

携 galectin-7-siRNA 超声纳泡靶向治疗大鼠心脏移植急性排斥反应的实验研究

王 卓 赵冰冰 李守强 于丹丹 赵 晨 姜双全 冷晓萍

摘 要 **目的** 采用超声靶向微泡破坏技术介导 galectin-7-siRNA 转染,抑制大鼠移植心脏 galectin-7 表达,以达到靶向治疗心脏移植后急性排斥反应的目的。**方法** 制备携 galectin-7-siRNA 的 ICAM-1 靶向纳泡;构建大鼠同系移植 (ISO) 及异系移植 (ALLO) 心脏模型,并分为 4 组:ISO+磷酸盐缓冲液 (PBS) 组、ALLO+PBS+低功率聚焦超声 (LIFU) 组、ALLO+微泡 (NBs) 组及 ALLO+NBs+LIFU 组。于移植后第 1、3、5、7 天分别行超声靶向微泡定位释放治疗,治疗后取材比较各组心脏 galectin-7 表达及急性排斥反应分级。**结果** 制备的纳泡平均粒径 (221.25±34.21) nm, 平均电位 (51.32±2.21) mV; galectin-7-siRNA 携带率 71.0%。ALLO+NBs+LIFU 组 galectin-7 蛋白表达均低于 ALLO+PBS+LIFU 组和 ALLO+NBs 组 (均 $P<0.05$), ALLO+NBs+LIFU 组急性排斥反应分级均明显低于 ALLO+PBS+LIFU 组及 ALLO+NBs 组 (均 $P<0.05$)。**结论** 超声引导下携 galectin-7-siRNA 靶向微泡爆破治疗能降低大鼠移植心脏 galectin-7 表达,抑制急性排斥反应发生。

关键词 超声;靶向纳泡;心脏移植;基因治疗

[中图分类号] R445.1

[文献标识码] A

Experimental study of ultrasonic-targeted nanobubbles loading galectin-7-siRNA for inhibiting the acute rejection of rat transplantation hearts

WANG Zhuo, ZHAO Bingbing, LI Shouqiang, YU Dandan, ZHAO Chen, JIANG Shuangquan, LENG Xiaoping

Department of Ultrasound Medicine, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, China

ABSTRACT Objective To inhibit the expression of galectin-7 and the occurrence of acute rejection after transplantation using galectin-7-siRNA-loaded nanobubbles combined with ultrasound-targeted microbubbles destruction (UTMD) technology. **Methods** The galectin-7-siRNA-loaded and targeted ICAM-1 nanobubbles were prepared and the rat heart transplantation model was constructed. Isograft (ISO) and Allograft (ALLO) of rat heart models were constructed and divided into 4 groups, including ISO+PBS group, ALLO+PBS+LIFU group, ALLO+NBs group and ALLO+NBs+LIFU group. UTMD were performed at 1, 3, 5, 7 d after transplantation. In addition, the galectin-7 expression and acute rejection grading in each group of transplanted hearts were compared. **Results** The average particle size of NBs was (221.25±34.21) nm and the average potential was (51.32±2.21) mV. The carrying rate of galectin-7-siRNA was 71.0%. The expression of galectin-7 protein in the ALLO+NBs+LIFU group was lower than that in ALLO+PBS+LIFU group and ALLO+NBs group (both $P<0.05$), and the level of acute rejection was significantly lower in the ALLO+NBs+LIFU group than that in the ALLO+PBS+LIFU group and ALLO+NBs group (both $P<0.05$). **Conclusion** The galectin-7-siRNA-loaded targeted NBs combined with UTMD can reduce the expression of galectin-7 in the transplanted heart of rats and inhibit the occurrence of acute graft rejection.

KEY WORDS Ultrasound; Targeted nanobubble; Heart transplantation; Gene therapy

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81971626);国家自然科学基金青年科学基金项目(81701707);黑龙江省自然科学基金杰出青年项目(JQ2019H001)

作者单位:150081 哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第二医院超声医学科(王卓、李守强、于丹丹、赵晨、姜双全、冷晓萍);黑龙江中医药大学附属第二医院超声科(赵冰冰)

通讯作者:冷晓萍, Email: xpleng@ems.hrbmu.edu.cn

随着心脏移植术手术方式的不断改进及免疫抑制剂的发展和运用,心脏移植已逐渐成为治疗终末期心力衰竭的有效方法。然而,由 T-细胞介导主导的急性排斥反应仍是影响移植患者心脏功能和长期存活的重要因素之一^[1]。T 细胞活化和细胞因子的产生是移植排斥反应的中心环节。探索移植排斥反应的免疫机制、寻找新的阻断排斥反应的作用位点是抑制急性排斥反应的重要途径^[2-3]。研究^[4]表明,半乳糖凝集素-7(galectin-7)特异性表达于移植器官的血管内皮细胞及浸润淋巴细胞表面,可以促进 T 细胞的分化和增殖,进而发生移植排斥反应。因此,通过抑制 galectin-7 蛋白的表达有可能抑制移植后急性排斥反应。本实验拟建立大鼠心脏移植急性排斥反应模型,以发生排斥反应心肌大量表达的血管内皮细胞表面黏附因子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)作为靶点,利用 ICAM-1 靶向阳离子超声纳泡(chronic nanobubbles, CNBs)作为 galectin-7-siRNA 的载体,通过超声靶向微泡定位释放(ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD)技术,即使用低强度聚焦超声(low intensity focused ultrasound, LIFU)辐照靶向纳泡,使其靶向释放 galectin-7-siRNA,介导 siRNA 下调 galectin-7 的表达从而达到抑制急性排斥反应的目的,实现心脏移植急性排斥反应的靶向治疗。

材料与方法

一、实验动物及心脏模型制备

1. 实验动物:雄性 Lewis 大鼠 60 只,体质量 180~200 g;雄性 Brown Norway 大鼠 36 只,体质量 180~200 g。均购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

2. 模型制备及分组:采用改良的 Ono 术式行大鼠异位心脏移植术,将供体的升主动脉和肺动脉分别与受体的腹主动脉和下腔静脉吻合,制备心脏移植模型。以雄性 Lewis 大鼠作为心脏受体, Lewis 大鼠作为心脏供体构建同系移植 ISO 组($n=12$), Brown Norway 大鼠作为心脏供体构建异系移植 ALLO 组,共 36 只,随机将其分为 ALLO+磷酸盐缓冲液(PBS)+LIFU 组、ALLO+微泡(NBs)组及 ALLO+Nbs+LIFU 组,每组各 12 只。

二、实验主要试剂和仪器

1. 主要试剂:二硬脂酰磷脂酰胆碱(PSPC, 美国 Avanti 公司);二硬脂酰磷脂酰乙醇胺聚乙二醇 2000-生物素(PSPE-PEG-2000-biotin, 美国 Avanti 公司);链霉亲和素(美国 Sigma 公司);小鼠抗大鼠 ICAM-1 抗体

(美国 Abcam 公司);生物素化小鼠抗大鼠 ICAM-1 抗体(美国 Abcam 公司);FAM-Galectin-7-siRNA(江苏吉马基因股份有限公司);APC 标记的兔抗小鼠荧光二抗;苏木素-伊红染料;DAB 显色剂(美国 RD 公司);抗荧光淬灭剂(上海碧云天生物技术有限公司);全氟丙烷气体(天津核工业厂);液氮(哈尔滨黎明气体厂)

2. 仪器与设备:使用 Philips iE Elite 彩色多普勒超声诊断仪,超净工作台(苏州净化设备厂);光学显微镜(日本 Olympus 公司);手术显微镜(日本 Olympus 公司);精密电子天平(日本岛津公司);荧光显微镜(德国 Lecia 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);库尔特颗粒计数仪(美国 Beckman Coulter 公司);银汞振荡仪(广东佛山斯凯斯医疗器械公司);LIFU 实验装置(重庆融海超声医学工程研究中心);Nano-ZS 90 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(英国马尔文仪器有限公司)。

三、靶向超声纳泡构建

携 galectin-7-siRNA 靶向纳泡的构建采用薄膜-水化法制备超声纳泡,分别取 PSPC 10 mg、DSPE-PEG-2000-biotin 4 mg 及 DC-chol 1 mg,加入 450 μ l 去离子水和 50 μ l 甘油充分混匀,置于 40 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 10 min,转移至充满全氟丙烷气体的特制管型瓶中,使用银汞振荡仪振荡 50 s(频率 600 次/min),静置后加入稀释并离心,所得上层的乳白色悬浮带即为脂质阳离子纳泡;并将其浓度稀释为 1.0×10^7 NBs/ml,加入 6 μ g 链霉亲和素于 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,并离心 2 次,去除过量的链霉亲和素。再加入 6 μ g 生物素化的 ICAM-1 抗体,于 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,离心 2 次,去除过量的 ICAM-1 抗体,即得到携 ICAM-1 抗体的靶向阳离子纳泡(NB_{ICAM-1})^[5]。显微镜观察纳泡的形态,使用纳米粒度及电位分析仪检测纳泡的粒径和表面电位。

将 NB_{ICAM-1} 与绿色荧光标记的大鼠 galectin-7-siRNA 按照荷电比 1:2~2:1 的不同比例混合,室温孵育 30 min,通过静电吸附作用得到 galectin-7-siRNA/ NB_{ICAM-1} ,离心 2 次,去除过量的 siRNA。应用红色荧光标记的二抗与 galectin-7-siRNA/ NB_{ICAM-1} 孵育,使其与 ICAM-1 抗体结合,并在荧光显微镜下观察 siRNA 及 ICAM-1 与纳泡连接的情况,流式细胞仪检测 siRNA 及 NB_{ICAM-1} 连接率^[6]。

四、UTMD 介导载基因靶向纳泡治疗心脏移植排斥反应

ISO 组和 ALLO 组大鼠于术后第 1、3、5、7 天分别经鼠尾静脉注射靶向纳泡(浓度 1×10^7 NBs/ml) 400 μ l 或等剂量的 PBS,随即用 2 ml 生理盐水冲管,注射 30 s

后,使用LIFU实验装置对移植心脏进行靶向爆破,频率1 MHz,功率2.0 W/cm²,占空比50%,使用超声诊断仪造影模式于胸骨旁乳头肌水平短轴持续观察,至心肌内纳泡显影完全消失时停止LIFU爆破。

五、病理学检测

于心脏移植后第10天处死大鼠并摘取供心标本,用4%福尔马林固定24 h,梯度酒精脱水、二甲苯透明,进行石蜡包埋并切片(厚度6 μm),行HE染色,光镜下观察心肌的病理学改变。排斥反应的病理学分级依照国际心肺移植协会(ISHLT)制定的标准^[7]:0级,正常心肌;I级,排斥反应表现为少量淋巴细胞浸润,无心肌坏死;II级,排斥反应表现为中等量淋巴细胞浸润伴少量心肌坏死;III级,排斥反应表现为弥漫型淋巴细胞浸润伴中等量心肌坏死;IV级,排斥反应表现为弥漫型淋巴细胞浸润伴严重心肌坏死。

另取切片行免疫组化染色,用抗大鼠的galectin-7抗体(0.5 mg/ml)孵育于4℃过夜,链亲和素-辣根过氧化物酶室温孵育30 min,应用DAB显色剂进行显色,并在显微镜下观察galectin-7的分布及表达程度,使用Image Pro Plus软件分析galectin-7表达情况。

六、统计学处理

应用SPSS 19.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用单因素方差分析;病理等级比较行K独立样本检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、siRNA/NBs的表征及基因携带能力检测

纳泡在光镜下显示为均匀分布的球形(图1A),平均粒径(221.25±34.21)nm(图1B),其Zeta电位(51.32±2.21)mV(图1C)。荧光显微镜下观察显示靶向纳泡表面携带抗ICAM-1为红色荧光,siRNA为绿色荧光(图2)。流式细胞仪检测结果显示,同时携带ICAM抗体和galectin-7-siRNA的微泡所占百分比为71%(图3)。

二、免疫组化检测UTMD体内转染效率

免疫组化结果显示,ALLO+PBS+LIFU组和ALLO+NBs组均可观察到心肌组织内galectin-7大量表达,ALLO+NBs+LIFU组中galectin-7阳性细胞数量显著减少,galectin-7表达水平减低,与ALLO+NBs组和ALLO+PBS+LIFU组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图4,5。

三、移植心脏排斥反应分级

ALLO+PBS+LIFU组和ALLO+NBs组的大鼠供体心脏切片均可观察到心肌及心内膜中有大量淋巴细胞浸润,心肌细胞凝结坏死,心肌间质内大量红细胞聚集,符合ISHLT III~IV级。与ALLO+PBS+LIFU组和ALLO+NBs组比较,ALLO+NBs+LIFU组显示免疫排斥反应相对较弱,仅2只符合排斥反应III级,其余10只均表现为血管病变较局限,心肌内仅出现少量坏死,

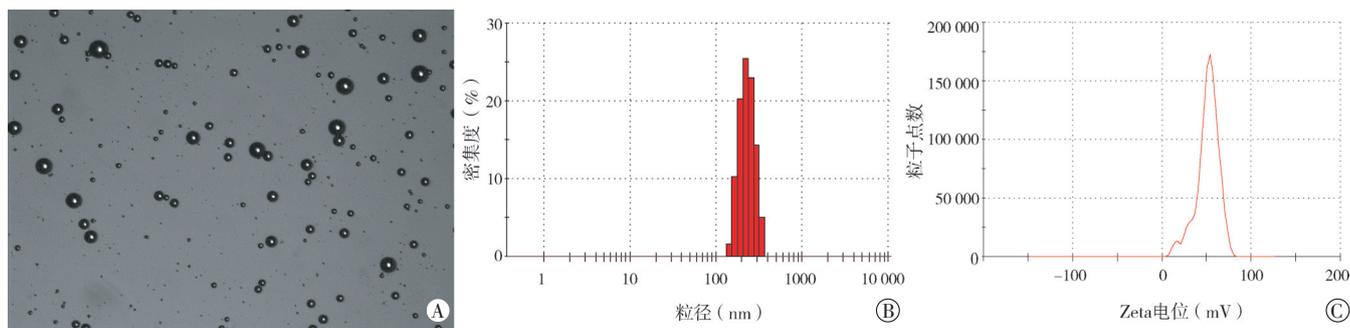


图1 靶向纳泡特性检测图

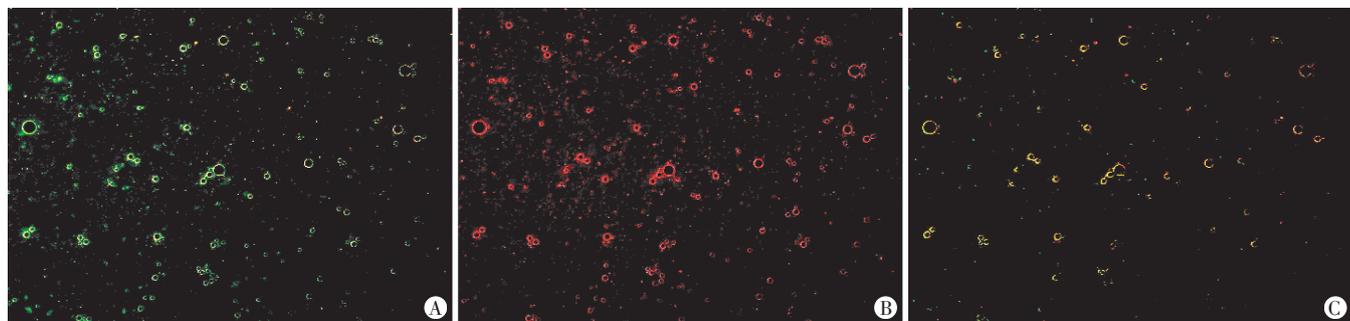
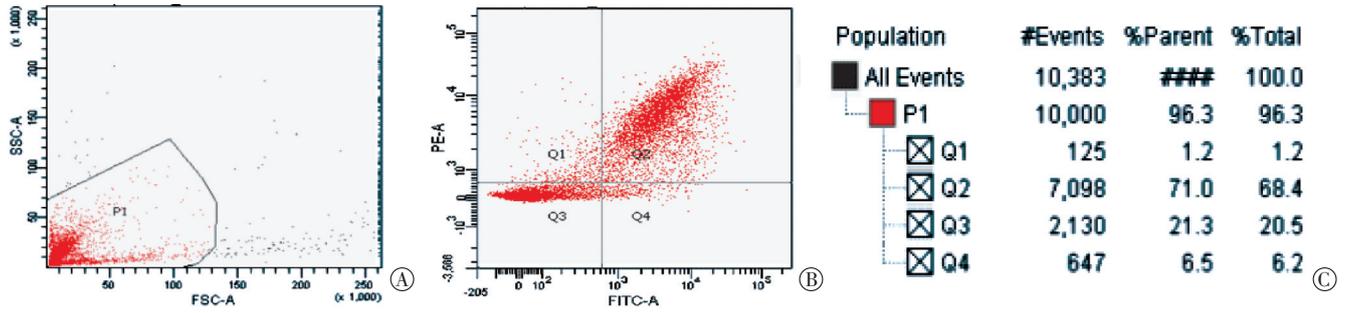
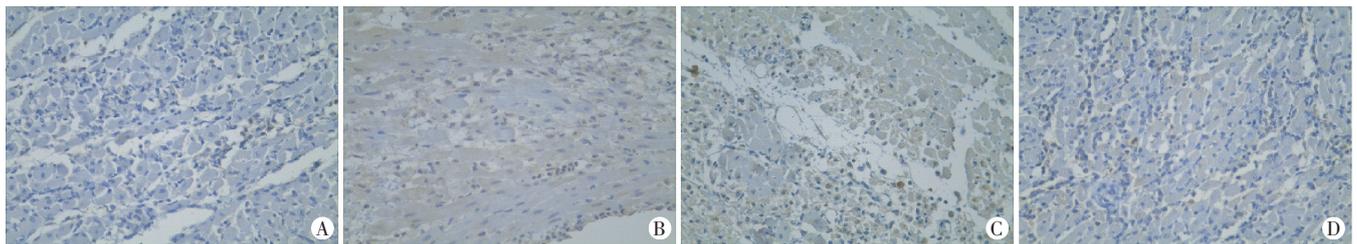


图2 携galectin-7-siRNA靶向纳泡特性检测图



A、B:同时携带 galectin-7-siRNA 和 ICAM-1 抗体的微泡所占百分比为 71.0%; C: Q2 区为同时携带 ICAM-1 抗体及 galectin-7-siRNA 的纳泡数量

图3 靶向纳泡与 galectin-7-siRNA 和 ICAM 抗体的连接率



A: ISO+PBS 组; B: ALLO+PBS+LIFU 组; C: ALLO+NBs 组; D: ALLO+NBs+LIFU 组

图4 免疫组化检测各组大鼠移植心脏内 galectin-7 表达(×400)

淋巴细胞浸润多见于心内膜,但数量明显减少,符合 ISHLT I ~ II 级(图6),与 ALLO+NBs 组及 ALLO+PBS+LIFU 组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图7。

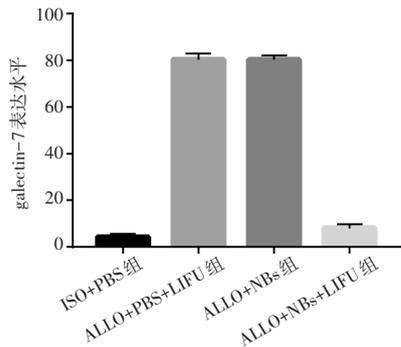


图5 各组大鼠移植心脏 galectin-7 表达水平比较

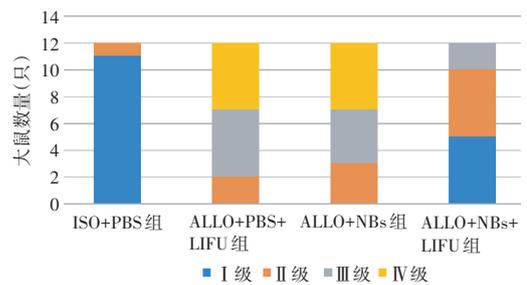
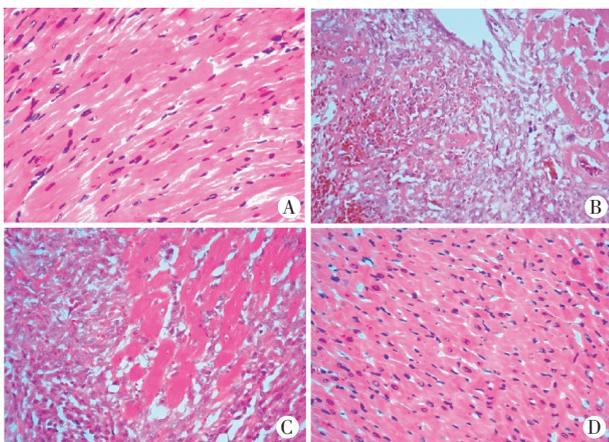


图7 各组大鼠移植心脏急性排斥反应分级图

讨论

心脏移植后,早期发现和及时治疗急性排斥反应对于患者的远期存活至关重要。目前的免疫抑制疗法主要使用小分子药物,但由于其半衰期短,对细胞特异性不足,长期使用易导致全身免疫系统失衡,造成感染及肿瘤等并发症。因此,临床上迫切需要一种克服小分子药物上述缺陷的新的治疗方法。siRNA 体积小,易于包被成为抑制细胞中 mRNA 表达的有效方法,但存在在生物体内不稳定,易被核酸降解,半衰期短,转染效率低的问题,因此需要基因载体使目的基因运送至靶细胞^[8-9]。病毒是基因传递最常用的载体,病毒载体虽然具有较高的基因转染效率,但因存在毒性和免疫原性等问题其应用受限。本实验采用 UTMD 技术,利用超声纳泡这种安全、便捷的非病毒载体载入 siRNA,靶向释放基因^[10]。

研究^[11-12]表明,galectin-7 蛋白特异性表达在移植器官的血管内皮细胞和浸润淋巴细胞表面,并与细胞



A: ISO+PBS 组; B: ALLO+PBS+LIFU 组; C: ALLO+NBs 组; D: ALLO+NBs+LIFU 组

图6 HE 染色检测各组大鼠移植心脏急性排斥反应程度(×400)

的凋亡和增殖有关。在T细胞介导的急性排斥反应中, Th1型细胞因子可以诱发迟发型变态反应, 启动或加速器官移植排斥反应的发生发展; Th2型细胞因子可抑制Th1细胞的分化和Th1型细胞因子的表达, 调节免疫排斥反应, 促进器官移植免疫耐受的建立。galectin-7对T淋巴细胞具有促进增殖及诱导Th1/Th2细胞平衡向Th1细胞优势应答偏移的作用, 从而诱导移植排斥反应发生。另有研究^[11]表明, galectin-7可以与抗CD3/CD28抗体活化的T细胞中的pSmad3蛋白相互作用, 并诱导pSmad3蛋白向胞浆转位, 表明galectin-7有阻断活化的T淋巴细胞TGFβ/Smad信号通路的作用; 由此也反映通过抑制galectin-7在活化的CD4⁺T细胞中的表达有可能抑制急性排斥反应的发生。本实验中, ALLO+PBS+LIFU组和ALLO+NBs组心肌组织内见大量galectin-7表达, 而当使用NBs+LIFU成功抑制异系移植大鼠galectin-7表达量后, 急性排斥反应的程度明显减弱, 证明在急性排斥反应的早期抑制galectin-7蛋白表达, 可以达到抑制急性排斥反应的效果, 也说明galectin-7有望成为急性排斥基因治疗的全新靶点。

本实验使用了ICAM-1靶向纳泡, 使其能够聚集在急性排斥反应发生区域, 同时使用UTMD提高siRNA转染效率, 通过UTMD产生的声孔效应, 使siRNA直接进入细胞内, 实现溶酶体逃逸, 从而提高基因敲除效率^[13]。本实验结果显示, ALLO+PBS+LIFU组、ALLO+NBs组及ALLO+NBs+LIFU组比较, 前两组galectin-7表达量基本相似, 而ALLO+NBs+LIFU组galectin-7蛋白表达量明显减低(均 $P<0.05$), 说明靶向ICAM-1的纳泡能够有效地将galectin-7-siRNA转运到大鼠心肌组织细胞中, 并能成功减低galectin-7表达, 证明UTMD技术结合siRNA靶向基因敲除具有较高效率。

综上所述, 本实验通过UTMD结合ICAM-1靶向纳泡, 成功实现galectin-7-siRNA的体内转染, 并通过抑制galectin-7蛋白的表达减轻了移植后急性排斥反应, 证明UTMD结合galectin-7-siRNA基因转染有望成为治疗心脏移植后急性排斥反应的一种新方法。

参考文献

- [1] Olymbios M, Kwiecinski J, Berman DS, et al. Imaging in heart transplant patients [J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2018, 11(10): 1514-1530.
- [2] Wang CY, Naka Y, Liao H, et al. Cardiac graft intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and interleukin-1 expression mediate primary isograft failure and induction of ICAM-1 in organs remote from the site of transplantation [J]. Circ Res, 1998, 82(7): 762-772.
- [3] Liu J, Chen Y, Wang G, et al. Improving acute cardiac transplantation rejection therapy using ultrasound-targeted FK506-loaded microbubbles in rats [J]. Biomater Sci, 2019, 7(9): 3729-3740.
- [4] Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(5): 338-352.
- [5] Yan P, Chen KJ, Wu J, et al. The use of MMP2 antibody-conjugated cationic microbubble to target the ischemic myocardium, enhance Timp3 gene transfection and improve cardiac function [J]. Biomaterials, 2014, 35(3): 1063-1073.
- [6] Zhao R, Liang X, Zhao B, et al. Ultrasound assisted gene and photodynamic synergistic therapy with multifunctional FOXA1-siRNA loaded porphyrin microbubbles for enhancing therapeutic efficacy for breast cancer [J]. Biomaterials, 2018, 173(8): 58-70.
- [7] Sánchez-Fueyo A, Strom TB. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs [J]. Gastroenterology, 2011, 140(1): 51-64.
- [8] Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A, et al. Delivery materials for siRNA therapeutics [J]. Nat Mater, 2013, 12(11): 967-977.
- [9] Zlatev I, Castoreno A, Brown CR, et al. Reversal of siRNA-mediated gene silencing in vivo [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(6): 509-511.
- [10] Tang H, Zheng Y, Chen Y. Materials chemistry of nanoultrasonic biomedicine [J]. Adv Mater, 2017, 29(10): 1604105.
- [11] Luo Z, Ji Y, Tian D, et al. Galectin-7 promotes proliferation and Th1/2 cells polarization toward Th1 in activated CD4⁺T cells by inhibiting the TGF beta/Smad3 pathway [J]. Mo Immunol, 2018, 101(1): 80-85.
- [12] Saussez S, Kiss R. Galectin-7 [J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(6): 686-697.
- [13] Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, et al. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases [J]. Med Res Rev, 2002, 22(2): 146-167.

(收稿日期: 2020-01-09)