

学校编码: 10384

分类号_____ 密级_____

学号: 24520121153150

UDC_____

厦 门 大 学

硕士学位论文

体内诱导调节性 T 细胞维持小鼠同种
异体心脏移植长期耐受

Maintenance of Long-term Tolerance by T Regulatory Cells
in a Mouse Model of Heart Transplantation

靳 宁

指导教师姓名: 齐忠权教授

专业名称: 生理学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩日期: 2015 年 5 月

2015 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）：

2015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）：

2015 年 月 日

摘要

目的: 自 20 世纪以来, 临床上心脏移植的一年生存率已经达到 90%, 但是移植后的慢性排斥以及长期存活仍面临巨大挑战, 目前临床上所用的免疫抑制剂多数都必须终身用药, 从而会产生多种副作用, 危害受者的健康, 影响患者的生活质量, 所以如何诱导移植物的长期耐受是器官移植面临的重大难题。调节性 T 细胞是具有免疫调节功能的 T 细胞亚群, 在移植后诱导和维持免疫耐受方面发挥重要作用。其中, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T 细胞 ($CD4^+Foxp3^+Treg$) 主要通过细胞接触发挥调节作用, 而 $CD4^+IL-10^+IL-4^-$ T 细胞 ($Tr1$) 主要通过分泌抑制性细胞因子 IL-10 发挥作用。本文首次在小鼠同种异体心脏移植模型中, 研究通过体内诱导上述两种调节性 T 细胞来维持移植物长期免疫耐受的方法和机制。

方法: 实验采取颈部套管吻合术建立 BalB/c 小鼠到 C57BL/6 小鼠的同种异体心脏移植模型, 术后单独或者联合给予雷帕霉素和重组细胞因子 IL-10 的处理, 观察不同用药处理对移植物的生存期、移植物炎细胞浸润情况、移植物和血清炎症因子分泌、淋巴细胞亚群比例等的影响, 并结合混合淋巴细胞培养等体外实验分析调节性 T 细胞亚群 $CD4^+CD25^+Foxp3^+Treg$ 和 $CD4^+CD25^-IL-10^+IL-4^-Tr1$ 分别在免疫耐受中的调节机制。

结果: 在初次心脏移植模型中, 我们发现, 单独使用雷帕霉素仅有约 50% 小鼠可以长期存活, 而联合应用雷帕霉素和重组细胞因子 IL-10 可以诱导 100% 的小鼠心脏移植的免疫耐受 (>100 天)。在移植术后 6 天、30 天、100 天进行检测, H&E 结果显示, 联合用药组较其他组炎性破坏明显降低。ELISA 检测发现, 血清中 IL-2、INF- γ 降低, IL-10 显著升高, 移植物的 real time PCR 检测细胞因子变化有相同的趋势。流式结果显示, 在移植后早期 (移植后 30 天), $CD4^+CD25^+Foxp3^+Treg$ 细胞亚群在雷帕霉素单用组以及联合用药组都有明显升高, 但在 100 天检测中, $CD4^+CD25^+Foxp3^+Treg$ 细胞亚群恢复正常水平, 而 $CD4^+CD25^-IL-10^+IL-4^-Tr1$ 细胞亚群在检测中一直处于较高水平。混合淋巴细胞反应检测 T 细胞对供体抗原的再次应答, 可以发现联合用药可以明显抑制细胞增殖能力, 对于第三方刺激 (C3H 小鼠) 都表现出较高的增殖, 组间无差异。

结论: 雷帕霉素和重组细胞因子 IL-10 联合给药可以诱导 CD4⁺Foxp3⁺Treg 和 Tr1 两种调节性 T 细胞亚群,这两种调节性 T 细胞分别在不同时期发挥调节作用共同维持同种异体心脏移植的免疫耐受。该联合用药方案作为一种新的移植术后治疗方案,通过诱导调节性 T 细胞建立长期稳定的移植物耐受状态,对器官移植领域的转化医学研究具有重大的理论指导意义。

关键词: 心脏移植免疫耐受 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞 Tr1 细胞;

厦门大学博士论文摘要库

Abstract

Background: In most experimental model of transplantation, the heart and lung allograft are called “tolerance resistant” organs (compared with the “tolerance prone” organs). It’s reported the one-year survival of heart transplantation have been obviously improved from the 2000s, but long-term tolerance is still a major challenge. The abuse of immunosuppressive drugs, the side-effects of these chronic medicines and the absence of methods to reach a donor-specific tolerance state are the obstacles to prolong the heart transplantation survival. Regulatory T cell therapy has generally been used for autoimmune diseases and is less frequently applied for transplantation of the heart, a “tolerance resistant” organ. In this work, we developed a method to induce CD4⁺Foxp3⁺Tregs and T regulatory type 1 (Tr1) cells *in vivo* to maintain long-term tolerance after heart transplantation.

Methods: C57BL/6 mice were transplanted with hearts from BALB/c mice. We then administered (hu) IL-10 and rapamycin to generate CD4⁺Foxp3⁺Tregs and Tr1 cells (CD4⁺IL-10⁺IL-4⁻) *in vivo*. On the 30th and 100th day after transplantation, the levels of rejection were analyzed by hematoxylin & eosin staining, ELISA and q-PCR, cell subtype was identified by flow cytometry, and the second immuno-response to the alloantigens was detected by MLR.

Results: Combined treatment with (hu) IL-10 and rapamycin could induce tolerance to the heart allograft in all recipient mice, and levels of IL-2 and INF- γ were also clearly decreased in the tolerance group. And compared with the Rapa group, the subset of Th1 was decreased in the combined group. The proportion of CD4⁺Foxp3⁺Tregs induced by this treatment keep high during the administration period and recovered to normal levels on the 100th day after transplantation, yet the proportion of Tr1 cells remained high after drug withdrawal. Mixed lymphocyte reactions showed that the recipient's T cells were tolerant (showed no response) to the donor's APCs rather than the third-party donor's APCs.

Conclusion: The combination of (hu) IL-10 with rapamycin could induce

CD4⁺Foxp3⁺Tregs and Tr1 cells *in vivo*. The two subsets showed different regulatory effects in the mouse model of heart transplantation and could maintain a low immune response environment to facilitate long-term graft survival. This combination provides a promising treatment for clinical heart transplantation.

Keywords: heart transplantation; immune tolerance; CD4⁺Foxp3⁺Treg; Tr1

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前言	1
1.1 心脏移植概述.....	1
1.1.1 心脏移植概况.....	1
1.1.2 心脏移植最新进展.....	1
1.1.3 心脏移植临床药物应用.....	2
1.2 器官移植排斥机制概述.....	6
1.2.1 免疫排斥分类.....	6
1.2.2 先天性和获得性免疫应答.....	7
1.2.3 急性排斥.....	8
1.2.4 慢性排斥.....	11
1.3 诱导移植耐受策略.....	11
1.3.1 中枢免疫耐受.....	11
1.3.2 外周免疫耐受.....	13
1.4 调节性 T 细胞诱导移植耐受策略	15
1.4.1 调节性 T 细胞的类型特点	15
1.4.2 调节性 T 细胞与移植免疫	19
1.4.3 调节性 T 细胞在移植领域的研究进展	21
1.5 本研究的目、意义和内容.....	22
1.5.1 研究目的.....	22
1.5.2 研究意义.....	22
1.5.3 研究内容.....	23
第二章 材料与方.....	24
2.1 实验材料.....	24
2.1.1 实验动物.....	24

2.1.2 主要试剂.....	24
2.1.3 主要仪器.....	26
2.1.4 主要耗材.....	27
2.2 实验方法.....	27
2.2.1 动物模型的建立.....	27
2.2.2 给药方案.....	29
2.2.3 细胞免疫学实验方法.....	29
2.2.4 分子生物学实验方法.....	33
2.2.5 统计学分析.....	37
第三章 结果与讨论.....	38
3.1 结果.....	38
3.1.1 雷帕霉素联合 IL-10 能够稳定地延长小鼠心脏移植生存期.....	38
3.1.2 雷帕霉素联合 IL-10 治疗可以减少移植物中炎性细胞的浸润.....	39
3.1.3 雷帕霉素联合 IL-10 治疗对细胞因子分泌的影响.....	40
3.1.4 雷帕霉素联合 IL-10 治疗对脾脏细胞亚型的影响.....	42
3.1.5 雷帕霉素联合 IL-10 能够诱导 CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg 细胞.....	43
3.1.6 雷帕霉素联合 IL-10 可以诱导 CD4 ⁺ IL-10 ⁺ IL-4 ⁺ T 细胞.....	44
3.1.7 雷帕霉素联合 IL-10 治疗降低受体对相同抗原的免疫应答能力.....	45
3.2 讨论.....	46
第四章 结论与展望.....	49
4.1 结论.....	49
4.2 展望.....	49
附录.....	50
附录一：图表索引.....	50
附录二：缩略语及中英文对照.....	51
附录三：攻读硕士期间发表和待发表的学术论文.....	53
参考文献.....	54
致谢.....	64

Table of Contents

Chinese Abstract	I
English Abstract.....	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Heart transplantation.....	1
1.1.1 Overview of heart transplantation.....	1
1.1.2 Latest advances in heart transplantation	1
1.1.3 Clinical medicine in heart transplantation	2
1.2 The mechanisms of organ transplantation rejection.....	6
1.2.1 Different types of rejection	6
1.2.2 Innate and adaptive immune response.....	7
1.2.3 Acute rejection	8
1.2.4 Chronic rejection.....	11
1.3 The strategies of inducing tolerance	11
1.3.1 Central tolerance	11
1.3.2 Peripheral tolerance	13
1.4 The strategies of inducing tolerance by regulatory T cells	15
1.4.1 Characteristics of regulatory T cells	15
1.4.2 Regulatory T cells and transplantation immunity	19
1.4.3 Latest advances of regulatory T cells in transplantation.....	21
1.5 Purpose, significance and contents of this study	22
1.5.1 Purpose.....	22
1.5.2 Significance.....	22
1.5.3 Contents	23
Chapter 2 Materials and Methods	24
2.1 Materials.....	24
2.1.1 Animals	24
2.1.2 Main reagents.....	24

2.1.3	Main instruments	26
2.1.4	Main consumable	27
2.2	Methods	27
2.2.1	Animals transplantation models.....	27
2.2.2	Main regents.....	29
2.2.3	Experiments of cell biology	29
2.2.4	Experiments of molecular biology.....	33
2.2.5	Statistical analysis.....	37
Chapter 3 Results and Discussion		38
3.1	Results.....	38
3.1.1	Combination of (hu)IL-10 with rapamycin can promote long-term graft survival of heart transplanted mice	38
3.1.2	Combination of (hu)IL-10 with rapamycin can diminish inflammatory reactions in allografts.....	39
3.1.3	Treatment with (hu)IL-10 combined with rapamycin regulates production of cytokines	40
3.1.4	Effects of (hu)IL-10 combined with rapamycin on splenic CD4+, CD8+ and Th1 cells.....	42
3.1.5	Effects of (hu)IL-10 combined with rapamycin on CD4+Foxp3+Tregs	43
3.1.6	Combined treatment of (hu)IL-10 and rapamycin can induce the Tr1 cell subset.....	44
3.1.7	Combination treatment induces recipient low responding T cells in vitro ..	45
3.2	Discussion.....	46
Chapter 4 Conclusion and Prospect.....		49
4.1	Conclusion.....	49
4.2	Prospect	49
Appendices.....		50
Figure index		50
Abbreviations.....		50
My Publications		53

References54

Acknowledgments64

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

1.1 心脏移植概述

1.1.1 心脏移植概况

1967年，南非克里斯蒂安-N-巴纳德医生成功地进行了人类首次原位心脏移植手术，这是人类心脏移植的里程碑。但是，直到二十世纪八十年代，环孢霉素A的出现才使得心脏移植正式成为终末期心脏病的一种治疗手段。

心脏移植是终末期心脏病的一种治疗手段，根据国际心肺移植(ISHLT)报告汇总，接受心脏移植手术的适应症主要包括：非缺血性心肌病、缺血性心肌病、瓣膜疾病、先天性心脏病、再次移植等。2006-2011年之间，由于非缺血性心脏病需要进行移植术的比率从49%上升至54%，而缺血性心脏病致使的心脏移植从42%下降至37%，此外，由于外科手术技术的完善，先天性心脏病病人借以外科手术的病例也持续增加。

1.1.2 心脏移植最新进展

根据国际心肺移植协会2012年的报告^[1]，目前，移植后急性排斥的发生率正逐年降低，慢性血管性疾病(CAV)、肾功能紊乱以及肿瘤的发生率在某种程度上也有所降低。尽管成效显著，但是，移植物长期存活仍未得到改善，如何进行移植术后个性化的护理以及更好的保护移植物长期存活与功能稳定仍是我们奋斗的目标。

(1) 心脏移植生存期

根据2012年统计数据显示，在完成一年随访期的基础上统计心脏移植中位生存期为10年，完成一年随访的移植患者中有63%能达到十年生存期，27%可以达到二十年生存期。

(2) 移植后导致死亡的原因分析

移植后致死原因主要有：移植失败、急性排斥、心脏同种异体移植物血管性病变更(CAV)、感染、肾衰竭以及诱发肿瘤。2002-2011年由于以上各病因诱发死

亡的概况如下图所示(图 1.1), 移植失败以及感染是移植后前三年致死的主要原因, 移植后 4-6 年间肿瘤发生以及移植物血管病变成为主要原因。值得注意的是, 图 1.1 显示仅有一小部分是出于急性排斥致死, 但是, 在进行统计时很可能将急性排斥和慢性排斥诱发死亡归类为移植失败。

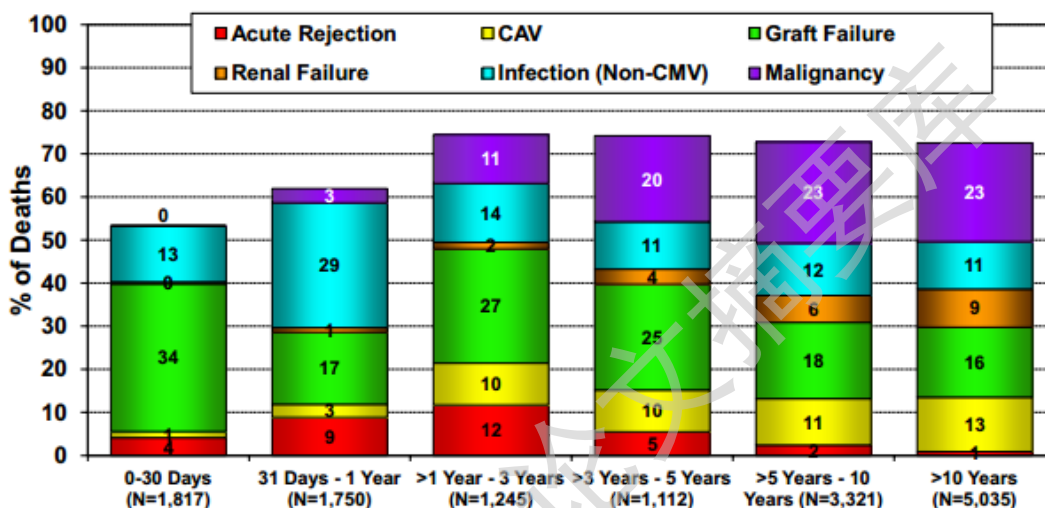


图 1.1 移植后死亡原因随移植后时间的变化^[1]

Fig1.1 Contribution of leading causes of death to mortality by time since adult heart transplant (deaths: January 2002 to June 2011)

1.1.3 心脏移植临床药物应用

器官移植的成功离不开免疫抑制剂的应用。在过去 20 年间, 免疫抑制剂的应用已经明显降低了急性排斥的发生率。1994-1999 年期间, 移植后一年内被要求在院内进行排斥治疗的患者占 42%, 三年内被要求入院排斥治疗的有 55%, 2000-2004 年之间数据已降低至 29%和 43%, 而 2005-2010 之间, 已经低至 22%和 36%。这些数据充分说明了移植后应用免疫抑制剂的重要性^[1]。

免疫排斥应答可以通过以下四种方法进行抑制如表 1.1 所示^[2]: a) 化学方法如化学药物的应用; b) 生物制剂免疫球蛋白等的应用; c) 物理方法如照射; d) 外科手术如胸腺切除术等。

表 1.1 器官移植进行免疫抑制的方法

Table 1.1 Immunosuppressive methods in organ transplantation

免疫抑制方法	示例
化学药物应用	皮质激素类、咪唑硫嘌呤、咪唑立宾、环孢霉素、FK506、胍立莫司、吗替麦考酚酯、雷帕霉素等
生物制剂应用	ALG ATG 抗 T 细胞表面分子的单克隆抗体、输血等
物理方法	局部或全身射线照射、全身淋巴器官照射等
外科手术	胸腺切除、脾脏切除、淋巴细胞去除、浆细胞去除等

(1) 皮质类激素

皮质类激素是同种异体器官移植的预防性和治疗性药物。皮质激素较其他免疫抑制剂的作用广泛。它与细胞表面类固醇受体结合影响蛋白合成前期的核酸合成，不仅能够减少单核细胞及巨噬细胞的数目，而且能够通过影响淋巴因子、吞噬作用、以及 IL-1 的分泌降低淋巴细胞功能，此外，还可以通过阻断 Th 细胞中 IL-2 的分泌抑制杀伤性 T 细胞的活性^[3]；虽然皮质类激素对 B 细胞没有直接的抑制作用，但是可以通过抑制巨噬细胞以及 Th 细胞分泌抗体来间接性的作用于 B 细胞；另外，还可以通过抑制环氧化酶的活性发挥抗炎效应。虽然皮质类激素作用广泛，但免疫抑制效用较低，长期应用具有耐药性，而且副作用较多，尤其是对胃肠功能以及代谢功能的影响。一般情况下，移植当天加强龙注射量为 10-20mg/kg，移植后用量逐渐，三个月之内由 1-2 mg/kg/day 降低至 0.31-2 mg/kg/day，接下来以 0.15-0.21 mg/kg/day 进行维持治疗。对于急性排斥的治疗：500-1000mg/kg/day 大剂量静脉注射 2-3 天，然后以每三天降低 50%的剂量用药。

(2) 抗代谢药

咪唑硫嘌呤 (Az) 直至 1980 年咪唑硫嘌呤联合皮质激素作为免疫抑制方案应用于临床肾移植持续了 15 年之久。咪唑硫嘌呤作用于细胞周期 S 期，抑制核算合成，对介导免疫反应的所有 T 细胞均有抑制作用；大剂量应用可以抑制 B 细胞的功能以及抗体产物。副作用有：增大感染风险、骨髓抑制。通过适当的剂量调整可以避免严重的白细胞减少症。在临床应用中，剂量调整十分关键，适当地给药剂量可以最大程度的发挥抑制效用而使副作用达到最低。肾移植中应用咪唑硫嘌呤的合适剂量如下：移植后 60 天内用药剂量为 2.45mg/kg/day，60-91 天内 2.43mg/kg/day。口服用药 1-2 小时血药浓度达到峰值。在由于排斥或肾小

管坏死引起肾功能损害的患者中，用量应小于 1mg/kg/day 以防止骨髓抑制。值得注意的是，当咪唑硫嘌呤与别嘌呤醇合用时，抑制功能增强，同时咪唑硫嘌呤毒性增大。环孢素的发现使得咪唑硫嘌呤的应用退居临床二线。

咪唑立宾(Mz) 咪唑立宾是二十世纪七十年代由日本发现作为咪唑硫嘌呤替代药应用的，可以竞争性地抑制嘌呤合成系统中的次黄嘌呤核苷酸至鸟苷酸途径而抑制核酸合成，较咪唑硫嘌呤副作用小（肝功能紊乱以及骨髓抑制）。咪唑立宾的免疫抑制作用不及咪唑硫嘌呤，因此用量为咪唑硫嘌呤的 2-3 倍，临床上常与其他免疫抑制剂合用，如与环孢素 A 合用有协同作用，常用于肝功能紊乱或有病毒性肝炎的患者。主要副作用有胃肠功能失调以及骨髓抑制。

霉酚酸酯 (MMF) 霉酚酸酯是一种真菌抗生素的半合成衍生物，在体内可以转化为霉酚酸 (MPA)，MPA 是次黄嘌呤单核苷磷酸脱氢酶的抑制剂，主要通过抑制 T、B 淋巴细胞的增殖发挥作用，同时可以抑制与细胞黏附有关的淋巴细胞和单核细胞蛋白糖基化，从而抑制淋巴细胞补充进入炎症和移植部位。肝肾毒性较低，骨髓抑制的副作用也较小，感染几率小。可以代替硫唑嘌呤与激素合用，预防和治疗同种肝、肾以及心脏排斥反应。最优用药剂量为 3000mg/day^[4]。

来氟米特(LEF) 人工合成的异噁唑类药物，是一种新型免疫抑制剂。作用机制包括：a) 抑制嘧啶合成，其代谢产物可以抑制二氢乳清酸脱氢酶合成，抑制激活的 T 细胞；b) 抑制 NF- κ B 的活性；c) 抑制蛋白酪氨酸激酶活性。研究发现来氟米特兼具有抗巨细胞病毒和单纯疱疹病毒的特性，因此可以在抑制器官排斥的同时防止病毒感染，在器官移植领域有良好的应用前景。比较常见的副作用有皮疹、肝功能损害以及血液系统的改变。因此在使用过程中必须严密监测患者肝功能以及血常规。

(3) 微生物代谢产物

环孢素 A (CsA) 环孢素 A 是从真菌培养液中分离出的一种环状多肽，从发现开始就备受关注，其不仅在肾移植中有很好的免疫抑制作用^[5]，在心脏以及肝移植中也发挥抑制效用。环孢素 A 与传统的非特异性免疫抑制药如皮质激素类、咪唑硫嘌呤的作用机制完全不同，其药理作用具有特异性和可逆性。药理作用如下：a) 体外抑制混合淋巴细胞反应 (MLR) 以及细胞介导的淋巴细胞减少反应 (CML)^[6]；b) 抑制细胞因子的产生^[7]，如 IL-2、IFN- γ 、IL-6、巨噬细胞趋化

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.