

文章编号 : 1005- 8982( 2005 )24- 3721- 03

·论著·

## 脂质体载体 pcDNA3- TGF- $\beta$ 1 基因治疗 延长同种心脏移植物存活的研究\*

赵 波<sup>1</sup>, 刘 云<sup>2</sup>, 宫念樵<sup>3</sup>, 叶启发<sup>2</sup>

( 1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 胸心外科 湖北 武汉 430030 ;

2. 中南大学湘雅三医院器官移植研究院 湖南 长沙 410008 , 3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院器官移植研究所 湖北 武汉 430030 )

**摘要** :目的 观察脂质体载体 pcDNA3- TGF-  $\beta$ 1 基因治疗对同种心脏移植物存活的影响。方法 大量扩增 pcDNA3- TGF-  $\beta$ 1 制备脂质体 - 靶基因混合物及杂交探针 ,建立同种心脏移植模型 ,行脂质体载体 pcDNA3- TGF-  $\beta$ 1 基因转染 ,观察移植后 5 d 心肌细胞中 TGF-  $\beta$ 1 mRNA 表达状况和移植心脏病理改变 ,观察受体存活情况。结果 移植后 5 d 脂质体载体 pcDNA3- TGF-  $\beta$ 1 基因治疗组心肌细胞中 TGF-  $\beta$ 1 mRNA 原位杂交阳性表达率为 11% ,移植心脏排斥反应病理改变明显延缓 ,同种心脏移植物存活明显延长 ,但未诱导出长期存活。结论 脂质体载体 pcDNA3- TGF-  $\beta$ 1 基因治疗延长了同种心脏移植物的存活。

**关键词** : 基因治疗 ; 脂质体 ; pcDNA3- TGF-  $\beta$ 1 ; 心脏移植

中图分类号 : R 654.2

文献标识码 : A

## Research of liposome- mediated pcDNA3- TGF- $\beta$ 1 gene therapy prolonging survival of cardiac allografts\*

ZHAO Bo<sup>1</sup>, LIU Yun<sup>2</sup>, GONG Nian- qiao<sup>3</sup>, YE Qi- fa<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiac Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, P.R.China; 2. College of Organ Transplantation, the third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, P.R.China;

3. Institute of Organ Transplantation, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, P.R.China )

**Abstract** : 【Objectives】To investigate the impact of liposome- mediated pcDNA3- TGF-  $\beta$ 1 gene therapy upon the survival of cardiac allografts. 【Methods】After amplify the plasmid pcDNA3- TGF-  $\beta$ 1, the mixture of liposome and target plasmid was prepared and used into the cardiac transplants while the hybridization probes were developed. 5 days post transplanttaion the expression of TGF-  $\beta$ 1 mRNA in cardiac muscles was observed by in situ hybridization and the rejection pathological progress were evaluated. The survival of grafts receiving gene therapy was analyzed. 【Results】The efficiency of liposome- mediated pcDNA3- TGF-  $\beta$ 1 gene transfer in cardiac muscle indicated by in situ hybridization was 11% after transplantation in 5th day. The rejection pathological progress was delayed. This therapy prolonged the survival of cardiac grafts significantly but without long- term case. 【Conclusion】The liposome- mediated pcDNA3- TGF-  $\beta$ 1 gene transfer can prolong the survival of cardiac grafts significantly.

**Key words** : gene therapy; liposome; pcDNA3- TGF-  $\beta$ 1; cardiac transplantation

心脏移植作为治疗许多终末期心脏疾患的有效手段 ,已成为全球例数最多的实体器官移植之一。

目前移植后排斥反应仍是限制移植心脏存活的关键因素。虽然免疫抑制剂的进步极大地改善了心脏移

植的预后,但其固有的不足之处如感染、代谢紊乱、诱发肿瘤生成等副作用促使基因治疗这一策略令人瞩目。能够下调 T 细胞活性的转化生长因子(transforming growth factor- $\beta$  1,TGF- $\beta$  1)可以保护移植物本身,诱导免疫低反应性乃致诱导耐受状态的建立<sup>[1,2]</sup>,是移植领域内可以优先考察的候选基因。现建立了大鼠心脏移植模型,观察 TGF- $\beta$  1 基因转染后移植物对免疫应答的反应。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和菌株

携带目的基因大鼠 TGF- $\beta$  1 的质粒 pcDNA3-TGF- $\beta$  1 由美国芝加哥大学心内科冯宁博士惠赠,E.coli 菌株由华中科技大学同济医院实验设备中心杨燕博士惠赠。

### 1.2 目的基因的大量扩增

以 E.coli DH5 $\alpha$  菌株制备感受态细菌。用质粒 2  $\mu$ L 转化,平皿培养挑取单菌落于液体 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。抽取质粒,用 Hind III 和 Xba I 酶切鉴定后大量培养并抽取质粒,RNA 酶处理后酚抽提。用 Pharmacia Biotech (80-2103-98)测最终质粒浓度为 20  $\mu$ g/ $\mu$ L。

### 1.3 脂质体-靶基因混合物制备

DOSPER 脂质体转染试剂盒购自 BOEHRINGERMANNHEIM 公司,取 40  $\mu$ L DOSPER 脂质体试剂,与 10  $\mu$ L PCDNA3-TGF- $\beta$  1 质粒及 450  $\mu$ L DMEM 振荡混匀后置室温下孵育 15 min 待转染用。

### 1.4 心脏移植

200~250 g 雄性 SD 大鼠为供体,雄性 Wistar 大鼠为受体,由华中科技大学同济医学院实验动物研究中心提供,1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,供心以升主动脉为流入道,以肺动脉为流出道,其余血管及心耳均结扎。供心升主动脉与受体腹主动脉端侧吻合,肺动脉与受体下腔静脉端侧吻合。

### 1.5 杂交探针制备与原位杂交

先后用 EcoR I 和 Sac I 酶切 PCDNA3-TGF- $\beta$  1,抽提 400 bp 片段作为探针,终浓度为 0.46  $\mu$ g/ $\mu$ L。探针行地高辛标记。原位杂交液体试剂及容器均行 DEPC 处理。获取的移植心脏组织切片脱蜡至水。 $H_2O_2$  室温 10 min。蛋白酶 K 1  $\mu$ g/mL 37 $^{\circ}$ C 暴露 mRNA 核酸片段。每张切片 20  $\mu$ L 预杂交液 37 $^{\circ}$ C 4 h,20  $\mu$ L 杂交液 40 $^{\circ}$ C 过夜。SSC 洗涤。30

g/L BSA 37 $^{\circ}$ C 30 min。封闭液 37 $^{\circ}$ C 30 min。生物素化鼠抗地高辛 37 $^{\circ}$ C 60 min。SABC 37 $^{\circ}$ C 20 min。生物素化过氧化物酶 37 $^{\circ}$ C 20 min。DAB 显色。

### 1.6 试验分组与观察指标

共分三组。每组观察六只受体存活情况。移植后每日腹壁触诊,移植心脏停跳则诊断为排斥。空白对照组供心获取后,自升主动脉插管灌注 200  $\mu$ L DMEM 溶液后置 4 $^{\circ}$ C 保存 40 min;载体对照组灌注含靶基因的脂质体及 DMEM 200  $\mu$ L;基因治疗组灌注不含靶基因的混合液 200  $\mu$ L。此外,每组另多做三只受体,移植后第 5 天处死动物,移植心脏切片作 HE 染色病理观测,并做原位杂交观察心肌细胞中 TGF- $\beta$  1 mRNA 表达状况。

## 2 结果

### 2.1 基因转染效率

移植后第 5 天基因治疗组移植心脏心肌细胞中 TGF- $\beta$  1 mRNA 原位杂交阳性表达率为 11%。

### 2.2 移植心脏存活

空白对照组、载体对照组及基因治疗组移植心脏存活,见附表。

附表 脂质体载体基因治疗后移植心脏存活情况

组别	移植心脏存活天数	存活天数统计值	P 值
空白对照组	6,6,6,7,7,8	6.50 $\pm$ 0.84	
载体对照组	5,6,6,7,7,7	6.17 $\pm$ 0.75	0.48
基因治疗组	10,12,13,14,14,14	12.83 $\pm$ 1.60	<0.0001

注 P 值与空白对照组比较

### 2.3 各组术后 5 d 病理学改变

空白对照组见弥漫性炎性细胞浸润和间质水肿,大片心肌细胞变性坏死;载体对照组与空白对照组病理学改变基本一致;基因治疗组弥漫性小灶性炎性细胞浸润,间质轻微水肿,心肌细胞结构尚完整,未见心肌细胞坏死。空白对照组见图 1,基因治疗组见图 2。

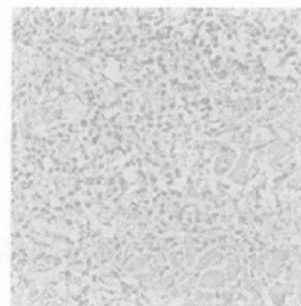


图 1 空白对照组病理学改变( $\times$ 400)

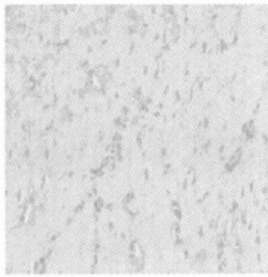


图 2 基因治疗组病理学改变( $\times 400$ )

### 3 讨论

TGF- $\beta$ 1 是一个分子量为 25 kd 的含 390 个氨基酸的多肽分子, 其不同品系的哺乳动物中基因序列高度保守<sup>[3]</sup>。作为分泌型的胞膜外蛋白, 它与靶细胞的受体结合后, 激活下游信号分子来调节靶细胞如免疫细胞(淋巴细胞、抗原提供细胞)的生物学功能, 抑制细胞 G1 期进入 S 期和 G2 期进入 M 期<sup>[3]</sup>。因此, TGF- $\beta$ 1 对免疫应答和炎症反应起重要的抑制作用。TGF- $\beta$ 1 抑制抗原提呈细胞表面主要细胞相容性复合物(MHC)I 类和 II 类分子的表达, 干扰 APC 的分化成熟, 可能诱导 T 细胞的无能, 它还同时抑制 TH1 型和 TH2 型细胞因子的分组, 并抑制 B 细胞分泌免疫球蛋白, 抑制体液免疫, 诱导 T 细胞凋亡改变粘附分子表达, 干扰淋巴细胞和中性粒细胞对血管内皮的细胞的粘附<sup>[4,5]</sup>。此外, TH3 型调节型 T 细胞可分泌 IL-10 和 TGF- $\beta$ 1, T 细胞所处微环境中的高 TGF- $\beta$ 1 浓度也可能促使 T 细胞向 TH3 型分化<sup>[6]</sup>。

TGF- $\beta$ 1 对不同的靶细胞表现出不同的生物学活性, TGF- $\beta$ 1 对间质细胞(纤维细胞、巨噬细胞系)则起促进增殖作用, 可引起层连蛋白等细胞外基质(ECM)的增多, 还可以抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)及组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinase, Timp)的表达, 减少细胞外基质的降解, 促进肾小球硬化<sup>[7]</sup>。

基因治疗毒副作用小, 移植植物在体外的冷保存时期为基因治疗提供了一个良好的转染平台, 目的基因可以直接转染进入移植的心肌细胞内, 转录靶蛋白质, 或者直接保护移植植物本身或者在移植植物内调整抗原提呈细胞或 / 和 T 细胞的反应状态, 或者直接进入引流二级淋巴器官内, 调整免疫反应。基于 TGF- $\beta$ 1 的特点, 基因治疗可能是延长心脏移植存活的有效手段<sup>[8,9]</sup>。

目前常用的基因治疗方法按载体不同分为病毒

载体和非病毒载体二类。病毒载体诸如逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体利用改造过的病毒装载目的基因, 转染效率相对较高, 但有导致突变可能, 病毒蛋白也可能引起免疫反应和炎症反应<sup>[10]</sup>。非病毒载体中脂质体载体应用较广, 它构建灵活, 无感染能力, 理论上靶基因大小无限制, 但较病毒载体转染效率为低, 转染后靶蛋白持续表达时间也较短。原位杂交发现术后 5 d 心肌细胞中 TGF- $\beta$ 1 的转染有效率为 11%, 说明脂质体载体 pcDNA3-TGF- $\beta$ 1 基因治疗的转染效率基本满意<sup>[11]</sup>, 虽然较腺病毒等载体相对为低, 但已能有效表达靶蛋白。基因治疗组术后 5 d 血清 TGF- $\beta$ 1 表达明显上升, 移植植物存活较空白对照组和载体对照组显著延长, 说明所表达的靶蛋白能够发挥功效, 以脂质体为载体的基因治疗是有效的。另一方面, 本方法未能诱导心脏移植植物耐受状态的形成, 提示脂质体载体 TGF- $\beta$ 1 基因治疗对心脏移植后的免疫状态调整仍需探讨, 可能与 TGF- $\beta$ 1 本身的免疫效应有关, 也可能与 TGF- $\beta$ 1 有效表达量和有效表达时间有关。

### 参 考 文 献:

- [1] WALLICK SC, FIGARI IS, MORRIS RE, et al. Immunoregulatory role of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) in development of killer cells: comparison of active and latent TGF- $\beta$  1[J]. *J Exp Med*, 1990, 172(6): 1777-1784.
- [2] ESPEVIK T, FIGARI IS, RANGES GE, et al. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$  1) and recombinant human tumor necrosis factor-alpha reciprocally regulate the generation of lymphokine-activated killer cell activity. Comparison between natural porcine platelet-derived TGF- $\beta$  1 and TGF- $\beta$  2, and recombinant human TGF- $\beta$  1[J]. *J Immunol*, 1988, 140(7): 2312-2316.
- [3] POLYAK K, KATO JY, SOLOMON MJ, et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest[J]. *Genes Dev*, 1994, 8(1): 9-22.
- [4] GOVINDEN R, BHOOLA KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta [J]. *Pharmacol Ther*, 2003, 98(2): 257-265.
- [5] KEHRL JH, TAYLOR A, KIM SJ, et al. Transforming growth factor-beta is a potent negative regulator of human lymphocytes [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1991, 628: 345-353.
- [6] GIOMI B, CAPRONI M, CALZOLARI A, et al. Th1, Th2 and Th3 cytokines in the pathogenesis of bullous pemphigoid [J]. *J Dermatol Sci*, 2002, 30(2): 116-128.

(下转第 3726 页)



图 6 细胞体外培养第 4 周的相差倒置显微照片 细胞几乎长满培养板底 ( $\times 250$ )

细胞固定后经抗 GFAP 免疫化学染色, GFAP 阳性细胞占总细胞数比例在 90% 以上, 见图 7。



图 7 第 4 周末将细胞固定后, 行抗 GFAP 免疫细胞化学染色鉴定星形胶质细胞, 阳性着色为棕黄色 ( $\times 250$ )

### 3 讨论

星形胶质细胞是神经组织内数量最多、分布最广的胶质细胞。由于星形胶质细胞的分裂高峰发生在动物胚胎晚期及出生以后<sup>[3]</sup>, 故纯化星形胶质细胞的材料来源一般选择出生以后的新生动物<sup>[4]</sup>。

原代培养时接种细胞的密度是一个与星形胶质细胞纯化程度有关的问题。本方法在原代培养时采用较低的密度, 但通过提高培养液中血清的浓度以及添加 EGF 维持星形胶质细胞的存活和分裂<sup>[5,6]</sup>。对于培养物中的神经元, 一方面由于实验材料取自生后的大鼠, 神经元不再分裂; 另一方面, 因为细胞接种密度较低, 神经元不容易存活, 所以通过延长培养

时间即可除之。少突胶质细胞暴露在空气中很短时间即死亡。所以通过换液时将培养液吸干即可达到去除少突胶质细胞的目的。

总之, 笔者建立的低密度添加 EGF 培养星形胶质细胞的培养方法可为对其研究星形胶质细胞的生物学作用提供纯化的星形胶质细胞株。

### 参 考 文 献:

- [1] LIN L-FH, DOHERTY DH, LILE JD, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons[J]. *Science*, 1993, 260(5111): 1130-1132.
- [2] 孙 怡, 田玉科, 项红兵. 氯化可的松对大鼠脊髓星形胶质细胞体外分泌 TNF- $\alpha$  及释放 EAAS 的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2004, 14(7): 103-107.
- [3] SUN Y, TIAN YK, XIANG HB. Effect of hydrocortisone on the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  and EAAS of astrocytes in the spinal cord of rats in vitro [J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2004, 14(7): 103-107. Chinese
- [4] BARBIN G, SELAK I, MATHORP M, et al. Use of central cultures of the detection of neuronotrophic agents [J]. *Neuroscience*, 1984, 12(1): 33-43.
- [5] IMURA T, KORNBLUM HI, SOFRONIEW MV. The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(7): 2824-2832.
- [6] BAMBRICK LL, DE GRIP A, SEENIVASAN V, et al. Expression of glial antigens in mouse astrocytes: species differences and regulation in vitro [J]. *J Neurosci Res*, 1996, 46(3): 305-315.
- [7] ERIKSSON C, ERICSON C, GATES MA, et al. Long-term, EGF-stimulated cultures of attached GFAP-positive cells derived from the embryonic mouse lateral ganglionic eminence: in vitro and transplantation studies [J]. *Exp Neurol*, 2000, 164 (1): 184-199.

(王荣兵 编辑)

### (上接第 3723 页)

- [7] JOHNSON TS, HAYLOR JL, THOMAS GL, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitions in experimental renal scarring [J]. *Exp Nephrol*, 2002, 10(3): 182-195.
- [8] RITTER T, GONG N, PLEYER U. Is ex vivo adenovirus mediated gene transfer a therapeutic option for the treatment of corneal diseases? [J]. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89(6): 648-649.
- [9] YANG J, REUTZEL-SELKE A, STEIER C, et al. Targeting of macrophage activity by adenovirus-mediated intragraft overexpression of TNFRp55-Ig, IL-12p40, and vIL-10 ameliorates adenovirus-mediated chronic graft injury, whereas stimulation of

macrophages by overexpression of IFN- $\gamma$  accelerates chronic graft injury in a rat renal allograft model [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(1): 214-225.

- [10] ST GEORGE JA. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors [J]. *Gene Ther.*, 2003, 10(14): 1135-1141.
- [11] BERTELMANN E, RITTER T, VOGT K, et al. Efficiency of cytokine gene transfer in corneal endothelial cells and organ-cultured corneas mediated by liposomal vehicles and recombinant adenovirus [J]. *Ophthalmic Res*, 2003, 35 (2): 117-124.

(王荣兵 编辑)