

网络出版时间: 2018-8-2 09:39 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180731.1310.013.html>

过表达 IDO 骨髓间充质干细胞分泌外泌体改善移植心脏存活

贺继刚¹, 韩金秀¹, 撒亚莲², 严丹³, 李贝贝¹

摘要 目的 探讨过表达吲哚胺 2,3 双加氧酶 (IDO) 大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 通过分泌外泌体 (exosome) 改善大鼠腹腔异位移植心脏存活机制。方法 构建过表达 IDO 大鼠骨髓间充质干细胞, 而后提取分泌的 exosome。同时建立大鼠腹腔异位移植心脏模型, 经尾静脉给予相应细胞分泌的 exosome 后检测如下指标: 移植心脏功能变化; 移植心脏局部荧光强度; 受体大鼠脾脏细胞表面 CD40、CD86、CD80、主要组织相容性抗原-II (MHC II)、CD274 (PDL-1)、CD45RA、CD45RA + CD45RB 表达及 Treg 细胞数量。并采用苏木精-伊红 (HE) 染色评估移植心脏局部炎症细胞浸润情况。结果 ① 大鼠异位心脏移植模型建立后, 给予相应细胞分泌 exosome, 过表达 IDO-BMSCs-exosome 组移植心脏的射血分数 (EF)、短轴缩短率 (FS) 较其余各组有提高; ② 过表达 IDO-BMSCs-exosome 组移植心脏局部 Dir 荧光最强; ③ 采用流式细胞技术证实过表达 IDO-BMSCs-exosome 组受体脾脏细胞 CD86、CD40、CD80、主要组织相容性抗原-II (MHC II)、CD45RA + CD45RB、CD45RA、OX62 表达量下降, 而 CD274 (PDL-1) 表达增高同时 Treg 细胞数量较其他组增多; ④ HE 染色证实过表达 IDO-BMSCs-exosome 组移植心脏局部有较少炎症细胞浸润。结论 大鼠 BMSCs 分泌的 exosome 可以有效调节 DC 细胞表面抗原分子表达、促进 Treg 细胞增生, 从而在多个免疫层面改善心脏移植排斥。

关键词 吲哚胺 2,3 双加氧酶; 大鼠; 骨髓间充质干细胞; 外泌体; 免疫抑制

中图分类号 R 310.17

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)09-1383-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.013

随着医学科技进步, 抗免疫排斥药物不断更新, 免疫基础、临床研究的进展, 器官移植已成为终末器

官衰竭治疗的手段之一。目前抑制免疫排斥反应主要有两种方法: ① 药物抑制, 包括吗替麦考等; ② 生物抑制法。目前认为骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 可以抑制器官排斥反应^[1]。但因为 BMSCs 的安全性一直以来未得到有效证实, 其临床应用受到限制。吲哚胺 2,3 双加氧酶 (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 可在胎盘和淋巴组织中广泛表达, 是除肝脏外唯一能催化色氨酸循尿酸分解途径代谢的催化限速酶, 在哺乳动物组织与细胞, 尤其是胎盘和淋巴组织中广泛表达。它能够催化降解色氨酸有效促进移植物存活^[2]。课题组前期已经证实过表达 IDO-BMSCs 可以有效抑制免疫排斥反应^[3]。外泌体 (exosome) 是直径介于 50~100 nm 的囊泡, 其是以出芽方式从细胞上产生的鳞片状囊泡, 它拥有多项生物功能, 能使细胞在不直接作用下实现细胞与细胞远距离生物信息传导, 目前其已成为研究热点^[4]。该研究通过提取过表达 IDO-BMSCs 分泌的 exosome 试图证明外泌体在抑制免疫排斥反应中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康 4 周龄 SPF 级 Wistar 及 SD 成年雄性大鼠各 70 只, 购自成都达硕科技实验动物。

1.2 主要试剂和仪器 大鼠液相芯片试剂盒 TG-FBMAG-64K-03 及 RECYTMAG-65K-07 (美国密理博公司); 流式细胞仪 BD Accuri C6 (美国 BD 公司); 小动物活体成像仪 (美国冷泉港公司); 心脏彩超 EPIQ 7C (荷兰飞利浦公司); 抗 OX62 大鼠免疫磁珠 (德国美天旌公司)。其它试剂见文献^[5]。

1.3 方法

1.3.1 大鼠 BMSCs 培养及鉴定 全骨髓培养, 胰酶消化传代至第 7 代。取生长至 P7 代 BMSCs, 并检测细胞黏附分子 29 (CD29)、细胞归巢因子-44 (CD44)、CD90、CD73、CD45、CD11b、造血干祖细胞表面抗原 (CD34)。

1.3.2 过表达 IDO-BMSCs 构建 利用慢病毒 GV308 构建 IDO 载体并使用强力霉素作为基因开

2018-05-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81460073); 云南省科技计划项目 (编号: 2014FB089); 云南省教育厅科学研究基金 (编号: 2015Z051); 中国博士后科学基金 (编号: 2015M582764XB); 成都医学院 2015 年度科研项目 (编号: CYZ15-18); 云南省医学后备人才 (编号: H-201607)

作者单位: 云南省第一人民医院 (昆明理工大学附属医院)¹ 心脏大血管外科、² 基础研究所、³ 重症医学科, 昆明 650032

作者简介: 贺继刚, 男, 博士后;

李贝贝, 男, 住院医师, 责任作者, E-mail: jianghe999@163.com

后剂实现大鼠 BMSCs 过表达 IDO, 分两组: 阴性对照组(NC 组), 过表达 IDO 组(OE 组), 每组包含 3 组细胞。而后根据文献^[4]采用定量 PCR 方法检测转染 2 d 后 IDO 基因表达量。

1.3.3 建立腹腔异位心脏移植模型 根据文献^[5]建立腹腔异位心脏移植模型。并采用心脏彩超 EPIQ 7C 评估建模 3 d 后移植心脏射血分数(ejection fraction, EF)、短轴缩短率(fractional shortening, FS) 改变。

1.3.4 Exosome 提取及检测 按照 SBI 公司 Exo-Quick-TC 说明书提取 exosome 并利用电镜检测分泌出的 exosome 形态^[6]。

1.3.5 心脏彩超评估移植心脏心功能和小动物活体成像评估心脏荧光强度 提取各组细胞分泌的 exosome。经 Dir 预染后。经尾静脉注射到腹腔异位移植心脏术后 3 d 的大鼠模型中。共分为过表达 IDO-BMSCs-exosome 组、空载体-BMSCs-exosome 组、BMSCs-exosome 组, 每组 3 只大鼠, 每只大鼠经由尾静脉注射 400 μ l (800 mg/ml) 的 exosome, 将吗替麦考组(给予吗替麦考喂养 2 d) 及未处理组做为对照组, 每组 3 只大鼠。并采用二维心脏超声评估移植心脏心功能和采用小动物活体成像评估移植心脏荧光强度。

1.3.6 受体大鼠脾脏细胞表面抗原分子表达检测

取受体大鼠完整脾脏组织, 制备脾脏单细胞悬液。按 Miltenyi 公司的 Anti-DC(OX62) Microbeads rat 试剂盒说明书操作阳选 OX62⁺ 细胞, 并检测细胞表面抗原 CD40、CD86、CD80、MHCII、CD274、CD45RA、CD45RA + CD45RB、OX62 的表达。同时对阴选 OX62⁻ 细胞检测 CD3、CD4、CD8 表达及 Treg 细胞数量。

1.3.7 移植心脏石蜡包埋切片与苏木精-伊红(HE) 染色 取移植心脏组织进行脱水, 浸蜡, 包埋, 连续切片, 伊红染色, 光学显微镜下观察心脏显色结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用单因素方差分析(ANOVA) 进行比较。所有假设统计检验采用双侧。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 BMSCs 鉴定结果 超过 90% 大鼠 BMSCs 可以表达 CD29、CD44、CD90、CD73。但不表达 CD45、CD11b、CD34。

2.2 RT-PCR 检测 IDO 基因的表达结果 定量 PCR 结果显示, 大鼠 BMSCs 中, OE 组 IDO 基因表达丰度为 NC 组的 62 906.27 倍($P < 0.05$), 见图 1。

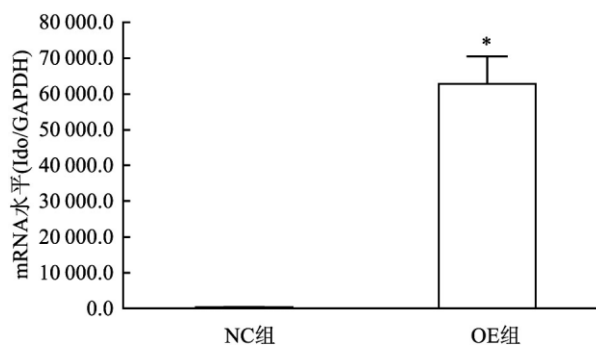


图1 慢病毒转染大鼠 BMSCs 中并加入基因开启剂 DOX 2 d 后 IDO 基因的表达与 NC 组比较: * $P < 0.05$

2.3 心脏彩超评价移植心脏 可见腹腔异位心脏移植模型建立 3 d, 移植心脏仍然跳动, 局部形成血栓, 见图 2。

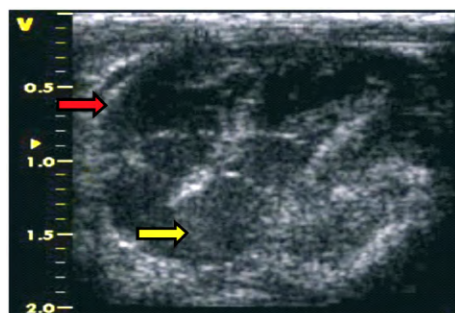


图2 腹腔异位移植心脏 3 d 后复查心脏彩超结果 黄色箭头指向的是形成的血栓; 红色箭头指向的是移植心脏

2.4 扫描电镜检测 exosome 结果 可见 BMSCs 分泌出的 exosome 表现为白色, 大小为介于 50 ~ 100 nm 的颗粒。见图 3。



图3 ExoQuick-TC 法提取 exosome 电镜图片 $\times 4\ 500$

2.5 心脏彩超评估注射 exosome 后移植心脏功能 异位腹腔移植心脏模型建立 3 d 后,通过受体大鼠尾静脉注射各种 BMSCs 分泌的 exosome,采用心脏彩超评估移植心脏功能改变,可见给予过表达 IDO-BMSCs 分泌的 exosome 处理后 2 d,移植心脏的 EF、FS 均有显著提高,与其余各组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.6 采用小动物活体成像评估注射 exosome 后移植心脏荧光强度 大鼠心脏移植模型建立 3 d 后给予受体大鼠注射过表达 IDO-BMSCs-exosome、空载体-BMSCs-exosome、BMSCs-exosome 后 2 d 完成小动物活体成像,将吗替麦考组及未处理组做为对照组。可见过表达 IDO-BMSCs-exosome 组移植心脏局部荧光强度与其他各组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),其荧光强度最强。见图 4。

2.7 流式细胞技术评估注射 exosome 后受体大鼠脾脏细胞表面抗原分子 过表达 IDO-BMSCs-exosome 组 CD40、CD86、CD80、MHCII、CD45RA、CD45RA + CD45RB 表达量最低,与其他各组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。过表达 IDO-BMSCs-exosome 组 CD274 表达量最高,与其他组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。过表达 IDO-BMSCs-exo-

some 组 Treg 细胞量最高,与其他组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。

将上述 CD40、CD86、CD80、MHCII、CD274、CD45RA、CD45RA + CD45RB、Treg 表达行单因素方差分析: CD40、CD86、CD80、MHCII、CD274、CD45RA、CD45RA + CD45RB 的表达及 Treg 细胞数量差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

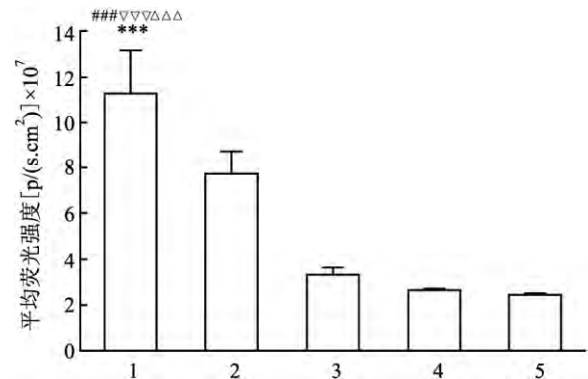


图4 给予干预措施 2 d 后评价移植心脏局部荧光强度评价

1. 过表达 IDO-BMSCs-exosome 组; 2. 空载体-BMSCs-exosome 组; 3. BMSCs-exosome 组; 4. 吗替麦考组; 5. 未处理组; 与空载体-BMSCs-exosome 组比较: *** $P < 0.001$; 与 BMSCs-exosome 组比较: ### $P < 0.001$; 与吗替麦考组比较: ∇∇∇ $P < 0.001$; 与未处理组比较: △△△ $P < 0.001$

表1 给予 exosome 处理 2 d 后移植心脏功能评价(%, $\bar{x} \pm s$)

时间/处理方式	IDO	空载体	BMSCs	吗替麦考	未处理组	F 值	P 值
EF 前后差值	16.83 ± 1.51	3.77 ± 1.43*	4.18 ± 0.85#	4.40 ± 0.32∇	-32.99 ± 11.13△	5.346	<0.05
FS 前后差值	14.81 ± 1.49	2.43 ± 0.31*	4.25 ± 0.25#	4.99 ± 0.26∇	-16.71 ± 5.43△	5.236	<0.05

与空载体组比较: * $P < 0.05$; 与 BMSCs 组比较: # $P < 0.05$; 与吗替麦考组比较: ∇ $P < 0.05$; 与建模未处理组比较: △ $P < 0.05$

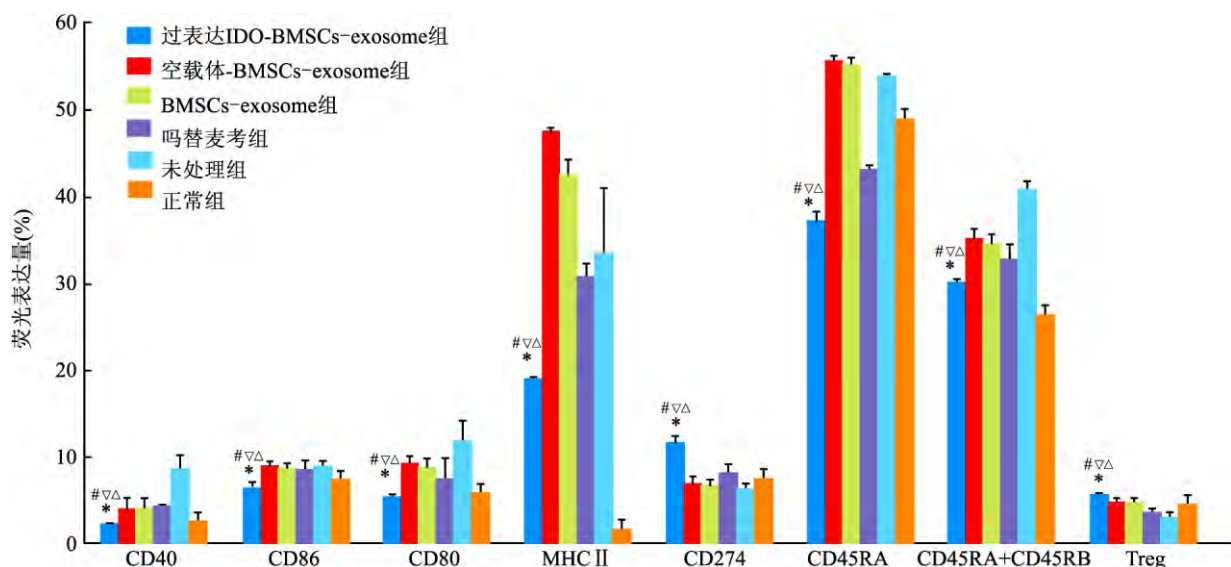


图5 给予干预措施 2 d 后流式检测脾脏细胞抗原分子表达

与空载体-BMSCs-exosome 组比较: * $P < 0.05$; 与 BMSCs-exosome 组比较: # $P < 0.05$; 与吗替麦考组比较: ∇ $P < 0.05$; 与未处理组比较: △ $P < 0.05$; 与正常组比较: ▼ $P < 0.05$

表2 给予各种 exosome 处理后行脾脏细胞 CD40、CD86、CD80、MHCII、CD274、CD45RA、CD45RB、Treg 评价($\bar{x} \pm s$)

项目	IDO-BMSCs-exosome 组	空载体-BMSCs-exosome 组	BMSCs-exosome 组	吗替麦考组	未处理组	正常组	F 值	P 值
CD40 %	2.07 ± 0.12	4.03 ± 1.18	4.20 ± 0.98	4.37 ± 0.15	8.47 ± 1.72	2.50 ± 0.26	4.678	<0.05
CD86 %	6.43 ± 0.61	8.97 ± 0.25	8.70 ± 0.44	8.40 ± 1.11	9.03 ± 0.21	7.37 ± 0.21	6.181	<0.05
CD80 %	5.23 ± 0.40	9.23 ± 0.74	8.87 ± 0.81	7.53 ± 2.19	11.73 ± 2.40	5.87 ± 0.35	3.678	<0.05
CD274 %	11.6 ± 0.76	6.90 ± 0.75	6.77 ± 0.45	8.17 ± 0.81	6.33 ± 0.46	7.50 ± 0.17	3.981	<0.05
CD45RA %	37.20 ± 0.95	55.83 ± 0.25	55.37 ± 0.55	43.17 ± 0.29	54.07 ± 0.15	49.03 ± 0.81	4.013	<0.05
CD45RA + CD45RB %	30.13 ± 0.31	35.30 ± 0.95	34.53 ± 1.10	32.90 ± 1.41	40.83 ± 0.91	26.40 ± 0.61	4.145	<0.05
Treg %	5.57 ± 0.31	4.83 ± 0.29	4.83 ± 0.38	3.63 ± 0.35	2.93 ± 0.55	4.40 ± 0.46	5.145	<0.05
MHC II %	18.93 ± 0.23	47.47 ± 0.42	42.47 ± 1.76	30.87 ± 1.33	33.47 ± 0.74	1.67 ± 0.47	5.257	<0.05

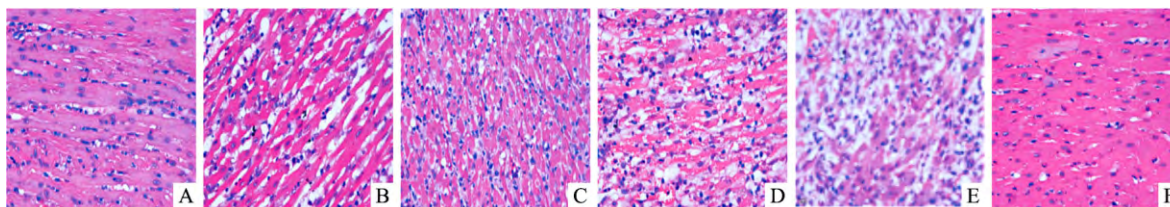


图6 HE 染色评估移植心脏炎性细胞侵袭结果 ×400

A: 过表达 IDO-BMSCs-exosome 组; B: 空载体-BMSCs-exosome 组; C: BMSCs-exosome 组; D: 吗替麦考组; E: 未处理组; F: 正常组

2.8 移植心脏苏木素-伊红染色结果 未处理组中炎性细胞浸润心肌数量高于其余各组,而过表达 IDO-BMSCs-exosome 处理组炎性细胞数量少于其它各组。见图6。

3 讨论

间充质干细胞(MSCs)可以调节免疫排斥反应,目前研究发现其通过以下途径完成:① MSCs 不表达主要组织相容性抗原-II 及细胞表面免疫协同分子,但可持续不断表达低水平 MHC-I 分子。② MSCs 可抑制 B、T 淋巴细胞的增生和激活。也能通过细胞因子(如: IL-6、M-CSF)影响树突状细胞的功能及成熟。③ MSCs 也能分泌抗炎因子和改变损伤组织处免疫细胞表面抗原分子表达,从而保护炎症处组织免除排斥反应损伤^[8]。

IDO 可通过三条主要途径实现免疫调节:① IDO 能分解色氨酸并产生毒性代谢产物犬尿氨酸,而淋巴细胞通过摄取犬尿氨酸使细胞进入 G1 期促进细胞凋亡;② IDO 通过消耗色氨酸激活免疫细胞中抑制免疫敏感转录信号途径^[9];③ IDO 也可通过在 DCs 上直接表达出 IDO 做为细胞与细胞间信号分子^[9]。IDO 的功能可不依赖 IDO 酶活性。通过 IDO 与 Src 原癌基因抗体同族第二域(SHP-1 / SHP-2)与磷酸酯酶(phosphatase)互相接触,激活 IDO 中免疫调节区域而发挥抗免疫排斥作用。IDO-SHP 复合体是转录生长因子-β(TGF-β)发挥对血浆树突状细胞调节免疫排斥的关键因素^[10]。

前期研究^[4]证实过表达 IDO-BMSCs 可以有效抑制免疫排斥反应。但经过基因改造的 BMSCs 应用于临床仍然遥遥无期。因而我们将目光聚焦于外泌体。exosome 是一种大小介于 50 ~ 100 nm 囊泡,其内含有多重蛋白质及 RNA。早期认为其是一种细胞代谢产物,细胞可以以外泌体的形式扔掉自身不需要的蛋白和 RNA,exosome 可以通过在细胞与细胞不直接接触下远距离进行细胞间生物信号传导包括免疫信号传导^[11]。研究^[12]显示当细胞暴露于一种应激条件下能够改变与免疫有关的 miRNA,同时也证实,exosome 中有 HSP72 和 miRNA 的表达。Wang et al^[13]报道外泌体中富含的 miRNA 能够与 mRNA 5' 端连接,从而抑制目标基因表达。因此,一条 miRNA 可以与多条 mRNA 相互作用从而抑制免疫蛋白表达。本研究也证实免疫细胞表面抗原分子表达发生改变。

研究采用二维心脏超声检测,可见过表达 IDO-BMSCs-exosome 组移植心脏 EF、FS 较其他各组有显著提高;小动物活体成像技术检测移植心脏局部荧光强度,可见过表达 IDO-BMSCs-exosome 组中移植心脏具有更强荧光强度;流式细胞检测免疫细胞表面抗原分子改变,可见过表达 IDO-BMSCs-exosome 组受体大鼠脾脏淋巴细胞中 CD40、CD86、CD80、主要组织相容性抗原 II、CD45RA、CD45RA + CD45RB 表达降低,而 CD274(PDL-1)表达增高。Treg 细胞的数量增多。HE 染色检测移植心脏局部淋巴细胞浸润减少。

参考文献

- [1] Meirelles Lda S, Fontes A M, Covas D T, et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(5 - 6): 419 - 27.
- [2] Zaher S S, Germain C, Fu H, et al. 3-hydroxykynurenine suppresses CD4 + T-cell proliferation, induces T-regulatory-cell development, and prolongs corneal allograft survival [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(5): 2640 - 8.
- [3] 贺继刚, 李贝贝, 韩金秀, 等. 过表达 IDO 大鼠骨髓间充质干细胞改善异位移植心脏存活 [J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(10): 1447 - 52.
- [4] Lässer C, Eldh M, Lötval J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes [J]. J Vis Exp, 2012 (59): e3037.
- [5] 贺继刚, 沈振亚, 滕小梅, 等. 采用改良 Ono 方法大鼠腹腔异位心脏移植研究 [J]. 浙江临床医学杂志, 2013, 15(2): 145 - 6.
- [6] 韩金秀, 李宏远, 撒亚莲, 等. 采用高速离心及 ExoQuick-TC 法提取小鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体比较及鉴定 [J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(4): 611 - 4.
- [7] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions [J]. Blood, 2006, 107(1): 367 - 72.
- [8] Powell J D, Pollizzi K N, Heikamp E B, et al. Regulation of immune responses by mTOR [J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30: 39 - 68.
- [9] Dalton D K, Noelle R J. The roles of mast cells in anticancer immunity [J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(9): 1511 - 20.
- [10] Pallotta M T, Orabona C, Volpi C, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells [J]. Nat Immunol, 2011, 12(9): 870 - 8.
- [11] Vlassov A V, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820(7): 940 - 8.
- [12] Lenassi M, Cagney G, Liao M, et al. HIV nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4 + T cells [J]. Traffic, 2010, 11(1): 110 - 22.
- [13] Wang K, Zhang S, Weber J, et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(20): 7248 - 59.

Exosomes excreted by bone mesenchymal stem cells with overexpressed IDO improves survival of transplanted heart

He Jigang¹, Han Jinxiu¹, Sa Yalian², et al

(¹Dept of Cardiovascular Surgery, ²Dept of Base Medicine Research, The First People's Hospital of Yunnan Province, The Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032)

Abstract Objective To investigate the mechanism of cardiac myocyte survival in rats by overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** Rat BMSCs overexpression IDO were constructed. The vector was transfected into rat BMSCs, and then the secreted exosomes were extracted. A rat heart model with abdominal heterotopic transplantation was also established. Exosomes secreted by corresponding cells were administered through the caudal vein. Cardiac function changes were also monitored after transplantation. Local fluorescence intensities of transplanted hearts was further evaluated. Flow cytometry was used to detect the expressions of differentiation CD40, CD86, CD80, major histocompatibility complex (MHCII), CD274, CD45RA, CD45RA + CD45RB, and Treg cell. Transplanted hearts in three exosome groups were removed to evaluate corresponding extents of inflammatory cell infiltration by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** Corresponding cell treatments were administered after heterotopic heart transplantation models were established in rats. Ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) of transplanted heart in rats with IDO-overexpressing BMSCs exosomes were higher than those of other groups. Assessment with Caliper IVIS Lumina II also showed the highest local fluorescence intensity in transplanted heart of the same group. An interference measure was provided after 2 days, and flow cytometry results revealed that spleen cells of rats with IDO-BMSCs exosomes presented downregulated expression levels of CD40, CD86, CD80, MHCII, CD45RA, and CD45RA + CD45RB and upregulated expression levels of CD274 and Treg cell. HE staining proved lower inflammatory cell infiltration in the same group than in other groups. **Conclusion** Exosome secreted by IDO-BMSCs can effectively regulate production of immune DC, T cells, and cytokines and consequently improve survival of transplanted hearts from multiple immunization levels.

Key words indoleamine 2,3-dioxygenase; rat; bone mesenchymal stem cell; exosome; immunosuppression