

·综述· 文章编号 1000-2790(2007)23-2200-03

## 炎症性肠病基因治疗进展

蒋泽斌<sup>1,2</sup> 哈小琴<sup>1</sup> 高鹏<sup>2</sup> (<sup>1</sup>兰州军区兰州总医院医学实验中心,甘肃兰州 730030; <sup>2</sup>甘肃省人民医院腹腔镜中心,甘肃兰州 730000)

【关键词】炎症性肠病;基因治疗

【中图分类号】R574.62 【文献标识码】A

### 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)都属于炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD),其发病可能由感染、遗传、免疫等多种因素相互作用所致。传统观念认为通过基因转移替代缺陷基因的基因治疗只适用于致病基因明确的疾病,目前慢性炎症性疾病和自身免疫性疾病也被纳入了基因治疗的范围,可通过基因转移使机体表达免疫相关蛋白质,从而下调致病的炎症和免疫反应,上调保护性反应。相对于囊性纤维化、重症联合免疫缺陷和肿瘤,IBD的基因治疗尚处于起步阶段。本文就IBD的基因治疗作一概述。

### 1 IBD的免疫病理机制和肠干细胞

CD的肠黏膜炎症以1型辅助性T细胞(Th1)型CD4<sup>+</sup>淋巴细胞占主导地位,而UC则主要是由Th2型CD4<sup>+</sup>淋巴细胞介导的。尽管CD和UC发生的机制并不完全相同,但最终的肠壁损伤均可归结于巨噬细胞、粒细胞等炎性细胞及其产生的炎性细胞因子。一方面,淋巴细胞、巨噬细胞在肠道局部聚集并释放各种促炎细胞因子,如TNF- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-6, IL-8, IL-12, IL-18等,其中多数与疾病活动性呈正相关;另一方面,抗炎细胞因子如IL-10, IL-4, 转化生长因子(TGF)- $\beta$ 等的分泌相对不足。这种促炎细胞因子和抗炎细胞因子之间的失衡促进和加剧了肠壁的炎症反应。细胞因子失衡可由Th1/Th2细胞比例失衡引起,又可反馈性地加重Th1/Th2细胞失衡,形成恶性循环,因此被视为IBD发病机制中的重要环节。肠上皮细胞不断更新,衰老的细胞脱落至肠腔,新的细胞则由位于肠隐窝底部的干细胞不断补充,因此位于肠腺底部的干细胞成了基因治疗的最佳靶细胞。但是肠干细胞缺乏明确的形态学特征或理化特性,目前还无法与其它肠上皮细胞鉴别,因此无法直接证明目的基因已成功转移至干细胞。给予携带目的基因的载体后,需要对干细胞成功地进行基因修饰,肠上皮细胞才能持久稳定地表达目的基因。腺相关病毒(AAV)载体能使肠上皮细胞于口服感染后1 mo内稳定高效地表达目的基因。予免疫缺陷鼠静脉注射5型重组腺病毒(AD5)载体,亦发现结肠上皮细胞长时间表达目的基因,而

消化道其他部位目的基因表达阴性。肠道相关淋巴组织内的免疫细胞无疑是IBD基因治疗中最受关注的靶细胞,但由于肠道黏膜上皮屏障的存在,载体不能有效到达固有层。M细胞是存在于黏膜集合淋巴结滤泡顶部上皮中的一种特殊细胞,其主要功能是将腔内抗原和病原体跨上皮转运至上皮下淋巴组织。可利用M细胞能广泛摄取各种抗原物质的功能及其与免疫细胞之间的对话方式,通过M细胞将载体导入黏膜淋巴组织,从而调节局部黏膜免疫反应和机体的系统免疫反应<sup>[1]</sup>。有实验表明AAV载体能感染肠道固有层内细胞,并使17%~19%的固有层细胞于感染后6 mo内持续表达目的基因。

### 2 目的基因转移至胃肠道组织

实验表明<sup>[2]</sup>,阻断小鼠肝动脉和门静脉后,经眶后静脉丛予重组腺病毒载体,30 min后恢复肝脏血供,肠壁血管、血管周围组织和小肠绒毛持续表达目的基因达数周之久。局部予经包装的质粒、脂质体、逆转录病毒、慢病毒、腺病毒和AAV载体均能将目的基因转导至肠道黏膜,且黏液溶解剂(二硫苏糖醇、N-乙酰半胱氨酸)和蛋白酶体调节剂(MG101)能促进转导效率。上述载体中,以AAV载体系统的应用前景最广阔。重组AAV(rAAV)载体去除了所有编码序列,只保留145 bp的末端重复序列,不含任何病毒基因,感染细胞后,前病毒DNA定向整合至19号染色体的AAVS1区域。在人类基因治疗的常用病毒载体中,rAAV是目前唯一没有引起宿主病理反应的载体<sup>[3]</sup>。实验表明,以AAV载体对空腹大鼠灌胃6 h后,胃十二指肠和近端空肠固有层细胞开始表达目的基因,并能持续稳定表达6 mo;虽然未观察到结肠有目的基因表达,但是可以推测灌肠能使目的基因被转导至结肠固有层细胞。此外,虽然没有直接证据表明AAV载体能感染肠干细胞,但除固有层外,肠上皮细胞亦表达目的基因1 mo。AD5是体内实验使用最多的载体,该载体由于E1缺失造成病毒复制缺陷。腺病毒载体可高效感染多种靶细胞,对分裂期细胞和增殖停止期细胞均有很高的导入效率,这是逆转录病毒载体所不具备的。据报道,经十二指肠饲管予大鼠E1缺失的重组腺病毒载体后,目的基因能有效导入十二指肠、空肠和回肠上皮细胞。以E1/E3缺失的重组腺病毒载体灌肠后,结肠上皮细胞能高效表达目的基因。而且炎症性肠病的基因治疗AD5载体感染IBD患者肠上皮细胞的效率远高于非IBD患者<sup>[4]</sup>。但是经消化道予腺病毒载体主要感染的是更新速率很快的肠上皮细胞,因此AD5载体转导的目的基因在肠道内的表达时间只能维持数天,为达到治疗IBD的目的,需反复给药,同时还要避免机体的免疫反应。有报道称,经尾静脉注射重组腺病毒载体后,免疫缺陷小鼠结肠上皮细胞和隐窝细胞可长时间表达目的基因,而消化道其他部位无目的基因表达。该实验结果非常诱人,但由于E1缺失造成病毒复制缺陷,AD5载体不能像逆转录病毒载体一样整合至宿主基因组。

### 3 IBD基因治疗的策略和研究现状

3.1 下调促炎细胞因子的表达 IL-18是一个多功能细胞因

收稿日期 2007-04-27; 接受日期 2007-07-03

作者简介 蒋泽斌,硕士生(导师哈小琴),医师。Tel (0931)8975971

Email zbobb\_001@163.com

子,结构类似 IL-1 家族,能活化 T 淋巴细胞内的核因子 (NF)- $\kappa$ B 和激活蛋白 (AP)-1,与 IL-12 诱导的 STAT4 协同促进 T 淋巴细胞表达干扰素 (IFN)- $\gamma$ <sup>[5]</sup>。此外,IL-18 还通过上调 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 的表达加剧炎症反应。以 IL-18 结合蛋白 (IL-18BP) 治疗三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱导的小鼠结肠炎,可减轻肠道炎症。鉴于 IL-18 在 CD 中的重要作用,Wirtz 等<sup>[6]</sup>尝试以 IL-18 为靶点对 CD 动物模型进行基因治疗。构建表达 IL-18 反义寡核苷酸的重组腺病毒载体,予移植 CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T 淋巴细胞形成的 CB.17SCID 小鼠结肠炎模型灌肠。蛋白质印迹分析显示表达 IL-18 反义寡核苷酸的重组腺病毒载体能抑制结肠组织产生 IL-18,实验组结肠炎的内镜和组织病理学改变均较对照组明显改善。此外,该实验还观察到局部给药方式只抑制结肠固有层单核细胞产生 IFN- $\gamma$ ,而不影响来源于脾脏的单核细胞。

**3.2 上调抗炎细胞因子的表达** IL-10 能抑制巨噬细胞活化和分泌 IL-1 $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18 和 TNF- $\alpha$  等细胞因子,下调人类白细胞抗原 (HLA) II 类分子的表达;通过影响抗原递呈细胞功能而强烈抑制 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞的增殖和分泌细胞因子。此外,其还能直接抑制 T 淋巴细胞产生 IL-2, TNF 和 IL-5。IL-10 基因敲除小鼠可自发形成 Th1 型淋巴细胞介导的结肠炎。IL-10 对 IBD 动物模型有效,对 CD 患者的临床实验结果却不令人满意,其原因可能是肠道局部 IL-10 浓度过低,起不到抑制炎症的作用,而加大剂量又会伴随严重不良反应;也可能是因为 IL-10 半衰期太短所致。一些研究小组尝试以不同的给药方式(灌肠、经静脉和经腹腔)评估 AD5 IL-10 对 IBD 动物模型的预防和治疗作用。结果显示 AD5 IL-10 能预防实验性结肠炎的发生;静脉给药的血 IL-10 浓度显著高于腹腔给药,但不能显著提高结肠局部 IL-10 浓度;灌肠给药的结肠局部 IL-10 浓度高于静脉给药<sup>[7-10]</sup>。虽然这些研究没有得到预期的结果,但至少证明以病毒载体表达细胞因子在 IBD 基因治疗中是可行的。与 IL-10 一样,IL-4 也具有抑制巨噬细胞产生 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等促炎细胞因子的作用。此外,作为 Th0 细胞向 Th2 细胞分化的主要诱导因子,IL-4 可调节 Th1/Th2 细胞平衡,缓解结肠炎症,但有研究<sup>[11]</sup>显示 IL-4 抗体能下调 SAMP1/Yit 鼠 IFN- $\gamma$  的表达并明显缓解肠道炎症,而移植分泌 IL-4 的 Th 细胞可诱导 SCID 小鼠发生肠炎。因此,IL-4 在肠道免疫中可能并非仅起抗炎作用,其在人类 IBD 中的确切作用尚有待确定。TGF- $\beta$  作为一种抗炎细胞因子在肠道免疫平衡中发挥重要作用,Kitani 等<sup>[12]</sup>研究了 TGF- $\beta$ 1 质粒在 TNBS 诱导的结肠炎中的作用,结果显示鼻内一次给药可预防和治疗实验性结肠炎,而腹腔给药无治疗作用。肠固有层和脾脏持续 2 wk 表达 TGF- $\beta$ 1 mRNA,并同时出现产生 TGF- $\beta$ 1 的 T 淋巴细胞和巨噬细胞,且并不引起肠道、肺、脾、肝、肾发生纤维化。TGF- $\beta$  除抗炎作用外,在组织纤维化,特别是病理性纤维化中也起重要作用。TGF- $\beta$ 1 经蛋白激酶 C 和细胞外信号调节激酶 1/2 丝裂原活化蛋白激酶通路促进 CD 患者肠道成纤维细胞产生纤维连接蛋白、I 型胶原和结缔组织生长因子<sup>[13]</sup>。Vallance 等<sup>[14]</sup>以表达 TGF- $\beta$ 1 的重组 AD5 载体灌肠,导致小鼠结肠发生纤维化,TNBS 诱导

的结肠炎恶化并加速肠壁纤维化进程。

#### 4 展望

基因治疗为目前无法治愈的疾病提供了希望,上述临床前试验为 IBD 的基因治疗勾勒出了诱人的前景。分子生物学的不断发展将使高效、特异性地下调基因表达成为可能。RNA 干扰是一种在生物体内普遍存在的、在 RNA 水平调节基因表达的方式,双链 RNA 能高效、特异性地诱导与同源 mRNA 降解。有报道称局部给予针对 TNF- $\alpha$  的小干扰 RNA 能有效缓解胶原诱导的关节炎<sup>[15]</sup>。综上所述,虽然 IBD 的基因治疗研究已取得了令人鼓舞的成绩,但仍应认识到基因治疗在 IBD 中尚处于起步阶段,在应用于临床之前还有很长的路要走。

#### 【参考文献】

- [1] Man AL, Prieto-Garcia ME, Nicoletti C, et al. Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: Do certain bacteria hold the keys? [J]. *Immunology*, 2004, 113(1): 15-22.
- [2] Ye X, Jerebtsova M, Ray PE. Liver bypass significantly increases the transduction efficiency of recombinant adenoviral vectors in the lung, intestine, and kidney [J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(4): 621-627.
- [3] Flotte TR. Gene therapy progress and prospects: Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors [J]. *Gene Ther*, 2004, 11(10): 805-810.
- [4] Schmedlin-Ren P, Kesiosoglou F, Mapili JA, et al. Increased transduction of human intestinal epithelial cells by adenoviral vectors in inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2005, 11(5): 464-472.
- [5] Nakahira M, Ahn HJ, Park WR, et al. Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1 [J]. *J Immunol*, 2002, 168(3): 1146-1153.
- [6] Wirtz S, Becker C, Blumberg R, et al. Treatment of T cell-dependent experimental colitis in SCID mice by local administration of an adenovirus expressing IL-18 antisense mRNA [J]. *J Immunol*, 2002, 168(1): 411-420.
- [7] Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, et al. The prevention and treatment of murine colitis using gene therapy with adenoviral vectors encoding IL-10 [J]. *J Immunol*, 2001, 166(12): 7625-7633.
- [8] Barbara G, Xing Z, Hogaboam CM, et al. Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats [J]. *Gut*, 2000, 46(3): 344-349.
- [9] Lindsay J, Van Montfrans C, Brennan F, et al. IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis [J]. *Gene Ther*, 2002, 9(24): 1715-1721.
- [10] Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, et al. Local delivery of adenoviral vectors encoding murine interleukin 10 induces colonic interleukin 10 production and is therapeutic for murine colitis [J]. *Gut*, 2003, 52(3): 363-369.
- [11] Bamias G, Martin C, Mashina M, et al. Proinflammatory effects of

TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation [ J ]. *Gastroenterology*, 2005, 128(3): 654-666.

- [ 12 ] Kitani A, Fuss IJ, Nakamura K, et al. Treatment of experimental (Trinitrobenzene sulfonic acid) colitis by intranasal administration of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 plasmid: TGF- $\beta$ -mediated suppression of T helper cell type 1 response occurs by interleukin (IL)-10 induction and IL-12 receptor  $\beta$ 2 chain downregulation [ J ]. *J Exp Med*, 2000, 192(1): 41-52.
- [ 13 ] Mulsow JJ, Watson RW, Fitzpatrick JM, et al. Transforming growth factor- $\beta$  promotes profibrotic behavior by serosal fibroblasts via

PKC and ERK1/2 mitogen activated protein kinase cell signaling [ J ]. *Ann Surg*, 2005, 242(6): 880-887.

- [ 14 ] Vallance BA, Gunawan MI, Hewlett B, et al. TGF- $\beta$  gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis [ J ]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 289(1): G116-G128.
- [ 15 ] Schifflers RM, Xu J, Storm G, et al. Effects of treatment with small interfering RNA on joint inflammation in mice with collagen-induced arthritis [ J ]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(4): 1314-1318.

编辑 吴涛

·综述· 文章编号 1000-2790(2007)23-2202-03

## 大鼠肾移植模型建立方法的探讨

麦海星

(第四军医大学西京医院泌尿外科, 陕西 西安 710033)

【关键词】肾移植; 动物模型; 显微外科手术

【中图分类号】R699.2 【文献标识码】A

**0 引言** 大鼠原位肾移植模型是开展肾移植基础研究的重要实验手段。国外 Lee 等<sup>[1]</sup>早在 20 世纪 60 年代就有关于大鼠肾移植模型报道。国内陈金芝等<sup>[2]</sup>在 20 世纪 80 年代初期建立了大鼠肾移植模型。众多的学者在大鼠肾移植手术方式上进行了探索。对大鼠肾移植模型的建立方法也提出了各种不同的意见。本文对供体、受体手术方式以及在建立模型过程中需要注意的问题进行了探讨。

### 1 供体手术

一般切除左肾作为供肾, 因左肾位置低浅, 易暴露。供肾动静脉一般游离 0.5 cm 即可, 左肾上腺动脉一定要结扎, 不要扯断, 避免吻合开放后出血。在游离肾静脉时, 要剥尽外膜上的脂肪组织, 既便于在吻合时准确辨认静脉的前后壁, 又避免将脂肪组织带入血管腔形成血栓。灌注时要缓慢、匀速推注, 一般用量 5 mL 左右灌注液就可以将肾灌注完全。

陈金芝等<sup>[2]</sup>手术步骤是: 进入腹腔后, 用自制拉钩牵开腹壁, 剪断脾结肠韧带, 将肠管推向右侧, 暴露左肾及左肾动静脉, 结扎肾上下极的脂肪组织起牵引作用, 用显微剪锐性分离肾周脂肪囊。用 1 mL 注射器在肾动脉开口远端的腹主动脉穿刺, 注入肝素生理盐水 1 mL ( $2.5 \times 10^6$  U/L) 使全身肝素化, 于主动脉下横贯一丝线打结固定针头。用一血管夹在左肾动脉与右肾动脉之间夹闭腹主动脉, 再用一血管夹于靠近下腔静脉处阻断左肾静脉, 在血管夹的远侧切断左肾静脉。用含

肝素的 4℃ 乳酸钠林格液 ( $1.25 \times 10^5$  U/L) 缓慢匀速推注灌洗, 直至从下腔静脉流出清亮的灌洗液。灌注完毕, 切断左肾动脉, 完成供肾切取, 放入 4℃ 的冰盐水中。

### 2 受体手术

供肾放于左侧, 游离受体左肾动静脉方法同供肾游离, 吻合动脉时先前后固定两点, 这样容易翻转动脉, 便于吻合上下壁。静脉吻合时先行后壁腔内连续缝合, 转出腔外打结, 再行前壁腔外连续缝合。在肾静脉管径比较小时, 前壁可以间断缝合 3~4 针避免狭窄。检查吻合口时, 出血较多时要补针, 少许出血时用棉棒压迫止血即可, 不要补针太多, 避免吻合口狭窄。胡建庭等<sup>[3]</sup>用五种不同的方法建立了大鼠肾移植模型, 方法 A: 供受体肾动脉、静脉及输尿管用 11-0 线间断端端缝合 7~9 针、12~14 针和 4 针。方法 B: 供受体肾动脉、静脉及输尿管分别用内径约 0.5, 1.0, 0.5 mm 的聚乙烯管端端套入吻合。方法 C: 动脉、输尿管均用 11-0 线间断端端缝合(同方法 A), 静脉用套管(套入方法同方法 B)。方法 D: 动脉、输尿管均用 11-0 线间断缝合(同方法 A), 静脉连续缝合。先用 11-0 无损伤线 18/00 两定点缝合、打结。注意: ①助手均匀地轻轻牵引两线尾, ②连续缝合时松紧度适当。方法 E: 动脉用 11-0 无损伤线间断缝合, 静脉用套管法套入(同方法 C)。其不同之处主要在于供体带膀胱瓣输尿管与受体膀胱顶部吻合, 切口为左腹部竖切口, 长约 4~5 cm, 各组动物移植的同时切除右肾。评价五种方法优劣的标准: ①技术的复杂程度; ②吻合共需时间; ③术后 14 d 病理检验证实血管内有无血栓形成。经比较后认为方法 C 为较理想的大鼠肾移植模型建立方法, 虽然其有约 15% 的静脉血栓形成率[与其它组(方法 B 除外)相比无显著性差异], 但方法简单, 吻合时间短。动脉、输尿管端端吻合, 技术易掌握, 且并发症少, 通畅率高, 静脉套管速度快, 易操作, 套管不与血流直接接触, 血栓形成机会少。

### 3 尿路重建

在游离输尿管时, 注意保留输尿管周围少许的脂肪组织, 保护输尿管的血供。供体输尿管在肾盂下方 0.5 cm 处切断, 此处输尿管内径稍粗, 一定程度上可以预防术后狭窄; 用 11-0 的无损伤缝合线间断吻合供受体输尿管 4 针, 无需再多防止狭窄。或将供体膀胱瓣修剪成椭圆形, 作供受体间膀胱壁全层缝合。Lopez-Nebinaf 等<sup>[4]</sup>和 Lee 等<sup>[1]</sup>在输尿管吻合应用支架管进行输尿管-输尿管吻合, Sliber 等<sup>[5]</sup>和 Fabre

收稿日期 2007-06-19; 接受日期 2007-09-04

基金项目 陕西省自然科学基金 2005K14-G4(3)

通讯作者: 王 禾, 教授, 博士生导师, Tel (029) 84775321 Email:

xjyymnw@fmmu.edu.cn

作者简介: 麦海星, 硕士生(导师王 禾), Tel (029) 82554208

Email maimark24@hotmail.com