论著

文章编号:1000-5404(2011)04-0342-03

组蛋白去乙酰化酶11在诱导大鼠肝移植免疫耐受中的作用

赖 星[1],连峥嵘[1],陈 勇[1],李金政[1],廖汪洋[1],张玉君[2],龚建平[1],刘作金[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肝胆外科[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所[2])

【摘要】 目的 通过观察组蛋白去乙酰化酶11(histone deacetylase 11,HDAC11)及IL-10表达水平在3种大鼠肝移植模型中的变化,探讨肝移植免疫耐受形成的相关机制。**方法** 纯系Lewis和BN大鼠各30只,建立肝移植排斥模型后将受体分为排斥组(Lewis-BN)、免疫抑制剂干预组(Lewis-BN)、耐受组(BN-lewis),每组10只。干预组于术后1~7 d以1 mg/kg肌肉注射他克莫司(FK506);分别于术后7 d处死受体。移植物排斥反应程度采用Banff评分标准;免疫荧光组织化学观察HDAC11表达情况;实时荧光定量PCR及Western blot测定肝组织HDAC11 mRNA和蛋白表达水平;酶联免疫吸附法检测血清IL-10及IFN-γ的含量。**结果** 术后7 d,排斥组为严重的急性排斥反应,Banff评分Ⅲ级,干预组为Ⅱ级,耐受组为0~Ⅰ级。排斥组HDAC11 mRNA及蛋白表达的水平明显高于干预组和耐受组($P<0.05$),耐受组表达量最低,与干预组有统计学差异($P<0.05$)。排斥组IL-10表达明显低于干预组和耐受组($P<0.05$);而IFN-γ含量排斥组明显高于干预组和耐受组($P<0.05$)。**结论** HDAC11通过对IL-10的调控促进或抑制肝移植免疫耐受的形成。

【关键词】 组蛋白去乙酰化酶11;肝移植;免疫耐受;大鼠

【中图法分类号】 R-332;R392.4;R657.3 **【文献标志码】** A

Role of HDAC11 in induction of immune tolerance in rats after liver transplantation

Lai Xing[1], Lian Zhengrong[1], Chen Yong[1], Li Jinzheng[1], Liao Wangyang[1], Zhang Yujun[2], Gong Jianping[1], Liu Zuojin[1] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the changes of histone deacetylase 11 (HDAC11) and IL-10 in the 3 rat liver transplantation models, and to explore the related mechanism of the formation of immune tolerance. **Methods** Thirty pure Lewis and thirty BN rats were used to establish liver transplantation, including 20 pairs of Lewis to BN and 10 pairs of BN to lewis. The recipients were divided into 3 groups: rejection group (Lewis to BN, $n=10$), immunosuppressant intervention group (Lewis to BN, $n=10$) and tolerance group (BN to Lewis, $n=10$). The recipients of immunosuppressant intervention group were treated with FK506 at a dose of 1 mg/kg per day by intramuscular injection from 1 to 7 d postoperatively. Rats were killed at the 7th day after transplantation. The extent of acute rejection was assayed by pathological examination. The distribution of HDAC11 was observed by immunofluorescent staining. The expressions of HDAC11 mRNA and protein levels were detected by real-time PCR and Western blot analysis. The levels of serum IL-10 and IFN-γ were measured by ELISA. **Results** The graft Banff scale on the 7th day after transplantation was higher in rejection group than that in other 2 groups (rejection group, Ⅲ; immunosuppressant intervention group, Ⅱ; tolerance group, 0 to Ⅰ). The expression of HDAC11 mRNA and protein were significantly higher in rejection group than the other 2 groups ($P<0.05$). Those of the tolerance group were also lower than those of immunosuppressant intervention group ($P<0.05$). The IL-10 levels were significantly lower in rejection group than the other 2 groups ($P<0.05$). But the level of IFN-γ were the highest in rejection group than the other 2 groups ($P<0.05$). **Conclusion** It is partly *via* HDAC11 regulation to IL-10 that promoting or inhibiting the formation of immune tolerance of liver tansplantation.

【Key words】 histone deacetylase 11; liver transplantation; immune tolerance; rats

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972888, 30801126). Corresponding author: Liu Zuojin, E-mail: liuzuojin66@hotmail.com

同种异体肝移植是目前治疗终末期肝脏疾病的有效手段,但移植后产生的排斥反应严重影响着患者的生存时间。自1989年他克莫司(FK506)首次用于肝

【基金项目】 国家自然科学基金(30972888,30801126)

【通信作者】 刘作金,E-mail:liuzuojin66@hotmail.com

移植以来,在临床上已广泛应用于各种急性排斥反应。肝移植是临床应用 FK506 最主要的适应证,其作用机制与环孢素 A(CsA)相似,都是通过抑制相关多细胞因子的产生和表达来抑制 T 细胞的活化[1]。然而,为了避免长期使用免疫抑制剂,诱导移植术后免疫耐受才是最佳途径。但如何减轻免疫排斥反应,诱导免疫耐受仍是肝移植领域的一大难题。最新研究[2]发现,组蛋白去乙酰化酶 11(histone deacetylases11, HDAC11)是调节 APC 细胞 IL-10 转录的关键因子,IL-10 通过维持 T 细胞对自身的免疫耐受产生强大的免疫抑制作用。本研究通过建立大鼠肝移植急性排斥、耐受模型及应用免疫抑制剂处理急性排斥反应后,观察 HDAC11 及其下游因子 IL-10 的变化,试图证明 HDAC11 在大鼠肝移植免疫耐受产生中的重要作用,以期为临床移植免疫耐受的诱导提供相应的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

纯系雄性 6 周龄 Lewis(Rtll)大鼠 30 只和 7 ~ 8 周龄 BN(Rtln)大鼠 30 只,体质量 150 ~ 180 g,购于北京维通利华实验动物有限公司。上述动物饲养于重庆医科大学实验动物中心无菌实验室。供、受体术前 8 h 禁食,不禁水,受体术后不禁食,水。

1.2 主要试剂

FK506 购于美国 Sigma 公司;总 RNA 提取试剂盒自美国 Promega 公司;兔抗鼠 HDAC11 多克隆抗体购自美国 Imgenex 公司;IL-10、IFN-γ ELISA 测定试剂盒购自美国 Active motif 公司。

1.3 大鼠原位肝移植模型的建立及分组

纯系 Lewis 和 BN 大鼠(各 30 只)建立肝移植排斥模型后,分为排斥组(Lewis-BN)、免疫抑制剂干预组(Lewis-BN)、耐受组(BN-lewis)。排斥组和干预组受体为 BN 大鼠,耐受组受体为 Lewis 大鼠,每组 10 只。干预组将 5 mg FK506 溶于 50 ml 生理盐水,术后 1 ~ 7 d 以 1 mg/kg 肌肉注射[3]。参照 Peng 等[4]介绍的改良 Kamada 袖套法,建立大鼠原位肝移植动物模型。于术后第 7 天处死受体,抽取下腔静脉血液 5 ml 并切取肝左外叶组织备检。

1.4 肝脏组织病理观察

取左肝前叶肝组织放入 10% 中性甲醛中固定 24 ~ 48 h,常规脱水、透明、石蜡包埋、5 μm 厚切片,HE 染色,光学显微镜观察;根据 Banff 等制定的急性排斥反应标准进行病理分级。

1.5 肝脏组织 HDAC11 荧光定量分析

肝组织石蜡切片常规脱蜡,水化,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗。0.4% 胃蛋白酶盐酸溶液 37 ℃抗原修复 30 min,PBS 冲洗 5 min × 3 次。10% 正常山羊血清封闭,室温孵育 30 min。滴加混合好的兔抗鼠一抗(最终稀释浓度为 1∶100),4 ℃过夜。PBS 冲洗,5 min × 3 次。滴加混合好的异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔二抗(最终稀释浓度为 1∶100),室温反应 2 h,PBS 冲洗 5 min × 3 次,90% 甘油封片。以 Zeiss510 LSM 激光共聚焦显微镜检测 HDAC11 的荧光定量表达。以绿色荧光通道扫描观察。绿光的激发波长为 488 nm,在 530 nm 波长以上观察。每张切片选取荧光表达最强的 10 个视野观察并由计算机扫描软件测定荧光强度与面积。HDAC11 的荧光值 = 平均荧光强度 × 平均荧光面积。

1.6 肝组织 HDAC11 mRNA 及蛋白表达水平检测

Real-time PCR 测定各组肝脏 HDAC11 mRNA 表达水平。按 Trizol 试剂盒说明书提取肝脏组织总 RNA。HDAC11 上游引物 5′-GTTTACAACCGCCACATCTACC-3′,下游引物 5′-AACCACTTCATCCCTCTTCACA-3′,扩增产物为 249 bp;内参照 β-actin 上游引物 5′-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3′,下游引物 5′-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3′,扩增产物为 150 bp;反转录后行实时荧光定量 PCR。mRNA 相对表达量:$2^{-\triangle CT} \times 100\%$。△CT = 目标基因 CT 值 - 内参 CT 值。Western blot 测定各组 HDAC11 蛋白表达水平。Western blot 产物电泳条带,采用美国 Bio-Rad 公司 Quantity 4.0 图像分析软件行扫描分析。

1.7 血清 IL-10 和 IFN-γ 含量检测

根据 ELISA 试剂盒说明,测定各时段血清 IL-10 含量。

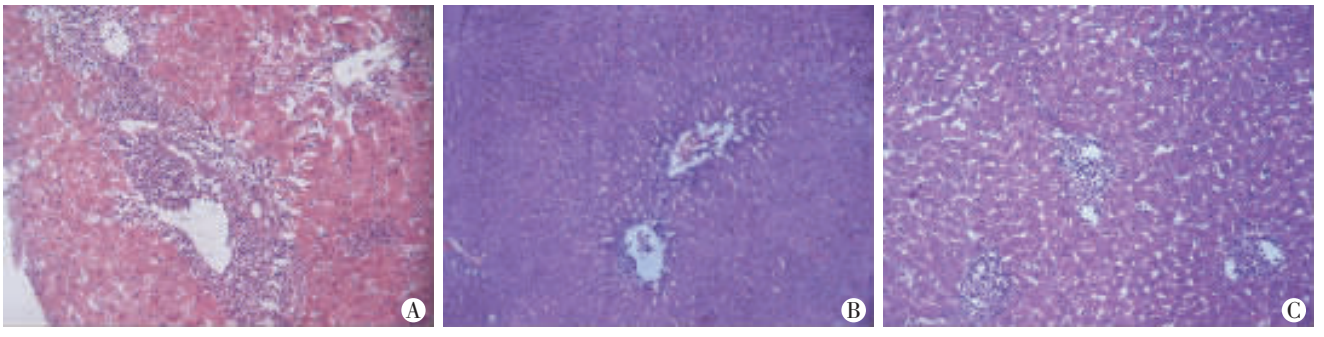
1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用统计学软件 SPSS 17.0 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 病理组织学观察

排斥组术后 7 d 肝脏病理表现为汇管区大量淋巴细胞浸润,并累及胆管、血管,肝小叶结构消失,伴有局灶性的出血、坏死;Banff 评分Ⅲ级。干预组表现为中等量的淋巴细胞浸润,肝血窦压缩,淤血;Banff 评分Ⅱ级。耐受组汇管区为少至中等量淋巴细胞浸润,胆管、血管未受侵犯;Banff 评分Ⅰ~Ⅱ级(图 1)。



A:排斥组;B:干预组;C:耐受组

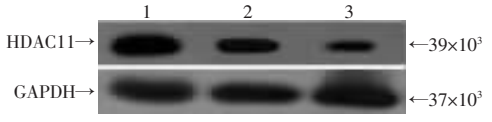
图 1 术后 7 d 各组大鼠肝脏病理组织学表现 (HE ×200)

2.2 肝脏组织 HDAC11 荧光表达情况

术后 7 d HDAC11 在排斥组、干预组和耐受组中荧光值分别为 34.25 ± 3.57、12.52 ± 1.68、4.95 ± 0.83。排斥组明显高于干预组和耐受组($P < 0.05$),干预组高于耐受组($P < 0.05$)。

2.3 不同移植模型处理对 HDAC11 mRNA 及蛋白表达水平影响

术后第 7 天,排斥组、干预组和耐受组 HDAC11 mRNA 和蛋白相对含量(图 2)分别为 0.91 ± 0.12、0.52 ± 0.07、0.24 ± 0.02 和 1.76 ± 0.21、0.93 ± 0.13、0.22 ± 0.02。耐受组 mRNA 及蛋白表达水平明显低于干预组和排斥组($P < 0.05$);排斥组表达量最高,且高于干预组($P < 0.05$)。



1~3:分别为排斥组、干预组和耐受组

图 2 Western blot 检测不同移植模型处理对 HDAC11 蛋白表达的影响

2.4 不同移植模型处理对血清 IL-10 及 IFN-γ 含量的影响

ELISA 结果表明:排斥组、干预组和耐受组 IL-10 和 IFN-γ 表达量分别为 2.70 ± 0.04、15.62 ± 0.53、28.37 ± 0.21 和 254.10 ± 21.34、83.02 ± 9.40、21.74 ± 2.13。耐受组 IL-10 含量最高,明显高于干预组和排斥组($P < 0.05$),干预组高于排斥组($P < 0.05$)。而 IFN-γ 含量耐受组最低,明显低于干预组和排斥组($P < 0.05$),干预组低于排斥组($P < 0.05$)。

3 讨论

肝移植术后的急性排斥反应(acute rejection, AcR)的实质是由活化的 T 淋巴细胞介导的细胞免疫反应。枯否氏细胞(Kupffer cells, KCs)等抗原提呈细胞群(antigen presenting cell, APC)活化后,一方面通过表达高水平的 MHC Ⅱ类抗原和共刺激分子,激活抗原特异性 T 细胞而诱发 AcR;另一方面,活化 KCs 同时还产生 IL-10 等强有力的免疫抑制因子,诱导免疫耐受。IL-10 表达多少是器官移植后维持耐受状态还是出现急性排斥反应的重要影响因素之一[5-7]。

HDACll 属于第Ⅳ类组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)成员之一,其开放读码框编码 347 个氨基酸残基,相对分子质量为 39 × 10^3[8]。HDAC11 可通过作用于 IL-10 末端的启动子区域,将乙酰基从组蛋白尾端移除后,促进其与沉默子间的相互作用,发挥转录抑制作用[9]。本研究发现,在 Lewis-BN 的大鼠排斥模型中,术后产生急性排斥反应,IL-10 表达量明显受到抑制,而 HDAC11 相对增高;而耐受组形成免疫耐受,IL-10 表达明显增加,而 HDAC11 表达减少。说明在大鼠肝移植中,HDAC11 对 IL-10 的仍然有负性调控作用,而且 HDAC11 表达活性也间接决定着移植后器官的状态。

免疫抑制剂 FK506 主要作用是抑制细胞因子的产生。FK506 可与 T 细胞质内的钙离子-钙调蛋白依赖性磷酯酶活性蛋白结合,阻断磷酯酶活性和钙离子内流,使 NF-AT 途径转录 IL-2 失活,从而抑制 T 细胞的活化。并可通过下调 FAS 和上调 Bcl-2 使移植肝脏产生抗凋亡作用[10]。尽管使用 FK506 干扰后可以减轻急性排斥反应,但本研究发现,干预组病理损害明显重于耐受组,这可能与 FK506 的非特异性有关,免疫抑制剂在阻止急性排斥反应的同时也抑制了部分有利于免疫耐受建立的免疫反应[11]。耐受组通过高表达 IL-10 来维持器官的免疫耐受,而干预组虽然排斥反应比排斥组明显减轻,但在抑制 $CD4^+$ 辅助性 T 细胞(Th1)细胞产生 IFN-γ 的同时,IL-10 的表达也受到抑制,这可能是干预组病理损害重于耐受组的原因之一。

本实验通过建立不同大鼠肝移植模型处理后,证明了 HDAC11 对 IL-10 的负性调控作用以及在移植免疫耐受产生中的重要作用。诱导免疫耐受不仅可以避免术后使用免疫抑制剂的高昂费用,而且能防止其非专一性对有利于耐受形成的免疫功能的抑制。然而,如何开展以 HDAC11 为靶点的诱导肝脏免疫耐受仍有待进一步的研究。

参考文献:

[1] 胡洁, 曹国良. 免疫抑制剂 FK506 在排斥反应中的应用及其肝肾毒性研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2008, 22(11):838-840.

[2] Villagra A, Cheng F, Wang H W, *et al*. The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance[J]. Nat Immunol, 2009, 10(1):92-100.

[3] Hossain M A, Hamamoto I, Kobayashi S, *et al*. Immunosuppression in auxiliary partial liver transplantation with FK506 in rats[J]. Transplant Proc, 1997, 29(8):3617-3618.

[4] Peng Y, Gong J P, Liu C A, *et al*. Expression of toll-like receptor 4 and MD-2 gene and protein in Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rat liver graft[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(19):2890-2893.

[5] Martinez O M, Rosen H R. Basic concepts in transplant immunology[J]. Liver Transpl, 2005, 11(4):370-381.

[6] Chen Y, Liu Z, Liang S, *et al*. Role of Kupffer cells in the induction of tolerance of orthotopic liver transplantation in rats[J]. Liver Transpl, 2008, 14(6):823-836.

[7] 涂兵, 梁绍勇, 陈勇, 等. Kupffer 细胞 Fas 配体的表达及其对移植肝内淋巴细胞的杀伤作用[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(14):1322-1326.

[8] 赖星, 董家刚, 龚建平. 组蛋白去乙酰化酶11 与基因表达[J]. 医学分子生物学杂志, 2009, 6(6):538-541.

[9] West A G, Fraser P. Remote control of gene transcription[J]. Hum Mol Genet, 2005, 14 Spec No 1:R101-R111.

[10] Moriuchi H, Kamohara Y, Eguchi S, *et al*. Diverse Effects of FK506 on the Apoptosis of Hepatocytes and Infiltrating Lymphocytes in an Allografted Rat Liver[J]. J Surg Res, 2009, Aug. 4 [Epub ahead of print].

[11] Xu M, Tan C, Zhou J, *et al*. The dynamic changes of T-bet$^+$/GATA-3$^+$ and RORgammat$^+$/FOXP3$^+$ cells in recipient spleens and grafts after rat orthotopic liver transplantation[J]. Transplant Immunology, 2010, 22(3/4):165-171.

(收稿 2010-09-17 修回 2010-11-01)

(编辑 张 维)