

外源性一氧化碳释放分子3抑制肾脏固有树突状细胞活化的作用机制

朱楠¹,袁清²,王毅³,洪善娟⁴,张雷³,曾力³,蔡明²,朱有华^{3*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院肝外五科,上海 200438
2. 解放军309医院器官移植中心泌尿一科,北京 100193
3. 第二军医大学长征医院器官移植中心,全军器官移植研究所,上海 200003
4. 第二军医大学基础部免疫学研究所,上海 200433

[摘要] **目的** 观察外源性一氧化碳释放分子3(carbon monoxide-releasing molecule 3, CORM-3)对肾固有树突状细胞(renal dendritic cells, rDCs)活化的影响,并探讨其可能的作用机制。**方法** 选取 C57BL/6J(H-2k^b)小鼠制备肾脏单细胞悬液,采用磁珠分选 CD11c⁺ rDCs,并用流式细胞术鉴定 rDCs 纯度。用 CORM-3 或无活性的 CORM (inactive CO-releasing molecule, iCORM)处理新鲜肾脏分离的 rDCs,实时定量 RT-PCR 检测 TLR4 基因表达,ELISA 法检测 rDCs 培养液上清中 TNF- α 蛋白水平。建立 TLR4^{-/-} (C3H/HeJ)和 TLR4^{+/+} (C3H/HeN)小鼠肾脏热缺血 30 min+冷保存 24 h 模型,在冷保存期间经 CORM-3 处理之后分选 rDCs,抽提 RNA,行实时定量 RT-PCR 检测 TNF- α 基因表达。**结果** CORM-3 呈剂量依赖性地抑制小鼠未成熟 rDCs 的 TLR4 mRNA 表达($P < 0.05$)。与 iCORM 比较,CORM-3 能够抑制 LPS 刺激后的 rDCs 表达 TNF- α ($P < 0.01$)。当 TLR4 缺陷之后,CORM-3 不再抑制 rDCs 表达 TNF- α 。**结论** CORM-3 可显著抑制肾脏未成熟 rDCs 表达 TLR4,也可抑制 LPS 刺激和缺血损伤时炎症因子的表达,但对于 TLR4 缺陷小鼠这一抑制作用消失,提示 CORM-3 对内源性配体介导的 rDCs 活化过程的抑制作用由 TLR4 信号通路介导。

[关键词] 肾;树突细胞;一氧化碳;炎症;缺血

[中图分类号] R392.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)06-0599-04

Mechanism of exogenous carbon monoxide-releasing molecule 3 in inhibiting activation of renal dendritic cells

ZHU Nan¹, YUAN Qing², WANG Yi³, HONG Shan-juan⁴, ZHANG Lei³, ZENG Li³, CAI Ming², ZHU You-hua^{3*}

1. The 5th Division of Hepatic Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. The 1st Division of Urology, Organ Transplant Center, No. 309 Hospital of PLA, Beijing 100193, China
3. Organ Transplant Center, Organ Transplantation Institute of PLA, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
4. Institute of Medical Immunology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effect of exogenous carbon monoxide-releasing molecule 3 (CORM-3) on activation of the renal dendritic cells (rDCs) and the underlining mechanism. **Methods** Kidneys harvested from C57BL/6J mice were made into single cell suspension. CD11c⁺ rDCs were then sorted by magnetic cell sorting (MACS) and the purity was assessed by flow cytometry. The rDCs were treated by CORM-3 or inactive CO-releasing molecule (iCORM) together with lipopolysaccharides (LPS). The expression of TLR4 gene was detected by quantitative real-time PCR. TNF- α protein levels in the rDCs culture were determined by ELISA. In addition, TLR4^{-/-} (C3H/HeJ) or TLR4^{+/+} (C3H/HeN) mice were subjected to 30 min bilateral kidney ischemia and 24-h cold preservation. The rDCs were then isolated to detect the expression of TNF- α gene in cells by quantitative real-time PCR. **Results** CORM-3 significantly inhibited the expression of TLR4 mRNA in immature rDCs in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with iCORM, CORM-3 significantly suppressed the expression of TNF- α in rDCs after LPS stimulation ($P < 0.01$); however, this inhibitory effect of CORM-3 was abrogated in

[收稿日期] 2012-01-12 **[接受日期]** 2012-04-23

[基金项目] 国家自然科学基金(81070596, 30872581, 81170690), 上海市科委基础研究重点项目(09JC1405500). Supported by National Natural Science Foundation of China (81070596, 30872581, 81170690) and Key Basic Research Program of Shanghai Science and Technology Commission (09JC1405500).

[作者简介] 朱楠, 硕士, 主治医师. E-mail: zhunan_2006@yahoo.com.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885754, E-mail: zhuyouhua@126.com

TLR4^{-/-} mice. **Conclusion** CORM-3 can greatly inhibit TLR4 expression in immature rDCs, and it can also suppress proinflammatory cytokine expression induced by LPS stimulation or ischemia and cold preservation, but not in TLR4 knockout mice, suggesting that CORM-3 suppresses rDCs activation through TLR4 pathway.

[Key words] kidney; dendritic cells; carbon monoxide; inflammation; ischemia

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(6): 599-602]

器官移植后的排异反应是造成移植物丢失和患者死亡的主要原因之一。目前认为以供体来源树突状细胞(dendritic cells, DCs)为代表的供者抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APCs)所介导的直接激活途径是诱发排异反应的主要因素^[1]。正常肾脏的间质就存在大量的固有 DCs (renal DCs, rDCs), 并呈网状结构包裹着每一个肾单位^[1]。这些 rDCs 在移植后作为供者来源 DCs 的主要部分, 直接参与移植物排异反应的活化与发生。因此, 调控这些 rDCs 的活化过程将有可能实现对器官移植排异反应的有效预防与治疗。有研究报道外源性一氧化碳(carbon monoxide, CO)预处理供者可以降低排异反应的发病率^[2], 但具体的机制并不明确。因此, 本研究采用 CO 释放分子 3 (CO-releasing molecule 3, CORM-3) 提供外源性 CO, 探讨其对 rDCs 活化过程的调控作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂 选取 C57BL/6J (H-2K^b)、TLR4^{-/-} (C3H/HeJ) 及 TLR4^{+/+} (C3H/HeN) 小鼠, 性别不限, 8~10 周龄, 体质量为 20~25 g, SPF 级, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。动物分笼饲养于第二军医大学基础部免疫学研究所 SPF 动物房。ReverTra Ace- α -RNA 反转录试剂盒购自 Toyobo 公司, SYBR Premix Ex Taq 荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, TRIzol 提取液购自 Invitrogen 公司。CORM-3 由英国伦敦大学 Roberto Motterlini 教授惠赠。
1.2 小鼠 rDCs 的分选 采集 C57BL/6J 小鼠肾脏标本, 去包膜, 剪成 1~2 mm³ 后浸入含 1.6 mg/ml I 型胶原酶和 200 μ g/ml DNase 的 DMEM 液中, 37 $^{\circ}$ C 摇床振荡 40 min。离心, 去上清, DMEM 液清洗 1 次; 加入含 200 μ g/ml DNase 的 DMEM 液重悬, 室温静置 15 min; DMEM 液清洗 1 次; 加 Tris-NH₄Cl 破坏红细胞; DMEM 液清洗 1 次; 加入含 10% FBS 的 DMEM 液重悬, 静置 20 min 后取三分之二的上清液。用磁珠分选法 (magnetic cell sorting, MACS) 分选 CD11c⁺ rDCs。
1.3 流式细胞术鉴定 rDCs 的纯度 将分选得到的 rDCs 用抗小鼠 CD11c-PE 抗体 (德国 Miltenyi Biotec 公司) 标记, 用流式细胞仪 (FACSVantage SE 分

选型, 美国 BD 公司) 检测其纯度。

1.4 CORM-3、iCORM 溶液的制备 (1) 将 CORM-3 粉剂溶于双蒸水, 制备成 10 mmol/L 的母液, 使用时再稀释至所需浓度。(2) 将 CORM-3 溶解在 PBS (pH 7.40) 中并室温静置 2 d, 使用前用氮气鼓泡 10 min 去除液体中残余的 CO, 制备成不含 CO 活性的 CORM (inactive CO-releasing molecule, iCORM) 溶液。

1.5 实时定量 RT-PCR 检测 TLR4 mRNA 表达 收集细胞, TRIzol 法提取总 RNA。用反转录系统将 RNA 转录为 cDNA。引物 (表 1) 序列均由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s; 扩增 40 个循环, 熔解曲线 72~95 $^{\circ}$ C。以 GAPDH 作为内标, 对目的基因进行均一化。目的基因相对表达量采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算。

表 1 实时定量 RT-PCR 引物

Tab 1 Quantitative real-time PCR primers

Gene	Sequence (5' \rightarrow 3')
TLR4	Forward: GCC TTT CAG GGA ATT AAG CTC C
	Reverse: AGA TCA ACC GAT GGA CGT GTA A
TNF- α	Forward: AAG CCT GTA GCC CAC GTC GTA
	Reverse: GGC ACC ACT AGT TGG TTG TCT TTG
GAPDH	Forward: TGA CCA CAG TCC ATG CCA TC
	Reverse: GAC GGA CAC ATT GGG GGT AG

1.6 ELISA 法检测培养上清中 TNF- α 水平 用 CORM-3 或者 iCORM 预处理新鲜肾脏分离的 C57BL/6J (H-2K^b) 小鼠 rDCs, 再给予 LPS 刺激过夜, 然后收集培养上清, -70 $^{\circ}$ C 冻存备测。用 TNF- α 的 ELISA 试剂盒 (上海希美生物科技有限公司) 进行检测, 具体步骤参见试剂盒说明书。

1.7 TLR4^{-/-} (C3H/HeJ) 及 TLR4^{+/+} (C3H/HeN) 小鼠肾脏缺血+冷保存模型制备及相关实验 小鼠经腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 及 500 U/L 肝素 500 μ l, 麻醉后腹部皮肤用碘酒消毒, 沿腹部中线切开, 游离双侧肾蒂并用无创显微动脉夹夹闭直至肉眼观察肾脏逐渐由红润变为浅灰红色。分离肾上腹主动脉并带线, 游离肾下腹主动脉备穿刺灌注。钳夹 30 min 后结扎肾上腹主动脉, 松开动脉夹, 用 30G 注射针头穿刺肾下腹主动脉, 剪开下腔静脉开放流出道, 4 $^{\circ}$ C 林格氏液灌注至双肾灰白, 再灌

入添加 CORM-3 或者 iCORM 的 UW (University of Wisconsin solution) 液 1 ml。摘下双肾, 在含有 CORM-3 或 iCORM 的 UW 液中 4℃ 保存 24 h。按 1.2 项方法分选 rDCs, 按 1.5 项实时定量 RT-PCR 法检测 TNF- α 表达(引物见表 1)。

1.8 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s_x$ 表示, 采用 Prism 5.0 软件进行统计学分析。3 组以上数据用单因素方差分析(one-way ANOVA), 再用 Bonferroni's correction 做两两比较。两组数据采用 Student's *t* 检验或者 Mann-Whitney 检验(均为双尾)。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 分选出的 rDCs 纯度鉴定 经过磁珠分选的 C57BL/6J(H-2K^b) 小鼠 CD11c⁺ rDCs 经流式细胞术鉴定可见其形态及密度较为均一, 纯度在 95% 以上(图 1)。

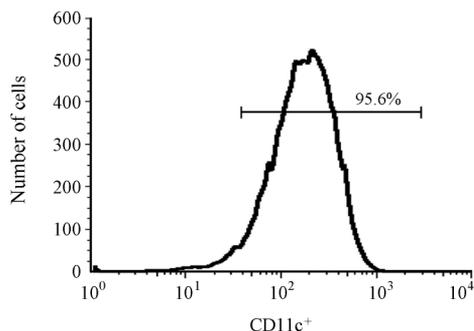


图 1 rDCs 的纯度鉴定

Fig 1 Purity identification of renal dendritic cells (rDCs)

2.2 CORM-3 抑制小鼠 rDCs 的 TLR4 mRNA 的表达 分别用 CORM-3 和 iCORM 处理 C57BL/6J (H-2K^b) 小鼠未成熟的 rDCs, 2 h 后收集细胞, 抽提 RNA, 用实时定量 RT-PCR 检测 TLR4 mRNA 的表达变化, 结果显示与 iCORM 处理组相比, CORM-3 呈剂量依赖性地下调 TLR4 mRNA 的表达。其中 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 CORM-3 下调 TLR4 mRNA 表达的 55% ($P < 0.05$); 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 CORM-3 下调 TLR4 mRNA 表达的 86% ($P < 0.001$); 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CORM-3 下调 TLR4 mRNA 表达的 99% ($P < 0.001$)。

2.3 CORM-3 抑制 rDCs 在 LPS 刺激后 TNF- α 的表达 ELISA 法检测结果(图 2)显示, 在空白对照 (medium) 组和 iCORM 组, LPS 刺激呈剂量依赖性地激活 rDCs, 诱导 TNF- α 的表达, 但两组间差异无统计学意义; 而 CORM-3 处理可以抑制 LPS 刺激后 rDCs 的 TNF- α 表达, 与 iCORM 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 CORM-3 对 rDCs 功能的抑制与 TLR4 信号通路相关 本研究选用 TLR4^{-/-} (C3H/HeJ) 及 TLR4^{+/+} (C3H/HeN) 小鼠制备肾脏缺血+冷保存模型。结果(图 3)显示, 从 TLR4^{+/+} 小鼠切取的新鲜肾脏分离出的 rDCs 在受到 LPS 刺激之后 TNF- α mRNA 表达显著升高, 为空白对照 (medium) 组的 (27.45 \pm 2.51) 倍 ($P < 0.001$)。从经过热缺血 30 min + 冷保存 24 h 的肾脏分离出的 rDCs 同样也存在 TNF- α mRNA 的表达, 并受到保存期间 CORM-3 处理的抑制 [(17.19 \pm 2.01) 倍 vs (5.58 \pm 1.18) 倍, $P < 0.01$]。而在 TLR4^{-/-} 小鼠新鲜切取的肾脏分离出的 rDCs 对 LPS 刺激并未有任何反应。当 TLR4 缺陷之后, CORM-3 抑制热缺血+冷保存过程所激活的 rDCs TNF- α 表达的作用也不再存在 [(8.10 \pm 2.02) 倍 vs (6.28 \pm 1.60) 倍], 提示 CORM-3 对内源性配体介导的 rDCs 活化过程的抑制作用主要是经由 TLR4 信号通路介导。

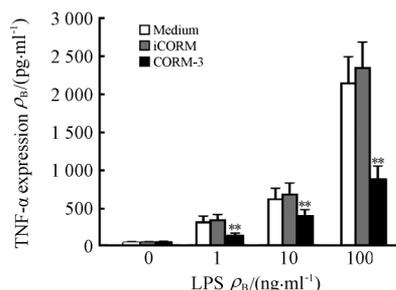


图 2 CORM-3 抑制小鼠 rDCs 在 LPS 刺激后 TNF- α 的表达

Fig 2 CORM-3 suppressed expression of TNF- α in mouse rDCs after LPS stimulation

CORM-3: Carbon monoxide(CO)-releasing molecule 3; iCORM: Inactive CO-releasing molecule; rDCs: Renal dendritic cells. ** $P < 0.01$ vs iCORM group; $n = 4$, $\bar{x} \pm s_x$

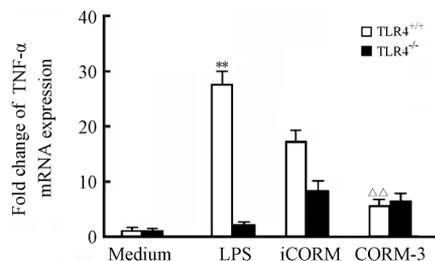


图 3 CORM-3 抑制内源性配体介导的 rDCs 活化过程与 TLR4 信号通路相关

Fig 3 CORM-3 suppressed rDC activation through TLR4 pathway

CORM-3: Carbon monoxide(CO)-releasing molecule 3; iCORM: Inactive CO-releasing molecule; rDCs: Renal dendritic cells. ** $P < 0.01$ vs TLR4^{+/+} in medium group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs TLR4^{+/+} in iCORM group; $n = 4$, $\bar{x} \pm s_x$

3 讨论

内源性 CO 由血红素氧合酶 (heme oxygenase, HO) 通过降解血红素而产生。钴原卟啉诱导人/大鼠骨髓来源 DCs (BMDCs) 高表达 HO-1 可抑制 LPS 刺激后 DCs 表型成熟和促炎因子分泌,减轻缺血再灌注损伤,并抑制 DCs 介导的同种异体反应性 T 细胞增殖^[3-4]。Sikorski 等^[5]和 Nakao 等^[6]的研究分别指出:诱导 HO-1 高表达所介导的生物学效应主要通过 HO-1 分解血红素的产物——内源性 CO 实现。在巨噬细胞中诱导 HO-1 高表达能抑制 TLRs 的信号转导,导致配体刺激后的细胞因子生成减少,已证实这种作用是由 CO 实现的^[7]。研究发现,外源性小剂量 CO 可发挥与 HO-1 相同的抗炎症、抗氧化的细胞保护作用^[8]。由于给药方式和浓度控制的困难,外源性 CO 的研究仍然受到限制。CORMs 属于过渡金属羰基化合物,能在生理条件下以可控制的方式释放 CO^[9],但早期的 CORMs—— $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ 是非水溶性的,需经适当溶剂溶解方能分散到生理环境中。 $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})]$ (CORM-3) 是新近研发的水溶性 CORMs,可在生理条件下溶于体液,稳定释放 CO。研究已证实 CORM-3 具有抑制血小板聚集^[10]、抑制内皮细胞黏附分子表达^[11]等作用。

在本研究中,我们以从小鼠肾组织直接分离分选出的 rDCs 作为研究对象,检测了 CORM-3 对未成熟 rDCs 表面 TLR 表达的影响,发现 CORM-3 处理可以呈剂量依赖性地下调 TLR4 mRNA 表达。这一结果与 CORM-2 抑制 BMDCs TLR 表达的报道相符^[12]。随后我们进一步发现 CORM-3 处理 rDCs 显著抑制了其在 LPS 刺激后 TNF- α 的表达。鉴于 TLR4 还可以被器官损伤后释放的内源性配体激活^[13],我们建立了小鼠肾脏热缺血+冷保存的模型模拟器官在移植前所经历的损伤事件。我们发现经过这一模型之后分选出的 rDCs 同样具有活化的 TNF- α mRNA 转录,提示可能热缺血+冷保存的过程中所产生的内源性配体成功地激活了 rDCs。鉴于 CORM-3 对 rDCs 的作用与 TLR4 紧密相关,TLR4 信号通路又是 DCs 活化过程中的关键,而 CORM-3 对 rDCs 活化的抑制作用是否与 TLR4 信号通路的关系尚不明确。因此,我们采用 TLR4 缺陷小鼠,发现当 TLR4 缺陷之后,CORM-3 对 rDCs TNF- α 表达的抑制作用消失,提示 CORM-3 对内源性配体介导的 rDCs 活化过程的抑制作用主要是经由 TLR4 信号通路介导的。

本研究采用 rDCs 替代了既往体外研究中常用的 BMDCs,并且建立了小鼠肾脏热缺血+冷保存的模

型,使研究结论更接近于器官移植的实际背景。在后续的研究中,我们将通过小鼠肾移植模型进一步明确 CORM-3 对 rDCs 活化过程的抑制是否会对急慢性排斥反应产生效果。实验中采用的 CORM-3 在冷保存期间有效抑制了 rDCs 的 TNF- α 表达,这一结果也为后期新型器官保存液的研发指出了新方向。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Soos T J, Sims T N, Barisoni L, Lin K, Littman D R, Dustin M L, et al. CX3CR1⁺ interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney[J]. *Kidney Int*, 2006, 70: 591-596.
- [2] Martins P N, Reutzel-Selke A, Jurisch A, Denecke C, Attrot K, Pascher A, et al. Induction of carbon monoxide in donor animals prior to organ procurement reduces graft immunogenicity and inhibits chronic allograft dysfunction [J]. *Transplantation*, 2006, 82: 938-944.
- [3] Kotsch K, Martins P N, Klemz R, Janssen U, Gerstmayer B, Dernier A, et al. Heme oxygenase-1 ameliorates ischemia/reperfusion injury by targeting dendritic cell maturation and migration[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9: 2049-2063.
- [4] Chauveau C, Rémy S, Royer P J, Hill M, Tanguy-Royer S, Hubert F X, et al. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression[J]. *Blood*, 2005, 106: 1694-1702.
- [5] Sikorski E M, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A. The story so far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 286: F425-F441.
- [6] Nakao A, Neto J S, Kanno S, Stolz D B, Kimizuka K, Liu F, et al. Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both [J]. *Am J Transplant*, 2005, 5: 282-291.
- [7] Nakahira K, Kim H P, Geng X H, Nakao A, Wang X, Murase N, et al. Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts[J]. *J Exp Med*, 2006, 203: 2377-2389.
- [8] Song R, Kubo M, Morse D, Zhou Z, Zhang X, Dauber J H, et al. Carbon monoxide induces cytoprotection in rat orthotopic lung transplantation via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163: 231-242.
- [9] Motterlini R, Clark J E, Foresti R, Sarathchandra P, Mann B E, Green C J. Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities[J]. *Circ Res*, 2002, 90: E17-E24.
- [10] Chlopicki S, Lomnicka M, Fedorowicz A, Grochal E, Kramkowski K, Mogielnicki A, et al. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): comparison with NO donors[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2012 Feb 25. [Epub ahead of print].
- [11] Bergstraesser C, Hoeger S, Song H, Ermantraut L, Hottenrot M, Czmayl T, et al. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by CORM-3: the role of the ubiquitin-proteasome system, p38, and mitochondrial respiration[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52: 794-802.
- [12] Rémy S, Blancou P, Tesson L, Tardif V, Brion R, Royer P J, et al. Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity[J]. *J Immunol*, 2009, 182: 1877-1884.
- [13] Jurewicz M, Takakura A, Augello A, Naini S M, Ichimura T, Zandi-Nejad K, et al. Ischemic injury enhances dendritic cell immunogenicity via TLR4 and NF- κ B activation[J]. *J Immunol*, 2010, 184: 2939-2948.

[本文编辑] 商素芳, 孙岩