

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01319

转染腺病毒介导的肝细胞生长因子减轻大鼠心脏移植急性排斥反应

Adenovirus-mediated human hepatocyte growth factor attenuates acute rejection in rats after heart transplantation

杨建胜^{1,2}, 陈良万^{1*}, 邱罕凡¹, 杨昭伟¹

1. 福建医科大学附属协和医院心外科, 福州 350004

2. 福建医科大学附属第二医院胸心外科, 泉州 362000

[关键词] 转染; 腺病毒; 肝细胞生长因子; 心脏移植; 排斥反应

[中图分类号] R 654.28 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2009)11-1319-03

心脏移植手术成功率高, 但如何防治术后严重的急性排斥反应而不损伤全身免疫功能仍是一大难题。近年来, 器官移植排斥反应的转基因治疗研究进展迅速^[1-2], 有望控制移植器官局部免疫反应, 而保留宿主全身免疫反应功能。内皮细胞的损伤、缺血/再灌注损伤及细胞凋亡等均为急性排斥反应的发生机制。肝细胞生长因子(HGF)是一种多效因子, 研究^[3]表明 HGF 是血管内皮细胞特异的、强大的生长因子, 可抗血管内皮细胞的凋亡, 并抑制内膜的增生, 且不引起血管平滑肌细胞的增殖; 最近, 日本学者 Kazuhiro 等^[4]观察到 HGF 对异位心脏移植小鼠的急慢性排斥反应具有抑制作用。本研究将携带人 HGF 基因的重组腺病毒(Ad-HGF)经冠状动脉灌注同种异位心脏移植大鼠供心, 观察 HGF 对急性排斥反应的影响, 为心脏移植后急性排斥反应的基因治疗方法提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 药品及试剂 Ad-HGF(上海医元生物基因科技发展有限公司构建), RT-PCR 试剂盒(Promega 公司), TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司), hHGF 和 GAPDH 基因上、下游引物(上海基康生物技术有限公司)。c-Met 单克隆抗体(Santa Cruz 公司), IL-2、IL-10 和 IFN- γ 单克隆抗体(深圳晶美生物工程有限公司)。

1.2 模型制备及分组 Wistar 大鼠为供体, SD 大鼠为受体, 雄性, 体质量 200~300 g, 清洁级, 上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[许可证号: SCXK(沪)2003-0003]。采用改进的套管技术通过自制 Cuff 管将 Wistar 大鼠供心的升主动脉、肺动脉与 SD 大鼠受体的右侧颈总动脉、颈外静脉分别进行套接。SD 和 Wistar 大鼠各 90 只配对移植, 随机平均分为 3 组。HGF 基因转染组(A 组): 供心在体外经冠脉缓慢灌注含 2.5×10^{10} pfu/ml Ad-HGF 的 4℃ Stanford 大学液, 持续 30 min, 再植入受体大鼠颈部; 空载体组(B 组): 供心灌

注含 2.5×10^{10} pfu/ml 不携带 HGF 基因的腺病毒载体(Ad)的 Stanford 大学液; 对照组(C 组): 供心仅灌注单纯的 Stanford 大学液。各组实验动物中 6 只用于观察生存期。

1.3 观察指标

1.3.1 供心存活时间 从移植术后起, 每日上、下午各触摸供心 2 次, 以供心搏动明显减弱或停止跳动为排斥终点和存活时间的标志。

1.3.2 HGF 基因转染及蛋白表达的检测 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)提取组织总 RNA, 按 RT-PCR 试剂盒说明书合成 hHGF 的 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。取 5 μ l 的 PCR 扩增产物加 6 \times 上样缓冲液, 于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察拍照。免疫组化方法检测 A 组 HGF 蛋白及其受体 c-Met 的表达。

1.3.3 H-E 染色 各组于术后第 1、3、7、14 天取部分供心组织切片行 H-E 染色。光镜观察供心组织病理学改变, 计数每 200 倍高倍镜视野的炎性细胞, 每份标本取 10 个高倍镜视野求平均值。按器官移植排斥反应的国际诊断标准分级^[5]。

1.3.4 心肌超微结构改变 取材, 3% 戊二醛-1.5% 多聚甲醛前固定, 1% 锇酸-1.5% 亚铁氰化钾后固定, 乙醇-丙酮脱水, 环氧树脂 618 包埋剂包埋; 超薄切片, 醋酸铀、柠檬酸铅染色, Hu-12A 型透射电镜(日立公司)观察、摄影。

1.3.5 心肌细胞凋亡检测 采用 TUNEL 方法检测心肌细胞凋亡, 按试剂盒说明书操作。每份标本计数 10 个随机 200 倍视野中的凋亡细胞, 以凋亡细胞数占总心肌细胞数的百分比为凋亡指数(apoptosis index, AI)。

1.3.6 免疫组化染色法检测炎性细胞因子的表达 分别于术后第 1、3、7、14 天取供心组织, 切片行 SP 免疫组化染色, 光镜观察。IL-2、IL-10、IFN- γ 表达的半定量分析采用 Image-Pro Plus 多媒体自动显微图文分析系统(SD-MI3 图像统

[收稿日期] 2009-04-18

[接受日期] 2009-07-25

[基金项目] 福建省科技计划项目(2005Y013). Supported by Science & Technology Program of Fujian Province(2005Y013).

[作者简介] 杨建胜, 博士, 副主任医师. E-mail: jiansyang@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0591-83344034, E-mail: drclw@tom.com

计软件,SONY公司)完成。

1.4 统计学处理 应用SPSS 12.0软件进行统计学分析,多组间生存时间比较用Kaplan-Meier生存分析,多组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 供心存活时间 A组、B组和C组供心存活时间分别为(63±12)、(7±1.4)和(8±1.2)d。Kaplan-Meier生存分

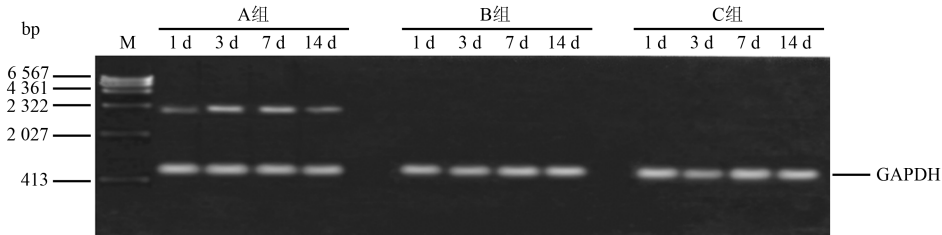


图1 各组心肌组织hHGF mRNA RT-PCR产物电泳结果

M: Marker; A组: HGF基因转染组; B组: 空载体组; C组: 对照组

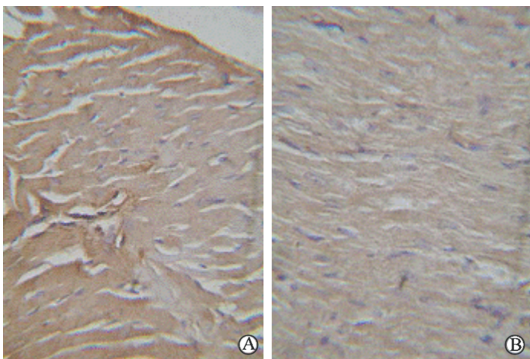


图2 术后7d心肌hHGF蛋白(A)和c-Met(B)的表达
Original magnification: ×200

2.3 心肌组织病理改变 A组的移植心周围组织轻微黏连,B、C组的移植心周围组织明显黏连。H-E染色显示,A组移植后,有轻微的弥漫性炎性细胞浸润,未见坏死,或单灶性侵袭性炎性细胞浸润,并伴有小灶状心肌损害;病理学分级为I或II级(图3A)。B组、C组移植后,出现典型的急性排斥反应表现,心肌间质出现弥漫性的炎性细胞浸润,伴有局部的心肌坏死,组织间质水肿,病理学分级为III或IV级(图3B)。各组供心组织术后炎性细胞浸润数明显增加,术后7、14d较多。A组术后3、7、14d较其他2组少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);B组和C组比较差异无统计学意义。

2.4 心肌超微结构的变化 A组移植后,心肌细胞及间质中度水肿,肌质纤维排列尚整齐,肌丝清楚,线粒体中度肿胀,部分嵴模糊,糖原颗粒减少,润盘尚清楚,核染色体均匀(图4A)。B组、C组移植后,心肌细胞严重水肿,胞核不规则,染色体边集,线粒体肿胀,部分嵴模糊、空泡变,肌丝溶解,肌浆网扩张,润盘模糊(图4B、4C)。

2.5 细胞凋亡指数 凋亡细胞主要是心肌细胞,少数为EC

析显示:A组的移植心脏平均存活时间明显较其他2组延长($P < 0.01$);B、C组间差异无统计学意义。

2.2 HGF基因转染及蛋白表达情况 A组移植后1、3、7、14d均有2.25 kb长的特异性hHGF基因片段出现,以第3、7天表达较明显。B、C组基本不表达(图1)。免疫组化染色显示A组心肌组织内均可见HGF和c-Met免疫反应阳性的棕色颗粒(图2),并随时间推移而增多,HGF在7、14d达高峰;c-Met在7d达高峰,14d有所下降。

和浸润的淋巴细胞。各组细胞凋亡均随移植时间增加而严重,14d最明显。移植后7、14d A组的移植心肌凋亡细胞数均较其他2组少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),B组与C组比较无明显区别。

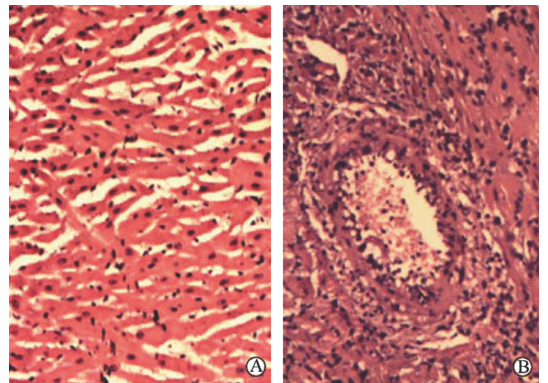


图3 A组(A)和C组(B)术后7d H-E染色结果

A: HGF基因转染组,移植心脏心肌间质中度水肿;心肌细胞水肿加重不明显,少量炎性细胞浸润;B: 对照组,移植心脏心肌间质大量单核细胞及淋巴细胞浸润,心肌细胞水肿,部分心肌细胞凝固性坏死;血管周围水肿,管腔内淤血和血栓形成,内皮细胞坏死脱落,管壁增厚明显,呈袖套样血管炎改变。Original magnification: ×200

2.6 免疫组化检测IL-2、IL-10和IFN-γ的表达情况 各组术后1、3、7、14d移植植物心肌组织内均可见IL-2、IL-10和IFN-γ免疫反应阳性的棕色颗粒。移植后3d,IL-2表达最明显,此后维持较高水平。与B、C组比较,第3、7、14天A组供心组织内IL-2表达减少($P < 0.01$)。移植后A组心肌内IL-10的表达逐渐增多,B、C组呈双峰样表达。与B、C组比较,第7、14天A组供心组织内IL-10表达量较大($P < 0.05$)。移植后3d,IFN-γ表达最明显,此后明显减少。与B、C组比较,第3天A组供心组织内IFN-γ表达减少($P < 0.05$)。

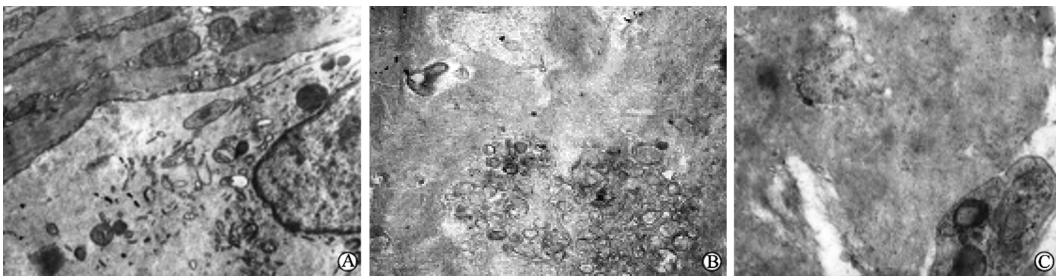


图 4 各组术后 14 d 心肌超微结构的改变

A: HGF 基因转染组, 心肌细胞轻度水肿, 肌质纤维排列尚整齐, 肌丝清楚, 线粒体轻度肿胀, 部分嵴稍模糊, 糖原颗粒减少, 润盘尚清楚, 核染色体尚均匀; B: 空载体组, 心肌细胞严重水肿, 肌丝溶解, 肌浆网扩张, 润盘消失; C: 对照组, 心肌细胞明显水肿, 胞核不规则, 肌丝溶解, 线粒体肿胀, 部分嵴模糊、空泡变。Original magnification: $\times 16\ 000$ (A-C)

3 讨论

器官移植中实行基因转导技术的独特优点是在移植前对离体的供体器官进行预处理和在冷保存期间转染外源性基因, 使移植器官能有效地实现基因转导, 形成“转基因供体”, 随后在血管重建血流开放后被转导基因序列迅速表达, 控制移植器官局部免疫反应, 保留宿主全身免疫反应功能^[6]。心脏移植的转基因治疗策略主要针对同种移植物的免疫反应的调控上, 已证实 IL-10 基因转移可明显延长同种移植物的存活时间^[7-8]; 然而由于基因产物表达的短暂和有限性以及血管表达水平相对较低等限制了其免疫抑制效果, 诱导免疫耐受的成功率较低^[1]。本实验采用重组腺病毒作为载体, 通过冠脉灌注的方法转染供心, 结果表明, 移植后 14 d 内不同时间取移植植物均检测到 HGF 基因和蛋白的表达, 但其长期表达效果如何尚有待进一步观察。

同种心脏移植急性排斥反应主要表现为: 移植植物存活时间短; 大量单核巨噬细胞、淋巴细胞游走并浸润移植植物组织; 心肌细胞坏死和细胞凋亡; 急性反应期细胞因子变化, 如: 移植植物组织内 IL-2、IFN- γ 的表达增多(常于术后 24 h 发生, 48~72 h 达到高峰), IL-10 的表达减少等^[9]。本实验显示对照组移植植物出现了典型的急性排斥反应表现: 心肌组织大量免疫及炎性细胞浸润; 组织细胞水肿、坏死; 血管内皮脱落、管壁增厚、管腔内血栓形成; 肌原纤维间水肿明显, 肌节结构欠清晰, 断裂, 部分肌纤维溶解; 线粒体肿胀, 基质密度降低, 嵴排列紊乱; 心肌细胞凋亡较多; 且心肌的 IL-2、IFN- γ 高表达, IL-10 低表达; 供心存活时间仅为 (8 ± 1.2) d。与对照组相比, HGF 基因转染组的排斥反应损害明显减轻, 移植植物中 IL-2、IFN- γ 表达水平降低, IL-10 表达水平升高, 心肌细胞凋亡明显减少, 供心存活时间也明显延长 $[(63 \pm 12)$ d, $P < 0.01$]。这提示转染 HGF 基因能在心脏移植急性期减轻移植植物炎症反应, 保护心肌缺血/再灌注损伤, 抑制细胞凋亡, 对其产生保护作用。HGF 对心血管疾病的保护作用一方面是由于其可以直接作用于内皮细胞, 改善内皮细胞功能, 诱导血管新生, 另一方面 HGF 可以直接作用于心肌细胞而发挥作用^[10]。HGF 还是一种特异的促内皮细胞生长因子, 具有很强的促血管内皮细胞有丝分裂、抑制细胞凋亡作用, 是一种抗损伤修复因子, 还可能具有免疫调节作用。

总之, 经冠脉灌注重组腺病毒载体介导 HGF 基因转移到同种心脏移植植物, 能减轻同种移植植物急性排斥反应, 其机制可能与减轻移植植物内炎性细胞浸润、减少心肌细胞凋亡和缺血/再灌注损伤有关。本研究中, 关于基因转染后表达的活性蛋白对全身其他脏器的影响, 基因转染的剂量和途径, 基因转染与其他药物疗效的比较等还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Ritter T, Nosov M, Griffin M D. Gene therapy in transplantation: toward clinical trials[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2009, 11: 504-512.
- [2] Ross J Jr. A 50-year research journey. From laboratory to clinic [J]. *Circ J*, 2009, 73: 3-12.
- [3] Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF[J]. *J Clin Invest*, 2000, 106: 1511-1519.
- [4] Yamaura K, Ito K, Tsukioka K, Wada Y, Makiuchi A, Sakaguchi M, et al. Suppression of acute and chronic rejection by hepatocyte growth factor in a murine model of cardiac transplantation: induction of tolerance and prevention of cardiac allograft vasculopathy[J]. *Circulation*, 2004, 110: 1650-1657.
- [5] Nunoda S. Diagnosis of rejection after heart transplantation[J]. *Kyobu Geka*, 2007, 60(8 Suppl): 685-691.
- [6] 李伟. 基因治疗[M]//杜宝恒. 生物治疗学. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2003: 79-98.
- [7] Oshima K, Sen L, Cui G, Tung T, Sacks B M, Arellano-Kruse A, et al. Localized interleukin-10 gene transfer induces apoptosis of alloreactive T cells via FAS/FASL pathway, improves function, and prolongs survival of cardiac allograft[J]. *Transplantation*, 2002, 73: 1019-1026.
- [8] Hong Y S, Laks H, Cui G, Chong T, Sen L. Localized immunosuppression in the cardiac allograft induced by a new liposome-mediated IL-10 gene therapy[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2002, 21: 1188-1200.
- [9] Marti V, Romeo I, Aymat R, Garcia J, Guiteras P, Ballester M, et al. Coronary endothelial dysfunction as a predictor of intimal thickening in the long term after heart transplantation[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, 122: 1174-1180.
- [10] Cho K R, Choi J S, Hahn W, Kim D S, Park J S, Lee D S, et al. Therapeutic angiogenesis using naked DNA expressing two isoforms of the hepatocyte growth factor in a porcine acute myocardial infarction model[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2008, 34: 857-863.

[本文编辑] 商素芳, 孙岩