泌尿外科学专题 文章编号:0253-3626(2009)09-1141-03

霉酚酸合并致耐受树突状细胞延长小鼠心脏移植物的研究

李 凤[1],冯嘉瑜[2],肖 亚[2],王平贤[2],范明齐[2],张银甫[2],黄赤兵[2]
(1.重庆市三峡中心医院泌尿外科,重庆 404000;2.第三军医大学新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

【摘 要】目的:探讨霉酚酸(Mycophenolic acid,MPA)对致耐受性树突状细胞(Dendritic cells,DC)延长小鼠异位移植心存活效应的影响。方法:以 Balb/C、C57 小鼠为心脏移植供、受体,在供体 DC 培养过程中加入 3 种浓度 MPA,以 CTLA-4Ig 基因转染 DC 使之成为表达 CTLA-4Ig 的致耐受 DC;观察 DC 形态变化并检测受体脾细胞对上述 DC 的刺激反应。将未处理的致耐受 DC 以及 0.05 μmol/L MPA 处理 DC 于心脏移植前 72 h 分别注入受体(组 3、组 4),注入供体 DC 的受体为组 2,未注入 DC 的受体为对照(组 1),观察受体颈部移植心脏搏动时间以及心电图检查结果。结果:MPA 组 DC 形态老化延缓,脾细胞对 3 种浓度 MPA 处理的 DC 刺激反应均显著低于对未经 MPA 处理致耐受 DC 的刺激反应;与对照相比,组 1、组 2 移植心存活时间显著延长,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:MPA 预处理可降低致耐受 DC 的抗原提呈能力,提高其延长移植心存活的效能。

【关键词】霉酚酸;树突状细胞;心脏移植
【中国图书分类法分类号】R654.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-11

Influence of mycophenolic acid on survival prolongation of renal allografts with tolerogenic dendritic cells

LI Feng, et al
(*Department of Urology, Three Gorges Central Hospital of Chongqing*)

【Abstract】*Objective*: To study the influence of mycophenolic acid (MPA) on survival prolongation of heart allografts with tolerogenic dendritic cells (DCs) in rat s. *Methods*: The influence of MPA on CTLA-4Ig-gene transferred donor DCs was observed in vitro morphologically and functionally. The influence of MPA on the survival time of the heart allografts was observed in a Blab/C→C57 Cervical Heterotopic Heart transplantation model with recipients treated by CTLA-4Ig-gene transferred donor DCs. *Results*: The maturation and aging of DC were delayed and the stimulating ability of DC to recipient splenic cells was impaired significantly with the adding of MPA. Survival time of renal allograft s in CTLA-4Ig-gene transferred DC group was prolonged significantly and further prolonged with the adding of MPA. The allografts functioned well even after 45 d postoperatively in recipient t reated with MPA preconditioned DC. *Conclusion*: MPA preconditioning impairs the ability of antigen presentation of CTLA-4Ig-gene transferred donor DCs and enhances it s efficacy of survival prolongation of heart allografts in mice.

【Key words】Mycophenolic acid; Dendritic cells; Heart transplantation

树突状细胞(Dendritic cells,DC)是介导器官移植排斥反应的重要成分,通过其表面的 B7 分子与抗原特异性 T 细胞表面的 CD28 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]。前期研究中,本中心采用 B7 分子阻断剂 CTLA-4Ig 基因转染供体 DC,获得了表达 CTLA-4Ig 的致耐受 DC,延长了移植肾存活时间,但未能实现长期存活。我们观察到 CTLA-4Ig 基因转染过程中 DC 迅速老化现象[2],研究表明成熟 DC 表达更多的共刺激分子,可能阻碍 CTLA-4Ig 充分发挥作用[3]。资料显示,霉酚酸(mycophenolic acid,MPA)具有抑制 DC 成熟的作用[4]。本研究观察了 MPA 预处理对致耐受 DC 形态和体外功能影响,以及其对致耐受 DC 延长移植心脏存活效应的影响,旨在探讨提高致耐受 DC 效能的方法。

作者介绍:李 凤(1964-),男,副教授,
研究方向:移植免疫耐受诱导策略研究。
通讯作者:黄赤兵,男,教授,E-mail:huangchibing@medmail.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目批准号:30571863);重庆市自然科学基金资助项目(CSTC,2007BB50);第三军医大学校管课题资助项目(2004D109)。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠心脏移植供体为近交系 Blab/C 小鼠(本校西南医院烧伤研究所提供),受体为近交系 C57 小鼠(本校西南医院烧伤研究所提供),雌雄不拘。重组小鼠 GM-CSF、IL4 均为美国 R&D 产品;FITC 标记的山羊抗小鼠 DC 单抗 OX62,PE 标记的小鼠抗人 CTLA-4 单抗均为美国 Pharmingen 产品。MPA 购自 Roche Bioscience,溶于甲醇,4℃放置过夜,过滤除菌后备用。美国 BioRad 450 酶标仪,XTS 6A 手术显微镜(江苏镇江中天光学仪器厂)。CTLA-4Ig 基因重组的复制缺陷型腺病毒 AdvCTLA-4Ig 由作者构建[5],滴度为 5×10^9 pfu/ml。

1.2 方法

1.2.1 DC 培养 根据文献方法[6]分离供体小鼠骨髓细胞,一组加入含 20%胎牛血清 RPMI 1640 培养基的 24 孔板中以 GM-CSF 和 IL4 刺激培养,另外 3 组按上述方法培养的同时分别加入终浓度为 0.01 μmol/L、0.05 μmol/L 和 0.1 μmol/L 的 MPA。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,收集阳性率达 85%以上的培养皿中 DC,用含 20%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 CTLA-4Ig 基因转染 DC 按感染复数(MOI)500∶1 向每 ml DC 中加入 AdvCTLA-4Ig,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 表面 CTLA-4 的阳性率,收集阳性率达 95%以上的培养皿中 DC,以含 20%胎牛血清 RPMI1 640 重悬,制成 1×10^6 个 /ml 细胞悬液。

1.2.3 受体脾细胞对 DC 的刺激反应检测 以 DC 为刺激细胞,根据 DC 性质分为:未经其他处理的 DC(Control DC),CTLA-4Ig 修饰的致耐受 DC(CTLA-4IgDC),以及 0.01 μmol/L、0.05 μmol/L 和 0.1 μmol/L 3 种浓度 MPA 处理的致耐受 DC(MPA DC1、MPA DC2、MPA DC3),各种 DC 同时培养,以 CTLA-4Ig 修饰 DC 完毕为刺激起点(培养后第 8 d)。以受体脾细胞为反应细胞,按文献方法[7],用 1%异戊巴比妥钠腹腔注射麻醉受体,切取 C57 小鼠脾脏,分离脾细胞,用含 20%胎牛血清的 RPMI1640 重悬脾细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个 /ml。在 96 孔板中,将脾细胞和 DC 各 100 μl 加入同一孔中,每一反应组设 3 个复孔,分别测定受体脾细胞对供体 DC、CTLA-4Ig 修饰的致耐受 DC 以及 3 种浓度 MPA 预处理的致耐受 DC 的刺激反应。于 37℃,5%CO_2 条件下孵育细胞,每天轻轻摇动 96 孔板,使细胞充分接触、反应,孵育 72 h,MTT 法检测反应结果:每孔吸出培养液 50 μl,加 MTT 20 μl,37℃,继续孵育 5 h,吸出培养液 100 μl,加入无水乙醇 100 μl,置 37℃10 min,用酶标仪测 OD 值(波长 595 nm)。

1.2.4 DC 延长颈部异位移植心脏存活的效能 按注入受体 DC 的不同分为 4 组:未注入 DC 的受体为对照(组 1)(n = 6);注入未经任何处理的供体 DC 为组 2(n = 8);注入未经 MPA 处理的致耐受 DC 为组 3(n = 8);注入经 0.05 μmol/L MPA 处理的致耐受 DC 为组 4(n = 8)。术前 72 h,受体 C57 小鼠经乙醚麻醉后,在显微镜下经股静脉注入 1×10^6 个DC。按过去建立的方法[8]行 Blab/C→C57 颈部异位心脏移植,以颈部心脏停止搏动,心电图不能记录其电活动,计算移植心脏存活时间。

1.3 统计处理

方差分析检验处理各组数据,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DC 培养以及 CTLA-4Ig 的修饰

倒置显微镜下观察到,未经处理培养组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 形态的细胞并逐渐悬浮,10 d 后 DC 出现树突活动逐渐减少、僵直等老化现象。加入 MPA 后,DC 出现树突形态时间无明显变化,但其老化现象延迟,0.01 μmol/L 浓度组在 12 ~ 13 d 后出现,0.05 μmol/L 和 0.1 μmol/L 浓度组至 16 ~ 17 d 后才出现。培养 6 d 后,以流式细胞术检测各孔 DC 形态悬浮细胞表面标志 OX62,阳性率为 84.9% ~ 91.4%。各组 DC 与 AdvCTLA-4Ig 孵育 48 h 后检测各孔中 DC 的 CTLA-4 阳性率为 91.2% ~ 95.8%,孵育后 3 d,两种高浓度 MPA 组 DC 未见明显老化改变,低浓度 MPA 组和无 MPA 组 DC 出现明显老化现象。

2.3 不同 DC 对移植心脏存活的影响

MPA 处理的致耐受 DC 组(组 4)获得了最长的移植物存活时间,较其他组有显著差异。未经任何处理的供体 DC 输入组(组 2)心脏移植物存活时间最短,较对照组有显著差异。致耐受 DC 输入组(组 3),较对照组存活时间显著延长。

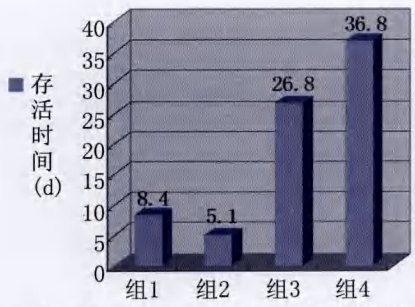
表 1 不同 DC 对受体脾细胞刺激能力

组别(刺激细胞)	脾细胞反应强度(OD)
组 1(Cont rol DC)	0.846 ± 0.051 ▲
组 2(CTLA-4Ig DC)	0.149 ± 0.012 ■
组 3(MPA DC1)	0.107 ± 0.010 ★
组 4(MPA DC2)	0.081 ± 0.007 ●
组 5(MPA DC3)	0.079 ± 0.005

注:▲与组 2 ~ 5 比较,$P < 0.001$;■与组 3 ~ 5 比较,$P < 0.01$;★与组 4,5 比较,$P < 0.05$;●与组 5 比较,$P > 0.05$

3 讨 论

作为目前发现的功能最强的抗原提呈细胞,DC 在诱导移植抗原特异性免疫低反应甚至耐受中的



MPA 处理的致耐受 DC 组(组 4)获得了最长的移植物存活时间,较其他组差异有统计学意义;未经任何处理的供体 DC 输入组(组 2)心脏移植物存活时间最短,较对照组差异有统计学意义;致耐受 DC 输入组(组 3),较对照组存活时间显著延长

图 1 受体小鼠心脏存活时间比较

作用正在得到广泛研究。目前发现高表达共刺激分子阻断剂如 CTLA-4Ig 的 DC 或者处于非成熟阶段的 DC,均有诱导受体抗原特异性 T 细胞产生免疫低反应状态的能力(即致耐受性)。本中心前期研究已经观察到 CTLA-4Ig 基因修饰 DC 在延长移植肾存活中的作用,但同时也观察到 DC 培养尤其是 CTLA-4Ig 基因修饰过程中 DC 的迅速成熟以及老化现象。研究发现 DC 成熟程度与诱导耐受能力成反比[9],其重要原因是 DC 表面共刺激分子的表达随成熟进程而增加。理论上,抑制 DC 培养和 CTLA-4Ig 基因修饰过程中 DC 的成熟及老化可能有助于提高 CTLA-4Ig 基因修饰 DC 的致耐受能力。

近年研究发现,免疫抑制剂霉酚酸酯(Mycophenolate mofetil,MMF)的活性代谢产物 MPA 不仅具有抑制 T、B 淋巴细胞的作用,还可通过延缓 DC 的成熟过程抑制其抗原提呈功能[4]。本研究观察到,在 DC 培养过程中加入 MPA 后,一般在培养后 10 d 出现的形态老化延迟发生,高浓度组可延迟 6~7 d 发生。CTLA-4Ig 基因转染 DC 过程中老化发生尤其迅速,MPA 可有效抑制这一过程的发生。供体 DC 经 CTLA-4Ig 修饰后对受体脾细胞的刺激能力明显减弱,而 MPA 的预处理进一步降低了其对脾细胞的刺激能力,显示 CTLA-4Ig 修饰与 MPA 联合应用具有降低 DC 抗原提呈能力的协同作用。MPA 对 DC 的上述作用在一定浓度范围内具有量 - 效关系,本研究中 MPA 的合适浓度为 0.05 μmol/L。

在进一步的小鼠心脏移植实验中观察到,未经处理的供体 DC 诱发移植心脏强烈排斥反应,使其提前丧失功能,可能是该 DC 在移植早期直接提呈供体抗原,激活抗供体抗原特异性淋巴细胞所致。经 CTLA-4Ig 修饰后的供体 DC 的则明显延长了移植心脏存活,显示 CTLA-4Ig 有效发挥了阻断 DC 与抗原特异性 T 细胞间 B7/CD28 共刺激信号的作用,可能使 T 细胞发生无能或凋亡。MPA 对 DC 的预处理进一步延长了移植心脏的存活时间,接近了长期存活的目标(> 100 d),显示 MPA 预处理提高了 CTLA-4Ig 修饰的供体 DC 延长移植肾存活的效能。

上述研究显示,MPA 预处理可延缓培养过程中以及 CTLA-4Ig 致耐受处理过程中 DC 的成熟和老化,可提高 CTLA-4Ig 修饰的供体 DC 延长移植肾存活的效能,但未能实现长期存活的原因有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Peche H, Trinite B, Martinet B, et al. Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors[J]. Am J Transplant, 2005,5(2):255-258.

[2] 黄赤兵,张良甫,范明齐,等. 共刺激阻断剂 CTLA-4Ig 基因修饰的树突状细胞对移植肾存活的影响[J].中国现代医学杂志,2006,16(1):57-59.

[3] Colic M,Stojic2Vukanic Z, Pavlovic B, et al. Mycophenolate mofetil inhibits differentiation,maturation and allostimulatory function of human monocyte derived dendritic cells[J]. Clin Exp Immunol,2003,134(1):63-65.

[4] Lagaraine C, Hoarau C, Chabot V,et al. Mycophenolic acid treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways[J]. Int Immunol,2005,17(4):351-3544.

[5] 黄赤兵,吴 军,易绍萱,等. 共刺激阻断剂 CTLA4Ig 基因重组腺病毒的构建与鉴定[J]. 重庆医学,2002,31(8):682-684.

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

[7] 黄赤兵,吴 军,易绍萱,等. 基因重组融合蛋白 B7-CD28 共刺激阻断剂对大鼠移植肾存活的影响[J].中华外科杂志,2001,39(7):553-556.

[8] 冯嘉瑜,贺伟峰,朱晓星,等.小鼠异位心脏移植模型的改良[J].中国比较医学杂志,2008,18(3):71-74.

[9] Nouri Shirazi M, Guinet E. Direct and indirect cross tolerance of alloreactive T cells by dendritic cells retained in the immature stage[J]. Transplantation,2002,74(7):1035-1038.

(责任编辑:冉明会)