

学校编码: 10384

分类号_____ 密级_____

学号: 24520081153504

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

抑制 T 细胞诱导同种异体胰岛移植耐受

Suppressing T cell induces islet allograft tolerance

夏俊杰

指导教师姓名: 齐忠权 教授

专业名称: 生理学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩日期: 2012 年 6 月

2012 年 5 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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（免疫抑制剂）课题（组）的科研成果，获得（齐忠权教授）课题（组）经费或实验室资助，在（厦门大学器官移植研究所）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，可以不做特别声明。）

声明人（签名）：

2012年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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硕士、博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、缩印或者其他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）

2012年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要.....	I
Abstract.....	V
第一章 前言.....	1
1.1 T 细胞与胰岛移植免疫排斥.....	2
1.1.1. T 细胞亚群和功能.....	3
1.1.2. 胰岛移植排斥反应的类型和特点.....	5
1.1.3. T 细胞在胰岛移植排斥中的作用机制.....	7
1.1.4. Tm 细胞在胰岛移植中的作用.....	13
1.2 T 细胞与胰岛移植免疫耐受诱导策略.....	24
1.2.1. T 细胞与胰岛移植耐受.....	25
1.2.2. T 细胞免疫耐受建立的机制.....	25
1.2.3. 胰岛移植中化学免疫抑制剂的应用.....	30
1.2.4. T 细胞共刺激信号通路与胰岛移植免疫耐受.....	36
1.2.5. Tm 细胞抑制策略与胰岛移植耐受.....	37
1.3 本研究的目的、意义和内容.....	41
1.3.1. 研究目的.....	41
1.3.2. 研究意义.....	41
1.3.3. 研究内容.....	42
第二章 材料与方 法.....	44
2.1 实验材料.....	44
2.1.1 实验动物.....	44
2.1.2 主要试剂.....	44
2.1.3 主要仪器.....	46
2.2 研究方法.....	47
2.2.1 动物模型.....	47
2.2.2 细胞免疫学研究方法.....	51
2.2.3 分子生物学研究方法.....	56

2.2.4	统计学分析.....	62
第三章	结果与讨论	63
3.1	As₂O₃ 抑制 T 细胞应答诱导同种异体胰岛移植免疫耐受.....	63
3.1.1	As ₂ O ₃ 抑制 T 细胞增殖	63
3.1.2	As ₂ O ₃ 抑制 T 细胞的作用机制	65
3.1.3	As ₂ O ₃ 对胰岛毒性的研究.....	69
3.1.4	As ₂ O ₃ 联合 Rapa 抑制 T 细胞激活诱导同种异体胰岛移植免疫耐受.....	70
3.1.5	As ₂ O ₃ 保护同种异体胰岛移植并减少炎细胞浸润	71
3.1.6	As ₂ O ₃ 可以降低受体对同种异体抗原的免疫应答能力.....	73
3.1.7	As ₂ O ₃ 通过克隆清除保护同种异体胰岛移植.....	74
3.1.8	小结.....	75
3.2	抑制 Tm 细胞应答诱导胰岛移植免疫耐受	79
3.2.1.	同种异体反应性 Tm 细胞介导加速性排斥模型的建立.....	80
3.2.2.	单克隆抗体对同种异体反应性 Tm 细胞的抑制作用	81
3.2.3.	单克隆抗体对序贯模型的作用.....	84
3.2.4.	单克隆抗体抑制 Tm 细胞保护序贯模型移植.....	86
3.2.5.	单克隆抗体对移植部位炎症因子的影响.....	88
3.2.6.	单克隆抗体对 T 细胞亚群的比例变化的影响	89
3.2.7.	诱导受体免疫系统对供体抗原的特异性低应答.....	91
3.2.8.	序贯模型中的同种异体反应性抗体削弱了联合抗体的作用.....	92
3.2.9.	组织特异性 Tm 细胞 的作用及干预.....	93
3.2.10.	小结	97
第四章	结论与展望	101
4.1	结论	101
4.1.1.	As ₂ O ₃ 有望成为胰岛移植新型免疫抑制剂.....	101
4.1.2.	抑制 Tm 细胞应答诱导同种异体胰岛移植免疫耐受.....	102
3.3	展望	104
	参考文献	105
	附 录.....	147

附录一：图表索引	147
附录二：缩略语及中英文对照	149
附录三：攻读博士期间发表和待发表的学术论文	151
致 谢	153

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Chinese Abstract	I
English Abstract	V
Chapter 1 Introduction	1
1.1 T cells in islets transplantation	2
1.1.1. Subsets and function of T cells	3
1.1.2. Typers and characteristics of islet transplant rejection	5
1.1.3. The mechanisms of T cell mediated rejection	7
1.1.4. The mechanisms of Tm cell mediated rejection	13
1.2 T cells and strategies to induce tolerance in islet transplantation.....	24
1.2.1. T cells and tolerance	25
1.2.2. Induction of tolerance	25
1.2.3. Immunosuppressive agents used in islet transplantation	30
1.2.4. Costimulatory pathway and tolerance induction.....	36
1.2.5. Suppressing Tm cells to induce tolerance.....	37
1.3 Purpose, significance and contents of this study	41
1.3.1. Purpose.....	41
1.3.2. Significance.....	41
1.3.3. Contents	42
Chapter 2 Materials and Methods	44
2.1 Materials	44
2.1.1 Animals.....	44
2.1.2 Main regents.....	44
2.1.3 Main instruments	46
2.2 Methods.....	47
2.2.1 Animal transplanation models	47

2.2.2	Experiments related cells	51
2.2.3	Experiments related gene and protein.....	56
2.2.4	Statistical analysis.....	62
Chapter 3 Results and discussion.....		63
3.1	As₂O₃ suppressing T cells and induce islet transplant tolerance	63
3.1.1	As ₂ O ₃ suppressing T cells proliferation	63
3.1.2	The mechanism of As ₂ O ₃ suppressing T cells.....	65
3.1.3	Toxicity of As ₂ O ₃ to islets.....	69
3.1.4	As ₂ O ₃ combined with Rapa to suppress T cells and induce tolerance	70
3.1.5	As ₂ O ₃ protect islet allo graft and reduce cells infiltration	71
3.1.6	As ₂ O ₃ reduce responder abilities of recipients mice	73
3.1.7	Clone depletion is the main mechanism of As ₂ O ₃	74
3.1.8	Summary of this part.....	75
3.2	Suppressing Tm cells to induce islet tolerance	79
3.2.1.	Tm mediated accelerate rejection models.....	80
3.2.2.	Suppressing Tm cells with mAbs in Tm transferred model.....	81
3.2.3.	Suppressing Tm cells with mAbs in allo-primed model.....	84
3.2.4.	Combination of mAbs protect islet allograft in allo-primed model.....	86
3.2.5.	Combination of mAbs reduce the inflammatory factor	88
3.2.6.	Combination of mAbs change the proportion of Tm and Tregs	89
3.2.7.	Combination of mAbs reduce responder abilities of recipients mice	91
3.2.8.	The prolongation of survival was offset by donor specific antibody.....	92
3.2.9.	Islet specific Tm cell.....	93
3.2.10.	Summary of this part	97
Chapter 4 Conclusion and Prospect.....		101
4.1	Conclusion	101
4.1.1.	As ₂ O ₃ suppressing T cells and induce islet transplant tolerance	101
4.1.2.	Suppressing Tm cells to induce islet tolerance	102

3.3 Prospect.....	104
References	105
Appendices.....	147
Figure index	147
Abbreviations.....	149
My Publication.....	151
Acknowledgments	153

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要

目的: 我国已成为世界糖尿病第二大国, 胰岛移植是治疗糖尿病最有前景的手段之一, 而免疫排斥和供体短缺问题是胰岛移植面临的主要难题, 免疫排斥问题使胰岛生存期不理想进而需要多次胰岛移植, 进一步加剧了供体短缺的问题。胰岛移植术后大量昂贵的免疫抑制剂也给患者带来了沉重的负担。本课题以抑制 T 细胞诱导胰岛移植耐受为中心, 从两个方面开展研究, 一方面开发免疫抑制效果更好、副作用更小、成本更低的免疫抑制剂, 另一方面研究记忆性 T 细胞 (Memory T cells, T_m) 在胰岛移植中的作用机制和抑制方法。

方法: 一方面我们尝试探索 As₂O₃ 对于胰岛移植免疫排斥反应的抑制作用: 首先通过淋巴细胞转化实验、凋亡实验等体外实验研究 As₂O₃ 对于 T 细胞的抑制作用和机制, 以及对胰岛细胞的毒性; 其次, 建立小鼠同种异体胰岛移植模型, 研究 As₂O₃ 或在联合使用 Rapa 的情况下对于胰岛生存期的影响; 最后, 通过对 T 淋巴细胞亚群、Th1/Th2 相关炎症因子、移植物病理切片等进行研究, 试图阐明 As₂O₃ 抑制 T 细胞诱导胰岛移植耐受的机制以及作为免疫抑制药物的可行性。另一方面, 系统研究了糖尿病患者体内存在的同种反应性 T_m 细胞和胰岛组织特异性的 T_m 细胞对胰岛移植物的影响及解决方法: 首先为了研究同种反应性 T_m 细胞介导的加速排斥的作用及机制, 我们通过对受体同品系小鼠进行同种异体皮肤移植, 使其经受预致敏并产生大量同种反应性 T_m 细胞; 其次, 通过提取这些 CD4⁺ 和 CD8⁺ 同种反应性 T_m 细胞并过继转移给 naive 的受体小鼠, 建立加速性排斥模型, 通过生存期的变化研究这些 T_m 细胞对胰岛移植物生存期的影响, 并尝试使用单克隆抗体特异的阻断 CD134 和 CD122 信号通路来特异的抑制这些 T_m 细胞的作用, 延长移植物的生存期; 再次, 在序贯胰岛移植模型中, 通过生存期的变化来验证阻断 CD134 和 CD122 信号通路分别抑制 CD4⁺ T_m 细胞和 CD8⁺ T_m 细胞对于其胰岛移植物生存期的影响, 并通过对 T 淋巴细胞亚群、Th1/Th2 相关炎症因子、移植物病理切片等实验手段, 试图阐明生存期变化的机制; 最后, 以 NOD 小鼠为模型, 研究发生严重糖尿病 NOD 小鼠中 T_m 细胞比例的变化, 并通过将这些 T_m 细胞过继转移给 NOD-scid 小鼠, 观察 NOD-scid

的发病情况，以验证 NOD 小鼠体内 Tm 细胞是否为胰岛组织特异性 Tm 细胞，之后尝试通过使用单克隆抗体阻断 CD134L 和 CD122 信号通路，抑制胰岛组织特异性 Tm 细胞，保护胰岛免受 Tm 细胞介导的破坏作用。

结果: 在关于 As₂O₃ 作为胰岛移植免疫抑制剂的可能性以及作用机制的研究中，我们有以下结果：首先，体外实验中，淋巴细胞转化实验证实 2~4μM As₂O₃ 可以显著抑制 T 细胞的增殖，并且具有剂量依赖性，并且在淋巴细胞转化试验体系中加入外源 IL-2 不能逆转 As₂O₃ 对 T 细胞增殖的抑制作用，说明 As₂O₃ 的作用机制并不是诱导 T 细胞无能；其次，T 细胞凋亡实验表明 As₂O₃ 可以诱导 T 细胞的凋亡，2μM As₂O₃ 诱导 T 细胞凋亡率达到 80%，4μM As₂O₃ 诱导 T 细胞凋亡率达 95%，凋亡实验结果与混合淋巴细胞反应结果相同，均是在 2~4μM As₂O₃ 即具有非常好的效果，说明诱导凋亡才是 As₂O₃ 抑制 T 细胞增殖的主要机制；再次，体内试验中，As₂O₃ 联合半剂量 Rapa 可以抑制免疫排斥反应，显著延长胰岛移植物的生存期，达到甚至超过全剂量 Rapa 的效果（有 1/5 的受体鼠移植生存期>100 天达到耐受）；最后，我们通过对受体移植物、血清以及脾脏中 T 细胞亚群的检测发现，As₂O₃ 联合半剂量 Rapa 可以显著降低受体鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的比例以及血清中 Th1/Th2 因子的浓度，同时移植物中炎细胞浸润数量也相应减少，这些结果表明，As₂O₃ 与半剂量的 Rapa 联合，在降低 Rapa 用量的同时，可以对供体反应性 T 细胞进行克隆清除，减少炎细胞向移植物浸润，从而抑制了 T 细胞介导的排斥反应，保护了抑制物，延长了移植物的生存期。在关于 Tm 细胞在胰岛移植中的作用及机制的研究中，我们主要由以下发现：首先，同种反应性 Tm 细胞过继转移胰岛移植模型中，受体鼠均可以加速排斥胰岛移植物，说明同种反应性的 Tm 细胞对胰岛移植物确实是很大的威胁；其次，用药干预结果表明，阻断 CD134L 和 CD122 信号通路可以分别很好的抑制 CD4⁺ Tm 细胞和 CD8⁺ Tm 细胞，诱导 CD4⁺ Tm 细胞或 CD8⁺ Tm 细胞胰岛移植物的耐受；再次，我们进一步在序贯模型中验证了此结果，发现序贯模型对胰岛移植物的排斥反应更为强烈，无药物处理组生存期更短，通过使用单克隆抗体阻断 CD134L 和 CD122 信号通路后可以延长胰岛移植物的生存期；通过对受体脾脏淋巴细胞亚群、血清、移植物的检测发现，联合使用抗体后，受体鼠外周 CD4⁺ Tm 细胞、

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