

· 论 著 ·

口服 MHC-CTB 交联物对大鼠移植肾存活的影响*

余雪松, 黄赤兵[△], 范明齐, 王平贤, 冯嘉瑜, 肖 亚
(第三军医大学附属新桥医院泌尿外科, 重庆 400037)

摘要:目的 观察口服 MHC-CTB 交联物对大鼠肾移植术后的影响。方法 用固相法合成 MHC 肽, 对其相对分子质量和纯度进行检测后, 口服 MHC-CTB 交联物灌胃 2 次/周, 持续 2 个月; 对照组口服灌胃生理盐水为对照, 以 BN(RT1n) 大鼠为供体, Lewis(RT11) 大鼠为受体, 建立大鼠肾移植模型, 观察两组术后外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞含量变化、两组生存时间、移植肾病理变化情况, 并在体外试验中, 通过混合淋巴细胞培养, 进一步验证, MHC 肽对 T 淋巴细胞有无抑制其增殖功能。结果 通过固相法合成的 MHC 肽相对分子质量为 1 389.81, 纯度为 98.1%, 建立大鼠肾移植模型后, 术后第 1 天外周血流式结果显示实验组 CD4⁺CD25⁺T 细胞较对照组明显升高 ($P < 0.01$), 且实验组生存天数为 (21.4 ± 1.45)d, 对照组生存天数为 (8.2 ± 2.15)d, 二者间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 移植肾病理切片显示对照组移植肾排斥变化早于实验组, 体外混合淋巴细胞培养显示, 实验组 T 淋巴细胞增殖弱于对照组 ($P < 0.01$), 且添加 MHC 肽后, T 淋巴细胞增殖抑制效果更明显 ($P < 0.01$)。结论 口服 MHC 肽能有效诱导免疫耐受, 抑制大鼠肾移植排斥, 延长生存时间。

关键词: 移植; 器官排斥; 交联; 口服耐受

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.01.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)01-0004-04

The effect of MHC-CTB cross-linking agent administrated orally on kidney allograft survival in rats*

Yu Xuesong, Huang Chibing[△], Fan Mingqi, Wang Pingxian, Feng Jiayu, Xiao Ya

(Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of MHC-CTB cross-linking agent administrated orally on kidney allograft survival in rats. **Methods** Synthesizing MHC peptides by using solid phase method, its molecular weight and purity were detected. Oral tolerance was induced by intragastric administration (gavage) at a dose of 5 mg/kg twice weekly until day 60, while rats in control group feed with 1 mL physiological saline as control. BN(RT1n) and Lewis(RT11) were chosen as donors and recipients, the allogeneic kidney transplantation was performed, then the assays of CD4⁺CD25⁺T cells in peripheral blood; the survival time and the pathological of kidney allograft was observed. The function of MHC inhibition to the proliferation of T cells was further observed by mix lymphocyte culture. **Results** The molecular weight and purity of MHC peptide was 1 389.81 and 98.1% respectively. The assays of CD4⁺CD25⁺T cells in peripheral blood were increased in experiment group at day 1 post-transplantation ($P < 0.01$); the survival time of kidney allografts in experiment group and control group were (21.4 ± 1.45)d and (8.2 ± 2.15)d respectively ($P < 0.01$). And transplantation kidney HE showed acute rejection happened earlier in the control. In vitro, the proliferation of T cells were inhibited and the effect of inhibition was highly increased by adding MHC peptides ($P < 0.01$). **Conclusion** Oral administration of MHC peptides can induce immune tolerance, inhibit the rejection of allograft kidney and prolong the survival time of kidney allografts.

Key words: transplantation; allograft rejection; cross-linking; oral tolerance

器官移植是实质器官终末期惟一有效的治疗方式^[1]。移植抗原诱导的免疫应答所导致的移植物功能丧失或受者机体损害, 成为临床移植失败的主要原因和移植免疫学所致力克服的关键难题^[2]。针对这一难题, 人们研究各种免疫抑制药物来辅助器官移植后治疗, 但其在抑制异体器官免疫排斥的同时, 对自身正常免疫有极大影响。大量文献报道, 诱导免疫耐受性诱导受者对移植物产生特异性免疫耐受是最为理想的办法, 使受者既不发生排斥反应, 又不降低对其他抗原的免疫应答能力^[3]。本文针对口服 MHC-CTB 交联物对大鼠肾移植术后的影响进行观察, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 BN(RT1n) 大鼠为供体, Lewis(RT11) 大鼠为受体(北京维通利华实验动物有限公司提供), 雄性, 体质量约 200 g, EZ-S 分离液(达科为公司), 灌胃针, RPMI-1640 培养基

(Gibco 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组 BN(RT1n) 供体大鼠 30 只, Lewis(RT11) 受体大鼠 30 只, 按照随机法将 30 对大鼠分为两组。

1.2.2 MHC 衍生肽合成 MHC 肽的序列为: RnleNleNleRNleNleNleGY(Nle 为正亮氨酸), 本实验拟通过口服途径诱导耐受, MHC 肽不能与 CTB 高效率交联, 在其末端加-GC 肽, 即结构衍生为 RnleNleNleRNleNleNleGY-GC(Nle 为正亮氨酸), 并用高效液相色谱图对合成后的衍生肽相对分子质量和纯度进行分析。

1.2.3 MHC 肽与霍乱毒素 B 型亚单位交联 为使 MHC 肽与霍乱毒素 B 型亚单位(cholera toxin B-subunit, CTB) 交联, 选用胶黏剂 3-(2-吡啶二硫基)丙酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯[N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)propionate, SPDP]。准确称取

SPDP 2 mg 溶解于 320 μ L 二甲基亚砜(DMSO)溶液中,得到 20 mmol/L SPDP 溶液;将 CTB 恢复到室温,准确称取 2 mg 溶解于 1 mL PBS-EDTA 溶液(含少量 DMSO)中;取 280 μ L SPDP-DMSO 溶液加入到 1 mL CTB-PBS-EDTA 溶液中,室温震荡反应,30 min;反应液 1;准确称取 MHC 5 mg,溶解于 1 mL PBS-EDTA(含少量 DMSO)溶液中;取 500 μ L MHC-PBS-EDTA 溶液加入到反应液 1 中,持续震荡,室温反应过夜;反应液 2;安装脱盐柱 G-25,流动相采用 PBS;反应液 2 经离心(6 000 r/min,5 min)处理后,上清采用脱盐柱脱盐,并进一步经高效液相色谱仪(HPLC)鉴定、纯化。

1.2.4 Lewis(RT11)大鼠口服灌胃 用灌胃针从口腔直接注入受体大鼠胃内,实验组灌胃 MHC-CTB 交联物 5 mg/kg,1 周 2 次,持续 2 个月。对照组口服灌胃生理盐水 5 mg/kg,1 周 2 次,持续 2 个月。

1.2.5 大鼠肾移植模型建立 以 BN(RT1n)大鼠为供体,Lewis(RT11)大鼠为受体,0.3%异戊巴比妥钠腹部注射麻醉供者和受者,采用原位左肾移植,肾动、静脉端端吻合,输尿管带瓣吻合于受体膀胱的方式进行肾脏移植,建立稳定的大鼠肾移植模型。

1.2.6 血清 CD4⁺CD25⁺T 细胞含量测定 移植术后第 1 天,于大鼠颈静脉抽取 2 mL 血,置于 15 mL 离心管中,加 5 mL EZ-s 淋巴细胞分离液(达科为生物技术有限公司)颠倒混匀后,小心覆盖 500 μ L 1640 培养基(保持液面分界清楚),室温 800 g 离心 30 min,吸出云雾状淋巴细胞层,加入 10 mL 1640 培养基,颠倒洗涤,室温 300 g 离心 10 min,弃上清,重悬细胞,目镜细胞计数。收集到的淋巴细胞悬液中加入 FITC Mouse Anti-Rat CD4 和 PE Mouse Anti-Rat CD25 (Becton Dickinson, San Jose, USA),4 $^{\circ}$ C,避光孵育 30 min 后,过 200 目筛,用流式细胞仪进行检测。

1.2.7 一般情况观察 术后每日观察大鼠的体质量、毛发、腹泻、精神状态,有无弓背、翘毛、腹泻等情况。记录两组大鼠存活及死亡时间,进行生存分析。

1.2.8 组织学检查 移植术后,各组大鼠死亡后取移植肾常规病理切片观察,HE 染色,比较两组间移植肾损伤情况。

1.2.9 体外混合淋巴细胞培养 (1)刺激细胞的准备:取供体 BN(RT1n)大鼠的外周血,参照 1.2.6 方法,收集 T 淋巴细胞,移置塑料培养瓶中,加入 30 μ g/mL 的丝裂霉素 C,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。1 000 r/min 离心 10 min,弃上清。0.01 mol/L 磷酸二氢盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,每次 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清。细胞沉淀重悬于新鲜完全培养基中,调整细胞数为 1×10^6 /mL。(2)反应细胞的准备:参照 1.2.6,实验组和对照组大鼠将收集到的 T 淋巴细胞调整细胞数为 1×10^6 /mL。(3)混合淋巴细胞反应:将刺激细胞加入 96 孔细胞培养板,每个样 3 个复孔,每孔 100 μ L,重复 3 组,将反应细胞按每孔 100 μ L 加入。分组如下:a 组:对照组反应细胞 1×10^5 ;b 组: 1×10^5 刺激细胞加 1×10^5 对照组反应细胞;c 组: 1×10^5 刺激细胞加 1×10^5 实验组反应细胞;d 组: 1×10^5 刺激细胞加 1×10^5 实验组反应细胞加 50 μ g MHC 肽。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 5 d,终止培养前 16 h,每孔加入 3H-TdR 20 μ L 吸取每孔培养物于玻璃纤维纸上,抽气过滤,并用蒸馏水充分洗涤,抽吸。加无水乙醇固定、晾干。将滤纸片烘干后浸入闪烁液中,置液体闪烁计数器上测定每个样品的每分钟脉冲值(cpm)。

1.2.10 统计学处理 由第一作者应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,生存分析采用 Kaplan-

meier 检验,混合淋巴细胞培养用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 KDP1258 肽合成 如图 1~2 所示,合成 RDP 肽相对分子质量为 1 389.81,HPLC 纯度检测为 98.1%。

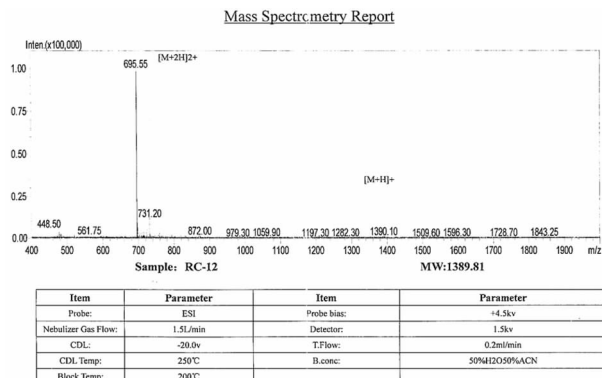


图 1 MHC 肽相对分子质量检测

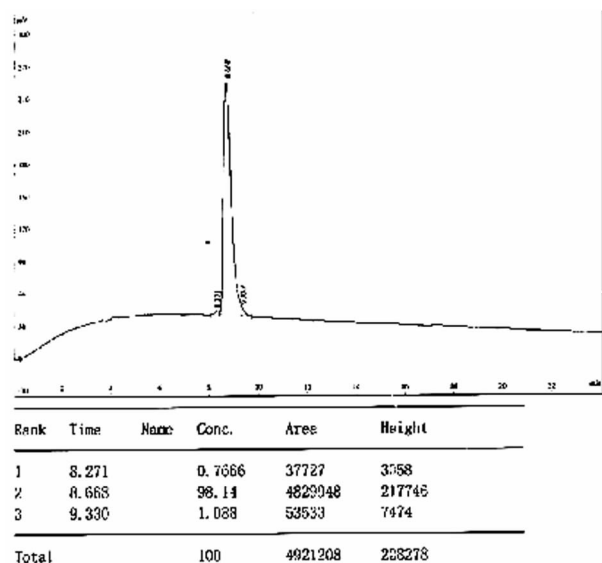
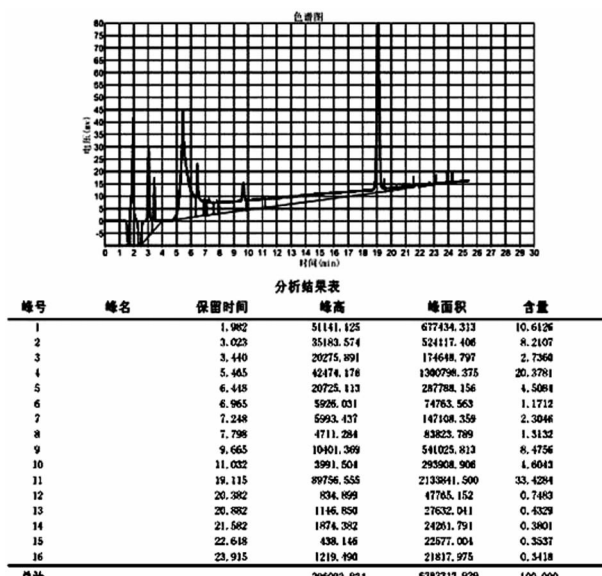


图 2 MHC 肽纯度检测



交联后,产物分析,于约 19 min 出现交联产物高峰。

图 3 MHC-CTB 交联产物 HPLC 图

2.2 MHC 衍生肽与 CTB 交联 MHC 衍生肽与 CTB 交联成功,但 SPDP 极易水解,在配置 SPDP 溶液时,需采用 DMSO 有机溶剂;同时,在反应体系中加入一定量的 DMSO 可以调节 SPDP 的水解速率,提高其反应率。CTB 微溶于水,实验体系中添加 DMSO 可以提高 CTB 的溶解性,提高 SPDP 与 CTB 的反应率。但是,DMSO 对蛋白活性存在一定的影响,需控制 DMSO 的使用量,减小蛋白活性损失,因此,反应体系中 DMSO 的使用是 CTB-MAH 制备中的关键。如图 3 所示交联率为 80%。

2.3 术后第 1 天外周血 CD4⁺CD25⁺ T 细胞含量检测 术后收集实验组和对照组各 6 只大鼠,取外周血检测 CD4⁺CD25⁺ T 细胞含量,如图 4 所示,实验组血 CD4⁺CD25⁺ T 细胞含量为(6.4±1.6)%;对照组 CD4⁺CD25⁺ T 细胞含量为(4.3±0.9)%,两组间比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

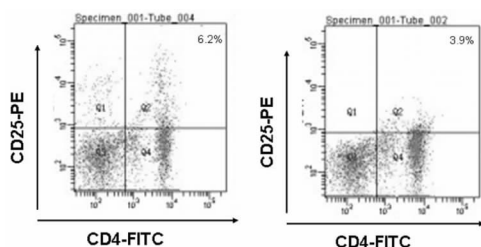
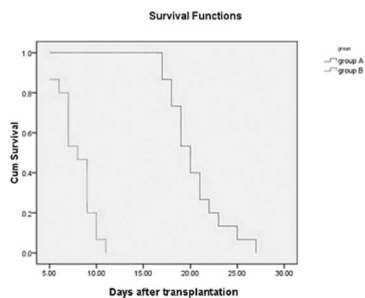


图 4 CD4⁺CD25⁺ T 细胞流式检测图

口服 MHC 肽后,大鼠肾移植术后第 1 天外周血实验组 CD4⁺CD25⁺ T 细胞含量明显增高。

2.4 移植后的情况 移植术后第 1 天,两组大鼠均出现少动、精神差、进食量少情况,毛发光亮;第 2 天两组大鼠活动、精神状况、进食量均正常。移植术后第 5 天,对照组部分大鼠即出现少食、消瘦、腹泻、弓背体位、毛发紊乱无光泽等症状。实验组于术后 19 d 左右出现弓背翘毛、腹泻、脱毛、消瘦等症状,明显迟于对照组。生存分析如图 5 所示:实验组生存天数(21.4±1.45)d;对照组生存天数(8.2±2.15)d,两组间比较差异有统计学意义($P<0.01$)。



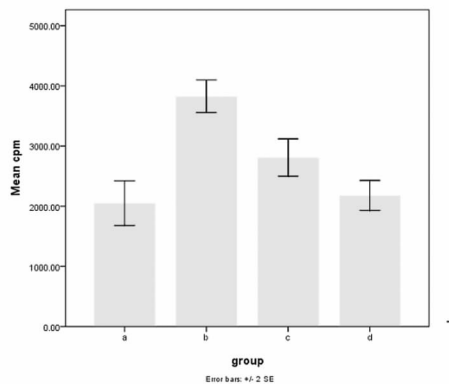
移植术后实验组生存时间明显延长,提示移植肾排斥被抑制。

图 5 移植术后大鼠生存率

2.5 移植肾病理检测 肾移植术后第 5 天对照组大鼠死亡 1 只,取移植肾作病理切片,HE 染色观察(封 2 图 6);肾小球血管充血,肾间质内有大量的炎细胞浸润,肾小管上皮细胞水肿。实验组大鼠于移植术后第 17 天第 1 只死亡。移植肾 HE 染色示,肾小管上皮细胞水肿,肾间质疏松水肿,少量炎性细胞浸润(封 2 图 7)。

2.6 混合淋巴细胞培养 实验前取两组 Lewis 大鼠外周血淋巴细胞作为效应细胞,用 BN 大鼠的外周血细胞经丝裂霉素处理后作为刺激细胞将两者行单向混合淋巴细胞培养,并作空白

对照。实验组淋巴细胞增殖没有对照组明显,bc 组间比较差异有统计学意义($P<0.01$),实验组培养过程中加入 MHC 肽 50 μg 后,T 细胞增殖抑制更明显,cd 组间比较差异有统计学意义($P<0.01$),见图 8。



口服 MHC-CTB 交联物后,实验组 T 淋巴细胞与刺激细胞混合培养后,T 细胞增殖被抑制,加入 MHC 肽 50 μg 后,抑制效果更明显。

图 8 混合淋巴细胞培养

3 讨论

器官移植后诱导免疫耐受是目前大量研究者正努力攻关的难题。诱导和维持免疫耐受的方法很多,如特异性全血输注^[4]、脾细胞输注或骨髓细胞输注等方法^[5-6]。口服耐受主要口服可溶性蛋白抗原是指通过消化系统摄入外源性抗原,通过吸收、降解为可溶性成分或与细胞结合,进入血流并快速分布到周围次级淋巴器官,如肠黏膜的肠相关淋巴样组织中,刺激机体后形成的对该抗原无免疫的应答,但对其他抗原仍能应答,诱导免疫耐受的发生,使机体对该抗原产生的全身性、低特异性免疫应答状态,但对其他抗原仍能保持正常的免疫应答能力^[7]。这一过程与静脉注射可溶性抗原诱导免疫耐受极为相似,但口服途径具有静脉注射无法比拟的方便性^[8]。

人的主要组织相容性抗原为人类白细胞抗原(human leukocyte antigen,HLA),即组织相容性白细胞抗原。它是一组淋巴细胞表面蛋白分子,参与细胞间的相互识别和免疫反应等许多重要功能,是诱导同种组织器官移植排斥反应的主要抗原。编码 HLA 分子的基因在人类是位于第 6 号染色体短臂(6p2113),具有高度多态性,分别编码 HLA I、II、III 类分子。Giral 等^[9]在体外实验,建立大鼠肾移植模型后,发现 HLA2B2702.75284 衍生肽能抑制淋巴细胞由丝裂原或同种抗原引起的增殖反应和 CTL 前体细胞分化,并能抑制 CTL 对靶细胞的溶破作用。

MHC 衍生肽与 HLA 有相同的活性位点。CTB 为无毒的受体结合亚单位,可以和所有有核细胞膜上的神经节苷脂(GM1)受体结合^[10];可大大增强机体对特异性抗原的特异性黏膜 IgA 免疫应答和系统 IgG 免疫应答,CTB 还是一种很好的黏膜免疫佐剂,用于强化多糖、小肽等半抗原的免疫原性,与其他不相关抗原共同使用时,可以促进诱导其他抗原的黏膜免疫反应^[11]。同时 CTB 还是一种良好的蛋白半抗原和弱免疫原的载体,共免时可以赋予半抗原免疫原性,增强弱免疫原的免疫原性^[12]。利用 CTB 的这些优良特性,用 MHC 与 CTB 交联,利用 CTB 特有的肠黏膜侵袭性,使其在口服过程中不被胃酸降解、变性,从而更好地进入肠道,被肠黏膜系统消化、吸收而发挥作用。

建立移植模型后,术后第 1 天 Lewis 大鼠外周血 CD4⁺

CD25⁺T 细胞比例明显提高,而已有大量文献证明 CD4⁺CD25⁺T 细胞是机体维持自身耐受的重要组成部分,提示口服 MHC 肽后,受体大鼠机体免疫系统已发生免疫应答。BN 大鼠-Lewis 大鼠为急性排斥模型,生存时间一般为 6~10 d 左右。术后从两组大鼠一般情况观察,实验组大鼠出现异常情况,如精神差、消瘦、食欲差等现象明显晚于对照组,说明异体移植肾脏发生排斥等不良反应晚于对照组,实验组术后生存时间明显延长,最长者生存天数长于对照组 18 d。病理切片进一步显示,移植术后未用药及口服 MHC 肽组移植排斥迅速,于术后第 5 天第 1 只移植大鼠死亡,移植肾病理切片显示肾小球上皮水肿,肾血管充血,大量炎性细胞浸润。而口服 MHC 肽组移植术后生存迹象平稳,于术后第 17 天才死亡第 1 只。体外混合淋巴细胞培养显示,相同供体细胞与两组大鼠刺激细胞单向混合培养,T 淋巴细胞增殖反应明显不同,而 d 组添加 MHC 肽 50 μg 后,进一步抑制了 T 淋巴细胞增殖。Magee 等^[13]在动物体内试验中,证实 MHC 肽能上调血红素氧化酶(HO-1)的活性,且起调节作用与热休克蛋白有直接关系;易善红等^[14]在体外试验中发现,MHC 肽具有较强的体外抑制人外周单核细胞 HO-1 活性的作用,且呈现出剂量依赖性,MHC 肽是通过影响细胞内血红素氧化酶-1 的活性,进而通过某种途径达到免疫抑制的结果。

参考文献:

- [1] Marc R. Hammerman: Transplantation of renal precursor cells: a new therapeutic approach[J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 14(4): 513-517.
- [2] Edemir B, Kurian SM, Eisenacher M, et al. Activation of counter-regulatory mechanisms in a rat renal acute rejection model[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 71-78.
- [3] 张立显. 口服抗原与肠黏膜免疫[J]. *郧阳医学院学报*, 2005, 24(6): 372-374.
- [4] Osamu I, Yasuo Y, Eiji A, et al. Prolonged survival of rat hepatic allografts treated with a pretransplant donor-specific blood transfusion is associated with reduced cytokine induced neutrophil chemoattractant expression [J]. *Transplantation*, 1998, 29(3): 378-381.
- [5] Tanigawa T, Monden M, Gotoh M, et al. Pretreatment of recipients with mitomycin C treated spleen cells induces

significant prolongation of cardiac allograft survival in rats[J]. *Transplant Proc*, 1994, 26(23): 3359-3360.

- [6] Holler E, Roncarolo MG, Hintermeier-Knabe R, et al. Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 25(3): 237-241.
- [7] 杜晓刚, 甘华. 口服免疫耐受大鼠脾淋巴细胞对肾小球系膜细胞中 NF-κB p65 活性的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 20(6): 708-711.
- [8] Patriarca G, Nucera E, Roncallo C, et al. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003, 17(3): 459-465.
- [9] Giral M, Cuturi MC, Nguyen JM, et al. Decreased cytotoxic activity of natural killer cells in kidney allograft recipients treated with human HLA-derived peptide[J]. *Transplantation*, 1997, 63(7): 1004-1011.
- [10] Sun JB, Eriksson K, Li BL, et al. Vaccination with dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen conjugated to cholera toxin efficiently induces specific tumoricidal CD8⁺ cytotoxic lymphocytes dependent on cyclic AMP activation of dendritic cells [J]. *Clinical Immunology*, 2004, 12(1): 35-44.
- [11] Annie GC, Eriksson K, Lebens M, et al. Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells[J]. *Infection and immunity*, 2001 (69): 5716-5725.
- [12] Rappuoli R, Pizza M, Douce G, et al. Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and Escherichia coli heat-labile enterotoxins[J]. *Immunol Today*, 1999, 20(4): 493-500.
- [13] Magee CC, Azuma H, Knoflach A, et al. In Vitro and in vivo immunomodulatory effects of RDP1258, a novel synthetic peptide[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 34(10): 1997-2005.
- [14] 易善红, 宋波, 汪泽厚. RDP1258 对人外周单核细胞增殖能力及 HO-1 活性的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(3): 230-333.

(收稿日期: 2011-07-09 修回日期: 2011-08-22)

(上接第 3 页)

- [9] Creutzig U, Ritter J, Zimmermann M, et al. Improved treatment results in high-risk pediatric acute myeloid leukemia patients after intensification with high-dose cytarabine and mitoxantrone; results of Study Acute Myeloid Leukemia-Berlin-Frankfurt-Münster 93[J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(10): 2705-2707.
- [10] de Botton S, Coiteux V, Chevret S, et al. Outcome of childhood acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and chemotherapy[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(8): 1404-1406.
- [11] 主鸿鹄, 刘艳荣, 秦亚濂, 等. 实时定量 PCR 检测 46 例初诊急性早幼粒细胞白血病难患者 PML/RAR α mRNA 的分子表达[J]. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15(1): 1-4.
- [12] 秦亚濂, 李金兰, 主鸿鹄, 等. 实时定量 RT-PCR 技术测定

初治白血病患者常见融合基因转录子水平及其标准化的探讨[J]. *中华血液学杂志*, 2007, 28(4): 433-435.

- [13] 姚利, 陈子兴, 岑建农, 等. 应用实时定量逆转录聚合酶链反应方法检测急性早幼粒细胞白血病患者 PML/RAR α 基因转录本的临床意义[J]. *中华血液学杂志*, 2006, 27(7): 773-775.
- [14] Ommen HB, Schnittger S, Jovanovic JV, et al. Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CBF β -MYH11 acute myeloid leukemias[J]. *Blood*, 2010, 115(2): 198-200.
- [15] 朱照辉, 林江, 钱军, 等. 实时定量甲基化特异性 PCR 检测 PRAME 基因启动子低甲基化 30 例及其临床意义[J]. *重庆医学*, 2010, 39(23): 3165-3168.

(收稿日期: 2011-06-07 修回日期: 2011-08-15)