

学校编码: 10384

分类号_____ 密级_____

学号: 24520110154127

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

抑制同种异体心脏移植排斥反应的策略

The strategies of inhibition of cardiac allograft rejection

林颖颖

指导教师姓名: 齐忠权 教授

专 业 名 称: 生理学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

2014 年 5 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

目 录

中文摘要	I
Abstract.....	III
第一章 前言	1
1.1 器官移植排斥反应与 T 细胞研究进展.....	1
1.1.1. 器官移植排斥反应的类型和特点.....	2
1.1.2. T 细胞的分类与功能	3
1.1.3. 记忆性 T 细胞的特点和抑制策略	9
1.2 器官移植耐受诱导策略	15
1.2.1. T 细胞免疫耐受建立的机制	14
1.2.2. Notch 信号通路参与免疫调节的机制.....	17
1.3 本研究的目的、意义和内容	22
1.3.1. 研究目的.....	22
1.3.2. 研究意义.....	22
1.3.3. 研究内容.....	23
第二章 材料与方 法	24
2.1 实验材料	24
2.1.1 实验动物.....	24
2.1.2 腺病毒实验相关材料.....	24
2.1.3 主要试剂.....	24
2.1.4 主要仪器.....	26
2.1.5 主要耗材.....	27
2.2 研究方法	27
2.2.1 动物模型的建立.....	27
2.2.2 细胞生物学实验与方法.....	27
2.2.3 分子生物学研究方法.....	30
2.2.4 统计学分析.....	35
第三章 结果与讨论	45

3.1 DC 过表达 Jagged-1 抑制初次同种异体心脏排斥反应	45
3.1.1 树突状细胞过表达小鼠的 Jagged-1 蛋白	46
3.1.2 体外过表达 Jagged-1 调节 T 细胞的增殖和活化.....	47
3.1.3 体内应用 JAG1-DC 并联合共刺激阻断剂	49
3.1.4 联合治疗降低受体对同种异体抗原的免疫应答能力.....	50
3.1.5 联合治疗可以诱导 Foxp3 和 TGF- β 的表达	52
3.1.6 讨论.....	54
3.2 As₂O₃ 抑制 Tm 细胞介导的同种异体心脏移植排斥反应	57
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	57
3.2.2 As ₂ O ₃ 联合 anti-CD154/LFA-1 显著延长心脏移植物的生存期	59
3.2.3 As ₂ O ₃ 对心脏移植物的保护作用	60
3.2.4 As ₂ O ₃ 联合 anti-CD154/LFA-1 抑制 Tm 的生成并诱导产生 Treg	62
3.2.5 联合治疗诱导受体脾脏对抗原的特异性免疫低应答.....	64
3.2.6 联合治疗对受体免疫系统的其他影响.....	66
3.2.7 讨论.....	67
第四章 结论与展望	70
4.1 结论	70
4.1.1 Jagged-1 有望成为调节免疫耐受的新靶点	70
4.1.2 As ₂ O ₃ 抑制 Tm 细胞介导的同种异体心脏移植排斥反应	71
4.2 展望	72
参考文献	73
附录.....	96
附录一：图表索引	96
附录二：缩略语及中英文对照	98
附录三：攻读博士期间发表和待发表的学术论文.....	99
致 谢.....	101

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 The research progress of T cells and organ transplant rejection	1
1.1.1. The types and characteristics of organ transplant rejection	2
1.1.2. The subsets and function of T cells.....	3
1.1.3. The characteristics of memory T cells and the treatment	9
1.2 The strategies to induce tolerance in transplantation	14
1.2.1. The induction of tolerance	14
1.2.2. Notch signaling pathway in the immune modulation	17
1.3 Purpose, significance and contents of this study	21
1.3.1. Purpose.....	21
1.3.2. Significance.....	21
1.3.3. Contents	22
Chapter 2 Materials and Methods	24
2.1 Materials	24
2.1.1 Animals	24
2.1.2 Materials about adenovirus experiment	24
2.1.3 Main regents.....	26
2.1.2 Main instruments	27
2.1.3 Main Supplies	27
2.2 Methods	27
2.2.1 Animal models	27
2.2.2 Experiments related cells	30
2.2.3 Experiments related gene and protein.....	35

2.2.4	Statistical analysis	44
Chapter 3	Results and discussion	45
3.1	Overexpression of Jagged-1 in DC inhibit heart transplantation	45
3.1.1	Overexpression of Jagged-1 protein in DC	46
3.1.2	Jagged-1 modulates the proliferation and activation of T cells	47
3.1.3	JAG1-DC combined with the costimulatory blockade	49
3.1.4	Combination treatment reduces responder abilities	50
3.1.5	Combination treatment induces expression of Foxp3 and TGF- β	52
3.1.6	Discussion	54
3.2	As₂O₃ Suppressing Tm cells mediated accelerate rejection	57
3.2.1.	Tm mediated accelerate rejection models	57
3.2.2.	As ₂ O ₃ combined with anti-CD154/LFA-1 prolongs the survival time ...	59
3.2.3.	The protection of As ₂ O ₃ in allografts	60
3.2.4.	The combination induces Treg cells	62
3.2.5.	Combination treatment reduces responder abilities	64
3.2.6.	The other effects of combination treatment	66
3.2.7.	Discussion	67
Chapter 4	Conclusion and Prospect	70
4.1	Conclusion	70
4.1.1.	Jagged-1 will be a new target in the immune tolerance	70
4.1.2.	As ₂ O ₃ suppressing Tm and induce transplant tolerance	71
4.2	Prospect	72
References	73
Appendices	96
Figure index	96
Abbreviations	98
My Publication	99
Acknowledgments	101

摘要

目的：已知，树突状细胞（Dendritic cells, DCs）在调节机体的固有免疫反应、适应性免疫反应以及诱导器官移植的免疫耐受中发挥了重要的作用。而在临床器官移植中，移植患者因为初次移植、输血、受孕或者持续暴露于共生性病原微生物等多种原因，外周血中 40~50%的 T 细胞具有记忆性的表型，对初次及再次移植的移植物生存时间造成重大影响。于是，在初次移植中，我们尝试应用过表达 Jagged-1 的 DC 抑制同种异体排斥反应，并联合共刺激通路的阻断剂诱导心脏移植物的长期存活，并探讨其可能的机制。而在抑制记忆性 T 细胞（memory T cells, Tm）介导的加速性移植排斥反应的方案中，我们尝试应用抗 CD40L/LFA-1 单克隆抗体（anti-CD40L/LFA-1）的基础上附加使用中国传统中药三氧化二砷（arsenic trioxide, As₂O₃），尽量抑制 Tm 的产生和功能，并诱导抗原特异性的调节性 T 细胞（regulatory T cells, Treg）的产生，从而延长加速性排斥反应中移植物的存活时间，并探讨该治疗潜在的机制。

方法：在初次心脏移植的排斥反应的治疗方案中，我们构建含小鼠目的基因 Jagged-1 的腺病毒载体及对照载体，大量扩增并纯化目的病毒和对照病毒。并培养小鼠 DC 细胞系 DC2.4 细胞作为目的感染细胞，过表达 Jagged-1 蛋白后于体外进行初步实验研究 Jagged-1 对于 T 细胞增殖的影响；其次，建立小鼠初次心脏移植模型，首次在体内研究过继转移 Jagged1-DC 后联合 anti-CD40L 单抗对移植物生存期的影响，通过对 Treg 细胞等 T 淋巴细胞亚群以及 Th1/Th2 相关炎症因子等方面的研究 Jagged-1 活化 T 细胞上 Notch 信号通路后产生的作用。而在 Tm 细胞介导的加速性排斥反应的治疗方案中，我们建立预致敏小鼠模型提取 Tm 细胞，并过继转移给同基因的受体小鼠后构建心脏移植模型，探索 As₂O₃ 联合共刺激阻断剂对于加速性排斥反应的抑制作用，并通过淋巴细胞混合培养实验、Tm 细胞亚群变化、Th1/Th2 相关炎症因子检测、移植物病理切片等方面进行研究，试图阐明 As₂O₃ 抑制 Tm 细胞介导的移植排斥反应和延长生存期的机制以及作为新型免疫抑制药物的可行性。

结果: 在初次心脏移植的排斥反应的研究中, 我们发现转移过表达Jagged-1的DC细胞系可以延长初次心脏移植物的生存期, 而且联合共刺激阻断剂anti-CD40L单抗后可以显著延长移植物生存期, 并有半数达到长期存活 (>110天), 这种联合治疗不仅可以明显抑制初次免疫反应, 还可以诱导供者特异性的T细胞低免疫应答反应能力, 上调转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 的表达, 以及增加Treg细胞的产生, 而这一切都是和Jagged1-Notch信号通路的活化有关。而同种反应性记忆性T细胞可以引起加速性排斥, 对于移植耐受的诱导是需要克服的困难, 在此部分研究中我们选择As₂O₃作为新型免疫抑制剂, 于是我们联合应用As₂O₃和anti-CD154/LFA-1两种单克隆抗体在预致敏小鼠中研究其对心脏移植物和机体免疫反应的作用, 结果显示接受联合治疗的受体鼠的移植物生存期达到长期存活 (>113.7天), 与抗体组 (MST=23.2天), As₂O₃组 (MST=12.5天) 和对照组 (MST=5.5天) 相比都明显延长, 这种联合治疗可以显著降低移植物种淋巴细胞的浸润, 抑制脾脏效应性T细胞的功能并减少脾脏Tm的生成。此外, As₂O₃和单克隆抗体联合治疗可以显著减少IL-2和IFN- γ 的分泌与表达, 与此同时, 移植物长期存活的受体鼠体内高表达TGF- β 和高水平的Tregs。这些数据不仅突显了As₂O₃在移植领域中的应用, 还为Tm细胞引起的加速性排斥反应提供了联合治疗的依据。

关键词: 心脏移植 As₂O₃ 调节性 T 细胞 记忆性 T 细胞 Jagged-1

Abstract

Objective: Dendritic cells (DCs) have the tolerogenic potential to regulate adaptive immunity and induce allografts acceptance. Transplant patients may develop alloreactive memory T cells after exposure to alloantigens during previous transplantations, blood transfusions, pregnancies, or due to continuous exposure to bacterial and viral pathogens. In adult humans, 40–50% of T cells circulating in the peripheral blood have memory phenotypes. Memory T cells play a key role in accelerated rejection. This study consists for two aspects of research. The first part aims to overexpression Jagged-1 on DCs to induce long-term heart allograft survival. On the other part, we want to develop new immunosuppressive agent with better inhibitory effect, smaller side effects and lower cost. And the action mechanisms of memory T cells in heart transplantation and their treatment are discussed.

Methods: In the research of primary cardiac transplantation rejection, the complementary DNA corresponding to full-length Jagged-1 and green fluorescent protein (GFP) was cloned into the chimaeric adenoviral vector. DC2.4 cells were transduced with either Jagged-1 virus or control virus. The overexpression of Jagged-1 protein was used to study the effect on proliferation of T cells in vitro. Then we established the heart transplantation in mice and transferred the Jagged1-DC in vivo to prolong the allograft survival time combined with anti-CD40L mAb. In order to study the effect of Jagged-1 on T lymphocyte subsets, such as Tregs, and Th1/Th2 related inflammatory factors through the activation of Notch signaling pathway on T cells. In the second part, we establish presensitized mice model to adoptive transfer memory T cells and study the inhibition of As_2O_3 in accelerated rejection with co stimulatory blockade. Through ways such as the T lymphocyte subsets, Th1/Th2 related inflammation factors and graft pathological experiment means, we try to illustrate the mechanism of As_2O_3 induced herat transplantation tolerance as well as its feasibility for immunosuppressive drugs.

Results: In the first transplant rejection experiments, we investigated whether blockade of the CD40 pathway could enhance the immune tolerance induced by DC2.4 cells modified to express Jagged-1 (JAG1-DC) in heart transplantation (HTx). Results showed that JAG1-DC treatment combined with anti-CD40L monoclonal antibody (mAb) administration significantly prolonged cardiac allograft survival in mice, with long-term survival (>110 days) of 50% of the allografts in the recipients. The therapy specifically inhibited the immune response, induced alloantigen-specific T-cell hyporesponsiveness, up-regulated transforming growth factor- β (TGF- β) synthesis and increased the population of regulatory T cells (Tregs) driven by Notch activation.

Alloreactive memory T cells are major barriers to transplantation acceptance due to their capacity to accelerate rejection. In the T_m cell experiments, we investigated the effects of combined treatment with arsenic trioxide (As₂O₃) and blocking monoclonal antibodies against CD154 and LFA-1 (anti-CD154/LFA-1) on graft survival as well as changes in pathology and immunological responses in mice with adoptively transferred allo-primed T cells. The mean survival time (MST) for the cardiac allografts in recipient mice receiving the combination of As₂O₃ and anti-CD154/LFA-1 was significantly longer (> 113.7 days) compared to those receiving anti-CD154/LFA-1 (23.2 days), As₂O₃ (12.5 days) alone or no treatment (5.5 days). This combined strategy distinctly inhibited lymphocyte infiltration in grafts, proliferation of splenic T cells and the generation of memory T cells in spleens. Moreover, the combined treatment caused the significant down-regulation of IL-2 and IFN- γ accompanied by increased expression of TGF- β and regulatory T cells (Tregs), which led to long-term cardiac allograft survival in recipient mice. These results highlight the potential application of As₂O₃ and its contribution in combination therapy with antibody blockade to delay rejection by memory T cells.

Keywords: heart transplantation; As₂O₃; regulatory T cells; memory T cells; Jagged-1;

第一章 前言

早在 1954 年，美国的医生就为一对孪生兄弟实施了世界上第一例的肾脏移植手术，这是人类器官移植手术获得的里程碑式的成功。半个世纪多以来，从肾脏到心脏、骨髓、肝、肺、脾脏、角膜等器官移植，器官移植技术也在一直取得突破，给人类医疗卫生领域带来革命性的变革和福祉，越来越多的人通过器官移植而获得了第二次重生的机会，器官移植从而被誉为“21 世纪医学之巅”。国外研究表明，现在临床采用的免疫抑制剂疗法并不能彻底阻止长期免疫进程中移植物发生排斥^[1]，由此导致的移植物慢性失功大大影响了患者术后的存活时间，且长期应用免疫抑制剂可导致严重的副反应，如感染、肾毒性、恶性肿瘤等并发症，因此在供体器官严重短缺的今日，如何诱导器官移植后的长期稳定的免疫耐受，同时规避服用这些常规免疫抑制剂所致的不良反应，都成为了人们关心并亟待解决的问题。而随着对调节性 T 细胞（regulatory T cells, Treg）研究的逐步深入，其在诱导器官移植的免疫耐受方面的作用引起人们的极大重视^[2]。

临床器官移植的数据表明，移植患者由于初次移植、输血、受孕或者持续暴露于共生性病原微生物等多种原因，外周血中会有 40~50% 的 T 细胞具有记忆性的表型，对初次及再次移植的移植物存活时间造成极大影响^[3, 4]。随着临床移植的开展和动物试验研究的不断深入，研究者们发现记忆性 T 细胞（memory T cells, Tm）比效应 T 细胞（effector T cells, Te）对移植物的破坏性更强烈^[5]，并且常规的免疫抑制剂对 Tm 治疗效果较差。所以，Tm 也是成为诱导初次或再次移植时耐受诱导的重要障碍，研究针对 Tm 的新型免疫抑制的开发和治疗策略就显得尤为重要。而且，单克隆抗体的开发和这类药物的免疫抑制作用效果现在已经受到了广泛的关注，本论文将主要从移植排斥反应的机制、Tm 的产生及其作用特征、移植耐受的诱导策略和 Notch 信号家族等方面进行文献回顾和综述，并以此阐明本论文的选题依据及其研究思路。

1.1 器官移植排斥反应与 T 细胞研究进展

根据移植时移植物来源不同以及其遗传背景的不同，可将移植分为 4 类：

1) 自体移植，指移植物取自受者本身，不发生排斥反应；2) 同系移植，指遗传基因完全相同或者基本相似的个体间的移植，如单卵孪生之间的移植，或近交系动物间的移植，一般不发生排斥反应；3) 同种异体移植，指同种之间但是遗传基因不同的个体间移植，临床移植多属此类型，一般都发生排斥反应；④异种移植，指不同种属个体间的移植，由于异种之间的遗传背景差异大，移植后可能迅速发生严重的排斥反应。在器官移植排斥反应中，最主要的是 T 细胞介导的细胞免疫应答，其次还有抗体介导的体液免疫应答，固有细胞等介导的固有免疫应答。

1.1.1 器官移植排斥反应的类型和特点

供受者基因相合程度不同所致组织抗原的差异以及不同抗原免疫原性的不同，使受者对移植物排斥时间和强烈程度也不一样。按照引起器官移植排斥反应的病理进程不同，可将排斥反应分为超急性排斥反应、急性排斥反应和慢性排斥反应。

1.1.1.1 超急性排斥反应 (hyper acute rejection, HAR)

超急性排斥反应可以发生在移植手术后血管接通的数分钟至 24 小时内，通常是由于受者体内预先存在的针对供者特异性抗原的天然抗体。移植物再灌注后的数分钟或者数小时内，预存的天然抗体可以迅速与移植物抗原结合，通过激活补体介导的溶解反应迅速直接破坏靶细胞，同时导致毛细血管、内皮细胞的损伤，引起纤维蛋白和血小板的聚集，导致移植物微血管系统内广泛的血栓形成，移植物发生不可逆性变性和坏死。往往在术中就可以看到接通血管后移植物颜色由正常迅速变为黑红色，并出现肿胀。随后移植物的血流量减少，质地变松软并失去弹性，迅速导致移植物功能的丧失。超急性排斥反应对药物治疗的效果不佳，最后只能切除移植物。但它可通过术前严格的 ABO 血型配合及淋巴细胞毒试验而有效地预防^[6]。

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫