

细胞因子基因疗法延长烫伤后小鼠同种植皮存活期的实验研究

郑江红 谷才之 林子豪 陈敏亮 王锡华 吴宏 李惠杰 夏来启

【摘要】 目的 探讨细胞因子基因疗法对烫伤后同种植皮存活期的影响。方法 以小鼠 IL-10 基因为治疗性目的基因,以成纤维细胞为载体细胞,利用基因转录技术,建立成纤维细胞介导的基因治疗延长烫伤小鼠同种植皮存活期的实验模型。利用逆转录病毒载体将 IL-10 转入 NIH3T3 细胞,小鼠烫伤后创面同种植皮,腹腔内埋植胶原包裹的 NIH3T3-IL-10 细胞,观察其对同种植皮的存活期的影响及小鼠重要脏器的变化。结果 细胞因子基因疗法能使同种植皮的存活期明显延长,小鼠重要脏器未见明显病理损害。结论 成纤维细胞能成功地将 IL-10 导入体内有效表达,并能抑制机体的免疫应答,延长小鼠烫伤后同种植皮的存活期。

【关键词】 白细胞介素 10; 基因转移; 皮肤移植

Effects of cytokine gene therapy on prolonging survival time of allografted skin after scalding in a murine model

ZHENG Jianghong, GU Caizhi, LIN Zihao, et al. Department of Burn and Plastic Surgery, General Hospital of Urumqi, Urumqi 830000, China

【Abstract】 Objective To explore the role of cytokine gene therapy on prolonging survival time of allografted skin after scalding in a murine model. **Methods** Interleukin 10 (IL-10) gene was employed as therapeutic objective gene and fibroblast was as a carrier cell. Gene transcription technique was adopted to establish an experimental murine model in which fibroblast-mediated gene therapy was used to prolong allografted skin survival time after scalding. IL-10 was transferred into fibroblastocyte (NIH3T3) by reverse transcriptive virus vector. The mice were grafted with alloskin after scalding. In addition, collagen capsulized NIH3T3-IL-10 cells were implanted intraperitoneally in the mice so as to observe its influence on allografted skin survival time and on the changes of their main internal organs. **Results** Cytokine gene therapy could obviously prolong the survival time of allografted skin ($P < 0.01$) without any evident detrimental effect on the internal organs. **Conclusion** These results demonstrated that skin allograft rejection could be inhibited and the survival time be prolonged with the implantation of the fibroblastocyte transferred IL-10 gene.

【Key words】 Interleukin-10; Gene transfer; Skin transplantation

及时封闭烧伤创面是大面积烧伤治疗成败的关键之一。当自体皮源供给困难时,同种和异种植皮是封闭创面的一种有效措施,但因机体的排斥反应,移植皮肤不能长期存活。随着生物技术的发展,人们发现细胞因子白介素-10(IL-10)对免疫效应分子的产生可起抑制作用^[1],是细胞因子合成的抑制因子(CSIF)^[2];这提示了 IL-10 可抑制同种移植排斥反应。我们已成功地将 IL-10 基因转入小鼠成纤维细胞,建立了 IL-10 基因疗法的实验模型^[3]。本文以小鼠烫伤后创面同种皮肤移植为模型,观察成纤维细胞介导的 IL-10 基因疗

法对植皮存活的影响以及受皮鼠体内重要器官的组织学变化,旨在探讨细胞因子基因疗法延长烫伤后同种植皮存活期的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

小鼠 IL-10 重组逆转录病毒载体由日本 Hamada 博士惠赠。

Superscript 逆转录试剂盒、DMEM 培养基均为 Gibco 公司产品;G418 购自 Sigma,大鼠 VII 型胶原购自上海华美试剂公司,鼠 IL-10ELISA 试剂盒购自 Endogen 公司。

1.2 动物与细胞株

小鼠成纤维细胞 NIH3T3 由第二军医大学免疫学

作者单位:830000 乌鲁木齐 兰州军区乌鲁木齐总医院烧伤整形科(郑江红、谷才之、王锡华、李惠杰、夏来启);上海第二军医大学附属长征医院整形外科(林子豪、陈敏亮、吴宏)

教研室保存, BALB/C 小鼠(18~20 g)及 C57BL/C 小鼠(17~21 g)购自第二军医大学动物管理所。

1.3 IL-10 基因体外转染试验及 IL-10 活性的测定

将 1×10^5 NIH3T3 细胞悬于 DMEM 培养基约 5 ml 培养瓶中, 12 h 后去除培养液, 加入 1 ml IL-10 逆转录病毒上清液, 同时加入 $8 \mu\text{g/ml}$ 的 Polybrene $10 \mu\text{l}$, 置于 37°C , 5% CO_2 孵育箱中孵育 24 h, 倾去瓶中培养液, 另加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 12 h 后按 1:4 传代, 待测得细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 时, 收集上清, 利用 ELISA 法测定其中所含 IL-10 的活性。

1.4 动物烫伤模型的制备及皮肤移植

BALB/C 小鼠常规麻醉后, 背部备皮约 $1.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$, 将该皮肤置于 100°C 沸水中约 12 s, 使之形成超过深 II 度烫伤, 立刻以 10°C 冷水冲洗该处皮肤 5 min 以中断继发性损伤。在肉膜平面上全层切除该处皮肤, 创面彻底止血。

C57BL/C 小鼠脱颈致死, 背部备皮, 浸泡在 75% 乙醇溶液中 5 min, 切取背部全层皮肤, 大小为 $1.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$, 0.01 mol/L PBS 冲洗 2 遍, 移植于经烫伤处理过的 BALB/C 小鼠背部创面, 打包加压包扎。术后 5 d 打开敷料, 每天观察记录皮片存活情况, 直至皮片完全排斥。以移植皮片红肿、水泡、干屑、溃疡、坏死、发黑视为排斥, 以移植皮片面积的 80% 出现坏死、发黑的时间视为排斥时间。

1.5 IL-10 分泌成纤维细胞克隆株的体内移植方法

采用胶原包裹后腹腔注射移植法(NIH3T3 细胞数为每只 BALB/C 小鼠 10^7 个)。

A 组: 等渗盐水对照组。受皮鼠腹腔内注射等渗盐水, $2 \text{ ml}/\text{只}$ 。

B 组: NIH3T3-Neo 组。受皮鼠腹腔内注射胶原包裹的 NIH3T3-Neo 细胞, 每只 10^7 个。(NIH3T3-Neo 为感染了空白质粒的 NIH3T3 细胞)

C 组: 氢化可的松对照组。受皮鼠腹腔内按 10 mg/kg 注射氢化可的松, 隔日 1 次, 持续 1 周。

D 组: NIH3T3-IL-10 组。受皮鼠腹腔注射胶原包裹的 NIH3T3-IL-10 细胞, 每只 10^7 个。

以上治疗均在植皮术后当天进行。

1.6 移植皮片的组织学观察

取 A、B、C、D 组受皮小鼠, 分别于术后 5、7、9 d 及 13 d 移植皮片完全排斥时处死, 完整切取所移植皮片, 常规光镜检查。

1.7 重要脏器的组织学观察

取 D 组动物 5 只, 术后 15 d 活杀, 分别取心、肝、肾、脾, 行常规光镜检查。

1.8 统计学处理

多组样本间用方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 IL-10 基因在 NIH3T3 细胞中的表达

用已包裹好的 IL-10 逆转录病毒上清感染小鼠 NIH3T3 细胞, 获得一分泌 IL-10 为 824 U/ml 的细胞克隆株, 而野生型 NIH3T3 细胞及感染对照病毒的 NIH3T3-Neo 细胞均不分泌 IL-10。

2.2 术后腹腔内埋植 NIH3T3-IL-10 细胞对小鼠烫伤后同种植皮存活期的影响, 见表 1。

表 1 术后腹腔内埋置 NIH3T3-IL-10 细胞对植皮存活的影响
Tab 1 Effect of intraperitoneal implantation of NIH3T3-IL-10 cells after operation on the survival time of allografts

组别	例数	给药途径	存活天数(d)
A	8	腹腔注射	7.2 ± 0.8
B	8	胶原包裹, 腹腔注射	7.8 ± 0.8
C	6	腹腔注射	$13.2 \pm 1.0^*$
D	7	胶原包裹, 腹腔注射	$16.1 \pm 1.1^{*\Delta}$

与 A、B 组比较, * : $P < 0.01$; 与 C 组比较, Δ : $P < 0.05$

表 1 所示, C 组和 D 组与对照组(A 组和 B 组)相比皮片存活期显著延长($P < 0.01$), 而 D 组皮片存活期较 C 组亦显著延长($P < 0.05$)。

2.3 移植皮片的形态学和组织学观察

皮片移植术后 5 d, 4 组皮片大体观察无明显差异, 皮片平整, 白润, 柔软, 基底不滑动, 周围组织略红肿。光镜观察可见: 表皮及真皮结构完整, 层次清晰, 真皮新生血管已长入, 周边有少量炎性细胞浸润。术后 7 d, A 组和 B 组显著红肿, 水泡形成, 部分皮片质地稍干硬, 发黑。镜下观: 表皮结构紊乱, 部分基底细胞良好; 表皮与真皮部分分离, 真皮层有大量炎性细胞浸润, 毛细血管大部分栓塞。C 组和 D 组皮片变化不显著。术后 9 d, A 组与 B 组皮片完全发黑、发硬。镜下观: 表皮全层坏死、脱落, 炎性细胞浸润, 同时发现有部分自体表皮细胞潜行性生长。C 组移植皮片少部分有水泡, 着色加深, 质地略硬。镜下见炎性细胞浸润明显增多, 少部分毛细血管栓塞。D 组移植皮片变化不甚

明显,镜下见表皮结构仍然完整,真皮炎性细胞浸润增多。术后 13 d, D 组移植皮片少部分出现水泡; C 组皮片发黑,与基底脱离。D 组移植皮片直至术后 16 d 才发生表皮脱落、干性坏死征象,镜下见:移植皮片广泛排斥反应发生,表皮坏死,大量炎性细胞浸润,血管栓塞。

2.4 腹腔内埋植 NIH3T3 - IL-10 细胞的小鼠重要脏器的组织学观察

BALB/C 小鼠皮肤移植术后腹腔内埋植 NIH3T3 - IL-10 细胞 15 d, 小鼠活动正常,无 1 例死亡。治疗结束后,重要脏器(心、肝、肾、脾)的组织学检查显示各组织结构完整,无明显损伤。

3 讨论

宿主对移植物的免疫排斥反应是同种组织器官移植中存在的最主要问题。在烧伤外科领域,由于皮肤的抗原性较一般的组织为强,故而在烧伤创面利用同种皮肤移植治疗过程中,如何延长同种植皮的存活期,是临床救治大面积烧伤病人的重要环节。以往大都局限于免疫抑制剂的使用,但对于大面积烧伤病人而言,反复使用免疫抑制剂,虽可达到延长移植异体皮或异种皮存活期的目的,但给烧伤后本身免疫力低下的病人带来严重的不良后果(如严重的全身感染)。随着生物技术的发展,基因治疗已成为一个受人们广泛关注并已取得显著疗效的研究领域,其基本模式是将治疗性目的基因导入载体细胞并回植宿主体内,使治疗性目的基因在体内持续发挥作用以达到疗效佳、副作用轻、不需反复使用的治疗效果^[6]。

我们的前期工作已成功地将 IL-10 基因转入小鼠成纤维细胞,并将其埋植于小鼠腹腔内,可检测出小鼠腹腔内 IL-10 含量显著增高^[3]。本研究资料显示,烫伤小鼠腹腔内埋植胶原包裹的 NIH3T3-IL-10 细胞后,其同种植皮的存活时间为(16.1 ± 1.1) d,与对照组的存活期比较差异非常显著($P < 0.01$),甚至与应用氯化可的松组[存活期:(13.2 ± 1.0) d]比较差异显著($P < 0.05$)。表明了腹腔内埋植 NIH3T3-IL-10 细胞可抑制同种植皮的排斥反应,显著延长小鼠烫伤后同种植皮的存活期。此作用可能与 IL-10 转染到宿主体

内后,能持续产生 IL-10,使皮肤存活期延长有关。近年的研究表明,细胞因子 IL-10 可以对免疫效应分子的产生起抑制作用^[1],它是细胞因子合成抑制因子(CSIF)^[2]。而免疫排斥反应过程中,机体内往往积聚了大量的免疫效应分子,如细胞因子 IL-1、IL-2、IL-3、TNF 等^[7],故 IL-10 能够在一定程度上抑制机体受到某些抗原刺激后所发生的免疫应答,从而对移植物的排斥具有一定的抑制效应,延长其存活期。

另一方面,IL-10 作为一种新兴免疫抑制剂,对其毒性研究是临床应用的重要前提。本实验结果表明:IL-10 基因导入小鼠体内,能显著降低小鼠对移植皮片排斥的同时,观察 15 d 后小鼠的重要脏器(心、肝、肾、脾)无明显的病理改变,初步显示了 IL-10 基因治疗对宿主重要脏器的组织学方面无明显损伤。当然,IL-10 基因疗法对宿主是否有毒副作用还有待于长期观察。对于 IL-10 基因导入宿主后,其究竟在体内的表达持续多长时间以及如何人为地控制其表达的量,这是基因疗法需要进一步解决的问题。另外,IL-10 基因治疗对机体免疫机能的影响,如免疫效应细胞的产生、成熟、分化等,我们将作进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Everson MP, Spalding DM, Koopman WJ, *et al.* Enhancement of IL-2 induced T cell proliferation by a novel factor(s) present in murine spleen dendritic cell - T cell culture supernatants. *J Immunol*, 1989, 142: 1183 - 1194.
- 2 Zlotnik A and Moore KW. Interleukin 10. *Cytokine*, 1991, 3: 366 - 371.
- 3 陈敏亮,林子豪,曹雪涛,等.成纤维细胞介导的 IL-10 基因疗法的建立的实验研究.第二军医大学学报,1998,19:501 - 504.
- 4 王文正.氟新龙 A 与确实舒松 A 在体外处理皮片延长同种和异种植皮生长的研究.第二军医大学学报,1982,3:43 - 45.
- 5 Wu J, Barisoni D, Menapace L, *et al.* A novel approach to extend the survival of skin xenografts without entailing general immunosuppression or systemic toxicity. *Burns*, 1993, 19: 289 - 296.
- 6 Russell SJ. Lymphokine gene therapy for cancer. *Immunol Today*, 1990, 11: 196 - 200.
- 7 Catherine G, Catherine B, Arnaud M, *et al.* Interleukin 10 reduces the release of TNF and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med*, 1993, 177: 547 - 550.

(收稿日期:1998-04-18;编辑:冷怀明)