

## FTY720 预防小鼠同种异体胰岛移植的排斥反应

刘龙山<sup>1</sup>, 王长希<sup>1</sup>, 张泳华<sup>2</sup>, 何晓顺<sup>1</sup>, 尚文俊<sup>1</sup>, 毕颖<sup>1</sup>, 王东<sup>1</sup>

( 1. 中山大学附属第一医院器官移植科, 广东 广州 510080; 2. 杭州中美华东医药集团, 浙江 杭州 310011 )

**摘要:** 【目的】探讨 FTY720 在小鼠同种异体胰岛移植中的抗排斥作用及其机制。 【方法】36 只链脲霉素诱导的糖尿病小鼠 (C57BL/6) 随机分为 3 组, 移植供体 (Balb/c 小鼠) 胰岛后分别连续口服不同剂量的 FTY720 或双蒸水 (对照组), FTY720 剂量分别为 0.5 mg/(kg·d) (F<sub>0.5</sub> 组) 和 1.0 mg/(kg·d) (F<sub>1.0</sub> 组)。术后连续测定血糖, 行组织学检查对比淋巴细胞浸润程度, 比较各组移植中位存活时间 (MST)。观察各组用药后不同时间外周血和肠系膜淋巴结 (MLN)、腋窝淋巴结 (ALN) 中淋巴细胞数量的变化。 【结果】F<sub>0.5</sub> 组 (84.5 d)、F<sub>1.0</sub> 组 (> 100 d) MST 明显长于对照组 (10 d) (P < 0.01), F<sub>1.0</sub> 组 MST 长于 F<sub>0.5</sub> 组 (P < 0.01)。用药组移植中淋巴细胞浸润减轻并与剂量相关。F<sub>0.5</sub> 组、F<sub>1.0</sub> 组 PBL 变化趋势略有不同, 分别在用药后 8 h、10 h 降至对照组的 23.81% 和 12.59% (P < 0.01), 之后略有回升并趋于稳定。用药组连续口服 FTY720 5 d 后 MLN、ALN 中淋巴细胞数量明显高于对照组 (P < 0.05), 连用 14 d 后其淋巴细胞数量减少并低于对照组, 尤以 MLN 明显。 【结论】连续口服 FTY720 可有效延长小鼠同种异体胰岛移植存活时间并呈一定的剂量相关性。FTY720 可促进外周血淋巴细胞归巢至肠系膜和外周淋巴结, 并诱导组织中淋巴细胞的凋亡, 来减轻移植中淋巴细胞浸润。

关键词: 同种异体胰岛移植; 小鼠; 免疫抑制剂; FTY720; 淋巴细胞归巢

中图分类号: R667.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)06-0644-05

## Preventive Effect of FTY720 on Acute Rejection of Islet Allograft Transplantation in Mice

LIU Long-shan<sup>1</sup>, WANG Chang-xi<sup>1</sup>, ZHANG Yong-hua<sup>2</sup>, HE Xiao-shun<sup>1</sup>,  
SHANG Wen-jun<sup>1</sup>, BI Ying<sup>1</sup>, WANG Dong<sup>1</sup>( 1. Department of Organ Transplantation, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510800, China;  
2. Hangzhou Huadong Medicine Group Co., Ltd. Hangzhou 310011, China )

**Abstract:** 【Objective】To investigate the anti-rejection effect of FTY 720 in islet allograft transplantation of mice and its mechanism. 【Methods】36 recipient mice (C57BL/6) were induced diabetes by streptozotocin (STZ) and then randomly divided into 3 groups. After islet allograft (Balb/c mice) transplantation, the 3 groups were orally administrated distilled water (control group) and different dose of FTY 720 [group F<sub>0.5</sub>: 0.5 mg/(kg·d), group F<sub>1.0</sub>: 1.0 mg/(kg·d)]. Blood glucose was consecutively monitored, lymphocyte infiltration in islet allograft was observed by histopathology, and graft median survival time (MST) of each group was compared. The changes in lymphocyte counting of peripheral blood leukocytes (PBL), mesenteric lymph node (MLN) and axillary lymph nodes (ALN) in each group were observed. 【Results】The MST of group F<sub>0.5</sub> (84.5 d) and group F<sub>1.0</sub> (>100 d) was significantly longer than that of control group (10 d) (P < 0.01). The MST of group F<sub>1.0</sub> was significantly longer than that of group F<sub>0.5</sub> (P < 0.01). Much less lymphocytes infiltration was found in FTY720 treated groups than in control group, which was dose related. Peripheral blood lymphocytes in group F<sub>0.5</sub> and group F<sub>1.0</sub> decreased to the lowest level at 8 h and 10 h after FTY720 administration respectively to 23.81% and 12.59% of that in control group, and then slightly came up to be stable. Lymphocytes in MLN and ALN in group F<sub>0.5</sub> and group F<sub>1.0</sub> were significantly higher than that in control group (P < 0.05) after 5 days of continuous FTY720 treatment, while decreased to be less than that in control group after 14 days of continuous FTY720 treatment, which was more apparent for lymphocytes in MLN. 【Conclusion】Continuous administration of FTY720 can effectively prolong the survival time of islet allograft in

收稿日期: 2006-07-15

基金项目: 教育部回国留学基金资助项目 (2003-14); 广东省自然科学基金资助项目 (2003B0202)

作者简介: 刘龙山 (1981-), 男, 山东东营人, 博士生; 王长希, 教授, 通讯作者. E-mail: wx21@21cn.com

mice, which is dose related. FTY720 can attenuate lymphocyte infiltration in graft probably by promoting peripheral blood lymphocytes homing into lymph nodes, as well as inducing apoptosis of lymphocytes in grafts.

Key words: islet allograft transplantation; mouse; immunosuppressant; FTY720; lymphocyte homing

[ J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6):644- 648]

胰岛移植治疗糖尿病具有广阔的应用前景,但排斥反应仍是其发展的重要障碍<sup>[1]</sup>。FTY720 从冬虫夏草中提取经改造而成,可有效防治排斥反应,且无明显毒副作用,在胰岛移植具有很好的应用价值<sup>[2]</sup>。本研究在小鼠同种异体胰岛移植后给予不同剂量的 FTY720,旨在研究 FTY720 延长胰岛移植存活时间的作用及其与剂量的相关性,并初步探讨其作用机制。现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

清洁级雄性 Balb/c(H-2<sup>d</sup>)和 C57BL/6(H-2<sup>b</sup>)小鼠,8~10 周龄,体质量 25~30 g,购自中山大学动物实验中心。Balb/c 为供体,C57BL/6 小鼠腹腔注射链脲霉素(STZ, Sigma 公司)250 mg/kg,非禁食血糖连续两次高于 22.2 mmol/L 作为移植受体。置于离心机(离心半径 20.4 cm, BECKMAN COULTER Allegra™ 6R Centrifuge)中以 2 000 r/min 离心 20 min,吸取 230~205 g/L 和 205~110 g/L 两层界面的胰岛,用 R/MINI 1640(Gibco, USA)洗涤后离心(1 000 r/min)3~5 min,反复 2~3 次,所获胰岛隔夜培养(37 ℃,体积分数 5%CO<sub>2</sub>)后移植于受体左肾被膜下。双硫脲(DTZ)染色鉴定。

### 1.2 胰岛移植

以胶原酶消化法和 Ficoll 梯度离心法分离和纯化供体胰岛。显微镜下经胆总管逆行灌注型胶原酶(2 mg/mL, Sigma, USA)2 mL,快速剪取胰腺(3 只)移入 15 mL 离心管,37 ℃水浴 30~35 min 后用 0~4 U Hanks 液终止消化,以上述离心机洗涤 3 次(800 r/min, 1~2 min/次),经不锈钢滤网过滤后再用 Hanks 液洗涤离心 1 次,弃去上清。然后加入 250 g/L Ficoll (Sigma, USA)溶液 4 mL,混匀后依次加入 230、205、110 g/L 的 Ficoll 溶液各 2 mL,胰岛特异性台盼蓝染色鉴定胰岛活性。从 3 只小鼠可获胰岛 450~600 个,活性在 95%以上。

### 1.3 实验分组及处理

36 只 C57BL/6 受体鼠采用随机分组软件 RandA1.0 随机(平衡设计)分为 3 组,每组 12 只,

术后分别连续口服不同剂量的 FTY720(杭州中美华东医药集团提供)或其溶剂(双蒸水),FTY720 剂量分别为 0.5 mg/(kg·d)(F<sub>0.5</sub>组)和 1.0 mg/(kg·d)(F<sub>1.0</sub>组),术后连续口服 FTY720 至移植失活或术后 100 d。术后取尾静脉血连续监测血糖水平,血糖降低后重新升高至 22.2 mmol/L 以上视为移植失活,麻醉下取左肾行组织学检查(HE 染色)。移植存活时间定义为从手术至血糖升高超过 22.2 mmol/L。手术前和术后每周称量体质量。

每组随机取 6 只于术前、用药后 2、4、6、8、10、12、24 h,1~7 d、2、4、8、12、14 周测定外周血淋巴细胞(PBL)数量;其余 6 只分为两批,分别于用药后第 5 天(d5)和第 14 天(d14)处死测定 PBL、肠系膜淋巴结(mesenteric lymph node, MLN)和腋窝淋巴结(axillary lymph node, ALN)中的淋巴细胞数量,同时取左肾行组织学检查(HE 染色)。

### 1.4 统计学处理

各组移植存活时间以中位存活时间(graft median survival time, MST)表示,采用 Kaplan-Meier 法绘制各组生存率梯形图,采用 log-rank 检验比较移植存活时间。各组不同时间点 PBL 和 MLN、ALN 中淋巴细胞数量之间的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 Fisher 最小显著差值法(LSD)。统计学软件采用 SPSS 11.0,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 胰岛移植存活时间

所有受体鼠血糖均在移植后 3~5 d 内降至 22.2 mmol/L 以下。各组移植存活时间见表 1。其中对照组于 d5 处死 3 只, F<sub>0.5</sub>组、F<sub>1.0</sub>组分别于 d5、d14 各处死 3 只。用药组 MST 明显长于对照组(F<sub>0.5</sub> vs. C,  $\chi^2=13.21$ , P=0.0003; F<sub>1.0</sub> vs. C,  $\chi^2=13.21$ , P=0.0003); F<sub>1.0</sub>组明显长于 F<sub>0.5</sub>组(F<sub>1.0</sub> vs F<sub>0.5</sub>,  $\chi^2=13.09$ , P=0.0005)。所有受体鼠未见手术切口和肺部感染,体质量亦未见明显减轻。图 1 所示为口服不同剂量的 FTY720 对移植存活时间的影响。

### 2.2 外周血和淋巴结中淋巴细胞数量的变化

表 1 小鼠同种异体胰岛移植物的存活时间

Table 1 The survival time of islet allograft in FTY720 treated and control groups

Group	n	Survival time(d)	MST(d)
Control	9	8,8,9,10, 10,11,11,11,12	10
F <sub>0.5</sub>	6	79,83,84,85,87,89	84.5
F <sub>1.0</sub>	6	94,100+,100+,100+,100+,100+	>100

Control group: distilled water; F0.5 group : 0.5 mg/(kg·d) of FTY 720; F1.0 group: 1.0 mg/(kg·d) of FTY 720; MST: (graft) median survival time. Three mice in control group were sacrificed on day 5 (d5), and three mice in FTY720 treated groups were sacrificed respectively on d5 and d14. 100+ means the survival time of graft was over 100 d

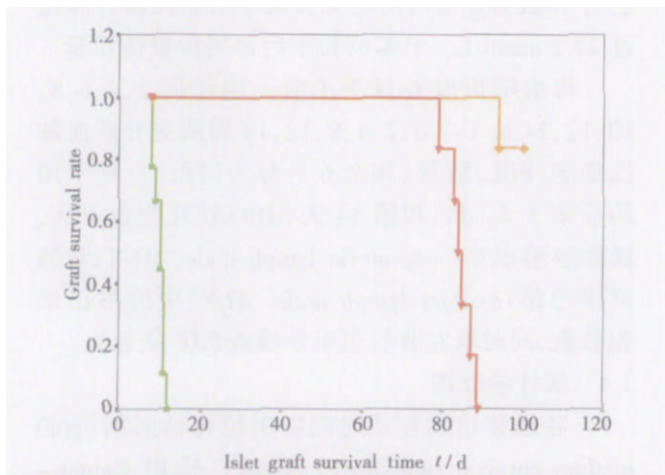


图 1 不同剂量的 FTY720 对小鼠同种异体胰岛移植存活时间的影响

Fig.1 The survival curve of islet allograft in different dose of FTY720-treated and control groups

Control group, F0.5 group, F1.0 group

**2.2.1 口服 FTY720 24 h 内 PBL 的变化** 口服不同剂量的 FTY720 后, PBL 数量均有明显降低。降低趋势与剂量相关: F<sub>0.5</sub> 组、F<sub>1.0</sub> 组分别于用药后 10 h、8 h 降至最低, 分别为对照组的 23.81% 和 12.59% (F<sub>0.5</sub> 组: 2 024/μL vs F<sub>1.0</sub> 组: 1 040/μL; F=82.42, P<0.001), 之后稍回升并趋于稳定。连续口服 FTY720 后, PBL 数量维持在首次用药后 24 h 时 (PBL<sub>24h</sub>) 的低水平状态, 略有波动, 每组各时间点 PBL 与本组内 PBL<sub>24h</sub> 比较差异无统计学意义 (F<sub>0.5</sub> 组: F=1.259, P=0.296, F<sub>1.0</sub> 组: F=1.063, P=0.406)。F<sub>1.0</sub> 组有 5 只移植存活达到 100 d, 3 只停用 FTY720 后, 血糖均在 2 周内升高并超过 22.2 mmol/L; PBL 亦于停用 FTY720 后开始回升, 8~13 d 后接近或略超过术前水平。

**2.2.2 肠系膜和腋窝淋巴结中淋巴细胞数量的变化** 如图 2A、B 所示, 连用 FTY720 5 d 后, F<sub>0.5</sub> 组、F<sub>1.0</sub> 组 PBL 分别占对照组的 24.21% 和 13.14%, 用药 14 d 后分别占对照组的 24.48% 和 13.42%; 各组内 d5、d14 的 PBL 数量差异无统计学意义 (F<sub>0.5</sub> 组: F=5.909, P=0.072; F<sub>1.0</sub> 组: F=1.445, P=0.296)。用药 5 d 后, F<sub>0.5</sub>、F<sub>1.0</sub> 组 MLN/ALN 中淋巴细胞数量明显增加, 分别为对照组的 1.75/1.24 倍和 2.42/1.58 倍, 用药 14 d 后减少为对照组的 0.84/0.90 倍和 0.63/0.81 倍; 各组内 d5、d14 的 MLN/ALN 中淋巴细胞数量差异有统计学意义 (P<0.001)。

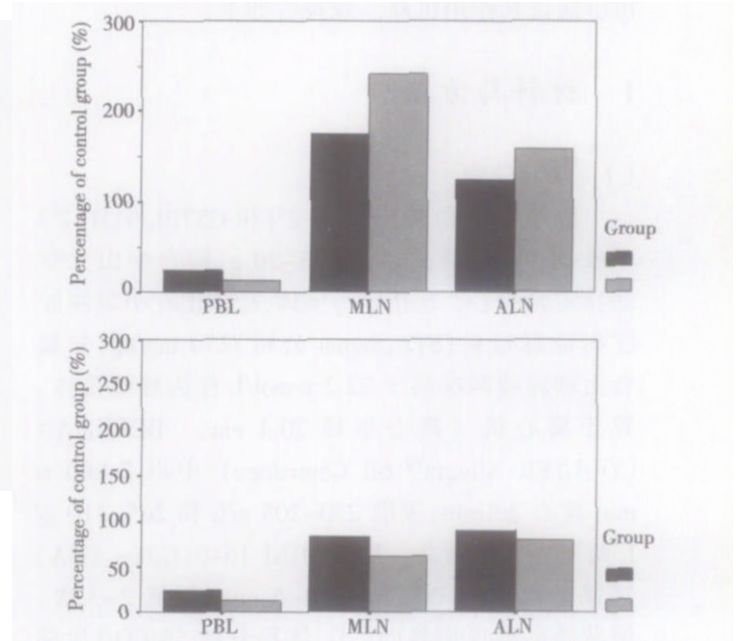


图 2 连续口服不同剂量 FTY720 5 d (A) 和 14 d (B) 时 PBL、MLN、ALN 的淋巴细胞数量

Fig.2 The lymphocyte count of peripheral blood, MLN and ALN in FTY720 treated groups after 5 days (2A) and 14 days (2B) of continuous administration

PBL: peripheral blood lymphocyte; MLN: mesenteric lymph node; ALN: axillary lymph node; F0.5: FTY720 0.5 mg/(kg·d); F1.0: FTY720 1.0 mg/(kg·d)

## 2.3 组织学检查

术后 d5, 对照组肾被膜下淋巴细胞广泛浸润, 胰岛结构破坏较重, 边界不清, 少见残留胰岛 (图 3A); F<sub>0.5</sub> 组、F<sub>1.0</sub> 组淋巴细胞浸润较对照组明显为轻, 胰岛边界较清、结构较完整; F<sub>1.0</sub> 组淋巴细胞浸润较 F<sub>0.5</sub> 组轻, 胰岛细胞团结构更为明显 (图 3B)。术后 d10, 对照组淋巴细胞浸润和胰岛结构破坏较 d5 时加重, 几乎不见残留胰岛。术后 d14, F<sub>0.5</sub> 组、

F<sub>1.0</sub> 组组织学改变与 d5 相比无明显差异。F<sub>0.5</sub> 组术后 d84 可见淋巴细胞浸润较多, 残留胰岛少 (图

3C)。F<sub>1.0</sub> 组术后 d100 可见肾被膜下较多结构尚完整的胰岛细胞团, 淋巴细胞浸润较少 (图 3D)。

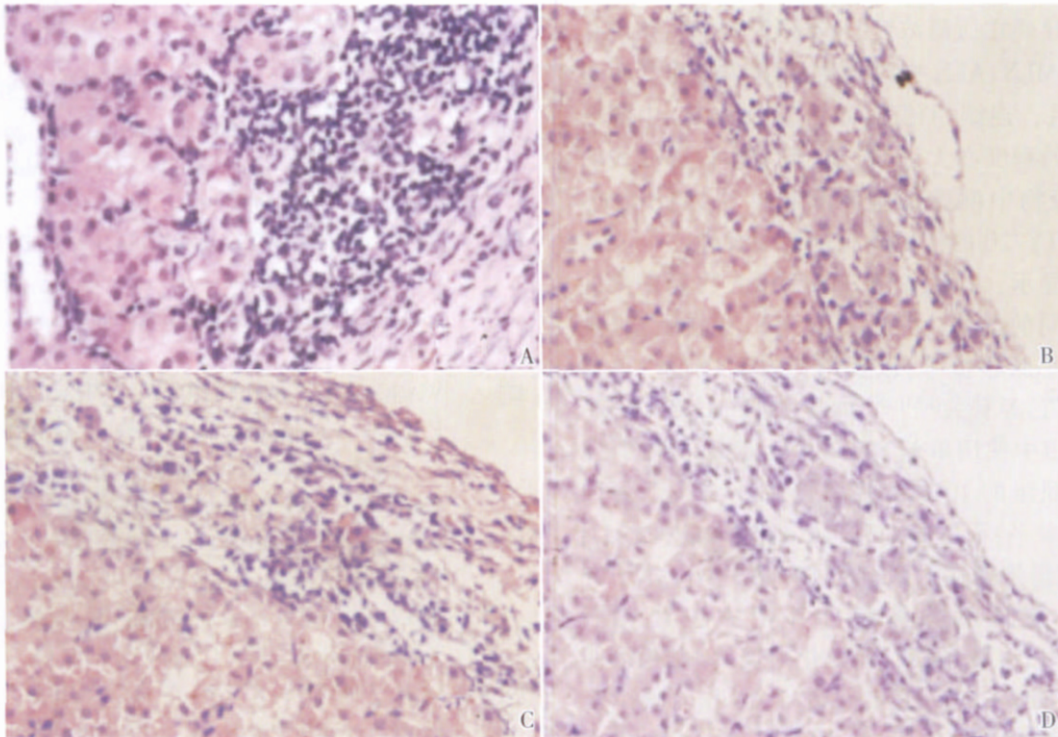


图 3 组织病理学表现

Fig. 3 Histopathologic manifestation (10×20)

A: In control group, islet grafts were severely destroyed massive infiltration of lymphocytes 5 days after transplantation. B: In FTY720 treated group [1.0 mg/(kg·d)], multiple clusters of islet grafts with clear contour and intact structure were showed with less infiltration of lymphocytes 5 days after transplantation compared with the control group. C: In FTY720 treated group [0.5 mg/(kg·d)], few islet grafts with destroyed structure and moderate lymphocytes infiltration under renal capsule were showed 84 days after transplantation. D: In FTY720 treated group [1.0 mg/(kg·d)], multiple clusters of islet grafts with clear contour and considerable integrity as well as few lymphocytes infiltration were showed 100 days after transplantation

### 3 讨 论

环孢素 (CsA) 和他克莫司等传统免疫抑制剂用于肝、肾等器官移植可有效降低急性排斥反应, 但二者对胰岛细胞有毒性作用<sup>[3]</sup>, 其肾毒性又可加重糖尿病引起的肾损害<sup>[4]</sup>, 而且他克莫司本身又可诱导糖尿病的发生, 因此在胰岛移植中应用受到限制。FTY720 在皮肤、心脏、小肠等多种移植模型以及临床试验中已证实具有防治排斥反应的作用<sup>[5-7]</sup>。与传统免疫抑制剂相比, FTY720 对胰岛细胞不仅无毒性作用, 尚可促进胰岛素的分泌<sup>[3]</sup>。国外研究表明连续口服 FTY720 [0.5 mg/(kg·d)] 可使小鼠移植胰岛 (Balb/c CBA) 达到长期存活 (>100 d)<sup>[3]</sup>。本研究中, 连续口服 FTY720 可明显延长移植胰岛的存活时间, F<sub>0.5</sub> 组移植植物存活达 84.5

d (MST), 而 F<sub>1.0</sub> 组移植植物则可长期存活 (>100 d), 两组差异有统计学意义 (P < 0.01)。本研究结果与上述国外研究的差异, 考虑主要是因为小鼠品系不同, 也可能与胰岛的纯化程度等有关。

FTY720 的作用机制尚不完全清楚, “诱导淋巴细胞凋亡”和“淋巴细胞归巢”是其可能的主要作用机制, 但尚有争议。本研究中, 连续口服 FTY720 5 d 时, PBL 明显减少并维持在 PBL<sub>24h</sub> 水平, 而 MLN 和 ALN 中的淋巴细胞则明显增加 (P < 0.05), 提示 FTY720 促进 PBL 归巢至肠系膜和外周淋巴结; 连续用药 14 d 后, PBL 仍维持在 PBL<sub>24h</sub> 水平, 而 MLN 和 ALN 中的淋巴细胞数量则明显减少, 考虑连续口服 FTY720 的累积作用诱导了淋巴细胞凋亡。已有研究表明, 连用 FTY720 后其累积作用可达到单剂作用的 10 倍; FTY720 在体内分布容积大, 90% 以上以蛋白结合形式存在, 移植

物、淋巴结等组织内的浓度很可能高于其血液浓度<sup>[8,9]</sup>。因此,连续使用 FTY720 后,虽然血药浓度不能诱导细胞凋亡,但移植物、淋巴结等组织中可能已达到诱导凋亡所需浓度<sup>[10]</sup>。本研究中, F<sub>1.0</sub> 组 PBL 减少以及 MLN、ALN 中淋巴细胞增多的程度明显大于 F<sub>0.5</sub> 组,连续用药 14 d 后 MLN、ALN 中淋巴细胞减少的程度亦大于 F<sub>0.5</sub> 组,组织学检查亦表明 F<sub>1.0</sub> 组移植物中淋巴细胞浸润程度明显低于 F<sub>0.5</sub> 组,说明 FTY720 的作用具有剂量相关性。

研究显示,口服 FTY720 后 PBL 数量变化的规律与不同的动物(大鼠、小鼠等)、移植类型(皮肤、心脏、小肠移植等)以及用药方案(剂量、单剂或连续用药)等有关<sup>[5,7,11,12]</sup>。如在 C3H C57BL/6 小鼠皮肤移植中使用单剂 FTY720 后,PBL 可在 12 h 内降至对照组的 10%,之后缓慢回升,2 周后可回复至正常水平;而连续口服 14 d [1.0 mg/(kg·d)] 时,PBL 则仍维持在对照组的 10%左右<sup>[13]</sup>。本研究监测了小鼠同种异体胰岛移植中连续口服 FTY720 时 PBL 数量随时间变化的规律。结果表明口服首剂 FTY720 后,PBL 可在 8~10 h 内减少至对照组的 23.81%(F<sub>0.5</sub> 组)和 12.59%(F<sub>1.0</sub> 组),之后趋于稳定;连续口服 FTY720 过程中 PBL 水平无明显变化。达到长期存活的小鼠停用 FTY720 后 PBL 逐渐回升,在 14 d 内达到正常水平。

综上所述,连续口服 FTY720 可能通过“淋巴细胞归巢”和“诱导淋巴细胞凋亡”减轻移植物中淋巴细胞的浸润,从而延长小鼠同种异体胰岛移植物的存活时间,这种作用具有剂量相关性。

#### 参考文献:

- [1] BALAMURUGAN A N, BOTTINO R, GIANNOUKAKIS N, et al. Prospective and challenges of islet transplantation for the therapy of autoimmune diabetes [J]. *Pancreas*, 2006, 32(3): 231-243.
- [2] FU F, HU S, LI S, et al. FTY720, a novel immunosuppressive agent with insulintropic activity, prolongs graft survival in a mouse islet transplantation model[J]. *Transplant Proc*, 2001, 33(1-2): 672-673.
- [3] FU F, HU S, DELEO J, et al. Long-term islet graft survival in streptozotocin- and autoimmune-induced diabetes models by immunosuppressive and potential insulintropic agent FTY720[J]. *Transplantation*, 2002, 73(9): 1425-1430.
- [4] Wijkstrom M, Kirchof N, Graham M, et al. Cyclosporine toxicity in immunosuppressed streptozotocin-diabetic nonhuman primates [J]. *Toxicology*, 2005, 207(1): 117-127.
- [5] LIMA R S, NOGUEIRA-MARTINS M F, SILVA H T Jr, et al. FTY720 treatment prolongs skin graft survival in a completely incompatible strain combination [J]. *Transplant Proc*, 2004, 36(4): 1015-1017.
- [6] YAN S, RODRIGUEZ-BARBOSA J I, PABST O, et al. Control of intestinal allograft rejection by FTY720 and costimulation blockade[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(1): 114-115.
- [7] WANG M H, MILEKHIN V, ZHANG H, et al. FTY720, a new immunosuppressant, as rescue therapy in mouse cardiac transplantation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(9): 847-852.
- [8] KAHAN B, CHODOFF L, LEICHTMAN A, et al.: Safety and pharmacodynamics of multiple doses of FTY720 in stable renal transplant recipients [J]. *Am J Transplantation*, 2001, 1(Suppl 1): 300.
- [9] LI H, MENO-TETANG G M, CHIBA K, et al.: Pharmacokinetics and cell trafficking dynamics of 2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol hydrochloride (FTY720) in cynomolgus monkeys after single oral and intravenous doses[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 301(2): 519-526.
- [10] SILVA H T Jr, FELIPE C R, PESTANA J O. FTY720 [J]. *Curr Opin Organ Transpl*, 2002, 7 (4) : 342-352.
- [11] NIKOLOVA Z, HOF A, BAUMLIN Y, et al. Combined FTY720/cyclosporine treatment promotes graft survival and lowers the peripheral lymphocyte count in a murine cardiac allotransplantation model [J]. *Transplantation*, 2001, 72(1): 168-171.
- [12] CHIBA K, YANAGAWA Y, KATAOKA H, et al. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing[J]. *Transplant Proc*, 1999, 31(1-2): 1230-1233.
- [13] LUO Z J, TANAKA T, KIMURA F, et al. Analysis of the mode of action of a novel immunosuppressant FTY720 in mice[J]. *Immunopharmacology*, 1999, 41(3): 199-207.

(编辑 张敏瑞)