重组腺病毒介导人肝细胞生长因子在病理性瘢痕基因治疗研究中的应用*

哈小琴 苑 宾 李元敏 劳妙芬 吴祖泽**
(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 采用细胞内质粒 DNA 同源重组方法, 将人肝细胞生长因子基因构建于 E1, E3 区缺失的复制缺陷型 5 型腺病毒载体上, 获得携带人肝细胞生长因子基因(*HGF*)的重组腺病毒 Ad-*HGF*. 在 293 细胞中扩增后用氯化铯密度梯度离心法扩增制备 Ad-*HGF* 和 Ad-*GFP*(携带绿色荧光蛋白报告基因的重组腺病毒), 然后, 用 Ad-*GFP* 和 Ad-*HGF* 体外分别转染原代培养的兔耳瘢痕成纤维细胞, 观察体外转染效率及表达, 并以新西兰兔耳瘢痕为体内模型, 观察局部瘢痕组织中一次性注射 Ad-*HGF* 后对已形成瘢痕的治疗作用. 结果显示: (ⅰ) Ad-*GFP* 感染原代培养兔瘢痕成纤维细胞后, 3 d 时转染效率为 (36.8 ± 14.1)%, 并持续表达 20 d 以上. (ⅱ) 用 ELISA 方法检测 Ad-*HGF* 感染原代培养兔瘢痕成纤维细胞后 HGF 的表达, 结果感染后 3 d 表达量约为 76 ng/4.0×10^5 细胞. (ⅲ) 用兔耳瘢痕模型观察在瘢痕内注射不同剂量(8.6×10^9, 8.6×10^8, 8.6×10^7, 8.6×10^6 pfu) 的 Ad-*HGF*, 于注射后第 32 天肉眼可见 Ad-*HGF* 治疗组瘢痕较治疗前明显缩小、变薄, 甚至与周围皮肤在同一水平. 这一效应呈剂量依赖性: 大、中剂量组(8.6×10^9, 8.6×10^8 pfu)治疗前后瘢痕肥大指数的减少有统计学意义($P < 0.05$), 尚可见不同程度再生的丛状新生毛, 低剂量组(8.6×10^7, 8.6×10^6 pfu)治疗后瘢痕肥大指数有减小但无统计学意义, 对照组多数瘢痕大小无明显变化. 光学显微镜观察组织切片显示, 治疗组真皮中纤维组织明显少于对照组, 并可见毛囊及皮脂腺的存在; 天狼猩红染色显示大剂量组创口中胶原纤维薄且稀少, 而低剂量组和对照组创口中仍有丰富的大而粗的Ⅰ型胶原. (ⅳ)治疗兔体内未检测到抗 HGF 抗体的存在. (ⅴ) 局部应用 Ad-*HGF* 所介导的基因只在局部表达, 不累及远隔的器官和组织, 也未见任何毒副作用. 结果提示, 以腺病毒介导人肝细胞生长因子基因治疗病理性瘢痕在整形外科中具有一定的应用前景.

关键词 病理性瘢痕 肝细胞生长因子 基因治疗 腺病毒载体

病理性瘢痕是创伤修复过程中的一种重要并发症, 常见于深度灼伤、某些手术切口及其他损伤皮肤的创伤愈合后, 除外观畸形、疼痛、瘙痒外, 亦可因瘢痕挛缩导致生理功能障碍. 其组织学特点为细胞外基质中大量胶原、蛋白多糖和糖蛋白沉积, 胶原纤维排列紊乱[1]. 目前, 其病因及形成机制尚未完全阐明, 虽有多种学说或解释, 但均未得到公认. 其治疗也颇为棘手, 迄今尚无普遍有效的药物或其他有效方法问世, 当前主要借助于手术、加压、冷冻等方法,

2002-07-09 收稿, 2002-09-10 收修改稿
* 国家"863"高技术发展计划资助项目(批准号: 2001AA217061)
** 联系人, E-mail: wuct@nci.bmi.ac.cn

但均不理想. 近年来, 随着细胞生物学和分子生物学在瘢痕形成机制方面研究的深入, 对修复细胞、细胞外基质及细胞因子有了进一步的认识. 修复细胞(主要是成纤维细胞)的大量增殖与凋亡抑制、细胞外基质中胶原合成与降解间失衡、部分细胞因子的大量产生, 这三者的共同作用构成了病理性瘢痕的生物学基础[2]. 应用生物学治疗对瘢痕形成的某些环节进行干预, 为从根本上防治病理性瘢痕提供了可能性.

HGF 是一多功能的生长因子, 不仅刺激皮肤微血管内皮细胞增殖、运动, 而且可促进皮肤角质细胞的迁移运动[3]. 另外, 有报道表明 HGF 能够明显地抑制肝纤维性组织中 TGF-β的产生和增强胶原酶的活性[4]. 我们认为外源性 HGF 的应用可能会促进伤口愈合, 抑制胶原的合成和沉积, 增强伤口中胶原蛋白的降解. 基于此, 本研究构建了携带人肝细胞生长因子基因的重组腺病毒(Ad-*HGF*), 以新西兰兔耳瘢痕为模型, 进行应用 Ad-*HGF* 基因治疗瘢痕的体内外实验, 旨在探索 HGF 是否对已形成的瘢痕有治疗作用.

1 材料与方法

1.1 材料

新西兰雌性大白兔由军事医学科学院动物实验中心提供. DMEM 和胎牛血清购自 GIBCO 公司. 鼠抗人 HGF 单克隆抗体及重组人 HGF 蛋白纯品购自 R&D 公司. 羊抗鼠 IgG-HRP 为 Jackson 公司产品. 稳定表达 HGF 的工程细胞 CHO 细胞由本室建立. 携带绿色荧光蛋白基因的重组腺病毒 Ad-*GFP*, 含有 CMV 启动子, PolyA 信号以及腺病毒基因组左端序列的穿梭质粒 pXCJL1-CMV/pA 及含有 E1, E3 区及包装信号区缺失的复制缺陷型 5 型腺病毒基因组的质粒 GT4050 均由美国百特医疗用品公司基因治疗部提供. 293 细胞系购自 ATCC 公司. 所用主要仪器有 IX70 倒置显微镜、生物光学显微镜、偏振光显微镜、酶联检测仪、0 ~ 125 mm 游标卡尺和紫外分光光度仪.

1.2 方法

1.2.1 携带人肝细胞生长因子基因的重组腺病毒(Ad-*HGF*)的构建与制备 将 HGF cDNA 克隆至 pXCJL1-CMV/pA 载体的 *Hind*Ⅲ和 *Not*Ⅰ位点之间, 从而获得携带人肝细胞生长因子基因表达盒以及腺病毒基因组左端序列的穿梭质粒(pXCJL1-CMV/pA-*HGF*). 然后用 LipofectAMIN 介导 pXCJL1-CMV/PA- *HGF* 和 GT4050 共转染 293 细胞, 当出现明显细胞病变效应(CPE)后, 用噬斑分析法筛选单克隆重组腺病毒, PCR 法鉴定阳性重组腺病毒, 并将其在 293 细胞中扩增后用氯化铯密度梯度离心法纯化. 通过测定 260 和 280 nm 光吸收、快速 CPE 分析及噬斑分析确定病毒的纯度和感染滴度.

1.2.2 重组腺病毒感染原代培养的兔耳瘢痕成纤维细胞后转染效率及 HGF 表达的检测

(1) 原代兔耳瘢痕成纤维细胞培养: 在无菌条件下, 切取兔耳局部皮肤切除后已形成瘢痕的组织, 经修除表皮及皮下组织后, 在一小瓶中反复剪切成 0.5 ~ 1.0 mm^3 的细小组织块. 将这些组织块接种于培养瓶壁上, 各组织块间距约 3 mm; 加入含 20%胎牛血清的 DMEM 培养液 5 mL, 置 37℃, 5% CO_2 的培养箱中; 培养 2 ~ 3 d 后, 换新鲜培养液. 以后每 3 ~ 5 天换液 1 次, 待原代培养的成纤维细胞长满瓶壁后用 0.25%胰蛋白酶消化传代.

(2) 重组腺病毒对原代兔耳瘢痕成纤维细胞转染效率的检测: 将原代培养兔耳瘢痕成

纤维细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔 2.0×10^5 个. 培养 24 h 后, 以 50 pfu/细胞的 MOI 感染 Ad-*GFP* 病毒. 感染 48 h 时, 在荧光显微镜下观察并检测转染阳性率.

(3) 原代培养兔耳瘢痕成纤维细胞感染 Ad-*HGF* 后 HGF 表达的检测: 将原代培养人瘢痕成纤维细胞接种于6孔细胞培养板中, 每孔 4.0×10^5 个, 24 h后吸出原培养液, 加入 Ad-*HG*F 的病毒稀释液 2 mL (50 MOI), 以 DMEM 稀释的 Ad-*GFP* 和 DMEM 作为对照; 感染 48 h时, 收集细胞培养上清, 用 ELISA 方法检测 HGF 水平. 一抗为鼠抗人 HGF 单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG, 显色底物为 OPD. 同时用重组人 HGF 蛋白纯品做一标准曲线, 以此计算 HGF 的表达量.

1.2.3　Ad-*HGF* 对兔耳瘢痕的治疗效果评价　选用 2.5 kg 左右健康的雌性新西兰大白兔 16 只, 戊巴比妥钠腹腔麻醉(50 mg/kg), 参照文献[5]在双耳腹侧以无菌手术方法切除圆形全层皮肤直至软骨, 切口直径 0.7 cm, 每侧耳 5 个. 于第 21 天用游标卡尺测量每个创口表面直至背侧皮肤厚度及其临近无创伤处厚度, 并以创口厚度大于临近皮肤厚度 2 倍者定义为瘢痕, 共有 60 个, 形成瘢痕率为 37.5% (60/160). 计算每个瘢痕的肥大指数(hypertrophic index, HI, HI = 愈合创面全层厚度/临近皮肤全层厚度). 依据 HI 将已形成的瘢痕随机分为 4 个 Ad-*HGF* 治疗组及 1 个 Ad-*GFP* 对照组: Ad-*HGF* 8.6×10^9 组(13, 14, 15, 16 号兔)、Ad-*HGF* 8.6×10^8 组(4, 5, 8 号兔)、Ad-*HGF* 8.6×10^7 组(1, 6, 10 号兔)、Ad-*HGF* 8.6×10^6 组(3, 7, 9 号兔)、Ad-*GFP* 8.6×10^9 组(2, 11, 12 号兔). 然后每个瘢痕用 25 μL 微量注射器注射不同剂量的 Ad-*HGF* 或 Ad-*GFP*. 注射重组腺病毒后第 32 天, 用游标卡尺再次测量每个创口全层厚度及其临近无创伤处皮肤全层厚度, 计算肥大指数, 同时将创面及其临近无创伤处皮肤全层一并切下, 10%福尔马林固定, 做常规石蜡切片, 行 H.E.染色, 光学显微镜下观察. 同时用 0.1%苦味酸天狼猩红溶液染色, 偏振光显微镜下观察胶原及其类型.

1.2.4　兔血中 HGF 及抗 HGF 抗体的检测　在局部瘢痕组织内注射 Ad-*HGF* 后第 5, 15 和 32 天, 从所有兔心脏采血并用 ELISA 方法检测血中 HGF 及其抗体的水平. 一抗为鼠抗人 HGF 单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, 抗原为稳定表达 HGF 的工程细胞 CHO 细胞的培养上清, 显色系底物为 OPD. 用酶标检测仪测 $A_{490\ nm}$ 值.

1.2.5　主要脏器组织的形态学改变　在局部瘢痕组织内注射重组腺病毒后第32天, 处死兔子, 取心、肝、脾、肺、肾及卵巢做组织切片进行病理学观察.

2　结果

2.1　重组腺病毒结构与病毒滴度

采用细胞内质粒 DNA 同源重组法将 HGF cDNA 构建于 E1, E3 区缺失的复制缺陷型 5 型腺病毒载体上, 获得了携带人肝细胞生长因子基因的重组腺病毒 Ad-*HGF*, 其结构见图 1(正申请中国专利)[1)]. Ad-*HGF* 及 Ad-*GFP* 经在 293 细胞中扩增后用氯化铯密度梯度离心法纯化病毒, 通过测定 260, 280 nm 光吸收、快速 CPE 分析及噬斑分析确定病毒纯度($A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$)和感染滴度(pfu/mL), 所得

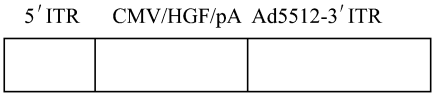


图 1　重组腺病毒 Ad-*HGF* 结构示意图

1) 哈小琴, 吴祖泽, 郭树华. 一种重组腺病毒及其在纤维性疾病防治中的应用. 专利申请号: 00100739.4, 公开号: 1307102

Ad-*HGF* 及 Ad-*GFP* 的 $A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$ 比值分别为 1.32 和 1.31, 病毒感染滴度分别为 8.60×10^{10} 和 2.30×10^{10} pfu/mL.

2.2 重组腺病毒对兔耳瘢痕成纤维细胞的转染效率

以 50 MOI Ad-*GFP* 感染原代培养兔耳瘢痕成纤维细胞, 感染后 48 h 即可在荧光显微镜下观察到 GFP 阳性表达的细胞, 且随时间的推移, 阳性细胞比例逐渐增多, GFP 表达量也升高, 3 d 时达高峰, 此时的重组腺病毒转染效率为(36.8 ± 14.1)%. 至 20 d 时仍可见少量 GFP 表达阳性的细胞. 以此类推, 重组腺病毒介导的 *HGF* 基因的转染效率与此相仿.

2.3 重组腺病毒介导的人 *HGF* 基因在原代培养兔耳瘢痕成纤维细胞中的表达

用 ELISA 方法检测 Ad-*HGF* 感染原代培养兔耳瘢痕成纤维细胞后 HGF 的表达, 结果感染后 72 h 表达达高峰, 表达量约为 76 ng/4.0×10^5 细胞; 至 96 h 时仍有较高的表达(约 34 ng/ 4.0×10^5 细胞), 说明 Ad-*HGF* 介导的人 *HGF* 基因可在原代培养兔耳瘢痕成纤维细胞中高效表达.

2.4 重组腺病毒介导的人 *HGF* 基因对兔耳瘢痕的治疗作用

各组瘢痕注射不同剂量的 Ad-*HGF* 或 Ad-*GFP* 后第 32 天肉眼可见治疗组瘢痕较治疗前明显减小或其高度与周围皮肤在同一水平, 而对照组多数大小无明显变化, 有的甚至更高, 光学显微镜观察显示, 治疗组真皮纤维组织明显少于对照组(图版Ⅰ-1, 2, 5, 6, 附本刊后, 下同). 将各创口治疗前后肥大指数进行比较, Ad-*HGF* 8.6×10^9 组和 Ad-*HGF* 8.6×10^8 组与 Ad-*GFP* 8.6×10^9 组比较均有明显差异($P < 0.05$); Ad-*HGF* 8.6×10^7 组和 Ad-*HGF* 8.6×10^6 组治疗后肥大指数较治疗前虽有下降趋势, 但无统计学显著意义($P > 0.05$); 对照组(Ad-*GFP* 8.6×10^9 组)治疗前后的肥大指数亦无明显变化 ($P > 0.05$)(表 1).

表 1 Ad-*HGF* 治疗瘢痕前后的肥大指数

组别	每组瘢痕注射剂量 /pfu	*n*	肥大指数 a)		*P*
			治疗前	治疗后	
Ad-*HGF*	8.6×10^9	14	3.39 ± 0.73	1.12 ± 0.29*	<0.05
Ad-*HGF*	8.6×10^8	13	3.67 ± 0.96	1.12 ± 0.36*	<0.05
Ad-*HGF*	8.6×10^7	10	3.41 ± 0.49	1.97 ± 0.28**	>0.05
Ad-*HGF*	8.6×10^6	13	3.34 ± 0.67	2.01 ± 0.49**	>0.05
Ad-*GFP*	8.6×10^9	9	3.35 ± 0.62	3.13 ± 0.43**	>0.05

a) * 示 $P < 0.05$, 治疗前后有显著性差异; ** 示 $P > 0.05$, 治疗前后无显著性差异

用 Ad-*HGF* 治疗后 32 d, 各剂量组愈合创面均可见不同程度增生的丛状新生毛, 以大剂量组较多, 而对照组仅可见稀疏的新生毛(图版Ⅰ-3, 4), 光学显微镜下可见毛囊及皮脂腺分裂相的存在(图版Ⅰ-7), 表明 HGF 可促进皮肤附属器的再生, 对皮肤功能的恢复有重要意义.

同时, 对组织切片进行了天狼猩红染色, 用偏振光显微镜观察胶原及胶原类型, 结果显示 Ad-*HGF* 8.6×10^9 组创口组织中胶原薄且稀少, 而 Ad-*HGF* 低剂量组和对照组创口组织中仍有丰富的大而粗的红色Ⅰ型胶原(图版Ⅰ-8, 9), 表明 HGF 有明显的减少创口组织中胶原形成的作用.

2.5 不良反应、中和抗体及毒副作用的检测

以 ELISA 方法检测治疗兔体内 HGF 及抗 HGF 抗体的存在情况, 以及通过病理切片观察组织、器官的形态学改变的结果显示: 给予 Ad-*HGF* 重组腺病毒治疗后, 治疗兔血清样品经 ELISA 检测, HGF 水平无明显变化, 与对照组比较无显著差异; 未发现抗 HGF 中和抗体的存

在; 注射局部瘢痕组织早期可出现红肿反应, 但很快消失; 治疗兔心、肝、脾、肺、肾及卵巢组织未发现任何与治疗相关的病理学改变.

3　讨论

皮肤上的病理性瘢痕是整形外科的常见病, 目前临床上还没有应用方便、效果显著、副作用小且复发率低的理想治疗方法. 近些年国内外不少学者逐渐证实了导致瘢痕增生的主要病理改变是发生在转录水平上的大量胶原组织的过量增生和沉积, 致使瘢痕呈现局部隆起、弹性下降、质地坚实的临床特点[6,7], 故抑制过量瘢痕胶原的形成、促使胶原有效地降解是任何成功方法的关键所在.

近年来, 细胞因子治疗病理性瘢痕已有越来越多的探索性研究. 已有研究证实 TGF-β的中和抗体可导致妊娠期子宫的无瘢痕愈合[8]. 在临床上应用中和抗体治疗硬皮病和其他纤维增生性疾病疗效肯定[9]. HGF 在理论上可从多方面促进伤口的有效高质量愈合. 首先, HGF 可刺激血管内皮细胞的迁移、增殖, 形成新生血管, 促进局部血液循环, 从而加速愈合; HGF 可刺激皮肤角质细胞运动、增殖, 加速伤口的再表皮化; HGF 可显著抑制 TGF-β的产生, 而 TGF-β是迄今了解最多的与瘢痕形成最密切相关的细胞因子; 另外, HGF 还可增强胶原酶的活性, 促使多余形成的胶原有效地降解. 实验结果表明, 瘢痕内一次性注射不同剂量的 Ad-*HGF*, 注射后第 32 天肉眼观察可见治疗组瘢痕较治疗前明显减小或与周围皮肤在同一水平, 呈剂量依赖性, 大、中剂量组(8.6×10^9, 8.6×10^8 pfu)治疗前后肥大指数的减少有统计学意义($P < 0.05$), 尚可见不同程度再生的丛状新生毛, 而对照组多数瘢痕大小无明显变化, 有的甚至更高; 光学显微镜观察显示, 治疗组真皮纤维组织明显少于对照组, 并可见毛囊及皮脂腺分裂相的存在; 天狼猩红染色显示大和中剂量组创口中胶原薄且稀少, 而低剂量组和对照组创口中仍有丰富的大而粗的Ⅰ型胶原.

由于腺病毒的高转染效率及转染谱的广泛, 应用腺病毒作为载体介导 *HGF* 基因治疗瘢痕, 效果较应用质粒载体好, 我们的结果也证明了这一点. 重组腺病毒对原代培养兔瘢痕成纤维细胞的转染效率明显高于质粒的转染效率, 质粒对该原代细胞的转染效率极低(<1%), 所以对已增生的瘢痕进行治疗, 采用腺病毒载体是有一定优势的.

结果显示, 利用复制缺陷型腺病毒载体转染 *HGF* 基因于瘢痕成纤维细胞是可行的, 而且靶细胞能够有效地表达目的蛋白. 以新西兰兔耳瘢痕为模型, 观察到局部瘢痕组织中一次性注射 Ad-*HGF* 后对已形成的瘢痕有治疗作用, 而且观察到外源性 HGF 的应用可促进皮肤附器的再生, 对于皮肤功能的恢复有一定的作用. 同时, 研究还显示, 局部应用治疗剂量的重组腺病毒不会引起动物血中 HGF 水平的明显改变, 也未检测到抗 HGF 抗体的存在; HGF 一方面可达到局部定点表达, 起到治疗作用, 但全身重要组织器官未出现炎症反应等不良反应的病理改变. 由此可见, 以腺病毒介导人肝细胞生长因子基因治疗病理性瘢痕在整形外科具有一定的应用前景. 目前的研究进展表明, 生长因子在整形外科中的应用刚刚开始, 但已显示出显而易见的巨大潜力. 相信随着对生长因子研究不断的深入, 整形外科的基因治疗将会有突破性进展.

参 考 文 献

1 Linares H A, Larson D L. Early differential diagnosis between hypertrophic and nonhypertrophic healing. J Invest Dermatol, 1974, 62: 514 ~ 516

2 Hunt T K. Basic principles of wound healing. J Trauma, 1990, 30(12 suppl): S122 ~ S126

3 Matsumoto K, Hashimoto K, Yushikawa K, et al. Marked stimulation of growth factor and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor. Exp Cell Res, 1992, 196: 114 ~ 120

4 Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. Nature Med, 1999, 5: 222 ~ 230

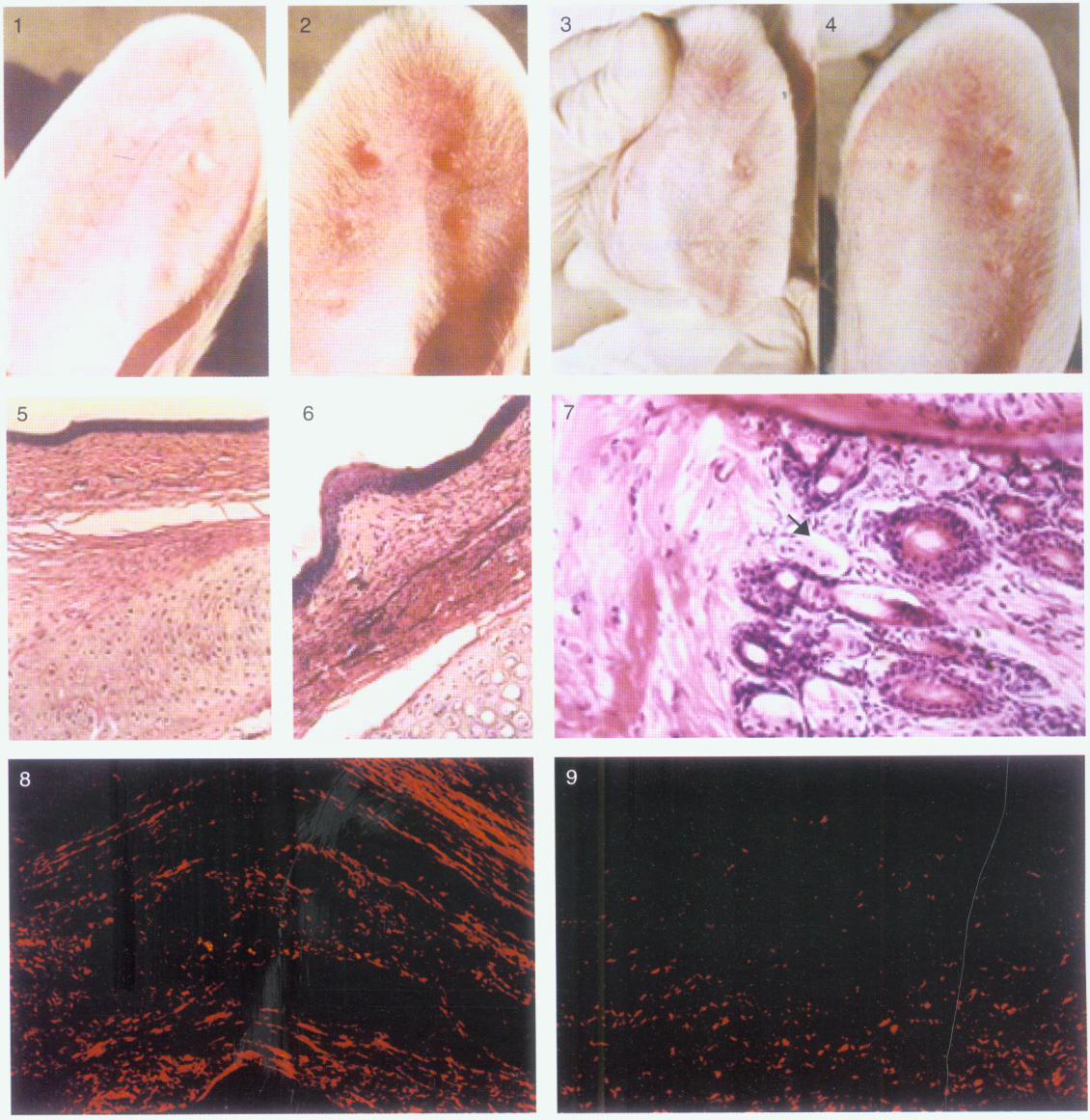
5 Morris D E, Wu L, Zhao L L, et al. Acute and chronic animal model for excessive dermal scarring: quantitative studies. Plast Reconstr Surg, 1997, 100: 674 ~ 681

6 Ghahary A, You J, Nedelec B, et al. Collagenase production is lower in post burn hypertrophic scar fibroblast than in normal fibroblasts and is reduced by insulin-like-growth factor-1. J Invest Dermatol, 1996, 106: 476 ~ 481

7 Lawrence W T, Banes A J. Plastic surgery research. Clin Plast Surg, 1996, 23: 173 ~ 182

8 Krummel T M, Ehrlich H P, Nelson J M, et al. Fetal wounds do not contract in utero. Surg Forum, 1989, 40: 613 ~ 615

9 Younai S, Nichter L S, Wellisz T, et al. Modulation of collagen synthesis by transforming growth factor-β in keloid and hypertrophic scar fibroblasts. Ann Plast Surg, 1994, 33: 148 ~ 151



Ad-*HGF* 对瘢痕的治疗效果. 1, 2, 5 和 6 示治疗后第 32 天的结果: 1 示 Ad-*HGF* 8.6×10^9 组巨检效果，可见瘢痕较治疗前明显减小. 2 示 Ad-*GFP* 8.6×10^9 组巨检效果，瘢痕较治疗前无明显变化. 3 和 4 示 Ad-*HGF* 治疗对毛发再生的影响: 3 示 Ad-*HGF* 8.6×10^9 治疗组，愈后创面可见增生的丛状新生毛. 4 示 Ad-*GFP* 8.6×10^9 组，愈合创面未见明显的新生毛: 5 示 Ad-*HGF* 8.6×10^9 组显微效果(H.E. × 100)，真皮纤维组织明显少于 Ad-*GFP* 8.6×10^9 组. 6 示 Ad-*GFP* 8.6×10^9 组显微效果(H. E. ×100). 7 示 Ad-*HGF* 治疗对毛囊及皮脂腺再生的影响(H. E. ×100)，并可见毛囊分裂相(箭头所示). 8 和 9 示 Ad-*HGF* 治疗已形成瘢痕后 32 d 对组织中胶原的影响（天狼猩红染色，×100): 8 示 Ad-*GFP* 组，观察到丰富的Ⅰ型胶原(红色). 9 示 Ad-*HGF* 组，Ⅰ型胶原明显减少