DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.013
第22卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 5
2000年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2000

文章编号:1000-5404(2000)05-0433-03

论著

CTLA4Ig基因转染对大鼠胰岛移植的影响

金世龙,顾红光,王亚旭,刘宝华,文亚渊,王仁云,王 东,何培生 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所普通外科,重庆 400042)

提 要:目的 研究CTLA4Ig基因在糖尿病大鼠体内表达及其产物延长胰岛移植物存活的作用。方法 利用Lipofectin载体包裹CTLA4Ig cDNA质粒后转染鼠胰岛和肌肉细胞,检测移植后CTLA4Ig基因表达水平,观察CTLA4Ig基因表达在延长糖尿病鼠胰岛移植物和大鼠存活时间的作用。结果 A组胰岛移植第7天2只大鼠血清CTLA4Ig呈阳性(阳性率20%),分别为14 ng/ml和31 ng/ml。B组胰岛移植后维持血糖正常时间平均(3.6±5.1)d,A组胰岛移植后维持血糖正常平均(14.8±12.3)d,两组比较差异显著($P<0.05$)。A组大鼠平均存活(24.0±10.8)d,最长45 d,B组大鼠平均存活(10.8±4.8)d,最长21 d,两组大鼠生存时间差异非常显著($P<0.01$)。结论 CTLA4Ig基因可以在受体大鼠胰岛细胞或肌肉组织表达,其表达产物可使胰岛移植物和受体鼠存活时间明显延长。

关键词:胰岛移植;基因治疗;糖尿病
中图法分类号:R394.2;R617 文献标识码:A

Role of CTLA4Ig gene in transplantation of pancreatic islets in rats

JING Shi-long, GU Hong-guang, WANG Ya-xu, LIU Bao-hua, WEN Ya-yuan, WANG Ren-jun, WANG Dong, HE Pei-sheng (Department of General Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the expression of CTLA4Ig gene and the effect of its product on the prolongation of the survival of pancreatic islet allograft in diabetic rats. Methods The cells of the islets and muscles of the pancreas were transfected with CTLA4Ig cDNA which was packaged with libofeclin vector. The expression of CTLA4Ig gene was observed after the transplantation of pancreatic islets to see the effect on the prolongation of the survival of the allografts and of the diabetic rats. Results The expression of CTLA4Ig in serum was positive in 2 out of 10 rats in group A with concentrations of 14 ng/ml and 31ng/ml respectively 7 days after the transplantation. The average duration of normal blood glycose level after the transplantation was 14.8±12.3 days in group A and 3.6±5.1 days in group B ($P<0.05$). The average survival time of the transplanted rats was 24.0±10.8 days (maximum of 45 days) in group A and 10.8±4.8 days (maximum of 21 days) in group B ($P<0.01$). Conclusion CTLA4Ig gene was expressed in the cells of islets and muscles of the pancreas in the recipient rats and prolonged the survival of the pancreatic islet allograft as well as the recipient rats significantly.

Key words: pancreatic islets transplantation; gene therapy; diabetes mellitus

胰岛移植是治疗糖尿病的理想方法,有效的胰岛移植可代替长期胰岛素的使用。胰岛移植存在的最主要问题是免疫排斥反应,因此降低移植物的免疫原性和诱导受体对移植物耐受是解决排斥反应的方法。CTLA4Ig是阻断B7-CD28共刺激信号传导最有效的制剂,是免疫学和移植学研究最活跃的领域,国外在这方面研究较多,取得了良好效果,国内尚未见报告[1]。本研究利用Lipofectin载体包裹CTLA4Ig cDNA质粒后转染鼠胰岛和肌肉细胞,观察CTLA4Ig基因表达及其在延长糖尿病大鼠移植胰岛存活的作用。

1 材料与方法

1.1 动物和主要试剂

大白鼠体重150~200 g,雌雄不拘,我院实验动物中心提供。细胞培养基PRMI 1640、DMEM和Lipofectin载体为Gibco产

基金项目:全军"九五"医药卫生科研基金(青年基金)资助项目(96Q075)
作者简介:金世龙(1963—),男,湖北省丹江口市人,硕士,主治医师,讲师,发表论文14篇。电话:(023)68757247
收稿日期:1999-07-02;修回日期:1999-12-09

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

品, ELISA 试剂盒为 Ancell Corporation 产品。胶原酶Ⅰ型、链脲酶素为 Sigma 产品。CTLA4Ig cDNA 由 Linsley 提供。

1.2 大鼠糖尿病模型制备和质粒肌肉注射

大鼠 20 只称重, 随机分为实验组(A 组)和对照组(B 组)各 10 只。用 Lipofectin 载体将 CTLA4Ig cDNA 包裹(超声法混匀)后按 Lipofectin(200 μl)与 CTLA4Ig cDNA(200 ug)的混匀液注入 A 组大鼠右侧大腿肌肉组织。CTLA4Ig cDNA 注射 5 d 后再给两组大鼠肌注(左腿)1%链脲素(75 mg/kg), 24 h 后大鼠血糖达到 20 mmol/L, 血糖浓度 5 d 测定 1 次。维持 10 d 为稳定地糖尿病鼠模型。

1.3 胰岛消化分离、纯化和转染

1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉后, 立即切开腹腔显露胰腺和胆总管, 胆总管中段向远侧插入 4 ½针头, 结扎十二指肠远近端形成闭绊。将 0.5%胶原酶和 7.5 mmol/L Ca^{2+} 的 Hanks 液 6~8 ml, 自胆总管注入十二指肠绊, 胰腺膨胀后, 迅速摘取胰腺, 置入 50 ml 三角烧瓶加上述 Hanks 液 8 ml, 38°C 水浴轻轻摇动 8~12 min 取出用眼科小剪刀将胰腺剪成 0.5~1 mm^3 碎块, 再置 50 ml 三角烧瓶中, 加上述 Hanks 液 6 ml, 38°C 水浴振摇消化 5~8 min, 加入 4°C Hanks 液 6 ml 终止消化。静置 3~5 min 待组织块沉淀后, 吸取上清消化物经 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀物用 20%小牛血清的 1640 培养液保存。沉淀物重复上述消化过程 4~5 次, 直到胰腺全部消化[3]。

消化后的胰岛用 20%小牛血清的完全 RPMI1640 培养液 10 ml(pH7.2), 置细胞培养箱, 95%空气、5%CO_2、37°C 恒温培养 48 h。吸出悬浮细胞团用 Hanks 液清洗后, 加入密度梯度为 25%、20%、15%和 10%的 Ficoll 液经 4°C 3 000 r/min 离心 15 min, 胰岛细胞在第 2 层(20%~25%)、第 3 层(15%~20%)及第 4 层(10%~15%)收集, 用 Hanks 液清洗 2 次待用。将 CTLA4Ig cDNA 50 μg 和 Lipofectin 100 μl 经超声混悬液与 A 组供体纯化的胰岛混匀后, 加 DMEM 培养液 4 ml, 95%空气、5%CO_2、37°C 培养 6 h, 再加入 10%小牛血清继续培养 18 h[2]。取胰岛悬液检测: ①胰岛纯度; ②胰岛活度; ③上清液胰岛素; ④葡萄糖刺激胰岛素释放试验。

1.4 胰岛移植和血清 CTLA4Ig 检测

糖尿病大鼠麻醉后, 左中腹切口, 将胰岛细胞悬液 1 ml 注入左肾包囊。按单纯胰岛移植组(B 组)和胰岛+CTLA4Ig cDNA 组(A 组)移植。移植后每隔 3~5 d 取鼠尾血检测血糖(微量血糖仪)变化, 血糖连续 2 次高于 11.0 mmol/L, 以第一时间为排斥开始, 观察糖尿病鼠存活时间。A 组移植后 7 d 取静脉血, ELISA 法检测血清 CTLA4Ig 水平[4]。

1.5 统计学处理

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组均数差异用 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 基因转染对胰岛功能影响

大鼠胰腺组织碎块经胶原酶消化和纯化后镜下观察胰岛纯度达到 81%~95%, 细胞活度 79%~89%。B 组和 A 组转染后 100 个胰岛经 24 h 普通、低糖和高糖+茶碱刺激培养释放胰岛素量差异不显著($P>0.05$)。两组高糖+茶碱刺激后胰岛素释放量为低糖的 2 倍多($P<0.01$), 纯化胰岛β细胞功能良好, 揭示基因转染过程不影响胰岛细胞分泌胰岛素功能, 见表 1。

表 1 两组 24 h 胰岛素释放量(*m*/ng)

Tab 1 Insulin secreation of two groups in 24 hours(*m*/ng)

Group	General	Low glucose (5.6 mmol/L)	High glucose+the ophylline (24.5 mmol/L)
A(100 cells)	125±21	381±123 *	841±197 *
B(100 cells)	134±19 #	412±135 *#	914±159 *#

*: $P<0.01$ *vs* general; #: $P>0.05$ *vs* A

2.2 糖尿病大鼠胰岛移植后血糖变化, 见表 2

B 组大鼠胰岛移植后 3 d 检测血糖, 5 只大鼠血糖正常, 维持血糖正常时间平均(3.6±5.1)d, A 组大鼠胰岛移植 3 d 后检测血糖, 8 只大鼠血糖正常, 维持血糖正常平均(14.8±12.3)d, 两组比较差异显著($P<0.05$)。

表 2 两组糖尿病大鼠胰岛移植后维持血糖正常时间

Tab 2 Time of maintaining blood glycose level of two groups after pancreatic islets graft

Group	Time of maintaining blood glycose level (t/d)									
A	34,	29,	26,	19,	17,	13,	7,	3,	0,	0
B	16,	10,	4,	3,	3,	0,	0,	0,	0,	0

2.3 移植后两组大鼠生存时间与 CTLA4Ig 表达

A 组大鼠平均存活(24.0±10.8)d, 最长 45 d, B 组大鼠平均存活(10.8±4.8)d, 最长 21 d, 两组大鼠生存时间差异有统计学意义($P<0.01$)。A 组胰岛移植第 7 天 2 只大鼠血清 CTLA4Ig 呈阳性, 分别为 14 ng/ml 和 31 ng/ml, 其维持血糖正常时间 19、29 d 和存活 25、31 d, 长于其平均值, 见表 3。

表 3 两组糖尿病大鼠胰岛移植后存活时间

Tab 3 Survival time of two groups after pancreatic islets graft

Group	Time of survival (t/d)									
A	45,	36,	31,	29,	25,	19,	17,	15,	12,	9
B	21,	17,	12,	12,	11,	9,	8,	8,	6,	4

3 讨论

胰岛移植不仅能逆转糖尿病高血糖状态, 而且能防止糖尿病慢性并发症的发生和发展, 是治疗Ⅰ型糖尿病的有效方法。全世界已开展临床胰岛移植数千例, 但长期完全停用胰岛素维持血糖正常水平的例数极少, 临床效果不够理想的主要障碍是免疫排斥反应。CTLA4Ig 与 CD28 配体 B7 有高度亲和力, 可以阻断 CD28 和 CTLA4 与其配体 B7 之间结合, 从而阻断 CD28 共刺激信号传递, 使 T 细胞增殖和分化成细胞毒 T 细胞和淋巴因子的作用受抑制, 诱导对特异抗原无反应状态, 体内体外均有免疫抑制作用, 不需要其它免疫抑制剂就可以延长移植物存活时间[1]。CTLA4Ig 在治疗心肾移植免疫排斥反应中发挥重要作用, 能够使移植物和受体长期存活[5]。Deborah 给异种胰岛移植鼠注

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

射 CTLA4Ig 使受体鼠长期存活, 也获得良好效果[6]。Gainer 用金颗粒将 CTLA4Ig cDNA 带入分离纯化的胰岛细胞, 使胰岛转染表达 CTLA4Ig, 实验组 12 只鼠有 6 只移植物存活超过 50 d, 移植的胰岛最长存活 164 d[7]。Chahine 利用 CTLA4Ig 基因转染鼠肌肉细胞, 转染的肌细胞与鼠胰岛联合移植到鼠肾包囊, 移植 12 只糖尿病鼠有 8 只存活时间超过 90 d, 其治疗效果良好[8]。国外在这方面研究较多, 取得了良好效果, 我们刚刚起步, 尚未见报告。我们用 Lipofcetin 包裹 CTLA4Ig cDNA 后直接肌肉注射以转染肌细胞和 DMEM 液培养纯化的胰岛以转染胰岛细胞, 此法转染不同组织细胞提高细胞 CTLA4Ig 基因表达。从转染对胰岛细胞功能看, 在普通、低糖和高糖+茶碱培养 3 种条件下 A 组释放胰岛素较 B 略低, 但两组差异无统计学意义($P>0.05$), 提示胰岛细胞的转染过程不会影响胰岛功能。A 组大鼠胰岛移植后维持正常血糖的时间($P<0.05$)和大鼠存活时间($P<0.01$)均较 B 组明显延长, 可能是 CTLA4Ig cDNA 转染受体鼠后 CTLA4Ig 基因得到不同程度表达, 受体细胞免疫抑制有关系。本组胰岛转染移植 10 只大鼠在第 7 天只有 2 只鼠血清检测 CTLA4Ig 阳性, 显示 CTLA4Ig cDNA 能够在糖尿病大鼠肌细胞或供体胰岛细胞内低水平表达。结果提示: CTLA4Ig 基因可以在受体大鼠胰岛细胞或肌肉组织表达, 其表达产物可使胰岛移植物和受体鼠存活时间明显延长。

参考文献:

[1] Lin H, Hua Lim, Steven F B, *et al*. Long-term acceplance of major histocompalibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor speacific tranfusion[J]. J Exp Med, 1993, 178(5): 1 801—1 805.

[2] Gainer A L, Korbutt G S, Rajotte R V, *et al*. Successful biolistic transformation of mouse pancreatic islets while preserving cellular function[J]. Transplantation, 1996, 61(11): 1 567—1 571.

[3] 沈守祥, 董见虎, 毕艳军, 等. SD 大鼠胰岛细胞培养技术的研究[J]. 中华器官移植杂志, 1995, 16(4): 158—160.

[4] Levisetti M G, Padrid P A, Szot G L, *et al*. Immunosuppressive effects of human CTAI4Ig in a non-human primate model of allogeneic pancreatic islet transplantation[J]. J Immunol, 1997, 159(10): 5 187—5 191.

[5] Judge T A, Tang A, Spain L M, *et al*. The *in vivo* mechanism of action of CTLA4Ig[J]. J Immunol, 1996, 156(6): 2 294—2 299.

[6] Deborah J, Lenschow, Zeng Yijun, *et al*. Long-term survial of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig[J]. Science, 1992, 257(7): 709—791.

[7] Gainer A L, Korbutt G S, Rajotte R V, *et al*. Expression of CTLA4Ig by Biolistically transfected mouse islets promotes islet allograft survival[J]. Transplantation, 1997, 63(7): 1 017—1 021.

[8] Chahine A A, Yu M, McKernan M M, *et al*. Immunomodulation of pancreatic islet allografts in mice with CTLA4Ig secreting muscle cells[J]. Transplantation, 1995, 59(9): 1 313—1 318.

（编辑　张大春）

（上接 432 页）

患者发生一过性右上腹隐痛不适, 未经特殊处理自行缓解。多数患者术后 2～4 d 发热, 体温最高达 39℃, 经用热可平、消炎痛或激素后缓解, 体温逐渐恢复正常。58 例术后 1～5 d 肝功能转氨酶有轻度增高, 6～8 d 后恢复正常。RF 治疗一周后 30 例复查彩超, 提示 RF 治疗部位瘤体影像呈增强回声、中央血流消失, 13 例复查 CT, 均提示 RF 治疗区域呈低密度, 增强扫描后病灶内未见造影剂充盈, 20 例以自动活检枪钳取的治疗部门瘤体组织及 4 例手术切除的瘤体组织病理检查均提示瘤体凝固性坏死。

3　讨论

肝肿瘤 RF 治疗属于介入治疗间质消融疗法中的一种, 运用 RF 高热使病灶发生凝固性坏死, 达到肿瘤切除的效果。多电极肝肿瘤 RF 治疗系统, 用经皮肝穿刺可张开多个 RF 针型电极治疗肝肿瘤, 在技术上有很大进步[1]。它的优点: ①多电极可张开 10 个电极, 使病灶损毁体积一次性达到直径 3.5～5 cm 范围, 比过去所用的单电极技术有较大进步[1]。②安全、可靠, RF 治疗是由 B 超导向和电子计算机控制射频发射能量和时间, 杀灭肿瘤病灶可靠, 对周围正常组织损伤小。③微创、微痛, 不需开腹手术。④见效快, 疗时短, 是目前世界上最先进的杀伤肝肿瘤较多而机体损害较轻的"导向治疗方法"。

B 超普通探头引导进行经皮肤肝穿刺定位[2] 用于 RF 治疗, 操作简便灵活, 准确性高。B 超影像判断治疗成功的标志: ①多电极针插入肿瘤后经过 10～15 min RF 治疗, 超声图像显示肿瘤区呈强回声区。②较大肿瘤则显示整个肿瘤变为弥漫性强回声斑片状改变。③RF 术后 5～7 d 复查 B 超, RF 治疗区呈强回声, 中央血流消失。57 例 RF 治疗后, 20 例以自动活检枪钳取的治疗部位瘤体组织及 4 例手术切除的瘤体组织病理检查提示瘤体凝固性坏死。RF 治疗后 CT 及彩超检查证实 B 超普通探头引导治疗肝肿瘤准确可靠。

关键词: 超声; 射频; 肝脏肿瘤
中图法分类号: R735.7　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Ross S, Buscarini E, Garbagnati F, *et al*. Percutaneoues treatment of small hepatic tumors by an expandable RF needle electrode[J]. AJR, 1998, 170(4): 1 015—1 022.

[2] 郭　佳, 杨甲梅, 吴孟超. B 型超声普通探头引导经皮肝穿刺无水酒精注射治疗非寄生虫性肝囊肿[J]. 中国超声医学杂志, 1998, 14(7): 35—36.

（编辑　薛国文）

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