

学校编码: 10384
学号: 24520141153586

分类号__密级__
UDC__

廈門大學

硕士学位论文

三氧化二砷对 T 细胞抑制作用的机制研究
The Mechanism of Arsenic Trioxide on T cells

杜菲菲

指导教师姓名: 齐忠权 教授

专业名称: 药理学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩日期: 2017 年 5 月

2017 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):
年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
第一章 前 言	1
1.1 器官移植概况	1
1.1.1 器官移植情况概述.....	1
1.1.2 移植物生存期.....	1
1.2 器官移植排斥反应类型及其机制概述	2
1.2.1 超急性排斥反应.....	2
1.2.2 急性排斥反应.....	2
1.2.3 慢性排斥反应.....	3
1.3 T 细胞与器官排斥反应.....	3
1.3.1 同种异体识别途径.....	4
1.3.2 T 细胞的激活	5
1.4 免疫抑制剂发展与应用	6
1.4.1 皮质激素类免疫抑制剂.....	6
1.4.2 抗代谢类抑制剂.....	6
1.4.3 钙调磷酸酶抑制剂类 (CNI)	7
1.4.4 雷帕霉素靶蛋白抑制剂 (mTOR)	8
1.4.5 中药类免疫抑制剂.....	8
1.4.6 单克隆或多克隆抗体类抑制剂.....	9
1.5 三氧化二砷在器官移植中的研究进展	9
1.6 三氧化二砷与 MAPK 信号通路	10
1.6.1 MAPK 信号通路	10
1.6.2 三氧化二砷与 MAPK 信号通路.....	10
1.6.3 MAPK 信号通路与 T 细胞.....	11
1.7 本研究的目 的、意义和内容	13
1.7.1 研究目的.....	13

1.7.2 研究意义.....	14
1.7.3 研究内容.....	14
第二章 材料与方法	15
2.1 实验材料	15
2.1.1 实验动物.....	15
2.1.2 实验试剂.....	15
2.1.3 实验仪器.....	18
2.1.4 主要耗材.....	19
2.2 研究方法	20
2.2.1 细胞学实验与方法.....	20
2.2.2 免疫学实验与方法.....	23
2.2.3 转录组测序 (RNA-seq)	28
2.2.4 统计学分析.....	29
第三章 结果与讨论	30
3.1.三氧化二砷抑制 T 细胞增殖.....	30
3.1.1 三氧化二砷抑制 T 细胞的增殖.....	30
3.1.2 三氧化二砷不能诱导 T 细胞克隆无能	31
3.1.3 三氧化二砷不能诱导调节性 T 细胞的生成.....	32
3.1.4 三氧化二砷诱导 T 细胞凋亡	33
3.2 转录组测序 (RNA-seq) 研究三氧化二砷对 T 细胞的作用机制.....	34
3.2.1 差异表达分析.....	35
3.2.2 差异基因 GO 富集分析.....	37
3.2.3 差异基因 KEGG 富集分析	40
3.3 MAPK 参与三氧化二砷抑制 T 细胞的机制	43
3.3.1 三氧化二砷与 MAPK 信号通路	43
3.3.2 三氧化二砷, MAPK 信号通路与 Bcl-2	46
3.4 讨论	47
第四章 结论与展望	53

参考文献	54
附 录	66
附录一：图表索引	66
附录二：缩略语及中英文对照	67
附录三：攻读硕士期间发表和待发表的学术论文	69
致 谢	70

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

Chinese Abstract	I
English Abstract	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Organ transplantation	1
1.1.1 Overview of organ transplantation	1
1.1.2 Latest survival of organ transplantation.....	1
1.2 The different types and mechanisms of organ transplantation	2
1.2.1 Hyperacute rejection	2
1.2.2 Acute rejection	2
1.2.3 Chronic rejection.....	3
1.3 The effects of T cells on organ transplantation	3
1.3.1 The ways involved in alloantigen recognition	4
1.3.2 T cells activation.....	5
1.4 The development and application of immunosuppressant	6
1.4.1 Corticoids.....	6
1.4.2 Antimetabolites	6
1.4.3 Calcineurin (CNIs)	7
1.4.4 Mammal target of rapamycin inhibitors (mTORI)	8
1.4.5 Chinese traditional medicine.....	8
1.4.6 Monoclonal and polyclonal antibody	9
1.5 Overview of arsenic trioxide in organ transplantation	9
1.6 Overview of MAPK pathway	10
1.6.1 MAPK pathway	10
1.6.2 The effect of arsenic trioxide on MAPK pathway	10
1.6.3 MAPK pathway involved in T cells activity.....	11
1.7 Purpose,significance and contents of this study	13
1.7.1 Purpose.....	13

1.7.2 Significance.....	14
1.7.3 Contents	14
Chapter 2 Materials and Methods	15
2.1 Materials	15
2.1.1 Animals	15
2.1.2 Main reagents.....	15
2.1.3 Main instruments	18
2.1.4 Main consumable	19
2.2 Methods.....	20
2.2.1 Experiments of cells.....	20
2.2.2 Experiments of immunology.....	23
2.2.3 RNA-seq	28
2.2.4 Statistical analysis	29
Chapter 3 Results and Discussion	30
3.1.The effect of arsenic trioxide on T cells.....	30
3.1.1 Arsenic trioxide inhibits T cells proliferation.....	30
3.1.2 The effect of Arsenic trioxide T cell energy	31
3.1.3 The effect of Arsenic trioxide on Treg	32
3.1.4 The effect of Arsenic trioxide on T cells apoptosis	33
3.2 The study based on RNA-seq	34
3.2.1 Analysis of differential genes	35
3.2.2 Enrichment of GO term among differential genes.....	36
3.2.3 Enrichment of KEGG among differential genes.....	40
3.3 The mechanism of Arsenic trioxide on T cells.....	43
3.3.1 The effect of Arsenic trioxide on MAPK pathway	43
3.3.2 Arsenic trioxide, MAPK pathway and Bcl-2	46
3.4 Discussion.....	47
Chapter 4 Conclusion and Prospect.....	53

References	54
Appendices	66
Figure index	66
Abbrevations	67
My Publication	69
Acknowledgments	70

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

目的: 三氧化二砷自被发现对急性早幼粒细胞白血病具有特殊疗效以来受到医学界的广泛关注。随着研究的不断深入,三氧化二砷被证实对多种实体瘤及自体免疫性疾病均有疗效,应用前景广阔。将三氧化二砷引入器官移植研究中后发现,其可延长同种异体小鼠心脏移植和胰岛移植物的生存期,但具体机制尚未研究清楚,本文在此基础上探索了三氧化二砷在体外抑制 T 细胞活动的机制,为之后的动物体内实验机制研究及临床应用提供理论基础。

方法: 我们首先将脾脏 T 淋巴细胞提取出来,三氧化二砷处理后用 Brdu 增殖实验检测 T 细胞的增殖情况,继而用流式细胞术检测 Treg 细胞的比例变化及 T 细胞凋亡情况。之后我们利用高通量测序技术对三氧化二砷处理后的 T 细胞及对照组 T 细胞进行转录组测序,分析测序结果挖掘潜在的作用靶点及作用通路。在测序结果的基础上用蛋白免疫印迹技术验证三氧化二砷的作用靶点,并进一步探索可能的作用机制。

结果: 我们验证了三氧化二砷在体外可以有效抑制 T 细胞的增殖,在 $2\mu\text{M}$ 的时候抑制效果已经非常显著。流式结果表明三氧化二砷不能诱导 T 细胞无能和 Treg 的生成,但可以促进 T 细胞凋亡,推测其可能是通过诱导 T 细胞凋亡来实现免疫抑制作用。测序结果证实了三氧化二砷组与对照相比,多种与免疫系统相关的差异基因表达下调,且能够显著富集到免疫系统相关的通路上,最后的蛋白免疫印迹实验证明了三氧化二砷可以影响抗凋亡蛋白 Bcl-2 和凋亡蛋白 Caspase3 的表达及 MAPK 信号通路中 P38 等蛋白的磷酸化水平,且 P38 与 Bcl-2 之间存在相互作用。

结论: 三氧化二砷在体外可以抑制 T 细胞的增殖,具体的作用机制可能是通过抑制 P38 MAPK 信号通路的激活来抑制 T 细胞增殖,同时由于 P38 的磷酸化减弱使 Bcl-2 的表达下降,促进了 T 细胞的凋亡

关键词: 三氧化二砷; T 细胞; 机制

Abstract

Objective: Arsenic trioxide (As₂O₃) has been widely recognized since it regarded as a specific drug for acute promyelocytic leukemia (APL). With the study, the effect of Arsenic trioxide on various solid tumor and autoimmune diseases has been verified, which provides it prospect of application. Arsenic trioxide can prolong the survival of allografts in organ transplantation, however, the specific mechanisms are unknown. We studied the mechanism of Arsenic trioxide in inhibiting T cell proliferation and provided a theoretical basis for in vivo study and clinical application.

Method: We first extracted the T cells from spleen and tested the proliferation of T cells by Brdu after T cells were dealt with Arsenic trioxide. Then we tested the percentage of Treg and apoptosis cells by flow cytometry. We also use RNA-seq to study the potential targets and pathways involving in the inhibition of Arsenic trioxide on T cells. Based on this, we tested the proteins and pathways with Western Blot.

Results: We verified that Arsenic trioxide can inhibit the proliferation of T cells in vitro and it had significant effect at 2 μ M. Arsenic trioxide cannot promote the production of Treg and T cell energy, while it can increase the percentage of apoptosis of T cells. RNA-seq data show that Arsenic trioxide has a close relationship with immune system. The results of Western Blot indicate that Arsenic trioxide plays a role in expression of Bcl-2 and P38, and there is a relationship between the Bcl-2 and P38.

Conclusion: Arsenic trioxide inhibits the T cells proliferation via P38 MAPK pathway Bcl-2 is involved in the process of T cells apoptosis induced by Arsenic trioxide and there is a interaction between Bcl-2 and P38.

Key Words: Arsenic trioxide; T cells; Mechanism.

第一章 前言

1.1 器官移植概况

1.1.1 器官移植情况概述

1954 年美国波士顿的医生成功的在一对同卵双胞胎之间进行了肾移植，开创了现代器官移植的历史。1963 年，美国托马斯·斯塔瑞教授首次尝试了人类肝脏移植，同年，美国的詹姆斯·哈迪医生进行了历史上第一例的肺移植。1967 年，南非克里斯蒂安·博纳德博士成功的完成了世界上第一例心脏移植。时至今日，随着器官移植技术越来越成熟，辅助检验设备日臻完善以及免疫抑制剂的开发使用，器官移植已成为治疗终末期器官衰竭最有效的手段并广泛应用于临床。

2007 年全世界约完成 10 万例实体器官移植手术，其中约有 68250 例肾移植，19850 例肝脏移植，5179 例心脏移植，3245 例肺移植和 2797 例胰腺移植^[1]。据全球捐献及移植瞭望台（GODT）统计，到 2011 年约有超过三分之一的 WHO 成员国实施已故供体的移植手术，全世界共完成实体器官移植手术的例数为 112939 例，其中 62% 的手术发生在经济水平高的国家，而仅有 28%，9% 和 1% 的手术分别发生在经济水平中等国家，中低等国家和低等国家^[2]。2014 年，全世界进行器官移植的例数已达到 119873 例，比 2013 年增加 1.81%^[3]。随着人均收入的增加，医疗保险的普及，全球人口老龄化加快等因素，器官移植的需求也在不断增加。

1.1.2 移植物生存期

据国际心肺移植协会统计（ISHLT），首次进行心脏移植的患者在 1982-1991 年间移植物的长期存活率平均为 8.5 年，1992-2001 年间该生存期上升到 10.4 年，到 2008 年随即增加到 11.9 年^[4]。肝脏移植后的一年生存率为 90%，5 年生存率为 70%-75%^[5]。随着免疫抑制剂不断的更新换代与广泛的临床应用，移植后的排斥反应在一定程度上有所缓解，大大提高了移植物的生存率，但现有的临床免疫疗法并不能彻底解决器官移植后的免疫排斥问题且毒副作用大，移植物的长期存活仍然是器官移植面临的重大课题。

1.2 器官移植排斥反应类型及其机制概述

器官移植后的排斥反应是引起移植物功能衰竭的主要原因之一。机体的免疫系统可以精确辨别“自己”，“非己”和异常的“自己”成分。在初次移植后，机体接触到异体的主要组织相容性复合体（MHC, HLA）后会激活自身的免疫系统并产生记忆细胞。同时，移植物也可能会把受体当做“异己”成分从而产生针对受体的抗体，发生免疫排斥。移植物发生免疫排斥的过程可分为三个步骤，首先识别外来抗原，之后产生针对移植物 MHC 的抗体，最后损伤移植物，使其失去功能^[6]。引起排斥反应的主要原因是由于供体与受体之间 MHC 的不同，其差异越大，排斥反应越严重。根据排斥反应发生的速度和机制不同，可将免疫排斥反应分为超急性排斥反应，加速性排斥反应，急性排斥反应和慢性排斥反应。

1.2.1 超急性排斥反应

超急性排斥反应（HAR）是指移植后数分钟至 24 小时内发生的免疫排斥反应，发生速度快且反应剧烈，其主要特点是移植物内形成血栓最终导致移植物坏死。此排斥反应主要是因为是在移植之前，受体内存存在针对供体的抗体，多见于反复输血，多次妊娠和再次移植的个体。在这种排斥反应发生的过程中，机体产生大量的抗供体 ABO 和 MHC 抗体与移植物内皮细胞上的抗原结合，并激活经典的补体系统，刺激内皮细胞分泌促凝血因子，导致血小板黏附聚集^[7]。

1.2.2 急性排斥反应

急性排斥反应（AR）是一类由免疫系统直接攻击移植物的免疫反应过程。此类排斥反应多发生于移植后一周至数月之内，在移植物的组织切片中可以观察到大量的淋巴细胞和巨噬细胞浸润。肾移植后进行肾活组织切片检查是鉴定移植后是否发生急性排斥反应的国际标准，从组织切片中可见肾小管，肾内膜动脉和肾间质中有大量单核细胞^[8]。基于此，起初人们一直认为体液免疫排斥反应仅限于超急性排斥反应，但之后的研究发现，在管周毛细血管网上存在 C4d 沉积，C4d 是由供体 HLA 特异性抗体激活补体系统后产生的，因此提出在急性排斥反应中也存在急性体液排斥（AHR）^[9]。在此排斥过程中，抗体直接攻击内皮细胞上的

供体 HLA 抗原，中性粒细胞大量浸润，多聚集在管周毛细血管网上，用流式可以检测到此处的供体特异性抗体（DSAs）。与此同时，体液免疫和细胞免疫之间也发生相互作用，这种作用可能是通过多条途径实现的。首先，抗体包覆在供体内皮细胞上，同时与受体的巨噬细胞和 NK 细胞结合促进靶细胞的裂解。其次，B 细胞产生抗体时需要 T 细胞的辅助，T 细胞和 B 细胞之间可通过 CD40L-CD40 和 CD80/86-CD28 两条通路作用从而促进 B 细胞的增殖分化^[10]，阻断这两条路可同时阻断细胞免疫和体液免疫应答，延长移植物生存期。在急性排斥反应中，体液免疫排斥反应相较于细胞介导的排斥反应来说发生率较低，主要是由 T 细胞介导的排斥反应，缺失 T 细胞的小鼠进行 MHC 完全错配的移植后不发生免疫排斥反应，重新注入 T 细胞后移植物出现排斥。目前抗排斥的药物大多靶定 T 细胞来抑制急性排斥反应^[11]。

1.2.3 慢性排斥反应

慢性排斥反应（CR）是影响移植物长期存活的主要原因，常发生在移植后数周，数月甚至多年。慢性排斥的发生多是由于免疫抑制不足及记忆性 T/B 细胞的激活可使机体重新产生供体特异性抗体（DSAs），这些抗体与移植物中的抗原结合逐渐损伤移植物结构最终导致移植物排斥。研究发现，MHC-I 类分子 A 链抗体（MICA），II 类血管紧张素受体 1（AT₁R）抗体，抗内皮细胞抗原抗体等多种抗体均参与了器官移植后同种异体抗体和自体抗体介导的慢性免疫排斥反应^[12]。在慢性排斥反应患者的组织切片中并没有发现 C4d 的沉积物且长期观察结果显示抗体介导的慢性排斥反应中并不存在补体的激活，因此提出慢性排斥损伤是由独立于补体系统的直接的内皮细胞激活及 NK 细胞和单核细胞浸润引起的^[6]。

除此之外，供体年龄，器官移植时移植物状态，其他并发症，免疫抑制剂的毒副作用等因素也是诱发慢性排斥反应的原因之一。

1.3 T 细胞与器官排斥反应

T 细胞是导致同种异体器官移植排斥反应的主要因素，其可通过不同途径识别同种异体的抗原并引起一系列的 T 细胞活动，最终导致移植物排斥。

1.3.1 同种异体识别途径

免疫系统可以识别不同机体基因编码的不同多肽,且这种识别在固有免疫应答体系和适应性免疫应答体系中均可发生。固有免疫系统中的NK细胞、巨噬细胞等分子可以区分“自己”与“非己”成分并激活抗原提呈细胞(APC)将同种异体抗原提呈给T/B细胞^[13]。在适应性免疫应答中,受体T细胞通过表面受体(TCR)识别移植物表面抗原,随后产生供体特异性T细胞诱发一系列免疫反应导致移植后组织器官损伤。T细胞可通过三种方式识别同种异体抗原。

1) 直接识别途径

直接识别是受体T细胞直接识别供者APC提呈的供者MHC抗原从而发生免疫反应。移植物中有供体来源的白细胞即过客白细胞,在移植之后,过客白细胞可进入受体与受体引流淋巴结处的初始T细胞接触,同时,此处的T细胞也可进入移植物内,过客白细胞将供体的MHC抗原提呈给T细胞。这种同种反应性T细胞的TCR识别的是供体APC提呈的两类抗原,第一类是供者自身来源的抗原肽-MHC分子复合物,第二类是供者外源性抗原肽-MHC分子复合物^[14,15]。同种反应性T细胞的直接识别是多克隆识别,涉及到大部分的T细胞受体库^[16,17],经常发生在移植后早期阶段,在皮肤移植中,这种直接识别可导致急性细胞性排斥反应^[18]。

2) 间接识别途径

间接识别与一般的抗原提呈过程相同,外源性的供体细胞或MHC分子首先被受体的APC加工处理,以供体MHC分子来源的抗原多肽-受体MHC分子复合物的形式提呈给受体的T细胞,T细胞活化后产生特异性T细胞。此过程贯穿移植后的所有时期,在慢性排斥反应中具有重要作用。此外,间接识别不仅仅发生在MHC抗原系统,亦参与其他类型抗原的识别过程^[6]。

3) 半直接识别途径

相比于前两种识别途径,第三种识别途径发现较晚,研究发现,树突状细胞(DCs)可以从其他细胞上获取完整的MHC分子^[19,20],并且可以使可溶性MHC分子和膜囊脱落,形成表达MHC-I类,II类分子和共刺激分子的外泌体,DCs又可以捕获这类外泌体,将其作为抗原提呈给受体T细胞。这种半直接同种异体识别是在同种异体MHC分子从供体细胞表面完整转移到受体DCs表面之后由直

接识别途径的 T 细胞识别的过程,产生的效应 T 细胞是供体 MHC 限制性的,此识别机制在急性排斥反应和慢性排斥反应中均发挥作用^[21,22]。

在一定的情况下,通过直接识别途径和间接识别途径激活的 T 细胞可以相互协同也可以相互抑制,这个过程会影响移植物的生存期。间接途径激活的 CD4⁺T 细胞可以通过分泌白介素 2 (IL-2), γ 干扰素 (IFN- γ) 等细胞因子协助直接途径激活的其他 CD4⁺T 细胞和分化的 CD8⁺细胞毒性 T 细胞识别供体 MHC-I 类分子多肽。直接途径介导的同种异体免疫应答在早期的炎症活动与 IFN- γ , 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的产生有关,之后诱导供体 MHC-II 类分子的表达,促进受体 APCs 提呈同种异体 MHC 抗原的作用及间接识别介导的 T 细胞的激活过程。总之,直接识别途径与间接识别途径在器官移植排斥反应中发挥协同作用^[23]。

1.3.2 T 细胞的激活

T 细胞在细胞介导的移植排斥反应中扮演着重要角色, T 细胞的激活可分为三个阶段: 诱导, 扩增和效应阶段^[24]。

在诱导阶段, CD4⁺T 辅助细胞和 CD8⁺细胞毒性 T 细胞与移植物上的同种异体抗原结合, 或者与受体 APCs 提呈的抗原结合。CD4⁺T 细胞主要与 APCs 提呈的 MHC-II 类分子结合, 而 CD8⁺T 细胞则主要与 MHC-I 类分子反应^[25]。大量证据表明固有免疫应答可以加强适应性免疫应答活动。Toll 样受体 (TLRs) 是表达在 APC 上的种系编码病原体识别受体, 激活 TLRs 会释放促炎因子介导适应性免疫应答^[26], 同时, TLRs 也表达在 T 细胞表面, 可促进 T 细胞的增殖和炎症因子的产生^[27]。补体系统对 T 细胞的免疫应答也具有重要的调节作用^[28]。另外, 自然杀伤细胞 (NK) 也可以通过对移植物的应激反应而激活, 激活后的 NK 细胞具有溶细胞作用, 并且释放促炎症因子加强适应性 T 细胞的活动^[29]。在 T 细胞通过抗原提呈激活和细胞因子释放的过程中, 亦有其他分子如 B 细胞发挥着重要作用^[30]。

在扩增阶段, 处于增殖期的 T 细胞迅速分裂并分泌 IL-2 和多种细胞因子。CD4⁺T 细胞进一步分化成亚群, 如 Th1 和 Th2, 通常情况下, Th1 主要参与细胞介导的免疫反应, 而 Th2 主要参与体液免疫反应, 协助 B 细胞的成熟分化^[31]。IL-2 和 IFN- γ 对 T 细胞的增殖至关重要。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库