

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00595

重组 Galectin-9 腺病毒对心脏移植小鼠 Treg 细胞分化和增殖的影响

阳揭宇, 郭闻渊, 肖亮, 傅宏, 施晓敏, 刘芳, 丁国善*, 傅志仁

第二军医大学长征医院器官移植科, 上海 200003

[摘要] **目的** 观察重组 Galectin-9 腺病毒对小鼠心脏移植生存期及调节性 T(Treg) 细胞分化和增殖的影响。**方法** 建立小鼠心脏移植模型, 随机均分为 3 组($n=10$): 对照组(术后用 0.9% NaCl 溶液)、空腺病毒组、重组 Galectin-9 腺病毒组, 记录心脏移植生存时间, 于移植心停搏或术后 14 d 取脾, 分离单个核细胞, 流式细胞仪检测 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞比例。ELISA 法检测外周血 IL-10、TGF- β_1 浓度。**结果** 与对照组、空腺病毒组相比, 重组 Galectin-9 腺病毒组心脏移植生存时间明显升高($P<0.01$), 重组 Galectin-9 腺病毒组 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞比例明显升高($P<0.01$)。重组 Galectin-9 腺病毒组 IL-10、TGF- β_1 的含量明显高于对照组及空腺病毒组($P<0.01$)。**结论** 重组 Galectin-9 腺病毒能促进体内 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞的分化与增殖, 明显提高小鼠心脏移植物的生存时间。

[关键词] Galectin-9; 调节性 T 淋巴细胞; 心脏移植; 细胞分化; 细胞增殖

[中图分类号] R 392.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)06-0595-04

Influence of adenovirus carrying Galectin-9 gene on differentiation and proliferation of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells in mice with heart transplantation

YANG Jie-yu, GUO Wen-yuan, XIAO Liang, FU Hong, SHI Xiao-min, LIU Fang, DING Guo-shan*, FU Zhi-ren

Department of Organ Transplantation, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To explore the influence of adenovirus carrying Galectin-9 gene on the survival of cardiac transplant and the differentiation and proliferation of $CD4^+CD25^+$ Treg cells in mice receiving heterotopic heart transplantation. **Methods** Neck heterotopic heart transplantation models were established with male BALB/c \rightarrow C57BL/6 mice by Cuff method, and they were randomly divided into 3 groups ($n=10$): control group (received 0.9% sodium chloride solution after operation), adenovirus group, and pAdeasyTM Galectin-9 treatment group. The survival time of the graft hearts was recorded. The spleens of mice were collected when the graft hearts stopped beating or 14 days after operation; the mononuclear cells were isolated and the proportion of $CD4^+CD25^+$ Treg cells was determined by flow cytometry. Treg cell related cytokines (IL-10, TGF- β_1) in the peripheral blood were assayed by ELISA. **Results** The cardiac allografts in pAdeasyTM Galectin-9 group survived significantly longer than those in the other two groups ($P<0.01$), and the proportion of $CD4^+CD25^+$ Treg cells in $CD4^+$ T cells was significantly higher ($P<0.01$). The levels of IL-10 and TGF- β_1 were increased in pAdeasyTM Galectin-9 group compared with control group and adenovirus group ($P<0.01$). **Conclusion** pAdeasyTM Galectin-9 can promote the proliferation and differentiation of $CD4^+CD25^+$ Treg cells *in vivo*, and can greatly improve the survival time of cardiac allograft after heart transplantation in mice.

[Key words] Galectin-9; regulatory T-lymphocytes; heart transplantation; cell differentiation; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(6): 595-598]

Galectin-9 属于半乳糖结合蛋白家族, 能与细胞表面和细胞间质中的半乳糖特异性结合^[1], 发挥细胞间及细胞与间质间的信号传递作用。它广泛分布于人体, 参与细胞黏附、增殖、凋亡、细胞周期调节等多种生理过程^[2-5]。Galectin-9 是 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 3 (T cell immunoglobulin mucin 3, TIM-3)

的配体, 后者特异性表达于分化成熟 Th1 细胞, 是调节 Th1 细胞免疫作用的重要因子; 与 Galectin-9 结合后可诱导 Th1 细胞的凋亡^[6], 显著抑制同种异体移植排斥反应, 延长同种异体皮肤移植物的生存期^[7]。同时, 研究显示 Galectin-9 基因缺失小鼠与野生型小鼠相比较 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T(Treg) 细胞

[收稿日期] 2010-01-06 **[接受日期]** 2010-03-23

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30772056)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30772056)。

[作者简介] 阳揭宇, 博士生。E-mail: yjysmmu@163.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81873305, E-mail: dingguoshanmail@163.com

在免疫后未见明显增加^[8],提示 Galectin-9 在 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的分化和增殖过程中可能起重要作用。本研究观察重组 Galectin-9 腺病毒对小鼠心脏移植物生存及体内 Treg 细胞分化与增殖的影响,探讨其诱导免疫耐受的可能机制,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 重组 Galectin-9 腺病毒(adenovirus vector Galectin-9,10×10¹⁰ pfu/ml);IL-10、TGF-β₁ 试剂盒(eBioscience);双人双目手术显微镜(上海医疗器械五厂);医用无损伤缝线(上海康捷医疗用品总厂);26-Gauge (外径为 0.4 mm)、22-Gauge (外径为 0.8 mm)的 Teflon 硅胶管。Cuffs 长度为 1~2 mm,用 26-Gauge(外径为 0.6 mm,内径为 0.4 mm)制作颈内动脉 Cuffs,22-Gauge(外径为 0.8 mm)制作左肺动脉的 Cuffs;显微手术器械(上海手术器械厂);Sigma 低温高速台式离心机(德国 B. Braun BiotechInternational 公司);流式细胞仪(EPICS X 型,美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 实验动物及分组 8~12 周龄雄性 C57BL/6 (H-2K^b)与 BALB/c(H-2K^d)小鼠各 30 只,体质量 20~25 g,购自第二军医大学实验动物中心。以 BALB/c、C57BL/6 小鼠为供、受体,供体术前 4 h、受体术前 12 h 禁食,均自由饮水。将供体用 Cuff 法^[9]装于受体小鼠颈部,以移植心恢复窦性心律为移植成功标志。具体分组如下(每组 10 只):对照组,术后尾静脉注射生理盐水 0.2 ml/d (1~14 d);空腺病毒组,术后尾静脉注射空病毒 0.2 ml/d (1~14 d);重组 Galectin-9 腺病毒组,术后尾静脉注射 0.2 ml/d (1~14 d)。术后每天检查移植心搏动情况,在移植心停搏或饲养 14 d 时即取眼球外周血,处死小鼠取脾细胞。

1.3 脾脏单个核细胞悬液的制备 断颈处死 C57BL/6 小鼠,取脾脏,加入 PBS,置于无菌碾磨钢网上,反复碾磨,过滤 2 次,1 000 r/min(*r*=5 cm)离心 10 min,弃上清,加入 Tris-NH₄Cl 缓冲液破红细胞,静置 3 min,1 100 r/min(*r*=5 cm)离心 5 min, PBS 缓冲液重悬,1 100 r/min(*r*=5 cm)离心 5 min,弃上清,调整细胞密度为 10⁷/ml。

1.4 流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞 取脾脏单个核细胞悬液,加入抗 CD4-FITC 抗体、抗 CD25-PE 抗体 2 μl,4℃ 孵育 30 min,1 200 r/min

(*r*=5 cm)离心 10 min,弃上清,重复洗涤 1 次,上流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁺Treg 比例。

1.5 ELISA 检测外周血 IL-10、TGF-β₁ 采用双抗体夹心 ELISA 法检测外周血 IL-10、TGF-β₁水平,试剂盒购自上海西唐生物技术有限公司,按说明书操作。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,术后生存分析用 Kaplan-Meier 法,组间均数比较用单因素方差分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 心脏移植物生存时间分析 结果(图 1)表明:对照组及空病毒组小鼠术后存活时间均未超过 2 周,组间无统计学差异;重组 Galectin-9 腺病毒组术后 7 只小鼠存活超过 2 周,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。

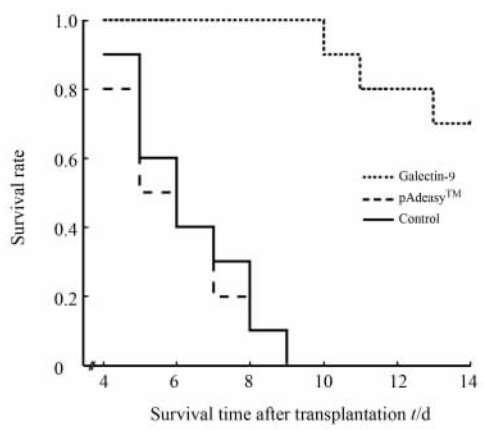
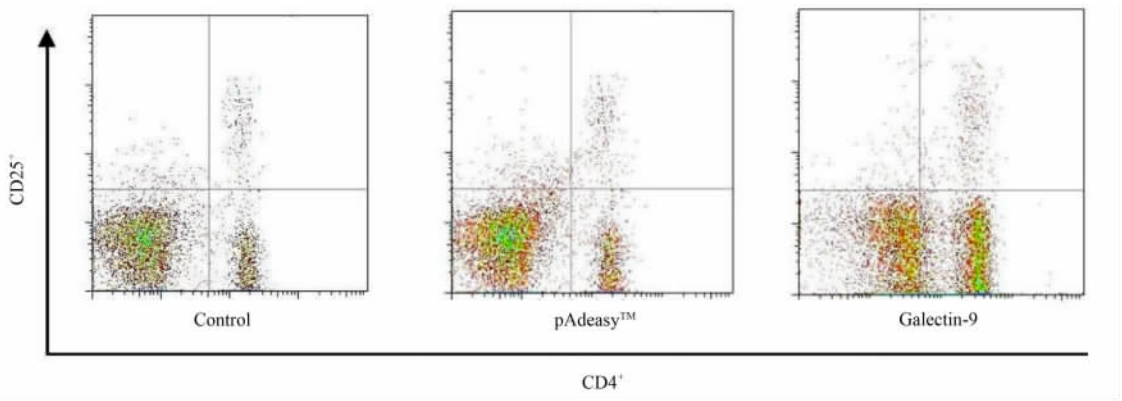


图 1 术后各组小鼠移植心存活率 Kaplan-Meier 曲线图

Fig 1 Survival rate of mouse cardiac allograft after operation in each group

2.2 外周血及流式细胞术检测结果 结果(图 2,表 1)表明:重组 Galectin-9 腺病毒组脾脏中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞比例为(10.92±1.31)%,与对照组(7.24±1.24)%及空病毒组(7.21±0.73)%相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结果提示重组腺病毒 Galectin-9 在小鼠体内对 CD4⁺CD25⁺Treg 亚群有促增殖和分化效应,而空腺病毒对 CD4⁺CD25⁺Treg 亚群的增殖和分化作用不明显。重组 Galectin-9 腺病毒组外周血中的 IL-10、TGF-β₁水平明显高于对照组及空腺病毒组($P < 0.01$)。

图 2 各组小鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞群的分布Fig 2 Distribution of CD4⁺CD25⁺Treg cells in the spleens of mice in each group表 1 各组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞增殖情况及外周血 IL-10、TGF-β₁ 表达水平Tab 1 Proportion of CD4⁺CD25⁺Treg cells and IL-10, TGF-β₁ levels in peripheral blood in each group(n=10, $\bar{x} \pm s$)

Group	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg (%)	IL-10 $\rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$	TGF-β ₁ $\rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$
Control	7.24 ± 1.24	52.68 ± 6.15	1 171.91 ± 61.78
pAdeasy™	7.21 ± 0.73	52.07 ± 5.94	1 161.71 ± 79.25
Galectin-9	10.92 ± 1.31 * * △△	156.63 ± 8.40 * * △△	2 002.76 ± 105.39 * * △△

* * P < 0.01 vs control group; △△ P < 0.01 vs pAdeasy™ group

3 讨论

Galectin-9 是半乳糖结合蛋白家族的成员之一, Galectin-9 结构上具有两个羧基结合区域, 相对分子质量为 36 000, 中间由连接肽连接, 具有比较明确的激活嗜红细胞、分化单核细胞的作用。人类 Galectin-9 是从 Hodgkin 病患者组织克隆出来的^[10], 进一步研究发现它广泛分布于人体^[11]。在获得性免疫反应中, 它可以表达在 T 细胞浸润组织的不同细胞上, 包括内皮细胞、成纤维细胞、肺上皮细胞、心肌细胞^[11]。这提示 Galectin-9 在调控适应性和先天性免疫反应中起重要作用。Galectin-9 最初归于嗜曙红化学引诱物, 诱导超氧化物产生, 延长细胞生存^[1], 且有其他生物活性, 如参与细胞黏附、增殖、凋亡、调节细胞周期等。有研究表明 Galectin-9 在数种肿瘤(如乳腺癌、鳞状细胞癌^[5, 12])中有抗转移潜力, 还可诱导树突状细胞成熟^[3]。

同种异体移植的排斥反应由 T 细胞通过特异的 T 细胞受体(TCR)识别移植物的非己组织相容性抗原所启动, 导致对移植物的排斥和破坏^[13]。目前预防和治疗排斥反应可应用免疫抑制药物。但实现对移植物免疫耐受可减少免疫抑制药的使用及减

轻患者经济负担。机体依靠中枢和外周两种调控机制建立自身的免疫耐受; 中枢耐受主要在胸腺通过凋亡清除自身反应性的 T 细胞; 外周耐受包括 T 细胞凋亡、免疫无能、效应 T 细胞分化和调节性 T 细胞形成。Sakaguchi 等^[14]于 1995 年识别出了 1 个小鼠的 CD4 T 细胞亚群, 发现该细胞亚群可以表达白细胞介素-2(IL-2)受体 α 链(CD25), 该细胞群约占辅助 T 细胞的 5%~10%。这些 CD4⁺CD25⁺T 细胞在体内和体外动物实验中均显示出了调节功能。Sakaguchi 等^[14]还证明了 CD4⁺CD25⁺T 细胞通过下调针对外来抗原或自身抗原的免疫应答水平来维持自身耐受, 且这一过程都是非抗原特异性的。他们将这一 CD4⁺CD25⁺T 细胞命名为 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)。CD4⁺CD25⁺T 细胞是由胸腺 T 细胞发育而来, 在人的 CD4 T 细胞中占 2%~3%。将无 CD4⁺CD25⁺T 细胞的小鼠 T 细胞转移至裸鼠中导致了自身免疫病, 而注射 CD4⁺CD25⁺T 细胞可预防此类疾病的发生。正常小鼠脾 CD4⁺T 细胞去除 CD25⁺细胞后转移给同基因型 T 细胞缺陷小鼠, 这些小鼠发生了各种器官特异性自身免疫病和系统性消耗疾病, 通过注射 CD4⁺CD25⁺T 细胞可以治疗自身免疫病, 表明

Treg 细胞具有抑制自身免疫病的作用。Treg 细胞在体内和体外均可抑制效应 T 细胞的活化和增殖。其作用机制还不十分清楚,目前认为是通过细胞因子抑制和细胞接触抑制。体内实验表明 Treg 细胞依靠分泌 IL-10 和 TGF- β 而发挥抑制作用^[15]。通过诱导外周 Treg 细胞的生成,进而诱导免疫耐受是解决术后排斥反应和减少免疫抑制剂用药的一个策略。

综上所述,本研究采用小鼠异位心脏移植模型,显示应用重组腺病毒 Galectin-9 能够显著延长移植物的生存时间,促进了 Treg 细胞的分化和增殖,外周血 Treg 相关 IL-10、TGF- β_1 水平也明显升高,提示 Galectin-9 具有诱导免疫耐受的潜在作用。

(志谢 本研究得到第二军医大学基础部免疫学研究所洪善娟博士、沈筱芸硕士的悉心指导,在此表示衷心感谢!)

[参考文献]

[1] Matsumoto R, Matsumoto H, Seki M, Hata M, Asano Y, Kanegasaki S, et al. Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 16976-16984.

[2] Abedin M J, Kashio Y, Seki M, Nakamura K, Hirashima M. Potential roles of galectins in myeloid differentiation into three different lineages[J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 73: 650-656.

[3] Dai S Y, Nakagawa R, Itoh A, Murakami H, Kashio Y, Abe H, et al. Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2005, 175: 2974-2981.

[4] Kohrenhagen N, Volker H U, Kapp M, Dietl J, Kammerer U. Increased expression of galectin-1 during the progression of cervical neoplasia[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16: 2018-2022.

[5] Irie A, Yamauchi A, Kontani K, Kihara M, Liu D, Shirato Y, et al. Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 2962-2968.

[6] Zhu C, Anderson A C, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury S J, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6: 1245-1252.

[7] Wang F, He W, Yuan J, Wu K, Zhou H, Zhang W, et al. Activation of Tim-3-Galectin-9 pathway improves survival of fully allogeneic skin grafts[J]. *Transpl Immunol*, 2008, 19: 12-19.

[8] Seki M, Oomizu S, Sakata K M, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis[J]. *Clin Immunol*, 2008, 127: 78-88.

[9] Matsuura A, Abe T, Yasuura K. Simplified mouse cervical heart transplantation using a cuff technique[J]. *Transplantation*, 1991, 51: 896-898.

[10] Türeci O, Schmitt H, Fadle N, Pfreundschuh M, Sahin U. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 6416-6422.

[11] Wada J, Kanwar Y S. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 6078-6086.

[12] Kasamatsu A, Uzawa K, Nakashima D, Koike H, Shiiba M, Bukawa H, et al. Galectin-9 as a regulator of cellular adhesion in human oral squamous cell carcinoma cell lines[J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16: 269-373.

[13] Zhai Y, Kupiec-Weglinski J W. What is the role of regulatory T cells in transplantation tolerance[J]? *Curr Opin Immunol*, 1999, 11: 497-503.

[14] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. *J Immunol*, 1995, 155: 1151-1164.

[15] Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa T C, Cumano A, Bandeira A. CD25⁺ CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10[J]. *J Immunol*, 2001, 166: 3008-3018.

[本文编辑] 贾泽军