

文章编号:1005-6947(2007)10-0982-04

· 基础研究 ·

# Th1/Th2 类细胞因子转换对小鼠心脏移植存活的影响

朱鹏, 陈义发, 张宜江, 张万广, 陈孝平

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 肝脏外科中心, 湖北 武汉 430030)

**摘要:**目的 探讨 Th1/Th2 类细胞因子转换对小鼠心脏移植存活时间的影响。方法 采用小鼠腹部心脏移植模型,分为同种异体移植组(A组)、同种异体移植+免疫抑制处理组(B组)和同系移植组(C组),每组20对。观察移植存活时间、供心病理改变、受鼠脾和供心内 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4 及 IL-10 mRNA 的表达水平。结果 A组及B组移植平均存活时间分别为(7.8 $\pm$ 0.77)d和(14.80 $\pm$ 1.01)d,C组移植存活均超过28d;3组间差异均有显著性( $P < 0.05$ )。A组与B组、C组比较,移植的心肌细胞变性坏死严重,并有大量炎性细胞浸润。A组受鼠脾脏及供心内 IFN- $\gamma$  和 IL-10 mRNA 表达比其余两组明显增强;3组移植心组织 IL-2 及 IL-4 mRNA 均无表达;A组脾脏 IL-2 mRNA 表达最强;B组脾脏 IL-4 mRNA 表达明显强于其余两组。结论 Th1/Th2 转换在延长移植存活过程中起重要作用;IL-10 也参与移植排斥反应过程。 [中国普通外科杂志,2007,16(10):982-985]

**关键词:** Th1/Th2; 细胞因子类; 心脏移植; 移植; 小鼠

**中图分类号:** R 392.4

**文献标识码:** A

## Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to the survival time of cardiac allografts in mice

ZHU Peng, CHEN Yi-fa, ZHANG Yi-jiang, ZHANG Wan-guang, CHEN Xiao-ping

(Hepatic Surgery Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract: Objective** To study the relationship between Th1/Th2 cytokine profiles and the survival time of cardiac allografts in mice. **Methods** The ventral heterotopic cardiac transplantation models were divided into three groups: rejection group, treated group, isograft group, each group with 20 recipients. Mean survival time (MST), pathologic histological changes, the mRNA expression of IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 and IL-10 were measured. **Results** MST of heart allografts in rejection and treated group was (7.8 $\pm$ 0.77)d, and (14.80 $\pm$ 1.01)d respectively. The survival time of grafts in isograft group were all more than 28d. The difference among the three groups was significant. In rejection group, the number of infiltrating cells was much more than that in the other groups, and also, the extent of pathologic histological changes was more severe. The mRNA expression of IFN- $\gamma$  and IL-10 in graft and spleen in rejection group was much stronger than that in the others. There was no obvious mRNA expression of IL-2 and IL-4 in grafts of all three groups. The mRNA expression of IL-2 in the spleens of rejection group was the strongest, while the mRNA expression of IL-4 in the spleens of treated group was the strongest. **Conclusions** The dynamic equilibrium of Th1/Th2 cytokines plays an important role in the survival time prolongation of cardiac allografts in mice. IL-10 can also participate in the process of graft rejection.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(10):982-985]

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30571754);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(2005383)。

**收稿日期:**2007-03-26; **修订日期:**2007-08-16。

**作者简介:**朱鹏,男,江苏靖江人,华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生,主要从事肝胆外科及器官移植方面的研究。

**通讯作者:**陈孝平 E-mail:chenxp@medmail.com.cn

**Key words:** Th1/Th2; Cytokines; Heart Transplantation; Graft; Mice

**CLC number:** R 392.4

**Document code:** A

Th1/Th2 两类辅助性 T 细胞之间动态平衡对诱导和维持免疫耐受十分重要。Th2 细胞因子表达的上调和 Th1 细胞因子表达的下降,被认为是移植免疫耐受机制之一<sup>[1-3]</sup>。但也有学者对此提出异议<sup>[4-7]</sup>。鉴于此,笔者采用小鼠腹部异位心脏模型观察 Th1/Th2 细胞因子转换对心脏移植存活时间的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 实验动物 近交系 C57BL/6 小鼠 40 只为供体,近交系 BALB/c 小鼠 80 只,作为供体或受体。动物均为雌性,约 8 周龄,15~20 g,购于同济医学院器官移植研究所。供、受体体重差异无显著性,手术前后不禁饮食。

1.1.2 手术器械及试剂 双人双目手术显微镜购于上海医用光学仪器厂;显微手术包购于上海医疗器械有限公司手术器械厂;12-0 带线缝合针购于宁波医用缝线厂;戊巴比妥钠为同济医学院职业医学研究所惠赠;Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司;引物合成由申能博彩完成;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒为 Fermentas 公司产品;50 bp ladder 购自 TIANGEN BIOTECH。

### 1.2 实验方 法

1.2.1 实验分组及模型制作 将实验动物分为 3 组:每组为 20 对。A 组(同种异体移植组):供体为 C57BL/6 小鼠,受体为 BALB/c 小鼠,供受体围手术期均未作特殊处理;B 组(同种异体移植+免疫抑制处理组):供体为 C57BL/6 小鼠,受体为 BALB/c 小鼠,受体于术前 1 d 经尾静脉行特异性供体脾细胞输注,术前 1 d 及术后 1 周联合应用环孢素 A(5 μg/g)。C 组(同系移植组):供受体均为 BALB/c 小鼠,供受体围手术期均未作特殊处理。

动物模型采用小鼠腹部异位心脏移植模型,将供心主动脉与受体腹主动脉、供心肺动脉与受体下腔静脉分别行端侧吻合<sup>[8]</sup>。

1.2.2 脾细胞悬液制备 1% 戊巴比妥腹腔注射麻醉 C57BL/6 小鼠(0.01 mL/g),无菌条件下切取脾脏,置于盛有少量 D-Hanks 液培养皿内,将之剪成小块。转移至 200 目钢网上,用灭菌针芯轻轻研磨,经网过滤,即制成单细胞悬

液。1 000 r/min,离心 10 min,弃上清液;加入红细胞裂解液,吹打混匀;2~3 min 后加入 10 mL D-Hanks 液终止反应;1 000 r/min,离心 10 min,洗 2 次。用 DMEM 培养基调整细胞浓度至  $5 \times 10^7$  个/mL 备用。采用台盼蓝溶液染色计算活细胞百分率。

### 1.2.3 观察指标及方法

1.2.3.1 移植心脏平均存活时间 设定 28 d 为观察终点。术后每日触诊受鼠腹部,如供心不再搏动或仅有细微颤动均视为排斥终点。

1.2.3.2 移植标本收集及组织学检查 移植后第 7 天分别从 3 组中随机挑选受体鼠各 5 只,断颈处死后取供心和脾组织,锡箔纸包裹后冻存于液氮中备用。其中 2 只供心,于 10% 甲醛溶液内固定 24 h 后,石蜡包埋制成切片,并采用伊红苏木素染色于光学显微镜下观察。

1.2.3.3 检测各组受鼠供心和脾脏中 Th1/Th2 类细胞因子白细胞介素 2(IL-2), $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ ),IL-4,IL-10 的 mRNA 表达水平 (1) RNA 提取。小鼠脾和心脏中的总 RNA 提取按 Trizol Reagent 说明书进行。取 50 mg 组织 + 1 mL Trizol Reagent 研磨,5 min 后加入 200 μL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温沉淀 3 min,4 ℃ 10 397 r/min 离心 15 min,取上清液并加入 500 μL 异丙醇,颠倒混匀,室温沉淀 20 min,4 ℃ 10 397 r/min 离心 10 min,弃上清液后用 75% 乙醇洗涤 1 次,4 ℃ 8 220 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 20 μL 0.1% DEPC 水充分溶解,测定 A260/A280 值并计算 RNA 浓度。(2) RT-PCR 的步骤。将 mRNA 逆转录为 cDNA:将配制逆转录反应体系在 42 ℃ 温育 60 min,进行 cDNA 合成,然后于 94 ℃ 作用 10 min 灭活逆转录酶,迅速冰浴 1~2 min 后,-20 ℃ 保存。PCR 扩增:采用 -20 ℃ 保存的 cDNA 作为 PCR 的模板,引物序列和产物大小见表 1。cDNA 2 μL,10 × 缓冲液 5 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4 μL,上下游引物各 1 μL,Taq 酶 1.5 μL(U/μL)、加去离子水补至 50 μL。将反应管置于 Eppendorf 热循环仪上,按表 2 条件进行 PCR 反应。反应完毕将产物置于 4 ℃ 冰箱保存。采用 2% 琼脂糖凝胶电泳:取 1 μL 6 × Loading Buffer,1 μL 荧光染料(SYB GREEN)和 4 μL PCR 产物,混匀后上样;以 5~7 V/cm 电泳,在凝胶成像系统上检测并照相。

附表 引物序列及产物大小

引物	序列	退火温度(°C)	产物大小(碱基对)
IFN- $\gamma$ 正义	5'-TCCTCCTGCGGCCTAGCTCTGA-3'	65	409bp
IFN- $\gamma$ 反义	5'-CGCTGGACCTGTGGGTGTGTA-3'		
IL-2 正义	5'-CCCTGTGCTAATCACTCCTCACA-3'	54	479bp
IL-2 反义	5'-ACTCATCATCGAATTGGCACTC-3'		
IL-4 正义	5'-TGACGGCACAGCCTATTGATG-3'	64	422bp
IL-4 反义	5'-TGATGCTCTTTAGGCTTTCCAG-3'		
IL-10 正义	5'-GCTGCCTGCTCTTACTGACTGG-3'	59	454bp
IL-10 反义	5'-TTCATGGCCCTGTAGACACCTT-3'		
$\beta$ -actin 正义	5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3'	56	218bp
$\beta$ -actin 反义	5'-ATGTCACGCACGATTTCC-3'		

### 1.3 统计学处理

RT-PCR 条带采用 Gel-pro 软件进行灰度扫描分析,并计算相对灰度值。相对灰度值 = IOD(目的条带)/IOD(内参)。实验数据采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。统计学方法采用单因素方差分析及 Pearson 相关分析,用 SPSS10.0 软件进行。

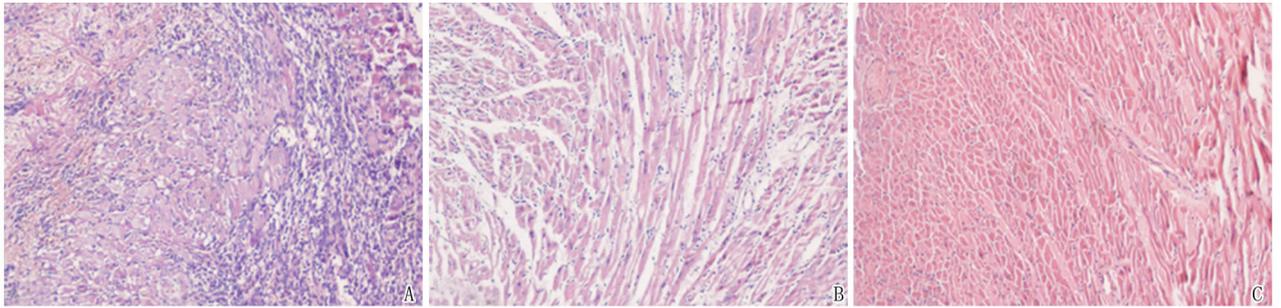


图1 光学显微镜下移植植物形态学改变(HE  $\times 100$ ) A: 移植排斥组; B: 免疫抑制处理组; C: 同系移植组

### 2.4 3组受鼠移植心脏和脾脏 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 及 IL-10 mRNA 的表达

A组受鼠脾脏及供心 IFN- $\gamma$  及 IL-10 mRNA 表达明显强于 B, C 组,受鼠脾脏及供心 IFN- $\gamma$  表达与移植植物存活时间(GST)呈负相关( $r = -0.441$ ,  $P = 0.235$ ;  $r = -0.525$ ,  $P = 0.146$ );受鼠脾脏及供心 IL-10 表达与 GST 呈明显负相关,差异具有显著性( $r = -0.856$ ,  $P = 0.003$ ;  $r = -0.775$ ,

## 2 结果

### 2.1 心脏移植成功率

小鼠腹部心脏移植手术共行 60 对,存活 58 对,成功率为 96.7%。

### 2.2 移植心脏平均存活时间

移植心脏平均存活时间 A 组为 ( $7.8 \pm 0.77$ )d, B 组为 ( $14.80 \pm 1.01$ )d, C 组移植植物在观察终点 28 d 时均存活。3 组间存活时间差别均有显著性意义( $P < 0.05$ )。

### 2.3 移植心脏组织学的变化

移植术后第 7 天, A 组为典型细胞免疫性损伤病理改变,心肌细胞变性坏死、大量炎性细胞浸润,以淋巴细胞和单核细胞为主; B 组只有少量炎性细胞浸润,心肌细胞变性坏死较轻; C 组几乎无炎性细胞浸润,心肌细胞无变性坏死(图 1)。

$P = 0.014$ ); 3 组供心组织 IL-2 和 IL-4 mRNA 均无表达, 3 组受鼠脾脏均有 IL-2 mRNA 表达,以 A 组最强, C 组次之, B 组最弱,脾脏 IL-2 表达与 GST 呈负相关( $r = -0.525$ ,  $P = 0.146$ )。3 组受鼠脾脏 IL-4 mRNA 的表达以 B 组最强, C 组次之, A 组最弱,脾脏 IL-4 表达与 GST 呈正相关( $r = 0.298$ ,  $P = 0.436$ )(图 2)。

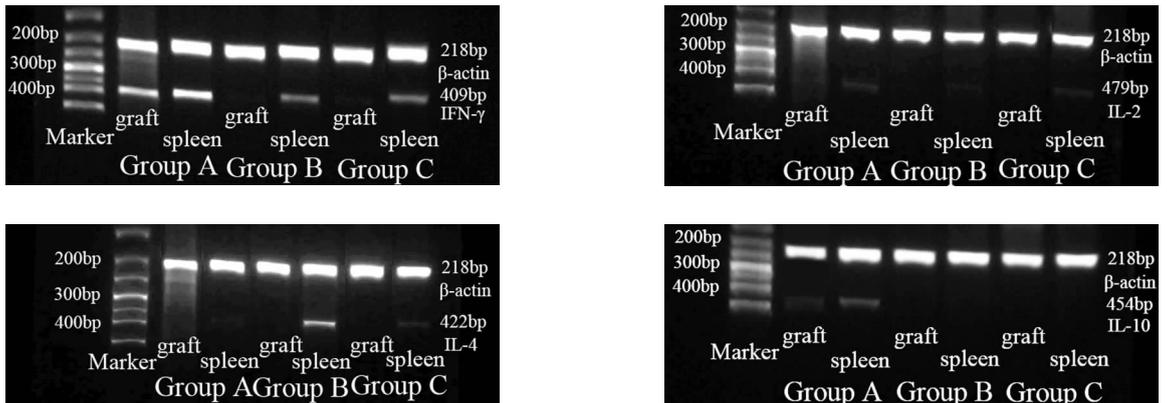


图2 3组受鼠移植植物和脾脏 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 及 IL-10 mRNA 的表达

### 3 讨论

激活的 CD4 + 辅助性 T 细胞分化为 Th1 和 Th2 亚群,通过它们分泌不同细胞因子而参与不同免疫应答。Th1 亚群分泌 IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  和 IL-2 等,主要介导细胞毒(CTL)和迟发性超敏反应(DTH);Th2 亚群分泌 IL-4, IL-5, IL-6 和 IL-10,主要功能是刺激 B 细胞增生并产生抗体,参与体液免疫应答<sup>[1]</sup>。

近年来认为<sup>[2-3]</sup>,同种移植中 Th1 型细胞通过促进同种抗原特异的 CTL 和 DTH 作用而启动排斥反应,Th2 型细胞则通过下调 Th1 型细胞驱动的排斥反应而促使移植耐受。但也有研究认为,Th1/Th2 转换并不能完全解释移植耐受现象。Bishop 等<sup>[4]</sup>发现大鼠肝移植自发性耐受模型淋巴结中,IL-2 及 IFN- $\gamma$  表达增加,而 IL-6 和 IL-10 表达减少。Lee SJ 等<sup>[5]</sup>和赵刚等<sup>[6]</sup>认为 Th2 上调与免疫耐受无关。一项应用 IL-2 和 IFN- $\gamma$  基因敲除小鼠进行的移植研究表明<sup>[7]</sup>,虽然细胞因子表达向 Th2 偏离,但仍有排斥反应发生,说明 Th1/Th2 转换学说仍然存在诸多争议。究其原因,除了各家采用的检测手段不同、移植脏器和动物种属等方法学原因外,也与该理论本身的局限性有关。

笔者采用小鼠腹部异位心脏移植模型进行研究发现,B 组存活时间明显长于 A 组。应用 RT-PCR 方法检测移植物和脾脏细胞因子 mRNA 表达,结果显示:经 DST 联合 CSA 处理的小鼠,IL-4 表达明显增强,但 IFN- $\gamma$ , IL-2 和 IL-10 表达均降低,尤以 IFN- $\gamma$  和 IL-10 降低比较明显,提示 Th1/Th2 转换确实在诱导移植耐受延长移植存活方面起着重要作用。但 Th2 因子中的 IL-10 表达水平反而降低。IL-10 主要由 Th2 细胞和活化的巨噬细胞分泌,它在移植排斥方面有双重作用,提示细胞因子网络间存在着精细协调作用方式,不能简单地将其区分为支持诱导耐受或参与排斥反应。IFN- $\gamma$  和 IL-2 一方面可以促进 T 细胞增殖分化,另一方面可以通过诱导促炎细胞因子分泌,激活炎性细胞释放各种效应分子,增强血管内皮细胞表面黏附分子表达,上调移植 MHC 分子表达等作用以促进排斥反应<sup>[9]</sup>。IL-4 作为诱导 Th2 细胞分化的关键因子<sup>[10]</sup>,它不仅促进 Th0 向 Th2 分化,还可以抑制 Th1 细胞增殖,下调 Th1 细胞因子表达,从而延长移植存活时间。本研究结果与之相符。大量研究证实<sup>[11-13]</sup>,IL-10 可以抑制排斥反应。其主要机制为:(1)直接或间接(诱导调节性 T 细胞生成)抑制 Th1 细胞增殖及相应细胞因子分泌;(2)通过减少抗原提呈细胞表面 MHCII 分子和一些共刺激信号表达,从而抑制 T 细胞激活;(3)通过减少血管内皮细胞表面

黏附分子表达,从而减少单核细胞渗出。也有研究发现<sup>[14]</sup>,IL-10 通过刺激 T 细胞增强其 MHCII 分子表达等机制,可加剧移植血管病等,从而促进排斥反应发生。本研究结果支持后者,A 组供心及脾脏内均有 IL-10 mRNA 表达,明显强于 B、C 组,提示其可能促进移植排斥反应。此现象的原因尚有待研究。

总之,细胞因子网络十分复杂,其作用往往具有多向性和多效性。如何通过调节细胞因子网络诱导移植耐受是目前诱导移植耐受的免疫策略之一。这一策略的深入研究,将有助于更深入了解移植免疫应答过程,从而对排斥反应的预防和治疗提供新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002,2(12): 933-944.
- [2] Amirzargar A, Lessanpezhski M, Fathi A, et al. TH1/TH2 cytokine analysis in Iranian renal transplant recipients [J]. *Transplant Proc*, 2005,37(7): 2985-2987.
- [3] Sadeghi M, Daniel V, Naujokat C, et al. Evidence for IFN-gamma up- and IL-4 downregulation late post-transplant in patients with good kidney graft outcome [J]. *Clin Transplant*, 2007,21(4): 449-459.
- [4] Bishop GA, Sun J, Decruz DJ, et al. Tolerance to rat liver allografts. III. Donor cell migration and tolerance-associated cytokine production in peripheral lymphoid tissues [J]. *J Immunol*, 1996,156(12): 4925-4931.
- [5] Lee SJ, Namkoong S, Ha KS, et al. Colchicine-derived compound CT20126 promotes skin allograft survival by regulating the balance of Th1 and Th2 cytokine production [J]. *Exp Mol Med*, 2007,39(2): 230-238.
- [6] 赵刚,王芳,王春友. 免疫缺陷树突状细胞诱导异种胰岛细胞移植耐受[J]. *中国普通外科杂志*, 2005,14(5): 347-350.
- [7] Zand MS, Li Y, Hancock W, et al. Interleukin-2 and interferon-gamma double knockout mice reject heterotopic cardiac allografts [J]. *Transplantation*, 2000,70(9): 1378-1381.
- [8] 朱鹏,陈义发,张宜江,等. 建立小鼠腹部心脏移植模型的体会[J]. *中国普通外科杂志*, 2007,16(2): 133-135.
- [9] Sawitzki B, Kingsley CI, Oliveira V, et al. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo [J]. *J Exp Med*, 2005,201(12): 1925-1935.
- [10] Surquin M, Le Moine A, Flamand V, et al. IL-4 deficiency prevents eosinophilic rejection and uncovers a role for neutrophils in the rejection of MHC class II disparate skin grafts [J]. *Transplantation*, 2005,80(10): 1485-1492.
- [11] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001,19: 683-765.
- [12] Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control [J]. *J Exp Med*, 2007,204(2): 239-243.
- [13] Moine AL, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection [J]. *Transplantation*, 2002,73(9): 1373-1381.
- [14] Furukawa Y, Becker G, Stinn JL, et al. Interleukin-10 (IL-10) augments allograft arterial disease: paradoxical effects of IL-10 in vivo [J]. *Am J Pathol*, 1999,155(6): 1929-1939.