

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.23.006

PD-L1 Ig 在缓解肾移植急性排斥反应中的免疫调节作用*

刘叶伟¹ 孙己晶¹ 李香玲¹ 孙秀菊¹ 张海波² 曹波³ 郭民¹ 陈学勋^{1Δ}

(1 潍坊医学院附属医院肾内科 山东 潍坊 261000; 2 潍坊市峡山生态经济开发区人民医院肾内科 山东 潍坊 261000;

3 潍坊医学院附属医院泌尿外科 山东 潍坊 261000)

摘要 目的:探讨 PD-L1 Ig(Programmed death ligand-1 immunoglobulin, 程序性死亡配体-1 免疫球蛋白)在缓解肾移植急性排斥反应中的免疫调节作用。**方法:**选择健康成年雄性 Lewis 大鼠 24 只作为供体,另取 24 只健康雄性 Wistar 大鼠作为受体。所选大鼠 3 个月龄,体重 300 g±30 g,创建肾移植大鼠模型,并将其随机分为三组,空白对照组,对照组,和 PD-L1 Ig 组。空白对照组:灌注液,肾动脉灌注 3 分钟。PD-L1 Ig 组:含 1 mL 的 PD-L1 Ig 的灌注液,肾动脉灌注 3 分钟。对照组不进行额外灌注操作。术后观察三组大鼠食欲、精神状态及生存情况。7 天后取血标本观察肌酐、尿素氮、 γ -干扰素(Interferon- γ , IFN- γ), 白细胞介素-2(Interleukin-2, IL-2), 白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10)水平,同时三组各处死 3 只大鼠行肾脏病理学检查。**结果:**1.病理:对照组及空白对照组大鼠较模型大鼠有改善,仍有较多的炎细胞浸润,间质水肿,红细胞管型,肾小管上皮细胞脱落。而 PD-L1 Ig 组大鼠较模型大鼠、对照组及空白对照组有显著改善。2.生存状态和肾功能:PD-L1 Ig 组大鼠生存时间最长 50 天,平均存活时间和体重均显著高于对照组和空白对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);血肌酐、尿素氮水平显著低于对照组和空白对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。3.细胞因子变化:PD-L1 Ig 组 IFN- γ 、IL-2 水平显著低于空白对照组、对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);PD-L1 Ig 组 IL-10 水平显著高于空白对照组、对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**PD-L1 Ig 可降低 IL-2 和 IFN- γ ,提升 IL-10,调节移植肾急性排斥反应的细胞因子平衡,改善肾功能,延长移植肾存活时间。

关键词:肾移植急性排斥反应;PD-L1;细胞因子

中图分类号:R617;R692 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)23-4425-04

Immunomodulatory Effects of PD-L1 Ig in Relieving Acute Renal Allograft Rejection*

LIU Ye-wei¹, SUN Ji-jing¹, LI Xiang-ling¹, SUN Xiu-ju¹, ZHANG Hai-bo², CAO Bo³, GUO Min¹, CHEN Xue-xun^{1Δ}

(1 Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang, Shandong, 261000, China;

2 People's Hospital of Weifang Xiaoshan Ecological Economic Development Zone, Department of Nephrology, Weifang, Shandong,

261000, China; 3 Weifang Medical College Hospital Affiliated Hospital, Urology, Weifang, Shandong, 261000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the immunomodulatory effects of PD-L1 Ig in relieving acute rejection of renal transplantation. **Methods:** Twenty-four healthy adult male Lewis rats were selected as donors, and 24 healthy male Wistar rats were selected as recipients. The selected rats were 3 months old and weighed 300 g±30 g. A kidney transplant rat model was established and randomly divided into three groups: blank control group, control group, and PD-L1 Ig group. The blank control group: perfusate, renal artery perfusion for 3 minutes, PD-L1 Ig group: perfusion with 1 ml of PD-L1 Ig, renal artery perfusion for 3 minutes, and the control group did not perform additional perfusion. The appetite, mental state and survival of the three groups were observed postoperatively. After 7 days, blood samples were taken to observe the changes of creatinine, urea nitrogen, IFN- γ , IL-2 and IL-10. At the same time, three rats in each group died of renal pathology. **Results:** 1. Pathology: Compared with the model rats, the control group and the blank control group had more inflammatory cell infiltration, interstitial edema, red blood cell cast, and renal tubular epithelial cells. The PD-L1 Ig group showed significant improvement compared with the model rats, the control group and the blank control group. 2. living condition and renal function: The survival time of PD-L1 Ig group was 50 days, the average survival time and body weight were significantly higher than that of the control group and the blank control group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). Serum creatinine and urea nitrogen levels were significantly lower than the control group and the blank control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). 3. cytokine change: The levels of IFN- γ and IL-2 in PD-L1 Ig group were significantly lower than those in the blank control group and the control group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The level of IL-10 in PD-L1 Ig group was significantly higher

* 基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(2017WS172)

作者简介:刘叶伟(1993-),硕士研究生,主要研究方向:肾脏病学,电话:13053650779, E-mail:504223949@qq.com

Δ 通讯作者:陈学勋,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:肾脏病学/血液净化学,电话:15966081167, E-mail:chenxuexun1981@163.com

(收稿日期:2019-03-31 接受日期:2019-04-26)

than that in the blank control group and the control group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** PD-L1 Ig can reduce IL-2 and IFN- γ , increase IL-10, regulate the balance of cytokines in acute rejection of transplanted kidney, improve renal function, and prolong the survival time of transplanted kidney.

Key words: Acute renal allograft rejection; PD-L1; Cytokine

Chinese Library Classification (CLC): R617; R692 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)23-4425-04

前言

肾移植是慢性肾功能衰竭常用治疗方法之一,而移植后由于抗原识别、淋巴细胞增殖、分化,进而对靶细胞产生一系列损伤,产生排斥反应^[1]。急性排斥反应发生率为 20%-50%,是影响移植肾存活率的重要因素之一^[2]。既往研究提示,细胞因子在急性排斥反应中发挥重要作用^[3]。其中 IL-2、IFN- γ 等 Th1 型细胞因子明显增殖,参与免疫排斥,加重靶器官损伤^[4,5],而 IL-10 作为诱导免疫耐受的细胞因子则表达降低^[6]。如何调节细胞因子变化,缓解急性排斥反应是一个研究热点。既往研究表明,程序性死亡配体-1 (Programmed death ligand-1 PD-L1) 在免疫反应中发挥负性调节作用,能够抑制促炎因子表达,促进 IL-10 等细胞因子增殖,诱导免疫耐受^[7]。本研究从此角度出发,通过在移植肾大鼠行程序性死亡配体-1 免疫球蛋白 (Programmed death ligand-1 immunoglobulin, PD-L1 Ig) 肾动脉灌注,观察 PD-L1 Ig 对肾移植大鼠细胞因子的变化及生存状态和肾功能情况,评价 PD-L1 Ig 在缓解移植肾急性排斥反应中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 于潍坊医学院动物实验室中选择成年雄性 Lewis 大鼠共 24 只作为供体,雄性 Wistar 大鼠 24 只作为受体。大鼠 3 个月龄,体重 $300 \text{ g} \pm 30 \text{ g}$ 。饲养条件 SPF 级。所有实验均采用大鼠实验,所有程序均经潍坊医学院附属医院动物伦理委员会批准通过。

1.1.2 主要试剂及仪器 手术器械均购自苏州医疗器械厂;手术显微镜来自镇江光学仪器有限公司;血清肌酐试剂盒购于 Roche 公司; γ -干扰素、IL-2、IL-10 ELISA 试剂盒及 PD-L1 Ig 均来自美国 R&D;全自动生化分析仪是 Beckman Instruments, Inc. 其他常用试剂从 Sangon 购买。

1.2 方法

1.2.1 建立肾移植模型 供体大鼠建模前 12 h 禁食,腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉和固定手术桌上,经中线切口显露左肾,结扎肾上腺动静脉分支,切断肾动脉,4℃ 灌注含肝素生理盐水经腹主动脉至肾动脉,然后分离输尿管和将左肾静脉连接导管后取出肾脏保存于 4℃ 含肝素生理盐水中。受体大鼠同样步骤麻醉固定。受体肾暴露后移除,供肾通过导管连接,开放动脉静脉后移植肾供血发红,尿液从输尿管流出 2-3 分钟。大鼠术后不限饮食^[8]。

1.2.2 分组 将肾移植大鼠模型随机分为三组,空白对照组,对照组,和 PD-L1 Ig 组,每组各 8 只。三组均接受青霉素 ($104 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$) 肌肉注射和环孢素 A ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射,共持续 7 天。空白对照组:灌注液,肾动脉灌注 3 分钟,PD-L1 Ig 组:用 PD-L1 Ig 0.1 mg/kg 灌注液,肾动脉灌注 3 分钟,对照组不进行额外灌注操作。

1.2.3 肾脏病理检查 7 天后每组处死 3 只,取移植肾切开置于 10% 多聚甲醛中固定、石蜡包埋、苏木素-伊红 (HE) 染色、200 倍光镜下取 3 个视野观察肾脏病理情况。

1.2.4 一般情况 术后观察大鼠的生存状态、饮食及基本活动。

1.2.5 检测指标 移植 7 天后采取负压方法收集腹主动脉血,室温静置 30 分钟后,4℃、3600 rpm 离心,上清液保存于 -20℃,全生化自动分析仪检测血肌酐、尿素氮水平。用 ELISA 法检测血清 IFN- γ 、IL-2、IL-10 水平。根据标准物质浓度和对应 OD 值绘制线性回归方程,基于线性回归方程计算样品浓度。

1.3 统计学处理采用

采用 SPSS 19.0 对数据进行分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较采用 t 检验和 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肾移植病理

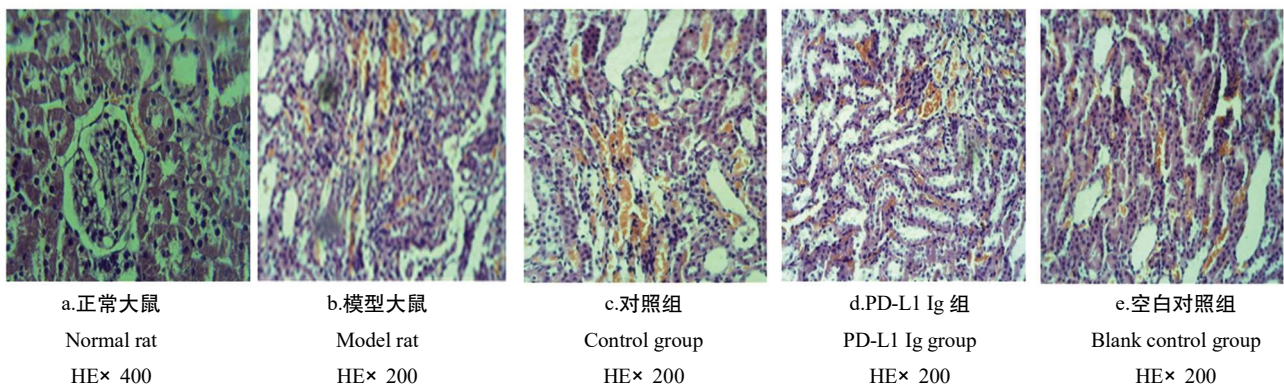


图 1 各组大鼠移植肾脏病理变化

Fig.1 Pathological changes of transplanted kidney in each group

建立肾移植排斥反应模型,可见肾间质水肿,炎性细胞浸润,肾小管上皮细胞脱落,红细胞管型。7天后每组处死3只病理检查,可见对照组及空白对照组大鼠较模型大鼠有改善,仍有较多的炎细胞浸润,间质水肿,红细胞管型,肾小管上皮细胞脱落。而PD-L1 Ig组大鼠较模型大鼠、对照组及空白对照组有显著改善。

2.2 生存状态与肾功能

表1 三组生存状态与肾脏功能比较

Table 1 Comparison of survival status and renal function in three groups

Index	Control group	Blank control group	PD-L1 Ig group
Survival time(Day)	15.1± 8.1	16.2± 7.9	35.7± 15.4*
Weight(g)	221.4± 52.1	237.9± 46.1	305.8± 41.4*
Serum creatinine(μmol/L)	89.2± 12.3	87.6± 11.5	68.8± 11.2*
Blood urea nitrogen (mmol/L)	7.83± 2.46	7.72± 2.31	4.39± 2.49*

Note: Compared with the control group * $P<0.05$.

2.3 IFN-γ、IL-2、IL-10 在血清中的表达

PD-L1 Ig组IFN-γ、IL-2水平低于空白对照组及对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),空白对照组与对照组之间差异无统

三组大鼠术后都可以自主翻身,精神状态略差,术后1天基本恢复正常饮食及基本活动。空白对照和对照组,术后第10天出现排尿异常、萎靡不振、死亡,PD-L1 Ig组第18天开始出现上述情况。PD-L1 Ig组大鼠生存时间最长50天,平均存活时间和体重均显著高于对照组和空白对照组($P<0.05$)。血肌酐、尿素氮水平显著低于对照组和空白对照组($P<0.05$),对照组与空白对照组比较均无统计学意义($P>0.05$), (表1)。

计学意义($P>0.05$);而PD-L1 Ig组IL-10水平明显高于空白对照组及对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),空白对照组与对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$), (表2)。

表2 三组大鼠血清细胞因子表达水平比较

Table 2 Comparison of serum cytokine expression levels in three groups of rats

Index	Control group	Blank control group	PD-L1 Ig group
IFN-γ(ng/mL)	492.6± 83.2	513.5± 94.3	385.5± 74.8*
IL-2(ng/mL)	834.3± 172.3	818.4± 197.8	592.6± 163.2*
IL-10(ng/mL)	139.4± 63.5	134.7± 71.8	273.8± 95.6*

Note: Compared with the control group * $P<0.05$.

3 讨论

急性排斥反应是影响移植肾存活率以及功能的重要危险因素之一^[9,10],如何有效预防急性排斥反应发生,诱导免疫耐受,是目前研究的一个热点。既往研究表明,PD-1/PD-L1信号系统与免疫调节有关,在外周器官中,它可能通过调节自身反应性T细胞、B细胞,从而影响免疫应答^[11]。有实验将携带PD-1基因的重组腺病毒注射入重组纯系小鼠体内来治疗类狼疮综合,结果小鼠蛋白尿较前减轻,双链DNA抗体浓度下降,小鼠的肾脏病理损害更是减少^[12],因此将其用于抑制器官移植排斥反应,诱导免疫耐受成为近来研究热点。

有作者通过腺病毒转染等方式使移植肾高表达PDL1,从而减轻移植肾病理炎性细胞浸润,间质水肿的排斥反应表现,延长移植物的存活时间^[2]。不同的近交系大鼠有不同的主要组织相容性复合体(MHC)和次要组织相容性复合体(MHC),这可能会导致急性排斥反应。因此,其广泛应用于器官移植急性排斥反应的实验研究中^[13]。本研究选择近交系Lewis大鼠和Wistar大鼠作为供体和受体,建立肾移植排斥反应模型,模型大鼠存在明显的肾间质水肿,炎性细胞浸润,红细胞管型,小管上皮细胞脱落等排斥反应表现,说明建模成功。单纯应用环孢素A的对照组和空白对照组,虽较模型组均有改善,但仍有较

多炎细胞浸润、间质水肿、红细胞管型、肾小管上皮细胞脱落等,而PD-L1 Ig组大鼠较模型大鼠、对照组及空白对照组有显著改善。实验结果表明,PD-L1 Ig可减轻移植肾大鼠急性排斥反应,与以往报道一致^[2,13]。

PD-1基因是1992年Ishida等最先从凋亡的小鼠T细胞杂交瘤2B4.11中克隆到的^[14]。PD-1,即CD279,是一个约为55 kDa的I型跨膜糖蛋白,在活化的T淋巴细胞、胸腺细胞及髓系细胞表面表达旺盛。当T、B淋巴细胞抗原受体激发后,PD-1分子呈现诱导性上调状态,由其介导的信号可在自身、移植、感染免疫中发挥负性调节作用。PD-1可降低CD28介导的信号,能够抑制Akt激酶磷酸化、糖代谢及Bcl-XL的表达,最终对淋巴细胞的增殖及细胞因子的产生起到抑制作用,并能诱导细胞分裂周期停滞^[15]。PD-L1对诱导调节性T细胞的产生也具有重大作用^[12]。既往研究表明,PD-L1基因可减少小鼠心脏移植排斥反应,延长移植存活时间^[16]。同时PD-1信号系统与多种细胞因子的分泌也互相影响,如IL-1、IL-2等促炎因子可诱导PD-1的表达,促使其发挥负反馈抑制作用。且PD-1抑制细胞因子的分泌程度较其抑制细胞增殖的程度强^[15]。目前人们对PD-1基因在肾移植中的作用研究较少,本实验采取移植肾大鼠模型肾动脉灌注的方式,分别设置PD-L1 Ig组,对照组及空白对照组,建立肾移植排斥反应模型,通过比较术后大鼠的生

存状态及肾功能变化,发现 PD-L1 Ig 可能会延缓大鼠肾移植急性排斥反应的发生,改善预后,而诱导免疫耐受的过程可能与体内细胞因子的变化相互影响,本研究发现肾移植大鼠体内血浆 IL-2、IFN- γ 水平降低,而 IL-10 水平有所升高。

细胞因子是诱导、参与免疫及炎症反应中的关键介质^[4],多种细胞因子在生物体内互相制约、影响,产生协同或拮抗的生物学作用,从而形成复杂、精细的细胞因子网络,介导生物体对移植物的免疫排斥或耐受。移植物辅助性 T 淋巴细胞(Th)和细胞因子失衡是导致急性排斥反应的关键因素^[17]。CD4⁺T 细胞受抗原刺激后可增殖分化为 Th1 和 Th2 亚群。Th1 细胞主要分泌 IL-2、IFN- γ 、TNF- β ,而 Th2 细胞分泌 IL-4、IL-6、IL-10 等,上述细胞因子分别在诱导免疫排斥及免疫耐受中发挥重要作用^[18]。既往研究认为,在同种异体排斥反应中 IL-2 发挥重要作用。IL-2 可以促进 T 细胞的增殖、分化,同时诱导 B 细胞的成熟、表达,从而引发免疫排斥。此外,通过 IL-2 受体的存在,IL-2 也可使 T 细胞克隆增生,同时激活细胞毒性 T 淋巴细胞,使其发挥细胞毒功能,间接介导排斥反应^[9]。IFN- γ 是细胞排斥反应中重要的细胞因子,可促进 T 细胞增殖分化,使 B 细胞表达旺盛,大量分泌抗体,从而参与免疫过程,对移植物产生损伤。研究表明,肾移植术后急性排斥反应患者体内 IFN- γ 水平术后一周开始升高,发生排斥反应前达到最高水平,而在未排斥组则保持较低水平^[10]。IL-10 是一种多效性抑制炎症反应的负性调节细胞因子,对 T、B 细胞、单核细胞等多种免疫细胞均可发挥作用。IL-10 可抑制 Th1 细胞增殖及相关细胞因子合成,诱导 Th1 向 Th2 偏移,从而发挥抑制免疫反应,诱导免疫耐受的作用^[11]。通常在急性排斥反应中,Th1 型细胞因子表达增高,而 Th2 型细胞因子不表达或低表达。本实验通过 PD-L1 Ig 肾动脉灌注,发现 PD-L1 Ig 组大鼠体内的 IL-2、IFN- γ 水平明显低于其他两组,IL-10 明显高于其他组,考虑 PD-L1 可能通过改变 Th1/Th2 之间的平衡,抑制 IL-2、IFN- γ 等 Th1 型细胞因子增殖分化,减少对移植物的损伤,降低排斥反应;并诱导 IL-10 等 Th2 型细胞因子表达,使其发挥免疫耐受作用,避免过度损伤,从而缓解急性排斥反应的发生,保护移植肾功能。

综上所述,本实验发现,PD-L1 可能会调节 Th1/Th2 细胞因子平衡,降低 IL-2 和 IFN- γ ,提升 IL-10,改善受体肾功能,缓解急性排斥反应,延长大鼠生存时间,这为日后研究 PD-L1 治疗肾移植提供了理论基础。

参考文献(References)

- [1] Davis S. Acute antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients[J]. Transplantation reviews (Orlando, Fla), 2017, 31(1): 47-54
- [2] Xu BX, Zhang YX, Chen XX, et al. Inhibitory effect of adenovirus mediated PD-L1 local gene transfection on renal transplant rejection[J]. Int J Clin Exp Med, 2017, 10(2): 4035-4041
- [3] Chen Z, Bouamar R, Van Schaik RH, et al. Genetic polymorphisms in IL-2, IL-10, TGF- β 1, and IL-2RB and acute rejection in renal transplant patients[J]. Clinical transplantation, 2014, 28(6): 649-655
- [4] 樊斌,李德卫,冯渊. TNF- α 和 IL-2 在肝移植急性排斥反应中的表达及意义[J]. 中国普通外科杂志, 2011, 20(01): 11-14
- [5] 洪良庆,黄正宇,欧阳斌. IL-12P70 及 IFN- γ 在预测肾移植术后急性排斥反应中的应用[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2010, 31(03): 422-427
- [6] 胡维显,李勇,赫建帅. 肝移植受者白介素 -10 表达与急性排斥反应的关系研究[J]. 器官移植, 2010, 1(05): 269-271+ 275
- [7] Li T, Ma R, Zhu JY. PD-1/PD-L1 costimulatory pathway in duced mouse islet transplantation immune tolerance [J]. Transplant Proc, 2015, 47: 165-170
- [8] 何云锋,程洪林,张尧. 改良型小鼠肾移植动物模型的建立[J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(04): 514-515
- [9] Krisl JC, Alloway RR, Shield AR, et al. Acute Rejection Clinically Defined Phenotypes Correlate With Long-term Renal Allograft Survival[J]. Transplantation, 2015, 99(10): 2167-2173
- [10] Jalalzadeh M, Mousavinasab N, Peyrovi S. The impact of acute rejection in kidney transplantation on long-term allograft and patient outcome[J]. Nephro-urology monthly, 2015, 7(1): e24439
- [11] Colleen S Curran, Sarthak Gupta, Ignacio Sanz. PD-1 immunobiology in systemic lupus erythematosus [J]. Journal of Autoimmunity, 2019, 97
- [12] Ding H, Wu X, Wu J, et al. Delivering PD-1 inhibitory signal concomitant with blocking ICOS co-stimulation suppresses lupus-like syndrome in autoimmune BXSB mice [J]. Clinical immunology (Orlando, Fla.), 2006, 118(2-3): 258-267
- [13] 丁涵露,吴雄飞. PD-L1 及其受体 PD-1 在急性肾移植排斥患者肾组织中的表达及意义. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 892-894
- [14] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death[J]. The EMBO journal, 1992, 11(11): 3887-3895
- [15] 张目涵,贺欣,路瑶. PD-1/PD-L 的作用机制及其在炎症性肠病中的关系进展[J]. 现代免疫学, 2018, 38(06): 513-518
- [16] Sui X, Ma J, Han W, et al. The anticancer immune response of anti-PD-1/PD-L1 and the genetic determinants of response to anti-PD-1/PD-L1 antibodies in cancer patients [J]. Oncotarget, 2015, 6(23): 19393-19404
- [17] de Graaf GN, Dieterich M, Hesselink DA, et al. Follicular T helper cells and humoral reactivity in kidney transplant patients [J]. Clinical and experimental immunology, 2015, 180(2): 329-340
- [18] 斯迪克江·尼亚孜,戎瑞明. 肾移植术后调节性 T 细胞的影响因素[J]. 器官移植, 2016, 7(05): 399-402