论著

文章编号:1000-5404(2008)11-1014-04

# 重组免疫毒素 hIL-2-Luffin P1 对大鼠肾移植存活时间的影响

王儒鹏[1],何 威[1],刘树雷[1],贺伟峰[2],张小容[2],吴 军[2] (第三军医大学:[1]新桥医院皮肤科,重庆 400037;[2]西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

**摘 要:目的** 以人 IL-2 片段与植物毒素 Luffin P1 重组获得的免疫毒素 hIL-2-Luffin P1,观察它对大鼠肾移植排斥反应的抑制作用。**方法** 采用同种异体大鼠肾移植模型,观察 hIL-2-Luffin P1 对移植物存活的影响,以及移植物的组织病理学观察。**结果** hIL-2-Luffin P1 组大鼠存活时间延长(13.86±2.11)d,与对照组比较相差显著($P<0.01$);而 Luffin P1 处理组与对照组相比无明显差异。同时,病理结果显示对照组移植肾单位结构破坏,淋巴细胞浸润明显,而在同一时间 hIL-2-Luffin P1 处理组大鼠的移植肾脏病理变化较轻;T 淋巴细胞亚群检测显示经 hIL-2-Luffin P1 处理后,受体外周血 T 细胞的活化程度降低。**结论** hIL-2-Luffin P1 能够抑制免疫排斥反应,延长移植物存活时间。

**关键词:**重组免疫毒素;肾移植;hIL-2-Luffin P1
**中图法分类号:**R392-11;R392.4;R692 **文献标识码:**A

# Recombinant immunotoxin hIL-2-Luffin P1 inhibits immunological rejection in rat kidney allotransplantation

WANG Ru-peng[1], HE Wei[1], LIU Shu-lei[1], HE Wei-feng[2], ZHANG Xiao-rong[2], WU Jun[2] ([1]Department of Dermatology, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Objective In graft rejection, immune reaction mediated by overactivated T lymphocytes plays a key role, which is characterized by high expression of high-affinity IL-2R on overactivated T lymphocytes. Therefore, this feature of activated T cell makes IL-2R an ideal target for drugs to mediate the suppression or killing of activated T cells in graft rejective reaction. We constructed a kind of recombinant immunotoxin hIL-2-Luffin P1 by combining single chain ribosome inactivating protein Luffin-P1 and human IL-2, then applied hIL-2-Luffin P1 to animal transplantation model to observe its effects on graft reject reaction. Methods The rats that underwent kidney allotransplantation, Wistar rats as donors and SD rats as recipients, were used to observe the effect of hIL-2-Luffin P1 on the survival of grafts, with HBSS solvent-treated rats and Luffin P1-treated rats as controls. The pathological changes of grafts in all rats after treatment were observed. Results The survival time of the hIL-2-Luffin P1-treated rats was longer than the HBSS-treated rats ($P<0.01$). In the rats treated with HBSS solvent, the renal structure was destroyed and lymphocyte infiltration was obvious. However, the pathological changes of grafts from the rats treated with hIL-2-Luffin P1 were relatively lighter. Conclusion In rat kidney allotransplantation, hIL-2-Luffin P1 prolongs the survival time of the grafts, indicating that hIL-2-Luffin P1 can inhibit immunological rejection.

**Key words:** recombinant immunotoxin; renal transplantation; hIL-2-Luffin P1

免疫毒素(immunotoxins,ITs)是具有导向能力的分子(载体)和具有细胞毒性的分子(毒素)偶联而成的具有特异性细胞杀伤能力的杂合分子,为导向药物之一,又称作生物导弹或导向毒素,具有特异性杀伤作用,而不损伤正常组织细胞[1]。移植排斥以 T 细胞过度活化介导的细胞免疫反应为主,T 细胞活化后高表达 IL-2R,因此可以将 IL-2R 作为针对移植排斥反应中

基金项目:国家自然科学基金(30771933)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771933)
作者简介:王儒鹏,男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事免疫毒素方面的研究。电话:(023)68774915,E-mail:wrp71@163.com
通信作者:吴 军,E-mail:junwupro@126.com
收稿日期:2008-01-01;修回日期:2008-03-10

活化 T 细胞的理想靶点，通过免疫毒素与 IL-2R 结合，介导对活化 T 细胞的抑制或杀伤，有效抑制免疫排斥反应[2,3]，另外，现有免疫毒素存在免疫原性强的不足，限制了其应用。研究表明，Luffin P1 是相对分子质量很小的核糖体灭活蛋白，具有较强的翻译抑制活性[4]。本实验将其作为细胞毒性分子，以人源性的 IL-2 为靶向载体，构建重组免疫毒素，并用同种大鼠肾移植模型观察其对移植物存活时间的影响。

## 1　材料与方法

### 1.1　重组免疫毒素 hIL-2-Luffin P1 的制备

在前期的实验中，我们利用基因工程技术将人 IL-2 基因与细胞毒素分子 Luffin P1 基因重组，构建表达 hIL-2-Luffin P1 的质粒 pET20b(+)-hIL-2-Luffin P1，通过诱导表达重组免疫毒素 hIL-2-Luffin P1，经分离纯化、Western blot 检测正确后备用，并制备细胞毒素分子 Luffin P1 作为实验对照[5,6]。

### 1.2　仪器及试剂

流式细胞仪（美国 Beckman-coulter），激光波长 488 nm，功率 15 mW；兔抗鼠单克隆抗体 CD3-PE、CD4-PE-Cy5、CD8-FITC（美国 Pharmingen 公司）。

### 1.3　大鼠肾移植模型[7]

Wistar 大鼠为供者，SD 大鼠为受者，实验动物共 60 只，其中供者、受者各 30 只，体质量 250～300 g，来自第三军医大学实验动物中心。供受体均以 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。采用显微外科技术，在 Fisher、Fabre 大鼠肾移植模型的基础上，应用带硬膜外导管作为临时内支架的肾静脉吻合技术建立大鼠肾移植模型。

1.3.1　供体手术　　供鼠以 1% 异戊巴比妥钠腹腔注射麻醉（40 mg/kg）。经腹正中切口进入腹腔，先游离左侧输尿管，从左肾下极游离至膀胱根部，从尿道处剪断膀胱颈，剖开膀胱修剪输尿管膀胱瓣。游离肾脏、肾动脉、肾静脉。钝性分离腹主动脉和下腔静脉。在左肾动脉平面以下 3 cm 用 4 号丝线结扎腹主动脉，于腹主动脉结扎线近心端插入弯曲的带注射器的 4 号针头，行腹主动脉逆行置管，同时阻断右肾动脉平面以上的腹主动脉，并在左肾静脉连接下腔静脉处以下 3 cm 剪一开口作为灌注流出通道，用 4 ℃含肝素的生理盐水（125 U/ml）经腹主动脉插管灌注肾，左肾静脉齐腔静脉处剪断，左肾动脉剪一动脉瓣，最后肾、输尿管膀胱瓣一起取出，放置在盛有 0～4 ℃肝素盐水的无菌培养皿中 4 ℃冰箱保存。

1.3.2　受体植肾手术　　按供体方法游离左肾，在近腹主动脉处结扎左肾动脉，在近腔静脉处用 7 号丝线结扎肾静脉，保留长度为 1.2～1.5 cm，以间断缝合法吻合供体肾静脉与受体肾静脉。缝合结束后从远侧腔静脉抽去硬膜外导管，并靠近肾静脉处结扎腔静脉远心端。以改良的 Fabre 法缝合供受体腹主动脉：用显微镊稍提起受体显露的腹主动脉段，于腹主动脉近心、远心端各置一把显微血管钳，于肾动脉吻合段的腹主动脉中部剪一椭圆形开口，用 9-0 针线两点式连续端侧缝合供受体腹主动脉，检查吻合口无出血及狭窄后将肾脏置于原肾位置。用 8-0 针线以两定点法行供受体输尿管膀胱瓣-膀胱外隧道式连续缝合。预置原右肾肾血管体外结扎线。

1.3.3　术后处理　　待动物清醒后即饲以 5% 葡萄糖盐水，恢复活动后放回笼内进行正常饲养。术后 3 d 行原肾肾血管体外结扎。观察大鼠的活动、切口情况及精神状态，记录 24 h 尿量和泌尿停止时间。

1.3.4　分组　　移植后 30 只受体动物分为：HBSS 溶剂对照组、Luffin P1 处理组和 hIL-2-Luffin P1 处理组，每组动物数量 10 只。每组按不同要求予以尾静脉注射，从移植第 1 天开始，隔天 1 次。其中根据前期预实验选择 hIL-2-Luffin P1 浓度为 22.5 μg/kg[5]；根据 Luffin P1 分子量，按与 hIL-2-Luffin P1 相等的摩尔浓度，则 Luffin P1 处理浓度为 70 μg/kg。

### 1.4　肾脏移植标本的组织病理

采用常规的病理学方法。当其中一组中大鼠出现泌尿停止，处死该大鼠，取出肾移植标本，同时其他组也处死一只大鼠取肾移植标本，标本经固定后作组织病理观察，病理诊断标准参照国际肾移植病理分类方案 Banff97 标准。

### 1.5　流式细胞仪检测

肾移植 1 周后，测定大鼠外周血 T 细胞亚群的比例。每份血液 2 支试管，一管加入 3 种 10 μl 的对照试剂，另一管加入 CD3、CD4、CD8 抗体各 10 μl，再加入 0.1 ml 抗凝血，振荡混匀，在室温下避光孵育 15 min；然后加入红细胞裂解液及固定液，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 0.13 ml PBS 低速振荡混匀，上机检测。

### 1.6　统计学分析

移植物存活时间用 SPSS 11.0 进行单因素方差分析，多个样本均数间两两比较采用 $q$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　大鼠肾移植后 T 淋巴细胞亚群

肾移植 1 周后，测定大鼠外周血 T 细胞亚群的比例。结果显示在肾移植 1 周后，Luffin P1 组与 HBSS 溶剂对照组相比，$CD_3^+$、$CD_4^+$ 和 $CD_8^+$ 比例均无差异，而 hIL-2-Luffin P1 组中，$CD_3^+$、$CD_4^+$ 与 HBSS 溶剂对照组相比差异非常显著（$P<0.01$），$CD_8^+$ 比例与 HBSS 溶剂对照组相比差异显著（$P<0.05$），见表 1。

表 1　移植术后第 1 周外周血 T 淋巴细胞亚群（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

| 组别 | $CD_3^+$（%） | $CD_4^+$（%） | $CD_8^+$（%） |
|---|---|---|---|
| HBSS 溶剂对照组 | 57.71±3.49 | 38.21±2.82 | 18.72±1.87 |
| Luffin P1 | 59.03±3.15 | 37.63±2.45 | 20.32±2.04 |
| hIL-2-Luffin P1（22.5 μg/kg） | 47.05±3.45[a] | 31.39±2.18[a] | 15.95±2.21[b] |

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与 HBSS 溶剂对照组相比较

### 2.2　大鼠肾移植后组织病理改变

病理结果显示在 HBSS 溶剂对照组中，大鼠发生排斥反应出现时间早，最早在第 8 天时即出现无尿。移植物组织病理检测显示，在 HBSS 对照组出现移植排斥反应时，HBSS 溶剂对照组和 Luffin P1 组移植肾结构破坏，表现为肾小球变性坏死、血管管腔狭窄、肾小管上皮细胞变性、淋巴细胞浸润明显（图 1）；而在同一时间，hIL-2-Luffin P1 处理组大鼠存活好，排尿均正常，肾脏病理变化较轻（图 2）。

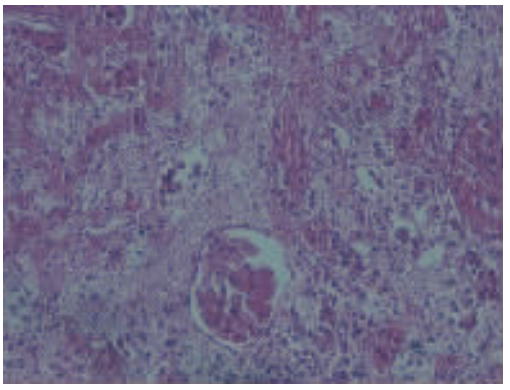


**图1 HBSS溶剂对照组大鼠肾移植术后8 d无尿,移植肾病理变化** (HE×200)

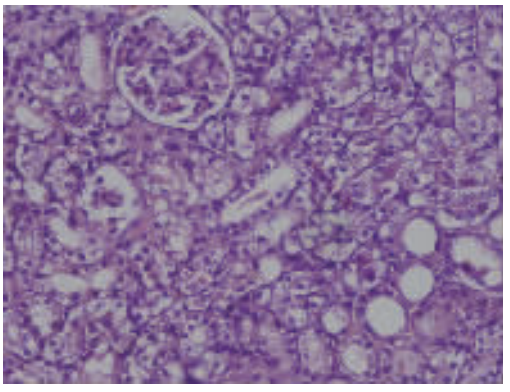


**图2 hIL-2-Luffin P1处理组大鼠肾移植术后8 d,移植肾病理变化** (HE×200)

### 2.3 hIL-2-Luffin P1对大鼠肾移植存活的影响

结果显示hIL-2-Luffin P1处理组大鼠存活时间延长,与HBSS溶剂对照组和Luffin P1对照组比较均相差显著($P<0.01$),而Luffin P1处理组与HBSS溶剂对照组相比无明显差异($P>0.05$)(表2)。

**表2 肾移植大鼠存活时间($n=10$, $\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | 剂量 | 存活时间(d) |
|---|---|---|
| HBSS溶剂对照组 | | 8.6±1.50 |
| Luffin P1处理组 | 70 μg/kg | 9.33±1.21 |
| hIL-2-Luffin P1处理组 | 22.5 μg/kg | 13.86±2.11[ab] |

a:$P<0.01$,与HBSS溶剂对照组相比较;b:$P<0.01$,与Luffin P1处理组相比较

## 3 讨论

目前,化学免疫抑制剂在器官移植排斥反应的预防和治疗中起着关键的作用,其抑制免疫排斥的作用是肯定的,但各种化学免疫抑制剂的作用是非特异性的,会抑制受者全身免疫功能,从而降低受者对感染和肿瘤的抵抗力。另外,免疫抑制剂本身的毒副作用会影响移植物的长期存活。免疫排斥反应主要是以细胞免疫反应为主,即主要是由活化的CD4亚群细胞介导,因此对抗这些移植排斥反应可采用导向治疗的策略,针对那些异常活化的免疫细胞,打断免疫应答链,避免对正常免疫细胞的非特异性损伤,因而可通过免疫毒素的靶向治疗作用达到这一目的。

免疫毒素由两部分构成,即靶向载体和毒素分子,其中毒素分子只有通过载体的携带才能进入靶细胞内发挥细胞毒性作用。目前已有的免疫毒素的应用还有一定的局限,主要是免疫原性影响了其疗效,一方面由于目前的免疫毒素多是由异源性的抗体为靶向载体,对机体来说是异种蛋白,容易在体内产生免疫反应,加速了免疫毒素的衰减,同时也增强了副作用;另一方面,通常的毒素相对分子质量较大,对组织的渗透性差。本实验构建了重组免疫毒素hIL-2-Luffin P1,其毒素分子Luffin P1具有相对分子质量小、毒性强的特点,而载体IL-2为人源性的,因而该免疫毒素分子可通过人源化及小型化来降低免疫毒素的免疫原性,一定程度上克服了其他免疫毒素的不足[8],同时相对分子质量小更容易到达靶组织,与高表达IL-2受体的活化T细胞结合,可高效、特异地杀伤活化T淋巴细胞。

本实验结果表明Luffin P1处理组大鼠存活时间与HBSS溶剂对照组比较无明显差异,说明单纯的毒素分子不能发挥细胞毒性作用,而hIL-2-Luffin P1处理组大鼠存活时间延长,较溶剂对照组平均延长5 d,最长存活时间为17 d,相差显著。通过病理观察发现溶剂对照组的大鼠出现无尿症状后,移植肾均明显肿大,呈暗红色或暗紫色,镜下见大量炎性细胞浸润并伴有肾小管坏死,肾单位的结构破坏。而在同一时间的hIL-2-Luffin P1处理组大鼠移植肾较正常肾脏稍大,色泽红润,镜下结构正常或间质中有少量炎性细胞浸润,这些结果说明hIL-2-Luffin P1能有效延长移植物的存活时间。并且通过对移植后外周血T细胞亚群的检测,显示经hIL-2-Luffin P1处理后,受体外周血T细胞的活化降低,表明减轻并延缓了移植排斥反应的发生。

免疫毒素hIL-2-Luffin P1在体外及体内的实验中均表现出抑制T细胞活化的生物学活性。结合现有关于植物来源的核蛋体失活蛋白的资料,我们认为其作用机制至少可能有以下两个方面:①蛋白合成抑制作用。核蛋体失活蛋白是通过裂解28S rRNA 4324残基上腺嘌呤的N-糖苷键,灭活真核生物核糖体的60S亚基而抑制蛋白质合成[9]。Luffin P1也属于核蛋体失活蛋白,可能也是以这样的方式发挥作用。②诱导凋亡的作用。研究发现核蛋体失活蛋白能在不同的细胞系中诱导凋亡[10,11],因此,在理论上运用免疫毒素策略延长移植物存活时间具有明显的优势,有较大的应用前景,从目前的实验结果来看,重组免疫毒素hIL-2-Luffin P1能延长同种大鼠肾移植存活时间,其抗移植排斥作用及其作用机制有待进一步研究。

本实验没有观察到移植物长期存活，推测可能有以下 3 个原因：①最佳有效剂量。我们目前只设定了一个剂量组，选用的蛋白浓度剂量偏小，需要增加几个剂量组，明确其最小有效剂量及最大耐受剂量，确定在动物模型中的最佳剂量。②最佳给药时间和途径。本实验采用的是隔天一次尾静脉注射，而最佳的给药时间应以药物的最小有效浓度为准进行调整，但我们目前尚未对 hIL-2-Luffin P1 进行药代动力学研究，故给药时间可能是本实验中影响移植物长期存活的原因之一，有待后续实验进一步完善。③体内 IL-2 的竞争结合 IL-2R。hIL-2-Luffin P1 需要与细胞表面的 IL-2R 受体结合，才能发挥有效的杀伤作用，体内的 IL-2 有可能存在与免疫毒素的竞争性拮抗作用，使毒素的作用发挥不彻底。

据资料报道，免疫毒素可引起一些毒副反应，包括发热、寒战、呕吐、肌痛、水肿、低钙血症、低白蛋白血症、低纤维蛋白原血症、高钾血症等，较严重的症状包括常见的血管渗漏综合征、肝肾轻微损伤或严重损伤、系统性炎症反应综合征、转氨酶升高等。免疫毒素引起毒性的原因可能是细胞非特异吸收免疫毒素，也可能是由于正常淋巴细胞上的靶向分子被识别，例如肝枯否氏细胞上有 GM-CS 阳性表达，或巨噬细胞非特异地吞入毒素。hIL-2-Luffin P1 有无上述毒副作用以及如何尽量减少其副作用，有待进一步研究。

## 参考文献：


[1] Fehr T, Sykes, M. Tolerance induction in clinical transplantation[J]. Transpl Immunol, 2004, 13(2): 117 - 130.

[2] Waldmann H. Therapeutic approaches for transplantation [J]. Curr Opin Immunol, 2001, 13(5): 606 - 610.

[3] Hess P R, Barnes C, Woolard M D, *et al*. Selective deletion of antigen-specific CD8 + T cells by MHC class I tetramers coupled to the type I ribosome-inactivating protein saporin[J]. Blood, 2007, 109(8): 3300 - 3307.

[4] Li F, Yang, X X, Xia H C, *et al*. Purification and characterization of Luffin P1, a ribosome-inactivating peptide from the seeds of Luffa cylindrica[J]. Peptides, 2003, 24(6): 799 - 805.

[5] 王儒鹏，周丽娜，吴　军，等. 重组免疫毒素 hIL-2-Luffin P1 的构建及表达[J]. 第三军医大学学报，2005，27(9)：828 - 830.

[6] 王儒鹏，吴　军，袁　军. 核糖体失活蛋白 Lufffin P1 的构建[J]. 贵阳医学院学报，2005，30(2)：103 - 107

[7] 黄赤兵，方玉华，吴　军，等. 应用新技术建立大鼠肾移植模型[J]. 中华器官移植杂志，2001，22(2)：114.

[8] Knechtle S J. Treatment with immunotoxin [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001, 356(1409): 681 - 689.

[9] Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins[J]. Toxicon, 2004, 44(4): 371 - 383.

[10] Narayanan S, Surendranath K, Bora N, *et al*. Ribosome inactivating proteins and apoptosis [J]. FEBS Lett, 2005, 579(6): 1324 - 1331.

[11] Knutson K L, Dang Y, Lu H, *et al*. IL-2 immunotoxin therapy modulates tumor-associated regulatory T cells and leads to lasting immune-mediated rejection of breast cancers in neu-transgenic mice[J]. J Immunol, 2006, 177(1): 84 - 91.


（编辑　吴培红）

（上接 1013 页）

表 2　两组血 GLU、TG、TC、HDL-C、LDL-C 指标和收缩压、舒张压检测结果

| 组别 | TC(mmol/L) | TG(mmol/L) | HDL-C(mmol/L) | LDL-C(mmol/L) | GLU(mmol/L) | 收缩压(mmHg) | 舒张压(mmHg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 正常组 | 4.38 ± 0.86 | 1.12 ± 0.80 | 1.45 ± 0.31 | 2.73 ± 0.78 | 5.44 ± 2.42 | 118.6 ± 18.2 | 75.0 ± 12.3 |
| 高尿酸血组 | 4.69 ± 1.01[a] | 1.79 ± 1.02[a] | 1.25 ± 0.27[a] | 3.05 ± 0.83[a] | 5.66 ± 2.33 | 127.1 ± 18.9[a] | 80.6 ± 12.7[a] |

a：$P < 0.05$，与正常组比较

### 2.2　血生化及相关指标水平

结果显示，UA 患者 TG、TC、血压、BMI、LDL-C 水平均高于正常尿酸组，HDL-C 水平低于尿酸正常组（$P < 0.05$，表 2）。

### 2.3　高尿酸血症相关因素的 Logistic 回归分析

结果显示，TG、HDL-C、LDL-C、高血压为患 UA 的独立危险因素，见表 3。

表 3　高尿酸血症相关因素的多因素 Logistic 回归分析

| 相关因素 | β | SD | Wald | *P* | *OR* | 95% *CI* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 高 TG | 1.156 | 0.156 | 54.72 | 0.000 | 3.177 | 1.345 ~ 2.976 |
| HDL-C 异常 | 0.96 | 0.167 | 32.654 | 0.000 | 2.598 | 1.088 ~ 1.123 |
| LDL-C 异常 | 0.642 | 0.118 | 29.627 | 0.000 | 1.9 | 1.489 ~ 2.665 |
| 高血压 | 0.662 | 0.139 | 22.64 | 0.000 | 1.938 | 1.101 ~ 2.137 |

## 3　讨论

本调查结果显示，患病率男性为 57.1%，女性为 12.7%。影响因素之一是来我院体检的人群大部分有一定经济收入，生活水平都较高。40 岁以后为高尿酸血症的危险因素，尤其在更年期以后雌激素水平的下降，不利于尿酸的排泄[1]。20 ~ 59 岁男性血尿酸值高，估计与不健康生活方式有关。60 岁以后尿酸高，可能与其机体功能减退，卫生知识获取较少，对健康重视不够有关。高血压、高 TG、高 LDL-C 与高尿酸血症成正相关，与 HDL-C 呈负相关。一方面，高血压本身就可引起肾功能减退；另一方面，高 UA 促进了高血压的发生。高 TG 可降低肾排泄尿酸的作用，造成尿酸潴留。高 TG 致 LDL-C 增高。HDL-C 是高尿酸血症者的保护因子。年龄、性别、健康的生活方式是影响高 UA 的重要因素。

关键词：高尿酸血症；患病率
中图法分类号：R589.7　　文献标识码：B

## 参考文献：


[1] 余俊文，陆锦波，张小娟，等. 1320 名老年人血尿酸与血脂、血糖和血压的分析[J]. 中华流行病学杂志，2005，26(6)：455 - 457.

[2] 林果为，俞茂华. 新编诊断学基础[M]. 上海：复旦大学出版社，2003：7.


（编辑　王小寒）