

· 基础论著 ·

大黄素对大鼠肝移植后 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的影响

蒋力 刘焱 张珂 穆毅 曾辉 毛羽

【摘要】 目的 研究大黄素对大鼠肝移植后 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的比例以及对其免疫抑制功能的影响。**方法** 双袖套法建立大鼠原位肝移植模型,以大黄素和环孢素 A (CsA) 分别在术后腹腔给药,并以给予 PBS 作为模型对照组,观察不同药物移植后大鼠存活时间的影响,以及对移植术后大鼠外周血中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞 (T regulatory cells, Treg) 亚群的变化以及免疫功能的影响。**结果** 大黄素能显著延长大鼠原位肝移植的术后成活时间,大黄素组大鼠的平均存活时间 (17.4 ± 2.5) d 与肝移植模型对照组 (8.8 ± 1.9) d 相比差异具有统计学意义;大鼠肝移植后大黄素给药可显著上调受体大鼠外周血以及肝内 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的比例,并显著增强 CD4⁺ CD25⁺ Treg 抑制效应性 T 细胞的增殖能力 ($P < 0.05$)。**结论** 大黄素能够延长大鼠原位肝移植的术后成活时间,并可能通过上调外周血以及肝内 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的数量及免疫抑制功能来实现移植后免疫排斥反应的抑制。

【关键词】 大黄素;原位肝移植;T 调节性细胞

Effects of emodin on CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in liver transplantation rats JIANG Li, LIU Yao, ZHANG Ke, MU Yi, ZENG Hui, MAO Yu. Department of Surgery, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China
Corresponding author: MAO Yu, Email: mao58@vip.sohu.net

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of emodin on proportion and suppressive function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and liver-infiltrating lymphocytes (LILs) after liver transplantation in rats. **Methods** SD to Wistar rats orthotopic liver transplantation models ($n = 45$) were established. Rats were randomized into three groups. In the control group, emodin group and ciclosporin A group were intraperitoneally treated with 0.5 ml/(kg · d) PBS, 50 mg/(kg · d) emodin, 10 mg/(kg · d) ciclosporin A, respectively. General conditions of rats were observed after operation. In each group, rats were killed three days and seven days after transplantation. PBMCs and liver tissues were collected to

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.03.006

基金项目:首都特色临床医学技术发展研究项目(Z0005190043111)

作者单位:100015 北京市,首都医科大学附属北京地坛医院外科

通讯作者:毛羽,Email:mao58@vip.sohu.net

observe the proportion and suppressive function of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells in PBMCs and LILs. **Results** The percentages of circulating $CD4^+CD25^+$ Tregs of emodin group and ciclosporin A group were significantly higher than control group. In the LILs, there was higher percentage of $CD4^+CD25^+$ Tregs and the percentages of circulating $CD4^+CD25^+$ Tregs of emodin group and ciclosporin A group were also significantly higher than control group. There were significant differences in the prevalence of $CD4^+CD25^+$ Tregs between three days and seven days in PBMCs and LILs after liver transplantation. **Conclusions** The results suggest that emodin can enhance the percentages and immune-suppression of $CD4^+CD25^+$ Tregs after liver transplantation, which may be involved in inhibiting the severity of rats hepatic allograft acute rejection and prolong the survival time after rats liver transplantation.

【Key words】 Emodin; Orthotopic liver transplantation; T regulatory cells

大黄素(emodin)作为一种蒽醌类物质,主要源于蓼科植物掌叶大黄的根茎,近年来研究发现大黄素具有抗炎^[1]、免疫调节^[2]、保护脏器^[3]及抗肿瘤^[4]等作用。前期研究表明大黄素可以抑制淋巴细胞增殖^[2],并可诱导器官移植后免疫耐受的建立^[5-7],但具体作用机制尚不明确。而调节性T细胞作为目前具有免疫抑制作用的细胞亚群在移植免疫中发挥着重要的作用,参与对移植免疫排斥反应并诱导移植免疫耐受的建立^[8-10],同时还发现器官移植后环孢素A(CsA)等免疫抑制剂的应用可显著上调Treg数量及免疫抑制的功能^[9,11]。大黄素作为具有免疫调节药理作用的药物,可抑制大鼠肝移植后急性排斥反应发生,但其作用是否与影响Treg数量及功能相关有待进一步明确。因此,本研究的主要目的是在建立近交系大鼠原位肝移植自发免疫耐受模型的基础上,初步探讨移植术后大黄素的应用对大鼠外周血中 $CD8^+CD28^-$ 、 $CD4^+CD25^+$ Treg的数量及对其免疫抑制功能的影响。

材料和方法

一、材料与试剂

抗-CD4-PerCP-Cy5.5、抗-CD25-FITC、抗-Foxp3-PE均购自美国BD Pharmingen公司、RPMI 1640培养基和胎牛血清(FBS)分别为Gibco BRL和Hyclone生产。抗-CD3、抗-CD28购自美国R&D公司。 $CD4^+CD25^+$ T细胞磁珠分选试剂盒购自加拿大Stemcell公司。流式细胞仪购自美国BD公司(FACSCalibur, BD)。

二、大鼠原位肝移植模型建立

SD大鼠以及Wistar大鼠,均8~10周龄,体重200~250 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,SPF级饲养条件。正常供应饲料和饮水,术前12 h禁食。参照Kamada等^[12]的双袖套等方法,建立SD大鼠→Wistar大鼠全血供原位肝移植模型^[12]。将制备的48只大鼠模型随机分为3组($n = 16$),即对照组、大黄素组和环孢素A组。于移植术后第1天开始各组分别腹腔内注射0.5

ml/(kg·d) PBS、50 mg/(kg·d) 大黄素、10 mg/(kg·d) 环孢素 A, 于术后第 3 天、第 7 天每组分别处死 3 只大鼠, 取静脉血及肝脏标本备检。余受体大鼠继续应用药物干预直至死亡, 记录其生存时间。

三、大鼠外周单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 以及肝脏浸润淋巴细胞(liver-infiltrating lymphocytes, LILs) 分离

将大鼠处死后取外周血加至 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 抗凝管中, 抗凝的外周静脉血小心铺于 10 ml 淋巴细胞分离液表面, 梯度离心 20 min (22℃, 1500 r/min), 细胞悬液和淋巴细胞分离液之间的白膜层即为所分离得到的单个核细胞, 小心吸出后, 用预冷 RPMI 1640 稀释, 1200 r/min 离心 15 min, 去除混杂的淋巴细胞分离液; 最后用预冷 RPMI 1640 悬浮细胞沉淀, 1000 r/min 离心 5 min, 即可分离到 PBMCs。

LILs 的分离步骤为取处死后的大鼠肝组织, 以含 2% 胎牛血清及 1% EDTA 的 PBS 漂洗去除红细胞后, 机械法制备细胞悬液, 以 100 目筛网过滤, 将过滤后的细胞以培养基稀释后加至淋巴细胞分离液进行密度梯度离心, 即分离肝组织内浸润的淋巴细胞。

四、Treg 表型检测

取上述 PBMCs 和 LILs 与抗-CD4-PerCP-Cy5.5、抗-CD25-FITC 室温共孵育 15 min。Foxp3-PE 标记参照试剂盒操作指南进行破膜标记。标记后的细胞用 PBS 洗 2 遍。1% 多聚甲醛 300 μl 重悬固定, 行流式细胞术检测。每例患者标本均设各自同型对照, 取 2 次检测结果均值进行统计学处理。以流式细胞仪双色、三色分析法分别分析 PBMCs 以及 LILs 中 CD4⁺CD25⁺ Treg 的比例。

五、Treg 抑制功能检测

以密度梯度离心法分离的大鼠肝移植后 7 d 的 PBMCs, 用 CD4 负选磁珠分选法去除大鼠 PBMC 中的 CD4⁻ T 细胞; 再使用 CD25 正选磁珠法分选出 CD4⁺CD25⁺ T 细胞, 剩余细胞即为 CD4⁺CD25⁻ T 细胞。将分离的 CD4⁺CD25⁻ 的 T 细胞加至抗-CD3 包被的培养板中, 同时加入抗-CD28 以刺激 CD4⁺CD25⁻ T 细胞增殖, 在培养中再加入分离的自身的 CD4⁺CD25⁺ T 细胞, 其与 CD4⁺CD25⁻ 细胞别按 10:1、5:1、1:1、1:5、1:0 的比例加入, 共同培养 72 h, 在培养结束前 12 h 加入 BrdU (终浓度 10 μmol/L) 共同培养 12 h 后, 终止反应、显色, 在酶标仪 450 nm 读数, 计算细胞增殖指数, 增殖指数公式为 $SI = (\text{刺激孔 } A - \text{对照孔 } A) / \text{对照孔 } A$ 。

六、统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件以及 Graphpad 5.0 进行统计分析, 对于多组间采用 *F* 分析, 两组间比较采用双侧 *t* 检验, 相关性分析采用 Spearman 法, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

一、大鼠肝移植后不同给药组大鼠生存分析

各组受体大鼠进入结果分析的数量分别为对照组 (PBS) 8 只、大黄素组

(emodin)8只、环孢素A(CsA)组9只。与对照组相比,大黄素组以及环孢素A给药组大鼠移植后一般状况好。对照组、大黄素组、环孢素A组大鼠的平均存活时间分别为 (8.8 ± 1.9) d、 (17.4 ± 2.5) d、 (20.0 ± 2.0) d,大黄素组、环孢素A分别与对照组的生存天数相比差异具有统计学意义($P < 0.05$),而大黄素组与环孢素组相比差异无统计学意义(图1)。

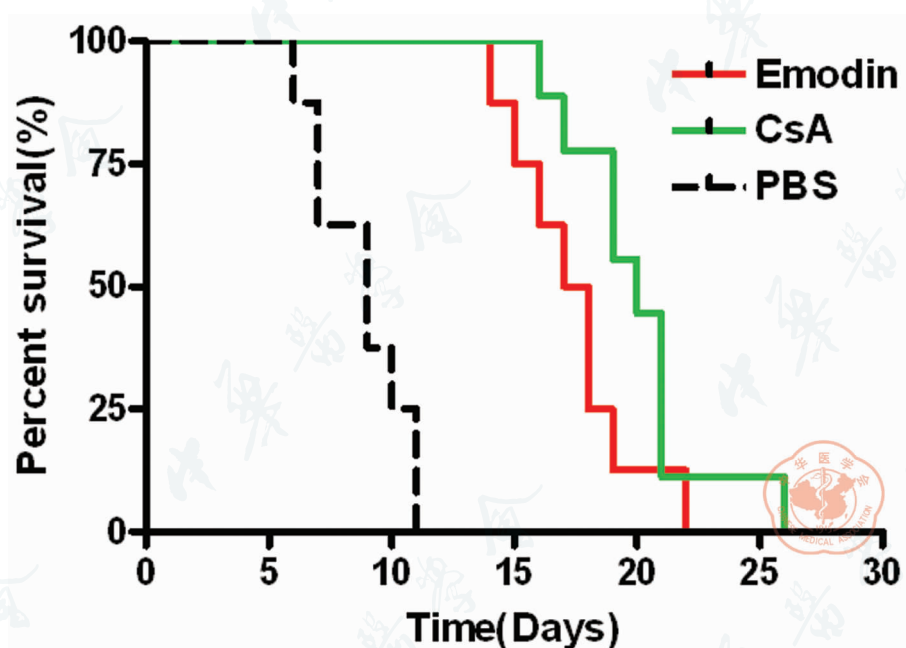


图1 大鼠肝移植后不同给药组大鼠生存分析

注:PBS,对照组($n = 8$);Emodin,大黄素组($n = 8$);CsA,环孢素A组($n = 9$)

二、大黄素对大鼠肝移植后外周血 $CD4^+CD25^+$ Treg 数量的影响

大鼠肝移植后,在大黄素以及环孢素A给药达3d时,两组大鼠外周血中 $CD4^+CD25^+$ Treg 增多,占 $CD4^+$ T细胞的比例分别为 $(7.66 \pm 0.60)\%$ 和 $(9.46 \pm 0.58)\%$,显著高于对照组的Treg比例 $(5.49 \pm 0.64)\%$ ($P < 0.05$)。在大黄素以及环孢素A给药达7d时,两组大鼠外周血中 $CD4^+CD25^+$ Treg 比例分别达到 $(10.12 \pm 0.33)\%$ 和 $(11.53 \pm 0.71)\%$,显著高于对照组肝移植7d后的Treg比例 $(4.04 \pm 0.49)\%$ ($P < 0.05$),但大黄素组以及环孢素A组相比 $CD4^+CD25^+$ Treg 比例差异并无统计学意义(图2A)。大鼠肝移植后,随大黄素以及环孢素A给药时间延长 $CD4^+CD25^+$ Treg 比例也出现显著增高($P < 0.05$),而对照组中肝移植后7d与移植后3d相比 $CD4^+CD25^+$ Treg 比例显著下调 $(5.49\% \pm 0.64\% \text{ vs } 4.04\% \pm 0.49\%, P < 0.05)$ (图2B)。

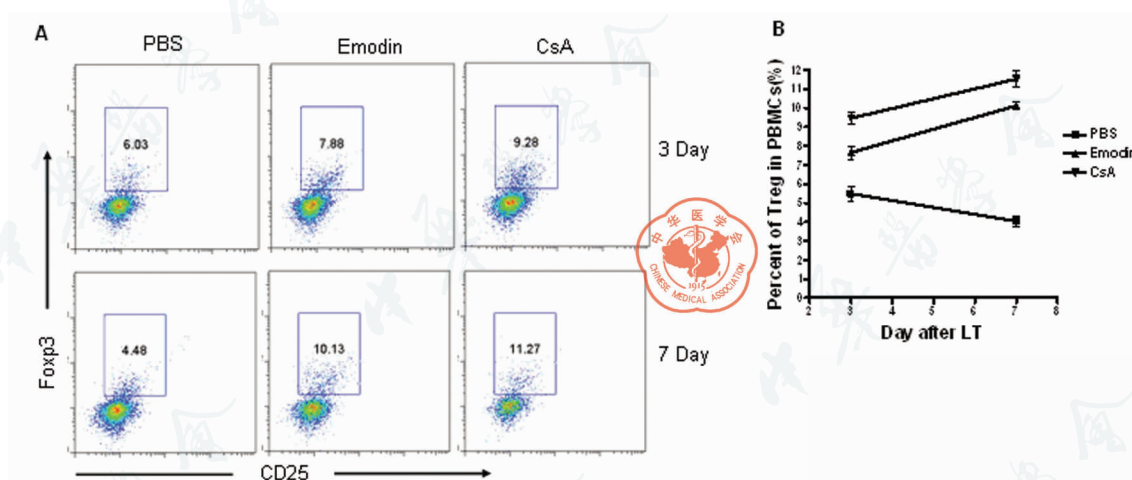


图2 大黄素对大鼠肝移植后外周血 CD4⁺CD25⁺ Treg 数量影响的流式分析
注:PBS,模型对照组(n = 8);Emodin,大黄素组(n = 8);CsA,环孢素 A 组(n = 9)

三、大黄素对大鼠肝移植后肝内浸润 CD4⁺CD25⁺ Treg 数量的影响

大鼠肝移植后,在大黄素以及环孢素 A 给药达 3 d 时,两组大鼠后肝内浸润 CD4⁺CD25⁺ Treg 增多,CD4⁺CD25⁺ Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例分别为(7.81 ± 0.59) % 和(12.23 ± 1.35) %,显著高于对照组的 Treg 比例(6.18 ± 0.78) % ($P < 0.05$)。在大黄素以及环孢素 A 给药达 7 d 时,两组大鼠后肝内浸润 CD4⁺CD25⁺ Treg 比例分别达到(12.21 ± 0.88) % 和(17.32 ± 1.13) %,显著高于对照组肝移植 7 d 后的 Treg 比例(6.16 ± 0.26) % ($P < 0.05$),但大黄素组以及环孢素 A 组相比,CD4⁺CD25⁺ Treg 比例差异无统计学意义(图 3A)。大鼠肝移植后,随大黄素以及环孢素 A 给药时间延长 CD4⁺CD25⁺ Treg 比例也显著增高($P < 0.05$),而对照组中 CD4⁺CD25⁺ Treg 比例在肝移植后 7 d 与 3 d 相比差异无统计学意义(图 3B)。

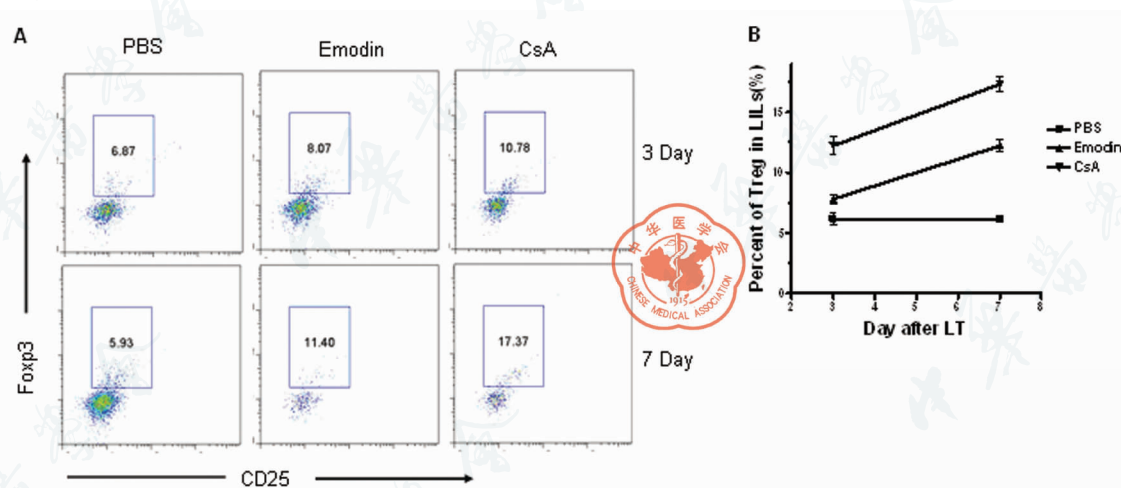


图3 大黄素对大鼠肝移植后肝内浸润 CD4⁺CD25⁺ Treg 数量影响的流式分析
注:PBS,模型对照组(n = 8);Emodin,大黄素组(n = 8);CsA,环孢素 A 组(n = 9)

四、大黄素对大鼠肝移植后 $CD4^+CD25^+$ Treg 免疫抑制功能的影响

各组大鼠肝移植 7 d 后通过磁珠分选出的 $CD4^+CD25^+$ Treg 均对 $CD4^+CD25^-$ 效应性 T 细胞增殖有显著的抑制作用,且抑制作用与共培养中所加入的 $CD4^+CD25^+$ Treg 数量呈剂量依赖的特点。大黄素给药组以及环孢素 A 给药组肝移植大鼠的 $CD4^+CD25^+$ Treg 对 $CD4^+CD25^-$ 效应性 T 细胞增殖抑制效应显著高于对照组 ($P < 0.05$),但大黄素给药组以及环孢素 A 给药组的 $CD4^+CD25^+$ Treg 免疫抑制效应差异无统计学意义(图 4)。

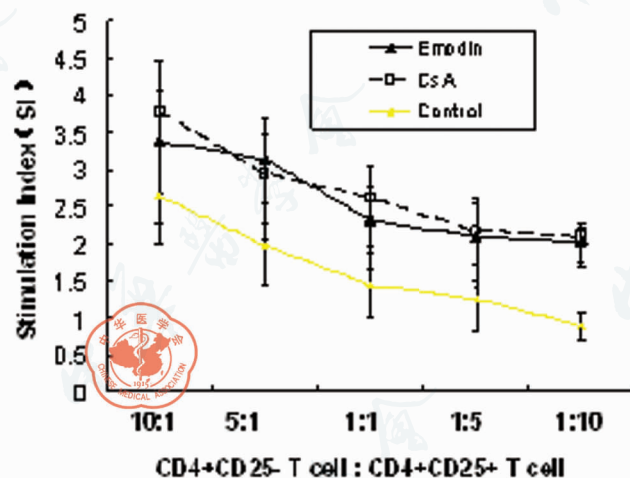


图 4 大黄素对大鼠肝移植后 $CD4^+CD25^+$ Treg 免疫抑制功能的影响

讨 论

近年来关于大黄素的研究已证实其对抗炎、免疫调节有重要的作用。体外研究表明大黄素可以明显抑制特异性及非特异性的淋巴细胞活化,有效地抑制淋巴细胞活化后的克隆扩增^[2]。同时研究也证实大黄素能够有效的延长小鼠皮肤移植物的存活时间,并减少排斥反应的发生^[6]。大黄素在大鼠肝移植模型中研究发现其可抑制大鼠肝移植后急性排斥反应发生,并增强移植免疫抑制剂作用^[5,7]。

本研究中利用建立的大鼠肝移植模型进一步证实了肝移植后大黄素的应用可显著延长肝移植大鼠的生存时间。肝移植后大黄素的连续给药还可显著上调大鼠外周血中 $CD4^+CD25^+$ Treg 的数量,此现象与肝移植后环孢素 A 的应用类似。进而研究也证实肝移植后大黄素的连续给药同时显著上调大鼠肝内浸润的 $CD4^+CD25^+$ Treg 的数量。对大黄素以及环孢素 A 的应用后 $CD4^+CD25^+$ Treg 免疫抑制功能的研究结果发现,与肝移植模型对照组相比,肝移植后大黄素应用一定程度上增强了 $CD4^+CD25^+$ Treg 抑制效应性 T 细胞增殖的能力。

目前,很多实验研究显示 $CD4^+CD25^+$ Treg 作为一群具有免疫负调控功能的 T 细胞亚群,通过抑制其他免疫效应细胞的激活和增殖,在诱导移植免疫耐受中发挥重要作用^[13-15]。虽然在未行移植者体内也存在一定数量的 $CD4^+CD25^+$ Treg,且具有一定的免疫抑制功能,但其数量较少,对外来移植抗原引起的免疫反应并无足够

的抑制能力,无法在移植术后立即发挥其免疫抑制作用。而移植后接触异体抗原后产生的 $CD4^+CD25^+$ Treg 发生免疫活化,并分布于淋巴组织以及移植部位从而对移植植物可能受到的免疫损伤起到保护作用。肝移植后雷帕霉素、CsA 等免疫抑制剂的应用可显著上调外周血及移植肝脏中 $CD4^+CD25^+$ Treg 数量,降低免疫排斥反应的发生^[9,10]。回输新鲜分离的经供体抗原体外激活的 $CD4^+CD25^+$ Treg,可以明显减轻大鼠移植肝脏的急性排斥反应,延长其术后生存期。

综上所述,本研究就大黄素作为具有免疫调节药理作用的药物,对其在大鼠肝移植后抗免疫排斥作用与 Treg 数量及功能相关影响进行了初步的研究。研究结果证实肝移植后大黄素的连续给药上调了大鼠外周血及肝内 $CD4^+CD25^+$ Treg 的数量,增强了 $CD4^+CD25^+$ Treg 免疫抑制功能,这对于进一步明确大黄素增强移植免疫抑制作用,抗移植排斥的免疫药理作用有一定的提示意义,也为研究大黄素在抗炎及免疫调节中的潜在临床应用提供了更多的研究基础及证据。

参 考 文 献

- 1 Basu S, Ghosh A, Hazra B. Evaluation of the antibacterial activity of Ventilago madraspatana Gaertn., Rubia cordifolia Linn and Lantanacamara linn.: isolation of emodin and physcion as active antibacterial agents. *Phytother Res*, 2005, 19:888-894.
- 2 刘昌, 刘原兴, 吕毅. 大黄素抑制体外淋巴细胞增殖的作用研究. *第四军医大学学报*, 2006, 27:2251-2252.
- 3 高志强, 王彩茂. 大黄素和器官纤维化. *中国中西医结合杂志*, 2005, 25:1030-1032.
- 4 Huang Q, Shen HM, Shui G, et al. Emodin inhibits tumor cell adhesion through disruption of the membrane lipid Raft-associated integrin signaling pathway. *Cancer Res*, 2006, 66:5807-5815.
- 5 孟珂伟, 宋占文, 周先亭, 等. 大黄素对大鼠原位肝移植术后急性排斥反应的干预. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11:9427-9430.
- 6 刘原兴, 沈乃营, 刘昌, 等. 大黄素在小鼠皮肤移植中的免疫抑制作用的实验研究. *第四军医大学学报*, 2009, 30:301-304.
- 7 Lin SZ, Xu XC, Tong HF, et al. Inhibitory effect of emodin on the rejection following orthotopic liver transplantation in rats. *Chin J Organ Transplant*, 2007, 28:147-149.
- 8 Edinger M. Regulatory T cells for the prevention of graft-versus-host disease: professionals defeat amateurs. *Eur J Immunol*, 2009, 39:2966-2968.
- 9 Xu G, Wang L, Chen W, et al. Rapamycin and tacrolimus differentially modulate acute graft-versus-host disease in rats after liver transplantation. *Liver Transpl*, 2010, 16:357-363.
- 10 Abe Y, Urakami H, Ostanin D, et al. Induction of Foxp3-expressing regulatory T-cells by donor blood transfusion is required for tolerance to rat liver allografts. *PLoS One*, 2009, 4:7840-7849.
- 11 黄华, 李红春, 潘海斌, 等. 肝移植受体免疫耐受的诱导及 $CD4^+CD25^+$ T 细胞的重要作用. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13:3455-3458.
- 12 Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat: techniques using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation*, 1979, 28:47-50.
- 13 Sakaguchi S. Naturally arising $CD4^+$ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22:531-562.
- 14 Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, et al. Control of T cell activation by $CD4^+CD25^+$ T suppressor T cells. *Immunol Rev*, 2001, 182:58-67.
- 15 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by $CD4^+CD25^+$ T regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance. *Immunol Rev*, 2001, 182:18-32.

(收稿日期:2010-01-03)

(本文编辑:孙荣华)

蒋力, 刘垚, 张珂, 等. 大黄素对大鼠肝移植后 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞的影响[J/CD]. *中华实验和临床感染杂志:电子版*, 2010, 4(3):271-277.