

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520111153424

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**CXCL9 和 CXCL10 在记忆性 T 细胞介导的
再次心脏移植急性排斥反应中的表达及意
义**

**Role of Chemokines CXCL9 and CXCL10 in Acute
Transplant Rejection Mediated by Alloreactive Memory T
Cells in a Mouse Cardiac Replantation Model**

庄嘉伟

指导教师姓名: 单忠贵 副教授

专 业 名 称: 外科学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩日期: 2014 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 4 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

摘要

目的

在机体抵抗感染等外来致病原入侵的这些环节上，记忆性 T 淋巴细胞起着相当关键的作用，但越来越多的研究证明，在器官移植中记忆性 T 淋巴细胞所起的作用却是非常不利的。由于有记忆性 T 淋巴细胞的存在，再次器官移植急性排斥反应的发生、发展速度都远快于初次器官移植。本研究主要探讨趋化性细胞因子 CXCL9 和 CXCL10 在记忆性 T 淋巴细胞介导的小鼠再次心脏移植急性排斥反应中表达的变化及意义。

方法

Balb/c 小鼠作为供鼠，C57BL/6 小鼠作为为受鼠，进行背部皮肤移植。分为四组进行实验：实验组，C57BL/6 小鼠进行皮肤移植饲养 6 周后，以 Balb/c 小鼠为供鼠，采用套管法进行颈部异位心脏移植；对照组，C57BL/6 小鼠未进行皮肤移植，直接进行颈部异位心脏移植；皮肤移植组，以 Balb/c 小鼠为供鼠，C57BL/6 小鼠作为受鼠进行背部皮肤移植。空白组为未接受任何处理的 C57BL/6 小鼠。观察两组移植心脏存活时间和组织病理学改变，检测移植物中趋化因子 CXCL9、CXCL10 和相关细胞因子（IL-2, IL10, TGF- β , IFN- γ ）基因的相对表达量及它们在受体血清中的浓度。

结果

- 1、对照组受鼠存活时间为 7.75 d，实验组为 3.25 d ($P < 0.001$)。
- 2、对照组移植心脏急性排斥反应的评级为 (2.27 ± 0.25) 级，实验组为 (4.12 ± 0.03) 级 ($P < 0.01$)。
- 3、实验组小鼠外周血术后趋化因子 CXCL9 和 CXCL10 表达明显升高，IL-2 和 IFN- γ 的表达量同样明显增加。
- 4、实验组心脏移植物中 CXCL9 和 CXCL10 基因的相对表达量明显高于对照组，IL-2 和 IFN- γ 的表达量同样明显增加。

结论

接受皮肤移植 6 周后进行再次心脏移植的受鼠，其发生急性排斥反应的速度

和程度都更加剧烈，经检测其体内 CXCL9 和 CXCL10 的表达量明显增加，因此我们推断血清中趋化因子 CXCL9 和 CXCL10 的高表达与急性排斥反应密切相关。

关键词：趋化因子；再次移植；急性排斥

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Objective:

Although memory T cells are always useful for resisting infection by pathogens, it is indeed a barrier to achieving the long-term allograft survival and transplant tolerance. Due to donor-reactive T cells, rejection of most second transplantations of organs is more intense than the first transplantation. Here, we investigated the effect of the chemokines CXCL9 and CXCL10 in a mouse retransplantation model.

Methods:

BALB/C mice were used as donors, and C57BL/6 mice were used as recipients. In the experimental groups, heterotopic heart transplantation was performed 6 weeks after skin grafting. In the control groups, heterotopic heart transplantation was performed without skin grafting. Untreated mouse served as blank controls.

Results:

- 1、 The mean graft survival time of heterotopic heart transplantations was 7.75 days in the experimental group ($n=6$) compared with 3.25 days in the control group ($n=6$; $P<0.001$).
- 2、 On day 3 after cardiac transplantation, histologic evaluation of the grafts revealed a higher ISHLT grade in the experimental group compared with the control group.
- 3、 Gene expression of CXCL9, CXCL10, IFN- γ , and IL-2 were markedly higher in the experimental group compared with the control group.
- 4、 Serum concentrations of CXCL9, CXCL10, IFN- γ , and IL-2 were markedly higher in the experimental group compared with the control group

Conclusions:

Our findings suggested that CXCL9 and CXCL10 play a critical role in transplantation and retransplantation. High levels of these cytokines during pretransplant period may lead to extensive acute rejection. Thus, our study enhances

the understanding of the increased expression and secretion of CXCL9 and CXCL10 by alloreactive T memory cells..

Key words: Chemokine; Retransplantation; Acute rejection

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
第一章 前言	1
1.1 心脏移植的现状	1
1.2 再次器官移植的现状	1
1.3 移植排斥反应	2
1.3.1 移植排斥反应的分型	2
1.3.2 同种异型排斥反应的识别机制和细胞学基础	2
1.3.3 急性排斥反应的发生过程	3
1.3.4 急性排斥反应损伤组织的效应机制	3
1.4 同种异型排斥反应的防治	4
1.4.1 选择组织型别相配的供者	4
1.4.2 免疫抑制药物的应用	4
1.4.3 诱导移植耐受	4
1.5 记忆性 T 细胞	5
1.5.1 记忆性 T 细胞的形成与维持	5
1.5.2 记忆性 T 淋巴细胞与再次移植	5
1.6 趋化因子 CXCL9 和 CXCL10 与再次移植	6
1.6.1 趋化因子的分类	6
1.6.2 趋化因子 CXCL9 和 CXCL10 与再次移植	7
1.7 研究的目的地及意义	7
第二章 材料与方法	9
2.1 实验材料	9
2.1.1 实验动物	9
2.1.2 主要实验试剂	9
2.1.3 主要实验仪器及器械	10

2.2 实验方法	11
2.2.1 同种异体小鼠皮肤移植模型	11
2.2.2 同种异体小鼠心脏移植模型（颈部异位套管法）	12
2.2.3 实验分组	14
2.3 检测方法	14
2.3.1 生存期观察	14
2.3.2 移植物组织病理学检测	15
2.3.3 RT-PCR 检测	17
2.3.4 ELISA 检测	19
2.4 统计学分析	20
第三章 实验结果与分析	21
3.1 心脏移植物的平均存活时间	21
3.2 移植物的组织病理学检测	22
3.3 小鼠心脏移植植物中 CXCL9、CXCL10、IFN- γ 、IL-2、IL-10、TGF- β 基因的相对表达量	24
3.4 小鼠血清中 CXCL9、CXCL10、IFN- γ 、IL-2、IL-10、TGF- β 的浓度	26
第四章 讨论	28
第五章 展望	35
附录	37
参考文献	39
致谢	43

Table of Contents

ABSTRACT IN CHINESE	I
ABSTRACT IN ENGLISH	III
CHAPTER 1 INTRODUCTION	1
1.1 CURRENT SITUATION OF CARDIAC TRANSPLANTATION	1
1.2 CURRENT SITUATION OF CARDIAC TRANSPLANTATION	1
1.3 TRANSPLANT REJECTION	2
1.3.1 Classification and characteristics of transplant	2
1.3.2 Role and cell basis of alloreaction	2
1.3.3 Acute rejection	3
1.3.4 Role of acute rejection	3
1.4 PREVENTION OF ALLOREACTION	4
1.4.1 Select donor	4
1.4.2 Immunosuppressive drugs	4
1.4.3 Transplantation tolerance	4
1.5 MEMORY T CELL	5
1.5.1 Generation and survival of memory T cells	5
1.5.2 The relation between memory T cells and transplantation	5
1.6 THE RELEATION BETWEEN CHEMOKINES CXCL9 和 CXC10 AND RETRANSPLANTATION	6
1.6.1 Classification of chemokines	6
1.6.2 The releation between chemokines cxcl9 和 cxc10 and retransplantation ..	7
1.7 THE PURPOSE AND SIGNIFICANCE OF THE STUDY	7
Chapter 2 MATERIALS AND METHODS	9
2.1 MATERIALS	9
2.1.1 Animals	9
2.1.2 Experimental reagents	9

2.1.3 Instruments and supplies	10
2.2 METHODS	11
2.2.1 Model of skin graft	11
2.2.2 Model of Heterotopic Cardiac Transplantation	12
2.2.3 Groups	14
2.3 TEST METHODS	14
2.3.1 Survival Time	14
2.3.2 Histologic Examination	15
2.3.3 Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ..	17
2.3.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	19
2.4 STATISTICAL ANALYSIS	20
Chapter 3 RESULTS AND ANALYSIS	21
3.1 SURVIVAL TIME OF CARDIAC ALLOGRAFTS	21
3.2 HISTOLOGIC EVALUATION	22
3.3 CXCL9 AND CXCL10 GENE EXPRESSION AND KEY EFFECTOR MOLECULES IN CARDIAC GRAFTS	24
3.4 EFFECT OF RETRANSPLANTATION ON THE SECRETION OF CXCL9, CXCL10 AND KEY EFFECTOR MOLECULES IN THE SERUM26	26
Chapter 4 Discussion	28
Chapter 5 Prospect	34
Appendices	36
Reference	38
Acknowledgement	41

第一章 前言

1.1 心脏移植的现状

1967年12月4日,毕业于南非开普敦大学医学院的克里斯蒂安巴纳德医生首次成功地实施并完成了人类同种异体原位心脏移植手术,这次手术的成功完成揭开了人类心脏移植的序幕。此后,心脏移植手术被广泛接纳并改善,进入80年代以来,随着手术技术的进一步发展和围手术期综合治疗方案的完善特别是免疫抑制剂研究的突破性发展,心脏移植迎来了一个蓬勃的发展时期。据相关部门统计,全世界最近10年中,每一年经注册备案的心脏移植手术大概为3500例,其中美国每年总共完成约2000-2300例,全球最大的心脏移植中心2012年完成人类心脏移植手术95例^[1]。中国2010-2012年的心脏移植数量大约在150-180例之间,其中我国最大的心脏移植中心——阜外心血管病医院每年完成心脏移植60例左右^[1]。

1.2 再次器官移植的现状

作为心脏移植最严重并发症之一的器官移植急性排斥反应同样也是引起移植物功能丧失、导致发生慢性排斥反应而影响移植物长期存活的重要原因之一^[2]。伴随着新型免疫抑制剂的不间断研发并投入使用、以及免疫治疗方案的不断日趋完善和手术技术的进一步提升,心脏移植的成功率也随之得到提高,因此对于终末期心脏病患者来说心脏移植已经成为最可行的治疗方法。但是由于免疫或非免疫因素所导致的移植物功能丧失也在进一步增加,一旦发生移植物失功,再次移植就成为唯一的选择。经过对1996-2005年之间美国的再次器官移植的概况进行的一个回顾性研究,Magee JC等^[3]发现其中2005年进行的肾再次移植率达到12.4%、肝再次移植率达到9.0%、心脏再次移植率达到4.75%、肺再次移植率达到5.3%。不幸的是再次移植后移植物的存活率均明显低于初次移植^[4,5]。怎样提高再次器官移植术后移植物存活率已经成为器官移植领域中的新热点。

1.3 移植排斥反应

1.3.1 移植术的分型

在移植术中，根据供、受者间存在的免疫遗传背景差异可以将移植术分为如下的四个类型：① 自体移植（autograft），指将准备接受移植者自身的组织移植到受者自身；② 同种同基因移植（syngraft），指将与受者遗传背景完全相同的供体的组织或者器官移植到受者体内（外）；③ 同种异基因移植（allograft），指属于同一动物种属内但是遗传背景不同的个体间的器官或者组织移植；④ 异种移植，指将一动物种属的个体的器官或组织移植到另一不同动物种属的个体。

如果移植物与受者所表达的蛋白质或者其他分子存在差异，那么移植排斥反应就会发生，移植物就会被排斥。因为同一动物种属内不同个体间差异所导致的分子结构的差异所引发的移植排斥反应我们称之为同种异型反应，而引发该种反应的移植相关抗原则被称之为同种异型抗原；因为不同动物种属间的差异所导致的这种分子结构的差异所引起的排斥反应我们称之为异种反应，而引发该反应的移植相关抗原我们称其为异种抗原。一般情况下，自体移植和同种同基因移植均不会引起排斥反应的发生。在同种异型移植或异种移植中，受者对移植物的排斥反应是影响移植术成功的主要障碍。

1.3.2 同种异型排斥反应的识别机制和细胞学基础

同种异基因移植，常被人们称之为同种异体移植，是目前临床上最常见的移植类型。究其本质而言，此类免疫应答反应（同种异体移植排斥反应）是由移植宿主 T 细胞表面 TCR 辨别移植物细胞表面同种异型抗原所诱发的。

对移植物排斥反应的发生、发展起着至关重要作用的是移植物内 APC（即“过客白细胞”，passenger leukocyte）。通过小鼠实验研究发现：① 在移植术前将移植物中表达 MHC II 类抗原的细胞清除掉，可以减轻或者减缓由 MHC II 类等位基因错配所引起的移植排斥反应，甚至不发生排斥反应；② 重新输入表达 MHC II 类分子的供者 APC，可以重建排斥反应。这个现象的机制目前已经被证实为：过客白细胞的表面表达同种异型 MHC II 类分子，该分子能激活 $CD4^+$ T 细胞， $CD4^+$ T 分泌细胞因子，借助相关细胞因子使同种异型反应性 $CD8^+$ CTL 被诱导增值和分化，进而激发排斥反应的发生发展。在人类，移植排斥反应更加复

杂，即使去除移植物中的过客白细胞，仍然发生移植排斥反应。

1.3.3 急性排斥反应的发生过程

通过不断的研究发现急性排斥反应的发生、发展过程包含如下几个步骤：①在移植器官血管与受体血管吻合、接通后，随着接通血管处的血液流动迁徙至受者外周淋巴组织的移植物中表达同种异型抗原的过客白细胞(主要为供者 APC)可以使该处同种异型反应性 $CD4^+T$ 细胞通过直接或间接提呈的形式被激活。②活化的 $CD4^+T$ 细胞分化为 Th1 细胞，协助 $CD8^+CTL$ 前体细胞的激活，使之增殖成为效应性 $CD8^+CTL$ 细胞。除此之外，供者抗原提呈细胞所表达的同种异型 MHC I 类抗原也可以直接激活 $CD8^+CTL$ 前体细胞，被激活 $CD8^+CTL$ 前体细胞通过自分泌 IL-2 支持其细胞增殖，因此不需要 $CD4^+T$ 细胞的协助。③多种趋化性细胞因子可以使活化的 Th1 细胞和 CTL 迁徙至移植物局部，进而产生免疫学效应。

1.3.4 急性排斥反应损伤组织的效应机制

经研究发现如下几方面的原因可以用来解释急性排斥反应损伤组织的作用机制：① $CD8^+CTL$ 细胞的细胞毒作用：表达有同种异型 MHC I 类分子的血管内皮细胞和实质细胞可以被体内存在的 $CD8^+CTL$ 细胞直接辨别并杀伤。② Th1 细胞的致炎因素：Th1 细胞可以产生 IL-2、IFN- γ 和 TNF- β 等细胞因子，经过活化单核巨噬细胞等炎性细胞而介导迟发型超敏反应性炎症，其损伤移植物的具体作用机制为：1) 通过扩张局部血管、增强白细胞的黏附作用、增加血管通透性等与之相似炎症效应，导致组织缺血；2) 细胞外基质被浸润的炎性细胞消化，正常组织结构被破坏；3) 炎性细胞释放多种细胞因子引起实质细胞受损和功能降低，或者通过采用上调 MHC 抗原表达的方法而加速、扩大排斥反应的发生发展。③体液免疫效应：在急性排斥反应发生、发展的后期，受者体内会逐渐生成抗同种异型抗原的抗体和抗内皮细胞表面分子的抗体，这些生成的抗体通过和相应的抗原结合形成免疫复合物，最终通过激活补体系统损害移植血管，进而导致移植功能的破坏。

1.4 同种异型排斥反应的防治

1.4.1 选择组织型别相配的供者

通过进行 ABO 血型抗原配型和 HLA 抗原配型的方法来筛选组织型别相匹配的供体, 这些方法的使用可以明显的降低同种异型抗原的免疫原性, 并且也可以尽可能的减轻所发生的移植排斥反应。

1.4.2 免疫抑制药物的应用

免疫抑制药物的研究进展直接促进了现代移植技术的发展。当前, 同种异体器官移植术的患者必须终生使用免疫抑制药物, 这已成为手术后的常规治疗方案。大量的研究和实验已经表明, 同种异基因移植排斥反应的发生、发展主要是由受者 T 细胞介导的, 因此临床使用的药物其主要功能是抑制 T 细胞的作用, 可以将其简单的概括为如下几种: ① 环孢菌素 A (cyclosporin A, CsA), 又被称之为环孢素, 迄今为止, 这一药物是临床上最为广泛使用的免疫抑制剂, 它是真菌来源的小环状肽, 通过抑制 T 细胞活化过程中的 IL-2 基因转录, 该药物最为明显的不足之处是有效治疗剂量与肾毒性剂量非常的接近, 因此对人体的伤害也较大; ② FK506, 这一药物是近年研制成功的真菌来源的大环内酯类药物, 它具有与环孢菌素相类似的药物效果及机制, 相异之处在于 FK506 在胞内是与 FK 结合蛋白(FKBP)结合, 而不是与环孢亲和素结合, 并且 FK506 的肾毒性明显小于环孢菌素 A, 所以 FK506 的应用范围较广, 毒性较小。③ 雷帕霉素(rapamycin), 这是一种属于抗生素类的免疫抑制剂, 雷帕霉素的作用环节与 CsA 不同, 前者抑制 IL-2 参与的 T 细胞增值, 而后者阻断 IL-2 的合成, 所以通过联合使用这两种药物可以更加有效地抑制 T 细胞的功能。④ 麦考酚酸酯(mycophenolate mofetil, MMF), 是麦考酚酯的 2-乙基酯类衍生物。传统抗代谢药物硫唑嘌呤和环磷酰胺的毒性较大, 但是麦考酚酸酯的毒性较前二者均较小, 目前临床上常将它与 CsA 联合使用预防急性排斥。

1.4.3 诱导移植耐受

在不应用免疫抑制剂的情况下, 通过多种方法诱导机体免疫系统对同种异型移植抗原产生特异性无应答的方法称之为移植耐受。主要包含如下几个方面: ① 将根据供者 MHC 分子多肽区顺序合成的多肽或可溶性 MHC 分子大剂量的输入

给受者，这一方法的机理是通过阻断特异性 TCR 识别功能而诱导同种异型反应性 T 细胞产生耐受；② 大剂量的输入可溶性 CTLA-4 给受者，这可以使移植细胞表面 B7 分子与受者 T 细胞表面 CD28 分子之间的相互作用被阻断，进而诱导 T 细胞导致 T 细胞的无能；③ 阻断共刺激信息传导通路（CD40-CD40L、CD2-LFA-3 等）来诱导 T 细胞无能。

1.5 记忆性 T 细胞

1.5.1 记忆性 T 细胞的形成与维持

初始的 T 淋巴细胞通过识别外来的抗原、进而致敏、活化，最终分化为效应性 T 淋巴细胞产生免疫应答效应，初次免疫应答完成后，生成的效应性 T 淋巴细胞大部分凋亡，少部分转化为记忆性 T 淋巴细胞，在免疫应答结束之后仍然可以长期存在。它们的存在可以使得机体在再次接触相同或类似抗原时，记忆性 T 淋巴细胞能够迅速扩增并形成大量的效应性 T 细胞，引起比初次免疫应答更剧烈的免疫反应。

1.5.2 记忆性 T 淋巴细胞与再次移植

既往对器官移植免疫排斥反应的研究多侧重于未致敏的 T 细胞，此外有一个尚未引起足够重视的问题，即受体在进行移植前由于细菌，病毒感染及输血，分娩等因素使 T 细胞致敏，并形成记忆性 T 淋巴细胞^[6]，部分记忆性 T 细胞虽然没有受到供体抗原的致敏，但能够对供体抗原快速产生效应^[7]。在机体抵抗感染等外来致病原入侵的这些环节上，记忆性 T 淋巴细胞是相当关键的，但越来越多的研究证明，在器官移植中记忆性 T 淋巴细胞所起的作用却是非常不利的。我们在前期的研究中已经发现，记忆性 T 细胞可以迅速的损伤移植植物，导致急性排斥反应的发生^[8-9]。研究表明，传统的免疫抑制剂（如他克莫司、雷帕霉素西罗莫司^[10]等）及阻断共刺激信号通路的治疗对 T_m 细胞并不显示出确切的效果。研究发现，同种异体皮肤移植 6 周后的小鼠体内含有足够数量的记忆性 T 淋巴细胞，以该小鼠为受体进行心脏移植所发生的排斥反应比进行记忆性 T 细胞输注更加剧烈，这说明记忆性 T 淋巴细胞可以介导再次心脏移植急性排斥反应的发生。并且该模型与过继（输注）记忆性 T 淋巴细胞相比可以更好的模拟

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.

厦门大学博硕士论文摘要库