文章编号:1000-5404(2012)11-1075-04

论著

半乳凝集素-9在诱导大鼠肝移植免疫耐受中的作用

刘一鸣,何 勇,张 艳,赖 星,李金政,龚建平 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 通过观察半乳凝集素-9(Galectin-9)在大鼠肝移植急性排斥模型中的作用,探讨其在诱导肝移植免疫耐受中的机制。**方法** 建立Lewis到BN大鼠肝移植急性排斥反应模型($n=30$),受体分为3组,每组10只。转染组于肝移植冷缺血期经门静脉转染重组galectin-9腺病毒质粒2 ml,空质粒组灌注2 ml空腺病毒载体,对照组灌注2 ml生理盐水。术后7 d各组处死5只大鼠,余观察生存率,采用Banff分级观察移植物排斥程度;实时荧光定量PCR检查肝组织Galectin-9、T-bet、RORγt mRNA表达水平;Western blot检测肝组织IFN-γ及IL-17蛋白表达水平。**结果** 术后7 d转染组Banff评分Ⅰ~Ⅱ级,空质粒组及对照组为Ⅲ级;转染组、空质粒组及对照组Galectin-9 mRNA水平依次为(1.14±0.05)、(0.46±0.03)、(0.49±0.07),转染组Galectin-9 mRNA水平较其余2组明显增加($P<0.05$)。转染组、空质粒组及对照组T-bet及RORγt mRNA表达水平分别为(0.27±0.07)、(1.26±0.12)、(1.31±0.08)和(0.57±0.13)、(1.57±0.09)、(1.58±0.07),转染组T-bet及RORγt mRNA表达水平明显低于其余2组($P<0.05$);转染组、空质粒组及对照组IFN-γ及IL-17蛋白表达水平分别为(0.39±0.06)、(1.28±0.11)、(1.47±0.05)和(0.64±0.07)、(1.52±0.05)、(1.67±0.04),转染组IFN-γ及IL-17蛋白表达水平低于空质粒组及对照组($P<0.05$)。**结论** Galectin-9通过清除Th1/Th17细胞诱导肝移植免疫耐受形成。

[关键词] 半乳凝集素-9;肝移植;免疫耐受;大鼠
[中图法分类号] R392.11; R392.4; R657.3 [文献标志码] A

Role of galectin-9 in inducing immune tolerance of rats after liver transplantation

Liu Yiming, He Yong, Zhang Yan, Lai Xing, Li Jinzheng, Gong Jianping (Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the mechanism of galectin-9 in inducing immune tolerance of rats after liver transplantation by observing its role in an acute rejection model of rats. **Methods** An acute rejection model of Lewis-BN rats after liver transplantation was established. Thirty rats were randomly divided into transfection group, blank plasmid group, and control group (10 in each group). Rats in transfection group were injected with 2 ml recombinant Ad-galectin-9 through the portal vein, those in blank plasmid group were injected with 2 ml adenoviral vector, and those in control group were injected with 2 ml normal saline during the cold ischemia period. Five rats in each group were sacrificed on day 7 after operation. Survival time of the remaining rats was observed. Degree of acute graft rejection was assayed according to the Banff scale. Expression levels of galectin-9, T-bet and RORγt mRNA, and IFN-γ and IL-17 protein in liver tissue were measured by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** Seven days after operation, the Banff scale was Ⅰ to Ⅱ in transfection group and Ⅲ in blank plasmid group and control group, the expression level of galectin-9 mRNA was significantly higher in transfection group than in blank plasmid group and control group (1.14±0.05 *vs* 0.46±0.03 and 0.49±0.07, $P<0.05$), while the expression level of T-bet and RORγt mRNA, and IFN-γ and IL-17 protein was significantly lower in transfection group than in blank plasmid group and control group (0.27±0.07 *vs* 1.26±0.12 and 1.31±0.08, 0.57±0.13 *vs* 1.57±0.09 and 1.58±0.07; 0.39±0.06 *vs* 1.28±0.11 and 1.47±0.05, 0.64±0.07 *vs* 1.52±0.05 and 1.67±0.04, $P<0.05$). **Conclusion** Galectin-9 can induce immune tolerance of rats after liver transplantation by clearing Th1 and Th17 cells.

[**Key words**] galectin-9; liver transplantation; immune tolerance; rats

Corresponding author: Gong Jianping, E-mail: gongjianping11@126.com

同种异体肝移植是目前治疗终末期肝脏疾病最有效的方法,移植后的急性排斥反应(acute rejection, AcR)是影响疗效的关键问题,而发生排斥反应的关键在于宿主T细胞的活化和功能[1]。现有的免疫抑制剂如他克莫司等虽能较好地控制排斥反应,但会产生

[通信作者] 龚建平,E-mail:gongjianping11@126.com

一系列毒副作用。因此,诱导移植术后免疫耐受成为避免移植物慢性失功及长期服用免疫抑制剂的最佳途径。最新研究发现,大鼠体内半乳凝集素-9(Galectin-9)活化后,与其表达于终末期分化的效应T细胞表面的配体T细胞免疫球蛋白粘蛋白-3(T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3, Tim-3)结合,在效应阶段特异性清除Th1细胞及Th17细胞,从而调节这两类细胞介导的免疫反应而受到广泛关注[2]。本研究通过体内转染大鼠Galectin-9基因重组腺病毒质粒,观察其在大鼠肝移植急性排斥反应模型中的作用及相关细胞因子的表达变化,试图证明其在大鼠肝移植免疫耐受产生中的重要作用,以期为临床肝脏移植术后诱导特异性免疫耐受提供新的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

纯系雄性6~8周龄Lewis(RTL1)大鼠30只及8~10周龄BN(RTln)大鼠30只,体质量160~180 g,购于重庆医科大学实验动物中心,饲养于重庆医科大学实验动物中心SPF实验室。供、受体术前8 h禁食,术后单笼喂养,不禁食、水。

1.2 主要试剂

总RNA提取试剂盒购自美国Promega公司;T-bet、RORγt RT-PCR引物由广州复能基因有限公司合成;大鼠IFN-γ,IL-17单克隆抗体购自美国Abcam公司;总蛋白提取试剂购自武汉谷歌生物技术有限公司。

1.3 大鼠Galectin-9基因重组腺病毒载体构建

大鼠Galectin-9基因重组腺病毒载体交由广州复能基因代为构建,利用RT-PCR法从大鼠脾脏中克隆出完整编码Galectin-9的cDNA,再定向插入到pShuttle-CMV穿梭质粒中,用脂质体法将穿梭质粒与腺病毒骨架质粒共转染HEK-293细胞,经扩增及纯化后制得高滴度病毒液。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠原位肝移植模型建立及分组 纯系Lewis和BN大鼠(各30只)参照Peng等[3]的改良Kamada双袖套法建立Lewis到BN大鼠原位肝移植急性排斥模型,实验动物按完全随机对照实验原则分为3组,每组10只:转染组于供体冷缺血期夹闭移植肝肝上及肝下下腔静脉,经门静脉灌注2 ml滴度为1.3×10^9 IU/ml的Galectin-9的腺病毒质粒,保存60 min;空质粒组灌注滴度为1.3×10^9 IU/ml的空载体2 ml;对照组灌注2 ml生理盐水,方法同转染组。术后7 d各组均处死5只受体,分别抽取下腔静脉血5 ml并切取肝中叶组织备检。各组剩余大鼠观察术后生存率。

1.4.2 肝脏组织病理观察 取肝中叶肝组织放入10%甲醛中固定24 h,常规脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、3 μm厚切片、脱蜡、脱水、HE染色,光学显微镜观察;根据Banff标准进行急性排斥反应评分。

1.4.3 Real-time PCR检测各组肝脏组织Galectin-9、T-bet、RORγt mRNA表达水平 按Trizol试剂盒说明书提取肝脏总组织RNA。Galectin-9上游引物5′-GAGATGTCTTTCCTTCAGCAC-3′,下游引物5′-GACCTTCCTAGGTCTCCAC-3′,扩增产物437 bp;T-bet上游引物5′-AACCAGTATCCTGTTCCCAGC-3′,下游引物5′-TGTCGCCACTGGAAGGATAG-3′,扩增片段224 bp;RORγt上游引物5′-TCTGGAAGCTGTGGGATAGA-3′,下游引物5′-GAGGAGCCTGTGGAGAAATAC-3′,扩增片段169 bp,内参β-actin上游引物5′-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3′,下游引物5′-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3′,扩增产物为150 bp。反转录后行荧光定量PCR,用Quantity One 4.62图像分析软件行光密度值测定,目的片段与β-actin光密度之比值作为目的片段mRNA相对表达量。

1.4.4 Western blot测定各组肝脏组织IL-17及IFN-γ水平 按照总蛋白提取试剂盒说明书提取总蛋白进行含量测定,常规行Western blot测定,一抗浓度稀释成1∶200;二抗浓度稀释成1∶2 000。显影后扫描,然后用UVP凝胶图像处理系统软件分析目的条带的灰度值。

1.5 统计学分析

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

2 结果

2.1 生存率观察

3组大鼠术后均常规进食、进饮,未作特殊处理,对照组及空质粒组大鼠从术后3 d开始精神变差,出现黄疸等表现,2组均只有1只大鼠生存超过7 d,7 d生存率20%。转染组大鼠术后状态良好,4只大鼠存活超过7 d,7 d生存率80%,明显高于对照组及空质粒组($P<0.05$)。

2.2 病理切片观察

转染组术后7 d肝脏病理表现为汇管区少至中量淋巴细胞浸润,胆管及血管形态尚可,未见明显侵犯;Banff评分Ⅰ~Ⅱ级,空质粒组及对照组表现为汇管区大量淋巴细胞浸润,胆管及血管受累,偶可见局部出血及坏死;Banff评分Ⅲ级(图1)。

2.3 各组肝脏组织Galectin-9、T-bet、RORγt mRNA表达水平

与空质粒组及对照组比较,转染组Galectin-9 mRNA水平表达明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$),证明质粒成功转入体内并表达;而转染组中T-bet和RORγt mRNA水平较空质粒组及对照组明显下降($P<0.05$)。见表1。

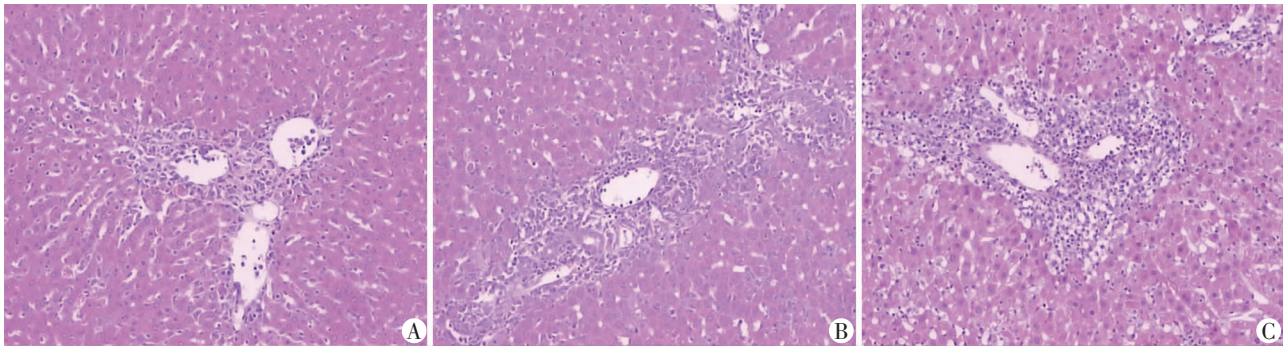
表1 各组肝脏组织Galectin-9、T-bet、RORγt mRNA相对表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	Galectin-9	T-bet	RORγt
转染组	1.14±0.05	0.27±0.07	0.57±0.13
空质粒组	0.46±0.03[a]	1.26±0.12[a]	1.57±0.09[a]
对照组	0.49±0.07[a]	1.31±0.08[a]	1.58±0.07[a]

a:$P<0.05$,与转染组比较

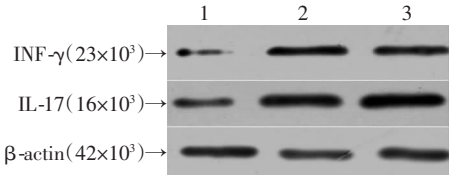
2.4 各组肝脏组织IL-17及IFN-γ蛋白表达水平

Western blot结果表明:转染组、空质粒组和对照组IFN-γ和IL-17相对蛋白表达水平分别为(0.39±0.06)、(1.28±0.11)、(1.47±0.05)和(0.64±0.07)、(1.52±0.05)、(1.67±0.04)。转染组中IFN-γ和IL-17蛋白水平均低于空质粒组及对照组($P<0.05$)。见图2。



A:转染组; B:空质粒组; C:对照组

图 1 术后 7 d 各组大鼠肝脏病理组织学表现 (HE ×200)



1~3:分别为转染组、空质粒组、对照组

图 2 Western blot 检测各组肝脏组织 IFN-γ 及 IL-17 蛋白表达

3 讨论

肝移植术后急性排斥反应的本质是由活化的 T 淋巴细胞介导的细胞免疫反应[4]。初始 $CD4^+$ T 细胞根据不同来源的抗原刺激,分化为效应 Th1 细胞、Th2 细胞、Th17 细胞等。效应 Th1 细胞主要分泌 IFN-γ、IL-2、TNF-α 等细胞因子,Th17 主要分泌 IL-17、TNF-α 等细胞因子,以上两类 T 细胞通过自身作用及分泌的细胞因子作用等途径,在介导炎症反应、自身免疫性疾病、肿瘤及移植排斥反应等过程中均发挥了重要的作用。而 Th2 细胞则在诱导免疫耐受等方面起着重要的作用[5-8]。

Galectin-9 属于半乳糖凝集素家族成员中的重要成员之一,在体内广泛分布,主要分布于树突状细胞、单核巨噬细胞、枯否氏细胞(Kupffer cells,KCs)等抗原提呈细胞中。其编码基因位于 17ql1.1,编码蛋白相对分子质量约 35×10^3,在 N′末端及 C′末端各含有一个同源的糖识别域(carbohydrate recognition domain, CRD),N 末端的糖识别域含有 148 个氨基酸,而 C 末端的糖识别域含有 149 个氨基酸。其活化需要 IFN-γ 的刺激[9-10]。前期研究[11-13]表明,Galectin-9 的配体 Tim-3 主要表达于终末期分化的 Th1 及 Th17 细胞表面,活化的 Galectin-9 与 Tim-3 通过 CRD 相连接,可立即触发 $Tim\text{-}3^+$ Th1/Th17 细胞钙离子内流,进而导致 Th1 及 Th17 细胞的细胞膜破裂,细胞坏死及凋亡,从而效应性清除 Th1 及 Th17 细胞。而 Th2 细胞则几乎不受影响。

前期研究[14-16]证明,效应 Th1 及 Th17 细胞及其分泌的细胞因子如 IFN-γ 和 IL-17 等,通过增加移植局部环境致炎性、上调相关炎症因子表达等多种途径参与排斥反应,在促进移植物排斥方面起着重要的作用。本研究发现,转染组中 Th1 的转录因子 T-bet 及 Th17 转录因子 RORγt mRNA 表达量及相关细胞因子 IFN-γ 和 IL-17 的蛋白表达水平较空质粒组及对照组均明显下降,提示 Galectin-9 能效应性清除移植局部环境中的效应 Th1 及 Th17 细胞,导致其分泌的细胞因子减少,从而降低或延缓其对移植物组织结构及功能的破坏,另一方面,由于 Th1 及 Th17 细胞减少,使得免疫平衡失调,使免疫反应向免疫耐受方向倾斜,从而对移植物起着保护作用,延长受体的有效生存时间及延缓组织病理性改变。

综上所述,本实验通过研究 Galectin-9 对大鼠肝移植急性排斥反应模型的作用,证实了其对 Th1 及 Th17 细胞的负性调控以及在诱导肝移植免疫耐受中得重要作用。诱导免疫耐受产生具有重要的研究意义,然而如何运用 Galectin-9 作为临床诱导肝移植免疫耐受治疗靶点还有待于进一步深入探讨。

参考文献:

[1] Pons J A, Revilla-Nuin B, Ramirez P, *et al*. Development of immune tolerance in liver transplantation[J]. Gastroenterol Hepatol, 2011, 34(3): 155-169.

[2] Zhu C, Anderson A C, Kuchroo V K. TIM-3 and its regulatory role in immune responses[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2011, 350: 1-15.

[3] 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.

[4] Thomson A W, Knolle P A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(11): 753-766.

[5] Sun H Y, Singh N, Cacciarelli T V, *et al*. Dysregulated expression of T-helper cell responses and susceptibility to infections in high-risk liver transplant recipients[J]. Transpl Immunol, 2008, 20(1/2): 68-72.

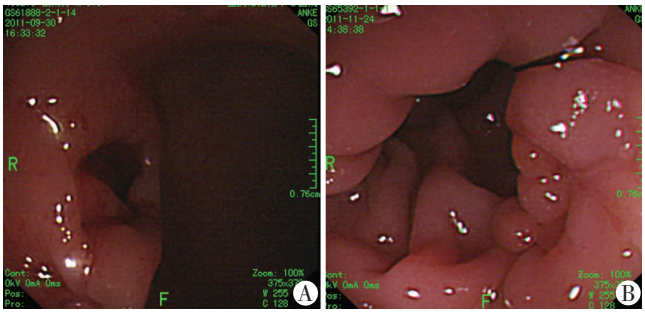
[6] Burrell B E, Bishop D K. Th17 cells and transplant acceptance[J]. Transplantation, 2010, 90(9): 945-948.

[7] Zygmunt B, Veldhoen M. T helper cell differentiation more than just cytokines[J]. Adv Immunol, 2011, 109: 159-196.

[8] Li J, Lai X, Liao W, *et al*. The dynamic changes of Th17/Treg cytokines in rat liver transplant rejection and tolerance[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(8): 962-967.
[9] Hirashima M. Ecalectin/galectin-9, a novel eosinophil chemoattractant: its function and production[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2000, 122 Suppl 1: 6-9.
[10] Dardalhon V, Anderson A C, Karman J, *et al*. Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b$^+$ Ly-6G$^+$ myeloid cells[J]. J Immunol, 2010, 185(3): 1383-1392.
[11] Zhu C, Anderson A C, Schubart A, *et al*. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity[J]. Nat Immunol, 2005, 6(12): 1245-1252.
[12] Nagahara K, Arikawa T, Oomizu S, *et al*. Galectin-9 increases Tim-3$^+$ dendritic cells and CD8$^+$ T cells and enhances antitumor immunity *via* galectin-9-Tim-3 interactions[J]. J Immunol, 2008, 181(11): 7660-7669.
[13] Kashio Y, Nakamura K, Abedin M J, *et al*. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway[J]. J Immunol, 2003, 170(7): 3631-3636.
[14] Damsker J M, Hansen A M, Caspi R R. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1183: 211-221.
[15] Yuan X, Paez-Cortez J, Schmitt-Knosalla I, *et al*. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy[J]. J Exp Med, 2008, 205(13): 3133-3144.
[16] Gong F, Shen Y, Zhang Q, *et al*. Obaculactone suppresses Th1 effector cell function through down-regulation of T-bet and prolongs skin graft survival in mice[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(2): 218-225.

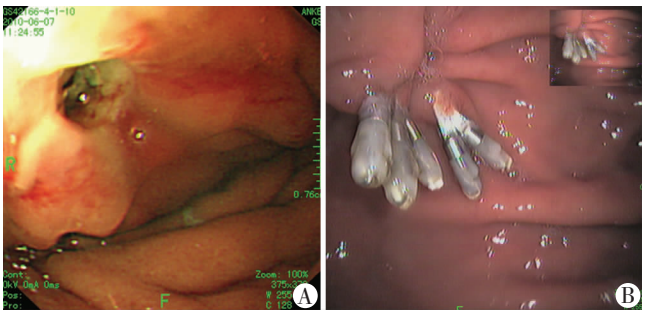
(收稿:2011-12-26;修回:2012-02-02)
(编辑 吴培红)

(上接1051页)



A:结肠镜检查中穿孔表现;B:钛夹治疗2个月后肠镜观察

图1 结肠镜检查中穿孔治疗前后观察



A:胃底间质瘤EMR术中穿孔表现;B:钛夹治疗15 d后胃镜观察

图2 胃底间质瘤患者EMR术中穿孔治疗前后观察

3 讨论

胃肠道穿孔最常见原因是消化性溃疡,其次是内镜治疗出现的并发症。目前EMR及内镜下黏膜剥离术(endoscopic submucosal dissection,ESD)的内镜治疗早期消化道原位癌、有蒂或无蒂息肉等已在各基层医院较为广泛运用,其中ESD治疗中出血、穿孔的风险大,操作难度较高。不论采取何种预防措施,EMR或ESD导致的穿孔仍不能完全避免,因此掌握内镜下及时有效的补救措施尤为重要。除此以外,内镜检查尤其是结肠镜检查过程中,肠穿孔的发生率随着基层医院内镜技术的不断开展呈上升趋势[2]

胃肠道空腔脏器自发性或医源性穿孔传统的方法是外科手术修补;同时极少数胃十二指肠较小的包裹性穿孔可采用非手术保守治疗。近年来,有研究[3]对胃肠道穿孔的外科手术治疗及内镜治疗进行分析比较,消化道穿孔内镜治疗也存在各种弊端,其治疗成功率主要受穿孔部位、直径,穿孔发生与治疗的时间间隔,术者的技术水平及熟练程度等因素影响。对于医源性穿孔来说其消化道较清洁,发现较及时,病灶炎症反应及水肿较轻,内镜下治疗效果较好。消化性溃疡所致的穿孔,组织水肿、脆性增加、其周围分泌物较多,因此治疗上较前者困难,24 h复查内镜显得十分重要,必要时可再次行内镜治疗。

有学者报道可经内镜在胃肠道瘘口注射生物纤维胶治疗难治性内瘘及外瘘,可达到75%的治愈率。有学者在体外动物实验中设计出内镜封闭装置模型对结肠穿孔进行修补。Sumiyama等[4]设计出使较大胃穿孔全层组织对合性缝合的可曲套管针锚状组织固定装置在动物实验阶段获得预期结果。目前应用最为广泛的是通过内镜下金属钛夹或尼龙绳结扎法治疗闭合穿孔[5]。对于食管良性穿孔还可通过内镜下带膜记忆金属支架植入。

我科已成功完成了数例胃肠医源性穿孔的内镜治疗,注意到在行钛夹或尼龙绳封闭穿孔时务必有较完整的组织支撑,避免出血及穿孔,且可根据穿孔直径选择封闭方式,一般情况下,对于直径>0.5 cm的较大穿孔可通过从裂口两端向中间逐步封闭的方式治疗。且术后常规禁食禁饮、抗感染治疗,减轻病变部位的炎症反应及水肿程度,减少钛夹脱落发生率。

参考文献:

[1] Tanaka S, Oka S, Kaneko I, *et al*. Endoscopic submucosal dissection for colorectal neoplasia: possibility of standardization[J]. Gastrointest Endosc, 2007, 66(1): 100-107.
[2] Rabeneck L, Paszat L F, Hilsden R J, *et al*. Bleeding and perforation after outpatient colonoscopy and their risk factors in usual clinical practice[J]. Gastroenterology, 2008, 135(6): 1899-1906.
[3] Raju G S, Fritscher-Ravens A, Rothstein R, *et al*. Endoscopic closure of colon perforation compared to surgery in a porcine model: a randomized controlled trial (with videos)[J]. Gastrointest Endosc, 2008, 68(2): 324-332.
[4] Sumiyama K, Gostout C J, Rajan E, *et al*. Endoscopic full-thickness closure of large gastric perforations by use of tissue anchors[J]. Gastrointest Endosc, 2007, 65(1): 134-139.
[5] 胡伟, 时昭红, 毛德华, 等. 内镜下金属夹治疗和预防消化道出血穿孔的价值[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2009, 17(5): 330-331.

(收稿:2011-12-28;修回:2012-04-05)
(编辑 王 红)