

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.01.0047

论著

KPNB1 抑制剂在小鼠移植排斥反应中的作用研究

高宇星¹, 李澍姣², 周春雷², 穆红²

(1.天津医科大学一中心临床学院, 天津 300192; 2.天津市第一中心医院临床检验科, 天津 300192)

摘要 **目的:**探讨核转运蛋白 $\beta 1$ (KPNB1) 抑制剂入核抑制因子 43 (INI-43) 在小鼠移植排斥反应中的作用。**方法:**首先进行体外实验, 将 Jurkat T 细胞分为 4 组: 空白组、活化对照组、INI-43 低剂量组和 INI-43 高剂量组; 染色质免疫共沉淀技术检测 INI-43 对活化 T 细胞核因子 (NFAT) 与白细胞介素 (IL)-2 启动子结合水平的作用; 双荧光素酶检测 INI-43 对 IL-2 启动子报告基因转录活性的影响。而后进行动物实验, 将小鼠分为 5 组: 假手术组、模型对照组、环孢素 A (CsA) 组、INI-43 低剂量组和 INI-43 高剂量组, 对实验小鼠进行皮肤移植手术, 记录移植物的存活时间; 流式细胞技术检测 INI-43 对小鼠 T 细胞表面活化分子 CD25、CD107a 的抑制情况; 酶联免疫吸附试验测定小鼠外周血 IL-2 和干扰素 (IFN)- γ 水平。**结果:**Western 印迹显示, 与活化对照组相比, INI-43 低剂量和 INI-43 高剂量组细胞核内 NFAT 含量均减少 ($Z=-1.96, t=20.88$, 均 $P<0.05$), 细胞核内 NFAT 与 IL-2 启动子的结合水平均降低 ($t=5.72, 12.51$, 均 $P<0.01$)。与活化对照组相比, INI-43 低剂量和 INI-43 高剂量组野生型 IL-2 启动子报告基因转录活性降低 ($t=12.69, 27.30$, 均 $P<0.001$); 移植物的存活时间延长 ($Z=-3.71, -3.89$, 均 $P<0.001$)。与模型对照组相比, INI-43 高剂量组 T 细胞 CD25 的表达水平下降 ($t=2.10, P<0.05$); INI-43 低剂量和 INI-43 高剂量组 CD107a ($Z=-3.40, -3.78$, 均 $P<0.01$)、外周血 IL-2 ($t=5.35, 9.07$ 均 $P<0.01$)、IFN- γ ($t=6.16, 6.81$, 均 $P<0.01$) 的表达水平均下降。**结论:**KPNB1 抑制剂 INI-43 能够抑制 NFAT 跨核转运, 抑制移植术后小鼠体内 T 细胞的活化, 缓解排斥反应。

关键词 INI-43; 核转运蛋白 $\beta 1$; 活化 T 细胞核因子; T 细胞活化; 移植排斥

中图分类号 R446.1

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)01-0047-07

Study on the role of KPNB1 inhibitor in mouse transplant rejection

GAO Yuxing¹, LI Shuxuan², ZHOU Chunlei², MU Hong²

(1.The First Central Clinical School, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2.Department of Clinical Laboratory, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

Abstract **Objective:** To investigate the role of inhibitor of nuclear import-43 (INI-43) as a karyopherin beta 1 (KPNB1) inhibitor in mouse transplant rejection. **Methods:** Firstly, *in vitro* experiments were conducted to divide Jurkat T cells into four groups: blank group, activated control group, INI-43 low-dose group, and INI-43 high-dose group; Chromatin immunoprecipitation technique was used to detect the effect of INI-43 on the binding level of nuclear factor of activated T cells (NFAT) and interleukin-2 (IL-2) promoter; Dual luciferase assay was used to detect the effect of INI-43 on the transcriptional activity of IL-2 promoter reporter genes. Subsequently, animal experiments were conducted to divide the mice into five groups: sham surgery group, model control group, cyclosporine A (CsA) group, low-dose INI-43 group, and high-dose INI-43 group. Skin transplantation surgery was performed on the experimental mice, and the survival time of the transplant was recorded; Flow cytometry was used to detect the inhibitory effect of INI-43 on the surface activation molecules CD25 and CD107a of mouse T cells; Enzyme linked immunosorbent assay was used to measure the levels of IL-2 and interferon gamma (IFN- γ) in peripheral blood of mice. **Results:** Western blotting showed that compared with the activated control group, the levels of NFAT in the nuclear of both low dose and high dose INI-43 groups decreased ($Z=-1.96, t=20.88$, both $P<0.05$), and the binding levels of NFAT and IL-2 promoter in the nuclei decreased ($t=5.72, 12.51$, both $P<0.01$). Compared with the activated control group, the transcription activity of the wild-type IL-2 promoter reporter gene was reduced in the low-dose and high-dose INI-43 groups ($t=12.69, 27.30$, both $P<0.001$). The survival time of the transplant was prolonged ($Z=-3.71, -3.89$, both $P<0.001$). Compared with the model control group, the expression level of T cell CD25 decreased in the high-dose INI-43 group ($t=2.10, P<0.05$). The expression levels of CD107a ($Z=-3.40, -3.78$, both $P<0.01$), IL-2 ($t=5.35, 9.07$, both $P<0.01$) and IFN- γ ($t=6.16, 6.81$, both $P<0.01$) in peripheral blood in the low-dose and high-dose INI-43 groups decreased. **Conclusion:** KPNB1 inhibitor INI-43 can inhibit NFAT transnuclear transport, suppress T cell activation in transplanted mice, and alleviate rejection reactions.

Key words INI-43; KPNB1; NFAT; T cell activation; transplantation rejection

基金项目 天津市医学重点学科(专科)建设资助项目(TJYXZDXK-015A)

作者简介 高宇星(2000-),女,硕士在读,研究方向:医学技术;通信作者:穆红,E-mail:tjyxshen@163.com。

目前,器官移植是终末期器官疾病和衰竭的最可持续、最具有成本效益治疗手段,常见于肾脏^[1]、肝脏^[2]、心脏^[3]、肺^[4]和胰腺^[5]等。移植排斥反应与移植物的存活密切相关,而T细胞的激活在移植排斥反应中处于中心位置。活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cells,NFAT)是活化T细胞中细胞因子和早期反应基因表达的关键转录因子。在T细胞刺激和钙释放后,钙调磷酸酶(calcineurin,CN)对NFAT中SP基序的去磷酸化暴露了核定位序列并掩盖了核输出序列,从而促进了核输入,导致转录激活^[6]。核转运蛋白 $\beta 1$ (karyopherin beta 1,KPNB1),又称为importin β ,是细胞中的一种主要的核输入受体^[7]。研究表明去磷酸化的NFAT在KPNB1的辅助下进行跨核转运^[8]。

入核抑制因子43(inhibitor of nuclear import-43,INI-43)是近年来通过以结构为基础的生物信息学而筛选出的、一种可以有效抑制肿瘤细胞中KPNB1介导的跨核膜转运物质,对KPNB1和已知的KPNB1货物NFAT、核因子- κB (NF- κB)、激活蛋白-1(AP-1)和哺乳动物CCAAT特异性转录因子(NF-Y)的核定位产生干扰,并抑制了不同组织来源的肿瘤细胞的增殖^[9]。已有实验证明其可以抑制Hela细胞中NFAT的入核,从而显著降低NFAT的活化,具有抗肿瘤活性,并且这个过程具有剂量依赖性^[10]。因此,本文以KPNB1抑制剂INI-43为主要研究对象,通过细胞及动物实验,研究在T细胞中抑制KPNB1在NFAT的跨核转运、T细胞活化和移植排斥反应中的作用机制,为开发免疫抑制剂新的治疗靶点奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂 KPNB1单克隆抗体、NFATC-1单克隆抗体(美国ABCAM公司);INI-43(美国Sigma公司);Cytochrome C、Protein A/G Beads(美国MCE公司);离子霉素(北京索莱宝生物技术有限公司);PMA/Ionomycin混合250 \times 母液(上海联科生物);多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司);全式金核质蛋白分离试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);ChIP试剂盒(美国Pierce公司);PrimeScriptTM RT Reagent Kit、SYBR Premix Ex TaqTM、RNAiso Plus(大连宝生物工程技术有限公司);脂质体Lipofectamine3000 Reagent、CD8-APC荧光一抗、CD25-PE荧光一抗(美国Invitrogen公司);CD107a-PE荧光一抗、CD3-FITC荧光一抗(美国eBioscience公司);小鼠白细胞介素2(IL-2)ELISA试剂盒、小鼠干扰素- γ (IFN- γ)ELISA试剂盒、PBMC分离试剂盒(美国TBD公司);

Super ECL Plus 超敏发光液(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理 从北京维通利华实验动物技术有限公司购买6~8周龄、雄性C57BL/6J小鼠50只(受体)和雄性BALB/c小鼠20只(供体)(体重18~22 g),饲养在中国医学科学院放射医学研究所(SPF级环境),温度 $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $55\%\pm 5\%$,以12 h为一个周期循环灯光,均为自动调节控制,所用饲料、垫料、饮用水均经高压灭菌处理(实验动物伦理号为TMUaMEC 2023017)。

皮片移植手术前,8%硫化钠溶液对C57BL/6J小鼠手术部位脱毛,剪去 $0.8\text{ cm}\times 0.8\text{ cm}$ 的皮片作为植床,供体BALB/c小鼠处死,鼠尾根部环剪下 $1\text{ cm}\times 1\text{ cm}$ 的皮片,受体同性别供体的皮片铺于植床,包扎腹部,保证皮片不从植床脱落。将小鼠随机分为5组:假手术组[$n=10$,C57BL/6J小鼠背部移植C57BL/6J小鼠的皮片];模型对照组[$n=10$,C57BL/6J小鼠背部移植BALB/c小鼠的皮片];环孢素A(CsA)组[$n=10$,C57BL/6J小鼠背部移植BALB/c小鼠的皮片+ $10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ CsA];INI-43低剂量组[$n=10$,C57BL/6J小鼠背部移植BALB/c小鼠的皮片+ $5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ INI-43];INI-43高剂量组[$n=10$,C57BL/6J小鼠背部移植BALB/c小鼠的皮片+ $20\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ I-NI-43]。小鼠皮肤移植术后第6天拆除包扎,观察记录,出现移植的皮片完全干缩、90%变黑、结痂和脱落中任一种情况即为排斥,以皮片平均存活时间(d)表示。除假手术组外其余组别小鼠均出现排斥反应后停止观察,观察截止天数为18 d,最后一只出现排斥反应的小鼠为高剂量组小鼠。

1.2.2 细胞培养 冻存的Jurkat T细胞经复苏、培养后,5 mL RPMI-1640(含10%FBS)培养基重悬,1:3传代培养, 37°C 5% CO_2 培养箱培养24 h,传代2次。经PBS洗涤Jurkat T细胞,5 mL MDME(含10%FBS)培养基重悬。6孔板接种细胞,每孔细胞数为 9.5×10^5 个/mL,与2 mL RPMI-1640(含10%FBS)培养基混匀, 37°C 5% CO_2 培养箱培养。24 h后,根据实验将培养的细胞分为4组:(1)空白对照组:正常细胞仅于培养基培养。(2)活化对照组:使用20 nmol/L 佛波酯(PMA)与0.5 mmol/L 离子霉素处理0.5 h使细胞快速活化。(3)INI-43低剂量组:先使用10 $\mu\text{mol/L}$ INI-43处理1.5 h后使用相同方法活化细胞。(4)INI-43高剂量组:INI-43剂量为20 $\mu\text{mol/L}$,其他操作同INI-43低剂量组。加入INI-43前应用DMOS将其稀释,4组细胞加入同等剂量的

DMOS 作对照。

1.2.3 Western 印迹检测 根据说明,收集胞核蛋白。按照仪器说明书,loading buffer 与胞核蛋白在 95℃下孵育 10 min。取 20 μ L 样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳处理(SDS-PAGE),并转移到 PVDF 膜上。室温下封闭膜 30 min,剪取目的蛋白印迹,在相应一抗(0.5 μ g/mL)的稀释液中 4℃摇动孵育过夜。抗体结合的膜在 TBST 溶液中漂洗 3 次,并在室温下与二抗(0.4 μ g/mL)孵育 1 h,再次清洗 3 次。而后将膜在 Super ECL Plus 超敏发光液中孵育 2 min,放入曝光盒内,暗室中将感光胶片进行曝光、显影、定影和保存。以组蛋白 His-H3 为内参纠正上样误差,靶条带与 His-H3 的灰度值之比表示相对蛋白表达。

1.2.4 染色质免疫共沉淀技术 按照说明书进行。1%的多聚甲醛固定细胞,培养细胞的培养皿中加入甘氨酸溶液室温终止反应。交联后的细胞弃去培养基,用 PBS 清洗 2 次,加入含有蛋白酶抑制剂的 PBS 和裂解液充分裂解细胞。冰上超声破碎细胞核,每组取 10 μ L 上清至一新 EP 管中作为 10% Input,保存。裂解液上清与 IP 稀释缓冲液混匀,分为 3 组:实验组(加入 8 μ g NFAT 一抗,浓度为 500 μ g/mL)、阳性对照 IP(加入 10 μ L 抗 RNA 聚合酶 II 抗体)、阴性对照 IP(加入 2 μ L 兔 IgG)。加入 20 μ L Protein A/G 磁珠(Magnetic Beads)4℃混匀,孵育 10 h。将获得的沉淀复合物用洗脱缓冲液洗脱并解交联,使用 DNA 纯化柱收集洗脱的 DNA,设计引物,PCR 检测。

1.2.5 荧光素酶报告实验 Jurkat T 细胞转染前以每孔 1.2×10^5 个细胞接种于 6 孔板,细胞数密度约为 50%时,pGL-3-promoter vector 构建 NFAT 依赖的包含 IL-2 启动子片段的荧光素酶报告质粒,与表达海肾荧光素酶的 phRL-TK 质粒共转染。所有细胞转染采用脂质体 Lipofectamine3000 进行,分为野生型质粒组、突变型质粒组、空白对照组 3 组,24 h 后进行高低浓度的 INI-43 处理和 PMA+离子霉素活化。每孔加入 100 μ L 细胞裂解液,离心取上清,加入萤火虫荧光素酶检测试剂,混匀后测定 RLT(relative light Tnit)。再加入 Renilla 荧光素酶检测工作液,混匀 ModULTs™ 微孔板型多功能光度计测定 RLT。以海肾荧光素酶为内参,测定各组相对荧光素酶活性,以报告基因细胞裂解液为空白对照。

1.2.6 流式细胞术检测 按照说明书分离小鼠外周血单个核细胞。取新鲜的小鼠外周血样加入等体积 PBS 稀释,置于与之等量的分离液液面上,500 \times g 离心 30 min。密度梯度离心后,离心管由上而下分为 4 层,取白膜状的单个核细胞层加入 PBS 清洗细胞

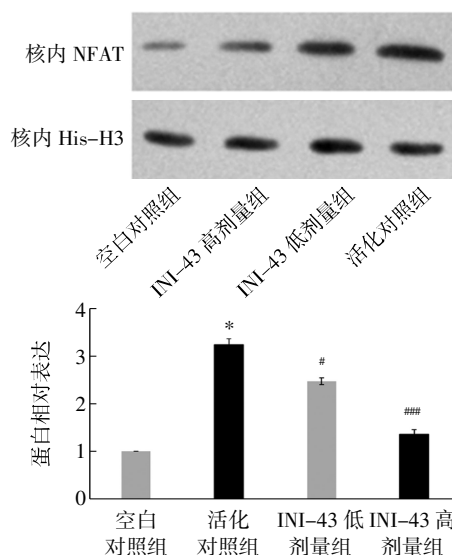
2~3 次,弃上清,获得小鼠外周血单个核细胞。取 PBMC 溶液加入一抗混合染色液(CD8-APC 荧光一抗浓度为 1 μ g/mL、CD3-FITC 荧光一抗浓度为 2.5 μ g/mL, CD25-PE 荧光一抗浓度为 1.25 μ g/mL、CD107a-PE 荧光一抗浓度为 10 μ g/mL),室温避光孵育 30 min。而后将细胞在 400 \times g 离心 5 min,流式细胞术染色液中重悬细胞,重复 3 次,使用流式细胞仪(美国 ACEA 公司)检测。

1.2.7 ELISA 检测 按照说明进行检测。将小鼠血液离心得到血清,标准品孔中加入 50 μ L 标准品,样本孔中加入待测样本 50 μ L,空白孔不加。分别将辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体加入到标准品孔与样本孔,封闭反应孔,3℃水浴锅孵育 60 min,重复洗板 5 次。加入底物 A、B,避光孵育 15 min,最后加入 50 μ L 终止液,450 nm 波长处测定 OD 值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS16.0 软件处理数据。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 存在差异有统计学意义。

2 结果

2.1 INI-43 对核内 NFAT 含量的影响 Western 印迹结果显示空白对照组 NFAT 核内含量低,与空白对照组相比,活化对照组 NFAT 核内含量增加($Z = -2.09, P < 0.05$)。与活化对照组相比,INI-43 低剂量组与 INI-43 高剂量组核内 NFAT 含量降低($Z = -1.96, P < 0.05; t = 20.88, P < 0.001$),见图 1。



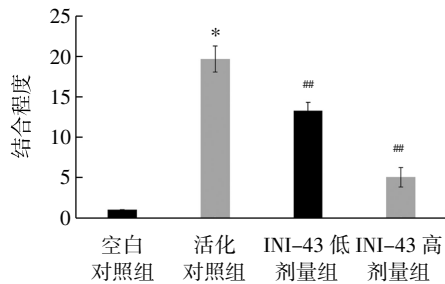
注: NFAT: 活化 T 细胞核因子; INI-43: 入核抑制因子 43; 与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与活化对照组相比, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$

图1 Western 印迹检测核内 NFAT 含量

Fig.1 Detection of nuclear NFAT content by Western blotting

2.2 INI-43 能够降低 NFAT 与 IL-2 启动子结合水平 使用染色质免疫共沉淀技术检测不同组细胞 NFAT 与 IL-2 启动子的结合程度。结果显示,空白对照组

T 细胞未活化, NFAT 极少进入胞核与 IL-2 启动子结合。与空白对照组相比, 活化对照组受到刺激后, NFAT 向核内移动, 与启动子结合调控 IL-2 的转录, NFAT 与 IL-2 启动子结合水平增加 ($Z=-2.09, P<0.05$)。与活化对照组相比, INI-43 低剂量组、INI-43 高剂量组 NFAT 与 IL-2 启动子结合程度均降低 ($t=5.72, 12.51$, 均 $P<0.01$), 见图 2。



注: INI-43: 入核抑制因子 43; IL-2: 白细胞介素-2; 与空白对照组相比, * $P<0.05$; 与活化对照组相比, ## $P<0.01$

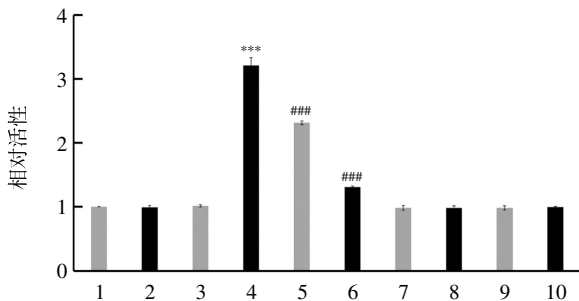
图2 染色质免疫共沉淀技术检测 IL-2 启动子与 NFAT 的结合程度

Fig.2 Detecting the binding degree between IL-2 promoter and NFAT by chromatin immunoprecipitation technique

2.3 INI-43 能减少 IL-2 启动子报告基因转录活性 双荧光素酶报告技术进一步验证 NFAT 与 IL-2 启动子间的靶向关系, 结果发现: 与空白对照组相比, 野生型活化对照组受到刺激后, 荧光素酶活性增高, 说明 NFAT 向核内移动, 与启动子结合调控 IL-2 的转录, NFAT 与 IL-2 启动子结合水平增加 ($t=-31.37, P<0.001$)。与活化对照组相比, INI-43 低剂量组与 INI-43 高剂量组细胞荧光素酶活性均减弱 ($t=12.69, 27.30$, 均 $P<0.001$), 见图 3。

野生型结合位点序列: 5'-TTATATAATATCCT-CTTCTGGAAAAATATT-3'

突变型结合位点序列: 5'-TTATATAATATCCT-



注: pmirGLO/IL2: 包含白细胞介素 2 启动子片段的双荧光素酶 miRNA 靶标表达载体; 1: pmirGLO/IL2 mut; 2: pmirGLO/IL2; 3: pmirGLO/IL2+空白对照组; 4: pmirGLO/IL2+活化对照组; 5: pmirGLO/IL2+低剂量组; 6: pmirGLO/IL2+高剂量组; 7: pmirGLO/IL2 mut+空白对照组; 8: pmirGLO/IL2 mut+活化对照组; 9: pmirGLO/IL2 mut+低剂量组; 10: pmirGLO/IL2 mut+高剂量组; 与空白对照组相比, *** $P<0.001$; 与活化对照组相比, ### $P<0.001$

图3 双荧光素酶报告检测结果

Fig.3 Results of dual luciferase report

CAAGACCTTTTATAA-3'

2.4 INI-43 能够延长移植物的存活时间 通过动物皮肤移植实验的小鼠皮片平均存活时间来评估 INI-43 对移植排斥反应的影响。结果显示, CsA 组、INI-43 低剂量组和 INI-43 高剂量组皮片平均存活时间分别为 14.59、11.42、16.79 d, 明显长于模型对照组 (8.32 d), 结果具有统计学意义 ($Z=-3.87, -3.71, -3.89$, 均 $P<0.001$)。与模型对照组相比, 假手术组小鼠移植术后皮片平均存活天数为 18 d, 结果具有统计学意义 ($Z=-4.10, P<0.001$), 见图 4。

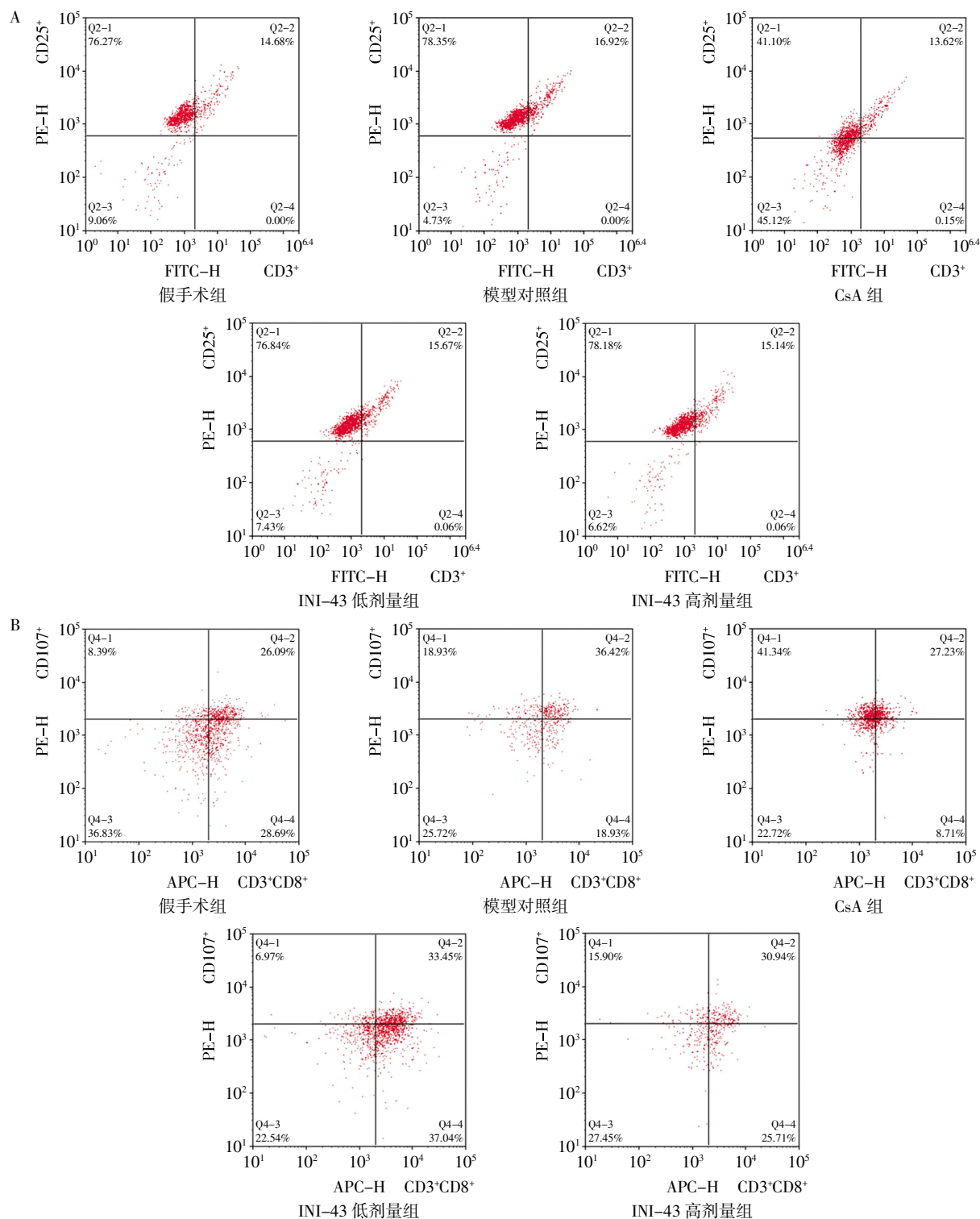


注: CsA: 环孢素 A; INI-43: 入核抑制因子 43; 1: 假手术组; 2: 模型对照组; 3: CsA 组; 4: INI-43 低剂量组; 5: INI-43 高剂量组; A: 小鼠皮片移植实验; B: 皮片存活时间统计; 与假手术组相比, *** $P<0.001$; 与模型对照组相比, ### $P<0.001$

图4 不同组小鼠皮片平均存活时间

Fig.4 Average survival time of skin grafts in different groups of mice

2.5 INI-43 能使小鼠 T 细胞 CD25、CD107a 的表达水平下降 使用流式细胞仪检测术后不同组小鼠外周血 T 细胞活化标志物 CD25 与 CD107a 的表达水平。模型组小鼠移植术后未使用任何免疫抑制剂, 引起排斥反应, T 细胞受到刺激, 活化标志物 CD25、CD107a 的表达水平增加 ($t=-2.87, Z=-3.78$, 均 $P<0.01$)。与模型组相比, CsA 组活化标志物 CD25、CD107a 的表达量减少 ($t=5.14, Z=-3.78$, 均 $P<0.01$)。INI-43 高剂量组相比于模型组 CD25 的表达水平下降 ($t=2.10, P<0.05$), CD107a 的表达水平也下降 ($Z=-3.78, P<0.01$), 而 INI-43 低剂量组 CD25 的表达水平与模型组相比没有统计学差异, 见图 5、表 1。



注:CsA:环孢素 A;INI-43:入核抑制因子 43;A:CD3⁺CD25⁺T 细胞检测散点图,B:CD3⁺CD8⁺CD107⁺T 细胞检测散点图

图 5 INI-43 对移植小鼠 T 细胞 CD25、CD107a 表达的影响

Fig.5 The effect of INI-43 on the expression of CD25 and CD107a on T cells in transplanted mice

2.6 INI-43 能使小鼠外周血 IL-2 和 IFN- γ 的表达水平下降 ELISA 检测术后不同组小鼠外周血 IL-2 和 IFN- γ 的表达水平,模型组小鼠移植术后未使用任何免疫抑制,引起排斥反应,细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 的表达量增加(与假手术组相比, $t=-13.42$ 、 -11.14 ,均 $P<0.001$)。

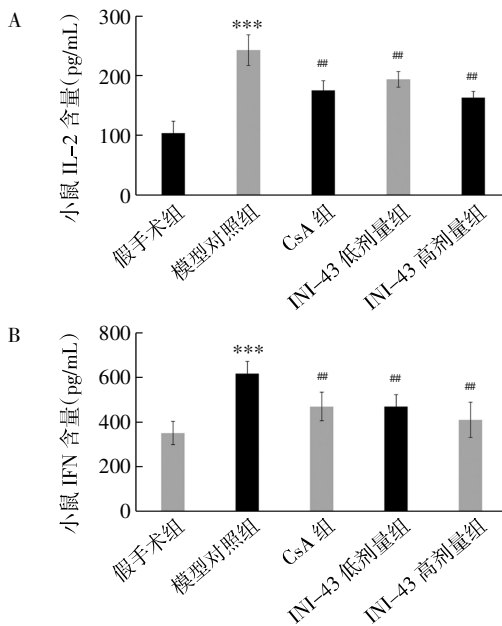
与模型组相比,CsA 组细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 的表达量下降($t=7.04$ 、 5.55 ,均 $P<0.01$)。与模型组相比,INI-43 低剂量组与 INI-43 高剂量组细胞因子 IL-2($t=5.35$ 、 9.07 ,均 $P<0.01$)和 IFN- γ ($t=6.16$ 、 6.81 ,均 $P<0.01$)的表达量均下降,见图 6 和表 2。

表 1 INI-43 对小鼠 T 细胞 CD25、CD107a 表达的影响

Tab.1 The effect of INI-43 on the expression of CD25 and CD107a in mouse T cells

组别	例数	CD3 ⁺ CD25 ⁺ T 细胞(%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD107 ⁺ T 细胞(%)
假手术组	10	14.67±1.12	26.27(25.64, 27.96)
模型组	10	16.43±1.58**	36.00(35.21, 38.82)**
CsA 组	10	13.37±1.02 ^{##}	27.89(27.06, 28.94) ^{##}
低剂量组	10	15.88±1.67	33.62(31.51, 34.64) ^{##}
高剂量组	10	15.06±1.32 [#]	30.74(28.53, 31.93) ^{##}

注:CsA:环孢素 A;与假手术组相比,** $P<0.01$;与模型对照组相比,^{##} $P<0.01$,[#] $P<0.05$



注:IL-2:白细胞介素-2;IFN- γ : γ -干扰素;CsA:环孢素 A;INI-43:入核抑制因子 43;A:ELISA 检测小鼠 IL-2 的表达水平;B:ELISA 检测小鼠 IFN- γ 的表达水平;与假手术组相比,*** $P<0.001$;与模型对照组相比,^{##} $P<0.01$

图 6 INI-43 对小鼠外周血 IL-2 和 IFN- γ 表达的影响Fig.6 The effects of INI-43 on the expression of IL-2 and IFN- γ in peripheral blood of mice表 2 INI-43 对小鼠外周血 IL-2、IFN- γ 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)Tab.2 The effects of INI-43 on the expression of IL-2 and IFN- γ in peripheral blood of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	小鼠 IL-2 含量 (pg/mL)	小鼠 IFN- γ 含量 (pg/mL)
假手术组	10	103.69±20.28	352.24±52.14
模型组	10	242.73±25.73***	618.28±54.61***
CsA 组	10	175.57±15.79 ^{##}	470.74±63.98 ^{##}
低剂量组	10	193.91±13.10 ^{##}	470.74±52.45 ^{##}
高剂量组	10	163.42±10.16 ^{##}	411.60±78.99 ^{##}

注:CsA:环孢素 A;与假手术组相比,*** $P<0.001$;与模型对照组相比,^{##} $P<0.01$

3 讨论

T 细胞活化过程中,钙调蛋白(CaM)捕获 Ca^{2+} 产生生物学活性从而激活 CN,CN 继而将 NFAT 去

磷酸化.NFAT 去磷酸化导致核定位信号(NLS)的暴露,使其可以与核转运蛋白结合进而通过核孔入核发挥转录作用^[11-13]。KPNB1 是核转运蛋白 Karyopherin β 超家族的成员,是细胞中一种主要的核输入受体,已有相关研究证实 KPNB1 介导了 NFAT 的核移位^[14]。阻断 KPNB1 与 NFAT 的相互作用,则可以抑制 NFAT 的核内转运,抑制其转录活性。近期有研究显示,KPNB1 充当载体蛋白并维持 CN 的核输入,CN 的核存在对于 CN/NFAT 信号级联反至关重要。Panther 等^[15]使用模拟 CN 核定位序列的合成肽(NLS 肽),抑制 CN 和 KPNB1 与对应于 CN(NLS 肽)之间的相互作用,阻止 CN 的核转位,抑制 CN/NFAT 信号通路,NFAT 转录活性减弱,从而抑制 T 细胞活化并防止供体心脏的急性排斥反应。

目前,已发现或合成的 KPNB1 抑制剂有 6 种,即伊维菌素、二氨基唑衍生物、进口唑、INI-43、核生长抑制素 1A 和入核抑制因子 60(iINI-60)。INI-43 是被计算机筛选的 KPNB1 结合分子,Van der watt 等^[10]研究显示,相比于伊维菌素和进口唑,INI-43 处理细胞后在更短时间内显著抑制 NFAT 入核,抑制其活性,说明 INI-43 是更有效的核输入抑制剂,并阻断了肿瘤细胞系中 AP-1、NFAT 和 NF- κ B 的入核。本实验结果证实,INI-43 可显著抑制活化 T 细胞核内 NFAT 含量,阻止 NFAT 向核内移动且具有浓度依赖性,与文献报道一致^[9-10]。NFAT 是淋巴细胞中的主要转录因子之一,活化入核后可与几种细胞因子基因的转录调节区域结合而促进转录,包括肿瘤坏死因子 α (TNF α)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-5、IL-4、IL-3 和 IL-2^[12]。在 T 细胞活化过程中,NFAT 与 IL-2 启动子的结合是 T 细胞活化的标志性事件,通过促进 IL-2 分泌加快 T 细胞活化的进程。本实验结果显示,INI-43 能降低 NFAT 与 IL-2 启动子的结合水平,减少野生型 IL-2 启动子报告基因转录的活性,表明 INI-43 具有抑制 T 细胞活化的潜能。

为进一步验证 INI-43 具有免疫抑制剂的潜能,课题组建立了小鼠皮片移植的模型,证实了 INI-43 可以延长移植物的存活时间。移植排斥反应的关键是受体淋巴细胞的激活和增殖,尤其是 T 细胞。活化的 T 细胞分泌大量 IL-2,IL-2 又通过 IL-2 受体传递活化信号,进一步促进 T 细胞的活化与增殖。CD25 是 IL-2 受体的 α 链。静止的 T 细胞、B 细胞和单核细胞很少表达 CD25(IL-2 受体)。高水平的 CD25 由 T 细胞受体(T cell receptor,TCR)激活诱导的 T 细胞瞬时表达,可作为 T 细胞活化的标志。本

研究证实,INI-43 可显著抑制移植小鼠体内 IL-2 水平和 T 细胞 CD25 的表达,表明 INI-43 通过抑制 NFAT 的核内转运,抑制 T 细胞的活化,从而降低移植排斥反应的强度。Th1 介导的细胞免疫应答在移植排斥反应中占据主导地位。CD4⁺T 细胞活化后分化为 Th1 细胞,Th1 细胞通过其标志性的细胞因子 IFN- γ 激活其下游效应细胞 CD8⁺T 细胞,使 CD8⁺T 细胞活化成为细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic lymphocyte,CTL)。CD107a 又称作溶酶体相关膜蛋白,是一种存在于溶酶体中的高度糖基化的跨膜蛋白,是 CD8⁺T 细胞的活化标志^[16]。在本研究中,通过流式细胞术与酶联免疫吸附试验测定,发现 INI-43 能降低移植小鼠体内 IFN- γ 水平,降低 CD8⁺T 细胞 CD107a 的表达,表明 INI-43 通过抑制 T 细胞活化,抑制 Th1 细胞免疫应答,降低 CD8⁺T 细胞的活化程度,减轻移植排斥反应的细胞杀伤效应,且 T 细胞受刺激后,高剂量的 INI-43 更能抑制动物体内 CD107a 的表达,具有浓度依赖性。

当然,本研究仍具有局限性。NFAT 作为与 T 细胞活化相关的重要物质,在移植术后排斥反应和移植抗宿主病的产生起到决定性的作用。经研究证明,NFAT 通过与 KPNB1 相互作用发生核易位,继而 NFAT 激活,促使 T 细胞活化^[8,17]。然而其两者间的相互作用机制尚不清楚,因此,未来可进一步研究 KPNB1 与 NFAT 两者间相互作用的机制,探究其与物质的经典入核途径相同之处以及核转运蛋白 α (Importin α) 在其中的作用。

参考文献:

- [1] KIM P Y, SHOGHI A, FANANAPAZIR G. Renal transplantation: immediate and late complications[J]. Radiol Clin North Am, 2023, 61(5): 809–820.
- [2] YAGI S, HIRATA M, MIYACHI Y, et al. Liver regeneration after hepatectomy and partial liver transplantation[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8414.
- [3] SHAH K S, KITTLESON M M, KOBASHIGAWA J A. Updates on heart transplantation[J]. Curr Heart Fail Rep, 2019, 16(5): 150–156.
- [4] KOLAITIS N A. Lung transplantation for pulmonary arterial hypertension[J]. Chest, 2023, 164(4): 992–1006.
- [5] CZARNECKA Z, DADHEECH N, RAZAVY H, et al. The current status of allogenic islet cell transplantation[J]. Cells, 2023, 12(20): 2423.
- [6] MANCINI M, TOKER A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(11): 810–820.
- [7] CHI R A, VAN DER WATT P, WEI W, et al. Inhibition of Kpn β 1 mediated nuclear import enhances cisplatin chemosensitivity in cervical cancer[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 106.
- [8] AJAYI-SMITH A, VAN DER WATT P, MKWANAZI N, et al. Novel small molecule inhibitor of Kpn β 1 induces cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells[J]. Exp Cell Res, 2021, 404(2): 112637.
- [9] SHI Q, LIN M, CHENG X, et al. KPNB1-mediated nuclear import in cancer[J]. Eur J Pharmacol, 2023, 955: 175925.
- [10] VAN DER WATT P J, CHI A, STELMA T, et al. Targeting the nuclear import receptor Kpn β 1 as an anticancer therapeutic[J]. Mol Cancer Ther, 2016, 15(4): 560–573.
- [11] SODERHOLM J F, BIRD S L, KALAB P, et al. Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin- β [J]. ACS Chem Biol, 2011, 6(7): 700–708.
- [12] CARRETTA M D, ALARCÓN P, JARA E, et al. Andrographolide reduces IL-2 production in T-cells by interfering with NFAT and MAPK activation[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 602(2–3): 413–421.
- [13] PENG Y, TAO Y, ZHANG Y, et al. CD25: a potential tumor therapeutic target[J]. Int J Cancer, 2023, 152(7): 1290–1303.
- [14] MACIAN F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(6): 472–484.
- [15] PANTHER F, STRASEN J, CZOLBE M, et al. Inhibition of nuclear translocation of calcineurin suppresses T-cell activation and prevents acute rejection of donor hearts[J]. Transplantation, 2011, 91(6): 597–604.
- [16] WIECHMANN A, WILDE B, TYCZYNSKI B, et al. CD107a (+) (LAMP-1) cytotoxic CD8(+) T-Cells in lupus nephritis patients[J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 556776.
- [17] ZENG Y, WANG Y, WU Z, et al. MIR-9 enhances the transactivation of nuclear factor of activated T cells by targeting KPNB1 and DYRK1B[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2015, 308(9): C720–C728.

(2024-08-06 收稿)