泌尿外科学专题 文章编号:0253-3626(2009)09-1191-02

ICOS 胞外区基因修饰的树突状细胞对移植肾存活的影响

范明齐,冯嘉瑜,肖 亚,黄赤兵
(第三军医大学附属新桥医院泌尿外二科,重庆 400037)

【摘 要】目的:探讨诱导共刺激分子(Inducible costimulator,ICOS)胞外区基因修饰的树突状细胞(Dendritic cells,DC)对移植肾存活的影响。方法:以 BN、Lewis 大鼠为肾移植供、受体;用 ICOS 胞外区基因重组腺病毒转染供体骨髓源性 DC 使之表达 ICOS 胞外区;将供体 DC 于肾移植前 24 h 经股静脉注入受体为实验组,未注射 DC 的受体为对照组;观察两组移植肾存活时间,术后第 20 d,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,实验组移植肾存活时间显著延长[(23.2 ± 3.08) d 与(8.5 ± 1.4)d],$P<0.01$)。术后第 20 d,实验组脾细胞对供体抗原刺激的反应明显低于正常对照(0.37 ± 0.06)与(0.84 ± 0.12),$P<0.01$,而对无关抗原刺激的反应与正常对照差异无显著性(0.76 ± 0.11)与(0.69 ± 0.09),$P>0.05$。结论:ICOS 胞外区基因修饰的供体 DC 可以明显延长大鼠移植肾存活时间。

【关键词】ICOS;树突状细胞;肾移植
【中国图书分类法分类号】R 617 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-11

Influence of dendritic cells modified with ICOS extracellular region on survival of renal allografts in rats

FAN Ming-qi, et al
(*Department of Urology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medcial University*)

【Abstract】*Objective*: To study the influence of donor dendritic cells (DCs) modified with ICOS extracellular region on the survival of renal allografts in rats. *Methods*: Bone marrow derived DCs of Brown Norway (BN) rats were modified with ICOS extracellular region gene recombined adenovirus and injected into Lewis rats 24 h before BN→Lewis kidney transplantation. Survival time of renal allografts was observed and one-way mixed splenic cell reaction (MSR) of the recipients to donors and the third party rats were performed by means of MTT on the 20th postoperative day. *Results*: Survival time of renal allografts was prolonged significantly [comparedwith control, (23.2 ± 3.08) d vs(8.5 ± 1.4) d, $P<0.01$]. On the 20th day, the recipients showed significant hyporesponsiveness to donors (compared with normal control, MSR was(0.37 ± 0.06) vs(0.84 ± 0.12), $P<0.01$, but showed normal reaction to the third party. *Conclusion*: Donor DCs modified with ICOS extracellular region can induce a significant prolongation of renal allografts survival.

【Key words】ICOS; Dendritic cells; Kidney transplantation

树突状细胞(Dendritic cells,DC)是目前发现的功能最强的 APC,在器官移植排斥反应中,其表面的 ICOSL 分子与抗原特异性 T 细胞表面的诱导共刺激分子(Inducible costimulator,ICOS)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[1]。但通过受体全身注射 ICOSL- ICOS 阻断剂所需的剂量大、影响范围广、特异性差,还可能造成全身性不良反应。为了提高治疗的靶向性,本研究采用 ICOS 胞外区基因对肾移植供体 DC 进行体外修饰,再将 DC 注入受体,观察了修饰后 DC 对移植肾存活的影响,探讨以 ICOS 胞外区基因修饰的供、受体 DC 延长移植肾存活的可行性及效能。

作者介绍:范明齐(1963-),男,副主任医师,副教授,博士,研究方向:肾脏移植。

1 材料与方法

1.1 实验材料

肾移植供体为近交系 Brown- Norway (BN) 大鼠(第三军医大学动物所提供),重 250~300 g;受体为近交系 Lewis 大鼠(第三军医大学动物所提供),重 250~300 g,雌雄不拘。Wistar 大鼠(第三军医大学动物所提供)作为无关淋巴细胞供体。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)。ICOS 胞外区基因重组的复制缺陷型腺病毒 AdvICOS 胞外区由作者构建,滴度为 5×10^9 pfu/ml。

1.2 方法

1.2.1 供、受体 DC 培养 根据文献方法[2]分离供、受体大鼠骨髓细胞，加入含 20%胎牛血清 RPMI1 640 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 85.0%以上的培养皿中 DC，用含 20.0%胎牛血清 RPMI1 640 重悬，调整细胞密度为 1×10^6 个 /ml，备用。

1.2.2 ICOS 胞外区基因对供、受体 DC 的修饰 按感染复数 (MOI)100 向每 mL DC 中加入 AdvICOS 胞外区，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 胞内表达 ICOS 阳性率，当阳性率达 95.0%时收集 DC，以 0.01 mol/L PBS 重悬，制成 1×10^6 个 /ml 细胞悬液。

1.2.3 ICOS 胞外区修饰的供体 DC 延长移植肾存活的作用 注入供体 DC 的为实验组(n=8)，未注入 DC 的受体为对照(n=8)。术前 24 h，受体 Lewis 大鼠经 1.0%异戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(100 mg/kg 体重)后，在显微镜下经股静脉注入 1×10^6 个修饰的 DC。按过去建立的方法[6]行 BN→Lewis 同种肾移植，以停止排尿为终点，计算移植肾存活时间。

1.2.4 移植肾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方法[3]，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 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 法检测前两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=8)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 统计处理

用 Excel 2003 进行方差齐性 t 检验。实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 供、受体 DC 培养以及 ICOS 胞外区的修饰

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 d 开始 DC 形态细胞逐渐增多，第 6、7 d 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 90.0%以上 DC 与 Adv ICOS 胞外区孵育 48 h 后检测各孔中 DC 的 ICOS 表达情况，阳性率为 92.3%~97.6%。

2.2 ICOS 胞外区修饰的 DC 对移植肾存活的影响

与对照组相比，实验组移植肾存活时间显著延长[(23.2±3.08) d 与(8.5±1.4) d，P<0.01)]。

2.3 移植肾延长存活期间受体大鼠免疫状态

术后第 10~13 d，对照组受体大鼠陆续死亡。术后第 18 d，实验组受体仍然全部存活，实验组脾细胞对供体抗原刺激的反应明显低于正常对照(0.37±0.06)与(0.84±0.12)，P<0.01，而对无关抗原刺激的反应与正常对照差异无统计学意义(0.76±0.11)与(0.69±0.09)，P>0.05。

3 讨 论

ICOS 是 CD28 家族中继 CD28、CTLA4 之后发现的第 3 个成员[4]。ICOS 的表达需要 TCR 信号的诱导，局限表达于活化后的 T 细胞上，故命名为诱导共刺激分子[1]。ICOS 胞外区通过竞争性结合 APC 上的 ICOSL 分子，阻断 ICOS/ICOSL 共刺激信号下调抗原特异性 T 细胞功能，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 ICOS 胞外区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。理论上，通过 Exvivo 基因治疗途径，用 ICOS 胞外区基因对体外培养的 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。

本研究中，术前输入经过 ICOS 胞外区修饰的供体 DC 显著延长了移植肾的存活。表明术前输入 ICOS 胞外区基因修饰的供体 DC 可很快使受体针对供体的 DSTC 发生功能明显下调，其遇到移植物时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。

既往本实验室对 CTLA4、TGFβ、CD154 和 PDL1 等分子对移植物和 DC 进行修饰，观察其在移植耐受诱导过程的作用[5-8]。我们发现单独使用某一种修饰分子均难以达到耐受的诱导，但是多分子联合运用，则可以大大延长移植物存活的时间。这也给我们一个提示：T 细胞的激活依赖多种途径，各途径之间有互补的效应，在移植耐受策略诱导上应该对多环节进行干预，否则难以取得满意的效果。

参 考 文 献

[1] Hutloff A, Dittrich A M, Beier K C, et al.ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28 [J]. Nature, 1999, 397 (6716): 263-266.

[2] Talmor M, Mirza A, Turley S, et al. Generation of large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(3): 811-817.

[3] Huang C B, Wu J, Yi S X, et al. Effect of B7- CD28 costimultory blockade on the survival of rat renal allografts[J]. Chin J Surg, 2001, 39(7): 553-555.

[4] Ozkaynak E, Gao W, Shemmeri N, et al. Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection[J]. Nat Immunol. 2001, 2(7): 591-596.

[5] 冯嘉瑜，张艮甫，王平贤，等. CD154 胞外区基因局部修饰对大鼠移植肾存活的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(2)：1068.

[6] 冯嘉瑜，张艮甫，黄赤兵，等. 转化生长因子 betal 修饰供体树突状细胞对大鼠肾脏移植物存活的影响[J]. 临床泌尿外科杂志，2005，20(6)：490.

[7] 冯嘉瑜，张艮甫，黄赤兵，等. 激活 T 细胞负性共刺激信号对大鼠同种异体肾移植存活的影响[J]. 四川医学，2006，27(1)：4.

[8] 冯嘉瑜，张艮甫，黄赤兵，等. PDL1 修饰树突状细胞对大鼠同种异体肾移植存活的影响[J]. 重庆医学，2006，35(16)：519.

(责任编辑：冉明会)