DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.003
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

文章编号:1000-5404(2001)07-0759-03

论著

CTLA4Ig基因表达对鼠皮肤移植免疫抑制作用的研究

杨世昕[1],吴 军[1],卞修武[2],易绍莹[1],罗高兴[1],贺伟峰[1],黄赤兵[1],周立新[1] (第三军医大学附属西南医院:[1]烧伤研究所;[2]病理学研究所;重庆 400038)

提 要:目的 探讨静脉注射CTLA4Ig腺病毒后在大鼠体内的表达和对同种异体移植皮肤存活的影响,以及该载体应用的安全性,为该基因治疗方法在抑制器官移植排斥反应的临床应用奠定基础。方法 供体SD大鼠皮肤移植前1周,用腺病毒作载体将CTLA4Ig导入Wistar大鼠体内,用蛋白质斑点印迹实验检测血清中CTLA4Ig的表达,用腺病毒荧光抗体检测腺病毒在脏器的分布。同时还观测了各脏器的病理改变及移植物生存时间。结果 CTLA4Ig腺病毒在肝、脾、心、肺、肾均有明显分布,但实质细胞均未见严重损伤性改变。CTLA4Ig基因能在血清中的表达高峰时间一般在7 d左右,移植皮肤的生存显著长于对照组($P<0.05$)。结论 从静脉注射导入的CTLA4Ig基因能在大鼠体内表达并对同种移植的排斥反应有明显的抑制作用。

关键词:腺病毒;CTLA4Ig;皮肤移植;大鼠
中图法分类号:R392.11;R394.2;R622.1 文献标识码:A

Adenovirus-mediated transfer of CTLA4Ig gene results in prolonged survival of skin all ograft

YANG Shi-xin, WU Jun, BIAN Xiu-wu, YI Shao-xuan, LUO Gao-xing, HE Wei-feng, HUANG Chi-bing, ZHOU Li-xin (Institute of Burns Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study CTLA4Ig expression and its immunoinhibitory effect on skin allograft and the safety of application of CTLA4Ig-adenovirus. Methods The replication-defective recombinant adenovirus was injected into the recipient Wistar rat one week before skin allograft transplantation of SD rat skin allograft. The expression of CTLA4Ig in serum was detected by Dot-ELISA. The survival time of the allografts was also determined. The distribution of viruses in tissues was examined with antibody to adenovirus labeled by FITC and observed by laser confocal scanning microscopy. Furthermore, pathological changes of the organs and survival time were also investigated. Results The expression of CTLA4Ig in serum could be detected in the liver, spleen, heart, lung and kidney without severe damages and reached the peak at 7 d. The skin allograft in injection group survived significantly longer than that in control ($P<0.05$). Conclusion The CTLA4Ig gene transferred into recipient rats by intravenous administration could express in the organs of these rats and result in obvious inhibitory effects on rejection reaction to the allograft skin.

Key words: adenovirus; CTLA4Ig; skin allograft; rats

CTLA4Ig是人CTLA-4分子胞外区(Extracellular domain)与人免疫球蛋白γ1绞链区、CH2、CH3区组成的融合蛋白,与B7有高度的亲和力而竞争性抑制由CD28/B7产生的协同刺激信号,T细胞不能被激活,从而抑制同种移植的排斥反应[1]。本实验利用SD大鼠和Wistar大鼠分别作为供、受体,在皮肤移植前1周,用腺病毒作为载体将CTLA4Ig基因导入Wistar大鼠体内,了解CTLA4Ig腺病毒载体在大鼠体内的分布及对大鼠脏器的影响,研究该基因在鼠体内的表达以及对同种异体皮肤移植排斥反应的抑制作用,为该载体的治疗应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar纯系大鼠,体重220~250 g/只,作为移植的受体;SD纯系大鼠,体重250~300 g/只,作为移植的供体。

1.2 异基因尾皮移植

在受体大鼠尾后靠前上部位作一1 cm×1 cm大小移植用创面,并用SD大鼠尾皮覆盖,观察移植皮存活情况,并取移植后7 d尾皮观察其组织学形态改变来了解移植皮肤排斥情况。

1.3 腺病毒载体

CTLA4Ig重组腺病毒由本室构建[2],在293细胞中扩增,病毒溶液在-70 ℃冻存。

1.4 实验分组及载体转染

Wistar大鼠随机分为3组:对照组、静脉注射转染组Ⅰ、静脉注射转染组Ⅱ。皮肤移植前对照组从静脉注射10 ml生理盐水,转染组Ⅰ、Ⅱ分别从静脉注射10 ml 3.5×10^6 pfu/ml、10 ml 7×10^8 pfu/ml的转染液。

1.5 血清中CTLA4Ig表达的检测

采用蛋白质斑点印迹实验[3]进行检查。

1.6 腺病毒在肝、脾、心、肺、肾等脏器中分布的检测

采用免疫荧光法[4]检测。

1.7 转染大鼠肝、脾、心、肺、肾脏病理改变

转染10 d后,无菌条件下,24 h后麻醉抽血,活杀取肝、脾、心、肺、肾组织标本,10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋、切片,HE染色。

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(39993430-2);国家自然科学基金面上项目(39970756);国家科技部重点项目(96-920-20-10);全军"九五"医学科研规划科研基金重点课题(98Z081)
作者简介:杨世昕(1968-),男,江西省永丰县人,硕士,主治医师,主要从事移植免疫方面的研究,现在南京军区空军九江庐山疗养院。电话:(023)68754149-8021
收稿日期:2000-12-30;修回日期:2001-04-17

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

1.8 大鼠尾皮观察

皮片排斥时间的确定:①观察移植皮完全排斥时间,以移植皮完全发黑变硬、溶化脱落完全露出创面肉芽视为排斥。结果以皮片平均存活时间(MST)表示。②通过移植后 10 d 尾皮组织学切片观察其形态改变,以了解移植皮肤排斥情况。

1.9 统计学处理

应用华西医科大学 PEMS 医用统计程序包进行数据处理,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 q 检验(Newman-Keuls 法)进行多样本均数间的比较。

2 结果

2.1 蛋白质斑点印迹实验检测血清中 CTLA4Ig 表达

与标准品相比较,有棕黄色斑点出现为阳性。注射 10 ml 转染液(7×10^8 pfu/ml)大鼠转染后 3 d 血清为弱阳性表达,7~10 d时血清为阳性表达,20 d时还可检测弱阳性;注射 10 ml 转染液(3.5×10^6 pfu/ml)大鼠血清仅在第 7 天时有弱阳性;未转染大鼠血清为阴性。

2.2 免疫荧光法检测腺病毒在主要脏器中的分布

与未转染组动物同种脏器组织相比较,阳性细胞呈现亮黄绿色的特异性荧光。转染组肝组织中荧光信号主要分布于肝细胞,呈弥漫性点状、小片状分布,靠近中央静脉周围的肝细胞尤为明显,在小叶间静脉和小叶下静脉附近的肝细胞也有强荧光信号;转染组脾脏组织内的阳性荧光信号主要分布于脾索,呈散在灶性强阳性;转染组心肌纤维散在阳性荧光信号分布,呈点状或小片状,大部分心肌呈阴性,心肌间质中则未见强阳性荧光信号,见图 1;肺组织中阳性荧光主要分布于肺泡上皮细胞、支气管粘膜上皮细胞和肺泡间隔组织,后者呈线形荧光分布,荧光分布很不均匀,部分区域荧光很强。肾组织中荧光信号主要分布在肾小管,尤其是近曲小管多见,而肾间质和毛细血管及肾小球未见明显分布。

2.3 转染大鼠主要脏器的光镜观察结果

转染组大鼠的脾组织内脾小梁正常,小梁血管壁无增厚,淋巴鞘内淋巴细胞轻度增生,血窦充血,脾索未见明显异常。转染组大鼠心肌纤维排列正常,其形态与未转染组相比无明显改变,少数心肌细胞横纹较模糊,部分区域间质毛细血管轻度充血,偶见淋巴细胞。转染组肺组织未见特殊改变。转染组肾近曲小管有轻度浊肿,肾小球无明显变化,肾间质无明显变化。

2.4 转染大鼠异基因皮肤移植存活情况

从表 1 中可看出,对照组、转染组Ⅰ在 7 天左右移植皮肤坏死融化、脱落,而转染组Ⅱ大鼠在 7 d 时色泽红润,创面愈合,14 d 后皮肤色泽开始发暗,18 d 左右开始出现皮肤变黑、自溶脱落。可见转染组Ⅰ和对照组之间差别无显著性意义,而转染组Ⅱ差别有显著性意义,说明静脉注射 7×10^9 pfu CTLA4Ig 腺病毒能够显著延长同种异体移植皮肤的存活时间。



图 1 Ⅴ型腺病毒在心肌中的表达

转染组Ⅱ心肌散在阳性荧光信号分布,而心肌间质中则未见强阳性荧光信号

Fig 1 Expression of adenovirus in cardiac muscle

Fluorescence diffused sporadically in the cardiac muscle in transfected group Ⅱ, without strong fluorscence in the interstitial tissue

表 1 SD-Wistar 大鼠尾皮移植成活时间

Tab 1 Survival time of the caudal skin allografts in the SD-Wistar mouse

Group	n	Average survival time of the allografts(d)
Control	10	7.40±1.43
Transfected group Ⅰ	10	7.70±1.25
Transfected group Ⅱ	10	18.3±2.41*

*: $P<0.01$ *vs* control

7 d 移植皮的组织学改变观察可见,对照组、低剂量转染组供体移植尾皮变性坏死,表皮完全分离、脱落,残存皮肤组织出血和大量炎细胞浸润。高剂量转染组移植皮全层存活,表皮及皮肤附件存活良好,皮下组织见轻度出血及肉芽组织形成,见图 2。

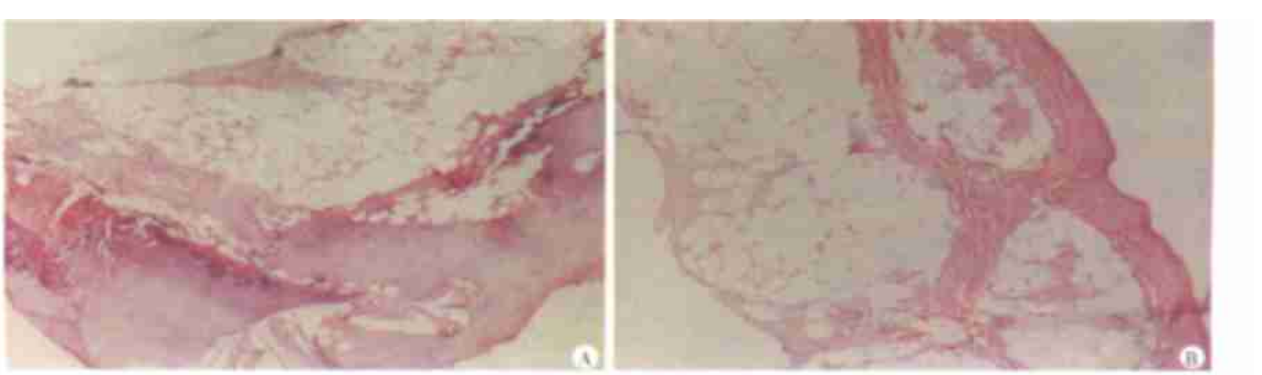


图 2 7 d 时移植尾皮组织形态学特征

A:对照组。供体移植尾皮变性坏死,表皮完全分离、脱落;B:转染组Ⅱ。移植皮全层存活

Fig 2 Histological character of the transplanted caudal skin allografts after 7 days

A: Control. Caudal skin allografts denatured and necrosed, epidermis separated completely and desquamated; B: Transfected group Ⅱ. The allografts survived in full thickness

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

3　讨论

现代免疫学研究发现, 同种异体排斥反应是一个 T 细胞依赖的过程。初始 T 细胞的完全激活需要双重信号的刺激, 既需要 T 细胞受体(TCR)提供的抗原特异性信号, 即 TCR 和抗原递呈细胞(APC)加工处理的抗原肽-MHC 复合物结合(第一信号), 又必须有抗原非特异性共刺激(Costimulation)信号(第二信号)。若缺乏第二信号的辅助, T 细胞将处于克隆无能(Anergy)或无应答状态[5]。CTLA4Ig 是人 CTLA-4 分子胞外区与人免疫球蛋白 γ1 绞链区、CH2、CH3 区组成的融合蛋白, 与 B7 有高度的亲和力而竞争性抑制由 CD28/B7 产生的协同刺激信号, T 细胞不能被激活, 从而抑制同种移植的排斥反应[1]。越来越多的报道显示 CTLA4Ig 可以有效地延长包括角膜、心脏、肾脏、小肠等的存活[6~9]。

本实验应用腺病毒作为载体, 将 CTLA4Ig 基因导入受体体内, 通过 CTLA4Ig 与 B7 结合而竞争性抑制由 CD28/B7 产生的协同刺激信号, 达到了抗排斥反应的目的。对照组移植皮肤平均存活 7 d, 而静脉注射 7×10^9 pfu CTLA4Ig 重组腺病毒组为 18 d ($P<0.05$)。表明 CTLA4Ig 腺病毒能够在机体细胞表达足够的 CTLA4Ig特异性与 B7 结合, 从而阻抑了 CD28 与 B7 的结合, 导致抗原特异性的 T 细胞失活和无反应, 使受体大鼠对移植尾皮处于免疫无应答状态, 从而延长移植尾皮的存活时间。本实验中大鼠移植皮肤存活最长时间在 23 d 左右, 但没有发现不被排斥而永久存活。可能有以下原因: 无论对腺病毒结构如何修饰及表达有抑制针对腺病毒和病毒感染细胞的细胞免疫和体液免疫反应的 CTLA4Ig, 由于病毒蛋白仍然存在, 不能完全消除腺病毒的免疫原性。腺病毒载体在不断地被消除, CTLA4Ig 蛋白也就逐渐减少, 其抑制 T 细胞作用也会减弱, 最后会导致排斥反应的重新启动。从 T 细胞的循环与分布来看, 在器官移植后, 并非所有的 T 细胞都能在移植物或周围的淋巴组织中与来源于供体的异体抗原相遇。在移植后 7 d 内给予 CTLA4Ig, 只能阻断受体抗原刺激的这部分 T 细胞活化中; 分布在其它部位的 T 细胞则逃避了 CTLA4Ig 的阻断作用, 而在停止给药之后再循环至移植物, 并诱导排斥反应。

本实验检测大鼠体内腺病毒分布情况表明, 腺病毒在肝、脾、心、肺、肾组织均有明显分布。肾脏组织中主要分布在肾小管, 尤其是近曲小管, 而肾间质和肾小球中未见明显分布; 肝组织中主要分布于肝细胞, 尤其是血管附近的肝细胞; 肺组织中主要分布于肺泡上皮、支气管粘膜上皮中。对以上大鼠脏器的进行病理检测, 发现主要脏器的实质细胞均未见严重损伤性改变, 淋巴细胞浸润也很轻微。这也证实本研究所用 E1 区缺失的 5 型复制缺陷型的重组腺病毒具有感染靶细胞的能力, 但不发生复制, 因而不会直接造成靶细胞的损害[10]。

上述结果提示重组腺病毒介导 CTLA4Ig 基因在治疗器官移植排斥反应中具有良好的应用前景。

参考文献:

[1] Sayegh M H. Finally, CTLA4-Ig graduates to the clinic[J]. J Clin Invest, 1999, 103(9): 1 223－1 225.

[2] 罗高兴, 吴　军, 易绍萱, 等. 重组腺病毒载体局部介导 CTLA4Ig 延长小鼠异体移植皮肤的存活[J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(1): 37－39.

[3] 王浩丹, 周　申. 生物医学标记示踪技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 142－144.

[4] 章静波. 细胞生物学实用方法与技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1995. 206－209.

[5] Kishimoto K, Dong V M, Issazadeh S, *et al*. The role of CD154-CD40 versus CD28-B7 costimulatory pathways in regulating allogeneic Th1 and Th2 responses *in vivo*[J]. J Clin Invest, 2000, 106(1): 63－72.

[6] Gebhardt B M, Hodkin M, Varnell E D, *et al*. Protection of corneal allografts by CTLA4-Ig[J]. Cornea, 1999, 18(3): 314－320.

[7] Guillot C, Mathieu P, Coathalem H, *et al*. Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression[J]. J Immunol, 2000, 164(10): 5 258－5 268.

[8] Tomasoni S, Azzollini N, Casiraghi F, *et al*. CTLA4Ig gene transfer prolongs survival and induces donor-specific tolerance in a rat renal allograft[J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(4): 747－252.

[9] Kurlberg G, Haglind E, Schon K, *et al*. Blockade of the B7-CD28 pathway by CTLA4-Ig counteracts rejection and prolongs survival in small bowel transplantation[J]. Scand J Immunol, 2000, 51(3): 224－230.

[10] Graham F L, Prevec L. Manipulation of adenovirus vector[A]. In: Murray E J. Methods in molecular biology[M]. Clifton New Jersey: The Human Press Inc, 1991. 109－128.

（编辑　薛国文）

书讯

《医学实验动物学》——教育部推荐的研究生教学用书

由第三军医大学魏泓教授主编、四川科技出版社出版的《医学实验动物学》一书, 由教育部组织专家评审, 审定为全国生物医学研究生教学用书。现已出版, 每册 42.00 元。邮购 50 册以上有折扣。凡需要此书作为研究生、本科生教材者, 请与第三军医大学学报编辑部联系。

联系电话: (023)68752187　　E-mail: Leng@mail.tmmu.com.cn

联 系 人: 冷怀明　　邮政编码: 400038

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