

地磷莫斯的免疫抑制效果及机制的研究

王路敏¹, 李艳萍², 夏俊杰³, 叶岩荣^{1*}

(1.复旦大学附属中山医院厦门医院, 福建 厦门 361000;

2.莆田医学院附属医院, 福建 莆田 351100; 3.厦门大学医学院器官移植研究所, 福建 厦门 361102)

【摘要】目的 临床上已应用多种免疫抑制剂,但是因为其价格昂贵,毒副作用强等等原因阻碍了其在临床的应用,雷帕霉素在临床上的应用已得到公认。但是由于雷帕霉素的水溶性小,半衰期长,水溶性较弱,化学稳定性较弱,限制了其在临床的应用。雷帕霉素的衍生物地磷莫斯具有高溶解性、高稳定性、高生物利用度等优点。地磷莫斯的诸多优点已得到FDA以快速通道方式批准,应用于软组织与骨肉瘤的治疗。关于治疗血液癌(淋巴瘤和白血病)的二期临床试验已经完成,子宫内膜癌的二期临床试验也已展开。为了研究其在免疫抑制方面的作用机制,我们进行一系列体外实验,观察其免疫抑制效果,研究其免疫抑制机制,为地磷莫斯进一步进行体内试验打下基础,为其能顺利扩大临床应用做好铺垫。**方法** 我们首先采用淋巴细胞转化实验来观察地磷莫斯对淋巴细胞与T细胞增殖的抑制作用,确定地磷莫斯的免疫抑制作用及其免疫抑制发挥的浓度,再用凋亡实验、克隆无能实验等探讨地磷莫斯的免疫抑制作用机制。**结果** 我们运用淋巴细胞转化实验确定了地磷莫斯可以抑制淋巴细胞的增殖;我们用流式检测术,发现地磷莫斯不会引起淋巴细胞/T细胞的凋亡;克隆无能实验证明了克隆无能是地磷莫斯诱导免疫耐受的机制之一。**结论** 通过本课题的研究,我们首次证实了地磷莫斯在体外通过抑制淋巴细胞/T细胞增殖,诱导克隆无能等方法发挥免疫抑制作用,为地磷莫斯应用于器官移植领域奠定了基础,促进了地磷莫斯从基础研究向临床器官移植的转化。

【关键词】 器官移植; 免疫抑制; 淋巴细胞; T细胞

【中图分类号】 R979.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 ISSN.2095.6681.2019.30.80.02

DOI:10.16282/j.cnki.cn11-9336/r.2019.30.060

在进行同种移植后,移植抗原可刺激受体发生免疫应答反应,通过细胞免疫和体液免疫的共同作用使移植体受损的情况称为宿主抗移植体反应^[1-2]。同种异体移植的排斥机制:适应性免疫系统识别供体组织上表达的不匹配的HLA等位基因产物^[3],并对排斥作用负责。发生抗体介导还是T细胞介导(CMI)的排斥,取决于移植组织的来源,如皮肤主要为CMI介导的排斥,而肾脏则为抗体介导CMI共同介导。在供体与受体之间HLA不匹配的数目(移植抗原数)通常决定排斥作用的强度。

T细胞介导免疫排斥的机制^[4]:在同种移植中,Th1细胞主要参与急性排斥反应,Th2细胞的活化可以导致形成移植耐受。Th1细胞分泌IL-2、TNF- β 、IFN- γ 等,介导细胞免疫应答、器官特异自身免疫性疾病和迟发型超敏反应,在宿主抗胞内病原感染中起重要作用。Th2细胞产生IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13等细胞因子,介导体液免疫应答、感染性和过敏性疾病^[5]。

1 材料与方法

1.1 淋巴细胞转化实验

刀豆蛋白A (concanavalin A, ConA)是一种很常用的丝裂原,他可以活化T淋巴细胞从而促进T细胞的增殖,Treg (CD4+CD25+)与Teff (CD4+CD25-)的活化都会受到ConA的影响,我们利用刀豆蛋白A刺激反应细胞使其进行增殖,在细胞中加梯度浓度的地磷莫斯,检测细胞增殖程度,判断其是否被地磷莫斯抑制。

1.2 T细胞克隆无能实验

反应细胞的提取参照上述淋巴细胞提取过程与T细胞提取过程,刺激剂可以是供体鼠脾脏细胞,也可以是ConA,将刺激剂与反应细胞混合如混合淋巴细胞/淋巴细胞转化实验,每孔加入100 U/ml IL-2,培养72小时,用BrdU掺入法检测细

胞增殖情况。

1.3 淋巴细胞、T细胞凋亡实验

1.3.1 细胞提取与处理

淋巴细胞提取如上述方法,将提取好的淋巴细胞 1×10^6 加入96孔板内,并加入梯度浓度的地磷莫斯溶液,培养72小时。

1.3.2 样品染色

淋巴细胞收集:吸取96孔板内的淋巴细胞,置于1.5 mL EP管内,加800 μ L的PBS清洗。

用预冷的PBS洗涤细胞2次,每次均需300 g,4 $^{\circ}$ C离心5 min。收集 $1 \sim 5 \times 10^5$ 细胞。

加入100 μ L $1 \times$ Binding Buffer重悬细胞。

加入5 μ L Annexin V-FITC 和5 μ L PI Staining Solution,轻轻混匀。

避光、室温反应10 min。

加入400 μ L $1 \times$ Binding Buffer,混匀,样品在1小时内用流式细胞仪进行检测。

2 结果与结论

2.1 地磷莫斯(deforlimus)对淋巴细胞/T细胞转化实验的抑制作用

(1)为了研究地磷莫斯(deforlimus)在体外对淋巴细胞增殖的影响,地磷莫斯是否对淋巴细胞的增殖有抑制作用,其抑制作用是否呈剂量依赖性等,我们提取B6小鼠的脾脏细胞,体外用ConA刺激增殖,并加入不同浓度的地磷莫斯(地磷莫斯溶解在纯酒精里,且浓度为0, 0.1, 0.5, 1, 5 μ g/mL的储液,工作浓度为0, 1, 5, 10, 50 ng/mL),放入37 $^{\circ}$ C孵育箱中,培养72小时,使用BrdU掺入法检测淋巴细胞的增殖情况,结果:当地磷莫斯浓度达到1 ng/mL的时候,其抑制率有明显统计学意义($P < 0.01$),随着地磷莫斯浓度的增加,其抑制

患者胸腔内各个脏器的图像传输到屏幕之上,能够帮助医师在更为直观的条件下进行手术。胸腔镜手术的优点较多,包括:创伤较小,胸部切口不超过5cm,基本上不会留下疤痕。手术采用静脉麻醉,患者睡眠的状态下完成手术^[3],术后疼痛感较小。由于创伤性小的关系,所以减少了手术治疗对于脏器的损伤以及对脏器功能的干扰,从而加速术后恢复。本文研究结果显示,观察组患者的手术指标中术中出血、手术时间及住院时间相比对照组表现更好,组间对比具有差异表现,差异有统计学意义($P < 0.05$)。观察组在术后出现1例并发症,发病率为2.5%(1/40),而对照组则7例,发病率为17.5%(7/40),组间对比具有差异表现,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

综上所述,相比于传统开放式肺癌根治术,采取电视

胸腔镜肺叶切除术治疗肺癌,不仅手术用时更短,出血量更少,而且患者术后恢复更快,并发症的发病率也更低,在降低创伤性的前提下提高了患者的手术安全性,适合在肺癌的治疗中推广和应用。

参考文献

- [1] 徐丽娥,浦同快,夏丽波,黄祖军,卜梁.电视胸腔镜肺叶切除术在老年早期非小细胞肺癌中应用方法及价值分析[J].名医,2018(12):43.
- [2] 杜永海.电视胸腔镜肺叶切除与开胸肺叶切除术的比较研究[D].山东大学,2016.
- [3] 张树明.肺癌治疗中应用电视胸腔镜辅助小切口肺叶切除术的价值分析[J].中国卫生标准管理,2015,6(05):103-104.

本文编辑:赵小龙

(上接 80 页)

率没有显著性差异。所以,当地磷莫斯浓度达1 ng/mL时,其抑制率已达到最大。

(2) 运用同样的方法,我们对地磷莫斯抑制T细胞的增殖进行研究,地磷莫斯的加入,明显抑制了T细胞的增殖,其抑制率大于60%,差异有统计学意义($P < 0.001$),随着药物浓度的增加,T细胞的抑制率没有显著变化,没有统计学意义。浓度为1 ng/mL的地磷莫斯已对T细胞有显著的抑制作用。因此,在药物浓度是1 ng/mL的时候已经达到最大抑制率。

2.2 地磷莫斯对淋巴细胞凋亡的影响

在缺血再灌注、组织缺血重构、神经系统退行性疾病、肿瘤的发生等疾病的病理生理机制研究中,关于凋亡机制的研究具有很大的意义,可以进一步地认识到疾病的本质,因此可以有针对性地开发针对凋亡机制的靶向药物,从而提高疗效。

我们研究地磷莫斯是否可以引起淋巴细胞的凋亡,用ConA刺激淋巴细胞培养,不同的孔内加入梯度浓度的地磷莫斯(0, 1, 5, 10, 50 ng/mL),培养72 h后取出,采用凋亡试剂盒对其进行标记,然后流式上机检测。地磷莫斯对淋巴细胞凋亡的影响。随着地磷莫斯浓度的增加,淋巴细胞的凋亡比例没有增加,其变化不具有统计学意义,因此,地磷莫斯不会引起淋巴细胞的凋亡。

2.4 地磷莫斯对T细胞克隆无能的影响

T细胞激活需要两个信号的刺激:第一信号是形成的pMHC复合物被抗原递呈细胞(APCs)递呈给T细胞;第二信号通过T细胞与APCs表面的多对免疫分子结合,形成共刺激信号。当T细胞缺乏第二信号,其接触抗原后无反应性,形成了克隆无能状态,从而产生特异性T细胞耐受。克隆无能组成外周免疫耐受的主要部分,也是避免自身免疫疾病的

重要机制。APCs与共刺激分子的任何一个信号的缺乏都可以诱导T细胞的克隆无能,一些促进T细胞的细胞因子(IL-2)的缺乏也可以诱导T细胞的克隆无能。T细胞被诱导克隆无能后可以通过加入IL-2来恢复其增殖能力,因此,我们可以通过加入IL-2后其增殖能力恢复与否来判断T细胞是否是被诱导克隆无能而影响其增殖能力。提取脾脏细胞,用尼龙毛过柱,提出T细胞,用ConA刺激T细胞增殖,在不同的孔加入梯度浓度的地磷莫斯(0, 0.5, 1 ng/mL),浓度为0.5 ng/mL的地磷莫斯没有对T细胞的增殖没有起到抑制作用,当地磷莫斯浓度达1 ng/mL时,T细胞的增殖被抑制,而加入IL-2之后,T细胞的增殖恢复。

由此得知,克隆无能是地磷莫斯对T细胞抑制的作用机制之一。

通过本课题的研究,我们证实地磷莫斯确实有免疫抑制作用,其抑制淋巴细胞的增殖,特别是T细胞的增殖,并且通过诱导克隆无能等方法起到免疫抑制的作用,诱导细胞凋亡不是地磷莫斯起免疫抑制作用的方式。

参考文献

- [1] 杨宁.雷帕霉素药物洗脱支架在急性心肌梗死急诊PCI术中的临床应用[J].医药论坛杂志,2015.11.
- [2] 王雪佳.肝移植术后免疫抑制药的使用调查[J].海峡药学,2017.10.
- [3] 王俊男.哺乳动物雷帕霉素靶蛋白及其抑制剂在乳腺癌临床诊治中的应用进展[J].中国临床医学,2018.08.
- [4] 杨宇.Treg细胞在大鼠肝移植术后感染免疫紊乱中的作用[J].中国老年学杂志,2018.08.
- [5] 赵越.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].实用器官移植电子杂志,2018.03.

本文编辑:赵小龙