论著

文章编号:1000-5404(2011)23-2450-04

CTLA4Ig和CD40LIg基因修饰骨髓间充质干细胞在异种胰岛移植排斥反应中的作用

张 剑,张 琪,姜 楠,张英才,汪国营,李 华,汪根树,杨 扬,陈规划 (510630 广州,中山大学附属第三医院肝脏移植中心)

[摘要] **目的** 探讨细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4免疫球蛋白(CTLA4Ig)和T细胞分化群40补体免疫球蛋白(CD40LIg)基因修饰骨髓间充质干细胞(MSCs)在异种胰岛移植排斥反应中的作用及其可能的机制。**方法** 将SD大鼠胰岛细胞移植到Wistar糖尿病大鼠肾包膜下,建立SD-Wistar大鼠的异种胰岛移植模型,用携带CTLA4Ig和CD40LIg基因重组腺病毒感染的MSCs进行干预治疗。取造模成功的糖尿病大鼠45只,按随机数字表法分为3组(每组15只):对照组只植入胰岛细胞;单纯MSCs组植入胰岛细胞和MSCs;基因转染MSCs组植入胰岛细胞及CTLA4Ig和CD40LIg基因转染的MSCs。观察胰岛移植后糖尿病大鼠的生存情况、血糖变化和移植物病理形态学的改变,检测移植物CTLA4Ig、CD40LIg和胰岛素的表达以及胰岛移植大鼠细胞因子水平的变化。**结果** ①糖尿病大鼠血糖在移植后2 d降至正常,对照组血糖平均在移植后8 d升高,单纯MSCs组和基因转染MSCs组血糖分别在21 d和49 d升高。②对照组、单纯MSCs组和基因转染MSCs组,移植物存活时间分别为(10.2±2.1)、(23.5±6.8)和(52.1±7.3)d,各组间比较差异有统计学意义($P<0.05$);移植大鼠的生存时间分别为(21.3±5.3)、(49.7±8.5)、(95.8±13.8)d,各组间比较和移植物存活时间相似($P<0.05$)。③对照组TNF-α和IL-2的水平在移植后1周内均急剧上升,而IL-4和IL-10的水平较移植前显著下降($P<0.01$);2个治疗组细胞因子水平的变化和对照组正好相反。④2个治疗组移植物内可见成片的胰岛细胞团,未见明显淋巴细胞浸润,基因转染MSCs组移植物内可见CTLA4Ig、CD40LIg和胰岛素的表达。**结论** 转移CTLA4Ig和CD40LIg基因修饰MSCs可抑制异种胰岛移植排斥反应,其效果优于MSCs单独应用。

[关键词] 胰岛移植;糖尿病;骨髓间充质干细胞;CTLA4Ig;CD40LIg
[中图法分类号] R392.4; R394.2; R657.5 [文献标志码] A

Effects of CTLA4Ig and CD40LIg modified bone marrow mesenchymal stem cells on rejection of rat islet xenografts

Zhang Jian, Zhang Qi, Jiang Nan, Zhang Yingcai, Wang Guoying, Li Hua, Wang Genshu, Yang Yang, Chen Guihua
(Liver Transplantation Center, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province, 510630, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 immuno-globulin (CTLA4Ig) and cluster of differentiation 40 ligand immunoglobulin (CD40LIg) modified bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) on rejection of rat islet xenografts. **Methods** The islet xenografts model of SD-Wistar rat was established with islet cells of SD rats transplant under left kidney capsule of diabetic Wistar rats. MSCs infected with recombinant adenoviruses containing CTLA4Ig and CD40LIg gene were applied in treatment. Forty-five successfully modeling diabetic rats were randomly divided into three groups with 15 rats in each group: only islet cells were transplanted to rats in control group (A); islet cells and MSCs were transplanted to rats in MSCs group (B); and islet cells and MSCs transfected with CTLA4Ig and CD40LIg gene were transplanted to rats in transfected MSCs group (C). Survival of rats, blood glucose and morphological changes of grafts were observed after islet transplantation. Expressions of CTLA4Ig, CD40LIg and insulin were detected by immunohistochemical staining and cytokines changes were quantified by ELISA. **Results** ①The blood glucose of transplant rats decreased to normal level on day 2 post-transplantation. The average level of blood glucose of group A, group B and group C increased on day 8, 21 and 49 post-transplantation, respectively. ② The grafts of the group A, B and C survived for (10.2±2.1), (23.5±6.8) and (52.1±7.3) days, respectively. There were significant differences among group A, B and C ($P<0.05$). The survival time of transplant

[基金项目] 国家自然科学基金(81070382);广东省科技计划资助项目(2008B030301050)
[通信作者] 张 剑,E-mail:zhangjian629@sina.com

rats were (21.3 ± 5.3), (49.7 ± 8.5) and (95.8 ± 13.8) days in group A, B and C, respectively. The survival time of transplant rats among each group was the same as that of grafts ($P < 0.05$). ③In group A, serum levels of IL-2 and TNF-α increased dramatically and serum levels of IL-4 and IL-10 decreased significantly within 7 days post-transplantation compared with those before transplantation ($P < 0.01$). Serum levels of IL-4 and IL-10 in group B and C increased significantly post-transplantation compared with those before transplantation. ④Hematoxylin-eosin staining of grafts showed in group B and C, bolus of islets under kidney capsule with no lymphocytes infiltration and immunohistochemical staining of grafts showed expression of insulin protein at islets in group B and C. These grafts positively stained for CTLA4Ig and CD40LIg in group C. **Conclusion** CTLA4Ig and CD40LIg modified MSCs can inhibit the rejection of rat islet xenografts, and the effect are superior to MSCs alone.

[**Key words**] islet xenografts; diabetes mellitus; bone marrow mesenchymal stem cells; CTLA4Ig; CD40LIg

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81070382) and the Sci-Tech Research Development Program of Guangdong Province (2008B030301050). Corresponding author: Zhang Jian, E-mail: zhangjian629@sina.com

排斥反应目前仍是胰岛移植面临的主要难题,而异种胰岛移植排斥反应问题就更为突出。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是一种来源于骨髓的多能干细胞,具有较强的增殖能力和多向分化潜能。近来研究表明,MSCs具有免疫调节作用,可以延长移植物的存活时间[1-3]。也有研究显示单独应用MSCs不能维持移植物的长期存活[4]。我们前期研究显示,阻断共刺激通路可抑制排斥反应的发生,但单独阻断任何一条共刺激途经都不能形成持久和稳定的免疫耐受[5]。我们构建同时表达CTLA4Ig和CD40LIg的重组腺病毒,用其转染MSCs,并对异种胰岛移植的糖尿病大鼠进行治疗,探讨CTLA4Ig和CD40LIg基因修饰的MSCs在异种胰岛移植排斥反应中的作用和可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

雄性SD大鼠,体质量200~250 g,作为胰岛细胞和骨髓间充质干细胞(MSCs)供体;雄性Wistar大鼠,体质量200~250 g,作为胰岛移植受体,由中山大学医学动物实验中心提供;携带基因CD40LIg和CTLA4Ig的重组腺病毒载体质粒由本中心参照Sambrook方法构建[6];抗CD40LIg单克隆抗体和抗CTLA4Ig单克隆抗体(美国Biodesign公司);抗胰岛素单克隆抗体、ELISA试剂盒和免疫组织化学试剂盒(深圳晶美生物有限公司提供);Ficoll 400试剂(瑞典Amersham公司)。

1.2 方法

1.2.1 胰岛的分离和纯化 SD大鼠在10%水合氯醛(40 mg/kg)麻醉下,开腹显露胆总管,经胆总管插管灌注胶原酶,待胰腺明显肿胀后,切取胰腺并剪成小块,放入消化器中,37.5 ℃消化5~8 min后,用37 ℃含10%胎牛血清的RMPI1640培养液中止消化,收集消化产物。消化物置于37.0 ℃、5% CO_2的恒温培养箱中培养48 h,再用25%、23%、20%、11%的Ficoll 400不连续密度梯度液进行纯化,收集纯化产物,置于30 ℃、5% CO_2的恒温培养箱中培养待用。

1.2.2 MSCs的分离和培养 SD大鼠拉颈处死,分离股骨与胫骨,制成骨髓细胞悬液,与等量DMEM混合,离心后加入Percoll分离液,离心后抽取有核细胞层,用含10%胎牛血清的DMEM重悬细胞,调整细胞浓度为10^6/ml,接种于25 cm^2培养瓶中,置于37 ℃、5% CO_2的恒温培养箱中培养。接种48 h后更换培养液,以后每隔3天更换1次培养液。培养细胞接近80%融合后,用0.25%胰酶消化,传代培养,传至第5代细胞备用。

1.2.3 骨髓间充质干细胞AdCTLA4Ig-IRES2-CD40LIg转染 用多重感染复数(MOI)为50的重组腺病毒AdCTLA4Ig-IRES2-CD40LIg病毒液感染MSCs,37 ℃、5% CO_2的恒温培养箱内培养48 h,用培养液洗涤,备用。

1.2.4 异种胰岛移植模型和实验分组 将SD大鼠胰岛细胞和AdCTLA4Ig-IRES2-CD40LIg转染的MSCs用培养液调整细胞浓度分别为8 000 IEQ/ml和4×10^6/ml。选取45只用静脉注射链脲佐菌素造模成功的糖尿病大鼠,按随机数字表法分为A、B、C 3组(每组15只),用10%水合氯醛(40 mg/kg)麻醉后,在左肾被膜下注入0.25 ml胰岛细胞悬液(约2 000 IEQ胰岛细胞)和0.25 ml AdCTLA4Ig-IRES2-CD40LIg转染的MSCs(约1×10^6 MSCs)。A组植入胰岛细胞,作为对照组;B组植入胰岛细胞和MSCs;C组植入胰岛细胞和AdCTLA4Ig-IRES2-CD40LIg转染的MSCs。移植后第1周内每天测1次血糖,以后每隔2天测1次血糖。血糖降低以后,若2次血糖高于16.0 mmol/L,以第1次时间为排斥反应开始。分别于移植前1 d和移植后3、7、14、21、28、35 d取移植大鼠外周血,采用ELISA方法检测细胞因子IL-2、IL-4、IL-10和TNF-α的水平。分别于胰岛移植后15 d和30 d,取移植大鼠左肾移植物,作病理组织学检查;采用S-P免疫组织化学染色法检测移植物胰岛素、CTLA4Ig和CD40LIg蛋白的表达,抗Insulin、抗CTLA4Ig和抗CD40LIg抗体工作浓度分别为1∶100、1∶200、1∶200。

1.3 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 软件进行数据统计分析，单因素方差分析进行多组样本均数间的比较，t 检验进行2组样本均数的比较。

2 结果

2.1 胰岛移植后糖尿病大鼠的血糖变化

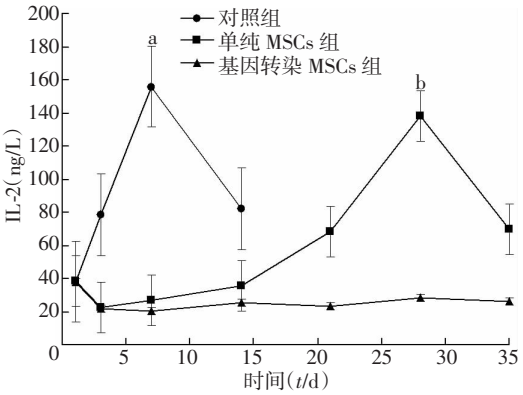
糖尿病大鼠移植后血糖即开始下降，移植后2～3 d恢复正常。对照组血糖平均在移植后8 d升高，单纯干细胞组和干细胞转染组血糖分别在21 d和49 d升高。

2.2 移植大鼠和胰岛移植物存活情况

对照组、单纯MSCs组和基因转染MSCs组移植物存活时间分别(10.2±2.1)、(23.5±6.8)和(52.1±7.3)d，各组间比较差异显著($P<0.05$)；移植大鼠的生存时间分别为(21.3±5.3)、(49.7±8.5)、(95.8±13.8)d，各组间比较和移植物存活时间相似($P<0.05$)。

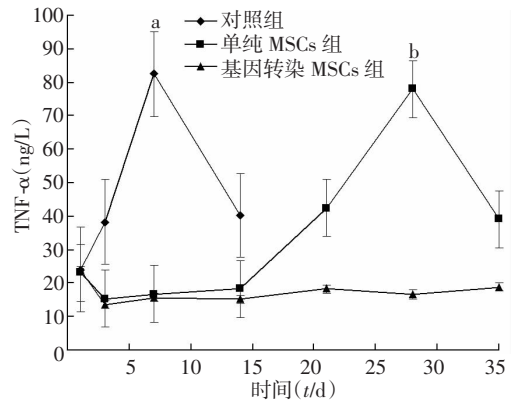
2.3 糖尿病大鼠胰岛移植后细胞因子变化

对照组TNF-α和IL-2的水平在移植后1周内均急剧上升，而IL-4和IL-10的水平较移植前显著下降($P<0.01$)；2个治疗组细胞因子水平的变化和对照组正好相反(图1～4)。



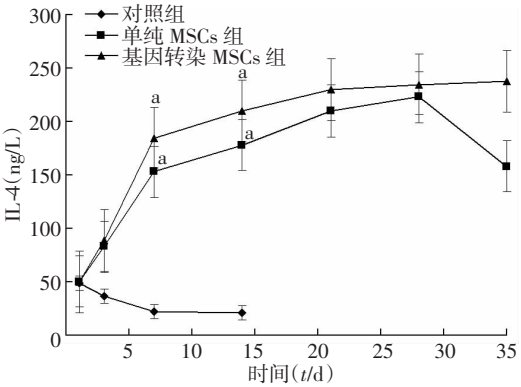
a：$P<0.01$，与单纯MSCs、基因转染MSCs组比较；b：$P<0.01$，与基因转染MSCs组比较

图1 胰岛移植不同时间大鼠IL-2水平的变化



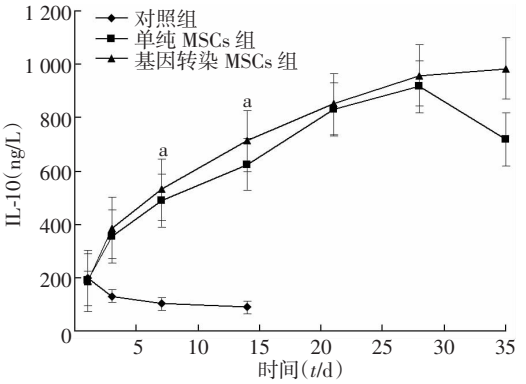
a：$P<0.01$，与单纯MSCs、基因转染MSCs组比较；b：$P<0.01$，与基因转染MSCs组比较

图2 胰岛移植不同时间大鼠TNF-α水平的变化



a：$P<0.01$，与基因转染MSCs组比较

图3 胰岛移植不同时间大鼠IL-4水平的变化



a：$P<0.01$，与基因转染MSCs组比较

图4 胰岛移植不同时间大鼠IL-10水平的变化

2.4 胰岛移植物病理学检查和免疫组织化学染色结果

①移植后15 d，2个治疗组移植物内可见成片的胰岛细胞，未见明显淋巴细胞浸润(图5)；免疫组化染色可见胰岛细胞内胰岛素蛋白的表达；而对照组移植物内胰岛细胞坏死和消失，并可见大量的淋巴细胞浸润。

②移植后30 d，基因转染MSCs组移植物内仍可见大量的胰岛细胞团，未见明显的淋巴细胞浸润；免疫组化染色见CTLA4Ig、CD40LIg和Insulin蛋白的表达(图6)；单独MSCs治疗组移植物内见胰岛细胞大量坏死和消失，明显的淋巴细胞浸润。

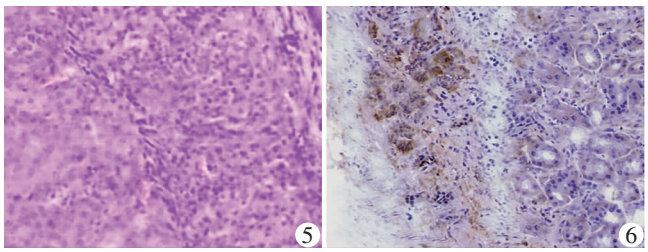


图5 移植后15 d单纯MSCs治疗组移植物HE染色观察 (×200)

图6 移植后30 d基因转染MSCs组移植物内胰岛素表达阳性 (S-P×200)

3 讨论

异种胰岛移植是解决供体短缺和治疗糖尿病的有效方法，但存在严重的排斥反应。常规免疫抑制剂虽

然可以抑制排斥反应,但同时带来多种毒副作用,并且免疫抑制剂对胰岛细胞也有损害作用。

MSCs是一类骨髓来源的非造血细胞的多能干细胞,具有较强的多向分化潜能,并且还具有低免疫原性,只表达少量的MHCⅠ型分子,不表达MHCⅡ类抗原及CD40、CD40L、B7、CD80等共刺激分子,使T细胞活化缺乏第2信号,导致T细胞对刺激的无反应性,可以促进免疫耐受的形成[7]。同时,MSCs还具有免疫调节作用。研究显示,将MSCs加入T淋巴细胞的混合培养体系,观察到混合淋巴细胞反应受到抑制,说明MSCs可抑制T淋巴细胞的增殖[8]。这种抑制作用是非抗原特异性的,不受MHC的限制,无论是来自供体和受体,还是第三者的MSCs都具有类似的免疫调节作用[9]。

我们研究结果显示,用MSCs对异种胰岛移植大鼠进行干预治疗,可延长移植大鼠和移植物的生存时间,抑制异种胰岛移植大鼠的排斥反应。有研究发现,给异基因皮肤移植小鼠输注MSCs,可延长皮瓣的存活时间[10]。同样在异基因胰岛移植小鼠模型,给予同源的MSCs能防止排斥反应的发生,使移植小鼠血糖长期维持在正常水平[11]。

MSCs抑制排斥反应的机制还不十分清楚,有学者认为可能与细胞间的相互作用和MSCs分泌的可溶性分子有关。另外,MSCs还可诱导辅助性T细胞(Th)细胞的分化偏移,抑制Th1型细胞生成IL-2、INF-γ和TNF-α,促进Th2型细胞分泌IL-4和IL-10等细胞因子。而细胞因子INF-γ、TNF-α和IL-2主要参与细胞免疫,促进排斥反应的发生。Th1和Th2之间还可以互相调节,Th1生成的INF-γ下调Th2型细胞的增殖,而Th2分泌的IL-4则下调Th1型细胞的增殖。

我们研究发现,对照组IL-2和TNF-α的水平在移植后1周内急剧升高,并达到高峰;而IL-4和IL-10的水平较移植前下降。MSCs治疗组胰岛移植后细胞因子的变化和对照组正好相反。说明MSCs可抑制Th1类细胞因子的生成,促进Th2类细胞因子的分泌。有研究用MSCs和纯化的免疫细胞一起培养,发现MSCs可引起Th1细胞生成INF-γ减少和Th2细胞分泌IL-4增多;同时,MSCs还能减少1型的树突状细胞(DC1)分泌TNF-α和增加DC2生成IL-10[12]。

我们研究还发现,用CTLA4Ig和CD40LIg基因转染MSCs治疗的胰岛移植大鼠和移植物存活时间较单纯MSCs治疗组和对照组显著延长,获得较长时间的存活。我们前期研究表明[5],基因转移CD40LIg可以通过阻断共刺激通路和下调相关Th1类细胞因子的表达,抑制异种胰岛移植大鼠的排斥反应,但不能形成免疫耐受。同样,我们研究也证实单独应用MSCs是不能维持胰岛移植大鼠和移植物长期存活的。这可能是由于排斥反应是一个多途径的、复杂的免疫过程,单独阻断一条途径不能获得稳定的免疫耐受。

综上所述,我们转移CTLA4Ig和CD40LIg基因修饰MSCs对异种胰岛移植大鼠进行干预治疗,通过CTLA4Ig和CD40LIg两条途径阻断共刺激通路,同时发挥MSCs免疫调节作用,抑制T淋巴细胞的增殖,延长了异种胰岛移植大鼠的存活时间,抑制了排斥反应的发生,为临床诱导异种胰岛移植免疫耐受提供了新的思路和方法。

参考文献:

[1] Pan Q, Fouraschen S M, Kaya F S, *et al*. Mobilization of hepatic mesenchymal stem cells from human liver grafts[J]. Liver Transpl, 2011, 17(5): 596-609.

[2] Rampino T, Gregorini M, Bosio F, *et al*. Mesenchymal stromal cells injection reduces acute rejection damage in a rat experimental model of kidney transplantation[J]. G Ital Nefrol, 2011, 28(2): 132-134.

[3] 赵玉金, 李瑶琛, 赖洁娟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外培养条件的优化及生物学特性[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(20): 2163-2167.

[4] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, *et al*. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival *in vivo*[J]. Exp Hematol, 2002, 30(1): 42-48.

[5] Zhang J, Li H, Jiang N, *et al*. Inhibition of rejection in murine islet xenografts by CTLA4Ig and CD40LIg gene transfer[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(21): 3106-3109.

[6] 萨姆布鲁克J, 弗里奇E T, 曼尼阿蒂斯T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学技术出版社, 1992: 16-35.

[7] Le-Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, *et al*. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells[J]. Lancet, 2004, 363(9419): 1439-1441.

[8] Ryan J M, Barry F P, Murphy J M, *et al*. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection[J]. J Inflamm (Lond), 2005, 2: 8.

[9] Le-Blanc K, Tammik L, Sundberg B, *et al*. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex[J]. Scand J Immunol, 2003, 57(1): 11-20.

[10] Han Q, Deng W, Li C, *et al*. Allogeneic adult stem cells establish long-term residence in recipient tissues and facilitate skin transplantation[J]. Exp Hematol, 2003, 31(7): 158-163.

[11] Ding Y, Xu D, Feng G, *et al*. Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogenic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9[J]. Diabetes, 2009, 58(8): 1797-1806.

[12] Aggarwal S, Pittenger M F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses[J]. Blood, 2005, 105(4): 1815-1822.

(**收稿**:2011-09-16;**修回**:2011-10-21)

(编辑 邓强庭)