

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 09. 003

XBP-1 活性对小鼠移植皮肤存活率的作用研究*

杨正弦¹, 吴 皓², 刘一鸣^{2△}

(1. 重庆市綦江区中医院普外科 401420; 2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科, 重庆 400010)

摘 要:目的 通过小干扰 RNA 技术抑制小鼠体内 X-盒结合蛋白 1(XBP-1)表达,探讨其在小鼠皮肤移植后急性排斥反应中的作用及可能机制。方法 BALB/c 小鼠及 C57BL/6 小鼠分别作为供体及受体,建立小鼠皮肤急性排斥反应模型。受体随机分为 3 组,转染组术后 1~7 d 经尾静脉注入 100 μg XBP-1-siRNA 慢病毒质粒($n=15$);对照组以同样方式每日注入同剂量慢病毒载体($n=15$);磷酸盐缓冲液(PBS)组($n=15$)注入同等剂量 PBS。术后 7 d 取标本及眼球血,观察移植物病理改变及生存率、移植物病理改变;采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)及酶联免疫吸附测定(ELISA)检测移植区及外周血白细胞介素 6(IL-6)、干扰素 γ (IFN- γ)及白细胞介素 10(IL-10)的表达水平。结果 转染组移植皮肤存活率较空白载体组及对照组有明显改善($P<0.05$),呈轻度排斥反应;转染组外周血 IFN- γ 及 IL-6 的水平较对照组及 PBS 组明显下降($P<0.05$),而 IL-10 则显著增高($P<0.05$)。结论 抑制小鼠体内 XBP-1 活性可通过调节局部细胞因子表达,从而延缓皮肤移植后急性排斥反应对移植物的破坏。

关键词:X-盒连接蛋白 1; 皮肤移植; 急性排斥反应; 白细胞介素 10

中图分类号:R392.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2019)09-1160-04

Suppression of X-box binding protein 1 prolong skin graft survival in mice*

YANG Zhengxian¹, WU Hao², LIU Yiming^{2△}

(1. Department of General Surgery, Hospital of Traditional Chinese Medicine of Qijiang, Chongqing 401420, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective X-box binding protein 1 (XBP-1), one of the three main mediators of the adaptive UPR, has been shown to increase responsiveness towards inflammatory and microbial stimuli. The aim of this study was to investigate whether to suppress the XBP-1 can protect skin allograft from acute rejection. **Methods** BALB/c mice and C57BL/6 mice were used as donors and recipients in an acute rejection skin graft model, respectively. Recipients were randomly divided into 3 groups. Knocking down XBP-1 using 100 μg si-XBP-1 (small interference RNA targeted XBP-1) was injected into recipients via caudal vein from day 1 to day 7; the non-target vector group received the same dose of vector; at the same time point, the control group received the same dosage of phosphate buffered saline (PBS). Graft survival, histopathologic changes, the mRNA and serum levels of related cytokines were tested. RT-PCR and ELISA were used to detect the expression levels of IL-6, IFN- γ and IL-10 in the transplanted and peripheral blood. **Results** Allograft survival was significantly higher among the si-XBP-1 group than the non-target group or control group. The histopathology showed less tissue damage in the si-XBP-1 group compared with the other two groups. ELISA exhibit a remarkably decreased of IFN- γ and IL-6 in the si-XBP-1 group compared with the other two groups, while IL-10 was much higher. **Conclusion** Suppression of XBP-1 may significantly prolonged skin allograft survival in mice via cytokine modulation.

Key words:X-box binding protein 1; skin transplantation; acute rejection; interleukin 10

皮肤移植是治疗创伤、烧伤及其他因素所致皮肤缺损的最佳治疗措施。理想的皮肤移植对创面愈合、抑制创伤后感染、预防休克及改善愈后生活质量都是至关重要的^[1]。在大面积皮损且自身皮瓣条件不理想的患者治疗中异体皮肤移植起着不可或缺的作用,但非实性器官移植术后急性排斥反应程度远强于实

* 基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(81671580);国家自然科学基金青年基金项目(81300364)。
作者简介:杨正弦,男,副主任医师,主要从事普外临床及相关基础研究。 △ 通信作者, E-mail: ncisigibbs@163. com。

性器官,导致移植皮肤溶解,坏死或过早脱落,移植失败^[2-3]。非特异性免疫抑制剂可一定程度延缓排斥反应的进展,但会产生不良反应。因此减轻移植物排斥甚至诱导特异性免疫耐受是本研究的方向。X-盒结合蛋白 1(XBP-1)是内质网应激时未折叠蛋白反应(UPR)的关键调节因子,其在胞质中经肌醇酶 1(IRE1)剪切激活,进入胞核参与细胞功能的调节^[4-6]。最新研究报道,XBP-1 在调节机体免疫系统中也起着重要的作用^[7-9]:(1) XBP-1 处于低表达状态是乙型肝炎病毒持续复制的重要原因;(2) XBP-1 促进活性氧簇副产物形成抑制树突状细胞对肿瘤抗原提呈及促抗肿瘤淋巴细胞活化功能,促进免疫逃逸;(3) 抑制小肠上皮细胞内 XBP-1 表达可诱发小鼠自发性肠炎。而目前有关 XBP-1 在移植后免疫调控方面,特别是在异体组织移植方面尚无全面阐述。本研究通过体内转染小鼠 XBP-1-siRNA 慢病毒,探索其在小鼠皮肤移植后急性排斥反应的作用及初步机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂 雄性 BALB/c (H-2d) 和 C57BL/6 (H-2b) 小鼠,6~8 周龄,购买并饲养于重庆医科大学实验动物中心 SPF 实验室,常规喂养。术后单笼饲养。本实验中所涉及动物操作与处置均遵循重庆医科大学动物伦理委员会的要求进行。

XBP-1-siRNA 慢病毒质粒交由英潍捷基(上海)公司代为构建;白细胞介素 6(IL-6)、干扰素 γ (IFN- γ)及白细胞介素 10(IL-10)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购买于美国 R&D Systems 公司;IL-6、IFN- γ 和 IL-10 引物由上海生工生物有限公司合成;HE 染色试剂盒购买于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 建立小鼠皮肤移植急性排斥反应模型 参考 MACFARLANE 等^[10]方法建立 BALB/c 到 C57BL/6 受体小鼠皮肤移植急性排斥反应模型。采用 10% 水合氯醛对小鼠进行麻醉,于 C57BL/6 背部选取移植区域,消毒后剪去大小约 1 cm×1 cm 皮肤,形成创面;取 BALB/c 小鼠背部相应大小皮肤组织,置于冷生理盐水中修剪并清洗 3 次后,逆毛方向移植到 C57BL/6 小鼠背部创面,四周间断缝合。凡士林及青霉素浸润的纱布轻加压覆盖包扎,分笼喂养,7 d 后拆除敷料。转染组(si-XBP-1, $n=15$)于术后每日经尾静脉注射 100 μ g si-XBP-1 慢病毒;对照组($n=15$)及磷酸盐缓冲液(PBS)组($n=15$)采用同样的方式注射相同剂量的空白载体及 PBS。术后第 7 天各组分别取移植皮肤及眼球血备检。移植皮肤出现 90% 以上表皮失活表现视为排斥。

1.2.2 检测 XBP-1、IL-6、IFN- γ 和 IL-10 的转录水

平表达 按 Trizol 试剂盒说明书提取移植标本组织 RNA。XBP-1 上游引物 5'-GAG ATG TCT TTC CTT CAG CAC-3',下游引物 5'-GAC CTT CCT AGG TCT CCAC-3';IL-6 上游引物 5'-AAC CAG TAT CCT GTT CCC AGC-3',下游引物 5'-TGT CGC CAC TGG AAG GAT AG-3';IFN- γ 上游引物 5'-CCA CGC TCT TCT GTC TAC TG -3',下游引物 5'-GGC TAC GGG CTT GTC ACT CG -3';IL-10 上游引物 5'-CTG CTA TGT TGC CTG CTC TT -3',下游引物 5'-ATG TGG GTC TGG CTG ACT GG -3'内参 β -actin 上游引物 5'-CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC-3',下游引物 5'-TTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'。逆转录后行实时荧光定量 PCR(RT-PCR),采用 Quantity One 4.62 图像分析软件行光密度值测定,目的片段与 β -actin 光密度(OD)之比值作为目的片段 mRNA 相对表达量。

1.2.3 ELISA 检测血清 IL-6、IFN- γ 和 IL-10 表达水平 按照 ELISA 试剂盒说明书采用标准双抗夹心细胞因子检测流程进行,450 nm 处读取 OD 值,绘制标准曲线。

1.2.4 皮肤组织病理观察 移植后 7 d 的皮肤组织放入 10% 甲醛中固定 24 h,常规脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、4 μ m 厚切片、脱蜡、脱水、HE 染色,光学显微镜观察并做急性排斥评估。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计学软件或 GraphPad Prism5.0 进行单因素方差分析及制图,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生存率观察 术后 3 组小鼠未做其他特殊处理,受体均在 1 h 内复苏。每日观察记录移植皮肤存活情况并更换敷料,绘制 Kaplan-meier 生存曲线(图 1)。si-XBP-1 组移植皮肤生存情况较对照组及 PBS 组有明显的改善,中位生存时间 14.7 d,高于其余两组(10.2 d 和 9.7 d),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 病理切片观察 术后 7 d 对照组及 PBS 组移植皮肤病理切片显示部分深层上皮组织坏死,以及引流淋巴结大量炎症细胞浸润;然而 si-XBP-1 组则可见正常上皮、皮下组织,以及较少量的炎症细胞浸润,见图 2。

2.3 各组移植皮肤内 XBP-1、IL-6、IFN- γ 和 IL-10 的 mRNA 表达水平 RT-PCR 结果提示,si-XBP-1 组 XBP-1 mRNA 表达水平较其余两组明显下调($P < 0.05$)。同时转染组外周血中促炎因子 IL-6 及 IFN- γ 的转录活性低于其余两组($P < 0.05$),而 IL-10 类抑炎因子的表达水平则明显增高,与其余两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

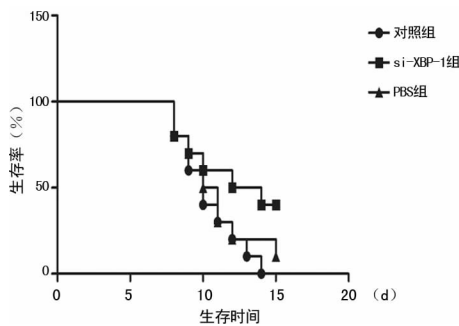
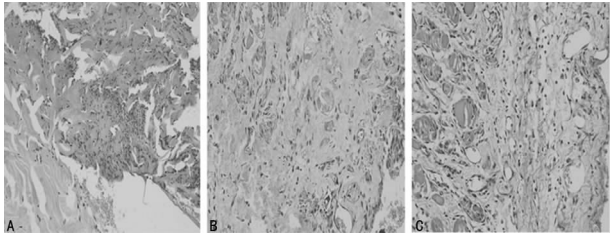


图 1 术后各组受体移植皮肤生存率



注: A 为对照组; B 为 PBS 组; C 为 si-XBP-1 组

图 2 术后第 7 天各组移植皮肤病理学改变

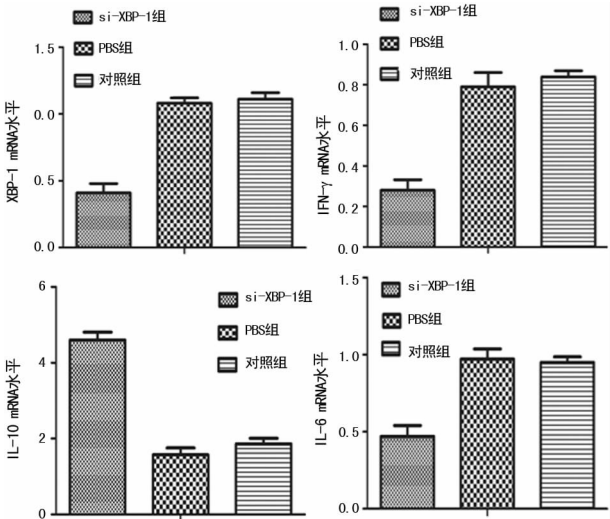


图 3 RT-PCR 检测移植皮肤中 XBP-1、IFN-γ、IL-6 及 IL-10 mRNA 表达水平

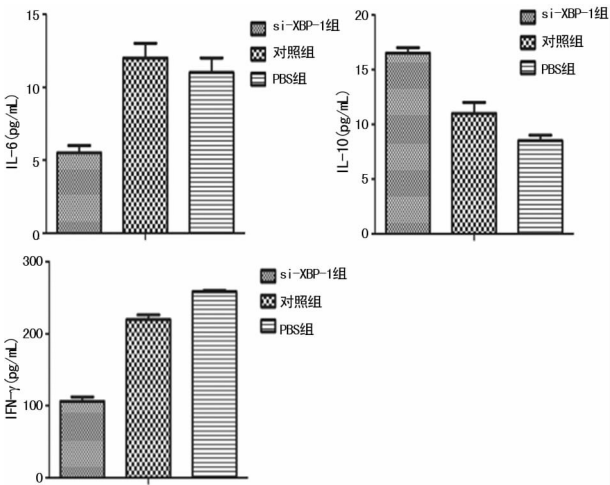


图 4 各组血清中 IFN-γ、IL-6 及 IL-10 表达水平

2.4 各组血清中 IL-6、IFN-γ 和 IL-10 的表达水平
转染组中血清 IL-6 及 IFN-γ 的表达水平较对照组和 PBS 组明显下降,而 IL-10 的表达水平则较其余两组有明显的上调,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4。

3 讨论

临床实际工作中,异体皮肤移植主要应用于严重创伤,特别是亟待植皮的严重烧伤^[11]。创面若不能及时覆盖封闭,将进一步加重体内环境紊乱及内外源性病原微生物侵入,进而诱发不可逆休克、顽固性感染甚至多器官功能衰竭等并发症,导致病死率上升^[12]。而在大面积Ⅱ~Ⅲ度烧伤患者的临床诊治中,自体皮源严重不足,目前最理想的办法是选择异体或者异种皮源来暂时覆盖受损创面,等待自体供皮区反复切取^[13]。但异源性皮源的植入则会触发机体免疫系统对其产生排斥反应,异种移植皮肤的有效覆盖中位时间仅有 14 d,同种异体皮源中位时间也只有 20 d,排斥反应缩短自体供皮区切取窗口,增加患者围治疗期风险^[14]。使用非选择性免疫抑制剂有进一步加重患者感染、菌群移位及休克的风险,故如何延长异体异种皮源的创面存活时间,仍是目前皮肤移植领域的研究重点^[15]。

本研究发现,通过 si-RNA 技术抑制 XBP-1 在 C57BL/6 小鼠体内的表达,转染组其 BALB/c 来源移植皮肤存活率得到了明显的改善,移植皮肤结构完整性基本正常,少量炎症细胞浸润,异体皮肤存活时间明显延长,提示机体对其免疫排斥受到抑制。排斥反应强度主要依靠活化 T 细胞亚群以及相关细胞因子的分泌的调节,而细胞因子的表达及分布情况反映了局部免疫反应的类型。Th1 型免疫反应主要通过分泌大量促炎因子如 IL-6、IFN-γ 等,破坏局部组织结构及微血管形成,导致移植皮肤缺血坏死^[16]。而 Th2 型免疫反应则分泌 IL-10、转化生长因子(TGF)-β 等抑炎因子,与免疫耐受密切相关^[17]。本实验中,转染组移植区及外周血中 IL-6 及 IFN-γ 水平均较其余两组有明显降低,而 IL-10 则表达上调,提示下调体内 XBP-1 活性可改变局部微环境中细胞因子分泌谱,改变免疫反应类型,进而延缓自身免疫系统对移植皮肤的破坏。但 XBP-1 能否直接作用于效应 Th1 及 Th2 细胞分化及相关细胞因子分泌,进而诱导 Th1/Th2 免疫平衡向耐受方向偏移,还有待进一步的研究。笔者的后续研究提示 XBP-1 对细胞因子分泌的调控可能与诱导外周血巨噬细胞极化关系密切。

综上所述,本实验通过研究 XBP-1 活性对小鼠移植皮肤存活率的作用,证实了下调 XBP-1 活性可改变局部细胞因子分泌谱,进而通过延缓移植皮肤结构完整性改善异源性移植皮肤的存活时间,参与了诱导免

疫耐受微环境的形成,但 XBP-1 对 Th 细胞亚型分化及细胞因子分泌的具体靶细胞及调节机制仍需深入的研究和探索。

参考文献

[1] GREENWOOD J E. The evolution of acute burn care - re-tiring the split skin graft[J]. Ann R Coll Surg Engl, 2017,99(6):432-438.

[2] 丁伟佳,陈茵,郑伟基,等. 不同皮肤移植方法在大面积烧伤瘢痕修复中的效果比较[J]. 中国美容医学,2018,27(3):36-38.

[3] CHENG C H, LEE C F, FRYER M, et al. Murine Full-thickness Skin Transplantation [J]. J Vis Exp, 2017(119):55105.

[4] SO J S. Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses[J]. Mol Cells, 2018,41(8):705-716.

[5] ABDULLAHI A, STANOJCIC M, PAROUSIS A, et al. Modeling Acute ER Stress in Vivo and in Vitro [J]. Shock, 2017,47(4):506-513.

[6] KANEKO M, IMAIZUMI K, SAITO A, et al. ER stress and disease: toward prevention and treatment [J]. Biol Pharm Bull, 2017,40(9):1337-1343.

[7] SANO R, REED J C. ER stress-induced cell death mechanisms[J]. Biochim Biophys Acta, 2013,1833(12):3460-3470.

[8] CUBILLOS RUIZ J R, BETTIGOLE S E, GLIMCHER L H. Tumorigenic and immunosuppressive effects of endoplasmic reticulum stress in cancer[J]. Cell, 2017,168(4):692-706.

[9] ZHANG H S, CHEN Y, FAN L, et al. The Endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 α in intestinal epithelial cells is essential for protecting against colitis[J]. J Biol Chem,

2015,290(24):15327-15336.

[10] MACFARLANE D F. Current techniques in skin grafting [J]. Adv Dermatol, 2006(22):125-138.

[11] 沈欣然,朱旭辉. 皮肤移植现状相关研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017,17(102)A2:45-46.

[12] SHECKTER C C, LI A, PRIDGEN B, et al. The impact of skin allograft on inpatient outcomes in the treatment of major burns 20-50% total body surface area - A propensity score matched analysis using the nationwide inpatient sample[J]. Burns, 2019,45(1):146-156.

[13] VYAS K S, BURNS C, RYAN D T, et al. Prolonged allograft survival in a patient with chronic immunosuppression; a case report and systematic review [J]. Wounds, 2017,29(6):159-162.

[14] CHUA A W, KHOO Y C, TAN B K, et al. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications[J]. Burns Trauma, 2016(4):3-9.

[15] MA T, WANG X, JIANG D. Immune Tolerance of Mesenchymal Stem Cells and Induction of Skin Allograft Tolerance[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2017,12(5):409-415.

[16] ENGELHARDT B G, PACZESNY S, JUNG D K, et al. Early Th1 immunity promotes immune tolerance and may impair graft-versus-leukemia effect after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. Haematologica, 2016,101(5):e204-208.

[17] HALL B M. CD4⁺CD25⁺T regulatory cells in transplantation tolerance: 25 years on [J]. Transplantation, 2016,100(12):2533-2547.

(收稿日期:2018-09-16 修回日期:2018-12-25)

(上接第 1159 页)

评价[J]. 实用妇产科杂志, 2010,26(2):81-83.

[7] 王佳. 硝呋太尔制霉菌素阴道软胶囊治疗孕妇霉菌性阴道炎的临床疗效研究[J]. 中国实用医药, 2018,13(6):122-123.

[8] 鄂静文,张颖,闫文英,等. 霉菌性阴道炎随季节变化的流行病学调查分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2016,23(1):65-67.

[9] 胡娟. 滴虫、霉菌性阴道炎患者白带检验及感染率动态研究[J]. 现代诊断与治疗, 2016,26(21):4912-4913.

[10] 吴宏宇,王敬华,祁建青,等. 细菌性阴道炎危险因素分析[J]. 中国医药导刊, 2011,13(12):2080-2081.

[11] 袁小松,邵秋琴,蒋丽霞,等. 细菌性阴道病联合测定技术在阴道感染诊断中的应用[J]. 中国妇幼保健, 2010,25(4):575-576.

[12] 何亮,陈群,曾忠铭. 细菌性阴道病的诊断方法评价[J].

中国微生态学杂志, 2003,15(15):122-124.

[13] SOBEL J D, FARO S, FORCE R W, et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations[J]. Am J Obstet Gynecol, 1998,178(2):203-211.

[14] 曲秀荣. 滴虫霉菌性阴道炎患者白带检验及感染率动态分析[J]. 中国卫生标准管理, 2015,6(12):13-14.

[15] 李云旭,刘斌,龚虹,等. 乳酸菌与阴道疾病关系的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2014,26(4):483-487.

[16] 李金红,崔林蔚. 中药治疗霉菌性阴道炎的观察及护理[J]. 新疆中医药, 2012,30(1):39.

[17] 佟庆艳. 霉菌性阴道炎患者的临床护理体会[J]. 中国卫生标准管理, 2015,29(1):129-130.

(收稿日期:2018-09-29 修回日期:2018-12-28)