论著

文章编号:1000-5404(2006)17-1778-03

CTLA4Ig转染供者DC对同种异体胰岛移植存活的影响

张艮甫,黄赤兵,冯嘉瑜,范明齐,王平贤,肖 亚,贾维胜,方针强 (第三军医大学新桥医院泌尿外科,全军肾脏病中心,重庆 400037)

提 要:目的 探讨共刺激信号阻断剂CTLA-4Ig基因修饰的树突状细胞(dendritic cells, DC)对胰岛移植存活的影响。**方法** 以BN、Lewis大鼠为胰岛移植供、受体;用CTLA-4Ig基因重组腺病毒转染供、受体骨髓源性DC使之表达CTLA-4Ig;将供、受体DC于胰岛移植前24 h经股静脉分别注入受体(设为组Ⅰ、组Ⅱ),供、受体DC混合后注入受体(组Ⅲ),注射生理盐水的为空白对照组(组Ⅳ);观察各组糖尿病鼠高血糖改善情况及存活时间,术后第20天,MTT法检测受体脾细胞对供体及无关抗原刺激的反应。**结果** 与对照组相比,组Ⅰ和组Ⅲ血糖维持正常时间和受体存活时间显著延长[组Ⅰ:(28.75±13.60)d和(35.38±13.21)d, $P<0.01$;组Ⅲ:(41.25±13.74)d和(49.50±13.87)d, $P<0.01$],组Ⅱ移植胰岛存活时间无延长[(8.75±3.33)d与(7.33±1.97)d相比,$P>0.05$]。术后第20天,组Ⅰ、组Ⅲ脾细胞对供体抗原刺激的反应均明显低于正常对照[(0.24±0.05)和(0.21±0.05)与(0.70±0.09)相比,$P<0.01$],而对无关抗原刺激的反应与正常对照无显著差异[(0.66±0.07)和(0.66±0.07)与(0.69±0.05)相比,$P>0.05$]。**结论** CTLA-4Ig基因修饰的供体DC可以明显延长大鼠移植胰岛的存活时间,而受体DC则无此作用,但两种DC联合应用可以使移植胰岛获得更长的存活时间。

关键词:共刺激阻断剂;树突状细胞;胰岛移植

中图法分类号:R322.57;R392.4;R617 **文献标识码**:A

Effect of dendritic cells modified with B7 blocking agent CTLA-4Ig on survival of pancreatic islets allografts in rats

ZHANG Gen-fu, HUANG Chi-bing, FENG Jia-yu, FAN Ming-qi, WANG Ping-xian, XIAO Ya, JIA Wei-sheng, FANG Zhen-qiang (Renal Diseases Research Center, Department of Urinary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effect of donor and recipient dendritic cells (DCs) modified with B7 blocking agent CTLA-4Ig on the survival of pancreatic islets allografts in rats. **Methods** Bone marrow derived DCs of Lewis and Brown Norway (BN) rats were modified with CTLA-4Ig gene recombined adenovirus and injected into Lewis rats 24 h before BN to Lewis pancreatic islets transplantation alone (donor DCs in Group Ⅰ, recipient DCs in Group Ⅱ) and in combination (donor and recipient DCs in Group Ⅲ). Time of maintaining blood glycose level and survival time of pancreatic islets allografts were observed and one-way mixed splenic cell reaction (MSR) of the recipients to donors and the third party rats were performed by MTT on postoperative day 20. **Results** Time of maintaining blood glycose level and survival time of pancreatic islets allografts in Group Ⅰ and Group Ⅲ were prolonged significantly as compared with control [28.75±13.60) d and (35.38±13.21) d in Group Ⅰ, (41.25±13.74) d and (49.50±13.87) d in Group Ⅲ, (1.33±1.97) d and (7.33±1.97) d in control group], but showed no significance in Group Ⅱ and control group [(8.75±3.33) d and 7.33±1.97 d in Group Ⅱ]. On postoperative day 20, the recipients in Group Ⅰ and Group Ⅲ showed significant hyporesponsiveness to donors [MSR was (0.24±0.05) and (0.21±0.05) in Group Ⅰ and Ⅲ, *vs* (0.70±0.09) in normal control, $P<0.001$], but showed normal reaction to the third party. **Conclusion** Donor DCs modified with CTLA-4Ig could induce a significant prolongation of maintaining blood glycose level and survival time of pancreatic islets allografts, and the administration of both donor and recipient DCs modified with CTLA-4Ig could induce a longer survival of pancreatic islets allografts.

Key words: costimulatory blocking agent; dendritic cells; pancreatic islets transplantation

作者简介:张艮甫(1954-),男,江西省九江市人,硕士,主任医师,教授,主要从事肾脏移植、泌尿系统肿瘤方面的研究,发表论文40余篇。电话:(023)68755624

收稿日期:2005-10-13;**修回日期**:2006-03-01

树突状细胞(dendritic cells, DC)是目前发现的功能最强的 APC[1]。在器官移植排斥反应中，其表面的 B7 分子与抗原特异性 T 细胞表面的 CD28 分子结合所提供的共刺激信号对 T 细胞的激活起重要作用[2]。我们前期的研究表明，通过受体全身注射 T 细胞活化所需的 B7/CD28 共刺激信号阻断剂 CTLA-4Ig 可以明显延长大鼠移植肾存活[3]，但所需剂量大，影响范围广，特异性差，可能造成全身性不良反应。为了提高 CTLA-4Ig 治疗的靶向性，本研究采用 CTLA-4Ig 基因对胰岛细胞移植供、受体 DC 进行体外修饰，再将 DC 注入受体，观察了两种 DC 单独以及联合应用对移植胰岛细胞存活的影响，探讨以 CTLA-4Ig 基因修饰的供、受体 DC 延长移植的胰岛细胞存活的可行性及效能。

1　材料与方法

1.1　实验材料

移植供体为近交系 Brown-Norway(BN)大鼠 33 只(第三军医大学西南医院全军烧伤研究所提供)，体质量 250 ~ 300 g；受体为近交系 Lewis 大鼠(第三军医大学西南医院全军烧伤研究所提供)，体质量 250 ~300 g，雌雄不拘。Wistar 大鼠 8 只(第三军医大学实验动物中心提供)作为无关(The third party)淋巴细胞供体。重组大鼠 GM-CSF、IL-4 均为美国 R&D 产品；FITC 标记的小鼠抗大鼠 DC 单抗 OX62，PE 标记的小鼠抗人 CTLA-4 单抗均为美国 Pharmingen 产品。XTS-6A 手术显微镜(江苏镇江中天光学仪器厂)。CTLA-4Ig 由第三军医大学西南医院全军烧伤研究所移植免疫室提供。CTLA-4Ig 基因重组的复制缺陷型腺病毒 AdvCTLA-4Ig 由作者构建[4]，滴度为 5×10^9 pfu/ml。

1.2　方法

1.2.1　供、受体 DC 培养　　根据文献[5]方法分离供、受体大鼠骨髓细胞，加入含 20% 胎牛血清 RPMI1640 培养基的 24 孔板中以 GM-CSF 和 IL-4 刺激培养。培养过程中，每天在倒置显微镜下观察细胞形态变化，以出现树枝状突起的细胞作为 DC 的形态学特征，培养后 6 d 以流式细胞术根据 DC 表面标志 OX62 进行鉴定，收集纯度达 85% 以上的培养皿中 DC，用含 20% 胎牛血清 RPMI1640 重悬，调整细胞密度为 1×10^6/ml，备用。

1.2.2　CTLA-4Ig 基因对供、受体 DC 的修饰　　按感染复数(MOI)500∶1 向每 ml DC 中加入 AdvCTLA-4Ig，分置于 24 孔板中 37 ℃孵育 48 h 后用 0.01 mol/L PBS 反复洗涤、离心 3 次，收集 DC，流式细胞术检测 DC 表面 CTLA-4 的阳性率，收集阳性率达 95% 以上的培养皿中 DC，以含 20% 胎牛血清 RPMI1640 重悬，制成 1×10^6/ml 细胞悬液。

1.2.3　糖尿病鼠动物模型和胰岛移植模型的建立　　健康近交系 Lewis 大鼠，于阴茎背静脉注入 20 g/L 的链脲霉素(50 mg/kg)，注药后第 2、4 天测血糖(酶酚试剂法)连续两次超过 16.8 mmol/L，尿糖持续 + +++ (班氏试剂法)，选为糖尿病模型。近交系 BN 大鼠 20 只，体质量 200 ~ 250 g，戊巴比妥钠麻醉，打开腹腔，在近肝门处胆总管内顺行插入细硅胶管，处死动物。把含 0.5 g/L 的 IV 型胶原酶(510 U/mg, Sigma) Hanks 液 10 ml 从导管缓慢逆行注入胰管内，使胰腺膨胀，迅速完整摘取胰腺，置于 Hanks 液 8 ml 中，37 ℃水浴静止消化 17 min 取出，终止消化，然后用 800 目孔径的不锈钢网过滤。取定量消化物用 Dithizone 染色于解剖镜下计数。胰岛移植：将胰岛悬液吸入 1 mm 无菌的 Teflon 管，离心后备用。取糖尿病受体大鼠，戊巴比妥钠麻醉后，于左肾下极切开一小口，将沉积于 Teflon 管的胰岛注入肾上极，每只受体大鼠移植 1 000 个胰岛。

1.2.4　CTLA-4Ig 修饰的供、受体 DC 延长移植胰岛存活的效能　　按注入受体 DC 的不同分为 5 组：注入供体 DC 的为组Ⅰ($n=8$)，注入受体 DC 的组Ⅱ($n=8$)，供、受体 DC 混合后注入受体为组Ⅲ($n=8$)，未注入 DC 的受体为对照组Ⅳ($n=6$)，同品系大鼠胰岛细胞移植作为阳性对照组Ⅴ($n=6$)。术前 24 h，受体 Lewis 大鼠经 1% 异戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(100 mg/kg)后，在显微镜下经股静脉注入 1×10^6 个 CTLA-4Ig 修饰的 DC。血糖及糖耐量的变化：移植次日起第 1 周每天 1 次，然后是每周 3 次采尾静脉血测定血糖，并同时测定尿糖。非空腹血糖连续低于 11.2 mmol/L 及尿糖阴性，作为移植物功能存活的标准。非空腹血糖连续 2 d 超过 11.2 mmol/ L 及尿糖阳性，作为移植物被排斥、功能丧失的指标。

1.2.5　移植胰岛延长存活期间受体大鼠免疫反应状态　　术后 20 d，对所有存活受体按文献[3]方法，用 1% 异戊巴比妥钠腹腔注射麻醉受体，切取受体部分脾脏，分离脾细胞，观察受体脾细胞对供体和无关大鼠脾细胞的单向刺激反应。以供体 BN 大鼠和无关(The third party)Wistar 大鼠脾细胞为刺激细胞，存活至术后 20 d 的 Lewis 大鼠脾细胞为反应细胞，进行混合培养，以 MTT 法检测前二者刺激后者的增殖反应；以供体 BN 大鼠和无关 Wistar 大鼠脾细胞刺激正常 Lewis 大鼠($n=6$)脾细胞的增殖反应作为对照，观察受体大鼠对供体大鼠及无关大鼠免疫反应状态的变化。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 统计软件包行 t 检验。

2　结果

2.1　供、受体 DC 培养以及 CTLA-4Ig 的修饰

光镜下观察到，骨髓细胞分离当天仅有个别 DC 形态的细胞，培养后第 3 天开始 DC 形态细胞逐渐增多，第 6 ~ 7 天出现大量 DC 形态的细胞，而且树状突起具有很强的活动性。培养 6 d 后 DC 形态细胞逐渐悬浮，以流式细胞术检测各孔 DC 表面标志 OX62，阳性率为 83.7% ~91.6%；收集纯度达 90% 以上 DC 与 AdvCTLA-4Ig 孵育 48 h 后检测各孔中 DC 的 CTLA-4 阳性率为 94.3% ~97.5%。

2.2　CTLA-4Ig 修饰的 DC 对移植胰腺存活的影响

受体大鼠(Lewis)血糖正常时间、存活时间均较组Ⅳ延长，有显著差异($P<0.01$)。与组Ⅳ相比，组Ⅰ移植胰岛细胞的功能存活时间和受体存活时间显著延长($P<0.01$)；组Ⅱ移植胰岛细胞的功能存活时间和受体存活时间无显著延长($P>0.05$)；组Ⅲ移植胰岛细胞的功能存活时间和受体存活时间延长更为明显($P<0.01$)

2.3 移植胰岛延长存活期间受体大鼠免疫状态

术后第7~14天,组Ⅱ和对照组受体大鼠陆续死亡。术后第20天,组Ⅰ、组Ⅲ受体仍然全部存活。受体大鼠T细胞对无关大鼠抗原刺激的反应无显著差异(0.66±0.07、0.63±0.07和0.66±0.07与0.69±0.05相比,$P>0.05$)。第Ⅰ组和第Ⅲ组对供体大鼠T细胞的反应明显低于组Ⅳ,并有显著差异(0.24±0.05和0.21±0.05与0.70±0.09相比,$P<0.01$)。

3 讨论

CTLA-4Ig通过竞争性结合APC上的B7分子,阻断B7/CD28共刺激信号可以使抗原特异性T细胞发生无能或凋亡,从而延长移植物存活甚至诱导免疫耐受,其作用的靶细胞是APC,尽管全身应用CTLA-4Ig可以延长移植物的存活,但针对性不强,所用剂量很大,有增加感染等并发症的隐忧[6]。目前研究显示,作为功能最强的APC,DC在移植中发挥重要作用,近年建立了体外大量培养DC的方法,理论上,通过Ex vivo基因治疗途径,用CTLA-4Ig基因对体外培养的DC进行修饰并回输受体诱导免疫耐受具有比全身用药更高的靶向性[7,8]。

在获得较高纯度DC后,为了达到CTLA-4Ig在DC中的高表达率,尽量减少CTLA-4Ig不表达DC对实验的影响,本研究采用CTLA-4Ig基因重组的复制缺陷型腺病毒载体对DC进行转染。前期研究中显示其与体外培养细胞共孵育24 h即可达到90%以上的CTLA-4Ig阳性表达[9],本研究将共孵育时间延长至48 h,进一步提高了CTLA-4Ig在DC中的表达。尽管再延长共孵育时间可能继续提高CTLA-4Ig阳性表达率,但实验观察到,共孵育48 h后DC逐渐出现树突活动减少、僵直等老化现象,可能是高滴度腺病毒持续转染导致的细胞毒表现。因此,将共孵育时间设定在48 h,实现了CTLA-4Ig在DC中的高表达,又适度控制了腺病毒载体对DC的不良影响。

本研究中,术前输入经过CTLA-4Ig修饰的供体DC显著延长了移植胰岛的存活,而受体DC则无此作用。供体DC与受体DC的主要不同是前者天然表达供体MHC分子,具备抗原特异性,经CTLA-4Ig修饰后成为致耐受性DC,可特异性阻断供体抗原特异性T细胞(donor-specific T cells, DSTC)活化所需的B7/CD28共刺激通路,在本研究中避免了早期排斥反应的发生,表明术前输入CTLA-4Ig修饰的供体DC可很快使受体针对供体的DSTC发生无能或凋亡,其遇到移植物时已不能或仅产生很低免疫反应,使移植物存活延长,显示致耐受DC的抗原特异性是其预防早期排斥反应的必要条件。研究显示,受体DC通过吞噬移植抗原并表达为MHC分子而获得抗原特异性,经间接提呈途径激活DSTC[10],CTLA-4Ig修饰的受体DC只有在表达供体MHC分子后才具备使DSTC无能或凋亡的能力,其过程较长,发挥作用晚。而移植胰岛细胞中供体源性APC可使DSTC早期激活,在受体DC发挥抑制作用前即可导致排斥反应。本研究中受体DC未能延长移植胰岛细胞的存活,但与供体DC联合应用时可使移植胰岛存活时间较单独应用供体DC时明显延长,表明CTLA-4Ig修饰的受体DC在抑制胰岛移植后期排斥反应中发挥重要作用。在两组移植胰岛延长存活期间,受体免疫状态显示受体对供体抗原产生了特异性的低反应状态,而对其他抗原刺激的反应维持在正常水平,可能是CTLA-4Ig修饰的供、受体DC使受体DSTC发生无能或凋亡的结果。

本研究初步显示,CTLA-4Ig修饰的供体DC可以明显延长大鼠移植胰岛存活时间,而受体DC则无此作用,但两种DC联合应用可以使移植胰岛获得更长的存活时间。该方法具备对DSTC的特异性抑制,对受体其他正常的免疫功能无明显影响。

参考文献:

[1] 曹 川,李世荣,王珍祥,等. 异体皮肤移植后局部淋巴结内MIP-3β与树突状细胞的动态变化[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(15): 5-8.

[2] PECHE H, TRINITE B, MARTINET B, *et al*. Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors[J]. Am J Transplant, 2005, 5(2): 255-267.

[3] 黄赤兵,吴 军,易绍萱,等. 基因重组融合蛋白B7-CD28共刺激阻断剂对大鼠移植肾存活的影响[J]. 中华外科杂志, 2001, 39(7): 553-555.

[4] 黄赤兵,吴 军,易绍萱,等. 共刺激阻断剂CTLA4Ig基因重组腺病毒的构建与鉴定[J]. 重庆医学, 2002, 31(8): 682-683.

[5] TALMOR M, MIRZA A, TURLEY S, *et al*. Generation or large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(3): 811-817.

[6] KREMER J M, WESTHOVENS R, LEON M, *et al*. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig[J]. N Engl J Med, 2003, 349(20): 1907-1915.

[7] LEHNERT A M, MOTTRAM P L, HAN W, *et al*. Blockade of the CD28 and CD40 pathways result in the acceptance of pig and rat islet xenografts but not rat cardiac grafts in mice[J]. Transpl Immunol, 2001, 9(1): 51-56.

[8] KIMURA F, GOTOH M, TANAKA T, *et al*. Locally expressed CTLA4-Ig in a pancreatic beta-cell line suppresses accelerated graft rejection response induced by donor-specific transfusion[J]. Diabetologia, 2002, 45(6): 831-840.

[9] 黄赤兵,吴 军,方玉华,等. 腺病毒介导CTLA4Ig基因在体外培养细胞中的表达[J]. 重庆医学, 2002, 31(8): 684-685.

[10] NOURI-SHIRAZI M, GUINET E. Direct and indirect cross-tolerance of alloreactive T cells by dendritic cells retained in the immature stage[J]. Transplantation, 2002, 74(7): 1035-1044.

(编辑 周 芳)