

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.22.003

CTLA4Ig 与 IDO 基因共转染对大鼠肝移植后免疫耐受的影响*

唐茂明^{1,2}, 徐雪松¹, 赖 星¹, 吴涯昆^{1△}

(1. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 400010; 2. 重庆市万州区中西医结合医院肝胆外科 404100)

[摘要] **目的** 研究经门静脉 CTLA4Ig、IDO 基因共转染对大鼠肝移植后免疫耐受的影响。**方法** 建立大鼠肝移植模型, 将 40 只大鼠分为 4 组: CTLA4Ig-IDO 组、CTLA4Ig 组、IDO 组、对照组。术后 14 d 处死 5 只大鼠并收集标本检测各组白细胞介素(IL)-2、IL-4、IL-10、转化生长因子-β(TGF-β)、γ-干扰素(IFN-γ)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)水平及 T 细胞凋亡的程度。**结果** 术后 14 d, CTLA4Ig-IDO 组血清中的 AST、ALT、TBIL 水平明显低于其余 3 组($P < 0.05$)。CTLA4Ig 组、IDO 组血清中的 AST、ALT 及 TBIL 水平均与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组中 IL-2、IFN-γ 的 mRNA 及蛋白表达均高于 CTLA4Ig-IDO 组($P < 0.05$), IL-4、IL-10、TGF-β 的 mRNA 及蛋白表达均低于 CTLA4Ig-IDO 组($P < 0.05$)。**结论** CTLA4Ig-IDO 基因共转染能够更加显著地改善肝移植后存活率及肝功能, 并且能够通过诱导 T 细胞凋亡缓解急性排斥反应, 形成肝移植免疫耐受。

[关键词] 肝移植; 免疫耐受; CTLA4Ig-IDO 联合基因

[中图分类号] R657.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)22-2892-04

Effects of co-transfection of CTLA4Ig and IDO genes on immune tolerance after liver transplantation in rat*

TANG Maoming^{1,2}, XU Xuesong¹, NAI Xing¹, WU Yakun^{1△}

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Wanzhou District Hospital of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western medicine, Chongqing 404100, China)

[Abstract] **Objective** To research the effects of co-transfection of CTLA4Ig and IDO genes through portal vein on the immune tolerance after liver transplantation in rat. **Methods** The rat models of liver transplantation were established. Forty rats were divided into 4 groups, CTLA4Ig-IDO group, CTLA4Ig group, IDO group and control group. Five rats were killed on postoperative 14 d for collecting the samples. The levels of IL-2, IL-4, IL-10, TGF-β, IFN-γ, ALT, AST and TBIL, and T lymphocyte apoptosis degree was detected in each group. **Results** The levels of serum AST, ALT and TBIL on postoperative 14 d in the CTLA4Ig-IDO group were significantly lower than those in the other three groups ($P < 0.05$). The levels of AST, ALT and TBIL had statistical difference between the CTLA4Ig group and IDO group with the control group ($P < 0.05$). The expression levels of IL-2 and IFN-γ mRNA and protein in the control group were higher than those in the CTLA4Ig-IDO group ($P < 0.05$), while the expression levels of IL-4, IL-10 and TGF-β mRNA and protein were lower than those in the CTLA4Ig-IDO group, which compared with those in the other three groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Co-transfection of CTLA4Ig-IDO genes can more significantly improve the survival rate after transplantation, moreover can relieve the acute rejection reaction by inducing T lymphocytes apoptosis and forms the immune tolerance of liver transplantation.

[Key words] liver transplantation; immune tolerance; CTLA4Ig-IDO combined gene

肝移植对于终末期肝脏疾病较有效的治疗方法。尽管肝移植术后免疫排斥的发生率及程度都远低于其他实质器官, 但是术后排斥反应依然是影响术后远期生存率的主要因素^[1-3]。

早期研究发现细胞毒性 T 细胞抗原 4 球蛋白 (CTLA4Ig) 对 CD28 的 B 分子有着高亲和性, 该蛋白

能够在心脏、肝脏、肾脏及胰岛组织引起满意的免疫耐受^[4-5]。吡啶胺 2, 3 双加氧酶 (indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO) 是一种 IFN-γ 诱导酶在移植术后排斥反应的进程中起着重要的作用^[6]。但单独转染 IDO 基因未能达到有效的免疫耐受效果^[7]。因此, 本试验将探讨 CTLA4Ig-IDO 基因共转染在大鼠肝移

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81600504; 81500497)。研究。 △ 通信作者, E-mail: 353827514@qq.com。

作者简介: 唐茂明(1968—), 副主任医师, 本科, 主要从事肝、胆、胰疾病

植术后免疫耐受中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 以 BN 大鼠[(215±35)g]分别作为供体和受体。所有大鼠均由重庆医科大学动物实验中心提供,经重庆医科大学附属第二医院实验动物伦理委员会批准。pWBP-CTLA4Ig-IDO 腺病毒、pWBP-CTLA4Ig 腺病毒、pWBP-IDO 腺病毒均由上海吉玛公司合成,选择的干扰载体为 ADV15(puro/EF1 α /IRES-GFP),病毒滴度为 3×10^8 TU/mL。受体大鼠分为 4 组:(1)CTLA4Ig-IDO 组($n=10$),在肝移植冷缺血期,夹闭肝上静脉及肝下静脉后,按 1×10^{11} /mL 的浓度,向供体肝脏经门静脉转染 1 mL pWBP-CTLA4Ig-IDO 腺病毒(福能基因公司);(2)CTLA4Ig 组($n=10$),转染 pWBP-CTLA4Ig 腺病毒 1 mL;(3)IDO 组($n=10$),转染 pWBP-IDO 腺病毒 1 mL;(4)对照组($n=10$),转染空载病毒 1 mL。在术后 14 d 处死 5 只大鼠,提取腔静脉血液以及肝脏组织。剩余 5 只大鼠继续喂养并用于生存率分析。全部大鼠均未出现手术操作不当、术后出血以及感染等并发症。对于未存活至 14 d 的大鼠,也提取其腔静脉血液及肝脏组织。

1.2 肝移植模型的构建 按照改进的 Kamada 方法进行大鼠原位肝移植^[8]。在肝移植中,将肝上静脉和门静脉以袖套法连接并将肝前静脉缝合,将支架插入共同胆管进行胆管重建,冷缺血时间小于 60 min。

1.3 组织病理学及免疫组织化学分析 处死受体大鼠后,将提取的供体肝脏以 10% 甲醛固定,石蜡包埋并以苏木素-伊红法染色。根据组织病理学结果,以 Banff 法对肝移植术后急性排斥反应进行分度^[9]。排斥反应活性指数(rejection activity index,RAI)根据 3 项独立评分进行计算:静脉内皮炎症、胆管损伤以及门静脉炎症。运用二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)染色法进行免疫组织化学实验,根据其结果,检测供体肝脏组织中 CTLA4Ig-IDO 基因的表达情况。

1.4 肝移植术后肝功能评价 运用全自动生化仪(Beckman)检测大鼠静脉血清中丙氨酸氨基转移酶(AST)、天门冬氨酸氨基转移酶(ALT)及总胆红素(TBIL)水平。

1.5 RT-PCR 以 TRIzol 法提取肝组织 mRNA 后,进行 RT-PCR 反应,引物由福能基因公司合成。具体步骤如下:94 °C 变性 60 s,58 °C 退火 69 s,72 °C 延长 60 s,72 °C 最终延长 7 min 为 1 个循环,共进行 30 个循环。利用琼脂糖凝胶电泳法分离 PCR 产物,同时以 β -actin 的相对光密度作为内参,利用溴乙锭染色、明胶成像以及图像分析系统对各细胞因子的相对表达量进行观察以及半定量计数。

1.6 Western blot 利用 RIPA 法于冰上提取总蛋白。提取出的蛋白按照 4:1 的比例加入负载缓冲液,混合后煮沸 5 min,处理后进行聚丙烯酰胺凝胶电

泳(SDS-PAGE)。电泳后,在 4 °C 环境下,利用聚偏氟乙烯(PVDF)薄膜进行转膜,转膜后,室温下用洗膜缓冲液(TBST)清洗 PVDF 膜 60 min。洗膜后,将 PVDF 膜浸泡于按 1:2 000 稀释后的辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠 CTLA4Ig、IDO 抗体溶液中,在 4 °C 环境中孵育过夜。

1.7 T 细胞凋亡水平检测 Annexin V-FITC 双标法进行 T 细胞凋亡检测。采用 EDTA-free 膜蛋白酶(Carlsbad,USA)对细胞进行消化后离心,离心后加入 PBS 重悬。向悬液中加入 500 μ L 膜连蛋白 V 结合悬浮细胞,再加入 5 μ L 细胞膜磷脂酰丝氨酸异硫氰酸荧光素(Annexin-FITC),将悬液充分混合均匀。向混合均匀的悬液中加入 5 μ L 碘化丙啶后,在室温避光条件下进行染色反应,反应时间为 60 min。反应结束后,运用流式细胞术对凋亡率进行检测。

1.8 统计学处理 采用 SPSS18.0 进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用方差分析(ANOVA)进行各组之间的比较。以皮尔森相关系数分析各参数之间的差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受体生存率 所有大鼠在肝移植术后均未对饮食进行特殊限制。对照组大鼠于术后第 5 天起出现急性排斥反应综合征,包括:乏力、厌食、活动能力下降、进行性体质量下降及总胆红素水平持续增高等;对照组大鼠于术后第 10 天全部死亡。在 CTLA4Ig-IDO 组中,急性排斥反应出现得更晚并且程度更轻。与对照组相比,CTLA4Ig-IDO 组中急性排斥反应综合征的发生率显著下降并且平均生存时间显著提高($P < 0.01$)。CTLA4Ig 组与 IDO 组各项指标之间的差异没有统计学意义,但与对照组相比均存在显著差异(图 1)。对照组大鼠均于 10 d 内死亡,而 CTLA4Ig-IDO 组、CTLA4Ig 组以及 IDO 组大鼠的生存率分别为 80%、20%、20%($P < 0.05$),见表 1。

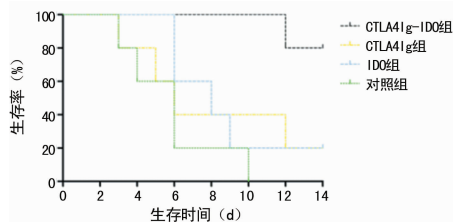
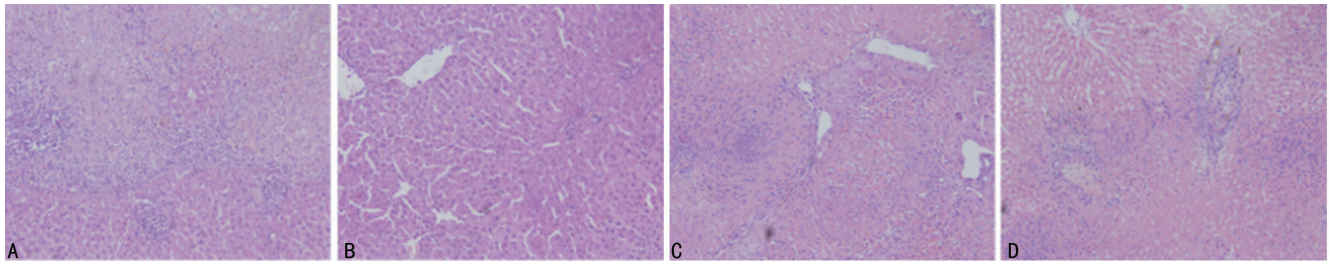


图 1 各组大鼠生存率比较

表 1 各组大鼠死亡情况(n)

组别	移植物失去功能	急性肝衰竭	胆管梗阻
CTLA4Ig-IDO 组	0	0	1
IDO 组	1	1	2
CTLA4Ig 组	0	2	2
对照组	2	3	0

2.2 组织病理学及免疫组织化学分析 术后 14 d 处



A:对照组;B:CTLA4Ig-IDO组;C:CTLA4Ig组;D:IDO组

图2 各组大鼠供体肝脏组织病理学变化(HE染色,×200)

死各组大鼠,提取肝脏组织进行组织病理学分析。对照组出现典型的严重急性排斥反应,例如:汇管区大量淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞浸润;广泛的肝小叶结构破坏;水泡样性;局部肝细胞坏死及胆管上皮损伤(图 2A)。在 CTLA4Ig-IDO 组中,绝大部分肝脏组织表现为正常组织结构,仅存在少部分汇管区及肝小叶区淋巴细胞浸润(图 2B)。CTLA4Ig-IDO 组的排斥反应程度显著低于对照组。CTLA4Ig 组及 IDO 组的排斥反应程度均较 CTLA4Ig-IDO 组严重,但均较对照组轻微(图 2C、2D)。免疫组织化学结果显示,经门静脉灌注 CTLA4Ig-IDO 腺病毒后,CTLA4Ig、IDO 基因的表达在 CTLA4Ig-IDO 组中均为阳性,而在对照组中均为阴性。

2.3 血清肝功能标志物 到术后 14 d 为止,CTLA4Ig-IDO 组中血清 ALT、AST、TBIL 水平均显著低于其余 3 组($P < 0.01$)。CTLA4Ig 组与 IDO 组比较,上述各项指标差异均无统计学意义($P > 0.05$),但均显著低于对照组($P < 0.05$),见图 3。

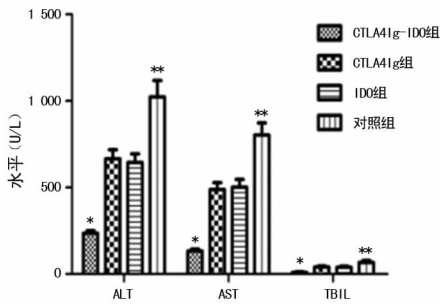
* : $P < 0.01$,与其余 3 组比较; ** : $P < 0.05$,与对照组比较

图3 各组大鼠供体肝脏肝功能血清标志物水平

2.4 蛋白及 mRNA 表达 到术后 14 d 为止,对照组中 IFN- γ 及 IL-2 的 mRNA 水平显著高于其余 3 组($P < 0.05$),CTLA4Ig-IDO 组中 IFN- γ 及 IL-2 水平明显低于其余 3 组($P < 0.05$)。CTLA4Ig-IDO 组中 IL-4、IL-10、TGF- β 的 mRNA 水平明显高于对照组的上述细胞因子 mRNA 水平($P < 0.05$),在 CTLA4Ig 组及 IDO 组之间,各细胞因子 mRNA 表达水平不存在明显差异($P > 0.05$)。Western blot 显示各组蛋白表达水平的差异趋势与各组 mRNA 水平表达的差异趋势相一致。对照组中 TNF- α 蛋白表达水平明显高于 CTLA4Ig-IDO 组,见图 4。

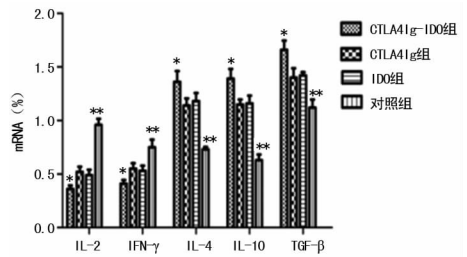
* : $P < 0.01$,与其余 3 组比较; ** : $P < 0.05$,与对照组比较

图4 各组大鼠供体肝脏细胞因子 mRNA 相对表达量

2.5 T 淋巴细胞凋亡水平 CTLA4Ig-IDO 组外周 T 细胞凋亡程度(35.57%)显著高于其余 3 组($P < 0.05$)。在 CTLA4Ig 组(20.84%)、IDO 组(22.75%)之间并不存在明显差异($P > 0.05$),但与对照组(14.63%)相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来,经腺病毒基因转染减轻移植排斥反应的方法受到了广泛关注。CTLA4Ig 含有一个细胞外 CTLA4 结构域及 IgG1 结构域,对 B7-1 分子高度亲和,能够阻断 APC 与抗原特异性 T 细胞之间的共刺激因子信号通路^[10-11]。前期研究发现,以腺病毒为载体,经门静脉转染 CTLA4Ig 基因能够在肝脏移植中稳定持续表达,从而阻滞移植中免疫活性细胞活性,诱导 T 淋巴细胞的凋亡、排斥反应的降低、移植术后免疫耐受的形成^[4,12]。因此,笔者认为 CTLA4Ig 对于移植术后免疫耐受的形成有着重要作用^[13-14]。

IDO 参与了色氨酸代谢的调节并在 APC 中更加显著。有研究提出,IDO 在免疫相关性应答中起着重要作用,包括移植相关免疫、肿瘤相关免疫、自身免疫性疾病及艾滋病感染等^[15-16]。对于其机制,有以下 2 种推测:(1)局部色氨酸耗竭抑制多种细胞的生长、分化;(2)色氨酸代谢抑制外周效应 T 细胞并使其凋亡^[17]。研究发现,色氨酸能够减轻移植后排斥反应,诱导免疫耐受的形成。ROBERT 等^[18]发现,CTLA4Ig 引起实质器官移植后免疫耐受形成主要与 IDO 代谢相关。亦有研究认为,IDO 对于减轻急性排斥反应、诱导免疫耐受方面无重要作用并在急性排斥反应的过程中被上调^[19]。这可能是因为排斥反应程度过重或者 IDO 没有达到有效的活性水平。

在本实验中,笔者构建了 CTLA4Ig-IDO 腺病毒、CTLA4Ig 腺病毒及 IDO 腺病毒,经门静脉转染至供

体肝脏,将 IDO、CTLA4Ig 基因单独转染与 CTLA4Ig-IDO 共转染的效果进行了对比。组织病理学检查结果表明,CTLA4Ig-IDO 组供体肝脏大部分表现为正常肝组织结构,仅有少部分门静脉区和肝小叶区呈现出 T 淋巴细胞浸润。对照组受体肝组织表现为典型急性排斥反应,CTLA4Ig 组、IDO 组介于两组之间。该结果表明,CTLA4Ig-IDO 组对于移植术后急性排斥反应的抑制作用最为显著。

T 淋巴细胞分泌的细胞因子有不同的免疫耐受调节作用,以 IL-4、IL-10 为代表的 Th2 型细胞因子能促进免疫耐受的形成,以 IL-2、IFN- γ 为代表的 Th1 型细胞因子能抑制免疫耐受的形成^[20]。对照组中 IFN- γ 、IL-2 的 mRNA 表达水平明显高于其余 3 组,CTLA4Ig-IDO 组中显著低于其余 3 组。CTLA4Ig-IDO 组中 IL-4、IL-10 及 TGF- β 的 mRNA 表达水平明显高于其余 3 组,对照组中明显低于其余 3 组。这表明细胞因子 mRNA 水平与移植后排斥反应的过程密切相关。各组 T 淋巴细胞凋亡指数以及受体生存率之间的差异也符合上述趋势。

综上所述,联合转染 CTLA4Ig-IDO 基因有着相互促进的效应,即在减少炎症细胞浸润、促进细胞因子表达向 Th2 型方向偏移、诱导 T 淋巴细胞凋亡及改善移植术后生肝功能等方面有着更显著的效果。

参考文献

- [1] ZHANG C X, WEN P H, SUN Y L. Withdrawal of immunosuppression in liver transplantation the mechanism of tolerance[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2015, 5(14):470-475.
- [2] MANUEL R P, MANUEL D M, ANDREW K. Liver transplantation: immunosuppression and oncology [J]. *Liver transplantation*, 2014, 3(19):254-260.
- [3] HIVROZ, CLAIRE, SAITAKIS, et al. Biophysical aspects of T lymphocyte activation at the immune synapse[J]. *Front Immunol*, 2016, 3(1):1-12.
- [4] JIANG G P, HU Z H, ZHENG S S, et al. Adenovirus-mediated CTLA4Ig gene inhibits infiltration of immune cells and cell apoptosis in rats after liver transplantation[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(7):1065-1069.
- [5] VOGEL I, KASRAN A, CREMER J, et al. CD28/CTLA-4/B7 costimulatory pathway blockade affects regulatory T-cell function in autoimmunity [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(6):1832-1841.
- [6] SENTHAMIL R, SELVAN D, JOHN P, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): Biology and target in cancer immunotherapies[J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2016, 9(16):755-764.
- [7] LAURENCE J M, WANG C M, ZHENG M L, et al. Overexpression of indoleamine dioxygenase in rat liver allografts using a high-efficiency adeno-associated virus vector does not prevent acute rejection[J]. *Liver Transpl*, 2009, 15(2):233-241.
- [8] WU Y K, WANG Y B, LI M, et al. Gadolinium chloride suppresses acute rejection and induces tolerance following rat liver transplantation by inhibiting Kupffer cell activation[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(6):1777-1782.
- [9] DEMETRIS A J, BATTS K P, DHILLP A P, et al. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document[J]. *Hepatology*, 1997, 25(3):658-663.
- [10] YAMADA Y, OCHIAI T, BOSKOVIC S, et al. Use of CTLA4Ig for induction of mixed chimerism and renal allograft tolerance in nonhuman primates[J]. *Am J Transplant*, 2014, 12(14):2704-2712.
- [11] CHEN Y K, LIU X C, LI J G, et al. Immunological tolerance of human hepatocyte xenograft induced by adenovirus vector-mediated CTLA4Ig gene transfer[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2012, 11(2):148-153.
- [12] LU S, YU Y, GAO Y, et al. Immunological inhibition of transplanted liver allografts by adeno-associated virus vector encoding CTLA4Ig in rats[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2008, 7(3):258-263.
- [13] CHRISTINE M, TRACI L, BRANDY D, et al. CTLA4Ig inhibits effector T cells through regulatory T cells and TGF- β [J]. *J Immunol*, 2013, 191(6):3082-3089.
- [14] LI W H, FAN W, HUANG Z Y, et al. CTLA4Ig gene transfer alleviates abortion in mice by expanding CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and inducing indoleamine 2,3-dioxygenase[J]. *J Reprod Immunol*, 2009, 89(1/2):1-11.
- [15] GRAZIA C, GAIA B, IRMA A, et al. IL-27 induces the expression of IDO and PD-L1 in human cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 41(6):43267-43280.
- [16] QIAN S, ZHANG M, CHEN Q L, et al. IDO as a drug target for cancer immunotherapy: recent developments in IDO inhibitors discovery[J]. *RSC Advances*, 2016, 9(6):7575-7581.
- [17] BOTTCHER M, ANDREAS D, BRUNSL H, et al. Mesenchymal stromal cells disrupt mTOR-signaling and aerobic glycolysis during T-cell activation [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(2):516-521.
- [18] ROBERT S, KLAUS F, RUPERT O, et al. IDO and regulatory T cell support are critical for cytotoxic T lymphocyte-associated Ag-4Ig-Mediated long-term solid organ allograft survival[J]. *J Immunol*, 2012, 188(1):37-46.
- [19] MULLEY W R, NIKOLIC D J. Indoleamine 2,3-dioxygenase in transplantation [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2008(13):204-211.
- [20] ANDREW K, KATREN N, LINDA D, et al. Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(3):277-292.