

· 论 著 ·

MC148 基因局部转染延长大鼠异体皮肤移植成活时间的研究

孙星慧 吴军 易绍萱 杨顺良 吴卫真 谭建明



【摘要】 目的 探讨 MC148 基因局部转染对皮肤移植排斥反应的免疫抑制作用。 方法 从传染性软疣病毒 (MCV) 中克隆 MC148 基因, 构建 Ad-MC148 腺病毒重组体后, 用其转染 8 只 Lewis 大鼠 (供体) 尾皮局部。另选 16 只 Wistar 大鼠 (受体), 于尾部制作皮肤缺损创面后, 分为对照组 8 只, 移植未转染的供体尾皮; 转染组 8 只, 移植转染了 MC148 基因的供体尾皮。于术后 6 h 及 2、3、7、10 d, 检测 MC148 mRNA 在转染组大鼠皮肤组织内的表达情况, 以它与内参照 β 肌动蛋白之间的吸光度 (A) 之比表示; 比较两组大鼠移植皮肤的成活时间; 术后 7 d 起对两组部分大鼠行大体观察, 其余大鼠于术后 7 d 行组织病理学观察。 结果 术后 6 h 转染组大鼠皮肤组织内有 MC148 mRNA 表达, 第 3 天达到高峰 ($A_{MC148\ mRNA} / A_{\beta\text{肌动蛋白}} = 0.86$), 随后下降, 但可持续表达约 10 d。对照组大鼠移植皮肤成活时间为 (8.5 ± 3.4) d, 明显低于转染组 (15.0 ± 2.0) d ($P < 0.01$)。大体及组织病理学观察到, 术后 7 d 转染组大鼠尾皮色泽红润, 皮下组织内有少量炎性细胞浸润, 12~20 d 后移植皮肤才逐渐变黑、脱落; 术后 7 d 对照组大鼠尾皮色泽变黑、逐渐脱落, 真皮及皮下组织有大量炎性细胞浸润。 结论 MC148 基因局部转染可能通过抑制器官移植后白细胞浸润而发挥免疫抑制作用。

【关键词】 皮肤移植; 免疫抑制剂; 趋化因子类; 转染; MC148

Prolongation of survival time of allogeneous skin graft after transfection of Molluscum contagiosum virus 148 gene in rats SUN Xing-hui*, WU Jun, YI Shao-xuan, YANG Shun-liang, WU Wei-zhen, TAN Jian-ming. *Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China
Corresponding author: WU Jun, Email: junwupro@public.cta.cq.cn, Tel: 023-68754006

【Abstract】 Objective To explore the immunosuppressive effect of local transfection of Molluscum contagiosum virus 148 (MC148) gene to allogeneous skin graft against rejection. Methods MC148 gene was cloned from molluscum contagiosum virus (MCV), and was employed to construct recombinant adenovirus vector (Ad-MC148). The recombinant Ad-MC148 was then locally transfected into a part of the tail skin of eight Lewis rats, which served as skin donors for grafting. The wounds (1 cm \times 1 cm) were produced on the tails of 16 Wistar rats, and they were then randomly divided into control (C, n = 8, with grafting of skin from donor rats without transfection), and transfection (T, n = 8, with grafting of skin from donor rats with transfection of the recombinant Ad-MC148) groups. The expression of MC148 mRNA gene in T group was detected on 6 post operation hour (POH) and 2, 3, 7 and 10 post operation day (POD), and the results were expressed by the ratio of absorption value (A) between MC148 gene and β -actin. The survival time of skin grafts in both groups was compared. Gross examination of grafted skin was carried out from 7 POD on in both groups, and the pathomorphological changes were examined in both groups on 7 POD. Results The MC148 gene expression in rat skin of T group could be identified in 6 POH, and it reached the peak on 3 POD ($A_{MC148\ mRNA} / A_{\beta\text{-actin}} = 0.86$), and then subsided thereafter, but it maintained for 10 days. The survival time of the grafts in T group was (15.0 ± 2.0) days, and it was significantly longer than that in C group (8.5 ± 3.4) days, ($P < 0.01$). Gross and microscopic examination showed that the tail skin of T group appeared ruddy on 7 POD, with little leukocytic infiltration in subcutaneous tissue; it began to turn black after 12 to 20 PODs. On the other hand, the tail skin of C group began to turn black and to shed off on 7 POD, with evident leukocytic infiltration in subcutaneous tissue and dermis. Conclusion Local transfection of MC148 gene may promote immunosuppression by inhibiting leukocytic infiltration after allogeneous skin transplantation.

【Key words】 Skin transplantation; Immunosuppressive agents; Chemotactic factors; Transfection; Molluscum contagiosum virus 148

作者单位: 400038 重庆, 第三军医大学西南医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 [孙星慧 (现在南京军区福州总医院泌尿外科, 350025)、吴军、易绍萱]; 南京军区福州总医院泌尿外科 (杨顺良、吴卫真、谭建明)

通信 (讯) 作者: 吴军, Email: junwupro@public.cta.cq.cn, 电话: 023-68754006

在异体器官移植中,免疫活性细胞定向迁移到移植体是免疫排斥反应发生的关键步骤,趋化因子系统参与此过程。趋化因子与免疫活性细胞上的受体结合而发挥趋化作用。如果能阻断趋化因子与受体的结合就可以抑制白细胞浸润,从而抑制免疫排斥反应。本研究利用腺病毒载体表达传染性软疣病毒(MCV)的 MC148 基因,在大鼠异体皮肤移植模型中,观察其局部转染对移植皮肤成活情况的影响。

材料与方 法

1. 动物来源及主要试剂:8 只 Lewis 大鼠和 16 只 Wistar 大鼠,均由本院实验动物中心提供,体重 200~250 g,雌雄不拘。病毒 DNA 提取试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司;高保真聚合酶试剂盒、内切酶(*Bam*H I、*Eco*R I)、DNA 纯化试剂盒及腺病毒构建试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司。 λ 包装试剂盒、磷酸钙转染试剂盒均购自美国 Promega 公司。质粒 DNA 提取试剂盒购自美国 Pharmacia 公司。

2. MC148 基因的克隆及其腺病毒载体的构建:经患者知情同意,从确诊有 MCV 的患者身上刮取软疣小体,用病毒 DNA 提取试剂盒提取病毒 DNA,参考文献^[1]经 PCR 扩增出 MC148 基因,构建重组质粒 pUC19-MC148。将 MC148 基因从 pUC19-MC148 上酶切下来,末端添平后与柯斯质粒 pAxCAwt 连接构建穿梭质粒^[1]。穿梭质粒与腺病毒 DNA-末端蛋白复合物,通过磷酸钙共转染同源重组构建 Ad-MC148 腺病毒重组体,并对其进行纯化和滴度分析。抽提总 RNA 进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),以检测 MC148 基因在 Ad-MC148 腺病毒重组体中的转录表达^[2]。

3. 实验分组与转染移植:采用 10 g/L 异戊巴比妥腹腔注射麻醉 Lewis 大鼠(供体)后,固定四肢,以 5 g/L 碘伏消毒鼠尾,将尾皮全层剥下(厚度为 0.25~0.30 cm),用体积分数 0.1% 新洁尔灭溶液浸泡 10 min,等渗盐水漂洗 3 次后,剪成大小为 1 cm \times 1 cm 的皮片。用手术刀在 Wistar 大鼠(受体)尾后切除 1 cm \times 1 cm 的全层尾皮(未伤及尾部动、静脉),分为对照组 8 只,伤后将供体皮片移植于创面;转染组 8 只,将供体皮片浸入 1.7×10^5 空斑形成单位/ml 的 Ad-MC148 腺病毒重组体溶液中转染 4 h 后,再移植于创面。两组大鼠术后均用体积分数 75% 乙醇消毒创面,医用透气胶布环绕包扎,分笼喂养。

4. MC148 mRNA 在 Ad-MC148 腺病毒重组体转染鼠尾局部的表达:转染组大鼠分别于术后 6 h 及 2、3、7、10 d 取移植部位皮肤组织,用 RT-PCR 法检测 MC148 mRNA 的表达情况,以 β 肌动蛋白的表达作为内参照,将 MC148 mRNA 与 β 肌动蛋白之间吸光度(A)值的比值作为 MC148 mRNA 的表达量。

5. 移植皮肤的成活时间、外观及组织病理学观察:术后第 5 天开始对两组大鼠行半暴露治疗,并记录两组大鼠移植皮肤的成活时间,将坏死总面积 $\geq 90\%$ 定义为排斥^[3]。术后 7 d 起对两组部分大鼠行连续大体观察,其余大鼠于术后 7 d 行组织病理学观察。

6. 统计学处理:部分数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *F* 分析。

结 果

1. 酶切鉴定结果显示,pUC19-MC148 质粒重组成功(图 1)。经测序分析证实,克隆的 MC148 基因序列与文献[4]完全相同。

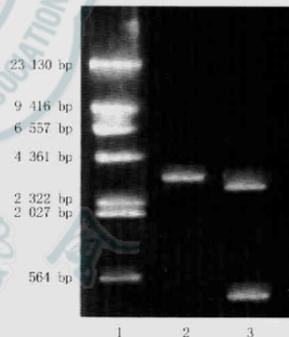


图 1 重组质粒 pUC19-MC148 酶切鉴定结果。样本 1, marker; 2, pUC19-MC148; 3, pUC19-MC148 被 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切后

2. 经 RT-PCR 检测,Ad-MC148 腺病毒重组体中可见 MC148 基因转录表达。

3. 转染组大鼠移植皮肤内,MC148 mRNA 于术后 6 h 即有表达,第 2 天表达量增加,术后 3 d 达到峰值($A_{MC148 \text{ mRNA}}/A_{\beta \text{ 肌动蛋白}} = 0.86$),随后下降,但可持续表达 10 d 左右。

4. 对照组大鼠移植皮肤成活时间为(8.5 ± 3.4) d,明显低于转染组(15.0 ± 2.0) d ($P < 0.01$)。

5. 局部外观及组织病理学观察:(1)外观:术后

7 d, 对照组大鼠皮肤开始出现坏死, 颜色加深, 变黑, 质地变硬, 失去弹性, 逐渐脱落; 转染组创面皮肤色泽红润, 12~20 d后才逐渐变黑、脱落。(2)组织病理学观察: 术后7 d, 对照组大鼠可见表皮脱落, 真皮及皮下组织内出现大量炎性细胞浸润, 以单核细胞、淋巴细胞为主(图2)。转染组皮肤仅见表皮层与真皮层略有分离, 皮下组织内有少量炎性细胞浸润, 真皮层内无此现象; 在皮肤吻合部位各层均见炎性细胞浸润, 离吻合处较远部位则无此现象(图3)。



图2 术后7 d, 对照组大鼠皮肤真皮及皮下组织均有大量炎性细胞浸润 HE × 100

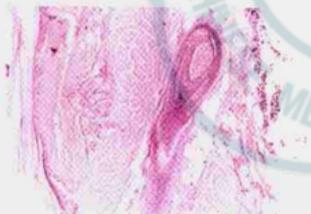


图3 术后7 d, 转染组大鼠皮下组织内有少量炎性细胞浸润 HE × 100

讨 论

趋化因子是一类结构上相似的对白细胞具有定向趋化吸引作用的细胞因子。目前已发现的趋化因子有五十多种, 分为 α 、 β 、 γ 、C 4类^[5]。有研究证明, 趋化因子对免疫活性细胞向移植物的浸润起主导作用, 并参与慢性排斥反应中移植体结构的损伤和纤维化^[6]。白细胞参与免疫反应是多步骤的迁移过程: 血液中的白细胞在内皮细胞表面停留并与之紧密结合, 随后穿过内皮细胞层进入间质, 向移植体浸润, 其中的任何一个步骤都依赖于某些趋化因子或其受体。趋化因子对免疫活性细胞的选择性及多步骤定向迁移的特点具有十分重要的调控作用^[7]。因此, 阻断特定的趋化因子(或其受体)的表达或与之结合, 可实现免疫抑制。

趋化因子通过与G蛋白偶联受体结合发挥作用。到目前为止, 已经确认有6种 α 类、10种 β 类和1种 γ 类趋化因子受体。应用趋化因子或其受体的抗体(拮抗剂)可以明显减轻排斥反应^[8]。但是, 由于趋化因子家族成员众多, 与其受体又有广泛的交叉反应, 1种白细胞上往往表达几种趋化因子受体, 只阻断其中的1种趋化因子或其受体难以达到理想的效果。MC148基因表达产物可以与CCR1、CCR2、CCR5、CCR8、CXCR1、CXCR2等多种趋化因子受体结合, 广泛拮抗 α 、 β 类趋化因子与受体的结合, 抑制它们对白细胞的趋化作用^[9], 属于一种广谱的趋化因子拮抗剂。

大面积烧伤患者常需要移植异体皮, 但它是器官移植中排斥反应最剧烈的。本研究结果表明, 转染由腺病毒重组体介导的MC148基因, 可以明显延长移植皮肤的成活时间。组织病理学观察到, 转染组大鼠皮肤的淋巴细胞、单核细胞浸润数量明显低于对照组, 这可能是由于部分趋化因子与受体的结合被MC148基因表达产物MC148蛋白拮抗, 使白细胞不能迁移到移植体, 实现了免疫抑制。在转染组大鼠皮肤吻合部位各层均见炎性细胞浸润, 而离吻合部位较远处则无此现象也说明了这一点。这种免疫抑制是局部的, 对全身免疫系统影响较小。因此对趋化因子受体拮抗剂的治疗将比广谱免疫抑制疗法具有更强的选择性和特异性。

基因治疗的持续性使之成为治疗肿瘤、遗传性疾病的新途径, 并取得了较大的成功。但基因治疗应用于器官移植免疫抑制方面的研究较少。本研究结果表明, MC148基因单次转染大鼠皮肤就可以在其体内长时间表达, 使目的蛋白MC148持续地发挥拮抗作用, 如能应用于临床, 将会减少患者费用及用药麻烦。当然, 基因转染后表达水平的稳定性及有效持续时间的监测需要进一步研究。

参 考 文 献

- 1 孙慧慈, 吴军, 易绍堂, 等. 传染性软疣病毒MC148基因腺病毒重组粒构建. 重庆医学, 2002, 31: 654-656.
- 2 罗高兴, 吴军, 易绍堂, 等. 重组腺病毒载体局部介导CTLA₄ Ig_g延长小鼠异体移植皮肤的存活. 中华烧伤杂志, 2000, 16: 37-39.
- 3 Nicolaidon E, Okada Y, Zuo XJ, et al. Prolongation of skin allograft survival is associated with reduced Th1 cytokine responses in the WKY - - > F344 rat model. Transplantation, 1999, 68: 1393-1401.
- 4 Senkevich TG, Bugert JJ, Sisler JR, et al. Genome sequence of a human tumorigenic poxvirus: prediction of specific host response-evasion genes. Science, 1996, 273: 813-816.
- 5 孙慧慈. 趋化因子类似物. 国外医学免疫学分册, 2002, 25: 79-82.

- 6 Hancock WW, Gao W, Faia KL, et al. Chemokines and their receptors in allograft rejection. *Curr Opin Immunol*, 2000, 12: 511 - 516.
- 7 Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 1998, 392: 565 - 568.
- 8 Grone HJ, Weber C, Weber KS, et al. Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment. *FASEB J*, 1999, 13: 1371 - 1383.

- 9 Damon I, Murphy PM, Moss B. Broad spectrum chemokine antagonistic activity of a human poxvirus chemokine homolog. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 6403 - 6407.

(收稿日期: 2004 - 12 - 22)

(本文编辑: 莫愚)

· 病例报告 ·

特重度烧伤并发弥漫性血管内凝血一例

梁延军

患者男, 50 岁。因销毁火药时不慎烧伤全身多处, 伤后 1 h 收入笔者单位。入院诊断: 烧伤总面积 71%, 其中浅 II 度 7%、深 II 度 10%、III 度 54% TBSA。患者入院后给予抗休克、抗感染治疗, 维持每小时尿量在 80 ~ 100 ml。查: 血小板计数 (PLT) $353 \times 10^9/L$, 血小板平均容积 (MPV) 9.7 fl, 凝血酶原时间 (PT) 16.7 s, 活化部分凝血活酶时间 (APTT) 34.2 s, 血浆纤维蛋白原 (FIB) 6.7 g/L。患者休克期度过平稳。伤后第 4 天行双手背切痂, 自体皮移植术。术中切痂创面呈弥漫性迟发性渗血, 遂在止血带下植皮并加压包扎。术后查 PLT $42 \times 10^9/L$, PT 18.4 s, APTT 40.5 s, FIB 3.0 g/L, 白细胞 (WBC) $27.7 \times 10^9/L$, 中性粒细胞 0.713, 患者出现嗜睡、谵语等精神症状, 创面水肿, 有创周炎。体温 $35.2 \sim 36.5^\circ C$, 脉搏 116 ~ 132 次/min, 呼吸 26 ~ 32 次/min, 血压 136 ~ 150/80 ~ 103 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa)。给予亚胺培南/西司他丁钠盐 2.0 g 静脉滴注, 2 次/d, 加强全身抗感染治疗及创面处理。伤后第 5 天 PT 17.5 s, 凝血酶时间 (TT) 15.3 s, APTT 32.7 s, 血浆硫酸鱼精蛋白副凝固试验 (3P, +), 血浆 D-二聚体测定 (+), 血浆纤维蛋白原降解产物 (FDP) 测定 (-), FIB 6.6 g/L。经血液科会诊, 考虑为弥漫性血管内凝血 (DIC)。立即给予低分子肝素钠 5 000 U 皮下注射, 1 次/d。酚磺乙胺 0.2 g、6-氨基己酸 4.0 g 静脉滴注, 2 次/d。血浆 400 ml, 1 次/d。伤后第 6 天行双下肢切痂微粒皮移植、异体皮覆盖术。术中用电刀切痂, 将大的出血点结扎后, 在止血带下行微粒皮移植、异体皮覆盖术, 加压包扎后松止血带。伤后 8 d, 再次同法行双上肢切痂、微粒皮移植、异体皮覆盖术。术后患者意识清楚, 食欲好, 体温 $35.2 \sim 36.0^\circ C$, 脉搏 76 ~ 88 次/min, 呼吸 20 ~ 24 次/min, 继续给予抗感染、加强营养支持等治疗。伤后 10 d 行胸背部切痂、微粒皮移植、异体皮覆盖术, 术后 4 h 见术区敷料有大量血性渗出, 考虑为迟发性出血。再次手术止血, 见异体皮下大量积血, 并有鲜血从皮片引流孔持续流出, 剪开异体皮冲洗创面, 电凝止血后, 改用内层打包, 外层用弹力绷带加压包扎。术后未再出血。伤后 12 d 患者头面部及前胸浅 II 度创面愈合。查血: WBC $22.0 \times 10^9/L$, 中性粒细胞 0.715, PLT $83 \times 10^9/L$, MPV 10.6 fl, PT 15.4 s, APTT 54.4 s, TT 27.2 s, 3P 试验 (+), D-二聚体测定 (-), FDP (-), FIB 9.9 g/L。停止全身抗感染措施, 继续抗凝、止血治疗。伤后 19 d 患者除胸背

部术区异体皮出现自溶、成活欠佳外, 双上、下肢异体皮成活良好, 且全身状况明显好转, 生命体征平稳。查血: WBC $14.2 \times 10^9/L$, 中性粒细胞 0.690, PLT $529 \times 10^9/L$, MPV 9.4 fl, PT 14.0 s, APTT 28.5 s, TT 10.5 s, 3P 试验 (+), D-二聚体测定 (-), FDP (-), FIB 6.2 g/L。停止抗凝、止血治疗。伤后 85 d, 再次查 PLT $255 \times 10^9/L$, MPV 8.1 fl, PT 13.3 s, APTT 26.6 s, TT 12.8 s, 3P 试验 (-), D-二聚体测定 (-), FDP (-), FIB 6.5 g/L。患者痊愈出院。

讨论 DIC 最常见的临床表现是出血、休克、栓塞及微血管病性溶血。在各种原因引起的急性 DIC 发病率中, 烧伤约占 3.1% ~ 6.4%, 烧伤合并感染者更为常见^[1]。本例患者经过第 1 次手术打击后, 出现创面脓毒症症状, 且术中有弥漫性迟发性出血表现, PLT 下降 ($42 \times 10^9/L$), PT 延长 (18.4 s), 3P 试验及血浆 D-二聚体测定均为阳性, 故诊断为 DIC。对于该并发症的治疗, 其根本措施是及时发现、及时处理、积极治疗基础疾病。本病例术前采血时血标本易凝固, 术中又有弥漫性迟发性出血表现, PLT 异常减少, 据此得以及时确诊, 为治疗赢得了时间。低分子肝素钠作为抗凝治疗药物, 疗效优于普通肝素, 出血等副作用显著减少^[2]。本病例使用低分子肝素钠皮下注射达 14 d, PLT 稳步上升, PT 逐渐恢复正常, 并在抗凝治疗的基础上给予抗纤溶、止血及输血浆补充凝血因子, 保证了后续手术的继续进行。笔者认为只要术中止血彻底, 包扎妥当, 术后出血是可以避免的。

近年来的研究证实, 脓毒症时凝血系统活化, 并促进炎症进一步发展; 反之炎症也可引起凝血系统活化, 二者相互影响^[3]。而烧伤创面的存在是伤后并发脓毒症和超高代谢的重要原因。本病例在抗凝、止血治疗的同时采用止血带下电刀切痂、微粒皮移植、异体皮覆盖术, 积极去除全身大部分深度坏死焦痂, 有效覆盖创面, 积极消除 DIC 的诱因和控制感染, 阻断了脓毒症的进一步发展, 是该病例救治成功的关键。

参 考 文 献

- 黎鳌, 主编. 烧伤治疗学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 115.
- 刘彦琴, 陈渝宁, 刘丽梅, 等. 低分子质量肝素治疗弥漫性血管内凝血临床观察. *中国实用内科学杂志*, 2004, 24: 448.
- 刘辉, 姚咏明, 盛志勇. 凝血系统与脓毒症的研究进展. *中华创伤杂志*, 2004, 20: 121 - 123.

(收稿日期: 2005 - 04 - 04)

(本文编辑: 张红)

作者单位: 030008 太原, 兴安职工医院烧伤整形科