

经供体气管转染腺病毒介导的人白介素 10 基因对大鼠同种异体肺移植 物缺血再灌注损伤的影响

孙浩亮,施我大,邵永丰*

(南京医科大学第一附属医院心胸外科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**观察局部转染腺病毒介导的人白细胞介素(hIL)-10 基因对移植肺缺血再灌注损伤(IRI)和肺功能的影响。**方法:**36 只雄性 SD 大鼠随机分为空白对照组空载体对照组、基因转染组。在移植前经供体气管分别灌入生理盐水 0.5 ml、Ad-5 腺病毒 5×10^9 PFU 和 Ad-5-hIL-10 5×10^9 PFU;24 h 后正中开胸取肺,在 4℃ 低钾右旋糖酐液(LPD 液)中保存 18 h。采用改良的三袖套法建立大鼠左肺原位移植模型,移植肺再灌注后 4 h 测定动脉血气、移植肺湿-干重比率(W/D)、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)含量和髓过氧化物酶(MPO)含量;观察移植肺组织病理改变及人 hIL-10 免疫组化染色;并使用酶联免疫吸附法(ELISA)测定移植组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)的表达水平。**结果:**与空载体组和空白对照组相比,基因转染组肺泡间质水肿减轻,炎细胞浸润减少,hIL-10 基因的表达明显增加, P_{aO_2} 明显提高($P < 0.01$),W/D 比率降低($P < 0.05$),MDA 含量和 MPO 活性下降($P < 0.01$),SOD 活性升高($P < 0.01$),TNF- α 和 IFN- γ 的表达下调($P < 0.01$)。**结论:**移植前经供体气管灌注途径转染外源性人 IFN-10 基因能有效地减轻移植后肺脏组织 IRI,改善早期移植肺功能。

[关键词] 人白介素 10;肺移植;再灌注损伤;基因转染

[中图分类号] R655.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)03-327-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130308

The effect of transbronchial gene transfer of human interleukin-10 gene to donor lung ischemia-reperfusion injury in the rat's lung transplantation

Sun Haoliang, Shi Woda, Shao Yongfeng*

(Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of transtracheal transferring the adenovirus-mediated human interleukin 10 (hIL-10) gene on lung ischemia-reperfusion injury (IRI), and posttransplant lung function in SD rat lungs. **Methods:** Thirty-six male SD rats were divided into 3 groups randomly: blank control group, empty vector-control group and gene transfer group. The donors of three groups received 0.5 ml of normal saline, 5×10^9 PFU of Ad-5 or 5×10^9 PFU of Ad-5-hIL-10, respectively. After 24 h of in vivo transfection, lungs were harvested and stored in low-potassium dextran solution (LPDG) at 4℃ for 18 h. Then the left lung orthotopic transplantation was performed. After 4 h of reperfusion, arterial blood gas analysis and wet-to-dry (W/D) weight ratios were determined, superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) contents and myeloperoxidase (MPO) activity were detected. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) were measured in graft tissue by ELISA. Besides, hIL-10 was detected by immunohistochemistry. Graft pathohistological changes were examined under a light microscope. **Results:** Empty vector and blank control groups showed a significant lung ischemia-reperfusion injury (IRI), while gene transfer group's lung IRI reduced significantly. The lung tissue edema, interstitial inflammation and exudation in gene transfer group were obviously reduced. Expression of hIL-10 gene was obviously increased when detected by immunohistochemistry (IHC). Partial pressure of oxygen (P_{aO_2}) levels in the gene transfer group were higher than in empty vector and blank vector groups ($P < 0.01$), respectively. W/D ratios were reduced in hIL-10 lungs ($P < 0.05$) compared with the other groups. MDA contents and MPO activity were reduced in tissue of the gene transfer group ($P < 0.01$). But the activity of SOD was increased significantly ($P < 0.01$). TNF- α and IFN- γ were reduced in tissue of the gene transfer group ($P < 0.01$) measured by ELISA. **Conclusion:** Transtracheal adenovirus mediated gene transfection of hIL-10

[基金项目] 江苏省科学技术厅自然科学基金资助(BK2008474)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yongfengshao@hotmail.com

can obviously lighten IRI after lung transplantation and improve early lung function effectively after lung transplantation.

[Key words] human interleukin 10; lung transplantation; reperfusion injury; gene transfection

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(3): 327-331]

自从1983年Cooper成功进行单肺移植以来^[1],肺移植在临床医疗中逐步开展起来,目前已成为公认的治疗终末期肺疾患的一种有效方法^[2]。缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是早期移植术后肺功能障碍和术后死亡的最主要原因^[3],也是阻碍肺移植发展的重要因素。如何减轻肺移植术后的缺血再灌注损伤成为目前肺移植研究的重要课题。本研究应用腺病毒介导人白介素10(hIL-10)基因经过气管转染至供体肺组织,研究IL-10对移植肺组织缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所用雄性SD大鼠(250~300 g,清洁级)由南京医科大学实验动物中心(北京维通利华实验动物技术有限公司)提供;超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)含量测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。酶联免疫吸附试验(ELISA)测定试剂盒、含hIL-10抗体、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)测定试剂盒、干扰素 γ (IFN- γ)测定试剂盒购自武汉博士德有限公司。含hIL-10基因的5型腺病毒载体(Ad-5-hIL-10)及空载体5型腺病毒(Ad-5)是一种复制缺陷病毒^[4],由上海白泽生物有限公司提供。腺病毒载体Ad-5-hIL-10及Ad-5其颗粒最终滴度为 1×10^{10} PFU/ml。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

36只SD大鼠随机分为3组,每组随机分为6对。A组(空白对照组):供肺气管内灌入生理盐水0.5 ml。B组(空载体对照组):供肺气管内灌入Ad-5腺病毒0.5 ml。C组(基因转染组):供肺气管内灌入Ad-5-hIL-10 0.5 ml。

1.2.2 基因体内转染

采用气管内转染病毒空载体和重组腺病毒载体。应用1%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔注射麻醉后,经气管插管(强生,14 G静脉留置针)后,动物呼吸机辅助呼吸,设定参数:呼吸频率70次/min,潮气量10 ml/kg。肺内分别灌入生理盐水0.5 ml,

Ad-5腺病毒0.5 ml,Ad-5-hIL-10 0.5 ml。待大鼠恢复自主呼吸后拔除气管插管,单笼喂养,自由摄食饮水,24 h后正中开胸取肺,分离修剪左肺门后粗线结扎左肺支气管,在4℃低钾右旋糖酐(LPD)液中保存18 h后移植。

1.2.3 肺移植动物模型建立

采用改良袖套法建立大鼠同种异体左肺移植模型。大鼠腹腔注射1%戊巴比妥40 mg/kg麻醉,固定,经颈部行气管切开,接动物呼吸机(呼吸机参数设置:频率70次/min,潮气量10 ml/kg),行胸腹联合切口,从下腔静脉或肝脏注射肝素1 000 U/kg,剪开腹主动脉、下腔静脉及左右心耳,切开右室流出道,插入导管至肺动脉,低压(25 cmH₂O)灌注4℃LPD液20 ml,至肺组织颜色变白、左心耳流出的灌洗液清亮后,结扎左侧主支气管,游离心肺周围并取出心肺组织块。将组织块置于4℃LPD液中,在显微镜下分别游离左肺静脉、肺动脉及主支气管,修剪后套入14号静脉留置针自制套管置并应用6-0丝线结扎固定,于4℃低温LPD液中保存18 h。麻醉方法同供体大鼠,经口气管插管,呼吸机参数设置同供体大鼠手术。右侧卧位固定,左侧第4肋间切口入胸,予以撑开器充分暴露。显微镜下充分解剖游离肺门后,预置6-0丝线圈于三者近心端备用,以微血管夹分别钳夹肺动、静脉及支气管,于正前壁剪开(不剪断)血管及支气管。将供体肺血管(或支气管)置入相应血管(或支气管),打紧预置线结(6-0丝线圈),依次完成肺动脉、支气管及肺静脉的吻合。吻合完毕,开放肺静脉及支气管,剪断受体左肺,将移植肺置入胸腔,待移植肺由白色变为粉红色时,开放肺动脉,如有肺不张,可予以呼吸机手控复张肺并适当增加潮气量。检查3个吻合口无漏血、漏气,放置自制胸腔引流管后3-0丝线关胸。待大鼠恢复自主呼吸后拔出气管插管^[5]。供肺再灌注4 h后,应用相同方法麻醉,气管切开插管,接动物呼吸机,设置参数同前,抽取动脉血行血气检查,收集再灌注后肺标本。

1.2.4 检测指标

移植肺肺功能检测:经正中切口开胸,阻断右侧肺门20 min,由左侧肺静脉取血行动脉血气分析。

移植肺 W/D 测定:左侧移植肺上中下 3 等分,上 1/3 擦净表面血迹及水分称重后,100℃烘烤 72 h,测量 W/D。

组织学病理和免疫组化检查:中间 1/3 肺组织甲醛固定后送石蜡切片病理检查及免疫组化检查。检测移植肺组织病理改变及 hIL-10 表达及分布。

氧化还原指标测定:下 1/3 肺组织匀浆后定量测定 MDA、SOD、MPO 的含量。

炎症因子测定:下 1/3 肺组织匀浆后 ELISA 法定量测定 TNF- α 、IFN- γ 含量。

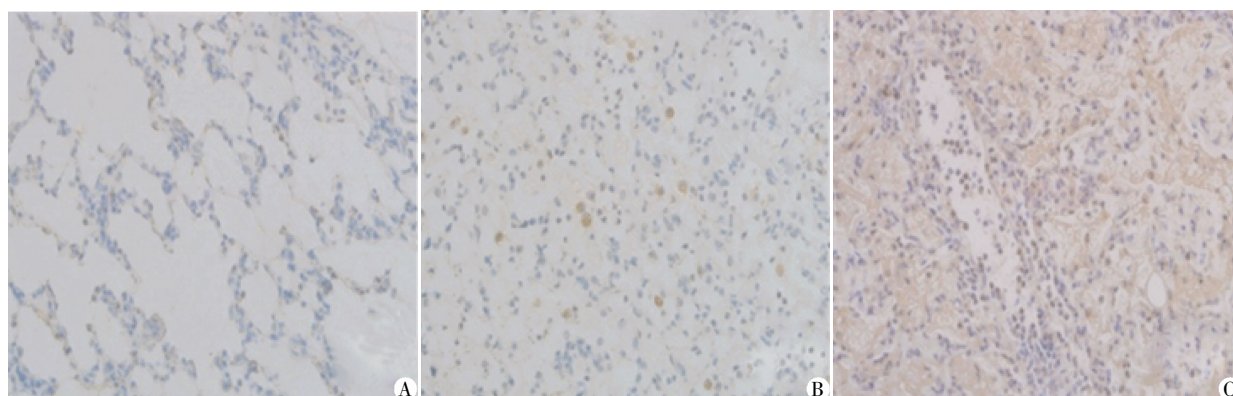
1.3 统计学方法

计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 Stata11.0 统计软件分析,多组间均数比较采用方差分析,以 $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 移植后 4 h 移植肺组织中 hIL-10 表达的测定

通过免疫组化结果可以看出,C 组中 hIL-10 表达明显,主要分布在肺泡间质及气管周围,而在 A、B 组中未见明显表达(图 1)。



A:A 组;B:B 组;C:C 组。

图 1 免疫组化检测 hIL-10 的表达分布($\times 100$)

Figure1 hIL-10 detection by immunohistochemical localization in recipient lung graft tissue after transplantation($\times 100$)

2.2 移植后 4 h 移植肺组织 PO_2 、 PCO_2 、W/D 检测结果比较

C 组移植后 PO_2 明显高于 A 组和 B 组 ($P < 0.05$),同时与 A 组及 B 组比较,C 组 PCO_2 没有显著差异($P > 0.05$),但湿干比明显下降($P < 0.05$,表 1)。

2.3 移植后 4 h 移植肺组织中 MDA、SOD、MPO 检测结果比较

与 A 组和 B 组相比较,C 组供肺组织中 MDA 含量显著性降低 ($P < 0.05$),MPO 含量明显减少 ($P < 0.05$),同时 C 组中 SOD 含量显著提高($P < 0.05$),氧化还原反应产物含量比较差异有统计学意义(表 2)。

表 1 移植术后 4 h hIL-10 对移植肺功能的影响

Table 1 Effect Of hIL-10 gene transfection on posttransplant lung function after 4 hours reperfusion period

($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	PO_2 (mmHg)	PCO_2 (mmHg)	W/D
生理盐水组(A 组)	79.00 ± 10.80	26.20 ± 4.19	7.13 ± 0.92
空白载体组(B 组)	65.70 ± 8.30	25.70 ± 3.40	7.34 ± 0.75
转基因组(C 组)	$112.00 \pm 6.50^{* \#}$	24.50 ± 4.04	$5.59 \pm 0.28^{* \#}$

与 A 组比较, $^{*}P < 0.05$;与 B 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

表 2 移植后 4 h 移植肺组织中 MDA、SOD、MPO 含量测定结果

Table 2 Activity analysis of MDA,SOD and MPO in posttransplant lungs after 4 hours of reperfusion

($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MDA(nmol/mgprot)	SOD(U/mgprot)	MPO(U/gprot)
生理盐水组(A 组)	1.63 ± 0.10	3.35 ± 0.17	10.92 ± 0.89
空白载体组(B 组)	1.75 ± 0.24	2.99 ± 0.18	9.02 ± 0.53
转基因组(C 组)	$0.89 \pm 0.11^{* \#}$	$11.30 \pm 0.86^{* \#}$	$6.26 \pm 0.81^{* \#}$

与 A 组比较, $^{*}P < 0.05$;与 B 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

2.4 移植后4 h 移植肺组织中 TNF- α 、IFN- γ 检测结果比较

C 组供肺组织中 TNF- α 、IFN- γ 含量较生理盐水组和空白载体组明显减少, 有显著统计学意义(表 3)。

2.5 移植后4 h 移植肺组织 HE 染色病理结果比较

从 HE 染色病理结果可以看出, A 组和 B 组中弥漫性病理改变: 肺间质中炎症细胞尤其是中性粒细胞浸润, 肺泡壁水肿, 肺泡腔中渗出明显, 肺泡壁及血管壁水肿明显。与 A 组和 B 组比较, C 组中肺泡间质炎症细胞浸润, 水肿及渗出明显减少, 病理改变减轻(图 2)。

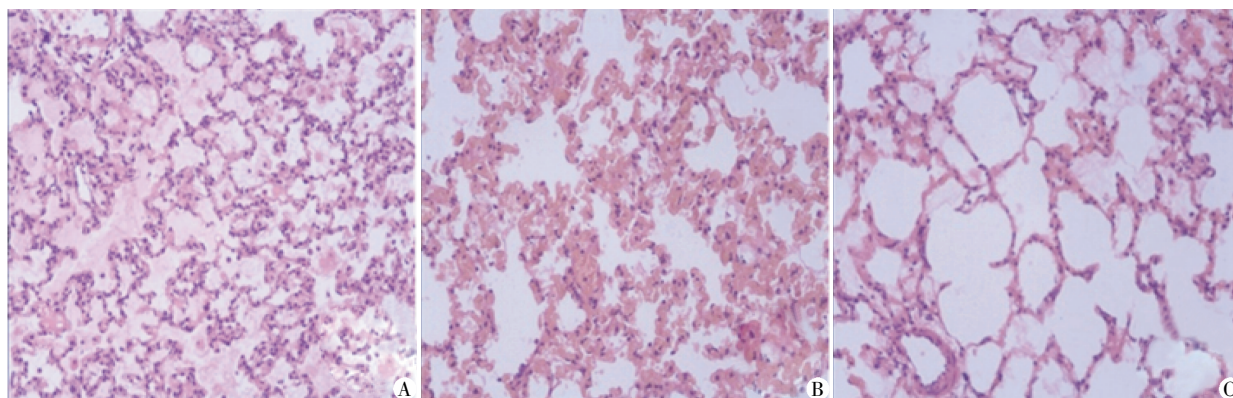
表 3 移植后4 h 移植肺组织中 TNF- α 、IFN- γ 含量测定结果

Table 3 Activity analysis of TNF- α and IFN- γ in posttransplant lungs after 4 hours of reperfusion

($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TNF- α (ng/gprot)	IFN- γ (ng/gprot)
生理盐水组(A组)	19.06 \pm 1.92	16.82 \pm 2.07
空白载体组(B组)	19.23 \pm 1.67	19.89 \pm 1.77
转基因组(C组)	7.65 \pm 0.29 ^{*#}	10.19 \pm 2.95 ^{*#}

与 A 组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 B 组比较, [#] $P < 0.05$ 。



A: A 组; B: B 组; C: C 组。

图 2 移植后4 h 移植肺组织 HE 染色病理结果比较($\times 100$)

Figure 2 HE staining and pathological analysis of posttransplant lungs after 4 hours of reperfusion($\times 100$)

3 讨论

肺移植及心肺联合移植已是终末期心肺疾病的有效治疗手段, 除了供体器官缺乏外, 肺移植术主要面临的问题包括移植术后即刻发生的缺血再灌注损伤、急性排异反应和感染、慢性同种异体移植功能障碍和闭塞性细支气管炎^[6]。随着分子生物学、重组 DNA 技术及转基因技术的发展, 通过载体携带目标基因转染至供体从而在肺移植的早期起到保护作用的研究逐步增加, 而肺脏也是基因治疗最理想的器官^[7]。由于肺脏同时接受来自支气管动脉及肺动脉的两套血液供应, 同时肺泡上皮细胞及肺脏血管内皮细胞具有较高的 ATP 代谢系统, 所以在肺移植术后, 肺脏的缺血再灌注损伤几率较其他器官明显增大。如何改善肺移植后的急性缺血再灌注损伤成为目前肺移植基础研究领域里的热点。移植肺的缺血再灌注损伤主要由缺血缺氧刺激启动了供肺体内的巨噬细胞释放多种炎症因子, 包括 IL-8、IL-12、IL-

18、TNF- α 、IFN- γ 等^[8], 这些细胞因子参与了供体内各种白细胞的活化及黏附, 攻击肺血管内皮细胞, 产生非免疫性炎症反应, 从而导致肺脏缺血再灌注损伤的病理改变: 肺泡-毛细血管内皮细胞受损, 渗透性增加, 肺血管阻力增加和肺动脉高压等^[9]。其中 TNF- α 、IFN- γ 在非免疫炎症反应中起主要作用^[10]。肺泡内皮细胞是否发生损伤取决于内皮的保护性物质和前炎症因子的相对平衡^[11]。保护性物质里 IL-10 是一个多效应的细胞因子, 主要由巨噬细胞、NK 细胞、T 细胞、B 细胞、肥大细胞和胶质白细胞所释放^[12], 它的主要功能是通过抑制巨噬细胞、单核细胞及 T 细胞的激活作用和效应作用而抑制炎症细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 的释放, 从而直接或间接抑制炎症反应^[13], 对移植后供肺的 IRI 有有效的调节抑制作用。

供肺转染目标基因的方法多种多样, 有多种基因载体及转染方式可以选择^[7], 而经气管途径转染目标基因已被证明是最优化的方法^[14]。在本实验中

应用免疫缺陷型即5型腺病毒作为目标基因载体,移植前通过供体气管转染 hIL-10 基因,供体肺组织免疫组化染色可以清楚显示 IL-10 在基因转染组中明显表达,在生理盐水组及空白载体组未见明显表达,说明经气管途径转染目标基因成功。肺脏 IRI 影响移植肺的功能变化,而肺功能最好的评价标准为受体的动脉血气分析结果及肺脏湿干比值。在本实验中再灌注 4 h 后 C 组的 PO_2 明显高于 A、B 组, PCO_2 没有显著差异,肺脏湿干比值明显低于 A、B 两组。说明转染 hIL-10 后移植肺脏功能得到了明显改善。肺移植后非免疫性损伤中炎症细胞因子 $TNF-\alpha$ 、 $IFN-\gamma$ 为缺血再灌注损伤最主要的炎症介质^[8],根据实验结果 $TNF-\alpha$ 、 $IFN-\gamma$ 在 C 组中表达量明显下降,说明 hIL-10 的表达能明显抑制肺脏组织中 $TNF-\alpha$ 、 $IFN-\gamma$ 的表达和释放。MDA 反映组织脂质过氧化损伤的程度,MPO 活性反映中性粒细胞的浸润程度,SOD 活性反映机体组织清除活性氧的能力,因此这三者是判断 IRI 损伤发生程度的重要生化指标^[15]。实验中 A 组、B 组与 C 组比较,供肺组织匀浆液中 MDA 含量及 MPO 活性明显增加,SOD 含量下降,光镜下示炎症细胞浸润明显,说明移植肺脏出现明显的 IRI 损伤,C 组中 hIL-10 的表达明显减少了肺脏血管内皮细胞的损伤程度,提高了肺脏组织清除活性氧的能力,减少了炎症细胞的浸润,减低了肺脏的 IRI 损伤程度。

本实验证实以抑制性细胞因子 hIL-10 为目标基因,应用腺病毒作为载体,经供体气管内转染,可以使 hIL-10 基因在移植肺脏中成功转染,并充分表达 hIL-10,通过有效抑制 $TNF-\alpha$ 、 $IFN-\gamma$ 等炎症细胞因子的释放,抑制了移植后肺脏组织中炎症细胞的激活与浸润,降低了供肺血管内皮细胞的破坏,增强了清除活性氧的能力,移植肺氧合能力明显改善。

随着肺脏移植器官的基因保护研究越来越深入,多个目标基因被发现在肺脏移植后急性缺血再灌注损伤中有有效的保护作用。IL-10 作为一种抑制因子可以广泛抑制炎症反应系统中多种炎症因子的释放,从而抑制炎症反应的发生,在肺移植后急性缺血再灌注损伤中起保护作用。但肺移植后急性缺血再灌注损伤涉及到多个细胞因子、多个系统,要想完整调控 IRI 过程,一个细胞因子的作用是远远不够的,同时 IL-10 在肺脏 IRI 损伤中作用机制仍然尚未明确。所以多基因联合治疗的可行性及各基因的确切作用机制还有待以后进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Cooper JD. Lung transplantation;a new era[J]. Ann Thorac Surg, 1987, 44(5):447-448
- [2] Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation; 29th adult lung and heart-lung transplant report-2012[J]. Heart Lung Transplant, 2012. 31(10): 1073-1086
- [3] Thabut G, Vinatier I, Stem JB, et al. Primary graft failure following lung transplantation; predictive factors of mortality[J]. Chest, 2002, 121(6): 1876-1882
- [4] Teramoto S, Ishii T, Matsuse T. Crisis of adenoviruses in human gene therapy[J]. Lancet, 2000, 355(9218): 1911-1912
- [5] 姚飞, 徐建康, 邵永丰, 等. 大鼠单肺原位移植模型的建立及改良[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2010, 30(7): 962-965
- [6] Hu LJ, Zhu L. Advance in study of interleukin-10 in lung transplantation [J]. International J Respiration, 2007, 27(8): 595-597
- [7] Sato MS, Keshavjee S. Gene therapy in lung transplantation[J]. Curr Gene Ther, 2006, 6(4): 439-458
- [8] Laubach VE, Kron IL. Pulmonary inflammation after lung transplantation[J]. Surgery, 2009, 146(1): 1-4
- [9] Kwon KY, Cho CH, Kim SP, et al. Apoptosis induced by preservation and reperfusion in canine lung transplantation[J]. Transplant Proc, 2003, 35(1): 134-137
- [10] De Perrot M, Sekine Y, Fischer S, et al. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation [J]. Respir Crit Care Med, 2002, 165(2): 211-215
- [11] Lefer AM, Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1993, 33(1): 71-90
- [12] Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10 [J]. Adv Immunol, 1994, 56(1): 1-26
- [13] Chan CS, Ming-Lum A, Golds GB, et al. Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α translation through a SHIP1-dependent pathway[J]. J Biol Chem, 2012, 287(45): 38020-38027
- [14] Souza DG, Guabiraba R, Pinho V, et al. IL-1-driven endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury [J]. Immunol, 2003, 170(9): 4759-4766
- [15] Eppinger MJ, Ward PA, Boiling SF, et al. Regulatory effects of interleukin-10 on lung ischemia-reperfusion injury[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 1996, 112(5): 1301-1305

[收稿日期] 2012-11-07