DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.014
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
1050 2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)11-1050-03

CTLA4 Ig在诱导小鼠心脏移植免疫耐受中的作用

姜 庆[1],方玉华[1],吴 军[2],靳凤烁[1],李黔生[1],易绍萱[2],罗高兴[2] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042;[2]附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 通过建立小鼠心脏移植模型,探讨CTLA4 Ig在免疫抑制和诱导免疫耐受中的作用。方法 建立小鼠心脏移植模型,供体分别为DBA/2和615新生鼠心脏,受体为BALB/c小鼠,移植后分别予以CTLA4 Ig 0.1、1、5 mg·kg^{-1}·d^{-1},治疗1周,观察不同剂量CTLA4 Ig对新生鼠移植心脏存活时间的影响;BALB/c小鼠首次移植2周后再次移植DBA/2或615新生鼠心脏,观察CTLA4 Ig对再次移植心脏存活的影响。结果 与对照组相比,CTLA4 Ig 0.1 mg·kg^{-1}·d组,移植心脏的存活时间不能延长,CTLA4 Ig 1 mg·kg^{-1}·d和5 mg·kg^{-1}·d^{-1}组能显著延长心脏的存活时间,但两组间差异不显著($P>0.05$)。再次移植615心脏各组,移植心脏的存活时间均无显著延长,而再次移植DBA/2新生鼠心脏,CTLA4 Ig 1 mg·kg^{-1}·d^{-1}和5 mg·kg^{-1}·d^{-1}组,其移植心脏的存活时间仍然能显著延长($P<0.01$)。结论 CTLA4 Ig能延长新生鼠心脏移植存活时间,且能诱导抗原特异性免疫耐受。

关键词:免疫耐受;心脏移植;细胞毒性淋巴细胞相关抗原4融合蛋白
中图法分类号:R392.1;R654.2 文献标识码:A

Role of CTLA4 Ig in the induction of immune tolerance in mice with allogenic heart transplantation

JIANG Qing, FANG Yu-hua, WU Jun, JIN Feng-shuo, LI Qian-sheng, YI Shao-xuan, LUO Gao-xin (Department of Urology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: objective To study the role of CTLA4 Ig in the induction of immune tolerance in mice heart transplantation. Methods Using the model of mice heart transplantation from the donor DBA/2 mice to the BALB/c recipients, different doses of CTLA4 Ig were injected into the recipients for 1 week after operation to observe the effects of CTLA4 Ig on the survival time of grafted hearts. Two weeks later the hearts from the DBA/2 or 615 mice was retransplanted into the recipients to study the effects of CTLA4 Ig on heart retransplantation. Results CTLA4 Ig prolonged the survival time of grafted hearts and CTLA4 Ig could induce the donor specific immune tolerance. Conclusion CTLA4 Ig could prolong the survival time of heart graft and induce donor specific immune tolerance.

Key words: immune tolerance; heart transplantation; CTLA4 Ig

同种异体排斥反应是一个T细胞依赖的反应过程。近年来研究发现,T细胞免疫的产生需要抗原递呈细胞(APC)递呈特异性抗原给T细胞受体(TCR),但是TCR激活后的功能结果,有赖于T细胞上表达的与APC特异的结合的共刺激分子的激活,因此,抗原刺激既可以通过增殖分化,克隆扩增产生免疫反应,也可以在缺乏共刺激时出现免疫无反应状态[1,2],基于此,T细胞激活的双重信号学说,已为大家所公认[3]。共刺激分子中最为关键的便是B7家族[4],本研究通过重组人CTLA4 Ig阻断T细胞激活的B7/CD28共刺激通路,探讨其在诱导新生鼠心脏移植免疫耐受中的作用,以

基金项目:国家自然科学基金资助重大项目(39993430-2);国家科技部重点项目(96-920-20-10);全军"九五"医药卫生重点资助项目(98Z081)

作者简介:姜 庆(1966—),男,重庆市万州区人,博士,主治医师,讲师,主要从事器官移植及移植免疫方面的研究。电话:(023)68757344

收稿日期:2000-02-10;修回日期:2000-08-12

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

期为 CTLA4 Ig 的临床应用提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

实验用动物受体为 BALB/ c 纯系小鼠 80 只, 体重 18 ~ 22 g/ 只, 雌雄兼用; 供体分别为出生 24 h 内的 DBA/ 2 和 615 新生鼠心脏; CTLA4 Ig(烧伤研究所), Beckman 液体闪烁测定仪(美国), MPA-IV 型多导生物信号分析系统(上海第二军医大学)。

1.2　方法

1.2.1　小鼠心脏移植模型的建立　　参照 Brunner 等[5] 报道的方法, 略加改进, BALB/ c 小鼠用 2.5% 戊巴比妥钠(3 mg/ kg)腹腔注射麻醉后, 以强力碘局部消毒、剃毛。于耳廓背侧作一 5 mm 左右之横切口, 钝性分离皮下组织, 约 4 mm 左右深浅的空腔。用强力碘消毒新生鼠胸部, 迅速取下 24 h 以内新生鼠的 DBA/ 2 或 615 心脏, 加入 4 ℃ Hanks 液中, 待心脏搏动 2 次后迅速将心脏植入受体耳廓皮下, 用 6-0 无损伤缝线缝合一针, 心脏离体时间不超过 2 min。

1.2.2　脾淋巴细胞悬液的制备　　参照文献[6], 无菌条件下, 将脾脏切成 2 cm× 1 cm× 0.5 cm 小块, 用镊子轻轻挤出脾细胞, 然后用梯度离心法制备小鼠脾淋巴细胞悬液, 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基调整细胞浓度备用。

1.2.3　移植小鼠对 DBA/ 2 和 615 小鼠的单向混合淋巴细胞反应　　无菌条件下, 分别将 1×10^5 经 20 Gy ^{60}Co 照射的 DBA/ 2 或 615 小鼠脾淋巴细胞作为刺激原与 1×10^5 首次移植的 BALB/ c 小鼠脾淋巴细胞混合, 置于 24 孔板, 37 ℃, 5% CO_2 条件下孵育 7 d, 终止前 16 h 每孔加入 1 μCi 的 ^{3}H-TdR, 在 Beckman 液体闪烁测定仪测定结果, 以 cpm 表示。

1.2.4　实验分组　　实验动物受体 BALB/ c 纯系小鼠和供体 DBA/ 2 新生鼠各 80 只, 完全随机分为 4 组, 每组各 20 只; 其中每组随机抽取 6 只用于观察首次心脏移植的存活时间。除去手术失败动物, 其余 2 周后按照同样的方法, 随机分为 2 组进行对侧耳朵移植 DBA/ 2 或 615 新生鼠心脏, 每组 6 只, 术后不再给予 CTLA4 Ig 免疫治疗, 观察移植心脏的存活时间。对照组: 不作任何处理; CTLA4 Ig 0.1 mg·kg^{-1}·d^{-1}组: 术后腹腔注射 CTLA4 Ig 0.1 mg·kg^{-1}·d^{-1}治疗 7 d; CTLA4 Ig 1 mg·kg^{-1}·d^{-1}组: 术后腹腔注射 CTLA4 Ig 1 mg·kg^{-1}·d^{-1}治疗 7 d; CTLA4 Ig 5 mg·kg^{-1}·d^{-1}组: 术后腹腔注射 CTLA4 Ig 5 mg·kg^{-1}·d^{-1}治疗 7 d。

术后定期用 MPA-Ⅳ型多导生物信号分析系统, 以银丝电极观察心电图, 用 2~4 倍放大镜观察心肌搏动。术后 4 d 不能测出心电图者, 不纳入统计; 术后移植心脏心电图消失后进行移植心脏病理检查。

1.3　统计学分析

采用华西医科大学医用统计程序包在计算机上对实验数据进行统计学处理。

2　结果

2.1　各实验组移植心脏存活时间比较

心脏移植术后, 对照组移植心脏存活 6 d 左右; 与对照组比较 CTLA4 Ig 0.1 mg·kg^{-1}·d^{-1}治疗组移植心脏的存活时间未见明显延长($P>0.05$); 而 1 mg·kg^{-1}·d^{-1}治疗组, 其移植心脏存活时间明显延长, 但 5 mg·kg^{-1}·d^{-1}治疗组与 1 mg·kg^{-1}·d^{-1}治疗组比较, 差异无显著性($P>0.05$); 首次移植术后 2 周, 再次移植 615 新生鼠心脏各实验组, 均不能显著延长移植心脏的存活时间, 但是再次移植 DBA/ 2 新生鼠心脏, CTLA4 Ig 1 mg·kg^{-1}·d^{-1}及 CTLA4 Ig 5 mg·kg^{-1}·d^{-1}组, 其移植心脏的存活时间仍然显著延长, 与对照组比较, 差异非常显著($P<0.01$), 见表 1、2。

表 1　各组实验动物移植心脏存活时间的比较($\bar{x}\pm s$, t/ d)

Tab 1　Comparison of survival time of graft hearts between groups ($\bar{x}\pm s$, t/ d)

Groups	n	DBA/ 2-BALB/ c
Control	6	6.5±0.4
CTLA4 Ig 0.1 mg·kg^{-1}·d^{-1}	6	6.9±0.6
CTLA4 Ig 1 mg·kg^{-1}·d^{-1}	6	23.4±3.5**
CTLA4 Ig 5 mg·kg^{-1}·d^{-1}	6	25.1±3.8**

**: $P<0.01$ *vs* control

表 2　各组实验动物再次移植心脏存活时间的比较($\bar{x}\pm s$, t/ d)

Tab 2　Comparison of survival time of retransplantated hearts between groups ($\bar{x}\pm s$, t/ d)

Groups	n	615-BALB/ c	DBA/ 2-BALB/ c
Control	6	6.2±0.3	6.1±0.2
CTLA4 Ig 0.1 mg·kg^{-1}·d^{-1}	6	6.5±0.4	6.3±0.4
CTLA4 Ig 1 mg·kg^{-1}·d^{-1}	6	6.7±0.3	21.2±3.1**
CTLA4 Ig 5 mg·kg^{-1}·d^{-1}	6	6.3±0.5	23.5±2.9**

**: $P<0.01$ *vs* control

2.2　CTLA4 Ig 对供体和非相关第三者混合淋巴细胞反应的影响

首次移植术后 2 周, 在移植 BALB/ c 小鼠脾淋巴细胞与 615 小鼠脾淋巴细胞的单向混合淋巴细胞反应中, 实验各组与对照组比较, 相差不显著($P>0.05$); 而在与 DBA/ 2 小鼠脾淋巴细胞的单向混合淋巴细胞反应中, 对照组及 CTLA4 Ig 0.1 mg·kg^{-1}·d^{-1}组, 淋巴细胞增殖差异不显著($P>0.05$); 而 CTLA4 Ig 1 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和 5 mg·kg^{-1}·d^{-1}组, 其淋巴细胞的增殖活性受到显著抑制, 与对照组比较, 相差非常显著($P<0.01$), 见表 3。

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

表3 CTLA4 Ig对供体和非相关第三者混合淋巴细胞反应的影响($\bar{x}\pm s$, min^{-1})

Tab 3 Effects of CTLA4 Ig on the MLR of the corresponding antigen and the third-party antigen($\bar{x}\pm s$, min^{-1})

Groups	Corresponding antigen	Third-party antigen
Control	6 792±1 082	6 235±987
CTLA4 Ig 0.1 mg·kg^{-1}·d^{-1}	6 389±971	6 517±1 164
CTLA4 Ig 1 mg·kg^{-1}·d^{-1}	2 174±423**	6 294±1 014
CTLA4 Ig 5 mg·kg^{-1}·d^{-1}	1 985±362**	5 982±897

**: $P<0.01$ *vs* control

3 讨论

在同种异体排斥反应中,T细胞是主要的效应细胞,所以临床应用的抗排斥反应药物,其主要目的是抑制受者的免疫功能,尤其是T细胞的功能。研究表明,T细胞的激活需要抗原递呈细胞(APC)双重信号的刺激,即TCR与主要组织相容性抗原复合物(MHC)结合,同时需要细胞间互相作用的第二信号系统即"共刺激系统"的作用,因此,抗原的刺激可以导致T细胞的增殖、分化、克隆扩增等免疫反应,但是如果缺乏共刺激分子刺激,T细胞将出现反应无能(Anergy)或克隆丢失(Clone deletion)。B7/CD28是T细胞激活最重要的共刺激分子之一,CTLA4是表达在T细胞表面的与CD28序列非常相似,并能竞争性的与B7结合的分子,它在T细胞的激活中,具有阻断B7/CD28信号传导通路,负调和终止免疫反应的功能。CTLA4在不同种属间具有高度同源性,而且在人小鼠、大鼠和兔的胞浆尾部分具有100%的同源;CTLA4 Ig是CTLA4胞外区与人免疫球蛋白Ig恒定区相结合的融合蛋白[7,8],关于CTLA4 Ig在免疫耐受中的作用,目前研究甚少,Lenschow等[9]研究发现CTLA4 Ig能延长异种胰腺移植存活时间,Hale等[10]研究发现CTLA4 Ig与传统免疫抑制剂联合应用能延长同种异体器官移植存活时间。

本研究结果发现,小剂量的CTLA4 Ig(0.1 mg·kg^{-1}·d^{-1})不能延长移植心脏存活时间,这可能是由于小剂量CTLA4 Ig不足以阻断B7/CD28信号传导,从而不能抑制T细胞的激活。随着CTLA4 Ig剂量的增加,移植心脏的存活时间明显延长,但继续增加CTLA4 Ig剂量,移植心脏的存活时间并不能继续延长,这可能是由于APC细胞上B7分子表达有限,同时尚有除B7/CD28以外的其它共刺激分子及第一信号系统的存在。

当2周后再次移植DBA/2新生鼠心脏时,CTLA4 Ig 1 mg·kg^{-1}·d^{-1}组及CTLA4 Ig 5 mg·kg^{-1}·d^{-1}组,再移植心脏存活时间仍然显著延长。而移植615新生鼠心脏,移植心脏存活时间与对照组比较差异不显著,说明CTLA4 Ig能诱导免疫耐受,而且这种免疫耐受是抗原特异的。在与DBA/2单向混合淋巴细胞反应中,CTLA4 Ig 1 mg及5 mg组,其淋巴细胞的增殖活性受到显著抑制,这可能是由于CTLA4 Ig使T细胞出现反应无能,或克隆丢失,从而抑制了T细胞的增殖。但在与615小鼠的单向混合淋巴细胞反应中,其淋巴细胞的增殖活性无明显变化,进一步说明CTLA4 Ig对T细胞诱导的免疫耐受具有抗原特异性。

总之,随着对T细胞共刺激信号通路认识的深入,通过阻断共刺激通路来抑制免疫和诱导免疫耐受,将为器官移植的免疫治疗带来新的思路和方法,从而进一步提高器官移植的成功率。

参考文献:

[1] Jenkins M K, Ashwell J D, Schwartz R H, *et al*. Allogeneic none-T spleen cells restore the responsiveness of normal T cell clones stimulate with antigen and chemically modified antigen-presenting cells[J]. J Immunol, 1988, 140(10): 3 324—3 330.

[2] Mueller D L, Jenkins M K, Schwartz R H. An accessory cell derived costimulatory signal acts independently of protein kinase C activation to allow T cell proliferation and prevent the induction of unresponsiveness[J]. J Immunol, 1989, 142(4): 2 617—2 624.

[3] Schwartz R H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy[J]. Science, 1990, 248(4 961): 1 349—1 356.

[4] Freeman G J, Freeman A S, Sege J M *et al*. B7 a new member of the Ig superfamily with unique expression in activated and neoplastic B cells[J]. J Immunol, 1989, 143(1): 2 714—2 721.

[5] Brunner K T, Mauel J, Cerottni J C, *et al*. Cardiac allograft in mice[J]. Immunology, 1968, 14(1): 181—188.

[6] Ohzato H, Monacoo A P. Induction of specific unresponsiveness (tolerance) to skin allografts by intrathymic donor specific splenocyte injection in antilymphocyte serum-treated mice[J]. Transplantation, 1992, 54(9): 1 090—1 097.

[7] Dariavach P, Mattei M G, Golstein P, *et al*. Human Ig superfamily CTLA4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA4 cytoplasmic domains[J]. Eur J Immunol, 1988, 18(12): 1 901—1 905.

[8] Brunet J F, Denizot F, Luciani M F, *et al*. A new member of the immunoglobulin superfamily CTLA4[J]. Nature, 1987, 328(6 127): 267—270.

[9] Lenschow D J, Zeng Y. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4 Ig[J]. Science, 1992, 257(5 071): 789—792.

[10] Hale D A, Gottschalk R, Maki T, *et al*. Use of CTLA4 Ig in combination with conventional immunosuppressive agents to prolong allograft survival[J]. Transplantation, 1997, 64(6): 897—900.

(编辑 薛国文)

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