

CTLA-4 Ig 与 ICAM-1 单抗联合 DCp 诱导同种移植耐受

丁国善*, 傅志仁, 王全兴, 张 明, 刘玉杉 (第二军医大学长征医院器官移植中心, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 利用细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 Ig 融合蛋白 (CTLA-4 Ig) 和细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) 单克隆抗体联合治疗经供者树突状细胞前体 (DCp) 免疫的移植受者诱导移植耐受。 **方法:** 实验分 4 组: 对照组、CTLA-4 Ig 组、ICAM-1 单抗组和联合组, 每组 8 只 BALB/c 受鼠。 每组均以 2×10^6 C57BL/6 供者 DCp 经尾静脉输注受鼠。 CTLA-4 Ig 组和 ICAM-1 单抗组分别自 DCp 输注之日起连续 2 周向受鼠腹腔内注射 CTLA-4 Ig 或 ICAM-1 单抗 (0.1 mg/d); 联合组以同样剂量两药注射 2 周; 对照组则仅输注 DCp。 DCp 输注 1 周后 4 组均行异位心脏移植并观察移植心存活时间, 进一步作皮肤移植确认耐受状态。 **结果:** 对照组、ICAM-1 单抗组和 CTLA-4 Ig 组的 C57BL/6 供心平均存活时间分别为 (20.13 ± 1.64) d、(45.00 ± 2.62) d 和 (90.00 ± 3.07) d, 联合组 8 例中除 1 例存活 98 d 外, 其他 7 例均超过 100 d。 前 3 组 C57BL/6 来源皮肤平均存活时间分别为 (4.25 ± 0.89) d、(9.00 ± 0.76) d 和 (44.50 ± 3.42) d, 联合组 8 例中 1 例存活 91 d, 3 例存活 95 d, 其他 4 例均超过 100 d。 **结论:** 在供者 DCp 输注受者后以 ICAM-1 单抗和 CTLA-4 Ig 联合处理受者能够诱导针对供者的耐受状态。

[关键词] 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 Ig 融合蛋白; 细胞间黏附分子 1; 抗体, 单克隆; 树突状细胞前体; 移植耐受

[中图分类号] R 392.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)08-0849-03

Combined treatment of allograft recipients with CTLA-4 Ig and anti-ICAM-1 mAb plus transfusion of donor-specific DC progenitors

DING Guo-Shan*, FU Zhi-Ren, WANG Quan-Xing, ZHANG Ming, LIU Yu-Shan (Organ Transplantation Center, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To induce donor-specific tolerance in allograft recipients by combined treatment with CTLA-4 Ig and anti-ICAM-1 mAb plus transfusion of donor-specific DC progenitors (DCp). **Methods:** Thirty-two BALB/c mice were divided into 4 groups: control, CTLA-4 Ig group, ICAM-1 mAb group, and combined treated group. Seven days before cardiac transplantations, donor-derived DCp were transfused to recipients with or without injections of anti-ICAM-1 mAb, CTLA-4 Ig, or both for the following 2 weeks. Thirty days after the cardiac transplant, a second grafting with skin obtained from donor or C3H third-party mice was performed. **Results:** The survival times of the cardiac allograft in control, ICAM-1 mAb and CTLA-4 Ig groups were (20.13 ± 1.64) d, (45.00 ± 2.62) d, and (90.00 ± 3.07) d, respectively. Combined treatment led to an indefinite survival of the cardiac allografts, with 7 of 8 mice survived for more than 100 d. The survival of the second skin allograft were (4.25 ± 0.89) d, (9.00 ± 0.76) d, and (44.50 ± 3.42) d in control, ICAM-1 mAb and CTLA-4 Ig groups, respectively, with 4 of 8 mice survived for more than 100 d in the combined treated group. **Conclusion:** CTLA-4 Ig and anti-ICAM-1 mAb synergistically augment the tolerance induction effect of GM-CSF-stimulated bone marrow-derived DCp.

[KEY WORDS] CTLA-4 Ig; ICAM-1 antibodies, monoclonal; dendritic cell progenitors; transplantation tolerance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(8): 849-851]

接受抗原提呈细胞提供的抗原信息后, T 细胞的活化需要共刺激信号的参与。树突状细胞 (dendritic cell, DC) 作为专职抗原提呈细胞, 除了启动免疫应答外, 在介导免疫耐受方面也起着重要作用。以粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 培养的小鼠骨髓细胞来源的 DC 前体 (DCp) 表面缺乏 B7 等共刺激分子表达, 能够在体外实验中诱导同种特异性的 T 细胞无能^[1], 这些细胞在术前 7 d 输注受者则能够把同种移植物的存活时间从 9.5 d 延长至 22 d^[2]。虽然未成熟的 DCp 能够延长移植物的存活时间, 却不能诱导移植耐受。根据上述研究, 本课题尝试在供者 DCp 免疫移植受者的同时, 利用细胞毒

性 T 淋巴细胞相关抗原 4 Ig 融合蛋白 (CTLA-4 Ig) 与细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) 单克隆抗体联合治疗受者, 以了解 DCp 输注入受者体内后, 阻断共刺激信号是否能够促进移植耐受的诱导。

1 材料和方法

1.1 材料 8~12 周雄性 C57BL/6 (H-2^b)、BALB/c (H-2^d) 和 C3H (H-2^k) 小鼠, 体质量 (20 ± 1.5) g, 购

[基金项目] 国家自然科学基金 (39870809)。

[作者简介] 丁国善 (1964-), 男 (汉族), 博士, 副教授、副主任医师, 硕士生导师。

* Corresponding author. E-mail: ading1964@126.com

自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。小鼠 FITC 标记的 Ia^d、CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2) 抗体及重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (mGM-CSF) 购自 R&D 公司。RPMI 1640 干粉及小牛血清购自 Gibco 公司。流式细胞仪 (FACScan) 购自 Becton Dickinson 公司。双人双目手术显微镜购自上海医疗光学仪器厂。显微手术器械购自上海手术器械厂。6-0、11-0 的医用无损伤缝线购自上海康捷医疗用品总厂。

1.2 DCp 的制备 参考 Inaba 的方法^[3]并稍作改进:取 C57BL/6 小鼠 (H-2^b) 股骨和胫骨,冲洗出骨髓细胞,Tris-NH₄Cl 去除红细胞,过尼龙毛柱去除组织碎屑,溶于完全培养基置于无菌培养皿中,在 37℃ 孵箱中培养 2 h,收集非黏附细胞,洗 2 次后,以 1×10⁶/孔加入 24 孔板培养,加 mGM-CSF 20 ng/ml,3 d 后,吸去培养基及悬浮细胞,重新加入新鲜培养基及 mGM-CSF,3 d 后,吸取疏松贴壁的增殖性细胞聚集体,置新培养瓶培养,过夜后收取悬浮细胞,即获得富集的 DCp。

1.3 CTLA-4 Ig 和 ICAM-1 单抗的制备和纯化 将 1×10⁶ 杂交瘤细胞接种于预先腹腔注射液体石蜡的 BALB/c 雌鼠腹腔,约 7~10 d 后产生腹水,每日抽取的腹水经 (NH₄)₂SO₄ 盐析和 DEAE 纤维素层析纯化。采用间接 ELISA 法检测单抗的效价。分装后冻存于 -20℃ 备用。

1.4 实验分组及受者处理 实验共分 4 组:对照组、CTLA-4 Ig 组、ICAM-1 单抗组和联合组,每组 8 只 BALB/c 受鼠。每组均以 2×10⁶ C57BL/6 供者 DCp 经尾静脉输注受鼠。CTLA-4 Ig 组和 ICAM-1 单抗组分别自 DCp 输注之日起连续 2 周向受鼠腹腔内注射 CTLA-4 Ig 或 ICAM-1 单抗 (0.1 mg/d); 联合组以同样剂量两药注射 2 周;对照组则仅输注 DCp。DC 输注 1 周后 4 组均行异位心脏移植。

1.5 小鼠异位心脏移植模型的建立 C57BL/6 (H-2^b)、BALB/c (H-2^d)、C3H (H-2^k) 小鼠分别作为供者、受者和第三方对照。参照文献报道^[4]的颈部套管法心脏移植模型,并作简要改进:整个操作在手术显微镜下进行,放大 10 倍。受鼠以苯巴比妥钠腹腔注射麻醉,开胸后经下腔静脉向心脏注入 50 U/ml 的 4C 肝素生理盐水 0.5 ml,立即将心脏连同双肺完整切下,置 4℃ 生理盐水中修整:切断左肺动脉装套管,游离主动脉至头臂干处切断。其余血管及双肺结扎切除。受鼠麻醉完成后切开右侧颈部皮肤,在血管夹阻断下切断右侧颈外静脉及颈总动脉,颈总动脉上套管,将供者的左肺动脉套管装入受鼠颈外

静脉,受鼠颈总动脉套管装入供者主动脉,分别结扎固定后开放血管夹。

1.6 皮肤移植 为检验移植耐受是否建立,心脏移植 30 d 后,无论移植物是否被排斥,均取 C57BL/6 供者和 C3H 第三方对照小鼠全厚皮片移植给 BALB/c 受鼠。手术方法^[5]:受鼠背部皮肤备皮、消毒后剪去 1.0 cm² 左右皮肤暴露肌层,取供者皮肤后去除皮下脂肪,覆盖于受鼠背部创面,不作缝合。凡士林纱布覆盖,绷带包扎。皮肤移植物表面出现坏死灶则认定为出现排斥。

1.7 统计学处理 采用方差分析检验各组均数间的差异。采用 SNK 检验进一步分析组间差异。

2 结果

2.1 心脏移植物的存活情况 利用异位心脏移植模型检验 CTLA-4 Ig 和抗 ICAM-1 单抗对移植物存活的影响。受者腹腔内注射 CTLA-4 Ig 和抗 ICAM-1 单抗显著地延长了心脏移植物的存活时间。对照组、ICAM-1 单抗组和 CTLA-4 Ig 组的移植物平均存活时间分别为 (20.13±1.64) d、(45.00±2.62) d 和 (90.00±3.07) d。CTLA-4 Ig 和 ICAM-1 单抗联合处理后移植物长期存活,8 例中除 1 例存活 98 d 外,其他 7 例均超过 100 d。方差分析显示 4 组间存活时间均数间差异有高度显著性 ($P<0.01$)。SNK 检验进一步分析显示两两比较均有显著差异 ($P<0.05$)。这一结果说明 CTLA-4 Ig 和 ICAM-1 单抗都具有抗排斥作用,两药联用有协同增强效果。

2.2 二次移植的存活时间 4 组所有受鼠均在 8 d 内排斥 C3H 皮肤移植物,而供者特异性的二次移植则出现了显著不同的结果。对照组、ICAM-1 单抗组和 CTLA-4 Ig 组的二次移植的 C57BL/6 来源皮肤平均存活时间分别为 (4.25±0.89) d、(9.00±0.76) d 和 (44.50±3.42) d。CTLA-4 Ig 和 ICAM-1 单抗联合处理组 8 例皮肤移植物中 1 例存活 91 d,3 例存活 95 d,其他 4 例均超过 100 d。方差分析显示 4 组间存活时间均数间差异有高度显著性 ($P<0.01$)。SNK 检验进一步分析显示两两比较均有显著差异 ($P<0.05$)。这一结果提示 CTLA-4 Ig 具有耐受诱导作用,ICAM-1 单抗本身不能诱导耐受,但能显著增强 CTLA-4 Ig 的耐受诱导效果。

3 讨论

阻断共刺激信号是诱导供者特异性耐受的一个有效途径。抗原递呈细胞表面的 B7 和 ICAM-1 与

T细胞表面的CD28和LFA-1是两个非常重要的共刺激分子对。CTLA-4表达在活化的T细胞上。与CD28相比,它与B7有着更高的亲和力,结合后会向活化的T细胞传递抑制信号,从而使T细胞的反应趋于缓和。CTLA-4 Ig是一个重组的可溶性融合蛋白,它包含了CTLA-4的细胞外部分以及免疫球蛋白的重链恒定区。CTLA-4 Ig与抗原提呈细胞表面的B7结合能够阻断B7/CD28信号通路,因而能够诱导T细胞的无能。CTLA-4 Ig已经在很多的移植模型中被证明能够诱导耐受,延长同种移植物的存活时间^[6]。但是在没有系统免疫抑制治疗的情况下把CTLA-4 Ig单独应用在临床器官移植中还不能完全避免排斥反应。我们的研究提示在与供者来源的DCp同时应用的情况下,CTLA-4 Ig能够显著地延长同种移植物的存活。由于皮肤移植实验中第三方对照小鼠的皮肤很快被排斥,CTLA-4 Ig的这种耐受诱导作用是供者特异性的。

值得一提的是,B7/CTLA-4的结合会对活化的T细胞产生强有力的抑制作用,例如对自体抗原的耐受就需要CTLA-4的参与。CTLA-4 Ig也会阻止B7/CTLA-4的结合从而增强T细胞反应。在CD28缺陷的小鼠,就有学者观察到CTLA-4 Ig能够加速同种心脏移植物的排斥^[7]。我们的研究结果也提示,虽然CTLA-4 Ig能够显著地延长移植物的存活时间,但是还不能诱导长期耐受。因此我们尝试在CTLA-4 Ig的基础上联合应用ICAM-1单抗。

ICAM-1/LFA-1是促进T细胞增殖的另一个重要的共刺激分子对。除了对炎症反应和免疫应答的促进作用以外,ICAM-1很早就被确认在再灌注损伤的发生机制中扮演着重要角色^[8],因此对移植效果有着很大的影响。ICAM-1单抗能够延长移植物的存活时间,降低移植后急性排斥的发生率,特别是与LFA-1单抗联用时效果尤为显著^[9]。本研究选择ICAM-1单抗与CTLA-4 Ig联用,更重要的原因是我们用来培养DCp的GM-CSF会促进DCp表面的ICAM-1表达^[10],当DCp注入受者后,高表达的ICAM-1会促进DCp与宿主细胞的相互接触,从而加速DCp的成熟及其表面B7-1和B7-2的表达。

ICAM-1单抗虽然能够延长同种心脏移植物的存活时间,但是二次移植后ICAM-1单抗组的C57BL/6皮肤平均存活期与C3H无关供者皮肤相似,说明ICAM-1单抗还不足以单独诱导供者特异性的免疫耐受。但是ICAM-1单抗与CTLA-4 Ig联合应用能够大大促进后者的耐受诱导作用,二次移

植的DCp同源皮肤存活期半数超过100d。原因除了ICAM-1单抗影响了DCp-T细胞的相互作用以外,还可能是由于ICAM-1/LFA-1分子对影响T细胞-B细胞相互作用以及免疫球蛋白的产生,从而降低了同种抗体的水平和慢性排斥的发生几率。

总之,在供者特异性的DCp输注受者后进一步以ICAM-1单抗和CTLA-4 Ig联合处理受者能够诱导同种心脏移植物的长期存活,二次移植证明这种方法能够帮助建立针对供者的耐受状态。

[参考文献]

- [1] Lu L, McCaslin D, Starzl TE, et al. Bone marrow derived dendritic cell progenitors (N1.EC-145⁺, class I⁺, B7-1^{dim}, B7-2⁻) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes[J]. *Transplantation*, 1995, 60(12):1539-1545.
- [2] Fu F, Li Y, Qian S, et al. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class I⁺, B7-1^{dim}, B7-2⁻) prolong cardiac allograft survival in non-immunosuppressed recipients[J]. *Transplantation*, 1996, 62(5):659-665.
- [3] Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with GM-CSF[J]. *J Exp Med*, 1992, 176(6):1693-1702.
- [4] Tomita Y, Zhang QW, Yoshikawa M, et al. Improved technique of heterotopic cervical heart transplantation in mice[J]. *Transplantation*, 1997, 64(11):1598-1601.
- [5] Markees TG, Phillips NE, Gordon EJ, et al. Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4⁺ T cells, interferon- γ , and CTLA4[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(11):2446-2455.
- [6] Eagar TN, Karandikar NJ, Bluestone JA, et al. The role of CTLA-4 in induction and maintenance of peripheral T cell tolerance[J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(4):972-981.
- [7] Lin H, Rathmell JC, Gray GS, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice; CTLA4 can function independently to CD28[J]. *J Exp Med*, 1998, 188(1):199-204.
- [8] Burne MJ, Elghandour A, Haq M, et al. IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1/VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury[J]. *J Leukoc Biol*, 2001, 70(2):192-198.
- [9] Mitsuaki I, Hideo Y, Okumura K, et al. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1[J]. *Science*, 1992, 255(5048):1125-1127.
- [10] Larsen CP, Ritchie SC, Hendrix R, et al. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecules (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells[J]. *J Immunol*, 1994, 152(11):5208-5219.

[收稿日期] 2003-12-29

[修回日期] 2004-04-25

[本文编辑] 李丹阳