

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520091152991

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

1,25(OH)₂D₃ 抑制同种反应性

CD4⁺记忆性 T 细胞介导的移植排斥反应

Inhibiting Transplant Rejection Mediated by Alloreactive

CD4⁺ Memory T Cells by 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃

席 艳 峰

指导教师姓名: 刘忠臣、齐忠权 教授

专业名称: 外 科 学

论文提交日期: 2012 年 月

论文答辩日期: 2012 年 月

学位授予日期: 2012 年 月

2012 年 月 中国 厦 门

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（记忆性移植免疫、免疫抑制剂）课题（组）的科研成果，获得（刘忠臣教授、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

英汉缩略词对照表.....	V
中文摘要.....	VI
英文摘要.....	VII
第一章 前言.....	1
1.1 CD4⁺Tm 与器官移植.....	1
1.1.1 Tm 的产生、功能和维持.....	1
1.1.2 CD4 ⁺ Tm 的功能特点.....	3
1.1.3 针对 CD4 ⁺ Tm 的免疫抑制策略.....	5
1.2 1,25(OH)₂D₃ 在器官移植中的研究进展.....	6
1.2.1 1,25(OH) ₂ D ₃ 的免疫调节作用及其机制.....	6
1.2.2 1,25(OH) ₂ D ₃ 在器官移植中的应用.....	9
1.3 研究目的、意义及内容.....	12
第二章 材料与方法.....	14
2.1 实验材料.....	14
2.1.1 实验动物.....	14
2.1.2 实验试剂.....	14
2.1.3 实验仪器.....	15
2.2 实验方法.....	16
2.2.1 动物模型及实验分组.....	16
2.2.2 细胞学实验方法.....	20
2.2.3 基因蛋白相关实验方法.....	26
2.2.4 组织病理学实验方法.....	29
2.2.5 统计学分析方法.....	31
第三章 1,25(OH)₂D₃ 抑制 CD4⁺Tm 的免疫活性.....	32
3.1 实验结果.....	32
3.1.1 CD4 ⁺ Tm 鉴定及纯度.....	32
3.1.2 1,25(OH) ₂ D ₃ 对 CD4 ⁺ Tm 活化增殖的影响.....	33
3.1.3 1,25(OH) ₂ D ₃ 影响 CD4 ⁺ Tm 分泌相关细胞因子.....	34

3.1.4 1,25(OH) ₂ D ₃ 对 CD4 ⁺ Tm 的诱导作用.....	36
3.2 讨论与结论.....	37
第四章 1,25(OH)₂D₃ 抑制 CD4⁺Tm 介导的移植排斥反应.....	41
4.1 实验结果.....	42
4.1.1 1,25(OH) ₂ D ₃ 最佳治疗剂量的探索.....	42
4.1.2 1,25(OH) ₂ D ₃ 对移植物存活时间的影响.....	43
4.1.3 1,25(OH) ₂ D ₃ 对移植受体体重的影响.....	44
4.1.4 1,25(OH) ₂ D ₃ 对移植受体血清总 Ca ²⁺ 浓度的影响.....	45
4.1.5 1,25(OH) ₂ D ₃ 减轻移植物中细胞浸润和组织损伤.....	46
4.1.6 1,25(OH) ₂ D ₃ 对移植受体血清学的影响.....	47
4.1.7 1,25(OH) ₂ D ₃ 对移植物中免疫相关因子基因水平的影响.....	49
4.1.8 1,25(OH) ₂ D ₃ 对移植受体脾脏和淋巴结中 CD4 ⁺ Tm 的影响.....	49
4.1.9 1,25(OH) ₂ D ₃ 对移植受体脾脏和淋巴结中的 Tregs 的影响.....	51
4.2 讨论与结论.....	53
第五章 展望.....	57
参考文献.....	58
发表文章.....	66
致谢.....	67

Table of Contents

Abbreviation.....	V
Abstract in Chinese.....	VI
Abstract in English.....	VII
Chapter 1 Introductoin.....	1
1.1 The relationship between CD4⁺Tm and organ transplantation.....	1
1.1.1 Generation, function and maintenance of Tm.....	1
1.1.2 Characteristics of CD4 ⁺ Tm.....	3
1.1.3 Immune suppressing strategy aimed at CD4 ⁺ Tm.....	5
1.2 Advances of 1,25(OH)₂D₃ in organ transplantation.....	6
1.2.1 Immunomodulatory effects of 1,25(OH) ₂ D ₃ and its mechanism.....	6
1.2.2 Applicatoins of 1,25(OH) ₂ D ₃ in organ transplantation.....	9
1.3 Purpose, significant and content of this study.....	12
Chapter 2 Materials and Methods.....	14
2.1 Materials.....	14
2.1.1 Experimental animals.....	14
2.1.2 Experimental reagents.....	14
2.1.3 Experimental apparatus.....	15
2.2 Methods.....	16
2.2.1 Animal model and grouping.....	16
2.2.2 Cytology.....	20
2.2.3 Genomics and proteomics.....	26
2.2.4 Histology and pathology.....	29
2.2.5 Statistical analysis.....	31
Chapter 3 1,25(OH)₂D₃ suppresses immune activity of CD4⁺Tm.....	32
3.1 Results.....	32
3.1.1 Identification and purity of CD4 ⁺ Tm.....	32
3.1.2 1,25(OH) ₂ D ₃ influeces activation and proliferation of CD4 ⁺ Tm.....	33
3.1.3 1,25(OH) ₂ D ₃ impacts cytokines secreted by CD4 ⁺ Tm.....	34
3.1.4 Induction of CD4 ⁺ Tm by 1,25(OH) ₂ D ₃	36

3.2 Discussion and conclusion.....	37
Chapter 4 1,25(OH)₂D₃ inhibits rejection mediated by CD4⁺Tm.....	41
4.1 Results.....	42
4.1.1 Exploring optimal therapeutic dose of 1,25(OH) ₂ D ₃	42
4.1.2 1,25(OH) ₂ D ₃ impacts allografts survival time.....	43
4.1.3 Influencing recipient body weight.....	44
4.1.4 Influencing serum total calcium concentration.....	45
4.1.5 Reducing tissue damage and inflammatory cells infiltration.....	46
4.1.6 Impacting of recipient serological cytokines.....	47
4.1.7 Impacting of immune-related mRNA in allografts.....	49
4.1.8 Reducing CD4 ⁺ Tm in recipients spleen and lymph nodes.....	49
4.1.9 Influencing Tregs in recipients spleen and lymph nodes.....	51
4.2 Discussion and conclusion.....	53
Chapter 5 Prospect.....	57
Reference.....	58
Publicaton.....	66
Acknowledgements.....	67

英汉缩略词对照表

缩写	全称（英文）	全称（中文）
Ag	Antigen	抗原
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依赖细胞介导的细胞毒作用
AICD	Activation-induced cell death	活化诱导的细胞死亡
APC	Antigen-presenting cell	抗原提呈细胞
DC	Dendritic cells	树突状细胞
MST	Mean survival time	平均存活时间
d	Day	天
μl	Microliter	微升
μM	Micromolar	微摩尔
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays	酶联免疫吸附法
IFN-γ	Interferon γ	γ 干扰素
IL-10	Interleukin 10	白介素10
IL-2	Interleukin 2	白介素 2
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织相容物复合体
min	Minute	分钟
MLR	Mixed lymphocyte reactivity	混合淋巴细胞反应
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
Tc	Cytotoxic T cell	细胞毒性 T 细胞
T_{CM}	Central memory T cells	中枢记忆性 T 细胞
TCR	T cell receptor	T 细胞受体
T_{EM}	Effector memory T cells	效应记忆性 T 细胞
TGF-β	Transforming growth factor β	转化生长因子 β
Th	Helper T cell	辅助性 T 细胞
Tm	Memory T cells	记忆性 T 细胞
Tregs	Regulatory T cells	调节性 T 细胞
VDR	Vitamin D receptor	维生素 D 受体

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

目的：供者反应性记忆性 T 细胞（memory T cells, T_m）介导的移植排斥反应是目前器官移植领域难以攻克的主要障碍之一。CD4⁺T_m 是 T_m 家族的主要成员之一，在记忆性移植排斥反应中发挥重要作用。在本研究中，通过体外验证 1,25(OH)₂D₃ 能否抑制 CD4⁺T_m 的免疫活性，结合体内实验研究 1,25(OH)₂D₃ 与 CD4⁺T_m 介导的移植排斥反应之间的关系，而且进一步探讨相关实验结果的发生机制。

方法：在同种异体小鼠间进行皮肤移植，移植后 4-12 周内从受体鼠脾脏分离得到同种反应性 CD4⁺T_m，通过体外细胞学实验研究 1,25(OH)₂D₃ 对 CD4⁺T_m 的免疫抑制特性。然后将 CD4⁺T_m 过继转移至裸鼠体内，过继转移 CD4⁺T_m 后 7 天内构建异位血管化心脏移植模型，在该模型上应用 1,25(OH)₂D₃ 治疗，摸索 1,25(OH)₂D₃ 的最佳治疗剂量，记录受体鼠体重变化和移植物存活时间，针对实验结果从不同角度探讨其发生机制。

结果：体外实验发现，1,25(OH)₂D₃ 能够抑制 CD4⁺T_m 增殖，且这种增殖抑制作用只能被外源性 IL-2 部分逆转。在过继转移 CD4⁺T_m 的裸鼠心脏移植模型中应用 1,25(OH)₂D₃ 治疗，移植物平均生存时间（mean survival time, MST）从 6.5 天延长到 20.2 天。与对照组相比，1,25(OH)₂D₃ 治疗后受体鼠体重未见明显下降，但血清总 Ca²⁺ 水平有一定程度的升高。移植物病理学实验提示移植物中免疫损伤细胞浸润减少，组织损伤明显减轻。移植物中 IL-2、IFN- γ 和 Foxp3 的相对基因表达量下降，而 IL-10 的相对基因表达量上升。受体鼠血清中 IFN- γ 和 IL-2 含量显著下降，而 IL-10 含量呈增加趋势。在受者鼠脾脏和淋巴结中，CD4⁺T_m 以及调节性 T 细胞（regulatory T cells, T_{regs}）比例均不同程度地减少。

结论：1,25(OH)₂D₃ 能够抑制同种反应性 CD4⁺T_m 介导的急性移植排斥反应，延长移植物的生存时间，其机制可能是诱导 CD4⁺T_m 发生克隆清除或克隆无能。该发现对开发针对 CD4⁺T_m 的免疫抑制剂提供了一个很好的研究方向。

关键词：CD4⁺ 记忆性 T 细胞；1,25(OH)₂D₃；心脏移植

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Objective: Donor-reactive memory T cells mediated transplant rejection is difficult to overcome and known as a major obstacle in the field of organ transplantation. CD4⁺Tm, one key member of the Tm family, plays an irreplaceable role in transplant rejection. In this study, by using of 1,25(OH)₂D₃ to suppress immune activity of CD4⁺Tm *in vitro* and *in vivo*, we achieve to inhibit acute allograft rejection and prolong allograft survival time, and to explore mechanism of this action.

Methods: Skin transplantation was conducted between allogeneic mice. 4-12 weeks after skin transplantation, pre-sensitized CD4⁺Tm were isolated from recipient spleen and were programmed of immunosuppressive properties on CD4⁺Tm *in vitro*. Within 7 days, after CD4⁺Tm were adoptively transferred to nude mice, heterotopic vascularized heart transplantation was performed from C57BL/6 to naive nude mice. Exploring optimal therapeutic dose, recording recipients body weight and drawing survival time curves were developed when 1,25(OH)₂D₃ was applied to this model from day -3 to day 10.

Results: *In vitro*, proliferation of CD4⁺Tm was significantly inhibited by 1,25(OH)₂D₃ and was partly restored following exogenous IL-2 addition. Compared with the control group, mean survival time of cardiac allografts in the 1,25(OH)₂D₃ group was prolonged from 6.5 to 20.2 days. No significant change of recipients body weight but higher serum calcium level was observed after 1,25(OH)₂D₃ treatment. Five days after transplantation, although IL-2 and IFN- γ were reduced in recipient grafts and sera by 1,25(OH)₂D₃ treatment, that of IL-10 increased correspondingly. Graft pathology suggested that inflammatory infiltration and tissue damage in the allograft was significantly reduced. The proportions of CD4⁺Tm and Tregs, both in recipient spleen and lymph nodes, were lowered by 1,25(OH)₂D₃ when compared with the control group.

Conclusion: 1,25(OH)₂D₃ can inhibit accelerated rejection mediated by CD4⁺Tm and prolong allografts survival by possible mechanism of inducing clonal deletion or clonal anergy. These results may provided a favorable theory for exploiting 1,25(OH)₂D₃ as a novel immunosuppressant aimed at alloreactive CD4⁺Tm.

Keywords: CD4⁺ memory T cells; 1,25(OH)₂D₃; heart transplantation

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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