

文章编号 1006-8147(2018)05-0385-05

论 著

## 不同 miR-146a 表达条件下 Treg 细胞体内回输对小鼠心脏移植免疫排斥反应的影响

于 洋<sup>1,2</sup>, 曹际森<sup>1,3</sup>, 王多伟<sup>1</sup>, 戚 峰<sup>1</sup>

(1.天津医科大学总医院普通外科,天津 300052;2.天津港口医院外科,天津 300456;3.天津市第三中心医院肝胆外科,天津 300170)

**摘要** 目的:本研究探讨调控 miR-146a Treg 细胞体内回输对小鼠心脏移植免疫排斥反应的影响。方法:流式分选 Treg 细胞并进行体外扩增。转染试剂分别上调和下调 Treg miR-146a 表达。建立小鼠心脏移植模型,设立对照组,空白 Treg 组,miR-146a 上调组,miR-146a 下调组。移植后回输 Treg,观察生存曲线,病理分级,测定受体脾 T 细胞亚群,RT-PCR 检测供心 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 表达。结果:细胞扩增 10 倍后 miR-146a 表达无明显变化,并能有效调控 miR-146a 表达。回输后空白 Treg 组(中位生存期 11 d)及上调组(中位生存期 13 d)生存时间延长,病理分级降低( $P<0.05$ );上调组更为明显( $P<0.05$ );下调组(中位生存期 7 d)生存时间缩短,病理分级升高( $P<0.05$ ),Th1 细胞数量( $28.6\%\pm 2.7\%$ )及供心 IFN- $\gamma$  表达( $1.12\pm 0.11$ )升高( $P<0.05$ )。结论:体外能有效分选和扩增 Treg 细胞,并保证 miR-146a 的表达。回输 Treg 明显抑制小鼠心脏移植急性排斥反应,上调组抑制功能增强,下调组抑制功能减弱。

**关键词** miR-146a;调节 T 细胞;心脏移植;T 细胞亚群;急性排斥反应

中图分类号 R617

文献标志码 A

### The effect of Tregs-infusion under different miR-146a expression on the immune rejection of cardiac allograft in mice

YU Yang<sup>1,2</sup>, CAO Ji-sen<sup>1,3</sup>, WANG Duo-wei<sup>1</sup>, QI Feng<sup>1</sup>

(1. Department of General Surgery, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Department of Surgery, Tianjin Harbor Hospital, Tianjin 300456, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effect of regulated Tregs-infusion on cardiac allograft rejection in mice. **Methods:** Tregs in the spleen of mice in vitro by flow cytometry were separated and proliferated. The cardiac allograft mice model were built and four groups were established: NS control group, empty group, miR-146a-up-regulated group and miR-146a-down-regulated group. We regulated the expression of miR-146a in Tregs, and transfused the Tregs to the cardiac allograft mice model. The survival curve, pathological grade and the T cell subsets in the recipient spleens in different groups were compared. We also detected the expression of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 in donor heart. **Results:** The proliferation reagent effectively proliferated 10 times the number of Tregs, and there was no significant difference between the expressions of miR-146a before and after the proliferation ( $P>0.05$ ). Survival time of mice in control group (median survival time: 11 days) and miR-146a-up-regulated group (median survival time: 13 days) was longer than that of miR-146a-down-regulated group (median survival time: 7 days), and the pathological grade was lower ( $P<0.05$ ); survival time of mice in miR-146a-down-regulated group was shorter than control group and miR-146a-up-regulated group, and the pathological grade was higher ( $P<0.05$ ). The number of Th1 ( $28.6\%\pm 2.7\%$ ) and the expression of IFN- $\gamma$  ( $1.12\pm 0.11$ ) in donor heart in miR-146a-down-regulated group were higher ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Tregs can be successfully separated and proliferated without affecting the expression level of miR-146a in vitro. Infusion of Tregs can significantly suppress the acute rejection of cardiac allograft in mice, while the suppression function in up-regulated group is stronger than that of down-regulation group.

**Key words** miR-146a; regulatory T cells; cardiac allograft; T cell subset; acute rejection

研究发现,调节 T 细胞负责维持体内免疫稳态和免疫耐受<sup>[1]</sup>,随着对其功能研究的不断深入,相关人员已将其应用于抑制器官移植的免疫耐受。近年

来相关研究表明 miRNA 通过调控免疫相关基因的表达影响免疫系统的发育及功能<sup>[2]</sup>,其中 miR-146a 是目前研究较为广泛的 miRNA 之一,它在不同物种间的序列高度保守,并且在器官移植免疫排斥过程中发挥着重要的作用<sup>[3]</sup>。大量研究发现 miR-146a 在 Treg 细胞的抑制功能的发挥上起着重要的调控

基金项目 国家自然科学基金资助项目(8157020853)

作者简介 于洋(1983-),男,主治医师,硕士在读,研究方向:普通外科;通信作者:戚峰,E-mail:qf@medmail.com.cn。

作用<sup>[4-5]</sup>。在此基础上,本研究的主要目的是探讨 Treg 细胞体内回输对小鼠心脏移植免疫排斥反应的影响以及进一步调控 miR-146a 的表达对 Treg 细胞抑制功能的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 实验材料** 实验选用 6~8 周龄雄性 C57, Balb/c 小鼠(购于中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心,体质量 20~25 g),饲养于天津医科大学总医院实验动物中心。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 Treg 细胞的分选及体外扩增** 无菌条件下获取及处理脾脏,加入 PBS 制备脾单细胞悬液,单细胞悬液白细胞计数,用 PBS 调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ ,流式标本的制备后立刻上机分选 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞,采用德国美天旎公司的 Treg 细胞体外扩增试剂盒按说明书完成 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞的体外扩增。

**1.2.2 Treg 细胞转染** 对扩增之后的 Treg 细胞采用广州锐博公司的 miR-146a agomir 和 miR-146a antagomir 试剂进行细胞转染,分别实现对 Treg 细胞 miR-146a 表达水平的上调和下调。具体实验步骤如下:用完全 1640 培养基重悬细胞后,进行细胞计数并检测细胞活力。然后用完全培养基按  $3 \times 10^5/\text{mL}$  的密度接种在 24 孔板中。将培养板置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 30 min。分别在相应孔中加入 100 nmol/L agomir 及 150 nmol/L antagomir 对 Treg 细胞转染,之后置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 3 d 后进行下一步检测。

**1.2.3 实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)** 采用 RT-PCR 方法检测转染后调节 T 细胞的 miR-146a 表达水平。具体步骤包括:总 miRNA 提取,miRNA 逆转录,实时定量 PCR,用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  将原始数据( $\Delta C_t$  值)转化成线性形式进行统计处理,再以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算 miRNA 的相对表达量。

**1.2.4 小鼠腹腔异位心脏移植模型的建立及处理** 取 Balb/c 小鼠心脏作为供体,以 C57 小鼠作为受体,构建小鼠腹腔异位心脏移植模型<sup>[6-7]</sup>。实验分为 NS 对照组、Treg 对照组、agomir 组、antagomir 组。于移植手术完成后立即经阴茎背静脉推注相应转染后的 Treg 细胞(数量均为  $10^6$  个)。术后小鼠分为两部分,一部分小鼠每日经腹壁触摸移植心脏搏动情况,直到供心停跳,记录各组供心存活时间。另一部分小鼠在术后第 5 天处死,取部分移植心脏组织用福尔马林固定,石蜡包埋后切片,行 HE 染色;流式检测受体脾脏中 T 细胞亚群及 Th 细胞的比例;RT-PCR 技术检测术后 5 d 供心 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-

17mRNA 的表达水平,实时定量 PCR 的实验方法同前,相关因子引物序列如下:

IFN- $\gamma$  forward: 5'-ATGAACGCTACACACTGAA TC-3';

IFN- $\gamma$  reverse: 5'-CCATCCTTTTGCCAGTTCC TC-3';

IL-4 forward: 5'-AATTGCCTCACATTGTCACT-3';

IL-4 reverse: 5'-CTCTCATGATCGTCTTTAG CC-3';

IL-17 forward: 5'-TGAAGGCAGCAGCGATCA-3';

IL-17 reverse: 5'-GGA AGTCCTTGGCCTCAGT GT-3';

$\beta$ -actin 上游: 5'-GCCAGAAGATGACCCAGCT C-3';

$\beta$ -actin 下游: 5'-CCAGTGGTACGGCCAGAGG-3';

**1.3 统计学处理** 所有实验均重复 6 次,所得实验数据运用 SPSS19.0 软件包进行统计学处理。计量资料表示为  $\bar{x} \pm s$ , 两样本之间的比较采用  $t$  检验,3 组以上比较采用方差分析(one-way ANOVA),组间均数间多重比较采用最小显著差法 (least significant difference, LSD)。

## 2 结果

**2.1 Treg 细胞扩增前后的纯度及 miR-146a 表达水平检测** Treg 细胞经扩增试剂盒扩增后,流式检测结果显示细胞数量达扩增前的 10 倍,纯度为 92.3%,如图 1 所示。RT-PCR 结果显示,扩增前后 Treg 细胞 miR-146a 的表达水平无显著差异( $P > 0.05$ ),见表 1。

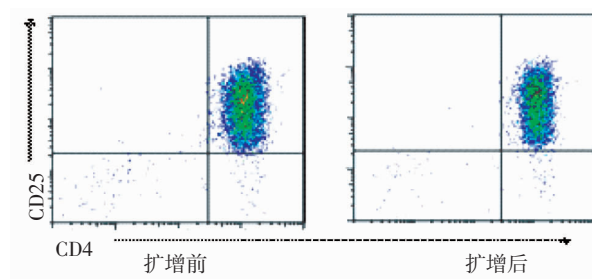


图 1 Treg 细胞扩增前后的纯度检测

Fig 1 The purity of Treg cells before and after cell amplification

表 1 扩增前后 miR-146a 的表达水平检测

Tab 1 Expression of miR-146a before and after cell amplification

分组	n	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	t	P
扩增前	6	1	0.393	0.702
扩增后	6	0.987±0.081		

**2.2 各组小鼠心脏移植术后生存曲线分析** 如图 2 所示,与生理盐水对照组相比,输注空白 Treg 细胞能够明显延长供心的生存时间,在此基础上应用

miR-146a agomir 上调 Treg 细胞中 miR-146a 的表达,能够使供心生存时间进一步延长( $P<0.05$ ),与之相反的是,输注下调 miR-146a 的 Treg 细胞却使得供心生存时间较空白 Treg 组显著缩短( $P<0.05$ )。

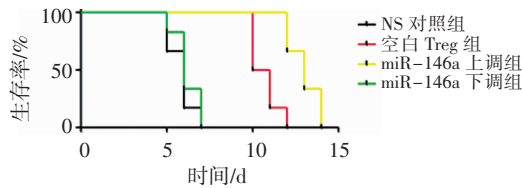


图2 各组小鼠心脏移植术后生存曲线分析

Fig 2 The survival curves of mice after heart transplantation in each group

2.3 各组小鼠心脏移植术后 5 d 供心病理分析 对术后 5 d 各组供心进行了病理学分析,如图 3、表 2、3 所示,miR-146a 上调组的急性排斥反应病理分级较空白 Treg 组显著降低( $P<0.05$ ),而 miR-146a 下调组急性排斥反应病理分级较空白 Treg 组显著升高( $P<0.05$ )。

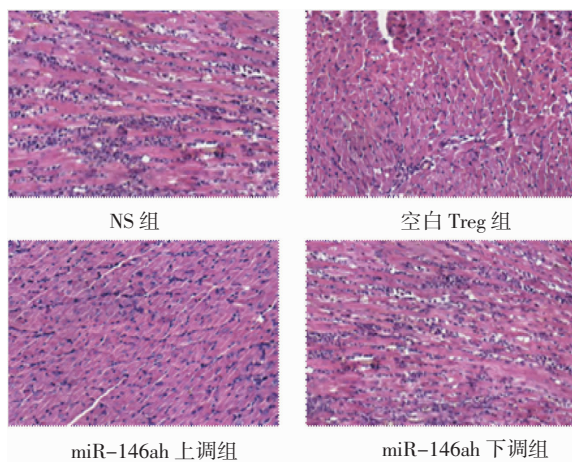


图3 各组移植心脏 HE 染色

Fig 3 HE-staining of donor hearts in each group

表2 各组移植心脏病理分级

Tab 2 The pathological grades of donor hearts in each group

分组	n	病理分级				$\chi^2$	P
		0 级	1 级	2 级	3 级		
NS 组	6	0	0	1	5	30.52	0.000
空白 Treg 组	6	0	2	3	1		
miR-146a 上调组	6	2	3	1	0		
miR-146a 下调组	6	0	0	2	4		

表3 各组间病理结果两两比较(P)

Tab 3 Paired comparison of the pathological grades in each group(P)

分组	空白 Treg 组	miR-146a 上调组	miR-146a 下调组
NS 对照组	0.034	0.001	0.652
空白 Treg 组		0.002	0.003
miR-146a 上调组			0.001

2.4 各组小鼠心脏移植术后 5 d 受体脾脏 T 细胞亚群检测 流式结果显示,与空白 Treg 组相比,miR-146a 上调组 CD4<sup>+</sup>T 细胞数量显著降低( $P<0.05$ ),CD8<sup>+</sup>T 细胞数量无明显区别( $P>0.05$ ),而 miR-146a 下调组 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞数量无明显区别( $P>0.05$ ),如图 4 和表 4、5 所示。

表4 各组受体小鼠术后 5 d 脾脏 T 细胞亚群分析

Tab 4 Cells of spleen in recipients by flow cytometry on the 5th day after transplantation

分组	n	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
NS 对照组	6	25.18±2.42	10.26±1.24
空白 Treg 组	6	20.02±1.87	9.12±1.09
miR-146a 上调组	6	16.02±1.09	9.26±0.72
miR-146a 下调组	6	20.82±0.74	8.03±0.46
F		8.71	0.89
P		0.005	0.762

表5 各组间 CD4<sup>+</sup>结果两两比较(P)

Tab 5 Paired comparison of CD4<sup>+</sup> in each group(P)

分组	空白 Treg 组	miR-146a 上调组	miR-146a 下调组
NS 对照组	0.004	0.001	0.008
空白 Treg 组		0.002	0.533
miR-146a 上调组			0.005

2.5 各组受体小鼠心脏移植术后 5 d 脾脏 Th 细胞亚群检测 与空白 Treg 组相比,miR-146a 上调组 Th1、Th2 和 Th17 细胞数量无明显差别( $P>0.05$ );而 miR-146a 下调组 Th1 细胞数量显著升高( $P<0.05$ ),Th2 和 Th17 细胞数量无明显区别( $P>0.05$ ),如表 6、7 所示。

表6 各组受体小鼠术后 5 d 脾脏 Th 细胞亚群分析

Tab 6 Th cells of spleen in recipients by flow cytometry on the 5th day after transplantation

分组	n	Th1 细胞	Th2 细胞	Th17 细胞
NS 对照组	6	17.2±2.6	10.5±1.8	12.2±0.7
空白 Treg 组	6	16.4±2.2	10.2±1.7	10.8±1.2
miR-146a 上调组	6	16.9±1.8	10.9±1.4	11.1±1.4
miR-146a 下调组	6	28.6±2.7	11.5±2.1	10.0±1.8
F		82.8	0.974	0.877
P		0.001	0.781	0.540

表7 各组间 Th1 细胞结果两两比较(P)

Tab 7 Paired comparison of Th1 cells in each group(P)

分组	空白 Treg 组	miR-146a 上调组	miR-146a 下调组
NS 对照组	0.234	0.701	0.002
空白 Treg 组		0.267	0.003
miR-146a 上调组			0.002



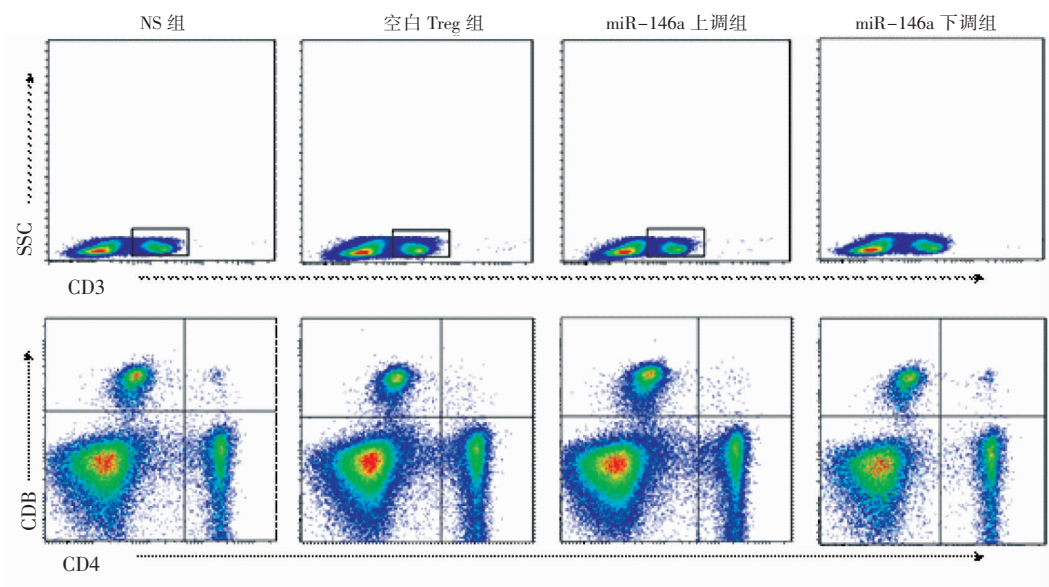


图 4 各组术后 5 d 受体脾脏 T 细胞亚群流式检测  
Fig 4 T cells of spleen in recipients by flow cytometry on the 5th day after transplantation

2.6 各组受体小鼠心脏移植术后 5 d 供心相关细胞因子表达水平 如表 8、9 所示,与空白 Treg 组相比, miR-146a 上调组供心 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-17 的表达水平无明显差别( $P>0.05$ );而 miR-146a 下调组供心 IFN- $\gamma$  的表达水平显著升高( $P<0.05$ ), IL-4、IL-17 的表达水平无明显区别( $P>0.05$ )。

表 8 各组受体小鼠术后 5 d 供心相关细胞因子检测  
Tab 8 Expression of related cytokines of donor hearts in recipients on the 5th day after transplantation

分组	<i>n</i>	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-17
NS 对照组	6	1	1	1
空白 Treg 组	6	0.62 $\pm$ 0.17	0.98 $\pm$ 0.12	0.97 $\pm$ 0.08
miR-146a 上调组	6	0.64 $\pm$ 0.05	0.99 $\pm$ 0.08	0.89 $\pm$ 0.10
miR-146a 下调组	6	1.12 $\pm$ 0.11	1.02 $\pm$ 0.16	0.96 $\pm$ 0.09
<i>F</i>		97.50	0.766	0.838
<i>P</i>		0.002	0.960	0.890

表 9 各组间 IFN- $\gamma$  结果两两比较( $P$ )  
Tab 9 Paired comparison of the expression of IFN- $\gamma$  in each group( $P$ )

分组	空白 Treg 组	miR-146a 上调组	miR-146a 下调组
NS 对照组	0.004	0.008	0.002
空白 Treg 组		0.667	0.002
miR-146a 上调组			0.002

3 讨论

器官移植的最终目的是受体对移植物产生类似于自身耐受的状态。早在 1995 年便有相关报道 Treg 细胞具有维持免疫耐受的作用。相关器官移植模型建立也表明其在维持免疫耐受的重要作用。Treg 细胞作为一种治疗手段在几十年前出现<sup>[8]</sup>。Lee

等通过小鼠骨髓移植模型证明了回输 Treg 细胞可以有效的防止移植物抗宿主病的发生或延缓病程进展。Treg 是目前用于 I 期临床试验较多的调节 T 细胞,其通过细胞接触式和非细胞接触式两种方式实现免疫抑制。但是单一的抑制性细胞因子治疗却不能达到满意的治疗及抑制效果。而互噬作用可能会成为未来临床免疫耐受研究的新途径<sup>[9]</sup>。miRNA 近年来成为免疫学领域的新热点,其能调控相关基因来影响免疫功能,进而参与更多自身免疫疾病发展。研究表明,miR-146a 在器官移植的免疫排斥过程中起着重要的调控作用,而且研究人员证实,miR-146a 对于 Treg 细胞的功能发挥也起着重要作用<sup>[10-11]</sup>。基于相关文献,我们将不同 miR-146a 表达条件下 Treg 细胞在小鼠心脏移植后回输体内,假设被移植心脏抗原激活效应 T 细胞,可被 Treg 细胞识别为自身反应性 T 细胞,从而被抑制,由此在受体内长期存在的,针对移植抗原记忆的 Treg 细胞,形成自身耐受的耐受模式,这就是的本课题的研究思路。Treg 细胞是通过细胞间的直接作用来实现的<sup>[12]</sup>,结合体外抑制实验得出要想实现有效的抑制功能,必须要满足足量的细胞数量。大量动物实验表明,要想达到回输的有效作用,细胞数量要达到  $10^6$  以上,而常规体外分选所得的 Treg 细胞数量极为有限<sup>[13]</sup>,因此获得足够细胞数量,一直困扰从事细胞回输的研究人员,2009 年研究人员首次成功地用体外扩增 Treg 细胞解决了细胞数量不足的困扰<sup>[14]</sup>。本实验采用扩增试剂盒有效获得满意细胞数量,并维持了 Treg 细胞的细胞表型及免疫功能。我们的实验结果表明,体内

回输空白 Treg 及上调 miR-146a 表达后的 Treg 可减轻急性免疫排斥反应,延长移植心脏存活期,减轻移植心脏病理炎症反应,上调组作用更为明显。这进一步证实了 miR-146a 对 Treg 细胞起着重要的调控作用,上调 Treg 细胞中 miR-146a 的表达能够进一步增强其抑制功能,其具体机制也有待于进一步深入研究。但是,我们的实验也发现回输下调 miR-146a 的 Treg 细胞后,生存时间较空白 Treg 组缩短,病理分级明显升高。在对移植 Th 细胞的流式检测中我们发现下调组 Th1 较 Treg 对照组及上调组明显升高,对应的细胞因子 IFN- $\gamma$  也明显升高。由此可知下调 miR-146a 的 Treg 细胞抑制功能受到破坏,其具体机制可能是下调 Treg 细胞的 miR-146a 表达水平使其抑制 Th1 分泌 IFN- $\gamma$  的功能受损<sup>[5]</sup>。综上所述,体外有效的分选和扩增 Treg 细胞,且不影响 miR-146a 的表达。回输 Treg 明显抑制小鼠心脏移植急性排斥反应,上调组抑制功能增强,下调组抑制功能减弱。但是回输后的 Treg 细胞能否在体内进行扩增,或者细胞不断凋亡对于移植免疫反应的影响还需进一步研究。关于 miR-146a 和 Treg 细胞在心脏移植免疫耐受的作用及机制还需要更深入的研究。

#### 参考文献:

- [1] Xu L, Xu W, Wen Z K, et al. In situ prior proliferation of CD4 (+) CCR6(+) regulatory T cells facilitated by TGF- $\beta$  secreting DCs is crucial for their enrichment and suppression in tumor immunity[J]. PLoS One, 2011, 6(5):e20282
- [2] Liu Z, Wang D, Hu Y L, et al. MicroRNA-146a negatively regulates PTGS2 expression induced by Helicobacter pylori in human gastric epithelial cells[J]. J Gastroenterol, 2013, 48(1):86
- [3] Fujino M, Zhu P, Cai S, et al. MicroRNAs Involved in Acute Rejection and Tolerance in Murine Cardiac Allografts[J]. Exp Clin Transplant, 2016, 14(4):424
- [4] Brunstein C G, Miller J S, Cao Q, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics[J]. Blood, 2011, 117(3):1061
- [5] 倪一鸣, 冯强, 梁宏立. 小鼠异位心脏移植模型的建立[J]. 中华器官移植杂志, 2002(6):20
- [6] Abbott C P, Lindsey E S, Creech O J, et al. A technique for heart transplantation in the rat[J]. Arch Surg, 1964, 89:645
- [7] Ono K, Lindsey E S. Improved technique of heart transplantation in rats[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1969, 57(2):225
- [8] Laurence A, Tato C M, Davidson T S, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell Generation[J]. Immunity, 2007, 26(3):371
- [9] Miossec P, Korn T, Kuchroo V K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells[J]. N Engl J Med, 2009, 361(9):888
- [10] Tang Y, Luo X, Cui H, et al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(4):1065
- [11] Yan C, Zhang B B, Hua H, et al. The dynamics of Treg/Th17 and the imbalance of Treg/Th17 in clonorchis sinensis-Infected mice[J]. PLoS One, 2015, 10(11):e0143217
- [12] Fujisawa Y, Nabekura T, Kawachi Y, et al. Enforced ROR( $\gamma$ ) expression in haematopoietic stem cells increases regulatory T cell number, which reduces immunoreactivity and attenuates hypersensitivity in vivo[J]. Asian Pacific J Allergy Immunol, 2011, 29(1):86
- [13] Choi J, Ritchey J, Prior J L, et al. In vivo administration of hypomethylating agents mitigate graft-versus-host disease without sacrificing graft-versus-leukemia[J]. Blood, 2010, 116(1):129
- [14] Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juscinska J, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>T regulatory cells[J]. Clin Immunol, 2009, 133(1):22
- [15] Yuan J, Bagley J, Iacomini J. Hyperlipidemia promotes Anti-Donor Th17 responses that accelerate allograft rejection[J]. Am J Transplant, 2015, 15(9):2336

(2018-03-08 收稿)

欢迎投稿

欢迎订阅