

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01236

## CD28 超竞争单抗对大鼠原位气管移植术后早期免疫炎症性损伤的影响

牛永胜, 曹浩, 刘刚, 史乾, 范慧敏\*, 刘中民\*

同济大学附属东方医院心胸外科研究室, 上海 200120

**[摘要]** **目的:** 研究大鼠原位气管移植术后应用 CD28 超竞争单抗对在体扩增 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的效果及对移植气管早期免疫排斥炎症性反应的影响。**方法:** 采用大鼠同种异体原位气管移植模型, 分 2 组。治疗组受体移植当天经腹腔注射 CD28 超竞争单抗 JJ316 (0.5 mg); 对照组注射同型抗体 mIgG (0.5 mg)。于术后第 5 天采用流式细胞仪检测颈部引流淋巴结、脾及外周血单个核细胞中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T 细胞的比率; 移植气管进行病理形态学检查。**结果:** CD28 超竞争单抗治疗组较同型抗体 mIgG 对照组气管闭塞程度、炎症反应细胞浸润及呼吸道上皮损伤情况明显减轻; 外周血、脾脏及颈部淋巴结中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T 细胞的比率 [(16.9±4.2)%、(14.8±3.6)%、(5.8±1.2)%] 高于同型抗体 mIgG 对照组 [(2.8±1.4)%、(3.3±1.3)%、(2.9±0.9)%],  $P < 0.05$ 。**结论:** 大鼠原位气管移植后在体应用 CD28 超竞争单抗可减轻术后早期的免疫排斥损伤。

**[关键词]** 气管移植; 移植耐受; 调节性 T 淋巴细胞; CD28 抗原

**[中图分类号]** R 653.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)11-1236-04

### Effects of CD28 superagonist antibody on immune inflammatory reaction early after orthotopic tracheal transplantation in rats

NIU Yong-sheng, CAO Hao, LIU Gang, SHI Qian, FAN Hui-min\*, LIU Zhong-min\*

Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the effects of superagonistic CD28-specific monoclonal antibody JJ316 (supCD28 MAb) on *in vivo* proliferation of rat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> (T<sub>reg</sub>) cells and on allograft rejection reaction in a rat orthotopic tracheal transplantation model. **Methods:** Rat orthotopic tracheal transplantation models were divided into two groups in the present study. The experimental group was treated with supCD28 MAb (0.5 mg/rat) *via* intraperitoneal injection on the day of transplantation. Control group was injected with mIgG (0.5 mg/rat). The proportions of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T cell population in cervical lymph nodes, spleen and peripheral blood monocytes were examined by flow cytometry 5 days after operation. The tracheas were also harvested for histological evaluation. **Results:** The allografts of the experimental group showed greatly improved airway obliteration, infiltration of inflammatory cells, and respiratory epithelial injury compared with those of the control group. Furthermore, The experimental group had significantly increased CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> cell population in the lymph nodes, spleen and peripheral blood monocytes compared with those in the supCD28 MAb group [(5.8±1.2)% *vs* [(16.9±4.2)%], [(14.8±3.6)%], and [(2.9±0.9)%], [(3.3±1.3)%] *vs* [(2.8±1.4)%], respectively,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** SupCD28 MAb can attenuate airway inflammation injury after orthotopic tracheal transplantation.

**[KEY WORDS]** tracheal transplantation; transplantation tolerance; regulatory T-lymphocytes; CD28 antigens

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(11):1236-1239]

肺移植后闭塞性细支气管炎 (obliterative bronchiolitis, OB) 在啮齿类动物模型上表现为闭塞性气管病, 是困扰肺移植长期存活的最主要障碍<sup>[1]</sup>。急性期免疫炎症性反应与 OB 有密切关系, 是 OB 发展中最重要的风险因素之一<sup>[2]</sup>。近年来研究确认 CD4<sup>+</sup>

CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞 (regulatory T cell, T<sub>reg</sub>) 亚群在免疫移植耐受中起重要作用<sup>[3]</sup>。

本实验拟采用大鼠原位气管移植复制闭塞性细支气管炎动物模型, 在体观察 CD28 超竞争单抗对扩增 T<sub>reg</sub> 的效果及对移植气管早期免疫排斥炎症反

**[收稿日期]** 2009-03-04 **[接受日期]** 2009-09-24

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (30772150, 30872557). Supported by National Natural Science Foundation of China (30772150, 30872557).

**[作者简介]** 牛永胜, 博士生, 主治医师. E-mail: sheng99@msn.com

\* 通讯作者 (Corresponding authors). Tel: 021-38804518-8319, E-mail: frankfan64@hotmail.com; Tel: 021-58761951, E-mail: zhongmin\_liu@sina.com

应的治疗作用。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 无特殊病原菌级近交系雄性 Brown Norway 大鼠 6 只, Lewis 大鼠 10 只, 体质量 180~220 g (北京维通利华实验动物技术有限公司提供)。

1.2 主要试剂及设备 RPMI 1640 购自 Gibco 公司, Histopaque-1083 购自 Sigma-Aldrich 公司, 抗大鼠 CD4<sup>-</sup> APC, 抗大鼠 CD3 Biotin, 抗大鼠 CD8 PerCP, 抗大鼠 CD25 FITC, 抗大鼠 CD28 超竞争单抗 Clone JJ316, CD28 同型抗体 IgG BDI041 购自 BD 公司, 抗大鼠 FoxP3 PE-Cy7 购自 eBioscience 公司。流式细胞仪为 BD 公司 FACScalibur(E2943)。

1.3 模型建立及动物分组 按文献<sup>[4-5]</sup>方法建立气管原位移植闭塞性细支气管炎模型, 即供体麻醉后正中颈部切口, 取约 10 个气管环长度, 分为 2 段, 各供 1 个受体应用。受体采用正中颈部切口, 切断甲状软骨下第 3 气管环, 保留自主呼吸下切去 2 个气管环, 采用端端吻合技术植入供体 5 个气管环。共分 2 组: CD28 超竞争单抗治疗组和同型抗体 mIgG 对照组。各随机采用 3 只 Brown Norway 大鼠为供体, 5 只 Lewis 大鼠为受体建立同种异体气管颈部原位移植 OB 模型。治疗组受体移植当天经腹腔注射 CD28 超竞争单抗 JJ316 (0.5 mg); 对照组注射同型抗体 mIgG (0.5 mg)。于术后第 5 天取标本观察。

1.4 检测指标 (1) 移植后大鼠生存状况及存活率, 包括精神状态、进食水量、活动情况及对外界刺激反应等。(2) 受体于术后第 5 天取颈部淋巴结、脾脏及外周血分离单个核细胞, 取 60 μl/1×10<sup>7</sup> 细胞分别用抗大鼠 CD4<sup>-</sup> APC, 抗大鼠 CD3 Biotin, 抗大鼠 CD8 PerCP, 抗大鼠 CD25 FITC 在 4℃、避光标记 20 min, 使用 eBioscience 固定/破膜液固定破膜 1.5 h 后用抗大鼠 FoxP3-PE-Cy7 标记 30 min, 用含 10% 胎牛血清的 PBS 洗涤 2 遍, 采用多通道流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T 细胞表达比率。(3) 取移植气管放入 10% 的中性甲醛内固定, 常规 H-E 染色病理形态学检查并计算管腔闭塞情况。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件, 利用 *t* 检验进行组间比较, *P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组总体效果评价 移植术后 5 d 观察期内 mIgG 对照组、CD28 超抗体治疗组动物于标本采集

阶段均存活, 无脱失, 术后精神状态、进食水量、活动情况及对外界刺激反应等均无特殊异常, 未见感染。

2.2 术后第 5 天颈部淋巴结、脾脏及外周血单个核细胞中 T<sub>reg</sub> 的比率 CD28 超竞争单抗治疗组大鼠的颈部淋巴结、外周血及脾脏单个核细胞中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T 细胞的比率 [(5.8±1.2)%、(16.9±4.2)%、(14.8±3.6)%] 均高于 mIgG 对照组 [(2.9±0.9)%、(2.8±1.4)%、(3.3±1.3)%], *P*<0.05。图 1 为各组代表性的流式细胞仪检查结果。

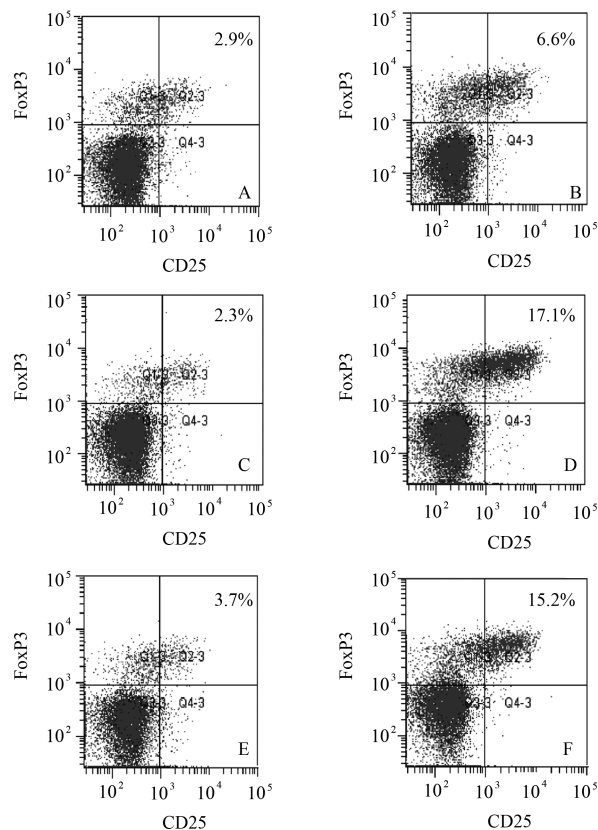


图 1 各组移植后 5 d 代表性的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> 流式细胞仪检查结果

Fig 1 Result of representative flow cytometric analysis of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> on day 5 after transplantation

A, C, E: mIgG; B, D, F: SupCD28; A, B: LN; C, D: PBL; E, F: Spleen

2.3 术后第 5 天病理组织学检查 2 组移植气管均出现明显的管壁水肿、增厚, 不同程度管腔闭塞, 气管黏膜上皮破坏, 伴随大量淋巴细胞浸润和溃疡形成, 提示存在急性免疫炎性排斥反应, 但 CD28 超竞争单抗治疗组较 mIgG 对照组中淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞及中性粒细胞等炎症反应细胞浸润及呼吸道上皮损伤情况有所改善, 管腔闭塞程度较轻 (24.8±3.3)%, 与 mIgG 对照组 (39.6±5.2)% 相比差异有统计学意义 (*P*<0.05)。见图 2。

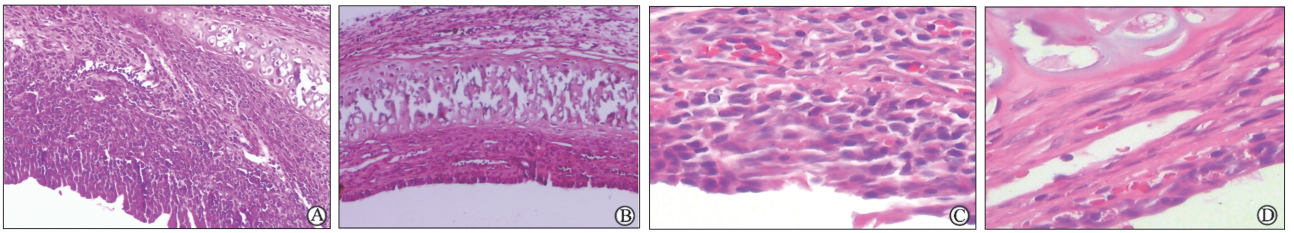


图2 各组移植后5d移植气管病理结果

Fig 2 Representative histological photomicrographs of transplanted tracheas in 2 groups on day 5 after transplantation

A, C; mIgG; B, D; SupCD28. Original magnification;  $\times 100$  (A, B);  $\times 400$  (C, D)

### 3 讨论

肺移植已经成为终末期肺疾病的唯一有效的治疗方法,是一项对未来基础和临床科学研究具有挑战性而且重要的领域。近20年来,外科手术和免疫抑制剂的改善明显提高了肺以及心肺联合移植患者术后的生存率;近年来对BOS的致病因素及发病机制等方面的研究,也取得了突破性进展,为BOS的防治策略提供了更多探索性的药物治疗和外科手术方案,但BOS的预防和治疗仍不理想,OB仍然是肺移植后长期存活的最主要并发症<sup>[1]</sup>。靶向活化和扩增 $T_{reg}$ 细胞,从而诱导移植免疫耐受正成为一条新的治疗途径<sup>[3]</sup>。

尽管OB多在肺移植及心肺联合移植患者术后16~20个月发生,但OB与急性期免疫炎症反应有密切关系,急性排斥诱导直接针对气道上皮细胞和内皮细胞的免疫损伤,是OB发生、发展中最重要的风险因素之一<sup>[2]</sup>。因此我们采用术后第5d初步观察了CD28超竞争单抗对OB早期急性免疫炎症反应的治疗效果。

OB一旦发生,对加强免疫抑制和抗炎治疗效果均不佳,而且过度的免疫抑制药物增加了感染的风险。 $T_{reg}$ 主要通过抑制 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞的IL-2转录与表达,从而干扰其活化与增殖而发挥确切的免疫负调节作用,在防治器官特异性自身免疫性疾病及诱导移植耐受方面发挥关键作用<sup>[3]</sup>。临床研究也表明移植后长期稳定耐受者体内 $CD4^+CD25^+T_{reg}$ 明显多于OB患者<sup>[6]</sup>。通过体外扩增 $T_{reg}$ ,继而静脉回输或过继转移,已成为免疫干预的重要策略<sup>[7-8]</sup>。但目前体外扩增 $T_{reg}$ 技术复杂,设备要求高,价格昂贵,且经反复扩增传代的 $T_{reg}$ 有可能丧失其免疫抑制功能。因此,有必要探索高效、选择性扩增 $T_{reg}$ 的新技术。

最近有报道应用CD28超竞争单抗治疗肾脏移植术后排斥反应,结果表明在体扩增的 $CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞能够诱导针对供者的特异性耐受<sup>[9]</sup>。本实验首次在同种异体大鼠原位气管移植模型上评价了CD28超竞争单抗在体应用对移植气管早期免疫排斥反应的影响。结果表明CD28超抗体移植术后第5天脾脏及外周血单个核细胞中 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T细胞的比率分别增加到14.8%和16.9%,均显著高于同型抗体mIgG对照组,说明CD28超抗体在该移植模型中具有激活和扩增 $T_{reg}$ 功能;H-E染色病理组织学检查结果表明,CD28超竞争单抗对早期气道炎症有一定改善作用。主要在于淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞及中性粒细胞等浸润减少,相应减轻了移植气管的管壁水肿、炎症细胞浸润、管腔部分闭塞及气管黏膜上皮破坏等急性免疫排斥损伤表现。另外,更具有重要意义的是移植侧区域引流淋巴结是 $T_{reg}$ 发挥免疫抑制作用的主要部位。因此,我们采用颈部淋巴结流式检查作为移植侧局部微环境中 $T_{reg}$ 浸润情况的评价指标。结果表明CD28超竞争单抗治疗组术后第5天移植气管局部淋巴结中 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T细胞的比率也明显增加,显著高于同型抗体mIgG对照组,可能部分说明应用CD28超竞争单抗扩增 $T_{reg}$ 细胞与气管移植术后早期的损伤改善有关。

CD28超竞争单抗在体内可选择性活化和扩增 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ 调节性T细胞的机制尚未完全阐明,可能的机制是:(1) $T_{reg}$ 的T细胞受体可优势识别自身抗原,故在胸腺内和外周淋巴组织内, $T_{reg}$ 的T细胞受体均可与抗原递呈细胞表面自身抗原肽-MHC II类分子复合物结合并提供第一信号,从而为CD28超竞争单抗启动第二信号(尤以CD28-B7信号通路最为重要)奠定了基础<sup>[10]</sup>;(2)体内 $T_{reg}$ 易发生凋亡,CD28超竞争单抗所激发的信号

具有抗凋亡特性,从而特别有利于  $T_{reg}$  存活<sup>[11]</sup>。

综上所述,我们证实了大鼠原位气管移植后在体应用 CD28 超竞争单抗可以靶向扩增  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  调节性 T 细胞,减轻早期免疫炎症性损伤,为诱导移植耐受提供了一条新途径。但对 CD28 超竞争单抗扩增的  $T_{reg}$  的免疫学特性及其诱导免疫耐受的机制仍未完全明了,其对 OB 的长期疗效也需要进一步深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Burton C M, Carlsen J, Mortensen J, Andersen C B, Milman N, Iversen M. Long-term survival after lung transplantation depends on development and severity of bronchiolitis obliterans syndrome[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2007, 26: 681-686.
- [2] Burton C M, Iversen M, Scheike T, Carlsen J, Andersen C B. Minimal acute cellular rejection remains prevalent up to 2 years after lung transplantation: a retrospective analysis of 2697 transbronchial biopsies[J]. *Transplantation*, 2008, 85: 547-553.
- [3] Zhang Y, Liu C, Yang X M, Yi L. Role and mechanisms of  $CD4^+CD25^+$  regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance[J]. *Transplant Immunology*, 2007, 17: 120-129.
- [4] Schrepfer S, Deuse T, Hoyt G, Sheikh A Y, Hoffmann J, Reichenspurner H, et al. Experimental orthotopic tracheal transplantation: the Stanford technique [J]. *Microsurgery*, 2007, 27: 187-189.
- [5] 牛永胜, 范慧敏, 韩俊毅, 刘刚, 刘中民. 大鼠肺移植后闭塞性细支气管炎模型的改进[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26: 395.
- [6] Meloni F, Vitulo P, Bianco A M, Paschetto E, Morosini M, Cascina A, et al. Regulatory  $CD4^+CD25^+$  regulatory T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome[J]. *Transplantation*, 2004, 77: 762-766.
- [7] Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin M I, Mottet C, Lechler R I. *In vitro*-expanded donor alloantigen-specific  $CD4^+CD25^+$  regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance[J]. *Blood*, 2007, 109: 827-835.
- [8] Xia G, He J, Zhang Z, Leventhal J R. Targeting acute allograft rejection by immunotherapy With *ex vivo*-expanded natural  $CD4^+CD25^+$  regulatory T cells[J]. *Transplantation*, 2006, 82: 1749-1755.
- [9] Azuma H, Isaka Y, Li X, Hünig T, Sakamoto T, Nohmi H, et al. Superagonistic CD28 antibody induces donor-specific tolerance in rat renal allografts[J]. *Am J Transplant*, 2008, 8: 2004-2014.
- [10] Hsieh C S, Liang Y, Tyznik A J, Self S G, Liggitt D, Rudensky A Y. Recognition of the peripheral self by naturally arising  $CD25^+CD4^+$  T cell receptors[J]. *Immunity*, 2004, 21: 267-277.
- [11] Kerstan A, Hunig T. Cutting edge: distinct TCR- and CD28-derived signals regulate CD95L, Bcl-x<sub>L</sub>, and the survival of primary T cells[J]. *J Immunol*, 2004, 172: 1341-1345.

[本文编辑] 尹茶

#### • 书 讯 •

### 《外科学及战创伤外科学》已出版

本书由王来根、徐志飞、景在平主编, ISBN: 978-7-81060-919-7, 16 开本, 定价: 162.00 元。

本书为“十一五”国家教育部规划教材, 内容丰富, 外科总论包括手术基础、新知识、新技术、新进展, 各论包括外科疾病和创伤的病因、病生、发病机制、临床表现、辅助检查、诊断与鉴别诊断、治疗预防及预后等内容, 侧重军事医学, 如战伤的急救、基本技术及新进展。

本书由第二军医大学出版社发行科发行, 全国各大书店均有销售。

通讯地址: 上海市翔殷路 800 号, 邮编: 200433

邮购电话: 021-65344595, 65493093

<http://www.smmup.com>