

吲哚胺2, 3-二氧化酶转染供体可抑制大鼠肝移植的急性排斥反应*☆

刘晓珑¹, 韩鲁浙¹, 任鑫¹, 肖刚¹, 金一怡¹, 陈永兵², 刘立新¹

Inhibition of acute allograft rejection in a rat liver transplantation model by adenovirus associated plasmid transferred with indoleamine 2,3-dioxygenase

Liu Xiao-long¹, Han Lu-zhe¹, Ren Xin¹, Xiao Gang¹, Jin Yi-yi¹, Chen Yong-bing², Liu Li-xin¹

文章亮点:

构建携带吲哚胺2, 3-二氧化酶的重组腺病毒质粒 pWCM-吲哚胺2, 3-二氧化酶, 发现吲哚胺2, 3-二氧化酶的重组腺病毒质粒可成功转染大鼠肝脏, 缓解急性排斥反应, 但难以持续有效表达, 对免疫排斥的抑制作用有限。

Abstract

BACKGROUND: Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expressing in immune privilege site can induces the T cell immune tolerance.

OBJECTIVE: To study the inhibitory effect of adenovirus associated plasmid vector medicated IDO on acute rejection following rat liver allograft.

METHODS: IDO and pWAV2 were transferred into a new vector pWCM-IDO. Forty-eight PVG/DA liver transplant models were randomly divided into three groups: normal saline group, pWAV2 group and pWCM-IDO group. Models in the three groups were performed with intraperitoneal injection of 1 mL normal saline, pWAV2 and pWCM-IDO, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: pWCM-IDO could be successfully transfected into the PVG donor liver. The survival time and the IDO expression level in the PWCM-IDO group were significantly higher than those in the normal saline group and pWAV2 group ($P < 0.05-0.01$). At 4 days after transplantation, the acute rejection degree in the PWCM-IDO group was significantly weaker than that in the other two groups. IDO recombinant plasmid could be successfully transfected into rat liver to relieve the acute rejection following liver allograft. But it difficult to sustain the effective expression, and the inhibitory effect on immune rejection was limited.

Liu XL, Han LZ, Ren X, Xiao G, Jin YY, Chen YB, Liu LX. Inhibition of acute allograft rejection in a rat liver transplantation model by adenovirus associated plasmid transferred with indoleamine 2,3-dioxygenase. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(31): 5701-5705. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 吲哚胺2, 3-二氧化酶(indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO)表达于免疫特赦器官中, 能选择性诱导T细胞免疫耐受。

目的: 观察腺病毒相关质粒载体介导 IDO 转染供体对大鼠肝移植急性排斥反应的抑制作用。

方法: 构建携带 IDO 的重组腺病毒质粒 pWCM-IDO, 建立 PVG/DA 大鼠肝移植模型 48 对, 随机分为 3 组, 生理盐水组、pWAV2 组、pWCM-IDO 组分别腹腔注射生理盐水、pWCM 悬液和 pWCM-IDO 悬液 1 mL。

结果与结论: pWCM-IDO 可成功转染 PVG 供体肝脏, PWCM-IDO 组生存期和 IDO 表达明显高于生理盐水组和 pWAV2 组($P < 0.05-0.01$); 移植后第 4 天 PWCM-IDO 组急性排反应程度明显弱于其他 2 组。提示 IDO 的重组腺病毒质粒可成功转染大鼠肝脏, 缓解急性排斥反应, 但难以持续有效表达, 对免疫排斥的抑制作用有限。

关键词: 吲哚胺2, 3-二氧化酶; 肝移植; 急性排斥反应; 转染; 免疫抑制

缩略语: 吲哚胺2, 3-二氧化酶: indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO

刘晓珑, 韩鲁浙, 任鑫, 肖刚, 金一怡, 陈永兵, 刘立新. 吲哚胺2, 3-二氧化酶转染供体可抑制大鼠肝移植的急性排斥反应[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(31):5701-5705. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of General Surgery, Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China;
²Department of General Surgery, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100007, China

Liu Xiao-long^{*}, Doctor, Attending physician, Department of General Surgery, Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China g_xlliu@126.com

Corresponding author: Liu Li-xin, Doctor, Chief physician, Department of General Surgery, Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Supported by: Medical Research Foundation of Guangdong Province, No.A2008373*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.31.001

Received: 2012-01-27
Accepted: 2012-03-07

¹ 南方医科大学第三附属医院普通外科, 广东省广州市 510630; ² 解放军北京军区总医院普外科, 北京市 100007

刘晓珑☆, 男, 1979 年生, 山西省太原市人, 汉族, 2008 年四川大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事肝胆外科的研究。
g_xliu@126.com

通讯作者: 刘立新, 博士, 主任医师, 南方医科大学第三附属医院普通外科, 广东省广州市 510630
liulixin@tom.com

中图分类号: R617
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2012)31-05701-05

收稿日期: 2012-01-27
修回日期: 2012-03-07
(20111027006/WL·C)

0 引言

吲哚胺 2, 3-二氧化酶(indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO)是一种细胞内含亚铁血红素的酶, 主要分布于胸腺髓质和次级淋巴器官的 T 细胞区, 并散见于一些免疫耐受或免疫特赦组织中, 如胸腺、胃肠道黏膜、附睾、胎盘及眼前房等, 移植排斥反应的关键之一是宿主 T 细胞的激活^[1]。抗原特异性 T 细胞的激活需要两种不同的刺激信号^[2-3]。第一信号是由抗原呈递细胞 MHC-抗原肽复合物和 T 细胞上的 TCR-CD3 结合提供, 第二信号即共刺激信号是由抗原呈递细胞表面表达的共刺激分子与 T 细胞上的相应受体作用产生^[4-5]。研究表明, 共刺激信号不但可以促进 T 细胞的生长、分化和细胞因子的产生, 而且还为防止 T 细胞凋亡提供了生存信号, 缺乏共刺激信号将导致 T 细胞无能, 调控共刺激信号通路可以增强或终止免疫应答^[6-8]。实验拟利用 IDO 能选择性诱导 T 细胞免疫耐受的特点, 构建其定向转染的重组腺相关病毒质粒, 转染大鼠肝移植急性排斥模型, 观察其对肝脏免疫排斥反应的抑制作用。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于 2009-02/2010-12 在南方医科大学实验动物中心及南方医科大学第三附属医院中心实验室完成。

材料:

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
pWAV2(AAV 的载体质粒)	北京病毒所
IDO 全长基因片段	南方医科大学肿瘤中心
AD-293 细胞、抗-IDO 抗体	南方医科大学免疫学教研室
限制性内切酶	Takara 公司
S-p 法试剂盒	Upstrate 公司
Olympus DD70 BX51 图像采集系统	日本
IMAGE-PRO plus 4.1 图像分析软件	美国

实验动物: 供体 PVG 大鼠 48 只, 体质量 234~254 g; 受体 DA 大鼠 48 只, 体质量 253~274 g; 均由南方医科大学实验动物中心提供, 供体术

前不禁食、水, 受体术前 12 h 禁食, 但不禁水; 饲养环境温度 23 ℃, 湿度为 60%~70%。

实验方法:

pWCM-IDO 真核载体质粒的构建: 大鼠 IDO cDNA 引物为正链, 5-CTG ATG CCT CAC AGT CAA ATA TCT CC-3; 反链, 5-TAG CTA AGG CCA ACT CAG AAG GG-3, 1.3 kb。PCR 扩增 DNA。具体过程为 2 min 95 ℃ 热启动, 40 次循环, 其中 95 ℃ 1 min, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 3 min, 最后 72 ℃ 扩增 10 min。IDO PCR 片段通过 PCR 克隆试剂盒, 按说明书进行克隆。电泳初步测定 PCR 产物。将上述 PCR 产物凝胶回收。T₄ 连接酶连接 IDO 片段及线性化 pWAV2 (16 ℃, 18 h), 将合成的 IDO 全长基因片段直接插入到 CMV 启动子序列下游, 构建成质粒 pWCM-IDO。Takara 公司测序。

重组腺病毒的制备: 质粒 pWAV2、pWCM-IDO 分别与辅助质粒 pXX2 和 pXX6 以磷酸钙共沉淀法转染 293 细胞, 破碎细胞收集并纯化 rAAV, 测定滴度。

动物分组: 按“二袖套法”建立 PVG 大鼠→DA 大鼠肝移植模型, 实验分为 3 组: 生理盐水组: 移植前 48 h 供体腹腔注射生理盐水 1 mL, pWAV2 组: 腹腔注射 pWCM 悬液 1 mL (7×10¹⁰ vp/mL), pWCM-IDO 组: 腹腔注射 pWCM-IDO 悬液 1 mL (7×10¹⁰ vp/mL), 每组 16 对。

所有操作在 SPF 级动物实验室中进行。术后第 2 天内死亡的, 认为死于并发症。各组因移植中移植后并发症死亡的受体大鼠不纳入统计。移植后第 4, 7 天, 每组处死 3 只动物, 取肝脏, 其余大鼠观察生存期, 7 d 内死亡大鼠仅记录生存期。

Banff 系统分级诊断标准评估排斥反应^[9-10]:

级别	标准
不明确(0级)	汇管区三体(肝动脉、门静脉和胆管)炎细胞浸润程度未达到急性排斥的诊断标准
轻度(1级)	排斥性炎细胞浸润少数汇管区的胆管和血管, 炎细胞数量较少, 仅局限在汇管区间隙中
中度(2级)	排斥性炎细胞浸及多数或全部汇管区的胆管和血管
重度(3级)	在中度的基础上, 炎细胞浸润汇管区周围, 伴有中~重度静脉炎并扩展到肝实质, 引起静脉周肝细胞坏死

取肝脏标本后, 中性多聚甲醛溶液固定,

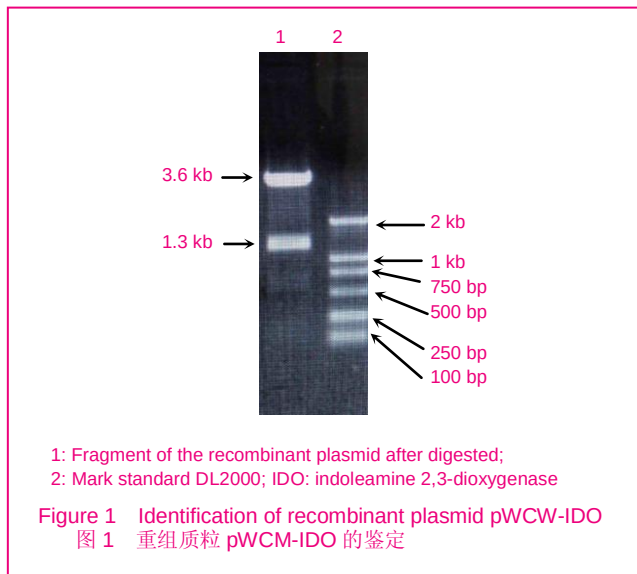
苏木精-伊红染色, 光镜下观察, 按Banff系统分级诊断标准评估排斥反应, 将排斥反应按以上标准分为4级。

主要观察指标: 移植后受体生存期, 病理观察移植物急性排斥反应, 免疫组织化学测定移植后第4, 7天移植肝IDO表达强度。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 11.0软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数间比较使用单因素方差分析LSD-*t* 检验; 计数资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

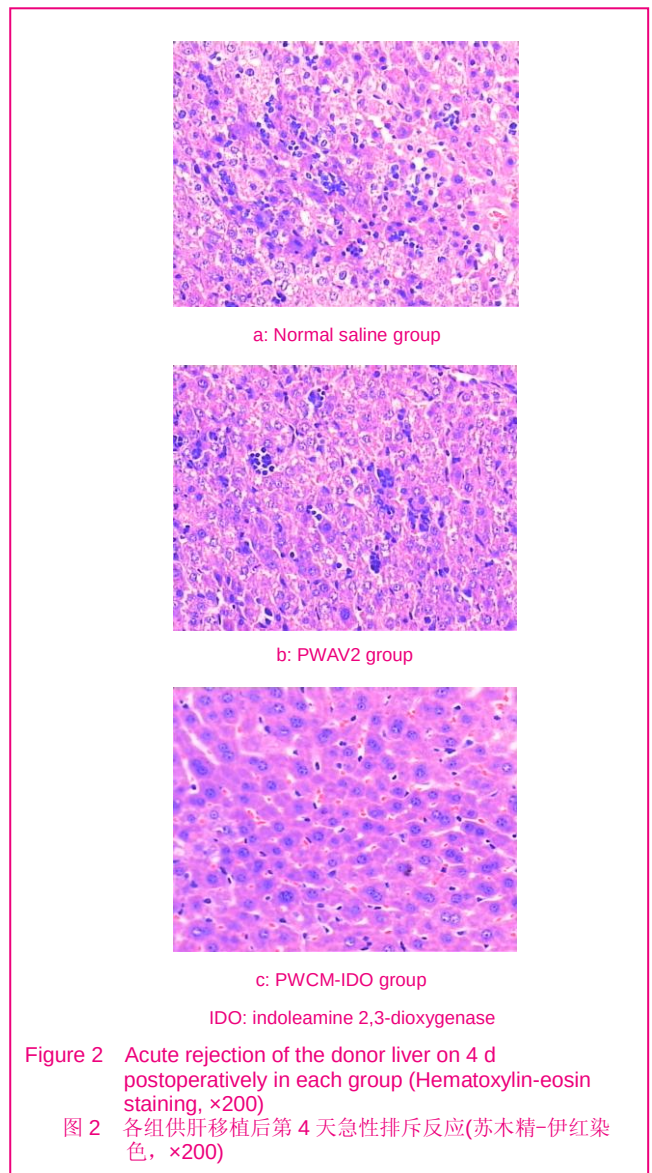
2.1 重组质粒 pWCM-IDO 的鉴定 重组质粒 pWCM-IDO 构建后经 *Bgl* II / *Kpn* I 双酶切鉴定切出 3.6 kb 与 1.3 kb 目的基因片段, 电泳结果与 IDO 基因大小相符, 测序结果与 pWAV2 载体多克隆位点和 IDO 序列进行同源比较后证明融合区域的读码框正确, 并有正确的方向, 表明重组质粒 pWCM-IDO 克隆正确, 见图1。



2.2 移植受体生存期 PWCM-IDO 组平均存活 (15.25 ± 4.33) d, 显著高于生理盐水组 (8.68 ± 1.53) d 及 PWAV2 组 (8.10 ± 2.35) d ($P < 0.05$)。

2.3 急性排斥反应评估 生理盐水组第4, 7天见免疫排斥反应明显, 中性粒细胞大量浸润, 未见肝脏细胞再生修复, Banff 分级2级, 见图2a; PWAV2 组第4, 7天中性粒细胞浸润明显, 肝脏出现大面积坏死, 毛细胆管上皮坏死明显, Banff 分级3级, 见图2b; PWCM-IDO 组第4天病理示汇管区三体(肝动脉、门静脉和胆管)炎细胞浸润程度未达到急性排斥的诊断标准, 可见毛细胆管上皮再生, Banff 分级0级, 第7天中性粒细胞大量浸润,

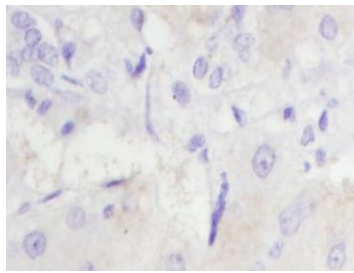
未见肝脏细胞再生修复, Banff 分级2级, 见图2c。



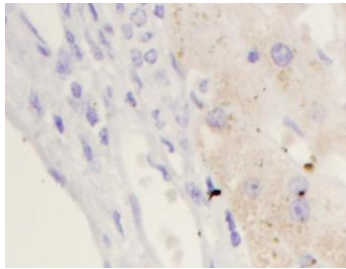
2.4 各组移植后4, 7 d 供肝 IDO 表达 移植后第4天 PWCM-IDO 组 IDO 表达明显高于生理盐水组和 PWAV2 组 ($P < 0.01$); 移植后第7天, PWCM-IDO 组 IDO 表达下降, 显著低于移植后第4天 ($P < 0.05$); 移植后第7天, PWCM-IDO 组与生理盐水组相比, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 略高于 PWAV2 组 ($P < 0.05$), 见表1, 图3。

表1 各组移植后4, 7 d 供肝 IDO 表达
Table 1 Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression of liver allografts on 4 and 7 d postoperatively in each group ($\bar{x} \pm s$)

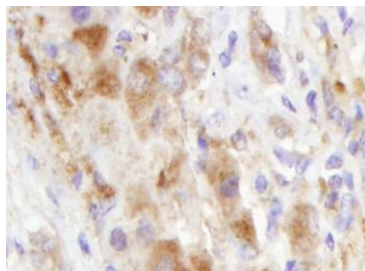
Group	4 d	7 d
Normal saline	1.38±0.49	1.46±0.51
PWAV2	1.46±0.67	1.38±0.49
PWCM-IDO	2.13±0.95	1.67±0.48
<i>F</i>	7.728	2.209
<i>P</i>	0.001	0.117



a: Normal saline group



b: PWAV2 group



c: PWCM-IDO group

Figure 3 Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression of liver allograft on 4 d postoperatively in each group (SP staining, $\times 200$)

图3 各组供肝移植后第4天 IDO 表达(SP 染色, $\times 200$)

3 讨论

联合重组质粒pWCM-IDO构建的rAAV可以使供肝表达IDO。IDO的活性表达导致细胞微环境中色氨酸的耗竭,从而使细胞处于一种“色氨酸饥饿”状态,处于迅速分裂期的细胞或病原微生物尤为敏感。在缺失色氨酸条件下活化的T细胞能够进入细胞周期,但细胞周期停滞G₁中期,且T细胞变得更易于凋亡而死亡,其中部分由Fas信号途径介导^[11-13]。经实验证实,IDO有效表达的供肝组织中急性排斥反应受到有效限制。同时,由于IDO活性导致的色氨酸代谢物诱导的细胞增殖抑制具有选择性,它仅发生于正经历活化的细胞,静息细胞不受影响,且纯化的IDO能抑制CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞以及NK细胞的增殖,但B细胞的增殖却不受其影响^[14-16]。这也保护

了受体的非特异性细胞免疫及体液免疫功能,为减少免疫抑制剂的不良反应提供了可能。

实验中,pWCM-IDO转染的供肝IDO的表达水平高于对照,但不能维持IDO长期有效的表达。因此,短期内在一定程度上缓解了排斥反应症状,延长了受体寿命,但长期来看仍不能避免急性排斥的发生。因此,仍需要更为特异性的定向转染以及改善给药方式及周期以期获得长期稳定的移植物IDO基因表达,以有效缓解肝移植后的急性排斥反应。

进一步研究中,课题组将利用肝细胞特异性表达白蛋白基因的特点^[17-20],将目的基因(IDO)置于白蛋白启动子的序列控制之下,再重组至病毒载体中,使目的基因(IDO)在白蛋白阳性的肝细胞中特异表达。白蛋白启动子可能在急性排斥反应期内更有效维持肝细胞IDO基因的表达。

将IDO导入肝细胞,使其在供肝局部表达IDO,选择性诱导T细胞耐受,这为移植免疫耐受的诱导提供一种新的途径,具有潜在的临床应用价值。

4 参考文献

- [1] Huang L, Baban B, Johnson BA 3rd, et al. Dendritic cells, indoleamine 2,3 dioxygenase and acquired immune privilege. *Int Rev Immunol*. 2010;29(2):133-155.
- [2] Li Y, Tredget EE, Ghaffari A, et al. Local expression of indoleamine 2,3-dioxygenase protects engraftment of xenogeneic skin substitute. *J Invest Dermatol*. 2006;126(1):128-136.
- [3] Fallarino F, Grohmann U. Using an ancient tool for igniting and propagating immune tolerance: IDO as an inducer and amplifier of regulatory T cell functions. *Curr Med Chem*. 2011;18(15):2215-2221.
- [4] Liu H, Liu L, Liu K, et al. Reduced cytotoxic function of effector CD8⁺ T cells is responsible for indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent immune suppression. *J Immunol*. 2009;183(2):1022-1031.
- [5] Sørensen RB, Hadrup SR, Svane IM, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase specific, cytotoxic T cells as immune regulators. *Blood*. 2011;117(7):2200-2210.
- [6] Liu H, Liu L, Fletcher BS, et al. Novel action of indoleamine 2,3-dioxygenase attenuating acute lung allograft injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(5):566-572.
- [7] Godin-Ethier J, Hanafi LA, Duvignaud JB, et al. IDO expression by human B lymphocytes in response to T lymphocyte stimuli and TLR engagement is biologically inactive. *Mol Immunol*. 2011;49(1-2):253-259.
- [8] Zhao XS, Liu KY, Liu DH, et al. Potential immunosuppressive function of plasma indoleamine 2,3-dioxygenase in patients with aGVHD after allo-HSCT. *Clin Transplant*. 2011;25(3):E304-E311.

- [9] No authors listed. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology*. 1997;25(3):658-663.
- [10] Akoglu B, Kriener S, Martens S, et al. Interleukin-2 in CD8+ T cells correlates with Banff score during organ rejection in liver transplant recipients. *Clin Exp Med*. 2009;9(4):259-262.
- [11] Vavrincova-Yaghi D, Deelman LE, Goor H, et al. Gene therapy with adenovirus-delivered indoleamine 2,3-dioxygenase improves renal function and morphology following allogeneic kidney transplantation in rat. *J Gene Med*. 2011;13(7-8):373-381.
- [12] Makala LH, Baban B, Lemos H, et al. Leishmania major attenuates host immunity by stimulating local indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *J Infect Dis*. 2011;203(5):715-725.
- [13] Xu T, Haering C, Lau CK, et al. Targeting of interleukin-10 is superior to cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 with human immunoglobulin G(1) for the prevention of chronic allograft deterioration in organ transplantation. *J Gene Med*. 2008;10(12):1315-1323.
- [14] Li J, Meinhardt A, Roehrich ME, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase gene transfer prolongs cardiac allograft survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(6):H3415-H3423.
- [15] Wang C, Tay SS, Tran GT, et al. Donor IL-4-treatment induces alternatively activated liver macrophages and IDO-expressing NK cells and promotes rat liver allograft acceptance. *Transpl Immunol*. 2010;22(3-4):172-178.
- [16] Lancellotti S, Novarese L, De Cristofaro R. Biochemical properties of indoleamine 2,3-dioxygenase: from structure to optimized design of inhibitors. *Curr Med Chem*. 2011;18(15):2205-2214.
- [17] Li ZH, Yan LN, Zhao YH, et al. Zhongguo Puwai Jichu yu Linchuang Zazhi. 2004;11(3):234-237.
李志辉,严律南,赵永恒,等.人肝癌特异性HSV-TK/GCV重组腺病毒相关病毒质粒的构建与研究[J].中国普外基础与临床杂志, 2004,11(3): 234-237.
- [18] Ohguchi S, Nakatsukasa H, Higashi T, et al. Expression of alpha-fetoprotein and albumin genes in human hepatocellular carcinomas: limitations in the application of the genes for targeting human hepatocellular carcinoma in gene therapy. *Hepatology*. 1998;27(2):599-607.
- [19] Borlak J, Dangers M, Thum T. Aroclor 1254 modulates gene expression of nuclear transcription factors: implications for albumin gene transcription and protein synthesis in rat hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;181(2):79-88.
- [20] Beck NB, Sidhu JS, Omiecinski CJ. Baculovirus vectors repress phenobarbital-mediated gene induction and stimulate cytokine expression in primary cultures of rat hepatocytes. *Gene Ther*. 2000;7(15):1274-1283.

来自本文课题的更多信息——

基金声明: 广东省医学科研基金项目(A2008373)。

作者贡献: 通讯作者进行实验设计, 实验实施为全部作者, 实验评估为通讯作者, 资料收集为全部作者, 第一作者成文, 通讯作者审校并对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

研究的创新之处与不足: 实验发现重组腺病毒质粒 pWCM-吡哆胺 2, 3-氧化酶转染的供肝吡哆胺 2, 3-二氧化酶的表达水平高于对照, 但不能维持吡哆胺 2, 3-二氧化酶长期有效的表达。因此, 短期内在一定程度上缓解了排斥反应症状, 延长了受体寿命, 但长期仍不能避免急性排斥的发生。因此, 仍需要更为特异性的定向转染以及改善给药方式及周期以期获得长期稳定的移植物吡哆胺 2, 3-二氧化酶基因表达。