

绿色荧光蛋白在大鼠角膜移植术后植片中的表达

周炼红 朱祥祥 邢怡桥 陈 希

Expression of green fluorescent protein in graft of rats after penetrating keratoplasty

Zhou Lianhong, Zhu Xiangxiang, Xing Yiqiao, Chen Xi. Department of Ophthalmology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract Objective It is very important for us to transfer the relevant gene into corneal graft to prevent the reject and protect the endothelium after keratoplasty. Our previous study demonstrated that the report gene mediated by recombinant adeno-associated virus (rAAV) can be expressed in subconjunctival, corneal and retinal tissue. Current experiment was to investigate the expression of green fluorescent protein (GFP) transferred by rAAV in the corneal graft of rats after penetrating keratoplasty (PKP). **Methods** Sixteen Wistar rats (donors) and thirty-two Sprague-Dawley rats (recipients) were used to establish penetrating keratoplasty model. The use of these animals followed the Standard of Association for Research in Vision and Ophthalmology. Donor cornea graft was treated in culture medium containing 1:1 rAAV-GFP (10^{10} vg/mL) + DMEM/F12 and 20% fetal bovine serum for 30 minutes before surgery. The corneal grafts were examined under the slit-lamp after operation at a two-day interval. The rats were sacrificed and the eyeballs were enucleated at the 1st, 2nd, 4th and 12nd week respectively to detect the expression of GFP in corneal endothelium under the confocal microscope. **Results** The cornea grafts were transparent, and no edema, opacity, neovascularization and other complications were seen. The green fluorescence was seen in corneal endothelium under the confocal microscope with the green fluorescence intensity 91.83 ± 10.83 , 128.67 ± 4.32 , 117.33 ± 3.01 and 118.50 ± 3.02 in 1-week group, 2-week group, 4-week group and 12-week group respectively, indicating a significant difference in expression of GFP between 2-week group and 1-week group, 4-week group and 1-week group, 12-week group and 1 week group ($P < 0.01$). No significant difference was found in the expression intensity of GFP between 4-week group and 1-week group ($P > 0.05$). **Conclusion** rAAV-GFP can be transferred into corneal endothelium of rats by the co-culture method. GFP gene can be stably expressed in endothelium of corneal graft for long-term after PKP.

Key words recombinant adeno-associated virus; green fluorescent protein; penetrating keratoplasty; gene transfer

摘要 目的 研究穿透角膜移植术(PKP)后重组腺相关病毒(rAAV)载体介导的绿色荧光蛋白(GFP)在大鼠植片中的转染及表达情况。**方法** 建立32只大鼠穿透角膜移植的动物模型,SD大鼠作为受体,Wistar大鼠作为供体,供体植片置于含 10^{10} μg/mL(病毒基因组数/mL)rAAV-GFP的DMEM/F12 1:1混合培养液中培养30 min。按照不同的观察时间点用抽签法将角膜移植术后的大鼠随机分成4组,每组8只。手术后隔日在裂隙灯显微镜下观察角膜植片的存活情况。于角膜移植术后1、2、4、12周取各组眼球在共焦显微镜下观察角膜组织中GFP的表达情况,Infinity-capt软件测量角膜植片内皮层中荧光的表达强度。**结果** 各组中选取的受体角膜植片无水肿、混浊、新生血管及其他并发症发生。GFP基因表达阳性的角膜内皮细胞呈绿色荧光。各组角膜内皮细胞绿色荧光强度与背景亮度比值,A组: 91.83 ± 10.83 ;B组: 128.67 ± 4.32 ;C组: 117.33 ± 3.01 ;D组: 118.50 ± 3.02 ,转染后1周即有明显表达,4周及12周组较1周组强($P < 0.01$),2周组强度最高($P < 0.01$)。**结论** 通过共培养的方法,rAAV-GFP能够有效地转染到角膜内皮细胞中。PKP后GFP基因能够持续、高效、稳定地在移植片的角膜内皮细胞中表达。

关键词 重组腺相关病毒;绿色荧光蛋白;穿透角膜移植;基因转染

分类号 R 779.65 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)05-0364-04

应中最容易受到攻击,同时,移植术后免疫排斥反应造成内皮细胞的数量减少和功能丧失,是植片衰竭的最主要原因^[2-4]。预防和治疗角膜移植术后的免疫排斥反应,保护角膜内皮细胞,提高植片的存活率至关重要。前期研究中我们发现,重组腺相关病毒(recombinated adeno-associated virus, rAAV)载体携带的报告基因可在结膜下组织、角膜及视网膜组织中持续稳定地表达^[5]。那么在角膜移植手术过程中,是否可以利用 rAAV 的生物学特点,对角膜植片进行简单的前期处理,从而使相关目的基因在植片的内皮细胞中持续稳定地表达,达到减轻免疫排斥反应,保护角膜内皮的目的。本研究观察穿透角膜移植术(penetrating keratoplasty, PKP)后, rAAV 载体介导的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因在大鼠角膜内皮组织中的转染及表达情况报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SD 大鼠及 Wistar 大鼠各 32 只,雌雄不限,体重 200~250 g,由武汉大学实验动物中心提供。动物的饲养和使用遵循美国视觉和眼科学研究会(Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO)制定的科研动物使用规范进行。rAAV-GFP 委托 863 计划生物领域病毒基因载体研究开发基地、本元正阳基因技术股份有限公司包装,滴度为 2×10^{12} $\mu\text{g}/\text{mL}$ (病毒基因组数/mL)。DMEM/F12 1:1 混合培养液购自美国 Gibco 公司;20% 胎牛血清营养液购自杭州四季青公司。共焦显微镜由武汉大学基础医学院免疫学教研室提供。

1.2 rAAV-GFP 体外转染角膜组织

Wistar 大鼠作为供体,无菌条件下沿角膜缘取全角膜,将其浸泡在含 10^{10} $\mu\text{g}/\text{mL}$ rAAV-GFP 的 DMEM/F12 1:1 混合培养液、20% 胎牛血清及双抗的 24 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 30 min。

1.3 PKP

参照文献[6-7]的方法建立大鼠同种异体角膜移植模型。术前 15 min 用 1% 阿托品滴眼液和 0.5% 托吡酰胺滴眼液充分散瞳,0.7 mL 10% 水合氯醛溶液腹腔注射麻醉大鼠。手术在显微镜下进行。32 只 SD 大鼠右眼行 PKP,用直径 3.25 mm 的环钻在角膜中央做植床,直径 3.5 mm 的环钻钻取浸泡过的 Wistar 大鼠角膜作为植片,10-0 尼龙线间断缝合 8 针固定植片。术毕前房注气,涂典必殊眼膏。术后所有受体大鼠术眼均用妥布霉素滴眼液及 0.5% 托吡酰胺滴眼液点

眼,每日 1 次,共 7 d。隔日裂隙灯下观察角膜植片是否透明,有无新生血管生长及混浊出现。术后发生角膜植片溶解、无前房、前房出血或积液、虹膜前粘连及感染等并发症者剔除。

1.4 实验分组

接受 PKP 的 SD 大鼠,抽签法随机分为 A、B、C、D 4 组,每组 8 只,分别于术后 1、2、4、12 周处死,摘除眼球。

1.5 GFP 基因表达的检测

将 A、B、C、D 4 组各组的 eyeball 用 PBS 冲洗 10 次,分别置于 4% 戊二醛中固定 2 h。固定后沿矢状面纵形剖开,在共焦显微镜下观察角膜内皮层中 GFP 的表达情况。若 GFP 基因在细胞中有表达,在共焦显微镜下为绿色荧光,判断为阳性细胞。每只 eyeball 随机选择 8 个视野,测 GFP 平均荧光强度比值,取平均值。Infinity-capy 软件测量 GFP 在内皮细胞层中的平均荧光强度比值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学处理。GFP 在内皮细胞层中的平均荧光强度测定值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对术后不同组测得的平均荧光强度比值进行多个样本均数的单因素方差分析,各时间点的两两比较采用 Dunnett *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裂隙灯观察角膜植片

角膜移植术后第 1 周内,角膜植片出现一过性水肿、混浊(图 1)。术后第 2 周,部分角膜植片出现严重水肿、混浊,伴新生血管形成(图 2)。术后第 4 周,角膜植片水肿、混浊逐渐消失,新生血管开始消退,植片透明(图 3)。术后 12 周,大部分角膜植片保持透明(图 4),部分再次出现排斥反应。

2.2 共焦显微镜观察 GFP 表达

A 组大鼠共焦显微镜下见角膜内皮层出现一条连续的绿色荧光条带(图 5),平均荧光强度比值为 91.83 ± 10.83 。提示 GFP 基因在角膜内皮层得到表达。B 组见角膜内皮层出现一条连续的绿色荧光条带(图 6),强度高于其他各组。平均荧光强度比值为 128.67 ± 4.32 ,与其他各组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。术后 4 周,C 组大鼠角膜各层均出现绿色荧光,角膜内皮层出现一条连续的绿色荧光条带(图 7),表达强度高于其他各层,C 组平均荧光强度比值为 117.33 ± 3.01 。术后 12 周,D 组大鼠角膜各层均出现绿色荧光,角膜内皮层出现一条连续的绿色荧光

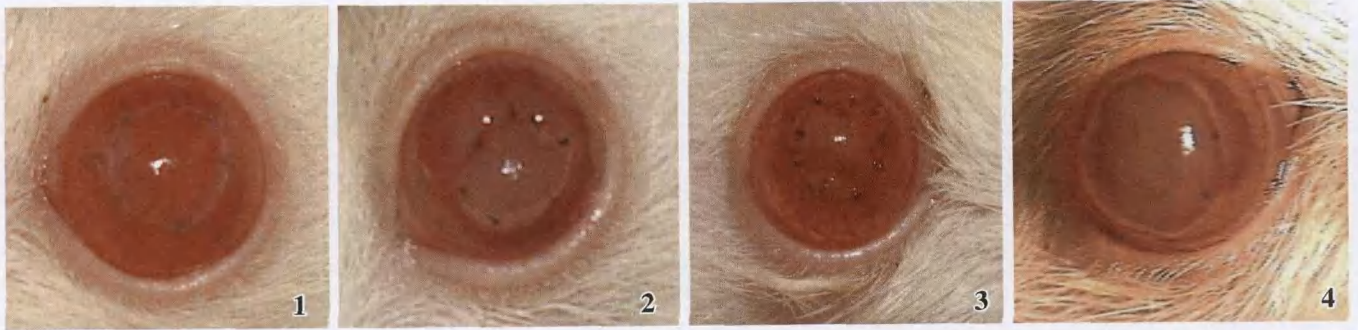


图1 大鼠角膜移植术后1周,角膜植片出现一过性水肿、混浊 图2 大鼠角膜移植术后2周,角膜植片水肿、混浊加重,出现角膜新生血管 图3 大鼠角膜移植术后4周,角膜植片水肿、混浊减轻,角膜新生血管部分消退 图4 大鼠角膜移植术后12周,大部分角膜植片保持透明
 Fig.1 In postoperative 1 week, the cornea grafts showed temporary edema and opacity Fig.2 In postoperative 2 weeks, the edema and opacity of the cornea grafts was aggravated and new blood vassels appeared Fig.3 In postoperative 4 weeks, the edema and opacity of the cornea grafts relieved and new blood vassels fade away partly Fig.4 In postoperative 12 weeks, most of the cornea grafts kept transparent, partly reject reaction reocurred

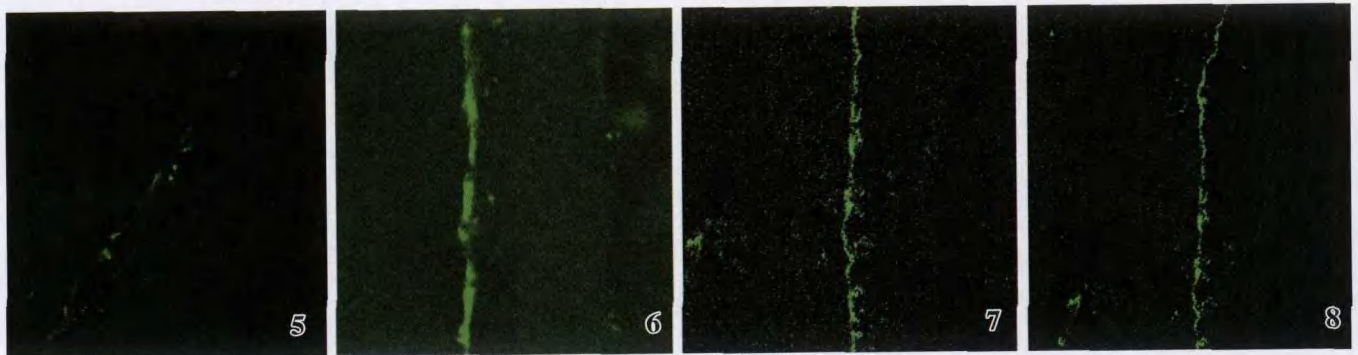


图5 大鼠角膜移植术后1周,共焦显微镜下可见角膜植片内皮层中 GFP 基因的表达(×400) 图6 大鼠角膜移植术后2周,共焦显微镜下可见角膜植片内皮层中 GFP 基因的表达(×400) 图7 大鼠角膜移植术后4周,共焦显微镜下可见角膜植片内皮层中 GFP 基因的表达(×400) 图8 大鼠角膜移植术后12周,共焦显微镜下可见角膜植片内皮层中 GFP 基因的表达(×400)
 Fig.5 In postoperative 1 week, the expression of GFP in corneal endothelium was seen under the confocal microscope (×400) Fig.6 In postoperative 2 weeks, the expression of GFP in corneal endothelium was seen under the confocal microscope (×400) Fig.7 In postoperative 4 weeks, the expression of GFP in corneal endothelium was seen under the confocal microscope (×400) Fig.8 In postoperative 12 weeks, the expression of GFP in corneal endothelium was seen under the confocal microscope (×400)

条带(图7,8),表达强度高于其他各层,D组平均荧光强度比值为 118.50 ± 3.02 。C组与D组之间比值差异无统计学意义($P > 0.05$)(图9)。

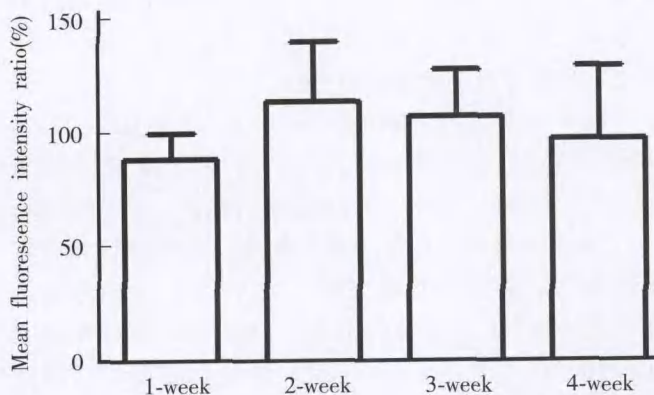


图9 术后不同时间点 GFP 平均荧光强度比值($F = 51.0753, P < 0.01$)
 Fig.9 GFP influorescence intensity ratio in different time group after PKP($F = 51.0753, P < 0.01$)

3 讨论

角膜移植是治疗角膜盲的主要手段之一,但是免疫排斥反应是造成移植片衰竭、移植失败的主要原因。高危角膜移植术后,免疫排斥反应高达60%。目前公认的角膜移植免疫排斥反应主要有3种类型^[8]:上皮型排斥反应、基质型排斥反应和内皮型排斥反应。其中内皮型排斥反应最常见于PKP后,是最严重的类型,约占免疫排斥反应发生率的60%。史伟云等^[9]进行了大量病例术后长期随访的研究,结果显示内皮型排斥反应于术后1、6、18个月为高峰。当发生一次内皮型排斥反应时植片内皮细胞损失率可能为30%~80%,而发生一次免疫排斥反应如未完全控制,则通常在近期可能再次发生免疫排斥反应。因此,如何预防和治疗角膜移植术后免疫排斥反应,保护角膜内皮细胞,提高植片的存活率是迫切需要解决的问题。

由于角膜组织中没有血管以及血眼屏障的存在,

全身及局部用药后,前房及角膜内皮组织难以达到有效的药物质量浓度,并且存在不良反应^[10]。近年来,随着分子生物学技术的发展,基因治疗作为一种新型的治疗手段在多种疾病的治疗领域已成为研究的重点,并取得了一定的成果。本研究使用的 rAAV 载体是目前动物病毒中最小的单链 DNA 病毒,自然缺陷、无包被、无致病源性,具有高效安全、长期有效表达的优点。国内外研究证实重组 rAAV 能有效转导外源基因至造血干细胞、肺、肝脏、肾、肠道、肌肉、心脏、神经和眼等组织中,并能长期表达^[11-12]。Tsai 等^[13]研究发现 rAAV 载体能有效地将目的基因转染到角膜内皮细胞,LPS 诱导眼内炎症反应后,基因表达水平明显增高,眼内炎症情况好转后,基因表达水平降低。再次诱导眼内炎症反应,其基因表达水平再次升高,可持续到注射目的基因后 60 d,推测此现象可能与炎症增强 CMV 启动子活性有关。我们在前期研究中亦发现经不同的给药途径,rAAV 携带的报告基因可在结膜下组织、角膜及视网膜组织中持续、稳定地表达。其中前房注射的方法可将携带目的基因的 rAAV 载体转染至活体大鼠角膜内皮细胞中,持续半年以上^[14]。

本研究观察到通过共培养的方法,rAAV 载体携带的 GFP 基因能够定向转染到移植片的角膜内皮细胞中,稳定表达 12 周以上。操作方法简单、易行,可操控性强,无需特殊设备和技术。对于排斥反应等情况的观察可直接在裂隙灯显微镜下进行。推测通过 rAAV 载体介导的基因治疗,可以将相关目的基因导入到相应的角膜内皮细胞中,持续稳定表达,从而促进角膜内皮细胞的分裂及移行,或纠正异常的代谢,改善角膜内皮的营养和功能,保护角膜内皮,将为治愈难治性角膜病变带来希望。特别在施行角膜移植手术时,

有望通过基因转染的方法,提高移植片的组织相容性,降低排斥反应的发生率。

参考文献

- 1 Inoue K, Amano S, Oshika T, et al. Risk factors for corneal graft failure and rejection in penetrating keratoplasty [J]. Acta Ophthalmol Scand, 2001, 79(3): 251 - 255
- 2 Reinhard T, Bohringer D, Huschen D, et al. Chronic endothelial cell loss of the graft after penetrating keratoplasty: influence of endothelial cell migration from graft to host [J]. Klin Monatsbl Augenheilkd, 2002, 219(6): 410 - 416
- 3 Terry MA, Wall JM, Hoar KL, et al. A prospective study of endothelial cell loss during the 2 years after deep lamellar endothelial keratoplasty [J]. Ophthalmology, 2007, 114(4): 631 - 639
- 4 宫华青, 高华, 谢立信, 等. 慢性角膜植片失功后移植物的超微结构观察 [J]. 中华眼科杂志, 2007, 43(1): 26 - 31
- 5 周炼红, 胡燕华, 汪道文. 重组腺相关病毒经不同途径转染鼠眼球组织 [J]. 眼科新进展, 2004, 24(3): 182 - 184
- 6 Williams KA, Muehlberg SM, Lewis RF, et al. How successful is corneal transplantation? A report from the Australian corneal graft register [J]. Eye, 1995, 9(Pt 2): 219 - 227
- 7 蔡剑秋, 徐栩, 陈长曦, 等. 高危角膜移植排斥动物模型建立的评价和显微手术技巧 [J]. 中华显微外科杂志, 2007, 30(1): 52 - 54
- 8 史伟云, 谢立信. 重视角膜移植术后免疫排斥反应的防治 [J]. 中华眼科杂志, 2006, 42: 3 - 5
- 9 史伟云, 王旭, 谢立信. 穿透性角膜移植术后内皮型免疫排斥反应的临床研究 [J]. 中华眼科杂志, 2005, 4: 145 - 149
- 10 Birnbaum F, Jehle T, Schwartzkopff J, et al. Basiliximab following penetrating risk-keratoplasty—a prospective randomized pilot study [J]. Klin Monatsbl Augenheilkd, 2008, 225(1): 62 - 65
- 11 Rudich SM, Zhou S, Srivastava R. Dose response to a single intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus-erythropoietin in monkeys [J]. J Surg Res, 2000, 90: 102 - 108
- 12 Schirmer JM, Miyagi N, Rao VP, et al. Recombinant adeno-associated virus vector for gene transfer to the transplanted rat heart [J]. Transpl Int, 2007, 20(6): 550 - 557
- 13 Tsai MT, Chen SL, Chen PI. Inducible adeno-associated virus vector delivered transgene expression in corneal endothelium [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43: 752 - 757
- 14 周炼红, 邢怡桥, 汪道文. 重组腺相关病毒介导的报告基因在角膜内皮细胞中的表达 [J]. 眼科研究, 2006, 24: 169 - 173

(收稿:2009-12-13 修回:2009-03-25)

(本文编辑:高红)

消息

中华临床医师杂志(电子版)征稿、征订启事

由中华人民共和国卫生部主管,中华医学会主办,中华医学电子音像出版社出版的中华临床医师杂志(电子版)ISSN 1674-0785 CN 11-9147/R 于 2007 年正式创刊,月刊,以光盘附纸质导读形式面向全国公开发刊,邮发代号:80-728。本刊为《万方数据——数字化期刊群》全文上网期刊,《中国核心期刊(遴选)数据库》《中文科技期刊数据库(全文版)》《中国学术期刊网络出版总库》收录期刊。

主要栏目:述评、专家笔谈、临床研究、实验研究、综述、临床经验、病例报告等。本刊特色栏目:(1)讲座(视频);(2)外科手术案例分析(视频);(3)影像及电生理诊断典型图像分析(动态图像)。欢迎投稿!

2009 年度,本刊将陆续刊出 24 个重点栏目,每期包含 5~10 个精品视频。同时,本刊特别邀请北京大学第一医院录制病例讨论系列视频。其内容详实,图像清晰,全部由临床一线名家主讲,是广大临床医师难得的学习资料。欢迎订阅!

投稿邮箱:北京市 100035-50 信箱 编辑部收 邮编 100035

电子邮件:Lcdoctor@163.com

电话:010-62219211

传真:010-62234701

网址:www.clinicmed.net

(中华临床医师杂志编辑部)