

基因工程在心脏移植中的应用

湖南医科大学附属第二医院心外科 (410011) 赵永祥 综述 胡冬煦 审核

摘要 基因工程技术是当代生命科学研究中的一个全新高科技。该技术包括染色体转导技术、基因转染技术、转基因动物技术。这些技术的应用,可望在基因水平解决同种心脏移植术后供心的缺血再灌注损伤和免疫排斥反应等难题。异种心脏移植最主要的问题是由于天然抗体及补体因素引起的超急性排斥反应,而转基因动物技术的应用,可使异种心脏不能再表达天然抗体的靶分子,以使供体器官免于宿主天然抗体的攻击。

关键词 心脏移植; * 基因工程

自 1973年美国斯坦福大学 Boyer 等生产出第一个重组 DNA 分子后,基因工程技术的蓬勃发展,给心脏移植界带来了深刻的变化,开创了心脏移植发展的新思维。本文探讨心脏移植中的基因工程及其应用前景。

1 基因细胞内转导技术

1.1 染色体转导技术 是利用微小细胞融合或显微注射法把携有目的基因整合入受体细胞内的技术。它具有无 DNA 损伤、蛋白和 DNA 没有分离、其基因结构完整及所反映的是原来的本质等优点。但是操作程序较复杂,且周期较长,因此,正处于完善阶段。

1.2 基因转染技术 该技术的关键是载体技术。应用理想的载体,将目的基因导入心脏和血管,并安全、长效表达,是基因预防和基因治疗的关键技术。目前用于体内外基因转移的载体分为病毒和非病毒两大类。

1.2.1 病毒方法 是利用载有目的基因的复制缺陷病毒感染靶细胞。逆转录病毒 (RV) 是早期基因治疗研究中最常用的载体。其原理是去掉编码病毒结构蛋白的反式作用序列,由目的基因取代,构成复制缺陷病毒,再借助病毒包装细胞提供病毒结构蛋白,形成具有完整感染能力的完整病毒,用其感染靶细胞,即可将目的基因导入细胞内。其优点是目的基因可以整合到染色体上,可实现稳定长期表达。而且转染效

染非增殖期的细胞,可能产生整合突变,现多用于体外实验,即将靶细胞从体内取出,进行基因修饰,而后移植到体内。

腺病毒 (AD) 是目前广泛应用于心脏移植时基因转移的病毒载体,能转染增殖和非增殖的细胞,具有较高转染性。但是,AD 不能整合进染色体,其基因只能暂时表达。

腺相关病毒 (AAV) 是一种无病理作用,定向整合到染色体的病毒载体,可转染增殖和非增殖细胞,获得高效与长期表达,近年来日益受到重视^[2]。但尚无在心脏移植中应用的报道。

1.2.2 非病毒方法 有 DNA 磷酸钙法、受体介导法、脂质体介导法和显微注射法等。与病毒方法相比,没有致癌性,也排除了病毒感染;缺点是整合率低。近来,人们对脂质介导的转移方法有了较多的研究,转导效率有很大提高;加之其具有安全、方便的优点,是一种很有前途的目的基因转载体系。现已有在心血管系统中研究的报道^[3]。

1.3 转基因动物技术 该技术是将目的基因 (外源基因) 在体外改造构建成可表达的融合基因 (或使用包括调控区在内的基因组 DNA) 后,将其导入受精卵的雄原核 (或囊胚内的全能干细胞、着床前的胚胎细胞及精子) 内,使目的基因在染色体上稳定整合,然后将其移入假孕母体的输卵管等 (或子宫) 中,使之发育成能携带

目的基因称之为转基因(transgene)^[4]。它具有能在个体水平从时间、空间角度同时观察基因表达功能和表现效应的独特优点;还具有“生物反应器”的功能,有效地将基因水平、蛋白质水平和临床水平的研究有机的统一起来。

2 应用现状

2.1 在同种心脏移植中的应用

心脏移植术中较为棘手的问题是供心的缺血再灌注损伤和免疫排斥反应。根据分子生物学机制,利用基因工程技术,对供心进行处理,有望使上述问题得到较好的解决。心肌直接注射可以将外源基因成功地导入心肌组织。但是,这种方法导入的基因分布不均匀,并可出现注射部位的炎症反应。后用冠状动脉内输注法将阳离子脂质体和目的基因的复合物转入低温保护期间的同种异体心脏,证明是可行的^[5,6]。有人用腺病毒载体得到类似的结果^[7]。

现在的工作转到了将目的基因导入供体心脏的阶段。Sawa用冠状动脉内灌注法,以病毒脂质体作为载体,将人超氧化物歧化酶基因导入供心,移植后3天进行缺血再灌注处理,结果发现转基因组心脏功能明显优于对照组,说明人超氧化物歧化酶基因转染能提高供心对缺血再灌注损伤的耐受力^[8]。另外一些学者正在进行基因预防心脏移植后免疫排斥反应的研究。也是采用冠状动脉内灌注法,用复制缺陷型腺病毒作为载体,将免疫抑制细胞因子基因IL-10和转化生长因子 β_1 导入兔供体心脏,术后4天发现有导入基因的表达^[9]。

2.2 在异种心脏移植中的应用

虽然同种心脏移植取得了巨大的成功,但供心的来源不足,远期的慢性排异反应控制不佳,费用过高仍严重地影响着这一技术的广泛开展。人们设想通过基因工程的方法来解决这些问题。科学家已把目光从有限的同种供心移向动物,但由于天然抗体(NA)及补体因素而引起的超急性排斥反应(HRA)严重阻碍着异种心脏移植的进行。现已表明,HRA的主要机制是人体内存在针对异种动物(猪)组织成份的天然抗体(主要

抗体通过与异种动物供体器官血管内皮细胞表面的靶分子结合,继而激活补体系统,导致补体依赖的细胞毒作用^[10]。

一方面是以NA攻击的靶细胞抗原为核心的研究。由于异种排斥是由受体内存存的NA与异种供体器官血管内皮细胞上的抗原结合而触发。这些抗原是位于细胞膜表面糖蛋白末端的碳水化合物,其分子特点为末端均为 α 半乳糖(α -Gal)残基。已发现人类抗猪抗体属于抗 α -Gal抗体,猪血管内皮细胞表面的 α 半乳糖残基是NA的特异性识别位点,NA对具有 α -Gal残基的寡糖具有较强的亲和力^[11]。此类寡糖由 α 半乳糖基转移酶(α 1-3GT)作用所产生。因此,如果能阻止异种动物供体 α 1-3GT基因的表达,那么对人类抗 α -Gal抗体将没有其相应的抗原,从而可避免或减轻由于人类抗 α -Gal抗体与异种抗原结合而引起的HRA。于是,人们试图采用转基因技术产生 α 1-3GT缺陷的转基因动物,使异种心脏不能再表达天然抗体的靶分子,以使供体器官免于宿主NA的攻击。目前,编码猪 α 1-3GT的cDNA已被克隆^[12],使之有可能通过同源基因重组,基因打靶灭活 α 1-3GT,或敲除 α 1-3GT基因,或利用反义核酸技术抵制 α 1-3GT在猪的表达,且产生一个在血管内皮细胞缺乏 α -Gal表型的转基因猪系^[13]。据此,有人认为该方法可能是一个最有希望解决HRA的途径。

另一方面是以抑制补体激活为焦点的探讨。因为补体激活是由一系列CRPs(补体激活调节蛋白如补体抑制因子、膜辅助蛋白等)所调控,在通常情况下,这些CRPs能限制自身或同种补体的激活。但由于种属差异,在异种移植中,异种供体器官上的CRPs阻遏受体补体激活的作用很弱,不能控制受体补体激活^[14]。而在HRA中,主要的靶器官是供体器官的内皮细胞,因此如能使其表达异种(受体)的补体调节蛋白,即使猪的内皮细胞表达人的CRPs,就有可能保护供体器官免于补体激活引起的内皮细胞溶解破坏,从而提高异种移植的成功率。在

脏进行基因修饰,产生表达人源补体调节蛋白的转基因动物,使异种心脏具有抑制人补体激活的能力。补体抑制因子(DAF)转基因猪的研究已取得进展。体外人体血液灌流实验表明,该基因表达产物具有明显的延迟排斥反应发生的作用。Mecurry^[15]等进一步用微注射法产生表达 DAF 的转基因猪,体外用人血灌注供体器官或将供体器官移植到灵长类动物内发现,靶器官不被受体(人或灵长类)补体所破坏。可见,此尝试亦可能是阻止 HAR 的一种有效方法。

总之,利用转基因动物技术,不断地对供体猪系进行基因修饰,使之最大限度地满足人类的需要,产生受体免疫耐受的心脏,从而极大地消除免疫障碍,使心脏移植不再依赖于免疫抑制剂或使受者免于用放射方法诱导免疫耐受或骨髓移植之苦;且能节省大量的经费,具有巨大的经济效益和社会效益。

3 存在的问题和前景

目前,心脏移植中的基因工程正处于实验阶段,既面临基因治疗普遍遇到的问题,也有心脏移植中的特殊问题。

(1)心脏移植术后供心的缺血再灌注损伤和免疫排斥反应的分子生物学机制尚未彻底明了,且涉及到多种基因的异常表达。因此,进一步阐明其发生机制,发展能够携带多种基因的多功能载体体系是今后主攻方向。

(2)基因转移技术有待完善,表现在①基因的转染率低。心脏移植中运用的基因转移途径有别于血液病和肿瘤。现在使用的基因转移法均难以获得满意的转染效率。②目的基因不能长期表达。因为多数情况下导入的靶细胞基因不能整合到靶细胞中,故基因表达时间维持不久。③血管内注射后基因转入靶细胞的目标性不强。而心脏移植中的基因工程研究多从预防角度出发,更加迫切需要外源基因在体内的高

效转染、目标性强和长效表达,迄今为止的基因转移技术尚不能满足这样的要求,有待进一步的探索。

(3)在基因治疗中,外源目的基因导入机体的靶细胞后复制、转录、表达调控及其对机体系统的效应如何?宿主细胞对外源基因产生何种影响?均是非常复杂的问题,关系着目的基因在体内的命运。就此方面深入探讨是心脏移植中基因工程的主要课题。

(4)转基因动物技术是一项高难度技术,在心脏移植中仍存在以下问题有待解决:①定点整合技术;②可控表达技术;③便于分析的单拷贝技术;④选择优良的启动子和增强子等。

参 考 文 献

- 01 Miller AD. Blood, 1990; 76(2): 271
- 02 Vieweg J et al. Circ Res, 1995; 55(10): 2366
- 03 Pastore CJ et al. Circulation, 1995; 92(4): 1
- 04 Murray GAH. Transgenesis, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, 1992; 251
- 05 Dalesandro J et al. J Thorac Cardiovasc Surg, 1996; 111(2): 416
- 06 Ardehali A et al. J Thorac Cardiovasc Surg, 1995; 109(4): 716
- 07 Lee J et al. J Thorac Cardiovasc Surg, 1996; 111(2): 246
- 08 Sawa Y et al. J Thorac Cardiovasc Surg, 1997; 113(3): 512
- 09 Ron Brauner et al. J Thorac Cardiovasc Surg, 1997; 113(6): 1059
- 10 Larkin DF et al. Transplantation, 1995; 60(5): 491
- 11 Galili V et al. Immunology Today, 1993; 14(10): 480
- 12 Dabakowski PL et al. Transplantation Proc, 1994; 26(3): 1335
- 13 Gustafsson K et al. Immunol Rev, 1994; 141: 59
- 14 Lisa E. Diamond et al. Transplantation, 1996; 61(8): 1241
- 15 Mecurry RR et al. Transplantation Proc, 1995; 27(1): 317

(1998-04-19 收稿)