

# 基因工程在心脏移植中的应用

冯强 梁宏立 倪一鸣

心脏移植是目前治疗终末期心脏病的重要手段。随着手术技术不断完善,以及免疫抑制剂的应用,心脏移植得到广泛开展。但全身使用免疫抑制剂会带来一些严重的毒副作用,如全身免疫系统受抑、药物中毒等。

随着基因工程的发展,近 10 年来,人们将转基因技术引入了器官移植领域,尤其是心脏移植。人们试图通过向移植心脏内转入特定目的基因(其多数表达产物具有调节免疫及炎症反应的活性),使心肌细胞表达转基因产物,而获得局限于心脏的区域性免疫抑制及炎症抑制。从而减缓排异反应和缺血再灌注损伤,并避免了应用免疫抑制剂所带来的毒副作用。

供体心脏植入前,有足够的时间在体外用高浓度、大体积、大剂量的转基因载体处理心脏,即在低温下(4℃)、短时间(数小时)内进行孵育(可避免热缺血损伤,又可使转基因载体与靶细胞充分接触),之后可洗脱多余载体(以减少其毒性,免疫原性及受体全身性的转染和表达)。如此体外转染可以不影响其他组织器官,而获得高度特异性的器官转染。

心脏移植的转基因治疗包括 3 个环节<sup>[1]</sup>:(1)合适的转基因载体,以获得尽可能高的转染效率,并稳定表达。(2)有效的载体转导方法,使载体在靶器官得以特异性、均匀地分布。(3)各种有效延长移植心脏存活的目的基因。以下分别加以综述。

## 转基因载体

目前应用的载体主要有 3 类:(1)质粒载体;(2)可整合入宿主基因组的病毒载体,如逆转录病毒及腺相关病毒;(3)无整合性的病毒载体,如腺病毒。亦有人使用一些反义寡聚核苷酸片段作为载体。

质粒载体与阳离子脂质体形成混合物,可与细胞膜融合,将质粒排入胞浆中。在早期的研究中其曾被直接注射到心肌中,但转染率低,只有 0.1%~1.0%靶细胞被转染<sup>[1]</sup>。此后,为增加混合体的转染能力加入了一些具有病毒性质的成分,如腺病毒蛋白—transferrin、仙台病毒衣壳等。此外,还开发了新的转染试剂,如 Starburst dendrimer<sup>[2]</sup>和 Polylysine-molossin<sup>[3]</sup>。

逆转录病毒载体在早期基因治疗研究中较常用。人们去掉病毒基因组中编码病毒结构蛋白的反式作用序列,由目

的基因取代,构成复制缺陷性病毒。其感染靶细胞后即可将目的基因导入细胞内。此载体的优点是:目的基因可以整合到靶细胞的染色体上,实现长期稳定表达。但其转染效率较低,可能有 2 个原因:(1)需要处于增殖状态的靶细胞;(2)制备的病毒悬液滴度低<sup>[1]</sup>。

腺病毒可以制得高滴度悬液,并可转染非分裂细胞,所以转染率甚高,达 10%~30%,是逆转录病毒的 100~1 000 倍。可以说,腺病毒载体的使用是转基因治疗的一个转折点。目前大多数针对目的基因的动物实验都是以腺病毒作为载体。但其不具整合性,基因只能暂时表达,一般维持 1 个月左右。

腺相关病毒是一种具有整合能力,可以转染增殖及非增殖细胞,而且不表达病毒自身蛋白,从而避免宿主针对载体免疫应答的病毒载体,可获得高效而长期的表达。但难以制备高滴度悬液。

反义寡聚脱氧核苷酸片段可与靶细胞自身的特定 mRNA 结合,阻断其翻译过程,并可加强 RNA 酶对 mRNA-反义寡聚脱氧核苷酸复合物的降解,使特定蛋白的表达减少,从而调节局部的免疫及炎症反应。

对于大多数转基因载体,在将免疫抑制基因导入靶细胞的同时,可能诱发局部炎症反应,包括特异性淋巴细胞反应,以及淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、NK 细胞和器官实质细胞的非特异性机制。这种炎症反应可以消除转基因的表达,使基因治疗失败,并可增强移植排异反应。如质粒 DNA 可以激活所有的细胞及体液反应。第一代腺病毒载体亦可引起抗病毒免疫反应。

对此,人们考虑了一系列的对策,如(1)构建免疫原性较弱的载体,如剔除部分或全部病毒基因的第二代、第三代腺病毒载体<sup>[1]</sup>;(2)合并使用免疫抑制剂;(3)通过载体所携带的免疫抑制因子产生局部免疫抑制。

## 载体转导方法

早期研究中,人们将目的基因载体直接注射到移植心脏的心尖部;基因的表达主要局限于注射部<sup>[4]</sup>。腺病毒载体的摄取率仅为(9.9±2.4)%,并可引起明显的炎症反应<sup>[5]</sup>。

此后发现,以冠状动脉(冠脉)灌注法转导载体,在冠状动脉、静脉周边组织、冠脉毛细血管网、心外膜、心肌、心内膜都有转基因表达存在<sup>[6]</sup>,且分布更均匀。对腺病毒载体的

血管所达到的免疫调节效果较直接注射到心肌更有效。

为提高体外转基因的效率,其操作过程也进行了一系列的优化性研究,如 DNA/ vector 浓度、血清抑制作用、靶细胞暴露时间、结合牢固程度、灌注方式等<sup>[7]</sup>。有人认为<sup>[8]</sup>,在缓慢冠脉内灌注的同时给予左心室间歇性压力,可使转基因分布更加均匀。有人<sup>[9]</sup>采用房间隔人为穿孔的大鼠心脏异位移植手术方式,使经冠状动脉灌注的载体可在冠状血管系统内反复循环,提高转染效率。有人<sup>[10]</sup>采用高压进行转导寡聚核苷酸片段,可获得 $(48 \pm 5)\%$ 的转染率。

## 目的基因

目前认为,心脏移植术后主要面临缺血再灌注损伤和排斥反应,包括超急性、急性和慢性排斥反应。根据以上问题,人们选择了相应的目的基因进行研究。

### 1. 缺血再灌注损伤(目的基因: ICAM-1)

移植心脏再灌注后, ICAM-1 的表达量升高,引起细胞因子粘附分子的“瀑布反应”,导致非特异性炎症反应,如再灌注损伤及急性排斥反应。研究表明,用 anti-ICAM-1 寡聚核苷酸转染移植心脏,可延长心脏存活,若合并使用 LFA-1 单抗,则其作用更加明显<sup>[10]</sup>。

### 2. 超急性排斥反应(目的基因: CD<sub>39</sub>, h-DAF)

同种间移植的超急性排斥反应,临床上已可以解决。关于目的基因 CD<sub>39</sub>、h-DAF<sup>[11]</sup>的研究主要在于建立转基因动物,改善异种间移植超急性排斥反应。

### 3. 急性排斥反应(目的基因: IL-10, TGF- $\beta_2$ , CTLA-4Ig, vMIP-II, MC148, B2702)

IL-10 对经抗原呈递细胞激活的 TH1 细胞的细胞因子合成过程有下调作用,抑制单核-巨噬细胞依赖性 T 细胞的活化和抗原呈递细胞的作用。TGF- $\beta_1$  在免疫系统有多种作用,可以抑制淋巴细胞的活化、T 细胞、B 细胞的增生和细胞因子的合成<sup>[5]</sup>。CTLA-4Ig 是一种由 CTLA-4 的胞外部分和 IgG 的重链重组而成的融合蛋白,是 CD<sub>28</sub> 的同系物。可以竞争性地阻断 B<sub>7</sub> 与 CD<sub>28</sub> 的结合<sup>[12]</sup>。vMIP-II 和 MC148 是分别从人类疱疹病毒-8 及痘病毒中获得的基因产物。它们与人的化学增强剂(chemokine)有较高的氨基酸序列同源性,可以竞争性地与内源化学增强剂的多种受体结合。从而阻断了免疫排斥起始阶段中淋巴细胞的聚集和活化过程<sup>[13]</sup>。B2702 是源自 I 类 HLA 分子-B2702 的十肽片段,可以抑制细胞毒 T 细胞的分化,及其与 NK 细胞所引起的靶细胞溶解。RDP1257 是 B2702 的类似物,可以通过提高血红素氧化酶-I 的活性而延长移植心脏的存活<sup>[14]</sup>。

### 4. 慢性排斥反应(目的基因: Bcl-X, Cdk-2-Kinase, CDC-2-Kinase)

Bcl-X 是抗调亡的调节因子之一,周期依赖性激酶-2 激酶(Cdk-2-Kinase)和细胞分裂周期-2 激酶(CDC-2-Kinase)

生性病变<sup>[15-17]</sup>。

近 10 年来,心脏移植的转基因治疗研究取得了很大进展。但多还处于临床前试验阶段,仍存在不少问题亟待解决。如目的基因的合理选择、基因转染效率低下、转基因表达时限短、目的基因进入体内的后果尚不明了。随着移植分子病理生理学研究 and 基因工程技术的发展,这些问题的研究将会进一步深入。

## 参考文献

- 1 Sanghong B, Keith L M. Gene therapy for restenosis getting nearer the heart of the matter. Crit Res, 1998, 82: 295-305.
- 2 Qin L, Pahud DR, Ding Y, et al. Efficient transfer of genes into murine cardiac grafts by Starburst polyamidoamine dendrimers. Hum Gene Ther, 1998, 9: 553-560.
- 3 Collins L, Sawyer GJ, Zhang XH, et al. In vitro investigation of factors important for the delivery of an integrin-targeted nonviral DNA vector in organ transplantation. Transplantation, 2000, 69: 1168-1176.
- 4 Wang J, Jiao S, Wolf JA, et al. Gene transfer and expression in rat cardiac transplants. Transplantation, 1992, 53: 703-705.
- 5 Brauner R, Wu L, Laks H, et al. Intracoronary gene transfer of immunosuppressive cytokines to cardiac allografts: method and efficacy of adenovirus-mediated transduction. J Thorac Cardiovasc Surg, 1997, 113: 1059-1066.
- 6 Ardehali A, Fyfe A, Laks H, et al. Direct gene transfer into donor hearts at the time of harvest. J Thorac Cardiovasc Surg, 1995, 109: 716-719.
- 7 Pellegrini C, Jeppson A, Taner CB, et al. Highly efficient ex vivo gene transfer to the transplanted heart by means of hypothermic perfusion with a low dose of adenoviral vector. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000, 119: 493-500.
- 8 Bolman RM 3rd. Intracoronary adenovirus-mediated transfer of immunosuppressive cytokine. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 115: 819-821.
- 9 Asfour B, Byrne BJ, Baba HA, et al. Effective gene transfer in the rat myocardium via adenovirus vectors using a coronary recirculation model. Thorac Cardiovasc Surg, 1999, 47: 311-316.
- 10 Poston RS, Mann MJ, Hoyt EG, et al. Antisense oligodeoxynucleotides prevent acute cardiac allograft rejection via a novel, nontoxic, highly efficient transfection method. Transplantation, 1999, 68: 825-832.
- 11 Chen RH, Naficy S, Logan JS, et al. Hearts from transgenic pigs constructed with CD<sub>39</sub>/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates. Xenotransplantation, 1999, 6: 194-200.
- 12 Guillot C, Mathieu P, Coathalem H. Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression. J Immunol, 2000, 164: 5258-5268.
- 13 DeBruyne LA, Li K, Bishop DK, et al. Gene transfer of virally encoded chemokine antagonists vMIP-II and MC148 prolongs cardiac allograft survival and inhibits donor-specific immunity. Gene Ther, 2000, 7: 575-582.
- 14 Magee JC, DeBruyne LA, Buelow R, et al. Gene transfer of immunosup-

- 15 Suzuki J, Isobe M, Morishita R, et al. Antisense Bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. Cardiovasc Res. 2000; 45: 783-787.
- 16 Suzuki J, Isobe M, Morishita R, et al. Prevention of graft coronary arteriosclerosis by antisense cdk2 kinase oligonucleotide. Nat Med. 1997; 3;

900-903.

- 17 Schoenbeck A, Isobe M, Suzuki J, et al. Expression of cell division cycle 2 kinase transcription in chronically rejected cardiac allografts of nonhuman primates. Heart Vessels. 1997; 12: 275-279.

(收稿日期: 2001-01-15)

## · 病例报告 ·

## 右房血管瘤破裂形成巨大血肿致急性右心功能衰竭 1 例

胡建明 方功德 章晔

病人 女, 26 岁。突然晕厥 0.5 h, 后胸闷、气促、全身发绀, 逐渐加重 9 d。查体: 体温 38℃、脉搏 120 次/min、呼吸 32 次/min、血压 90/60 mm Hg (12/8 kPa)。全身发绀、瘀斑, 颈静脉怒张, 极度呼吸困难, 两肺可闻及喘鸣音及湿性罗音。三尖瓣区闻及轻度隆隆样舒张期杂音, 腹稍膨隆, 四肢稍肿胀、湿冷。超声心动图可见右房内增强回声团, 充满全腔, 并延至三尖瓣口, 右房、室内血流稀少。诊断“右房巨大粘液瘤、急性右心衰。”

2001 年 2 月入院后急诊在全麻低温体外循环下手术。术中见: 右房巨大, 表面饱满、质韧, 压力大, 切开右房壁见大量凝血块, 部分机化, 游离壁见一约 3.0 cm×1.5 cm 大小似囊内膜样组织, 房内、外膜广泛分离。右房腔被血肿压迫, 使上、下腔静脉回流受阻。术中清除凝血块 300 g, 切除囊

状组织, 自根部将内、外膜褥式缝合。术后 10 d 痊愈出院。

病理检查: 膜状组织为毛细血管增生, 部分血管内皮细胞呈乳头状增生, 可见残留心肌纤维。病理诊断: 右房血管瘤破裂。

讨论 本例右房血管瘤破裂形成巨大血肿导致急性右心衰, 术前误诊为右房粘液瘤, 考虑右房梗阻引起急性右心衰而采取急诊手术, 病人获救。

我们认为, 手术中要注意两点: (1) 插腔静脉管时要避开血管瘤。本例在上腔静脉开口处用直角管插管, 由于血肿巨大, 无法插下腔管, 遂阻断主动脉后先切开右房, 再阻断上腔静脉, 加大右心吸引, 快速插入下腔管。(2) 仔细探查血管瘤范围并彻底切除, 以免术后复发。本例血肿使右房内、外膜分离, 术中应作修补, 使内、外膜粘合, 避免再发血肿。

(收稿日期: 2001-06-16)

作者单位: 330006 南昌, 江西省人民医院心胸外科

## 巨大气管内软骨瘤摘除 1 例

万磊池 童健 郭梦和

病人 男, 10 岁。间断哮喘 2 年, 高热、气促 20 d。查体: 口唇、甲床发绀, 声嘶, 双侧肺可闻及喘鸣音及细湿罗音。X 线胸片示双侧肺支气管肺炎。胸部 CT 示气管内肿瘤或异物。纤维支气管镜检查见声门下方有新生物, 堵塞管腔 2/3。

1999 年 5 月手术。胸骨切迹上切开气管前壁, 气管插管, 接呼吸机。向上延伸切开气管壁约 4 cm, 见肿物位于气管后壁, 卵圆形, 约 6 cm×4 cm, 结节状隆起, 堵塞管腔 2/3。切开肿物表面包膜, 完整剥离肿物, 气管后壁无破损, 修剪多余气管粘膜后, 5-0 可吸收缝线连续缝合, 1 号丝线间断缝合气管前壁切口, 保留气管插管。术后 9 d 拔除。

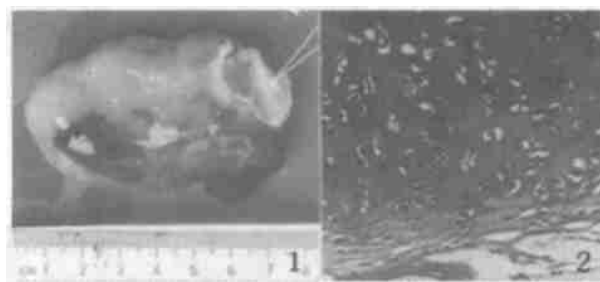


图 1 手术大体标本照片 图 2 病理诊断为(气管内)软骨瘤 HE×400

作者单位: 510282 广州, 第一军医大学附属珠江医院心胸外科 (万磊池、童健), 耳鼻喉科 (郭梦和)

病儿痊愈出院。切除肿物病理检查: (气管内) 软骨瘤。

(收稿日期: 2001-05-23)