

放射性肝损伤的发病机制及防治策略研究

杜世锁

原发性肝癌(PLC)是常见恶性肿瘤,尽管根治手术切除和肝移植仍为肝癌获得根治的主要途径,但 80%患者明确诊断后即失去根治手术机会。越来越多确凿临床数据表明肝癌是放射敏感肿瘤。放射性肝损伤(RILD)是继发于肝脏放疗后并发的最严重、制约剂量递增的致死性并发症。肝脏是仅次于骨髓、淋巴组织的放射敏感器官,然而体外肝实质细胞却是放射抵抗细胞,很难用“经典的靶细胞理论”解释。前期研究中已经证实肝实质细胞微环境包括非实质细胞、放疗后产生的细胞因子级联效应参与肝脏放射损伤发生、发展,即放疗后的非靶向性效应(Non-target effect)在 RILD 中发挥重要作用。辐射诱导基因调控下多条信号传导途径进行细胞内及细胞间的信息传递,形成庞大调控网络,但它们之间的相互关系及调控模式仍不清楚。大量文献支持肝脏非实质细胞是放射敏感细胞,放疗后释放大细胞因子是放射诱导非靶向性效应的关键因素。已经证实转化生长因子- β (TGF- β)在放射性肝损伤显著活化且高表达,TGF- β 信号通路与 RILD 密切相关,但其确切作用机制仍然不清楚,本研究将在前面研究的基础上通过构建携带目的基因的重组腺病毒基因治疗阻断 TGF- β 信号通路或抑制 Kupffer 细胞,研究放射诱导的非靶向性效应与肝脏放射损伤的关系,从全新角度探索 RILD 分子机制及防控策略。

第一部分应用 AdMax 系统构建 T β IIR-IgFc 融合基因重组腺病毒

目的:应用 AdMax 系统构建携带 II 型 TGF β 受体(T β IIR)IgFc 融合基因重组腺病毒,为进一步研究放射性肝纤维化干预打下基础。

材料和方法:针对 T β IIR 设计引物,PCR 目的基因 T β IIR 构建 PDC316-T β IIR:针对 IgFc 设计引物,PCR 目的基因 IgFc,连入 PDC316-T β IIR 构建 PDC316-T β IIR-IgFc;双质粒共转染 293 细胞,同源重组产生重组腺病毒,AdMax 腺病毒包装系统由骨架质粒: pBHGl ox-E1,3Cre 和穿梭质粒: pDC316-2501 组成。使用 LipOfectam Ine2000 法转染 293 细胞包装携带目的融合基因的重组腺病毒,少量提取重组腺病毒 DNA 检测证实为复制缺陷型 T β IIR-IgFc 基因重组腺病毒后大量扩增、生产、纯化及鉴定。

结果:PCR 扩增 T β RII 基因,酶切连接到 pDC316-cmv-EGFP 空载体,提取质粒酶切鉴定电泳检测正确;PCR 扩增 IgFC 基因,酶切、连接 PDC316-T β RII 载体,再提取质粒,根据 PDC316 载体序列设计引物,PCR 琼脂糖凝胶电泳与预期的目的基因片段一致,测序鉴定正确。双质粒共转染 293 细胞,转染后第 9 天出毒而在光学显微镜下观察出毒现象表现为细胞变大变圆,呈“葡萄串”样形态学特征,并开始出现明显噬斑。转染后第 14 天待细胞大部分病变并从底部脱落进行收毒,证明有感染能力病毒颗粒包装成功。重组腺病毒经 RT-PCR 扩增后,产物电泳观察出现一条特异性预期条带,证明该重组腺病毒携带目的基因。测得扩增后病毒滴度为

2.6×10¹²pfu / ml。

结论：应用 AdMax 系统可方便、快捷地构建携带目的融合基因的复制缺陷型重组腺病毒。

第二部分抑制 TGF-β 信号转导通路有效减轻大鼠放射性肝纤维化

目的：本研究拟通过携带可溶性 Tβ_{II}R 的复制缺陷性重组腺病毒(AdTβ_{RIIFc})选择性阻断 TGF-β 信号转导通路治疗晚期放射性损伤,明确 TGF-β 在放射性肝纤维化(RILF)发展中作用机制,进一步探索 RILF 的治疗策略。

方法：RILF 大鼠模型采用上腹部全肝 30Gy 单次照射,放疗后活过 6 个月的大鼠肝脏都出现晚期纤维化表现。随机分成 4 组,第 1 组模型组(RILFM);第 2 组携带目的基因重组腺病毒基因治疗组：腹腔注射 1×10¹¹ PFU AdTβ_{RIIFc};第 3 组空病毒对照组,腹腔注射相同剂量和滴度的对照病毒;第 4 组生理盐水对照组,腹腔注射等体积的生理盐水(SALINE)。

结果：抑制 TGF-β 信号转导通路有效抑制放射性诱导肝星状细胞(HSC)活化、胶原蛋白-1(Col-I)和纤维粘连接蛋白(Fibronectin, FN)表达;阻断 TGF-β 信号转导通路可以减轻 RILF 阶段慢性氧化应激(Chronic Oxidative Stress, COS) DNA 损伤。另外,抗 TGF-β 治疗可以有效释放 TGF-β 对肝细胞生长抑制效应,提高肝细胞代偿能力,有效缓解 RILF 对肝脏功能损伤。

结论：TGF-β 信号转导通路在 RILF 的形成和发展中发挥重要作用,阻断 TGF-β 信号转导通路有效缓解 RILF。

第三部分抑制肝脏 Kupffer 细胞减轻放射诱导肝脏细胞凋亡

目的：通过放疗前三氯化钆抑制库鲁细胞(KCs),全肝照射检测其对放射诱导肝脏凋亡保护作用,研究抑制 KCs 对放射性肝损伤的防护作用,从非实质细胞和实质细胞相互作用全新角度探索放射性肝脏损伤(RILD)的发病机制和防护策略。

材料和方法：Sprague-Dawley 大鼠放疗前 24 小时腹腔注射三氯化钆(GdCl₃10 mg/kg 体重)清除肝内 KCs。大鼠随机分为 4 组：第 1 组假照射腹腔注射生理盐水;第 2 组假照射腹腔注射 GdCl₃;第 3 组腹腔注射生理盐水全肝照射;第 4 组腹腔注射 GdCl₃ 全肝照射。腹腔注射 GdCl₃ 后不同时间点通过 KCs 特异性免疫抗原 CD-163(ED2)免疫组织化学染色检测肝脏 KCs 数量,确认 GdCl₃ 对肝内 KCs 细胞的抑制作用。放疗后不同时间全麻下去肝脏及血清标本,检测凋亡相关细胞因子 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 基因和蛋白表达情况。通过肝细胞和肝内皮细胞凋亡、肝细胞微核技术评估放射诱导肝脏凋亡,进一步通过肝脏组织病理学和血清酶学改变评估肝脏损伤程度。

结果：腹腔注射 GdCl₃ 对肝脏没有明显毒副作用,CD163 (ED2)是肝内 KCs 细胞的标记物,GdCl₃ 注射后门脉周围 ED2 阳性 KCs 细胞数 0,2,6,24 和 48 小时分别

是正 常 情 况 下 $11.8\% \pm 4.5\%$, $11.5\% \pm 2.5\%$, $12.5\% \pm 4.2\%$, $9.5\% \pm 4.8\%$ 和 $12.5\% \pm 4.1\%$; 小 叶 中 心 区 域 分 别 为 $7.9\% \pm 3.1\%$, $8.2\% \pm 3.4\%$, $9.3\% \pm 2.4\%$, $8.0\% \pm 1.4\%$ 和 $9.5\% \pm 1.9\%$ 。第 3 组放疗后肝内凋亡细胞开始增多,6 小时肝内凋亡细胞数达到高峰,第 4 组凋亡细胞数在放疗后各个时间点都显著低于第 3 组。通过双标记技术显示放疗后 6 小时肝窦内皮细胞凋亡细胞,第 4 组显著低于第 3 组。微核技术是反映射线对染色体损伤简单而有效的方法,30Gy 照射组肝细胞微核数达到 $19.8\% \pm 5.5\%$,GdCl₃ 腹腔注射后减少到 $7.9\% \pm 2.6\%$ 。通过肝脏酶学和组织病理学分析都同样显示 GdCl₃ 抑制 KCs 细胞对放射性肝损伤的显著保护作用。抑制 KCs 后放射性肝损伤相关的细胞因子 TNF- α , IL-6 及 IL-1B 的基因及蛋白的表达都显著抑制。

结论：选择性抑制 Kupffer 细胞可以显著抑制放射诱导肝脏损伤相关因子的表达减轻放射肝损伤。