

大鼠小肠移植排斥反应期移植肠 RANTES 表达的变化

杨建军, 王为忠, 王春梅, 陈丹, 季刚

杨建军, 王为忠, 季刚, 中国人民解放军第四军医大学西京医院胃肠外科 陕西省西安市 710033
王春梅, 陈丹, 中国人民解放军第四军医大学基础部电子显微镜中心 陕西省西安市 710033
国家自然科学基金资助项目, No. 30070742
项目负责人: 王为忠, 710033, 陕西省西安市长乐西路 15 号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院胃肠外科. weichang@fmmu.edu.cn
电话: 029-83375261 传真: 029-83375261
收稿日期: 2004-02-28 接受日期: 2004-04-20

摘要

目的: 探讨移植肠 RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted 活化T细胞调节的正常T细胞表达和分泌的因子)的表达在小肠移植急性排斥反应中的意义以及他克莫司(FK506)对他的影响。

方法: 选用成年健康 SD和Wistar大鼠进行全小肠异位移植. 实验分4组 第1组: 非手术对照组(Wistar); 第2组: 同基因移植对照组(Wistar Wistar); 第3组: 异基因移植组(SD Wistar); 第4组: FK506治疗组[SD Wistar+FK506 (1 mg/kg⁻¹/d⁻¹ im)]. 移植术后3 5 7 d取各组大鼠移植肠标本进行病理学检查并采用免疫荧光染色和激光扫描共聚焦显微镜技术对移植肠RANTES的表达进行连续定量测定。

结果: 异基因移植组大鼠的移植肠RANTES表达在术后均非常显著高于其他3个对照组($P<0.01$) 其动态变化与急性排斥反应的进程呈正相关; FK506治疗组大鼠移植肠RANTES的表达明显低于未治疗组($P<0.01$)。

结论: RANTES阳性细胞在小肠移植急性排斥反应中发挥了重要作用动态检测移植肠RANTES的表达变化可能成为小肠移植急性排斥反应有效的诊断指标之一。

杨建军, 王为忠, 王春梅, 陈丹, 季刚. 大鼠小肠移植排斥反应期移植肠 RANTES 表达的变化. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1738-1740

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1738.asp>

0 引言

同种异体移植排斥反应是影响移植植物功能和存活的最大障碍. 小肠移植排斥反应的诊断与治疗尤为困难. 我们建立大鼠全小肠异位移植模型用免疫荧光染色和激光扫描共聚焦显微镜技术检测移植肠 RANTES(regulated upon activation normal T cell expressed and secreted 活化T细胞调节的正常T细胞表达和分泌的因子)的表达变化探讨RANTES与急性排斥反应的关系寻求小肠移植排斥反应早期敏感的诊断指标为抗排斥治疗和免疫耐受诱导策略提供新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 选用健康成年 SD和Wistar大鼠 体质量约300 g(由第四军医大学实验动物中心提供) 进行全小肠异位移植. 将动物随机分为4组 每组移植大鼠数均为18只: 第1组 非手术对照组(Wistar); 第2组 同基因移植对照组(Wistar Wistar); 第3组 异基因移植未治疗组(SD Wistar); 第4组 异基因移植FK506治疗组[SD Wistar+FK506(每日1 mg/kg, 0-7 d im)]. 术后3 5 7 d每组各处死6只大鼠 取移植肠标本用40 g/L甲醛液固定常规石蜡包埋切片厚3 μ m 备病理及免疫荧光检查. 兔抗大鼠RANTES多抗购自美国Peprotech公司 鼠抗兔IgG-FITC购自美国Santa Cruz Biotechnology公司 他克莫司(FK506)每支1 mL含5 mg 购自爱尔兰Kerry公司。

1.2 方法 组织病理学检查按文献[1-4]制定排斥反应的病理学诊断标准. 激光扫描共聚焦检测移植肠RANTES表达用石蜡切片常规二甲苯梯度酒精顺序脱蜡至水 PBS冲洗30 mL/L正常羊血清封闭30 min 滴加兔抗大鼠RANTES多抗 工作浓度为1:50 同时设立空白对照和已知阳性对照(以非手术对照组中Wistar大鼠的小肠组织切片作为空白对照异基因移植肠染色阳性标本作为阳性对照) 4 过夜后室温下复温30 min PBS振洗5 min \times 3次 滴加鼠抗兔IgG-FITC(1:50) 37 孵育30 min PBS振洗5 min \times 3次 缓冲甘油封片 BIO-RAD MRC-1024型激光扫描共聚焦显微镜观察 在400倍镜下胞质染色呈黄绿色荧光为阳性细胞应用Lasersharp软件进行扫描. 每张切片在400倍镜下随机选取10个视野对阳性细胞聚焦区进行荧光强度测定 计算出平均每个视野阳性细胞的荧光强度值。

统计学处理 所有结果以mean \pm SD表示 数据处理采用SPSS11.0统计软件包进行方差分析 $P<0.05$ 时差异有显著性。

2 结果

在未给予FK506治疗的异基因移植大鼠移植组织术后3 d发现肠黏膜绒毛数量减少轻度水肿绒毛高度变矮间质中有少量炎性细胞浸润符合轻度排斥的病理学诊断标准; 术后5 d肠黏膜绒毛数稀少黏膜上皮开始脱落杯状细胞和潘氏细胞数目减少炎性细胞浸润加重以淋巴和单核细胞为主符合中度排斥的病理学诊断标准; 术后7 d肠黏膜绒毛结构消失黏膜上皮完全脱落肠壁变薄并坏死杯状细胞和潘氏细胞消失 间质中有大量炎性细胞浸润基层结构破坏血

管炎性反应显著符合重度排斥的病理学诊断标准. FK506治疗组大鼠和同基因移植对照组大鼠在观察期内未发现明显排斥反应征象. 非手术对照组大鼠小肠每个视野RANTES表达阳性细胞的荧光强度(13.4 ± 2.3). 异基因移植未治疗组大鼠移植肠RANTES表达从术后3 d开始明显升高(47.3 ± 1.8) 术后5 d持续上升(79.0 ± 9.5) 术后7 d达高峰(138.5 ± 8.7) 各时间段RANTES表达均非常显著高于其他3个对照组($P < 0.01$) 其动态变化与排斥反应的进程呈正相关. FK506治疗组大鼠术后3 d RANTES表达(20.8 ± 3.2) 术后5 d轻度升高(36.4 ± 2.5) 术后7 d仍维持在同一水平峰值为(40.4 ± 5.3) 明显低于未治疗组($P < 0.01$). 同基因移植对照组大鼠术后移植肠RANTES表达的变化趋势与治疗组相似($P > 0.05$) (表1).

表1 大鼠移植肠RANTES阳性细胞的荧光强度 (mean \pm SD)

分组	t (移植后)/d		
	3	5	7
Wistar	13.4 \pm 2.3	13.4 \pm 2.3	13.4 \pm 2.3
Wistar Wistar	17.4 \pm 6.1	33.9 \pm 6.1	39.5 \pm 5.2
SD Wistar	47.3 \pm 1.8 ^b	79.0 \pm 9.5 ^b	138.5 \pm 8.7 ^b
SD Wistar+FK506	20.8 \pm 3.2	36.4 \pm 2.5	40.4 \pm 5.3

^b $P < 0.01$ vs 其他3组.

3 讨论

小肠移植是治疗终末期肠功能衰竭如短肠综合征的惟一确切的方法^[5]. 小肠移植之所以难以长期存活主要是因为小肠属于高免疫原性器官小肠及其系膜拥有丰富的淋巴组织移植后免疫反应较其他器官移植更为剧烈既有排斥反应又有移植抗宿主反应(GVHR) 再加上小肠肠腔内含有大量的病原菌术后易并发肠源性感染引起败血症使治疗更加困难因此 小肠移植的早期结果并不令人乐观^[6].

小肠移植急性排斥反应是以细胞免疫为主体体液免疫共同参与完成的一个复杂的免疫应答过程细胞在小肠移植免疫反应中起决定性的作用^[7]. RANTES主要是由活化的T淋巴细胞产生的一个 β -家族的趋化因子 具有控制单核细胞和淋巴细胞定向迁移的免疫学特性 在机体的免疫反应调节中起重要作用^[8-12]. 我们发现正常大鼠小肠组织中RANTES表达很低而异基因移植未治疗组大鼠移植肠RANTES阳性细胞表达在移植后3 5 7 d较其他3组明显升高($P < 0.01$) 结合组织病理学检查发现RANTES表达的动态变化与排斥反应的进程呈正相关. 由此可见同种异体小肠移植术后移植肠RANTES表达与急性排斥反应的关系密切. RANTES介导移植排斥反应的机制可能是移植术后抗原特异性T淋巴细胞活化增生分泌大量的RANTES趋化单核细胞和淋巴细胞向移植物定向迁移淋巴细

胞的活化使IL-2和IFN- γ 等细胞因子产生增加又能诱导RANTES的分泌RANTES含量的不断增加进一步诱导T淋巴细胞活化产生效应形成免疫应答不断增强的正反馈过程^[13]. 随着RANTES的增加免疫炎症细胞浸润增多排斥反应进一步加剧. 本研究表明RANTES阳性细胞在小肠移植急性排斥反应中发挥了重要作用RANTES表达的高低可以间接反映移植T淋巴细胞浸润的严重程度为小肠移植排斥反应的早期诊断提供帮助. 目前临床小肠移植排斥反应的诊断只能以临床观察与内窥镜指导下肠黏膜活检的病理学检查相结合的方法为主缺乏早期特异敏感的指标^[14]. 趋化因子的高表达发生在排斥反应的早期阶段因此利用激光扫描共聚焦显微镜技术动态检测移植肠RANTES的表达变化可成为小肠移植急性排斥反应有效的诊断指标之一. 同时采取以趋化因子为靶位的治疗方案可能达到抗排斥和诱导移植耐受的目的.

FK506是从放线菌Streptomyces tsukubaeensis的代谢产物中提取的大环内酯类物质其抑制体外混合淋巴细胞反应T细胞增生反应以及抑制IL-2和IFN生成作用比CsA强100倍或以上. 我们应用FK506治疗的异基因移植组大鼠移植肠RANTES表达显著降低病理学检查无明显排斥反应. 这说明FK506能显著抑制T淋巴细胞的活化减少RANTES的产生延长移植物的存活时间. 此外同基因移植对照组和FK506治疗组大鼠术后5 7 d移植肠RANTES表达轻度升高但仍保持在较低水平其原因可能还与小肠异位移植后缺乏肠内容物刺激而导致的肠黏膜萎缩和细菌易位有关.

4 参考文献

- 1 Wu T, Abu-Elmagd K, Bond G, Nalesnik MA, Randhawa P, Demetris AJ. A schema for histologic grading of small intestine allograft acute rejection. *Transplantation* 2003;75:1241-1248
- 2 Sudan DL, Kaufman SS, Shaw BW Jr, Fox IJ, McCashland TM, Schafer DF, Radio SJ, Hinrichs SH, Vanderhoof JA, Langnas AN. Isolated intestinal transplantation for intestinal failure. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1506-1515
- 3 Toogood GJ, Rankin AM, Tam PK, Morris PJ, Dallman MJ. The immune response following small bowel transplantation. II. A very early cytokine response in the gut-associated lymphoid tissue. *Transplantation* 1997;63:1118-1123
- 4 Schmid T, Oberhuber G, Korozsi G, Klima G, Margreiter R. Histologic pattern of small bowel allograft rejection in the rat. Mucosal biopsies do not provide sufficient information. *Gastroenterology* 1989;96:1529-1532
- 5 Willetts IE, Tam PK, Morris PJ, Dallman MJ. Treatment with an HLA-peptide and cyclosporine A prolongs rat small bowel allograft survival. *J Pediatr Surg* 1997;32:469-472
- 6 Grant D, Wall W, Mimeault R, Zhong R, Ghent C, Garcia B, Stiller C, Duff J. Successful small-bowel/liver transplantation. *Lancet* 1990;335:181-184
- 7 Wallander J, Lackgren G, Tufveson G. T-lymphocytes are necessary for fetal graft vs host disease after small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1989;21(1 Pt 3):2896-2897
- 8 Ramhorst RE, Garcia VE, Corigliano A, Rabinovich GA, Fainboim L. Identification of RANTES as a novel immunomodulator of the maternal allogeneic response. *Clin Immunol* 2004;110:71-80
- 9 Lillard JW Jr, Boyaka PN, Taub DD, McGhee JR. RANTES potentiates antigen-specific mucosal immune responses. *J*

- Immunol* 2001;166:162-169
- 10 Ajuebor MN, Hogaboam CM, Kunkel SL, Proudfoot AE, Wallace JL. The chemokine RANTES is a crucial mediator of the progression from acute to chronic colitis in the rat. *J Immunol* 2001;166:552-558
- 11 Amerio P, Verdolini R, Proietto G, Feliciani C, Toto P, Shivji G, Loconsole F, Cassano N, Amerio P, Vena G, Sauder DN. Role of Th2 cytokines, RANTES and eotaxin in AIDS-associated eosinophilic folliculitis. *Acta Derm Venereol* 2001;81:92-95
- 12 Fairchild RL, VanBuskirk AM, Kondo T, Wakely ME, Orosz CG. Expression of chemokine genes during rejection and long-term acceptance of cardiac allografts. *Transplantation* 1997; 63:1807-1812
- 13 顾晓, 唐孝达, 杨尚琪, 刘永, 周佩军, 徐达, 王祥慧, 谭建明. 大鼠心脏移植后动态监测血清 RANTES 和单核细胞趋化蛋白-1 的意义. *中华器官移植杂志* 2001;22:36-38
- 14 李元新, 李宁, 黎介寿. 小肠移植排斥反应期移植肠基因表达的研究. *中华医学杂志* 1999;79:773-776

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

双功能融合基因在肝癌细胞中的表达与作用

谢娜, 林菊生, 吴斌文, 黎培员

谢娜, 林菊生, 吴斌文, 黎培员, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030
项目负责人: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所. linjusheng2001@163.net
电话: 027-83662578
收稿日期: 2004-04-04 接受日期: 2004-04-27

摘要

目的: 构建含有融合基因 FCU1 的自杀基因系统观察其对体外培养肝癌细胞的杀伤效应。

方法: 将 FCU1 基因亚克隆于 pEGFP-C₁ 载体转化大肠杆菌 DH5 α 阳性重组子转染肝癌细胞 HepG2 绿色荧光蛋白检测 FCU1 的表达用 G418 筛选出阳性细胞克隆后进行体外药物敏感实验观察旁观者效应。

结果: FCU1 基因正确插入到 pEGFP-C₁ 中 pEGFP-FCU1 转染成功的细胞在荧光显微镜下可见绿色荧光 5-FC 作用下细胞的生长抑制率明显高于未转染细胞且旁观者效应显著。

结论: 本基因治疗体系具有很好的体外杀肿瘤效果为肝癌的基因治疗提供了一个新的选择。

谢娜, 林菊生, 吴斌文, 黎培员. 双功能融合基因在肝癌细胞中的表达与作用. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1740-1742

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1740.asp>

0 引言

自杀基因/前药系统是一种很有效的肿瘤药物敏感基因疗法这种方法已在多种肿瘤的治疗中得到应用. 新型高效的融合自杀基因 FCU1 是由 FCY1 和 FUR1 两种自杀基因的编码序列经过特定的酶切连接定点缺失突变等过程融合而成^[1]. FCY1 和 FUR1 基因分别编码胞嘧啶脱氨酶(CDase)和尿嘧啶磷酸核糖转移酶(UPRTase)

可将 5-FC 直接代谢为 5-FU 的单磷酸化产物在肿瘤自杀基因治疗中可产生双功能杀伤细胞的功效^[2-4]. 我们将构建好的自杀基因真核细胞表达载体用一定方式导入肿瘤细胞获得稳定表达的细胞株并探讨 FCU1/5-FC 自杀基因系统对体外培养肝癌细胞的杀伤效应。

1 材料和方法

1.1 材料 pCIneoFCU1 由 Transgene S.A. 惠赠 pEGFP-C₁ 由本实验室保存宿主菌 DH5 α 由本室保存肝癌细胞株 HepG2 由本室保存在含 100 mL/L 小牛血清 100 IU/mL 青/链霉素的 DMEM 培养基(Gibco 公司)中于 37 50 mL/LCO₂ 培养箱中培养. 限制性内切酶 *Sma* *Xho* 购自 MBI 公司 DNA 回收试剂盒质粒提取试剂盒购自上海华舜公司 T₄ DNA ligase 购自 MBI 公司 脂质体 LipoGen 购自 InvivoGen 公司 G418 购自 Gibco 公司 5-FC 购自 Sigma 公司。

1.2 方法 用 *Sma* *Xho* 分别双酶切 pEGFP-C₁ 和 pCIneoFCU1 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物并回收目的基因片段将载体片段目的基因片段按摩尔比 1:3 混合用 T₄ DNA 连接酶于 4 连接过夜. 取适量连接产物用低温 CaCl₂ 法转化 DH5 α 同时用空载体质粒转化作为阳性对照. 筛选出阳性克隆后提取质粒琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性产物即得所需重组体质粒 pEGFP-FCU1. HepG2 细胞培养至对数生长期时转入 6 孔板每孔 5 10⁵ 个细胞重组体质粒 pEGFP-FCU1 用 LipoGen 脂质体进行转染对照组转染 pEGFP-C₁ 空质粒 48 h 后于荧光显微镜下观察结果. 用 400 mg/L 的 G418 筛选阳性细胞克隆获得稳定表达的单克隆细胞记为 HepG2/FCU1 再扩大培养. 检测前药 5-FC 作用下的细胞生长抑制率将 HepG2/FCU1 细胞以 2 10⁵ 个/