

学校编码: 10384

分类号_____ 密级_____

学号: 24520120153956

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

三氧化二砷通过诱导 T 细胞凋亡抑制小鼠
同种异体胰岛移植排斥反应

Arsenic Trioxide Induces T cell Apoptosis and Prolongs Islet
Allograft Survival in Mice

高 畅

指导教师姓名: 齐忠权

专 业 名 称: 生理学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

2015 年 5 月

三氧化二砷通过诱导 γ 细胞凋亡抑制小鼠同种异体胰岛移植排斥反应

高畅

指导教师

齐忠权 教授

厦门大学

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(厦门大学医学院器官移植研究所)课题(组)的研究成果,获得(器官移植研究所)课题(组)经费或实验室的资助,在(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,可以不作特别声明。)

声明人:高畅

2015年5月19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：高畅

2015年5月19日

目 录

中文摘要	I
Abstract	III
第一章 前言	1
1.1. 糖尿病的危害	1
1.2. 胰岛素的提供方式	1
1.2.1. 胰岛素治疗	2
1.2.2. 胰腺移植	3
1.2.3. 胰岛移植	4
1.2.4. 干细胞移植	6
1.2.5. 小结	7
1.3 器官移植排斥反应机制	7
1.3.1. 超急性排斥反应	7
1.3.2. 急性排斥反应	8
1.3.3. 慢性排斥反应	13
1.4. 临床免疫抑制剂发展	14
1.5. 三氧化二砷的应用研究	17
第二章 材料与方法	19
2.1. 实验材料	19
2.1.1. 实验动物	19
2.1.2. 主要试剂	19
2.1.3. 主要仪器	23
2.2. 研究方法	25
2.2.1. 胰岛细胞团的分离纯化	25
2.2.2. 体外葡萄糖刺激胰岛素分泌实验	26
2.2.3. 单个胰岛细胞的分离	27

2.2.4.	Annexin V / 7AAD 双标记法检测细胞凋亡	28
2.2.5.	小鼠同种异体胰岛移植	30
2.2.6.	腹腔葡萄糖耐量试验	31
2.2.7.	组织病理学分析	32
2.2.8.	移植物中相关因子的 mRNA 水平检测	36
2.2.9.	淋巴细胞亚群的比例检测	39
2.2.10.	血清中抗体的检测	42
2.2.11.	血清中细胞因子的检测	43
2.2.12.	受体小鼠脾脏 T 细胞同种异体特异性应答的检测	45
2.2.13.	T 细胞活化增殖试验	49
2.2.14.	Treg 细胞诱导试验	51
2.2.15.	T 细胞无能试验	52
2.2.16.	T 细胞凋亡试验	53
2.2.17.	免疫印迹检测	55
2.2.18.	统计学分析	55
第三章	结果与讨论	56
3.1.	三氧化二砷对胰岛功能与活性的影响	56
3.1.1.	三氧化二砷对胰岛功能的影响	56
3.1.2.	三氧化二砷对胰岛活性的影响	57
3.2.	三氧化二砷联合雷帕霉素抑制同种异体急性排斥反应	58
3.2.1.	三氧化二砷联合雷帕霉素诱导同种异体胰岛移植耐受	58
3.2.2.	三氧化二砷联合雷帕霉素维持移植物长期功能	59
3.2.3.	三氧化二砷联合雷帕霉素抑制移植物排斥反应	62
3.2.4.	三氧化二砷联合雷帕霉素影响淋巴细胞分布, 血清中抗体、细胞因子的分泌	64
3.2.5.	三氧化二砷联合雷帕霉素抑制 T 细胞应答	67
3.3.	三氧化二砷对 T 细胞的作用机制	68
3.3.1.	三氧化二砷抑制 T 细胞活化增殖	68
3.3.2.	三氧化二砷对调节性 T 细胞的影响	69
3.3.3.	三氧化二砷对 T 细胞无能的影响	70
3.3.4.	三氧化二砷对 T 细胞凋亡的影响	71

3.4. 三氧化二砷作用的信号通路.....	73
3.5. 讨论.....	74
第四章 结论与展望	83
参考文献.....	84
附 录：	121
附录：攻读博士期间发表和待发表的学术论文	121
致谢.....	122

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1. The burden of diabetes mellitus	1
1.2. The source of insulin for diabetes	1
1.2.1. Insulin treatment	2
1.2.2. Pancreas transplantation	3
1.2.3. Islet transplantation	4
1.2.4. Insulin-secreting cells derived from stem cells	6
1.2.5. Conclusion.....	7
1.3. Mechanism of organ transplant rejection	7
1.3.1. Hyperacute rejection	7
1.3.2. Acute rejection.....	8
1.3.3. Chronic rejection.....	13
1.4. The development of immunosuppressive drug	14
1.5. Clinical activity of arsenic trioxide	17
Chapter 2 Materials and Methods	19
2.1. Materials	19
2.1.1. Animals	19
2.1.2. Main reagents	19
2.1.3. Main instruments	23
2.2 Methods	25
2.2.1. Mouse islet purification.....	25
2.2.2. Glucose stimulated insulin secretion.....	26

2.2.3.	Islet cell Isolation	27
2.2.4.	Annexin V/7AAD apoptosis detection.....	28
2.2.5.	Mouse islet allograft model	30
2.2.6.	Intraperitoneal Glucose Tolerance Test	31
2.2.7.	Histopathology.....	32
2.2.8.	Rejection-related gene transcription	36
2.2.9.	The proportion of lymphocyte subsets	39
2.2.10.	Serum antibody detection	42
2.2.11.	Serum cytokine detection	43
2.2.12.	Mixed Lymphocyte Reaction	45
2.2.13.	T Lymphocyte Transformation Test	49
2.2.14.	Treg cell generation detection	51
2.2.15.	Assay of T cell anergy.....	52
2.2.16.	Assay of T cell apoptosis.....	53
2.2.17.	Western Blotting	55
2.2.18.	Statistical analysis	55
Chapter 3 Results and discussion.....		56
3.1.	Effect of Arsenic Trioxide on islet function and activity.....	56
3.1.1.	Effect of Arsenic Trioxide on islet function	56
3.1.2.	Effect of Arsenic Trioxide on islet activity	57
3.2.	Arsenic trioxide and rapamycin combination treatment suppress islet allografts rejection	57
3.2.1.	Effect of arsenic trioxide and rapamycin combination treatment promote islet allografts tolerance in mice.....	58
3.2.2.	Effect of arsenic trioxide and rapamycin combination treatment on maintaining islet graft function	59
3.2.3.	Effect of arsenic trioxide and rapamycin combination treatment on suppressing allografts rejection... ..	62

3.2.4. Influence of arsenic trioxide and rapamycin combination treatment on the proportion of lymphocyte and the secretion antibodies and cytokines.....	64
3.2.5. Inhibition on T cell respond by arsenic trioxide and rapamycin combination treatment	67
3.3. The mechanisms of arsenic trioxide in reduce T cell respond	68
3.3.1. Effect of arsenic trioxide on T cell proliferation	68
3.3.2. Effect of arsenic trioxide on Treg cell induction	69
3.3.3. Effect of arsenic trioxide on T cell anergy	70
3.3.4. Effect of arsenic trioxide on T cell apoptosis	71
3.4. Signaling pathways in arsenic trioxide reducing T cell respond	73
3.5. Discussion	74
Chapter 4 Conclusion and Prospect.....	83
References	86
Appendices	86
My Publication.....	84
Acknowledgments	125

摘要

目的: 作为一种最有潜力的 I 型糖尿病的治疗方法, 胰岛移植目前已经应用于临床。然而, 免疫因素特别是 T 细胞介导的移植物活性损伤与功能丧失是胰岛移植应用的一大障碍。一直以来, 科学家们都在寻找适用于胰岛移植的新型免疫抑制剂。三氧化二砷是临床上治疗早幼粒细胞白血病的特效药, 最近被证明能够抑制同种异体心脏移植排斥反应。在此基础上, 本文研究了三氧化二砷对同种异体胰岛移植免疫排斥的抑制作用, 以及三氧化二砷与雷帕霉素联合诱导免疫耐受的可能作用机制。

方法: 我们首先检测了三氧化二砷对胰岛细胞的毒性作用。将胰酶消化的胰岛单细胞分别置于 5.6 uM 和 16.7 uM 葡萄糖的培养基中, 在浓度梯度三氧化二砷 (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 uM) 的作用下观察胰岛素的分泌。此外我们还观察了浓度梯度三氧化二砷对胰岛细胞活性的影响。在体内试验中, 我们将 400 个 Balb/c 小鼠的胰岛移植到 C57BL/6 小鼠的肾被膜下, 将移植后的受体随机分为 4 组: 对照组、三氧化二砷单用组、雷帕霉素单用组、三氧化二砷与雷帕霉素联合应用组, 并观察各组生存期。在移植后第十天采用 HE 染色、PCR、混合淋巴细胞反应、流式细胞术和 ELISA 等实验方法与手段进行免疫学检测。我们同时在体外研究了三氧化二砷对 T 细胞活化增殖的抑制效果, 并通过 Treg 细胞诱导实验、T 细胞无能实验、凋亡实验、免疫印迹实验等一系列实验来探索三氧化二砷的免疫抑制机制以及三氧化二砷与雷帕霉素共同诱导耐受的可能相关通路。

结果: 我们发现, 三氧化二砷对胰岛功能和活性有一定的安全范围。在同种异体胰岛移植模型中, 对照组小鼠胰岛移植物中位数生存期为 11 天, 单用三氧化二砷组的中位数生存期显著延长至 14 天, 单用雷帕霉素组中位数生存期为 24 天, 三氧化二砷与雷帕霉素联合应用组中位数生存期为 77.5 天。实验结果表明: 三氧化二砷能够削弱 Th1 型免疫应答。另外我们还发现, 三氧化二砷与雷帕霉素在抑制同种异体免疫应答方面具有协同作用。体外实验表明: 三氧化二砷能够抑制刀豆蛋白 A 刺激的 T 细胞增殖, 并诱导 T 细胞凋亡。此外, NF- κ B 信号通

路和 p38-MAPK 信号通路在三氧化二砷抑制 T 细胞活化增殖中起到重要作用；其中，p38-MAPK 信号通路很有可能参与了三氧化二砷和雷帕霉素的协同作用。

结论：我们的免疫抑制治疗是通过抑制炎症反应，影响细胞因子的合成及分泌和 T 细胞亚群比例，削弱 T 淋巴细胞介导的同种异体免疫应答来保护移植物的。三氧化二砷通过抑制 T 细胞增殖及诱导 T 细胞凋亡来保护胰岛移植物免受同种异体移植排斥。

关键词：同种异体胰岛移植；T 细胞；凋亡

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Objective: Islet transplantation is a promising treatment for type 1 diabetes in clinical therapy. However, function loss and activity decline of grafts caused by T cell-mediated immune rejection remain barriers to islet transplantation, and continuous development of new small-molecule immunosuppressive agents is required. Arsenic trioxide (As_2O_3), a potent agent for acute promyelocytic leukemia, was recently reported to attenuate the rejection of cardiac allografts in mice, which seems to be the medicine specifically valuable for recipients with primary tumor recurrence. Besides, new evidence showed As_2O_3 also abrogated sclerodermatous graft-versus-host disease by killing activated T cell. Our previous works investigated the effects of As_2O_3 on prolonging the survival of cardiac allografts in alloantigen-primed mice and adoptive T cell-transferred mice. Here, we sought to investigate the possibility of using As_2O_3 to prolong islet allograft survival in an acute rejection model of Balb/c to C57B/6 mice, and the mechanism of As_2O_3 prevent allograft rejection.

Methods: We initially analyzed the influence of As_2O_3 on islet cell viability and function. The cells were dissociated with trypsin-EDTA. Insulin release from isolated mouse islets in the presence of 5.6 and 16.7 mmol/l glucose, and As_2O_3 was applied at concentrations of 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 or 16 μM at the lower glucose concentration. The cells were stained with annexin V-FITC (annexin V) and 7-AAD to reveal the number of viable, necrotic and apoptotic cells by FCM after culture for 24 h with different concentrations of As_2O_3 . In vivo study, Balb/c mice were induced to become diabetic by a single intraperitoneal injection of streptozotocin. Recipient mice were treated with As_2O_3 and/or rapamycin after islet allograft transplantation. We performed Intraperitoneal Glucose Tolerance Test to examine the ability of the recipient mice to regulate their blood glucose levels. At day 10 post-transplantation, the graft, spleen, lymph nodes, and blood of the recipient mice were recovered for

analysis. We also performed mixed lymphocyte reaction assays to determine the alloreactive T cell responses. In vitro, to further examine the mechanism underlying As₂O₃ protection of islet allografts against T cell-mediated rejection, Treg cell induction experiment, T cell anergy test and apoptosis analyses of T cells were performed. To gain insight into the specific targets and biochemical mechanisms of As₂O₃, we examined the phosphorylation of IκBα and MAPK signaling pathway molecules p38 in the lysates of Con A-stimulated T cells following treatment with As₂O₃.

Results: As₂O₃ had negative effects on islet activity or function at low doses. In vivo, As₂O₃ and/or rapamycin prolonged islet allograft survival and maintained normal blood glucose levels by delayed rejection without obvious side effects. As₂O₃ decreased the inflammatory reactions and the Th1 cell-derived cytokine IFN-γ and IL-2 mRNA levels in the grafts, reduced the IFN-γ, IL-2 concentration in serum, and reduced the proportions of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in spleen. Moreover, there was no significant different change in the synthesis and secretion of Th2 cell-derived cytokine IL-4 after immunosuppressive therapy, and so was the alloreactive antibody in serum and the proportions of CD19⁺ B cells. Furthermore, our findings suggest As₂O₃ combined with Rapamycin therapy synergistically induce transplant tolerance. In vitro, As₂O₃ showed its immunosuppressive effect by inhibiting T cell proliferation and inducing T cell apoptosis. We suggest that the NF-κB and p38-MAPK signaling pathways may be involved in the inhibitory effect of As₂O₃ on activated T cells. And As₂O₃ combined with rapamycin synergistically suppressed T cell activation via inhibiting p38-MAPK signaling pathways.

Conclusion: We found that As₂O₃ prevent allograft rejection by inhibiting T cell responses. As₂O₃ and rapamycin showed a synergistic effect in inducing islet allotransplant tolerance. We consider that induction of T cell apoptosis, rather than induction of Treg cell population or induction of T cell anergy, is the central mechanism by which As₂O₃ inhibit T cell proliferation and induced allotransplantation tolerance.

Keywords: islet allograft; T cell; apoptosis.

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1.1. 糖尿病的危害

随着人类医疗卫生水平的高速发展,历史上造成人类人口骤减的传染性疾病已经得到一定控制,非传染性疾病成为全球的主要疾病致死风险因素。世界卫生组织最新公布的世界首份非传染性疾病报告——《全球非传染性疾病现状报告 2010》指出,糖尿病是继肿瘤,心血管疾病,慢性呼吸系统疾病之后的影响人类健康的第四大非传染性疾病。当胰腺不能足量产生人体所需要的胰岛素,或者人体器官、组织无法有效利用机体产生的胰岛素时,人体会发生以持续高血糖为特征的疾病——糖尿病。在过去的 30 年间,世界人口的糖尿病发病率提高了近 50%,呈逐年上升趋势^[1]。国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF)在 2013 年发布的最新数据显示,当今全球有 3.82 亿人口已确诊糖尿病,此外,不能正常调控血糖的潜在的病人数约有 3.16 亿。糖尿病能引发多种并发症,病因大多与人体持续高血糖状态有关,常见的有急性代谢疾病(包括酮症酸中毒和低血糖昏迷),微血管病变(包括眼部疾病如视网膜病变、白内障、青光眼,糖尿病肾病如肾小球硬化、肾衰竭,中枢及周围神经系统病变如末梢神经炎、胃轻瘫、腹泻),大血管病变(包括心血管疾病如心脏病、高血压、心肌梗塞,脑血管疾病如脑血栓、脑栓塞),及其他慢性并发症(如糖尿病性感觉障碍足、抑郁症、阿尔茨海默病)^[2]。此外,糖尿病病人死亡率也呈现上升趋势^[3]。IDF 公布的数据中,在 2013 年一年里,即使全球用于治疗糖尿病的费用高达 5480 亿美元,仍然有 510 万人因糖尿病及其并发症而死亡,几乎平均每 6 秒就有一人死于糖尿病。由此可见,如何控制糖尿病的发展是一个被世界关注的社会性问题。

1.2. 胰岛素的提供方式

按照病理原因的不同,临床上将常见的糖尿病分为两种:以胰岛细胞被破坏为特点的 I 型糖尿病,和以胰岛素作用障碍为特点的 II 型糖尿病^[4]。I 型糖尿病又称为胰岛素依赖型糖尿病,由于免疫系统造成的胰岛细胞损伤,机体分泌胰岛

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.