自美国 Virostat。XTS-6A 手术显微镜(江苏镇江中天光学仪器厂), 冰冻切片机(英国 Shandon), TCS-NT165123 激光共聚焦显微镜(德国 Leica)

1.2　方法

1.2.1　动物分组和肾脏转染　　肾移植供体 BN 大鼠 20 只为转染研究对象, 各组大鼠均为 5 只, 按以下方法进行分组: A 组: 摘取大鼠左肾, 用 4 ℃灌注液(含肝素钠 125 U/ml 的生理盐水)将其中血液灌注干净, 然后用血管夹于近肾门处夹闭肾静脉, 经肾动脉插入钝针头, 向肾动脉内注入 4 ℃的 AdvCTLA-4Ig 液, 至肾静脉饱满为止, 用量约 1 ml, 完全退出针头前用血管夹夹闭肾动脉, 防止 AdvCTLA-4Ig 液外溢。置肾脏于 4 ℃下转染 3 h。B 组: 大鼠于麻醉下开腹, 将肾血管以下腹主动脉暂时夹闭, 经近端腹主动脉向肾动脉内注入 AdvCTLA-4Ig 液 3～5 ml 后松开远端腹主动脉血管夹, 每隔 1 h 加注 AdvCTLA-4Ig 液 1～2 ml, 共转染 3 h。C 组: 大鼠于麻醉下开腹, 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 AdvCTLA-4Ig 液 3～5 ml, 每隔 1 h 加注 AdvCTLA-4I 液 1～2 ml, 共转染 3 h。D 组: 正常肾脏对照。

1.2.2　AdvCTLA-4Ig 对大鼠肾脏转染效率的检测　　各组肾脏摘取后用肝素生理盐水经肾动脉灌注冲洗肾血管中残存的 AdvCTLA-4Ig 液, 肾脏保存于液氮中, 冰冻切片, 用 FITC 标记的腺病毒抗体行肾脏腺病毒免疫荧光检测, 方法如下: 冰冻切片组织贴附于载玻片上, －20 ℃丙酮固定, 4 ℃保存备检。组织片用 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次; 0.01 mol/L PBS-T(含 0.1% Tween20)稀释的 10%牛血清白蛋白封阻液, 37 ℃, 30 min; 滴加 FITC 标记的 V 型腺病毒抗体(1∶1 000), 37 ℃, 暗盒内孵育 30 min; 0.01 mol/L PBS-T 漂洗 5 min×3 次; 用 5%缓冲甘油封片后在激光共聚焦显微镜下观察荧光染色部位及强度, 各组标本每张片选一典型图像, 计算 5 个肾小管、肾小球平均荧光强度。

1.2.3　转染对肾脏组织学的影响　　各组肾脏常规切片, HE 染色, 光镜下观察肾脏组织学变化。

1.3　肾移植

按本实验室模型[3]进行。根据上述检测结果, 以基因转染效率最高组的的方法转染 BN 供肾并移植给 Lewis 受体大鼠为转染组($n=6$), 以未转染的 BN 供肾脏移植给 Lewis 受体大鼠为对照组($n=6$), 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。

1.4　统计学处理

对 4 组肾脏中肾小管、肾小球腺病毒免疫荧光强度进行方差分析; 对两组移植肾存活时间采用 t 检验。

2　结果

2.1　不同条件下 AdvCTLA-4Ig 对大鼠肾脏的转染效率

肾脏切片以腺病毒免疫荧光抗体处理后, 在激光共聚焦显微镜下观察到: 4 ℃转染组(A 组)、经腹主动脉注射病毒的全身转染组(B 组)与正常对照组一样, 肾脏内未显示特异性荧光; 阻断肾脏以下血流以及肝脏和肠道血流后再经腹主动脉→肾动脉注射腺病毒转染的肾脏(C 组)肾小管显示明显的特异性荧光染色(图 1); 4 组肾小球均未显示特异性荧光; 激光共聚焦图像分析结果显示: A、B、C、D 组肾小管荧光强度无显著差异; C 组肾小管荧光强度明显高于其他 3 组, D 组肾小球荧光强度无显著差异(表 1)。



图 1　阻断肝脏、肾脏以下血流后脉病毒转染肾脏的免疫荧光检测, 肾小管显示照亮的特异性荧光, 肾小球无特异性荧光显示 (×200)

Fig 1　Expression of adenovirus mainly in renal tubular cells by means of immunofluorescence (×200)

表 1　四组大鼠肾脏中腺病毒免疫荧光强度比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Comparison of the immunofluorescent intensities of adenovirus in kidneys in each group ($\bar{x}\pm s$)

Group	Immunofluorescent intensity (u/μm²)	
	Tubular cell	Glomerular structure
A	37.1±5.7#	16.9±1.8
B	35.9±4.2#	17.0±1.9
C	67.1±8.4	16.5±2.7
D	33.7±3.9#	17.2±2.2

#: $P<0.01$, *vs* group C

2.2　转染对肾脏组织学的影响

各组转染肾脏均显示正常组织结构。

2.3　移植肾存活时间

对照组大鼠在移植 1 周后均出现萎靡并停止排尿; 而同时

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

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；转染组移植肾存活时间较对照组明显延长（26.6±6.9）d *vs*（8.1±1.6）d（$P<0.01$）。

3 讨论

CTLA4-Ig 为一种强效的共刺激分子阻断剂，实验研究中，其全身应用可明显延长移植物的存活时间[4]，但其所需剂量大、价格昂贵，而且特异性差，可能导致受体对同时存在的病原体的耐受，诱发感染。而 Guillot 等[1] 发现，CTLA-4Ig 基因心脏局部转染可使心脏移植物获得长期存活（>100 d），而全身应用 CTLA-4Ig 仅能使其延长存活至术后 22 d，表明 CTLA-4Ig 在移植物的局部表达可以更有效延长移植物的存活。理论上，CTLA-4Ig 在移植物的局部表达对机体其他免疫功能的正常发挥影响很小，有可能提供一种具有高度抗原特异性的诱导免疫耐受的方法。

本实验以低毒、高效的复制缺陷型腺病毒[5] 为载体，在不同条件下观察了 CTLA-4Ig 基因对大鼠肾脏的转染效率。A 组结果显示，低温条件下腺病毒难以介导 CTLA-4Ig 基因对肾脏的有效转染。资料表明，采用静脉注射腺病毒至全身的方法只有肝脏可以得到有效转染，而对其他器官则不能达到满意的效果[6]，本实验中 B 组亦采用了相似方法而未能使肾脏获得有效转染，可能因肝脏等易感性较高的组织对腺病毒载体的消耗使得滴度明显降低的腺病毒载体难以对易感性较低的肾脏进行有效转染。Ye 等[7] 的实验结果证实了上述理论，其采用先阻断肝脏血流再注射腺病毒的方法使小鼠肺、小肠、肾脏在在体条件下均获得有效转染。参考这一方法，本实验在阻断大鼠肝脏血流的基础上进一步阻断了下肢血流，明显减少了 AdvCTLA-4Ig 对肝脏等易感组织、器官转染而造成的消耗，加之转染过程中补充注射 AdvCTLA-4Ig，使在体转染过程中 AdvCTLA-4Ig 滴度维持在较高水平，因此在体转染的 C 组、肾脏获得成功转染。本组腺病毒抗体荧光集中在肾小管上皮细胞，肾小球未见特异性荧光，一些实验也报导了类似结果[8]，但另一些实验显示腺病毒主要转染肾小球结构[9]，造成这一差别的确切机制尚有待探讨。各组肾脏组织学检查显示：转染不会破坏肾脏组织结构，转染方法是安全的。

在上述基因转染的基础上，实验对该基因转染的肾脏移植后的存活情况进行了初步观察，发现其术后存活时间较对照组明显延长，不仅进一步明确了 CTLA-4Ig 基因对肾脏的有效转染，而且初步显示了 CTLA-4Ig 基因对移植肾的局部转染具有延长移植物存活的作用，但与诱导耐受的目标尚有差距。提高 CTLA-4Ig 基因对移植肾重要结构（如具有抗原提呈功能的血管内皮细胞）的转染效率可能进一步延长移植肾的存活时间。

参考文献：

[1] Guillot C, Mathieu P, Coathalem H, *et al*. Tolerance to cardiac allografts *via* local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression[J]. Immunol, 2000, 164(10): 5258-5268.

[2] 黄赤兵，吴 军，易绍萱，等. 共刺激阻断剂CTLA4-Ig基因重组腺病毒的构建与鉴定[J]. 重庆医学，2002，39(8)：682-683.

[3] 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.

[4] Olthoff K M, Gelman A E, Zamir G A, *et al*. Pattern of alloimmune response in second same donor allografts after induction of tolerance using CTLA4Ig[J]. Transplantation, 2001, 72(12): 1952-1956.

[5] Graham F L. Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells[J]. Immunol Today, 2000, 21(9): 426-428.

[6] Fechner H, Haack A, Wang H, *et al*. Expression of coxsackie adenovirus receptor and alpha V-integrin does not correlate with adenovector targeting *in vivo* indicating anatomical vector barriers[J]. Gene Ther, 1999, 6(9): 1520-1535.

[7] Ye X, Jerebtsova M, Ray P E. Liver bypass significantly increases the transduction efficiency of recombinant adenoviral vectors in the lung, intestine, and kidney[J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(4): 621-627.

[8] Chetboul V, Klonjkowski B, Lefebvre H P, *et al*. Short-term efficiency and safety of gene delivery into canine kidneys[J]. Nephrol Dial Transplant, 2001, 16(3): 608-614.

[9] Ye X, Liu X, Li z, *et al*. Efficient gene transfer to rat renal glomeruli with recombinant adenoviral vectors[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(2): 141-148.

（编辑 刘洪娥）

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期，减少编排错误，请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后，将修改稿以纯文本格式存入软盘，并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号，连同修改稿一并送交本刊编辑部（校外稿件请邮寄）。

本刊编辑部

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