

# TIPE2 在 T 细胞介导的心脏移植急性排斥反应中的潜在作用

赵越<sup>1,2</sup>, 徐双悦<sup>1</sup>, 韩蔚民<sup>1</sup>, 庄国洪<sup>1</sup>, 齐忠权<sup>1,3</sup> (1. 厦门大学器官移植研究所, 福建省器官与再生重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学附属中山医院肝胆外科, 慢性肝病肝癌重点实验室, 福建 厦门 361005; 3. 广西大学医学院, 广西壮族自治区 南宁 530004)

**【摘要】** 目的 探讨作为免疫负调控因子的肿瘤诱导坏死因子- $\alpha$ -诱导蛋白8样因子-2 (TIPE2) 在 T 细胞介导的小鼠心脏移植急性排斥反应中的潜在作用。方法 通过苏木素-伊红 (HE) 染色和流式细胞术确定心脏移植中的主要免疫排斥细胞, 免疫荧光染色确定 TIPE2 与脾细胞间的关系, 实时定量荧光 PCR (Real-time PCR) 检测心脏移植 TIPE2 及细胞因子表达量。结果 小鼠心脏移植 7 天后心脏组织出现明显免疫细胞浸润及心肌组织的破坏, 流式细胞术检测心脏移植中 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞增高, 免疫荧光显示移植小鼠脾细胞中的 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞表达 TIPE2, 而心脏移植在第 7 天时 TIPE2 和细胞因子表达量均明显增高。结论 TIPE2 与在 T 细胞介导的小鼠心脏移植急性排斥反应中可能发挥着潜在作用。

**【关键词】** 心脏移植; TIPE2; 急性排斥反应

## The potential role of TIPE2 in T cells mediated acute cardiac rejection

Zhao Yue<sup>1,2</sup>, Xu Shuangyue<sup>1</sup>, Han Weimin<sup>1</sup>, Zhuang Guohong<sup>1</sup>, Qi Zhongquan<sup>1,3</sup>. 1.Organ Transplantation Institute of Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China; 2.Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital, Provincial Key Laboratory of Chronic Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma, Xiamen 361005, Fujian, China; 3.Guangxi University School of Medicine, Nanning 530004, Guangxi, China.

Corresponding author: Qi Zhongquan, Email: oti@xmu.edu.cn; Zhuang Guohong, Email: zhgh@xmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the role of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced Protein-8-like2 (TIPE2) in T cells mediated acute cardiac rejection in mouse. **Methods** Hematoxylin-eosin (HE) staining and flow cytometry were used to identify the preface of immune cells in cardiac allograft rejection. Immunofluorescence staining was taken to determine the relationship between TIPE2 and splenocytes. Real-time PCR was used to detect the expression of TIPE2 and cytokine in cardiac allograft. **Results** Seven days after heart transplantation of mice, the histological features of myocardia of allograft were extensive necrosis and abundant infiltration of inflammatory cells. Flow cytometry showed upregulations of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in cardiac allograft. CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> staining in splenocytes also showed the expression of TIPE2. Real-time PCR detected increased expressions of TIPE2 and cytokine in cardiac allograft. **Conclusion** TIPE2 might take part in T cells mediated acute cardiac rejection process.

**【Key words】** Cardiac transplantation; TIPE2; Acute rejection

器官移植被认为是治疗器官衰竭的最有效手段<sup>[1-3]</sup>,然而,移植后的免疫排斥反应一直是影响移植植物生存的主要障碍<sup>[4-5]</sup>。目前,通过抑制急性排斥反应,能够较好地延长移植植物的生存期。T细胞介导的免疫反应在急性免疫排斥反应中起到了重要的作用<sup>[6-7]</sup>。因此,深入研究免疫排斥反应的分子机制,有利于临床寻找新的靶点治疗,缓解T细胞介导的急性免疫排斥反应,从而延长移植植物的生存期。

肿瘤坏死因子- $\alpha$ -诱导蛋白8样因子-2 (tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced Protein-8-like-2, TN-F $\alpha$  IP8L2/TIPE2) 是肿瘤坏死因子- $\alpha$ -诱导蛋白8家族成员之一,作为免疫负调控分子,它在固有免疫以及细胞免疫中发挥着重要作用<sup>[8]</sup>。TIPE2主要在免疫系统中高表达,具有维持免疫平衡和防止免疫过反应的作用。已有文献报道显示, TIPE2主要在淋巴组织中高表达,但是在内分泌组织和骨骼肌中也可以检测到TIPE2的表达<sup>[9]</sup>,而在众多的肿瘤细胞系中TIPE2不表达或是表达量低。近几年,越来越多文献报道TIPE2与肿瘤的增殖、转移等相关<sup>[10-12]</sup>。

在系统性红斑狼疮的患者中, TIPE2在外周血单个核细胞中表达量明显下降,说明TIPE2在系统性红斑狼疮的发病机制中至关重要<sup>[13]</sup>。在移植方面,有文献表明相对于正常肾组织,慢性排斥组的肾移植植物TIPE2表达量明显下降,急性排斥反应组TIPE2表达量轻微下降<sup>[14]</sup>。但在心脏移植中TIPE2的表达情况以及作用尚不清楚。本研究发现,同种异体心脏移植植物中TIPE2表达量上升,这与浸润心脏内的T细胞有关,提示了TIPE2与T细胞介导的急性免疫排斥反应可能具有一定的相关性。

## 1 材料与方法

**1.1 材料:** 8~12周雌性C57BL/6以及BALB/c小鼠(上海Slac实验动物有限公司);流式抗体FITC-anti-CD4、PE-anti-CD8(美国Biolegend公司);免疫荧光抗体anti-CD4、anti-CD8、anti-TIPE2(加拿大Invitrogen公司);FITC和PE标记的抗兔抗体(加拿大Invitrogen公司);实时定量PCR反转录试剂盒、聚合酶链反应扩增试剂盒及TRIzol(日本

Takara公司);全部引物由上海生工生物工程有限公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 小鼠心脏移植:** 我们实施的是血管异位心脏移植术,将供体心脏的主动脉及肺动脉与受体的颈总动脉及颈外静脉采取套管法连接<sup>[15]</sup>。实验分为两组(同种同系组和同种异系组),同种同系组( $n=3$ ):将C57BL/6小鼠的心脏异位移植到另一只C57BL/6小鼠颈部;同种异系组( $n=3$ ):将BALB/c小鼠的心脏异位移植到C57BL/6小鼠颈部。

**1.2.2 流式细胞术检测心脏移植植物中CD4<sup>+</sup>与CD8<sup>+</sup>T细胞:** 同种同系组及同种异系组小鼠心脏移植植物在第7天取出,研磨匀浆后过滤,标记FITC-anti-CD4、PE-anti-CD8抗体,标记好后用来自德国Partec公司的FACScan仪器进行检测,所获得数据通过FlowJo软件进行处理。

**1.2.3 心脏移植植物切片及HE染色:** 第7天时取出受体小鼠的心脏移植植物,浸泡在10%福尔马林中,石蜡包裹后切成5 $\mu$ m的切片,最后用HE染色制片。

**1.2.4 免疫荧光:** 同种异系组小鼠脾脏在移植后7天取出,研磨提取脾细胞后涂片,用4%多聚甲醛泡15分钟,PBS洗涤液洗两次,然后用0.2% Triton X-100冲洗5分钟。5%脱脂牛奶阻断30分钟,然后用CD4、CD8及TIPE2多克隆抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜,过夜后切片用FITC和PE标记的抗兔抗体37 $^{\circ}$ C黑暗孵育1小时。然后,(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色。最后,通过共聚焦激光扫描显微镜观察。

**1.2.5 Real-time PCR 检测 TIPE2、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 和  $\gamma$ -干扰素 (interferon- $\gamma$ , INF- $\gamma$ ) 的表达:** 引物序列设计: TIPE2 上游引物为 5'-CACCCAAGTCACATGACCGC-3', 下游引物为 5'-GAGCCCATCACAGATCTTGC-3', IL-2 上游引物为 5'-GGAGCAGCTGTTGATGGACCTAC-3', 下游引物为 5'-AATCCAGAACATGCCGCAGAG-3', INF- $\gamma$  上游引物为 5'-CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA-3', 下游引物为 5'-CGGCACAGTCA TTGAAAGCCTA-3'。以  $\beta$ -actin 为内参对照,上

游引物为 5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3', 下游引物为 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'。研磨心脏组织匀浆后, 按 TRIzol 说明书提取总 RNA, 测纯度和浓度, 按照 Takara 反转录试剂盒合成 cDNA, 然后按 SYBR Green 说明书进行实时 PCR 反应。检测结果由 SDS 软件进行分析。

## 2 结果

**2.1** 第 7 天心脏移植破坏程度及 T 细胞浸润情况 (图 1): 第 7 天时, 收取同种同系组和同种异系组小鼠的移植心脏, 行切片及 HE 染色, 镜下发现第 7 天时同种同系组的移植心脏组织肌纤维没有受到破坏, 没有明显炎症细胞浸润。而在同种异系组小鼠的移植心脏中, 我们可以看到明显的心肌组织受损和炎症细胞浸润。同时, 充分研磨心脏组织匀浆后, 进行流式细胞仪检测发现, 作为介导急性炎症排斥反应的重要免疫细胞 T 细胞, 在小鼠的移植心脏中, CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞表达均增多 (图 2)。

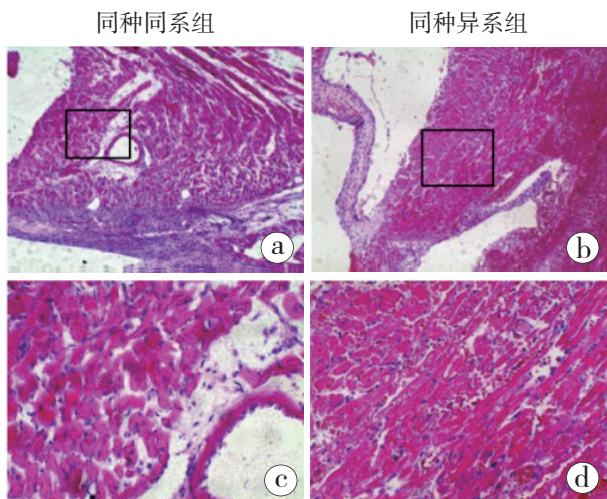


图 1 心脏移植 HE 染色结果 (a、b 为 HE 染色 ×100; c、d 为 HE 染色 ×400)

**2.2** TIPE2 在心脏移植及 T 细胞中的表达情况 (图 3): 从第 7 天的小鼠心脏移植中提取 RNA, 逆转录后 Real-time PCR 检测发现, 相对于同种同系组, 同种异系组小鼠的心脏 TIPE2 表达量出现了明显的上调, 因为 TIPE2 主要在免疫细胞中表达, 而 T 细胞又是介导急性排斥反应的主要细胞, 因此, 我们推测心脏移植中的 TIPE2 可能主要来自 T 细胞。我们取第 7 天移植小鼠脾脏提取脾细

胞, 利用免疫荧光技术定位 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 和 TIPE2 的关系, 发现在 CD4<sup>+</sup> 或 CD8<sup>+</sup> 的 T 细胞中, 同样高表达 TIPE2, 这解释了心脏移植中 TIPE2 的升高可能来自浸润的 T 细胞。

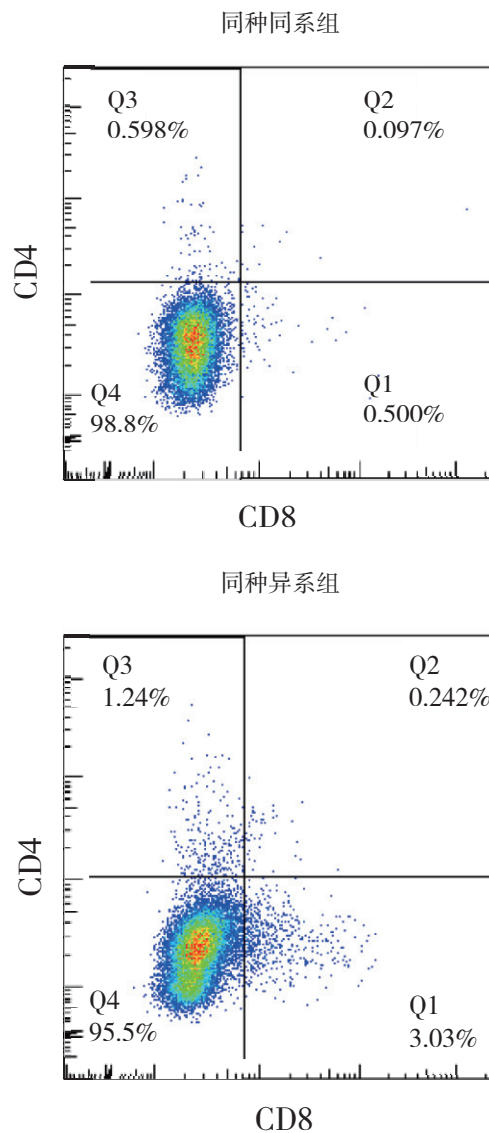


图 2 心脏移植流式检测 CD4<sup>+</sup> 及 CD8<sup>+</sup>T 细胞

**2.3** 心脏移植中细胞因子明显上调 (图 4): TIPE2 作为免疫负调控因子, 对于免疫细胞细胞因子的表达与分泌有着直接的影响。通过 Real-time PCR 检测发现, 由 T 细胞介导分泌的细胞因子 IL-2 和 IFN- $\gamma$  均在小鼠移植心脏中出现明显的上调, 提示了 T 细胞中 TIPE2 的表达可能与 T 细胞细胞因子的分泌具有一定的关系, 从而介导了急性排斥反应过程的发生。

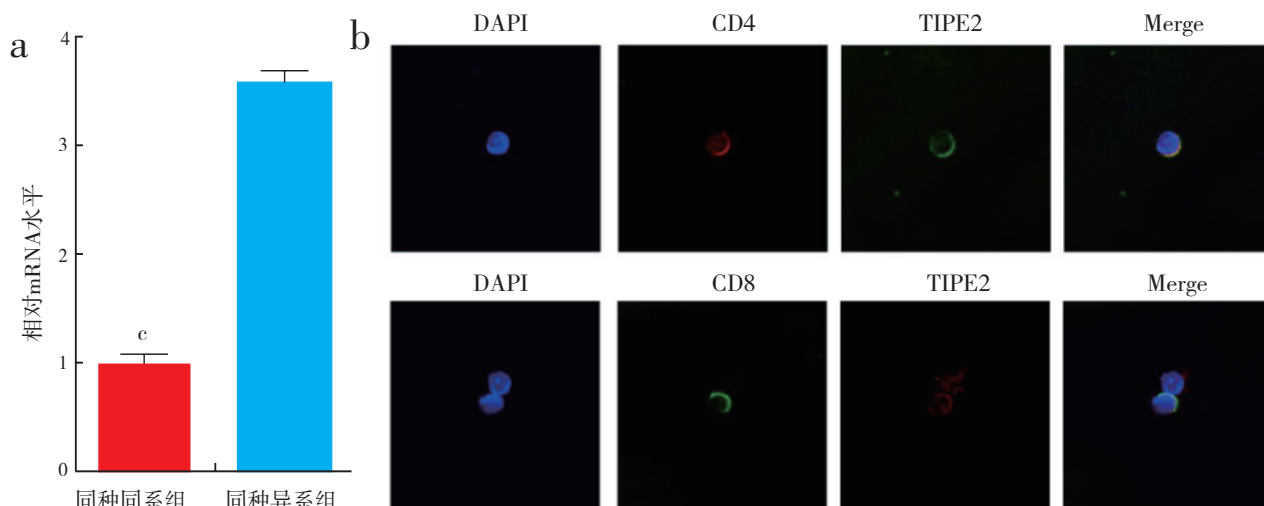


图 3 a 为 Real-time PCR 检测同种同系组, 同种异系组小鼠第 7 天心脏移植 TIPE2 表达水平; b 为脾细胞免疫荧光染色 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 及 TIPE2; 与同种异系组相比, <sup>a</sup>*P* < 0.001

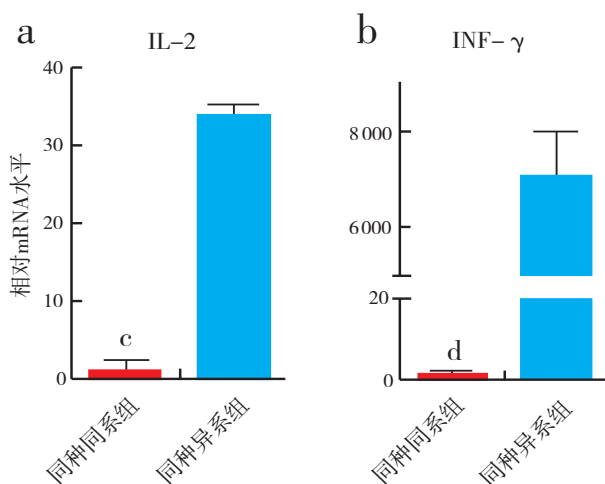


图 4 a、b 为 Real-time PCR 检测同种同系组、同种异系组小鼠第 7 天心脏移植 IL-2 和 IFN-γ 表达水平, 与同种异系组相比, <sup>a</sup>*P* < 0.01, <sup>b</sup>*P* < 0.05

### 3 讨论

作为肿瘤坏死因子-α-诱导蛋白 8 家族的一员, TIPE2 主要在造血以及淋巴组织中高表达, 在稳定免疫平衡中发挥着至关重要的作用<sup>[16-17]</sup>。在心脏移植排斥反应过程中, 正是由于免疫平衡被打破, T 细胞识别受体心脏抗原并产生免疫应答, 从而导致移植物的失活<sup>[18]</sup>。我们前期通过一些研究发现, T 细胞介导的急性免疫排斥与 TIPE2 之间可能存在一定的相关性, 但其具体分子机制仍不明确。

我们发现在小鼠心脏移植第 7 天, 同种异系组的心脏移植 TIPE2 表达量明显高于同种同系组, 而 TIPE2 表达量的提升正是由于介导急性免疫排

斥反应的 T 细胞浸润心脏组织而导致的。在心脏移植中, 浸润的 CD4<sup>+</sup> 及 CD8<sup>+</sup>T 细胞可分泌众多细胞因子, 例如 IL-2 和 IFN-γ 等, 导致排斥反应的级联扩大, 最终导致心脏移植物的失活<sup>[19-20]</sup>。Huang 等<sup>[21]</sup>报道当 T 细胞中的 TIPE2 下调以后, 能明显促进 IL-2 和 IFN-γ 的分泌。本研究发现在小鼠心脏移植第 7 天, 心脏移植中的细胞因子 IL-2 和 IFN-γ 表达量明显增高, 所以我们推测, TIPE2 能通过调节 T 细胞在心脏移植中细胞因子的分泌, 从而影响急性免疫排斥的过程。

本实验中, 心脏移植中的 T 细胞表达 TIPE2, 是心脏移植 TIPE2 表达增高的主要原因, 也提示了 TIPE2 与 T 细胞介导的急性排斥反应间的关系, 能够为以后临床治疗提供治疗靶点, 然而尚需进一步研究 TIPE2 与 T 细胞介导的急性排斥反应间的分子机制。

### 参考文献

- [1] 刘蕾, 刘懿禾, 沈中阳, 等. 4 例心脏移植患者术后的早期处理[J]. 中华危重病急救医学, 2007, 19 (7): 438-439.
- [2] 薛武军. 器官移植免疫抑制治疗策略[J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2015, 3 (5): 268-271.
- [3] 史源, 沈中阳. 肝、肾机械灌注保存技术进展[J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2017, 5 (3): 172-176.
- [4] 袁建, 徐燕杰. 肾移植体液免疫排斥反应的研究进展[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7 (1):



- 147-149.
- [5] Rose EA, Smith CR, Petrossian GA, et al. Humoral immune responses after cardiac transplantation: correlation with fatal rejection and graft atherosclerosis [J]. *Surgery*, 1989, 106 (2): 203-207.
- [6] 周广臣, 陈惠萍. 小儿肾移植急性排斥与慢性排斥[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2002, 11 (5): 484-487.
- [7] Lechler RI, Sykes M, Thomson AW, et al. Organ transplantation—how much of the promise has been realized? [J]. *Nat Med*, 2005, 11 (6): 605-613.
- [8] Sun H, Gong S, Carmody RJ, et al. TIPE2, a negative regulator of innate and adaptive immunity that maintains immune homeostasis [J]. *Cell*, 2008, 133 (3): 415-426.
- [9] Zhang G, Hao C, Lou Y, et al. Tissue-specific expression of TIPE2 provides insights into its function [J]. *Mol Immunol*, 2010, 47 (15): 2435-2442.
- [10] Gus-Brautbar Y, Johnson D, Zhang L, et al. The anti-inflammatory TIPE2 is an inhibitor of the oncogenic Ras [J]. *Mol Cell*, 2012, 45 (5): 610-618.
- [11] Liu QQ, Zhang FF, Wang F, et al. TIPE2 inhibits lung cancer growth attributing to promotion of apoptosis by regulating some apoptotic molecules expression [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (5): e0126176.
- [12] Deng B, Feng Y, Deng B. TIPE2 mediates the suppressive effects of shikonin on MMP13 in osteosarcoma cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37 (6): 2434-2443.
- [13] Li D, Song L, Fan Y, et al. Down-regulation of TIPE2 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Immunol*, 2009, 133 (3): 422-427.
- [14] Jia L, Gui B, Tian P, et al. TIPE2, a novel biomarker for clinical chronic kidney allograft rejection [J]. *Artif Organs*, 2013, 37 (2): 221-225.
- [15] Matsuura A, Abe T, Yasuura K. Simplified mouse cervical heart transplantation using a cuff technique [J]. *Transplantation*, 1991, 51 (4): 896-898.
- [16] Zhang X, Wang J, Fan C, et al. Crystal structure of TIPE2 provides insights into immune homeostasis [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16 (1): 89-90.
- [17] Freundt EC, Bidere N, Lenardo MJ. A different TIPE of immune homeostasis [J]. *Cell*, 2008, 133 (3): 401-402.
- [18] Honjo K, Xu XY, Kapp JA, et al. Activation and migration of allo-peptide specific TCR transgenic T cells in cardiac allograft rejection [J]. *Cell Immunol*, 2004, 230 (1): 44-55.
- [19] Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1992, 98 (4): 279-285.
- [20] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins [J]. *J Immunol*, 1986, 136 (7): 2348-2357.
- [21] Huang L, Chen J, Hong B. Down-regulation of TIPE2 promotes the proliferation and immune activity of T lymphocytes [J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2016, 32 (7): 886-890.

(收稿日期: 2017-11-21)

赵越, 徐双悦, 韩蔚民, 庄国洪, 齐忠权. TIPE2在T细胞介导的心脏移植急性排斥反应中的潜在作用[J/CD]. *实用器官移植电子杂志*, 2018, 6 (2): 98-102.