DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.004
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
762 2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0762-03

CTLA4Ig基因转染猪皮异种移植的体外实验研究

郑峻松,吴 军,马 兵,罗高兴,易绍萱,贺伟峰,陈希炜 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探索重组腺病毒载体(Recombinant adenovirus, rAdv)介导CTLA4Ig基因转染猪皮异种移植免疫耐受的分子机制。方法 构建CTLA4Ig重组腺病毒载体,转染猪树突状细胞(Dendritic Cell, DC),以猪表皮细胞匀浆液为刺激原,观察DC递呈猪表皮抗原刺激人T细胞增殖、活化及信号转导的影响;同时,以CTLA4Ig-rAdv转染小鼠DC细胞,观察该DC膜表面分子CD40、CD80表达。结果 CTLA4Ig转染DC能显著抑制人外周血T淋巴细胞增殖能力($P<0.01$)和T细胞肌醇磷脂信号系统转导活性,IL-2分泌亦受到明显抑制($P<0.05$);转染CTLA4Ig的小鼠DC膜表面分子CD80表达降低($P<0.05$)。结论 腺病毒介导CTLA4Ig基因转染猪皮能诱导人外周血T淋巴细胞免疫耐受。

关键词:皮肤;CTLA4Ig;异种移植;免疫耐受;信号转导
中图法分类号:R392.11;R394.2;R622.1 文献标识码:A

Experimental study on the mechanism of CTLA4Ig transgenic swine derm xenotransplantation *in vitro*

ZHENG Jun-song, WU Jun, MA Bin, LUO Gao-xing, YI Shao-xuan, HE Wei-feng, CHEN Xi-wei (Institute of Burns Research, Southwest Hosptial, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of xenotransplantation immune tolerance by recombinant adenovirus (rAdv) CTLA4Ig transgenic swine derm. Methods A recombinant CTLA4Ig-Adenovirus expression vector was constructed and then transfected into swine dendritic cell (DC). The transfected dendritic cell was stimulated with swine derm antigen and cultured with human T lymphocyte. CD80 and CD40 of DC membrane were detected, then function and signal transduction mechanism (PI-PLC pathway) of T lymphocyte was observed. Results T lymphocyte proliferation ability and IL-2 secretion were suppressed significantly by the CTLA4Ig-rAdv transfected DC, signal transducing activity was also decreased. Conclusion The CTLA4Ig transgenic dendritic cell mediated by recombinant adenovirus vector could induce the immune tolerance for human peripheral T lymphocytes.

Key words: derm; CTLA4Ig; xenotransplantation; immune tolerance; signal transduction

创面问题是烧伤治疗的首要问题,深度烧伤创面需经皮肤移植才能愈合。但大面积、特大面积烧伤患者,其自体皮源严重不足,异种皮能暂时有效保护、覆盖、封闭烧伤创面,但它可激活机体免疫系统,而在短期内(2~4周)被排斥[1]。如果能延长异种皮在烧伤创面的存活期,将对烧伤治疗的关键问题——创面问题的解决提供极大帮助。分子生物学转基因技术的成熟和免疫学的发展为异种皮创面移植存活期的延长(甚至耐受)提供了可能。研究表明,急性细胞性排斥(主要是活化的T细胞)在异基因皮肤移植排斥中起着决定性作用,而在异种移植排斥反应中,由移植器官内的抗原提呈细胞(Antigen presenting cell, APC)向受者免疫细胞递呈抗原的"直接识别"是急性细胞性排斥的主要抗原识别方式[2]。本研究通过利用重组腺病毒载体将CTLA4Ig cDNA导入猪树突状细胞(Dendritic cell, DC),观察其膜共刺激分子CD40和CD80表达,及其活化人外周血T细胞能力;同时观察CTLA4Ig阻断B7-CD28共刺激通路后,T细胞活化的信号转导改变,从而阐明外源性CTLA4Ig能否介导人体T淋巴细胞对移植基因转染猪皮的免疫耐受,及介导诱发免疫耐受的分子机制。

1 材料及方法

1.1 实验动物

昆明种小鼠20只,雄雌各半,体重(24±2.0)g及广西小香猪(2~3月龄)6只,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 仪器及试剂

FACS流式细胞仪(Beckman),γ-闪烁计数仪(Beckman),低温超速离心机(HITACHI),酶联免疫仪(Bio-Rad);pCTLA4Ig质粒(由易绍萱博士构建),腺病毒表达载体试剂盒(TakaBa公司),λ噬菌体包装试剂盒(Stratagene公司),质粒提取转染试剂盒及内切酶(BM公司),尼龙毛纤维(上海中福公司),hIL-2 ELISA试剂盒(深圳晶美),信号转导试剂(Sigma),健康人外周血(西南医院血库),猪GM-CSF(美国Miregel教授惠赠)。

1.3 猪树突状细胞的分离培养及转染

取新鲜猪血10 ml,淋巴细胞分离液Percoll分离单个核细胞,调浓度至2×10^5/ml,以GM-CSF、IL-4、TNFα诱导培养成熟DC[3];CTLA4Ig-rAdv构建及转染按罗高兴等[1]的方法进行。

1.4 T淋巴细胞分离纯化

取健康人血8 ml,氯化铵红细胞溶解液裂解RBC,尼龙毛纤维分离T细胞[4],酸性α-醋酸萘酶(ANAE)染色,96%以上为T细胞,台盼蓝染色证明T细胞存活率>95%。

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(39993430-2);国家自然科学基金面上项目(39970756);国家科技部重点项目(96-920-20-10)
作者简介:郑峻松(1971—),男,四川省南充市人,博士研究生,讲师,主要从事烧伤后细胞免疫抑制机制及移植免疫机制方面的研究。电话:(023)68754148-8021
收稿日期:2001-01-04;修回日期:2001-03-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5　T 细胞增殖能力及 IL-2 分泌测定

分别将猪表皮细胞抗原(匀浆液)500 mg, Anti-CD3 8 μg, ConA 10 μg, 加入 1 ml 浓度 2× 10^5/ml DC 悬液中, 37 ℃, φ(CO_2)=5%孵箱培育 24 h, 加入 1 ml 2× 10^5/ml 人 T 淋巴细胞, 再次孵育 24 h, 离心收集上清, ELISA 法测定 IL-2 含量; T 细胞增殖能力按 MTT 法进行[4]。

1.6　信号转导指标测定

刺激原为猪表皮复合抗原, 活性测定指标包括: 胞膜 G 蛋白(G-Protein), 胞膜蛋白酪氨酸激酶(Protein tyrosine kinase, PTK), 胞浆 PTK, 转膜蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC), 胞浆 PKC, 胞浆游离钙[Ca^{2+}]浓度。取 1 ml 2× 10^5/ml 培养成熟 DC 悬液(胰酶消化贴壁细胞), 加入 500 mg 猪表皮细胞匀浆液, 同时混入 1 ml 2× 10^5/ml 分离纯化 T 淋巴细胞, 在 37 ℃, φ(CO_2)=5%条件下培养 24 h, 洗脱未贴壁 T 淋巴细胞, 分离信号转导酶, 测定方法按文献[5, 6]进行。[Ca^{2+}]浓度检测作平行管, 于加入刺激原 Anti-CD3 后培养 15 min 即分离 T 淋巴细胞检测[4]。

1.7　流式细胞仪测定小鼠树突状细胞 CD40、CD80 阳性表达

小鼠树突状细胞培养同样按文献[3]进行。取 1.0 ml 浓度为 2× 10^5/ml 培养成熟 DC 悬液, CTLA4Ig-rAdv 转染后继续培养 24 h, 直接法分别测定 CD40、CD80[4]。

1.8　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 STAT 5.0 统计程序处理, 进行方差分析, 方差齐性检验和 t 检验。

2　结果

2.1　FACS 流式细胞仪检测小鼠 DC 膜共刺激分子 CD40、CD80 阳性表达率

与未转染阴性对照组相比, CTLA4Ig-rAdv 转染小鼠树突状细胞膜共刺激分子 CD80 阳性表达率降低($P<0.05$), 而 CD40 表达无显著改变, 见表 1。

表 1　转染 CTLA4Ig 小鼠树突状细胞膜 CD40、CD80 阳性率改变(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of membrane CD40 and CD80 on CTLA4Ig gene transfected mouse DC(%, $\bar{x}\pm s$)

Parameter	Non-transgenic	Transgenic
CD40	77.20±9.20	58.50±6.15
CD80	70.10±6.90	42.50±3.20 *

*: $P<0.05$ *vs* Non-transgenic

2.2　不同刺激原刺激 CTLA4Ig-rAdv 转染猪 DC 对人 T 淋巴细胞增殖及 IL-2 分泌活性的影响

实验结果显示, 抗原刺激转染组及抗-CD3 刺激转染组与相应未转染对照组相比, 人 T 淋巴细胞增殖能力(MTT)及 IL-2 分泌均显著受抑($P<0.01$), 而 ConA 刺激后转染组与未转染组无明显差别; 三个转染组之间相比较, 表皮复合抗原刺激组和抗 CD_3 刺激组亦明显低于 ConA 刺激组, 三个非转染组相比较差异无显著性, 见表 2。

表 2　不同刺激原刺激猪 DC 对人 T 细胞增殖及 IL-2 分泌活性的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Influence of different stimulating factors on the proliferation of swine DC induced human T lymphocyte and IL-2 secretion($\bar{x}\pm s$)

Parameter	Derm composite antigen		Anti-CD3		ConA	
	T	Non-T	T	Non-T	T	Non-T
MTT(%)	95.5±7.85 **	158.75±12.10	86.3±9.10 **	175.20±19.29	160.55±7.25	152.30±10.10
IL-2(pg/ml)	1 230±119.2 **	2 370±187.50	1 325±91.0 **	2 590±185.50	2 160±218.00	2 270±195.50

T: CTLA4Ig transgenic group; Non-T: CTLA4Ig non-transgenic group; **: $P<0.01$ *vs* Non-T

2.3　表皮复合抗原刺激 CTLA4Ig-rAdv 转染猪 DC 诱导人 T 淋巴细胞信号转导机制的改变

实验结果显示, 与未转染组相比较, 转染组细胞浆游离[Ca^{2+}]非常显著降价($P<0.01$), 膜 G 蛋白、PTK、PKC 活性不同程度受抑, 胞浆 PTK 活性升高($P<0.05$), 转膜 PKC 活性亦非常显著升高($P<0.01$), 胞浆 PKC 活性二者无明显差异, 见表 3。

表 3　表皮复合抗原刺激转染猪 DC 诱导人 T 淋巴细胞信号转导机制改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Changes of human T lymphocyte signal transduction by swine cutaneous antigen stimulation($\bar{x}\pm s$)

Parameter	Transgenic	Non-transgenic
G-Protein (pmol·min^{-1}·mg^{-1})	12.21±4.39 *	16.39±0.61
M-PTK (pmol·min^{-1}·mg^{-1})	26.64±1.57 **	47.13±1.40
P-PTK (pmol·min^{-1}·mg^{-1})	123.13±5.14 *	82.57±6.65
M-PKC (pmol·min^{-1}·mg^{-1})	152.03±4.89 **	84.40±4.93
P-PKC (pmol·min^{-1}·mg^{-1})	75.21±4.20	73.12±6.44
[Ca2+] (nmol/ml)	92.04±51.90 **	219.57±34.50

M-PTK: Membrane PTK; P-PTK: Plasmic PTK; M-PKC: Membrane PKC; P-PKC: Plasmic PKC; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Non-transgenic group

3　讨论

英国 White 实验室 1995 年通过向猪受精卵导入人体衰变加速因子(DAF)编码基因, 首次培育出表达人补体调节蛋白的转基因猪, 在一定程度上成功地克服了远缘种间器官移植的超急性排斥反应, 把十分遥远的猪→人器官移植提上了日程[7]。因而也引起对随后出现的延缓性异种移植排斥反应(Delayed xenotransplantation rejection, DXR)的研究, 并使之成为晚近探索的新热点。通常认为, 异种移植涉及的机制太复杂, 问题的解决当在同种异体移植之后, 这种观点过于绝对。例如, 同种异体移植中由 HLA 决定的个体间组织不相容性, 一直是一个棘手的问题, 需进行等位基因分型和通过组织配型逐一选择 HLA 基因匹配的供受对。然而, 在异种移植中, 提交供器(官)的近交系猪种一旦确立, 供受者间的组织相容性问题即被简化为该供猪和人种间的 MHC 差异, 既不需要反复配型, 亦易于采用基因修饰等手段, 一劳永逸地解决不相容性问题。这便是异种移植可能更易于突破的原因。

由于在异种移植细胞性排斥机制中, 受者免疫细胞接受移植抗原存在"直接识别"和"间接识别"两种方式, 以"直接识别"方式占主导地位[8]。故本研究以猪树突状细胞(即直接识别过程中的抗原提呈细胞)为研究对

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

象，探索CTLA4Ig基因转染猪皮异种移植引起人体免疫反应的特征及其分子机制。由淋巴细胞增殖MTT试验和T细胞IL-2分泌结果可知：CTLA4Ig基因转染猪皮能显著抑制人T对异种抗原的反应，从而降低细胞性排斥反应发生的可能。本室前期研究亦提示[1]，转染外源性CTLA4Ig的小鼠异体皮肤移植存活时间明显延长。由于外源性CTLA4Ig能明显降低DC细胞CD80阳性表达率，据此推测无论CD80阳性率降低是由膜上CD80本身表达降低引起，还是由于CTLA4Ig封闭所致，它都将引起树突状细胞向T细胞传递的活化信号减弱（CD28-B7信号），从而抑制T细胞活化。本实验所进行的信号转导机制研究亦证明，外源性CTLA4Ig转染猪DC细胞明显抑制细胞跨膜及胞内信号转导（结果中胞浆PTK、和转膜PKC活性升高应该是对跨膜信号转导减弱的补偿），从而为外源性CTLA4Ig诱导异种移植免疫耐受提供了分子基础。对分别以猪表皮复合抗原、Anti-CD3和ConA作刺激原的实验结果综合分析，我们发现，CTLA4Ig主要抑制TCR-CD3和CD28通路，而对刀豆素A活化T细胞途径无明显影响，从而间接印证T细胞活化的双信号理论。国内外研究亦提示，外源性CTLA4Ig能延长异基因心、肾、胰岛移植器官的存活时间[9,10]。总之，虽然外源性CTLA4Ig基因转染猪皮的应用还有待临床试验进一步研究，但可以肯定CTLA4Ig基因转染猪皮将为临床大面积深度烧伤患者创面问题的解决，提供新的有效途径和手段。

参考文献：

[1] 罗高兴，吴 军，易绍萱，等. 重组腺病毒载体介导CTLA4Ig延长小鼠异体移植皮肤的存活[J]. 中华烧伤杂志，2000，16(1)：37—39.

[2] Paradis K, Langford C, Long Z, *et al*. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissues[J]. Science, 1999, 285(5 431): 1 236—1 241.

[3] 王月丹，谢 玮，邱玉华，等. 细胞因子诱导不同来源的贴壁细胞分化为树突状细胞的研究[J]. 上海免疫学杂志，2000，20(3)：140—144.

[4] 郑峻松，吴 军，彭代智，等. 严重烧伤后小鼠脾脏T淋巴细胞跨膜信号转导的改变与IL-2、IL-10分泌[J]. 中华烧伤杂志，2000，16(6)：352—354.

[5] Kong S K, Jerry H. Purification and characterization of protein tyrosine kinase from bovine spleen[J]. J Biol Chem, 1987, 262(6): 2 597—2 603.

[6] David L, Adams D, Thomas A, *et al*. Charaterization of a protein kinase C activity in interferon gamma treated murine peritonedal macrophages[J]. J Cell Physiol, 1985, 125(4): 486—491.

[7] Scotler D, Gearhart J. Putting stem cells to work[J]. Science, 1999, 283(5 407): 1 468—1 470.

[8] 周光炎. 胚胎干细胞和异种器官移植——21世纪移植免疫学面临的挑战[J]. 上海免疫学，2000，20(1)：7—8.

[9] Glysing-Jensen T, Raisanen-Sokolowski A, Sayegh M H, *et al*. Chronic blockade of CD_{28}-B_7 mediated T cell costimulation by CTLA4Ig reduces intimal thickening in MHC class I and II incompatible mouse heart allografts [J]. Transplantation, 1997, 64(12): 1 637—1 645.

[10] Roy-Chaudhury P, Nickerson P W, Manfro R C, *et al*. CTLA4Ig attenuates accelerated rejection in the mouse islet allograft model[J]. Transplantation, 1997, 64(1): 172—175.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)07-0764-01

成人前牙反𬌗修复治疗的桩核设计特点

Post-core design for restorative therapy of anterior crossbite of adult

裘松波，汪志德，林景春 （第三军医大学附属新桥医院口腔科，重庆 400037）

对不能做正畸治疗的成人前牙反𬌗，可以采用人工断牙再接或桩冠修复治疗[1]。为了增强治疗牙的抗根折强度和全冠的固位，近年来，我们在应用烤瓷熔附金属（PFM）全冠治疗成人前牙反𬌗中，对基牙预备和铸造金属桩核设计进行了一些改进，取得了良好疗效。

1 材料与方法

14例病人，23颗上颌前牙，其中中切牙6颗，侧切牙17颗。选择标准：成人前牙反𬌗，反覆𬌗不超过1/2冠长，反超𬌗小，无严重拥挤，治疗牙无明显松动，无明显骨性畸形。

牙体预备特点：治疗牙先常规去除牙髓和根管充填；若唇侧牙龈肥大、增生，则同时行龈切、龈成形术；观察1周，无明显临床症状，即可开始牙体预备。切割切端，使离开对颌牙切缘2 mm，并由唇侧斜向舌侧形成切斜面；一般此时已暴露髓室。可较大量地磨削牙舌侧，使舌侧呈唇向倾斜的斜面，并在舌侧颈部预备肩台。唇侧只少量磨改，不预备肩台。邻面按PFM冠常规预备。

桩核设计、制作特点：进行髓室和根管预备，并从切端开始向唇面扩展、贯穿部分牙冠，即使切端呈倒“凹”字形，凹深约2 mm；通过此贯穿部（即凹沟）可使桩钉与唇面核连接。舌侧和邻面不加蜡，只在唇侧加蜡形成核，以增加唇侧突度；从切端向颈部蜡逐渐变薄，在颈部呈刃状，加蜡核后的唇面呈唇向倾斜。常规铸造完成桩核。

2 结果

23颗反𬌗牙，按上述设计进行牙体预备和桩核制备，最后完成的PFM全冠就位顺利，全部解除反𬌗，呈浅覆𬌗，达到了前牙美观要求，固位良好。

3 讨论

提高了抗根折强度：常规桩冠治疗几乎需磨除全部牙冠。

（下转770页）

作者简介：裘松波（1962—），男，浙江省宁波市人，硕士，主治医师，讲师，主要从事口腔材料的生物学性能方面的研究。电话：(023)68755114-74645

收稿日期：2001-04-05；修回日期：2001-06-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net