

# CD40LIg 基因修饰骨髓间充质干细胞对异种胰岛移植排斥反应的抑制作用

张 剑, 张 琪, 张英才, 朱焕兵, 汪国营, 杨 扬  
(中山大学附属第三医院器官移植中心, 广东 广州 510630)

**摘 要:**【目的】探讨白细胞分化抗原 40 配体免疫球蛋白(CD40LIg)基因修饰骨髓间充质干细胞(MSC)对异种胰岛移植排斥反应的抑制作用。【方法】建立 Wistar-SD 大鼠异种胰岛移植模型,用携带分泌型 CD40LIg 基因的重组腺病毒感染的 MSC 进行干预治疗。取糖尿病大鼠 45 只,随机分为 3 组(每组 15 只):对照组植入胰岛细胞;单纯 MSC 组植入 MSC 和胰岛细胞;基因转染 MSC 组植入 CD40LIg 基因转染的 MSC 和胰岛细胞。观察糖尿病大鼠胰岛移植后生存情况、血糖变化和移植病理形态学改变,检测移植 CD40LIg 和胰岛素的表达以及移植大鼠细胞因子水平变化。【结果】①糖尿病大鼠血糖平均在移植后 2 d 恢复正常,对照组血糖平均在移植后 7 d 升高,单纯 MSC 组和基因转染 MSC 组血糖分别在 20 d 和 47 d 升高。②对照组、单纯 MSC 组和基因转染 MSC 组,移植存活时间分别为(9.5 ± 3.2)d、(25.2 ± 5.3)d 和(53.6 ± 7.5) d,各组间比较具有显著差异( $F=5.362, P < 0.05$ );移植糖尿病大鼠生存时间分别为(24.1 ± 6.8)d、(51.7 ± 7.9)d、(95.2 ± 12.7)d,各组间比较差异具有显著性( $F=6.821, P < 0.05$ )。③对照组在胰岛移植后 7 d 内,IL-2 和 TNF- $\alpha$  的水平急剧上升,IL-4 和 IL-10 的水平较移植前显著下降( $P < 0.01$ )。④两个治疗组移植体内均可见成片的胰岛细胞团,未见淋巴细胞浸润,转染 MSC 组移植体内可见 CD40LIg 和胰岛素的表达。【结论】CD40LIg 基因修饰骨髓间充质干细胞可以延长胰岛移植物的存活时间,抑制大鼠异种胰岛移植的排斥反应。

**关键词:** 骨髓间充质干细胞; CD40LIg; 胰岛移植; 糖尿病

中图分类号:R392.4; R587 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2012)02-0168-04

## Effects of CD40LIg Modified Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Rejection of Rat Islet Xenografts

ZHANG Jian, ZHANG Qi, ZHANG Ying-cai, ZHU Huan-bing, WANG Guo-ying, YANG Yang  
(Organ Transplantation Center, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:**【Objective】To investigate the effects of cluster of differentiation 40 ligand immunoglobulin (CD40LIg) modified bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) on the rejection of rat islet xenografts.【Methods】The islet xenografts model was established with islet cells of Wistar rat transplant under the left kidney capsule of diabetic SD rat. MSC were infected with the recombinant adenoviruses containing CD40LIg gene as intervention treatment. Forty-five modeled diabetic rats were randomly divided into three groups with 15 in each: only islet cells were transplanted to rats in control group (A), islet cells and MSC were transplanted to rats in MSC group (B) and islet cells and MSC infected with CD40LIg gene were transplanted to rats in transfected MSC group (C). The blood sugar and the survival of transplantation rats and grafts were observed after transplantation. The morphological changes of grafts were observed. Expression of CD40LIg and insulin were detected by immunohistochemical staining and cytokines were quantified by ELISA.【Results】(1) The blood sugar of transplantation rats decreased to normal level on day 2 after transplantation. The average level blood glucose of control group (A), MSC group (B), transfected MSC group(C) increased on day 7, 20, 47, after transplantation respectively. (2) The grafts of group A, B, and C survived for (9.5 ± 3.2), (25.2 ± 5.3), and (53.6 ± 7.5) days, respectively. There are significant deviation of the grafts survival among group A, B and C ( $F=6.821, P < 0.05$ ). The survival of transplantation rats were (24.1 ± 6.8), (51.7 ± 7.9), and (95.2 ± 12.7) days in group A, B, and C, respectively. The survival of transplantation rats compared each other were same as the survival of grafts ( $F=6.821, P < 0.05$ ). (3) In group A, Serum IL-2 and TNF- $\alpha$  concentration

收稿日期:2011-11-27

基金项目:国家自然科学基金(81070382);广东省科技计划项目(2008B030301050)

作者简介:张剑,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:器官移植,E-mail: zhangjian629@sina.com

were elevated to a high level within seven days post-transplantation and significantly increased compared with that pre-transplantation ( $P<0.01$ ). Serum IL-4 and IL-10 concentration were significantly decreased compared with that pre-transplantation ( $P<0.01$ ). (4) Hematoxylin-eosin staining of grafts showed islets bolus under the kidney capsule of transplantation rats, no inflammatory cell infiltrate and expression of insulin protein at islets in group B and C. The grafts positively stained for CD40Lig in group C. 【Conclusion】 CD40Lig gene modified bone marrow mesenchymal stem cells could prolong the survival time of islet xenografts and inhibit the rejection of islet xenografts.

**Key words:** islet xenografts; diabetes mellitus; bone marrow mesenchymal stem cells; CD40Lig

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(2):168-171;183]

骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells, MSC)是一种多能干细胞,不但具有多向分化潜能,还具有免疫调节作用。近来研究表明<sup>[1-2]</sup>, MSC 可以延长多种移植物的存活时间。我们前期研究显示<sup>[3]</sup>,用白细胞分化抗原 40 配体免疫球蛋白(CD40Lig)阻断 T 细胞共刺激通路可抑制异种胰岛移植的排斥反应,但不能维持移植物的长期存活。同样,有研究显示单独使用 MSC 也不能维持移植物的长期存活<sup>[4]</sup>。因此,我们建立 Wistar-SD 大鼠异种胰岛移植模型,用 CD40Lig 基因修饰的 MSC 进行干预治疗,同时发挥 CD40Lig 和 MSC 的作用,探讨 CD40Lig 基因修饰的 MSC 在异种胰岛移植排斥反应中的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

雄性 Wistar 大鼠,体质量约 200~250 g,作为胰岛细胞和骨髓间充质干细胞(MSC)供体;雄性 SD 大鼠,体质量约 200~250 g,为胰岛移植的受体(由中山大学医学动物实验中心提供);抗 CD40Lig 单克隆抗体、抗胰岛素单克隆抗体、免疫组织化学试剂盒和 ELISA 试剂盒(由深圳晶美生物有限公司提供);携带分泌型 CD40Lig 基因的重组腺病毒载体质粒由本中心构建;Ficoll 400 试剂(由瑞典 Amersham 公司提供)。

### 1.2 胰岛的分离和纯化

Wistar 大鼠在 100 g/L 水合氯醛(按体质量 40 mg/kg)麻醉下,开腹经胆总管插管灌注胶原酶,等胰腺肿胀后切取胰腺,将胰腺剪成小块置入消化器中,37.5℃消化 5~8 min,收集消化产物。将消化物在 37℃、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养 48 h 后,用 25%、23%、20%、11% 的 Ficoll 400 不连续密度梯度液进行纯化,将纯化产物置于 30℃、体积分数为 5%CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中

培养备用。

### 1.3 骨髓间充质干细胞(MSC)分离和培养

Wistar 大鼠拉颈处死后取股骨与胫骨进行分离,制成骨髓细胞悬液,并与等量 DMEM 混合后离心,再加入 Percoll 分离液离心,抽取有核细胞层,加入含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM,接种于培养瓶中,置于 37℃、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养。接种 48 h 后更换培养液,之后每隔 3 d 更换一次培养液。待培养细胞接近 80%融合后,再用 0.25%胰酶消化,传代培养至第 5 代细胞备用。

### 1.4 骨髓间充质干细胞 AdCD40Lig 转染

用多重感染复数(MOI)为 100 的重组 5 型野生型腺病毒 AdCD40Lig 病毒液感染 MSC(转染率达 90%以上),置于 37℃、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱内培养 48 h 后,备用。

### 1.5 异种胰岛移植模型和实验分组

将 AdCD40Lig 转染的 MSC 和 Wistar 大鼠胰岛细胞用培养液调整细胞浓度分别为  $4\times 10^6$  个/mL 和 8 000 IEQ/mL。将 45 只用静脉注射链脲佐菌素造模成功的糖尿病大鼠随机分为 A、B、C 3 组(每组 15 只),在 100 mg/L 水合氯醛(按体质量 40 mg/kg)麻醉下,将 0.25 mL AdCD40Lig 转染的 MSC(约  $1\times 10^6$  个 MSC)和 0.25 mL 胰岛细胞悬液(约 2 000 IEQ 胰岛细胞)注入左肾被膜下。A 组仅植入胰岛细胞,作为对照组;B 组植入胰岛细胞和 MSC;C 组植入胰岛细胞和 AdCD40Lig 转染的 MSC。

### 1.6 观察指标

移植后观察移植大鼠的一般情况和存活情况;第 1 周内每天检测 1 次血糖,从第 2 周开始每隔 2 d 测 1 次血糖。当血糖恢复正常后,如连续 2 次血糖高于 16.0 mmol/L,以第 1 次时间为排斥反应开始。在移植前 1 d 和移植后 3、7、14、21、28、35 d 分别采取胰岛移植大鼠外周血,采用 ELISA 方法检测 TNF- $\alpha$  和 IL-2 的水平。分别于胰岛移植

后 15 d 和 30 d, 取移植大鼠移植物, 作病理组织学检查; 用 SP 免疫组织化学染色法检测移植物 CD40Llg 和胰岛素蛋白的表达。

### 1.6 统计学方法

数据以表示, SPSS 11.0 软件进行统计分析, 采用  $t$  检验和单因素方差分析分别进行两组样本均数和多组样本均数的比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 糖尿病大鼠胰岛移植后血糖的变化

糖尿病大鼠血糖平均在胰岛移植后 2 d 恢复正常, 对照组血糖平均在移植后 7 d 开始升高; 单

纯 MSC 组和基因转染 MSC 组血糖分别在移植术后 20 d 和 47 d 升高。

### 2.2 移植糖尿病大鼠和胰岛移植存活情况

对照组、单纯 MSC 组和基因转染 MSC 组移植存活时间分别为  $(9.5 \pm 3.2)$ d、 $(25.2 \pm 5.3)$ d 和  $(53.6 \pm 7.5)$ d, 各组间比较具有显著差异 ( $F = 5.362, P < 0.05$ ); 移植糖尿病大鼠生存时间分别为  $(24.1 \pm 6.8)$ d、 $(51.7 \pm 7.9)$ d、 $(95.2 \pm 12.7)$ d, 各组间比较差异具有显著性 ( $F = 6.821, P < 0.05$ )。

### 2.3 糖尿病大鼠胰岛移植后细胞因子的变化

对照组在移植后 IL-2 和 TNF- $\alpha$  的水平快速上升, 而 IL-4 和 IL-10 的水平较移植前显著下降 ( $P < 0.01$ ); 2 个治疗组细胞因子水平的变化和对照组正好相反(图 1)。

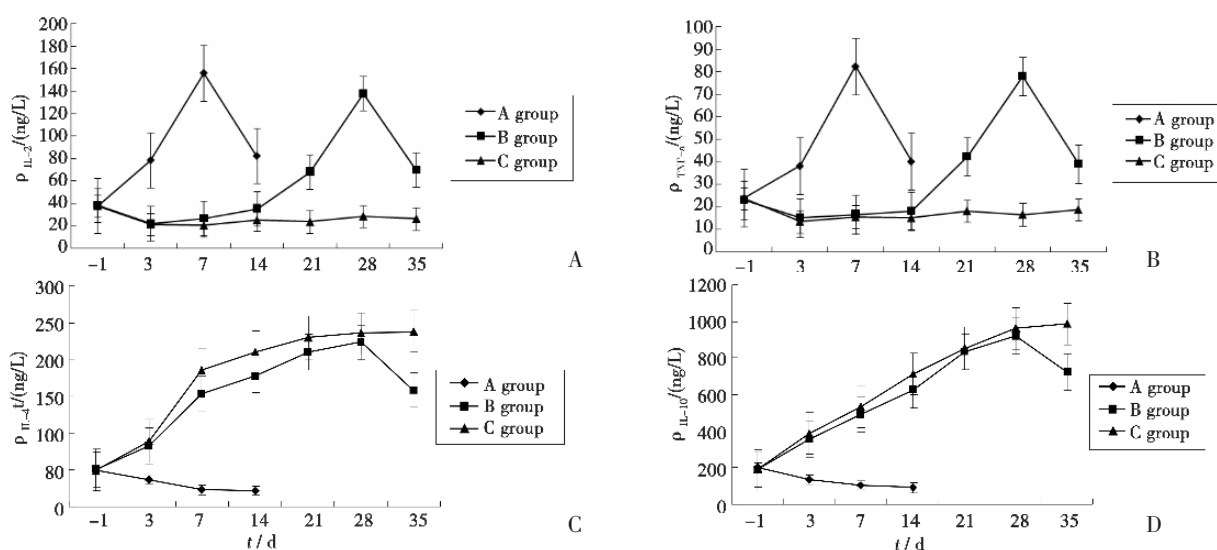


图 1 胰岛移植糖尿病大鼠细胞因子水平的变化

Fig.1 Change of serum cytokine after transplantation in rats

A: IL-2; B: TNF- $\alpha$ ; C: IL-4; D: IL-10

### 2.4 胰岛移植病理学检查和免疫组织化学染色结果

移植后 15 d, 两个治疗组移植物内均可见成片的胰岛细胞团, 无明显的淋巴细胞浸润; 免疫组化染色可见胰岛素蛋白的表达(图 2A); 而对照组移植物可见的胰岛细胞坏死和大量淋巴细胞浸润(图 2B)。移植后 30 d, 基因转染 MSC 组移植物内可见成片的胰岛细胞, 无明显的淋巴细胞浸润; 并可见棕黄色的胰岛素和 CD40Llg 蛋白的表达(图 2C)。MSC 组则见胰岛细胞变性、坏死, 大量淋巴细胞浸润。

## 3 讨论

排斥反应目前仍是影响胰岛移植疗效的主要因素, 而排斥反应的免疫应答过程主要由 T 淋巴细胞介导完成。骨髓间充质干细胞(MSC)是一类骨髓来源的多能干细胞, 具有低免疫原性和免疫调节功能。多种体外实验研究均证实 MSC 可抑制 T 淋巴细胞的增殖<sup>[5-8]</sup>。有研究报道<sup>[8]</sup>, 在 MSC 和 T 淋巴细胞的混合培养中, 由丝裂原刺激的 T 细胞增殖被抑制, 并且这种抑制作用在去除 BMSC 后

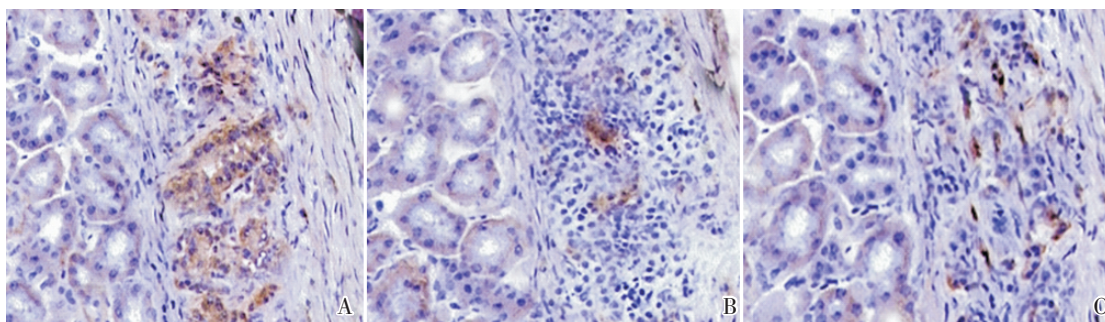


图 2 胰岛移植后 3 组移植植物表达情况

Fig.2 Expression of islet grafts after transplantation

A: Immunohistochemical staining with antiinsulin antibody of islet grafts in MSC group on day 15 after transplantation; B: Immunohistochemical staining with antiinsulin antibody of islet grafts in control group on day 15 after transplantation; C: Immunohistochemical staining with anti-CD40Lig antibody of islet grafts in MSC infected with CD40Lig gene group on day 30 after transplantation; SP, original magnification  $\times 200$

消失。

通过建立异种胰岛移植模型,用 MSC 进行干预治疗,结果显示 MSC 组的胰岛移植糖尿病大鼠和移植物的生存时间较对照组显著延长,排斥反应明显被抑制。MSC 抑制胰岛移植排斥反应的机理还不清楚。有研究显示<sup>[9]</sup>,移植前输注 MSC 可通过抑制 T 细胞的增殖,延长心脏移植的存活时间。同样也有研究表明<sup>[10]</sup>,MSC 可调节 T 淋巴细胞的扩增,抑制大鼠肝脏移植的排斥反应的发生。有学者认为 MSC 抑制胰岛移植排斥反应的机理可能和诱导辅助性 T 细胞(Th)细胞的分化偏移有关。Th1 型细胞主要生成 IL-2、TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$ , 参与细胞免疫,促进排斥反应的发生;Th2 型细胞产生 IL-4、IL-10 等细胞因子,参与体液免疫; Th1 和 Th2 亚群之间可以相互调节和互相转化,Th2 型细胞生成的 IL-4 可下调 Th1 的扩增,而 Th1 型细胞产生的 INF- $\gamma$  则下调 Th2 的增殖。

本研究显示,对照组 IL-2 和 TNF- $\alpha$  的水平在移植后急剧升高,移植术后 7 d 达到高峰,IL-4 和 IL-10 水平较移植前下降;而两个治疗组细胞因子的变化则和对照组相反,证实 MSC 可抑制 Th1 类细胞因子 IL-2 和 TNF- $\alpha$  的产生,促进 Th2 类因子 IL-4 和 IL-10 的生成。有报道人 MSC 可抑制 Th1 类细胞因子 IL-2 和 TNF- $\alpha$  产生,促进 Th2 类因子 IL-4 和 IL-10 生成,诱导 Th1 向 Th2 分化偏移,抑制排斥反应的发生<sup>[11]</sup>。

本研究还发现,MSC 治疗虽然可抑制胰岛移植排斥反应,但不能使移植大鼠获得长期的存活。而用 CD40Lig 基因转染 MSC 治疗的胰岛移植大鼠和移植植物存活时间较 MSC 治疗组和对照组显

著延长。CD40L 是 CD40 的配体,属于 TNF 超家族成员,主要在 CD4<sup>+</sup> T 细胞上表达,与 CD40 分子结合,为 T 细胞的活化提供共刺激信号。CD40Lig 可阻断 T 细胞的活化重要的 CD40/CD40L 共刺激途径,抑制 T 细胞介导的排斥反应。我们前期研究表明<sup>[3]</sup>,基因转移 CD40Lig 可以通过阻断 T 细胞的活化的共刺激通路和下调相关 Th1 类细胞因子的表达,抑制异种胰岛移植大鼠的排斥反应,但不能形成免疫耐受。这可能与排斥反应是一个复杂的和多途径的免疫过程有关,所以单独阻断任何一条途径都不能获得稳定的效果。

因此,我们转移 CD40Lig 基因修饰 MSC 对异种胰岛移植大鼠进行干预治疗,通过 CD40Lig 阻断 T 细胞的活化的共刺激通路,发挥 MSC 免疫调节作用,使胰岛移植糖尿病大鼠获得较长时间的存活,为诱导异种胰岛移植免疫耐受提供新的思路和方法。

#### 参考文献:

- [1] Rampino T, Gregorini M, Bosio F, et al. Mesenchymal stromal cells injection reduces acute rejection damage in a rat experimental model of kidney transplantation[J]. *G Ital Nefrol*, 2011, 28(2):132-134.
- [2] Casiraghi F, Noris M, Remuzzi G. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells in solid organ transplantation[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2010, 15(9):731-737.
- [3] Zhang J, Li H, Jiang N, et al. Inhibition of rejection in murine islet xenografts by CTLA4Ig and CD40Lig gene transfer[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(21):

(下转第 183 页 to page 183)