

大鼠心脏移植急性排斥反应与 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞钙离子的相关性研究^{*}

余春俊,王 涛,涂星强,邹小明[△](南方医科大学,广州 510515)

【摘要】 目的 探讨 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率、胞内 Ca²⁺浓度与大鼠心脏移植急性排斥反应(AR)的相关性。**方法** 用流式细胞仪分选大鼠对照组(T₀)、假手术组(T₁)、实验组(T₂)术后第 1、3、5、7、9、11 天外周血 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞,测量胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率、胞内 Ca²⁺浓度,进而分析 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率、胞内 Ca²⁺浓度与大鼠心脏移植后 AR 的相关性。**结果** T₂ 组 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率、胞内 Ca²⁺浓度较 T₁、T₀ 组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与心脏移植后 AR 程度的 Spearman 相关系数分别为 0.494($P<0.01$)、0.688($P<0.01$)。**结论** 外周血 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率、胞内 Ca²⁺浓度与大鼠心脏移植 AR 密切相关,有助于早期监测心脏移植术后 AR。

【关键词】 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞; 心脏移植; 急性排斥反应; 钙离子

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.07.009 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)07-0885-03

Correlation between acute rejection in rat heart transplant with CD8⁺CD28⁺T lymphocyte calcium ion^{*} YU Chun-jun, WANG Tao, TU Xing-qiang, ZOU Xiao-ming[△] (Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

【Abstract】 Objective To explore the correlation between the acute rejection (AR) in rat heart transplant (HT) with extracellular ⁴⁵Ca²⁺ uptake rate and intracellular Ca²⁺ concentration of CD8⁺CD28⁺T lymphocytes. **Methods** The flow cytometry was used to sort the peripheral blood CD8⁺CD28⁺T lymphocytes on postoperative 1, 3, 5, 7, 9, 11 d in the rat control group (T₀), sham operation group (T₁) and experiment group (T₂), the extracellular ⁴⁵Ca²⁺ uptake rate and intracellular Ca²⁺ concentration were measured, and then the correlation between extracellular ⁴⁵Ca²⁺ uptake rate and intracellular Ca²⁺ concentration of CD8⁺CD28⁺T lymphocytes was analyzed. **Results** The extracellular ⁴⁵Ca²⁺ uptake rate and intracellular Ca²⁺ concentration of CD8⁺CD28⁺T lymphocytes in the T₂ group were significantly increased compared with the T₁ group and T₀ group, the difference was statistically significant ($P<0.05$); the ⁴⁵Ca²⁺ uptake rate and intracellular Ca²⁺ concentration of CD8⁺CD28⁺T lymphocytes in the T₂ group were positively correlated with the degree of AR, the Spearman correlation coefficients were 0.494 and 0.688 respectively ($P<0.01$). **Conclusion** Peripheral blood extracellular ⁴⁵Ca²⁺ uptake rate and intracellular Ca²⁺ concentration of CD8⁺CD28⁺T lymphocytes are closely correlated with the AR in rat HT, which is conducive to early monitor AR after HT.

【Key words】 CD8⁺CD28⁺T lymphocytes; heart transplantation; acute rejection; calcium ion

急性排斥反应(AR)是心脏移植后最常见的并发症之一,尽管移植经验逐渐丰富,免疫抑制剂和治疗方案不断改进,长期用药仍伴随免疫过度抑制、感染及恶性肿瘤等风险。此外,移植后 AR 处理不及时可导致移植物体快速失去功能,病死率极高。如何能找到确切有效的监测方法并能准确判断器官移植术后免疫微嵌合现象,减少使用免疫抑制药物的周期,是器官移植免疫耐受研究的焦点。CD28 是表达在 T 淋巴细胞表面的共刺激分子,是细胞激活、信号传导、细胞增殖所需的第 2 刺激信号受体^[1]。钙信号传递在 T 淋巴细胞激活、增殖和分化中也起关键作用^[2]。已发现使用抗 CD28 抗体可以引起器官移植的动物对供体移植器官产生免疫耐受^[3],本文研究 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞活化期间胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率及胞内 Ca²⁺浓度与心脏移植 AR 的关系。以进一步明确心脏移植 AR 与钙

信号的关系,探索诊断心脏移植后 AR 的新思路。

1 材料与方法

1.1 一般材料 WISTAR 大鼠 36 只,SD 大鼠 108 只,体质量为 250~300 g,雄性,由南方医科大学实验动物中心提供。

1.2 仪器与试剂 Mouse-Anti-Anti-Rat-CD8 RPE Cy5、Mouse-Anti-Rat-CD28 RPE、Mouse IgG1 • RPE、Mouse IgG1 • RPE Cy5、Fluo-3-AM(eBioscience 公司);PBS 缓冲液、红细胞裂解液(eBioscience 公司);流式细胞仪(FACSCalibur 美国 B. D 公司);⁴⁵CaCl₂(中科院原子能研究所),液闪仪(Beckman LS 6000)(中山大学同位素实验室)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 T₀ 组(正常 SD 大鼠)、T₁ (假手术对照组:将大鼠腹部切开假手术,即模拟移植手术过程,而未真正移

^{*} 基金项目:新疆维吾尔自治区科技计划资助项目(201233149)。

作者简介:余春俊,男,硕士,医师,主要从事胸心血管外科工作。 [△] 通讯作者,E-mail:nanfangxm_z@163.com。

植)、T₂ 组(同种心脏移植组, WISTAR→SD 大鼠)各 36 只, 随即各分为 6 组, 每组 6 只。

1.3.2 模型制作及病理分级 心脏移植模型的制作参见高旭辉等^[4]的方法, 心脏移植 AR 的分级参照 Stanford 标准^[5]。

1.3.3 外周血采集 术后第 1、3、5、7、9、11 天分别取 T₀、T₁、T₂ 组大鼠 6 只, 取每只大鼠腹主动脉外周血 2 mL, 均采集血标本 3 份(100 微升/份)。

1.3.4 胞外⁴⁵Ca²⁺摄取量测定 1 份大鼠血标本(100 微升/份); 加入红细胞裂解液 2 mL, 裂解 20 min; 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液; 加入磷酸盐缓冲液(PBS)3.5 mL、Anti-Rat CD8 RPE Cy5 和 Anti-Rat CD28 RPE 抗体剂量均为 10 μL, 各管与抗体避光孵育 20 min; 1 000 r/min 离心 5 min, 然后弃去上清液收集外周血单核细胞; 加入 PBS 100 μL, 离心(1 000 r/min, 10 min); 加入冷冻液 5 mmol/L NaCl; 5 mmol/L KCl; 1 mmol/L MgCl₂; 1 mmol/L CaCl₂; 20 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸; 10 mmol/L 葡萄糖; 0.1% 牛血清清蛋白; pH 7.4; 调整细胞浓度为 100 个/微升。分别加入圆底 96 孔培养板中(冰上操作), 100 微升/孔, 然后按 1:1 比例加入含有(185 kBq of ⁴⁵CaCl₂)的冷冻液, 加样后置于含 5%CO₂ 的 37 ℃ 孵箱中培养 3 min, 每孔加入 50 μL 冷稀释液[40 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸(pH 7.0); 100 mmol/L MgCl₂; 10 mmol/L CaCl₂]终止反应, 使用玻璃纤维滤纸收集细胞, 干燥后用液闪仪测定每分钟脉冲数。

1.3.5 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞胞内 Ca²⁺浓度测定 2 份大鼠血标本(100 微升/份), 分别置于标记 1 号阴性对照管、2 号钙离子测定管内。1 号管: 加 Mouse IgG1 • RPE、Mouse IgG1 • RPE Cy5; 2 号管: 加 Mouse-Anti-Rat-CD8 • RPE Cy5、Mouse-Anti-Rat-CD28 • RPE、Flou-3-AM 各 10 μL, Flou-3-AM 终浓度为 10 μmol/L; 抗体及荧光探针孵育 20 min; 然后用红细胞裂解液 2 mL, 裂解 10 min; 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液; 各管再加入 PBS 3.5 mL, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液收集单核细胞; 标本中加入 PBS 至 100 μL, 进行上机监测。

1.4 统计学处理 使用 SPSS21.0 统计软件进行分析。T₂ 组分别与 T₁、T₀ 组比较采用 Dunnet-*t* 检验; T₂ 组术后 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率、胞内 Ca²⁺浓度相关关系进行非参数相关分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

T₂ 组在术后第 1 天只发现局灶性炎细胞浸润及小灶状心肌细胞坏死, 第 3、5 天排斥反应最重, 可见弥漫性多类型炎性细胞浸润, 明显心肌间质水肿、出血和心肌坏死, 第 7 天次之, 但仍可见炎性细胞浸润、心肌细胞坏死, 第 9、11 天减轻(表 1)。术后 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率、胞内 Ca²⁺浓度分别于 T₂ 组和 T₀ 组、T₁ 间比较, 差异均有统计学意义(*P* < 0.05), T₀ 组和 T₁ 组组间比较差异无统计学意义(*P* > 0.05), 见图 1、2。T₂ 组术后不同时间点间 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率、胞内 Ca²⁺浓度与 AR 程度之间 Spearman 相关系数为 0.494(*P* < 0.01)、0.688(*P* < 0.01), 提示术后心脏 AR 程度与术后 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率、胞内 Ca²⁺浓度呈显著正相关关系。

表 1 T₂ 组术后 AR 分级随时间变化表(*n*)

AR 等级	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 9 天	第 11 天
0 级	0	0	0	0	0	0

续表 1 T₂ 组术后 AR 分级随时间变化表(*n*)

AR 等级	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 9 天	第 11 天
1 级	0	0	0	0	1	2
2 级	5	0	1	3	3	3
3 级	1	3	2	2	2	1
4 级	0	3	3	1	0	0
平均等级	2.17	3.5	3.33	2.67	2.17	1.83

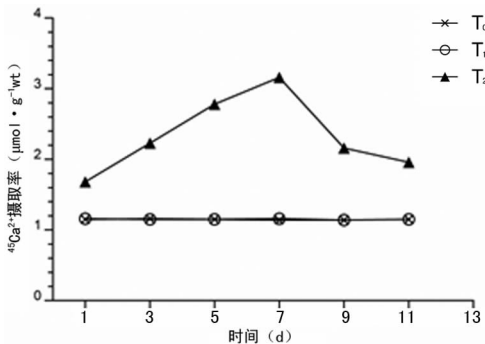


图 1 术后不同时间点 T₀、T₁、T₂ 各组 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率

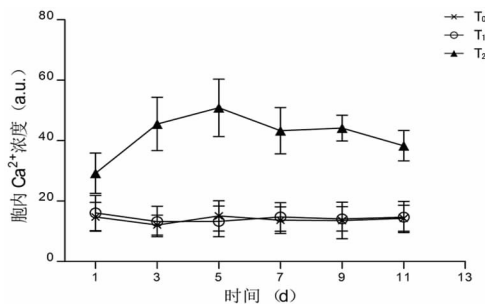


图 2 术后不同时间点 T₀、T₁、T₂ 各组 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞胞内 Ca²⁺浓度

3 讨 论

研究提示, 在 AR 发生时, CD28⁺CD8⁺T 淋巴细胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率及胞内 Ca²⁺浓度较正常大鼠或创伤大鼠显著增高, 且随 AR 的加重而增高, 表明胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率及胞内 Ca²⁺浓度与术后心脏移植发生 AR 密切相关, 与手术创伤无关; 测定 CD28⁺CD8⁺T 淋巴细胞外⁴⁵Ca²⁺摄取率、胞内 Ca²⁺浓度可成为一种新的 AR 简便、有效的诊断方法。

医学免疫学表明, CD28⁺只表达在 T 淋巴细胞的共刺激分子, 90% 分布 CD4⁺T 淋巴细胞, 50% 分布 CD8⁺T 淋巴细胞。同种移植排斥反应最主要的机制是由 T 淋巴细胞介导的细胞免疫反应, CD8⁺T 淋巴细胞激活后成为 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞, 即细胞毒性 T 细胞, 起杀伤靶细胞的作用, 因此监测 CD28⁺T 淋巴细胞激活状态, 对心脏移植术后的 AR 具有关键作用。钙离子为中心的 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞激活的机制十分复杂过, 仅内质网中释放的 Ca²⁺, 还不足以激活 T 细胞, 但内质网中 Ca²⁺的释放或消耗, 可启动 T 淋巴细胞膜上的 Ca²⁺通道, Ca²⁺由胞外进入胞内, 2 个部分的 Ca²⁺浓度累加才可激活第 2 信使整个反应过程, 同时细胞内高浓度的钙离子与钙调蛋白结合激活钙调磷酸酶, 引起 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞核转录因子去磷酸化, 核转录因子转位至核内将活化信号传至细胞核内调控核内基因转录, 最终 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞分

泌的颗粒酶和穿孔素最终杀伤移植物靶细胞^[6-7]。同位素⁴⁵Ca²⁺ (T_{1/2}=163 d, β 射线能量为 0.25 MeV) 与生物体中的 Ca²⁺ 具有相同的生物活性, 由于⁴⁵Ca²⁺ 发出的 β 射线能被闪烁计数器探测, 因此, 只要测量⁴⁵Ca²⁺ 进入细胞内的数量变化就可快速、直接的反映 CD8⁺CD28⁺ T 淋巴细胞外的⁴⁵Ca²⁺ 摄取量^[8]。本研究测得 CD28⁺CD8⁺ T 淋巴细胞外⁴⁵Ca²⁺ 摄取率及胞内 Ca²⁺ 浓度至术后第 3 天同趋势增长, 此后至第 7 天胞外⁴⁵Ca²⁺ 摄取率仍同幅度增长, 而胞内 Ca²⁺ 浓度却逐渐降低增长幅度甚至降低, 可能与引起细胞激活的钙离子浓度已达到所需的阈值范围后, 部分胞内 Ca²⁺ 填充钙池所需引起。本研究结果显示, ⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度未见明显变化, 原因可能是未能激活细胞免疫反应, 而胞内 Ca²⁺ 浓度相对于⁴⁵Ca²⁺ 摄取率的变化程度却稍明显; 手术组⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度变化关系的比较中发现, 术后第 7~9 天⁴⁵Ca²⁺ 摄取率显著下降, 而胞内 Ca²⁺ 浓度却经过“平台期”后逐渐下降; 以上均说明在心脏移植术后无论⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度在急性排斥反应所起作用的复杂性。其原因可能也包括手术创伤引起的应激反应, 即通过过氧化应激机制, 进而引起氧自由基抑制 Ca²⁺-ATP 酶活性, 影响该泵功能的修饰等相关^[9]。手术组与假手术组相比较, 无论⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度都变化显著, 除与排斥反应引起钙离子为中心的 CD8⁺CD28⁺ T 淋巴细胞激活之外, 还存在心肌缺血再灌注损伤可能。心肌缺血再灌注损伤发病机制主要是氧自由基生成、细胞凋亡和钙超载^[10]。缺血期由于缺血细胞膜去极化以及电压敏感性的慢钙通道的开放, 一部分 Ca²⁺ 会进入细胞内。这些内流的 Ca²⁺ 能否增加细胞内 Ca²⁺ 水平, 在很大程度上依赖于内流的 Ca²⁺ 量与细胞内分隔 Ca²⁺ 和排出 Ca²⁺ 能力的平衡。同时心肌细胞迅速开始无氧代谢, 出现能量代谢障碍, 进而产生大量有害代谢产物。随着 ATP 水平的下降, 细胞膜、肌浆网 Ca²⁺-ATP 酶活力及肌浆网摄钙能力下降, 使 Ca²⁺ 内流增加, 并激活膜磷脂酶, 并在此过程中产生氧自由基, 进一步引起肌浆网钙依赖性 ATP 酶失活, 导致肌浆网摄钙能力下降, 肌浆网内钙离子浓度升高, 兴奋收缩耦联受损等。在缺血再灌注损伤的过程中, 钙超载与氧自由基的作用不是孤立存在的, 而是相辅相成影响 CD8⁺CD28⁺ T 淋巴细胞⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度变化。另外, 即使术后第 11 天, 移植物病理结果显示排斥反应已明显下降, CD8⁺CD28⁺ T 淋巴细胞⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度仍然维持稍高水平, 这种现象胡野等^[11] 研究认为, 同种异体心脏移植排斥反应引起的细胞凋亡在移植后 3~5 d 达到高峰, 此后逐渐减少, 但是整个急性反应期仍持续存在; 凋亡的心肌细胞孤立散在分布, 且大多分布于心肌间质; AR 时细胞凋亡可以不重, 这可能与细胞凋亡发生快而且凋亡细胞消失也快相关。虽然本实验与多个研究具有相同实验结果, 仍然有一定不足, 即未能建立与实验组相同的缺血再灌注干扰因素, 需要后续的实验深入研究钙在 CD8⁺CD28⁺ T 淋巴细胞活化过程中的重要作用。在制作假手术组实验时, 应严格对大鼠性别、体质量、品系等进行合理选择, 建立移植后无排斥反应模型。这

种探索性质的研究可能是心脏移植后 AR 的诊断和治疗研究的新领域, 如促进内质网、高尔基体、线粒体的生理钙离子缓冲作用, 也能在 AR 期使 CD8⁺CD28⁺ T 淋巴细胞钙离子水平降低, 延缓或阻断 CD8⁺CD28⁺ T 淋巴细胞的活化, 延长 AR 的发生。

相信随着研究的不断深入, CD8⁺CD28⁺ T 淋巴细胞⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度等在心脏手术后免疫排斥反应的快速诊断方面将拥有广阔前景。

参考文献

- [1] Akiyoshi K, Hikida S, Inoue H, et al. Extracellular Ca²⁺ uptake by T cells might help to make a diagnosis of acute rejection[J]. *Pediatr Surg Int*, 2007, 23(2): 149-153.
- [2] 涂星强, 王涛, 邹小明, 等. CD8⁺CD28⁺ T 淋巴细胞胞外钙离子摄取与心脏移植急性排斥反应的相关性研究[J]. *岭南心血管病杂志*, 2014, 20(3): 360-363.
- [3] Fan K, Wang H, Wei H, et al. Blockade of LIGHT/HVEM and B7/CD28 signaling facilitates long-term islet graft survival with development of allospecific tolerance [J]. *Transplantation*, 2007, 84(6): 746-754.
- [4] 高旭辉, 王昊飞, 王武军, 等. 大鼠异位心脏移植动物模型制作的外科技巧[J]. *实用医学杂志*, 2004, 20(5): 492-494.
- [5] Majora M, Wittkamp T, Schuermann B, et al. Functional Consequences of Mitochondrial DNA Deletions in Human Skin Fibroblasts: Increased Contractile Strength in Collagen Lattices Is Due to Oxidative Stress-Induced Lysyl Oxidase Activity[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(3): 1019-1029.
- [6] 孙逸, 杨宝学. T 淋巴细胞离子通道的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2012, 35(2): 81-85.
- [7] Cahalan MD. How to Stimulate Calcium Channels[J]. *Science*, 2010, 330(6000): 43-44.
- [8] 边原, 肖洪涛, 陈璐. 组织和细胞中 Ca²⁺ 浓度测定方法的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(9): 1253-1256.
- [9] Mishra S, Sabbah HN, Rastogi S, et al. Reduced Sarco-plasmic Reticulum Ca²⁺ Uptake And Increased Na⁺-Ca²⁺ Exchanger Expression In Left Ventricle Myocardium Of Dogs With Progression Of Heart Failure[J]. *Heart Ves-sels*, 2005, 20(1): 23-32.
- [10] Thind GS, Agrawal PR, Hirsh B, et al. Mechanisms of myocardial ischemia-reperfusion injury and the cytoprotective role of minocycline: scope and limitations[J]. *Future Cardiol*, 2015, 11(1): 61-76.
- [11] 胡野, 凌志强, 单小云. 细胞凋亡的分子医学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2002: 273-288.

(收稿日期: 2015-09-15 修回日期: 2015-12-08)

(上接第 884 页)

734.

- [8] Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders; the cellular impact of lysosomal dysfunction[J]. *J Cell Biol*, 2012, 199(5): 723-

(收稿日期: 2015-09-08 修回日期: 2015-12-05)