

文章编号:1005-6947(2007)05-0451-05

· 基础研究 ·

反义肽核酸阻断 CC 趋化因子受体 5 途径 延长同种异体胰岛移植存活

杨蕾, 刘永锋, 程颖, 张睿, 富大智, 李铁民, 赵宁

(中国医科大学附属第一医院 器官移植科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 探讨 CC 趋化因子受体 5 (CCR5) 反义肽核酸对同种异体胰岛移植急性排斥反应的影响。方法 建立小鼠胰岛移植模型用于检测以 CCR5 为靶位的 PNA CCR5 在体内对急性胰岛移植排斥的效应。通过混合淋巴细胞培养 (MLR) 来评估体外 T 细胞增殖应答能力。应用 RT-PCR 和 Western blot 检测 mRNA 和蛋白表达水平。结果 与生理盐水对照组 [(6.5 ± 0.58) d] 和随机 PNA 错配组 [(6.5 ± 0.50) d] 相比, PNA CCR5 处理组有功能胰岛移植存活时间明显延长 [(12.0 ± 1.75) d] (P 均 < 0.01)。移植后第 7 天, PNA CCR5 组的 CCR5 mRNA 表达水平 (0.56 ± 0.05) 明显低于对照组和错配组 (1.68 ± 0.07 和 1.80 ± 0.14) (P 均 < 0.01)。PNA CCR5 组移植 CCR5 蛋白水平亦较对照组和错配组明显下降 (P 均 < 0.01)。PNA CCR5 组小鼠淋巴细胞增殖能力亦明显降低。结论 PNA CCR5 能延长同种异体胰岛移植物的存活时间, 在抑制同种异体急性排斥反应中具有潜在的治疗效应。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(5):451-455]

关键词: 胰岛移植; CC 趋化因子受体 5; 肽核酸, 反义; 移植排斥

中图分类号: R322.57; R617

文献标识码: A

Blocking the CC chemokine receptor 5 pathway by antisense peptide nucleic acid prolongs islet allograft survival

YANG Lei, LIU Yong-feng, CHEN Ying, ZHANG Rui, FU Da-zhi, LI Tie-min, ZHAO Ning
(Department of Transplantation, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Objective** To identify the effect of peptide nucleic acid of CC chemokine receptor 5 on acute rejection of islet allograft. **Methods** Mice islet transplant models were used to test the effect of PNA CCR5 by targeting CCR5 in acute allograft rejection. In vitro T cell proliferative responses were assessed by mixed lymphocyte response (MLR). RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of mRNA and protein. **Results** PNA CCR5-treated recipients demonstrated statistically significant prolongation [(12.00 ± 1.75) d] in functional allograft survival when compared with saline [(6.50 ± 0.58) d] or PNA mismatch-treated recipients [(6.50 ± 0.50) d]. The CCR5 mRNA expression level of PNA CCR5, control, and PNA mismatch treatment recipients at day 7 posttransplant was 0.56 ± 0.05, 1.68 ± 0.07 and 1.80 ± 0.14, respectively. The data showed that CCR5 protein was significantly down-regulated in PNA CCR5 treatment allografts compared with saline and PNA mismatch treatment allografts (P < 0.01, P < 0.01). Lymphocytes from PNA CCR5 treatment mice also exhibited a reduced degree of proliferation. **Conclusions** The present study indicates that PNA CCR5 can prolong the survival time of islet allograft, and has a potential therapeutic effect on inhibiting acute allograft rejection.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(5):451-455]

收稿日期:2006-11-02; 修订日期:2007-01-30。

作者简介:杨蕾,女,辽宁人,中国医科大学附属第一医院讲师,主要从事器官移植方面的研究。

通讯作者:杨蕾 E-mail:yanglei72@medmail.com.cn

Key words: Islet of Langerhans Transplantation; CC Chemokine Receptor 5; Peptide Nucleic Acid, Antisense; Allograft Rejection

CLC number: R322.57; R617

Document code: A

胰岛移植不仅可以有效地降低血糖,而且能改善患者依靠胰岛素治疗所不能纠正的免疫缺损状况^[1]。但移植后急性排斥反应仍是影响移植胰岛功能的主要障碍。趋化因子对白细胞的发育、分化、定位具有调节作用^[2]。CC趋化因子受体5(CC chemokine receptor 5, CCR5)是炎症性趋化因子的受体,在同种异体排斥反应中起重要作用。肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)是一种核酸类似物,是2-氨基乙基甘氨酸蛋白骨架取代核酸的磷酸戊糖,形成类似多肽的骨架。本实验探讨应用CCR5反义肽核酸阻断CCR5途径对小鼠同种异体胰岛移植急性排斥反应的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及建立糖尿病模型

供者为BALB/c小鼠,受者为C57BL/6小鼠(均由中国医科大学动物中心提供),体重30~35g,8~12周龄。采用链脲霉素(STZ)化学灼伤法制备糖尿病小鼠模型。小鼠禁食过夜后,腹腔内注射2% STZ(溶于pH为4.5的柠檬酸缓冲液),剂量为150mg/kg(体重)。注射后断尾采血,血糖仪监测随机血糖。如连续3d在非禁食情况下血糖 ≥ 16.8 mmol/L,即为糖尿病模型建立成功^[3]。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 根据不同处理因素将成模小鼠随机分3组。每组10只。即(1)CCR5反义肽核酸处理组(PNA CCR5组), (2)随机错配PNA组(错配组); (3)生理盐水对照组。肽核酸合成于成都派德生物技术有限公司。PNA CCR5序列为434(5'-Tyr-CCGTTCTGACTTTT-Lys-3')421; 随机错配肽核酸序列为Tyr-TTTCCAGCTGCTTT-Lys。胰岛移植受体分别接受PNA CCR5、随机错配PNA,剂量为2.5mg/kg,从术日起至术后第6天,每日经尾静脉注射,首次注射在移植前4h。另对照组每日注射等体积生理盐水。

1.2.2 胰岛分离和移植 正常小鼠乙醚麻醉。胆管插管,并缓慢灌注含1.5mg/mL胶原酶V(Sigma, USA)的冷却缓冲液3~4mL。切取胰腺,37℃水浴12~15min。用Hank's平衡盐溶液洗涤后,采用Ficoll(Sigma)不连续密度梯度离心法纯

化胰岛。双硫脲(DTZ)染色,在倒置显微镜下胰岛团呈猩红色或红色,手检计数胰岛备用^[4](图1)。

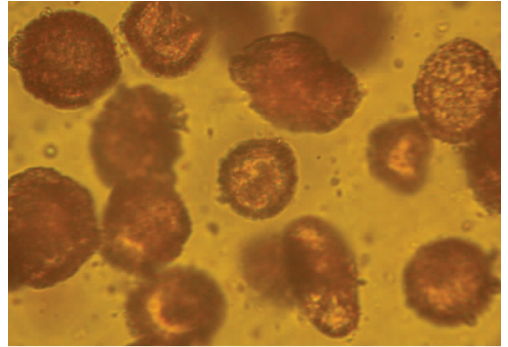


图1 DTZ染色胰岛细胞(呈猩红色)

糖尿病小鼠经腹腔戊巴比妥麻醉后,俯卧位固定经右侧脊柱旁切口暴露右侧肾脏。通过聚丙烯管将胰岛注入肾被膜下,每一受体注射300~400当量胰岛。监测尾静脉血糖评估胰岛移植功能。移植后若非空腹血糖连续2d高于11.2mmol/L,则以第一次血糖升高时间作为移植受体排斥、功能丧失的时间。术后第7天和排斥反应时,受体小鼠处死,每组共留取5只小鼠的胰岛移植体、脾脏进行各项指标检测。其余受者观察生存时间。

1.2.3 淋巴细胞应答 通过混合淋巴细胞培养(MLR)评估体外T淋巴细胞的增殖应答能力。C57受者脾细胞作为应答细胞, Balb/c供者脾细胞经放射照射后作为刺激细胞;两者共同培养于96孔板,细胞浓度均为 1×10^6 /mL。培养72h后,加入³H-TdR培养16h。收集细胞后用 β 液闪仪计数。所有细胞设4个复孔,计算平均每分钟脉冲数(cpm)。

1.2.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 检测CCR5 mRNA应用TRIzol试剂提取RNA。RT-PCR反应体系10 μ L包括1 μ g总RNA, 0.5 μ g随机引物, 0.4 μ L 25mM dNTP, 100U反转录酶。引物如下^[5]: RANTES(regulated upon activation normal T cell expressed and secreted)为5'-CCTCACCATCATC-CTCACTGCA-3', 5'-TCTTCTCTGGGTTGGCACAC-3'(215bp); 巨噬细胞炎症蛋白-1 α (macrophage-inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)为5'-GAAGAGTCCCTCGATGT GGCTA-3', 5'-CCCTTTTCTGTTCTGCTGACAAG-3'(472bp);

CCR5 为 5' - CAAGACAA TCCTGATCGTGCAA - 3'; 5' - TCCTACTCCCAAGCTGCATAGAA - 3' (125 bp); β - actin 为 5' - GGAAATCGTGCCTGACATTA - 3', 5' - GATCTCTTCTGCATCCTGTC - 3' (350bp)。扩增体系为 20 μ L, 包括 0.5 μ M 引物, 10 μ L PCR 反应混合液, 1 μ L cDNA。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 退火 15 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 45 次循环。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色。采用凝胶成像分析系统进行密度指数分析。 β - actin RT-PCR 扩增作为内参照。表达水平以实验组各电泳条带密度与相对的内参照密度之比来表示。

1.2.5 免疫印迹检测蛋白水平 胰岛移植物留取后, 迅速冷冻保存, 提取蛋白。蛋白浓度应用 Bio-Rad 蛋白分析仪进行监测。50 μ g 蛋白置于 12% SDS - PAGE 凝胶电泳后, 转印于硝酸纤维素膜, 与 CCR5 (0.5 μ g/mL) 抗体孵育。应用电化学发光法检测电泳带密度。 β - actin 作为内参照。进行密度指数分析。

1.2.6 组织学检查 切取的移植物标本, 置 10% 福尔马林溶液中固定, 石蜡包埋, 连续切片, HE 染色观察。

1.3 统计学处理

所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 One-Way ANOVA 方法检验。胰岛移植物生存时间用 Kaplan-Meier 生存曲线分析, 用 Log-rank 进行检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 胰岛移植物存活时间

对照组和错配组胰岛移植物平均存活时间分别为 (6.50 \pm 0.58) d 和 (6.50 \pm 0.50) d, 而 PNA CCR5 组胰岛存活时间为 (12.0 \pm 1.75) d, 显著长于对照组和错配组, 差异有显著性 ($P < 0.01$) (图 2)。

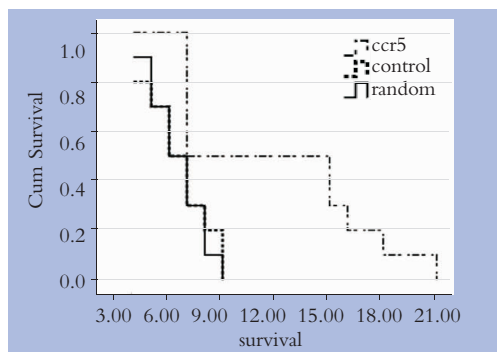


图 2 各组胰岛移植物存活时间

2.2 混合淋巴细胞培养结果

PNA CCR5 组、对照组和错配组受者 cpm 均值分别为 8 742.6 \pm 876.5, 16 382.3 \pm 1 012.4 和 18 548.4 \pm 985.4。与对照组和错配组相比, PNA CCR5 组小鼠淋巴细胞增殖能力明显下降 ($P < 0.01$)。

2.3 趋化因子受体及其配体基因表达水平

胰岛移植术后第 7 天, PNA CCR5 组、对照组和错配组 CCR5 mRNA 水平分别为 0.56 \pm 0.05, 1.68 \pm 0.07 和 1.80 \pm 0.14。PNA CCR5 组、对照组和错配组 MIP-1 α mRNA 水平分别为 1.73 \pm 0.06, 1.81 \pm 0.10 和 1.94 \pm 0.13。3 组 RANTES mRNA 表达分别为 1.53 \pm 0.07, 1.72 \pm 0.04 和 1.82 \pm 0.06。PNA CCR5 组 CCR5 mRNA 的表达显著下调 ($P < 0.01$), 但对其配体无明显的抑制作用 (附表)。

附表 移植术后趋化因子受体及其配体 mRNA 的表达水平

分组	例数	趋化因子受体/配体 ($\bar{x} \pm s$)		
		CCR5	MIP-1 α	RANTES
对照组	10	1.68 \pm 0.07 [†]	1.81 \pm 0.10	1.72 \pm 0.04
PNA CCR5 组	10	0.56 \pm 0.05	1.73 \pm 0.06	1.53 \pm 0.07
错配组	10	1.80 \pm 0.14 [†]	1.94 \pm 0.13	1.82 \pm 0.06

注: [†] 与 PNA CCR5 组比较, $P < 0.01$

2.4 CCR5 蛋白表达水平

光密度半定量数据显示, 对照组, PNA CCR5 组和错配 PNA 组 CCR5 蛋白相对表达量分别为 2.21 \pm 0.19, 0.92 \pm 0.06 和 1.78 \pm 0.13。与对照组和错配组比较, PNA CCR5 组胰岛移植物 CCR5 蛋白水平明显下调 (P 均 < 0.01) (图 3)。

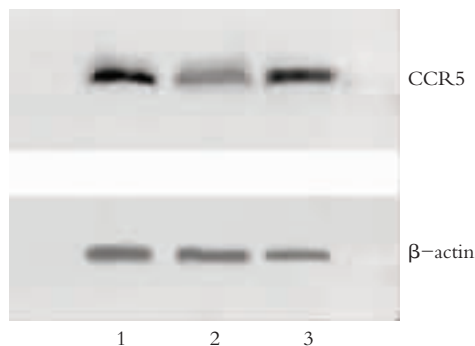


图 3 胰岛移植物 CCR5 蛋白表达水平 1: 对照组 2: PNA CCR5 组 3: 错配组

2.5 组织学表现

术后第 7 天, 不同处理组的移植物显示不同程度的单个核细胞浸润。对照组和错配 PNA 组移植胰岛周围见大量细胞浸润; 而 PNA CCR5 组胰岛周围浸润细胞少见 (图 4 - 6)。

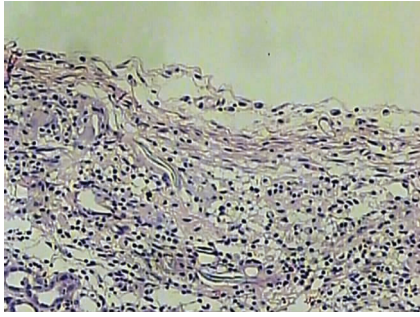


图4 术后第7天对照组胰岛移植植物 HE 染色图片(×200)

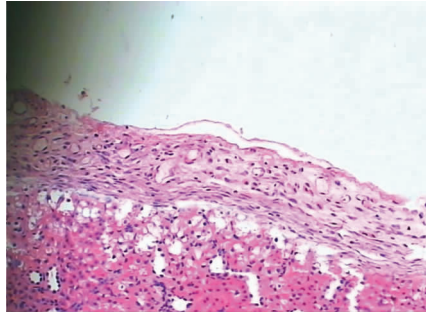


图5 术后第7天 PNA CCR5 组胰岛移植植物 HE 染色图片(×200)

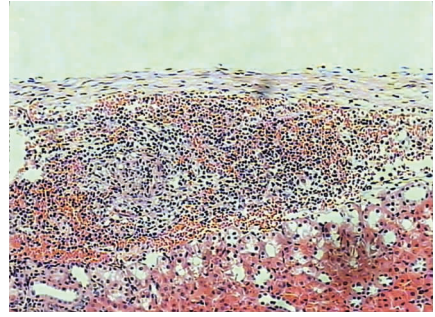


图6 术后第7天错配组胰岛移植植物 HE 染色图片(×200)

3 讨论

胰岛移植被认为是能够治愈糖尿病的潜在治疗手段。接受胰岛移植成功的患者显示正常的血糖水平,而无低血糖发生,生活质量明显提高^[6]。然而,排斥反应仍是影响胰岛移植存活的主要原因^[7]。为克服这些弊端,需要寻找新的免疫抑制靶位和阻断药物。

近来在不同的移植模型研究中显示,趋化因子受体及其配体在同种异体排斥反应过程中起重要作用^[8-9]。在多个主要的趋化因子和其受体中,就同种异体免疫应答而言,CCR5 可能是关键的趋化因子受体^[10]。

反义寡核苷酸是一种独特的基因特异性产物,能选择性地抑制靶基因的表达。PNA 化学性质稳定,不被水解,故在活细胞内不被降解,具有更稳定的化学特性。PNA 能与互补的 DNA 和 RNA 杂交(形成 PNA-DNA, PNA-RNA 二聚体或 PNA2-DNA 三聚体),杂交复合物呈现超常的稳定性和独特的离子强度。近年研究显示其在体内具有反基因和反义效应。Tyler^[11]报道腹腔内注射反义 PNA 能使脑内淀粉样前体蛋白(APP)水平降低 70%。Boules^[12]报道体内注射反义 PNA 可降低 APP 水平,由于 APP 在 Alzheimer 病中起重要作用,所以反义 PNA 可能对治疗 Alzheimer 病有一定的意义。本研究结果显示,PNA CCR5 能延长同种异体胰岛移植存活时间。

为了探讨 PNA CCR5 的作用机制,笔者应用 RT-PCR 和 Western blots 方法测定 CCR5 mRNA 和蛋白表达水平。结果证实,PNA CCR5 能显著而特异地抑制胰岛移植 CCR5 mRNA 和蛋白表达。组织学证据显示,PNA CCR5 能降低移植部位淋巴细胞浸润。同时,应用 MLR 检测体外 PNA CCR5 处理鼠对 T 细胞的应答能力结果表明 PNA CCR5 组淋巴细胞对刺激细胞产生增殖应答,但

MLR 的增殖水平仅是对照组和错配组的 40%~50%,提示 PNA CCR5 通过影响 T 细胞/抗原递呈细胞的相互作用以减轻胰岛移植排斥反应。本实验发现,移植后第 7 天从 PNA CCR5 组受者获得的胰岛移植物的 CCR5 mRNA 水平下降。然而,不同处理方法并未改变移植后 7d 各组移植趋化因子 mRNA 的表达模式(RANTES, MIP-1 α)。上述结果说明,PNA CCR5 通过阻断 T 细胞表达 CCR5,从而抑制 T 细胞迁移至移植植物,调节同种异体胰岛移植排斥反应,而并不改变趋化因子配体的表达。本实验还发现 PNA CCR5 能降低 CCR5 蛋白表达,显示了 PNA CCR5 不仅具有反基因作用,而且还有反义作用。

本文结果提示 CCR5 在体内同种异体免疫应答中起重要作用;若以这一趋化因子受体为靶位,可能有利于胰岛移植物的存活。

参考文献:

- [1] Shaprio AM, Lakey JR, Ryan EA, *et al.* Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen[J]. *N Eng J Med*, 2000, 343(4):230-238.
- [2] Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(2):102-107.
- [3] Lee I, Wang L, Wells AD, *et al.* Blocking the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 chemokines pathway induces permanent survival of islet allograft through a programmed death-1 dependent mechanism[J]. *J Immunol*, 2003, 171(12):6929-6935.
- [4] Gurol AO, Yillar G, Kursun AO, *et al.* A modified automated method for isolation of viable pancreatic islets in laboratory animals[J]. *Transplant Proc*, 2004, 36(5):1526-1527.
- [5] Zhang N, Schropfel B, Chen DM, *et al.* Adenovirus transduction induces expression of multiple chemokines and chemokine receptors in murine β cells and pancreatic islets[J]. *Am J Transplant*, 2003, 3(10):1230-1241.
- [6] Sutherland DE. Current status of beta-cell replacement therapy (pancreas and islet transplantation) for treatment of diabe-

- tes mellitus [J]. *Transplant Proc*, 2003, 35 (5): 1625 - 1627.
- [7] 沈滨, 张建国, 杨维良, 等. FTY720 在鼠类异种胰岛移植排斥反应中的作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12 (12): 906 - 909.
- [8] Goddard S, Williams A, Morland C, *et al.* Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants [J]. *Transplantation*, 2001, 72 (12): 1957 - 1967.
- [9] Fahmy NM, Yamami MH, Starling RC, *et al.* Chemokine and chemokine receptor gene expression indicates acute rejection of human cardiac transplants [J]. *Transplantation*, 2003, 75 (13): 2044 - 2047.
- [10] Hancock WW, Wang I, Ye Q, *et al.* Chemokines and their receptors as markers of allograft rejection and targets for immunosuppression [J]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15 (5): 479 - 486.
- [11] Tyler BM, Jansen K, McCormick DJ, *et al.* Peptide nucleic acids targeted to the neurotensin receptor and administered i. p. cross the blood-brain barrier and specifically reduce gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (12): 7053 - 7058.
- [12] Boules M, Williams K, Gollatz, E *et al.* Down-regulation of amyloid precursor protein by peptide nucleic acid in vivo [J]. *J Mol Neurosci*, 2004, 24 (1): 123 - 128.

文章编号: 1005 - 6947(2007)05 - 0455 - 01

· 病案报告 ·

大网膜扭转误诊 2 例

霍新合, 韦晓景, 董圣洁, 寇炳岳, 杨芳

(河北省沧州市人民医院 外一科, 河北 沧州 061000)

关键词: 大网膜扭转; 误诊; 病例报告

中图分类号: R656.4 **文献标识码:** D

病例报告 例 1 男, 36 岁。右侧腹股沟可复性肿物 10 余年, 肿物不能回纳伴腹痛进行性加重 32h 入院。体查: 体温 37.6℃; 腹平坦, 未见胃肠型及蠕动波, 全腹压痛, 轻度反跳痛及肌紧张, 肠鸣音弱。右侧腹股沟触及 10cm × 6cm × 5cm 肿物, 降入阴囊, 回纳困难, 但外环口较松弛, 压痛较轻。白细胞 11.6 × 10⁹/L。腹穿抽出淡红色血性液。诊断: (1) 急性弥漫性腹膜炎; (2) 右侧腹股沟绞窄性斜疝? 行剖腹探查术, 见腹腔血性渗液约 100mL, 大网膜顺时针扭转 360°, 远端呈暗红色, 并疝入阴囊内, 与疝囊少许粘连, 肿胀明显, 部分已坏死。于扭转蒂近端 2cm 切除大网膜, 行疝环缝合腹腔内修补术, 术后治愈出院。

例 2 男, 30 岁。入院前 3d 出现脐周疼痛, 20h 后转移至右下腹, 逐渐加重, 伴恶心呕吐。体查: 急性病容, 全腹压痛, 反跳痛, 轻度肌紧张,

右下腹为重, 肠鸣音弱。B 超示: 右下腹约 5cm × 3cm 肿块, 边界不清, 腹腔积液少量。疑为阑尾周围脓肿行剖腹探查术。术中见大网膜扭转 720°, 形成 6cm × 5cm × 4cm 肿块, 呈黑色; 腹腔血性渗液约 200mL, 阑尾正常, 行扭转网膜切除。病检为大网膜缺血坏死。治愈出院。

讨论 大网膜按大网膜下缘部位分为上腹型、中腹型、下腹型 3 型。下腹型下缘较长, 活动度大, 易发生扭转^[1]; 大网膜解剖变异, 如舌状突出、大网膜肥厚蒂长、分叉网膜等亦为其发生扭转的因素之一; 大网膜存在肿瘤、不对称性肥厚、粘连、疝入疝囊等都是发生扭转的病理学因素; 剧烈活动、咳嗽、体位突然改变、各种原因的肠蠕动过快等到亦为其诱因。

大网膜扭转分为原发性和继发性两类, 临床以后者较为多见, 多继发于腹腔炎症粘连、网膜病变、疝等, 如本组例 1。原发性大网膜扭转是指没有明显的病变因素存在者, 约 80% 以上发生于成年人, 男女比例为 2:1^[2]。

大网膜扭转缺少特异性临床表现, 诊断困难, 一般均为术中确诊。其主要临床表现为突发性腹痛, 并进行性加重, 好发于右下腹, 偶有转移性右下腹痛^[3]。但比急性阑尾炎症状

重, 偶可触及压痛肿块, 腹腔穿刺可抽出血性液体。由于发病早期大网膜根部受牵拉, 亦可出现恶心、呕吐等消化道症状, 但症状轻微。本组例 1 虽右腹股沟疝回纳困难, 但外环口较松弛, 压痛较轻, 腹膜炎体征却存在, 故难下嵌顿疝致肠绞窄诊断。B 超检查显示腹腔内积液, 有时可发现边界不清的不规则肿块而胆囊、阑尾等器官正常, 可作为怀疑本病的首选辅助检查, 但因技术方面的限制诊断率亦不高^[4]。本病虽无特异性诊断依据, 但应提高对本病的认识, 当出现上述症状体征又不能确诊为其它疾病时, 应想到本病存在的可能。

参考文献

- [1] 何宇杰. 大网膜扭转的诊疗现状 [J]. *中国误诊学杂志*, 2004 (5): 698 - 699.
- [2] Cao WG, Zhang JZ. Primary omental torsion in a 12 year old boy [J]. *Chin medj*, 2001, 114 (2): 202 - 203.
- [3] 周建宏. 原发性大网膜扭转误诊 2 例 [J]. *四川医学*, 200, 21 (5): 427.
- [4] 刘胜春, 姚榛祥. 原发性大网膜扭转 3 例报道 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12 (8): 637 - 638.

收稿日期: 2007 - 02 - 08

作者简介: 霍新合, 男, 河北泊头人, 河北省沧州市人民医院副主任医师, 主要从事普外微创方面的研究。

通讯作者: 霍新合 E-mail: huxinh@sina.com