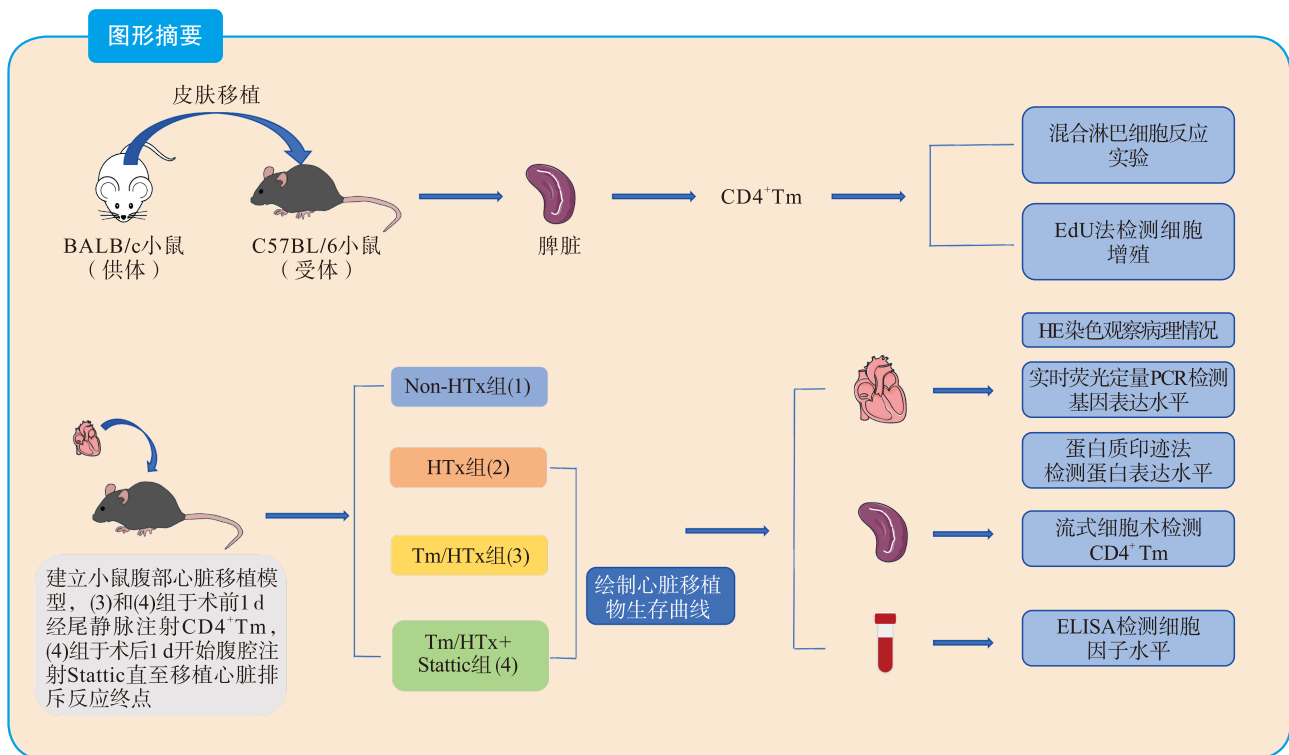


· 论著 ·

Stattic 通过调控记忆性 CD4⁺T 细胞介导的急性排斥反应对小鼠同种异体心脏移植存活的影响

李师亮 冯异 方明 周彦



【摘要】 目的 探讨信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 抑制剂 Stattic 对小鼠同种异体心脏移植排斥反应的影响及机制。**方法** 将 BALB/c 小鼠 (供体) 皮肤移植至 C57BL/6 小鼠 (受体), 4 周后取受体小鼠脾脏分离获得记忆性 CD4⁺T 细胞 (CD4⁺Tm)。将 C57BL/6 小鼠脾脏淋巴细胞与 CD4⁺Tm 进行混合淋巴细胞反应实验, EdU 法检测 Stattic 对 CD4⁺Tm 细胞增殖的影响。构建 C57BL/6 小鼠心脏移植 (HTx) 模型, 实验分为: Non-HTx 组、HTx 组、Tm/HTx 组和 Tm/HTx+Stattic 组。每日观察小鼠移植心脏存活情况; 苏木素-伊红染色观察移植心脏组织病理情况; 实时荧光定量聚合酶链反应检测心脏移植组织中干扰素 (IFN)- γ 、白细胞介素 (IL)-2、IL-10 和转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 信使 RNA (mRNA) 表达水平; 酶联免疫吸附试验检测血清 IFN- γ 、IL-2、IL-10 和 TGF- β 1 含量; 流式细胞术检测脾脏淋巴细胞中 CD4⁺Tm (CD4⁺CD44⁺CD62L⁺) 水平; 蛋白质印迹法检

DOI: 10.12464/j.issn.1674-7445.2024225

基金项目: 湖北省科技创新重大专项项目 (2022ACA002)

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院心脏大血管外科 (李师亮、冯异); 华中科技大学同济医学院附属协和医院健康管理中心 (方明), 耳鼻喉科 (周彦)

作者简介: 李师亮 (ORCID 0000-0003-1018-4010), 博士, 副主任医师, 研究方向为心肺移植及心肌保护, Email: lishiliangcom@126.com

通信作者: 周彦 (ORCID 0009-0005-3937-4004), 博士, 研究方向为缺血-再灌注损伤, Email: bluekeigo@163.com

测移植心脏组织中 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达水平。**结果** 当 Static 浓度超过 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可抑制 CD4⁺Tm 细胞增殖。与 HTx 组比较, Tm/HTx 组小鼠心脏移植存活时间缩短, 心脏移植组织病理损伤加重, 血清 IFN- γ 和 IL-2 含量升高, IL-10 和 TGF- β 1 含量降低, 移植心脏组织 IFN- γ 、IL-2 mRNA 相对表达量升高, IL-10 和 TGF- β 1 mRNA 相对表达量降低, 脾脏淋巴细胞中 CD4⁺Tm 比例升高, 移植心脏组织 p-STAT3/STAT3 比值升高 (均为 $P<0.05$)。与 Tm/HTx 组比较, Tm/HTx+Static 组小鼠心脏移植存活时间延长, 心脏移植组织病理损伤减轻, 血清中 IFN- γ 、IL-2 含量降低, IL-10 和 TGF- β 1 含量升高, 移植心脏组织中 IFN- γ 、IL-2 mRNA 相对表达量降低, IL-10、TGF- β 1 mRNA 相对表达量升高, 脾脏淋巴细胞中 CD4⁺Tm 比例降低, 移植心脏组织 p-STAT3/STAT3 比值降低 (均为 $P<0.05$)。**结论** Static 可延长小鼠同种异体心脏移植物的存活时间, 其机制可能与抑制 CD4⁺Tm 介导的急性排斥反应有关。

【关键词】 心脏移植; 排斥反应; 信号转导和转录激活因子 3; Static; 记忆性 CD4⁺T 细胞; 白细胞介素; 干扰素; 转化生长因子

【中图分类号】 R617, R392 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2025) 01-0007-09

Effect of Static on the survival of mouse heart allograft by regulating memory CD4⁺T cell-mediated acute rejection Li Shiliang*, Feng Yi, Fang Ming, Zhou Yan. *Department of Cardiothoracic and Vascular Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
Corresponding author: Zhou Yan, Email: bluekeigo@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect and mechanism of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) inhibitor Static on the rejection of mouse heart allograft. **Methods** BALB/c mice (donors) were used to transplant skin onto C57BL/6 mice (recipients). Four weeks later, memory CD4⁺T cells (CD4⁺Tm) were isolated from the recipient mice's spleens. Mixed lymphocyte reaction experiment was conducted with C57BL/6 mouse splenocytes and CD4⁺Tm, and the EdU method was used to detect the effect of Static on CD4⁺Tm cell proliferation. A C57BL/6 mouse heart transplant (HTx) model was constructed, and the experiment was divided into four groups: Non-HTx group, HTx group, Tm/HTx group, and Tm/HTx+Static group. The survival of heart allografts in mice was observed daily. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the histopathology of the heart allografts. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression levels of interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-2, IL-10, and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) messenger RNA (mRNA) in the heart allografts. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of IFN- γ , IL-2, IL-10, and TGF- β 1 in the serum. Flow cytometry was used to detect the levels of CD4⁺Tm (CD4⁺CD44⁺CD62L⁺) in splenic lymphocytes. And Western blotting was used to detect the expression levels of STAT3 and p-STAT3 proteins in the heart allografts. **Results** When the concentration of Static exceeded 2.5 $\mu\text{mol/L}$, it could inhibit the proliferation of CD4⁺Tm cells. Compared with the HTx group, the Tm/HTx group showed shorter survival time of heart grafts, more severe histopathological damage, increased serum IFN- γ and IL-2 levels, decreased IL-10 and TGF- β 1 levels, increased relative expression of IFN- γ and IL-2 mRNA, decreased relative expression of IL-10 and TGF- β 1 mRNA in the heart allografts, increased proportion of CD4⁺Tm in splenic lymphocytes, and increased p-STAT3/STAT3 ratio in the heart allografts (all $P<0.05$). Compared with the Tm/HTx group, the Tm/HTx+Static group showed longer survival time of heart grafts, less severe histopathological damage, decreased serum IFN- γ and IL-2 levels, increased IL-10 and TGF- β 1 levels, decreased relative expression of IFN- γ and IL-2 mRNA, increased relative expression of IL-10 and TGF- β 1 mRNA in the heart allografts, decreased proportion of CD4⁺Tm in splenic lymphocytes, and decreased p-STAT3/STAT3 ratio in the heart allografts (all $P<0.05$). **Conclusions** Static may prolong the survival time of mouse heart allografts, and its mechanism may be related to the inhibition of CD4⁺Tm-mediated acute rejection.

【Key words】 Heart transplantation; Rejection; Signal transducer and activator of transcription 3; Static; Memory CD4⁺T cell; Interleukin; Interferon; Transforming growth factor

心脏移植是终末期心脏病的最终治疗方法, 但排斥反应仍然是导致同种异体心脏移植术后病死率增加的重要原因^[1]。急性细胞性排斥反应是心脏移植术长

期存活的主要障碍之一^[2], 而免疫细胞在急性排斥反应中起着关键性作用, 故调节免疫细胞介导的急性排斥反应对于同种异体心脏移植存活具有重大意

义^[3]。免疫抑制药一直是预防和治疗急性排斥反应的主要药物,但会导致患者全身性免疫抑制,从而发生恶性肿瘤、慢性感染等^[4]。因此,急需寻找更完善的心脏移植免疫耐受诱导方案。机体在初次免疫应答后部分 T 细胞会形成记忆性 T 细胞 (memory T cell, Tm),当机体再次被同种抗原侵入时, Tm 将快速识别并增殖,产生更强烈的记忆反应为机体提供免疫保护^[5]。然而, Tm 的这些特点对于器官移植受者而言是致命的,会导致急性排斥反应的发生^[6-7]。因此,寻找针对 Tm 的治疗方法以减轻排斥反应对于心脏移植长期存活十分重要。大量研究显示, CD4⁺Tm 是介导器官移植急性排斥反应的主要免疫细胞之一^[8-10]。据相关研究显示,信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路对 Tm 的形成与增殖至关重要^[11-12]。研究证实,抑制 STAT3 信号传导可明显降低小鼠心脏移植急性排斥反应程度^[13]。同时较多报道显示, STAT3 抑制剂 Stattic 可通过抑制 STAT3 磷酸化激活参与免疫调控^[14-16]。然而, STAT3 能否通过调节 CD4⁺Tm 介导的急性排斥反应影响心脏移植存活时间还需进一步研究。因此,本研究采用 Stattic 干预同种异体心脏移植小鼠,探讨 Stattic 对心脏移植存活时间的影响及可能机制,以期寻找同种异体移植免疫耐受新方法提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂

6~8 周龄雌性近交系 C57BL/6 小鼠 (作为受体) 和 BALB/c 小鼠 (作为供体),体质量 15~20 g,购自湖北省实验动物研究中心 [生产许可证号: SCXK (鄂) 2020—0018]。所有小鼠在无特定病原体级环境中饲养,适应性喂养 1 周后进行实验。本研究获得湖北省疾病预防控制中心实验动物管理与使用委员会批准 [审批号: 安评中心动 (福) 第 202310009 号]。

STAT3 抑制剂 Stattic、SYBR Green qPCR Master Mix (美国 MedChemExpress 公司); 小鼠 CD4⁺Tm 免疫磁珠分选试剂盒 (加拿大 STEMCELL Technologies 公司); 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) -CD4 抗体、藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) -CD44 抗体、别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) -CD62L 抗体、逆转录试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); EdU 细胞增殖检测试剂盒、苏木素-伊红 (hematoxylin-

eosin, HE) 染色试剂盒、Trizol (上海碧云天生物技术有限公司); 干扰素 (interferon, IFN) - γ 、白细胞介素 (interleukin, IL) -2、IL-10 和转化生长因子 (transforming growth factor, TGF) - β 1 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immune absorbent assay, ELISA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 化学发光法检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 兔抗 p-STAT3 (Tyr705) 单克隆抗体、兔抗 STAT3 单克隆抗体、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (英国 Abcam 公司)。

1.2 皮肤致敏模型建立及 CD4⁺Tm 提取

以 BALB/c 小鼠为供体提供皮肤,以 C57BL/6 小鼠为受体接受背部全层皮肤移植,移植皮片为直径 > 1.2 cm 的圆形。移植 4 周后,颈椎脱臼处死 C57BL/6 小鼠并取出脾脏,制备脾脏淋巴细胞悬液,再根据 CD4⁺Tm 免疫磁珠分选试剂盒说明书操作分离 CD4⁺Tm。收集纯化的细胞,依次加入 FITC-CD4、PE-CD44、APC-CD62L 抗体,以 CD4⁺T 细胞群落设门采用流式细胞术分析 CD4⁺Tm 纯度。

1.3 心脏移植模型建立与分组

采用套管法建立小鼠腹部心脏移植模型^[17]: 采用 1% 戊巴比妥钠 (20 mg/kg) 腹腔注射对小鼠进行麻醉,将 1 mL 含肝素的生理盐水经下腔静脉注入 BALB/c 小鼠,打开小鼠胸腔并暴露心脏,血管结扎后,将心脏肺动脉和主动脉剪断,游离心脏并保存于 4 °C 预冷含肝素的生理盐水中。将麻醉的受体 C57BL/6 小鼠腹部正中切开,于腹主动脉和下腔静脉的近心端和远心端分别结扎,并剪一纵型切口 (切口需与供体心脏肺动脉和主动脉口径一致),将供体心脏肺动脉和主动脉分别与受体腹部下腔静脉、腹主动脉缝合。待供体心脏变红并恢复搏动后,缝合受体小鼠腹部切口。术后每日观察 C57BL/6 小鼠腹部移植心脏存活情况,以供体心脏不再搏动视为排斥反应终点。

将 54 只 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组: Non-HTx 组 ($n=6$)、HTx 组 ($n=16$)、Tm/HTx 组 ($n=16$) 和 Tm/HTx+Stattic 组 ($n=16$)。Non-HTx 组小鼠不进行尾静脉注射 CD4⁺Tm 和同种异体心脏移植; HTx 组小鼠不进行尾静脉注射 CD4⁺Tm,但进行同种异体心脏移植; Tm/HTx 组小鼠于心脏移植前 1 d 经尾静脉注射 CD4⁺Tm (1×10^6 /只),然后进行同种异体心脏移植; Tm/HTx+Stattic 组小鼠于心脏移植前 1 d 经

尾静脉注射 CD4⁺Tm (1×10⁶/只), 然后进行同种异体心脏移植, 且于术后 1 d 开始腹腔注射 10 mg/(kg·d) Static 进行干预, 连续注射至移植心脏排斥反应终点^[18]。HTx 组、Tm/HTx 组和 Tm/HTx+Static 组各取 10 只小鼠用于观察移植心脏存活时间, 剩余 6 只小鼠于术后 4 d 处死, 腹主动脉采血后收集心脏移植组织, 将一半组织置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 剩余组织置于 -80 °C 冻存。

1.4 研究内容与方法

1.4.1 混合淋巴细胞反应实验 将分离的 CD4⁺Tm 作为效应细胞, 取 C57BL/6 小鼠脾脏淋巴细胞作为刺激细胞 (经丝裂霉素 C 处理), 将效应细胞按照 10:1 比例接种至含有刺激细胞的 96 孔板中进行混合淋巴细胞反应, 以 CD4⁺Tm 单独培养的作为对照 (Control) 组。同时, 加入不同浓度 (0、1、2.5、5、10 μmol/L) Static 干预 72 h^[19]。根据 EdU 细胞增殖检测试剂盒说明书, 检测各组细胞于 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 根据所测 A 值计算细胞增殖率。细胞增殖率 (%) = (A_{实验孔} - A_{空白孔}) / (A_{对照孔} - A_{空白孔}) × 100%。

1.4.2 HE 染色 将心脏移植组织置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 石蜡包埋心脏移植组织并制作成 4 μm 厚的切片, 脱蜡至水, 进行 HE 染色, 于显微镜下观察组织病理学变化。

1.4.3 实时荧光定量聚合酶链反应 取冻存的小鼠心脏移植组织, 加入 Trizol 裂解组织提取总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书操作将 RNA 逆转录为互补 DNA (complementary DNA, cDNA), 再以 cDNA 为模板, 加入引物和 SYBR Green qPCR Msater Mix

进行扩增。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

1.4.4 ELISA 于术后 4 d, 收集各组小鼠腹主动脉血液标本, 并分离获得血清。根据 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测小鼠血清 IFN-γ、IL-2、IL-10 和 TGF-β1 含量。

1.4.5 流式细胞术 于术后 4 d, 收集各组小鼠脾脏组织, 研磨后用 200 目过滤网过滤制备成脾脏淋巴细胞悬液。随后, 加入红细胞裂解液反应 5 min, 168×g 离心 10 min, 弃上清, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 重悬细胞沉淀。取 100 μL 细胞溶液 (约 1×10⁶ 个细胞) 加入 FITC-CD4、PE-CD44、APC-CD62L 抗体各 1 μL, 避光反应 20 min, 再加入 200 μL PBS 终止反应, 168×g 离心 5 min, 收集细胞沉淀并加入 500 μL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪上机检测, 分析各组小鼠脾脏淋巴细胞中 CD4⁺Tm (CD4⁺CD44⁺CD62L⁺) 水平。

1.4.6 蛋白质印迹法 于术后 4 d 取冻存的小鼠心脏移植组织, 研磨裂解后提取总蛋白。电泳后转膜, 置于 5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h, 洗涤 3 次后加入一抗 (p-STAT3: 1:2 000, STAT3: 1:1 000, GAPDH: 1:2 000) 于 4 °C 孵育过夜, 洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (1:10 000) 于室温孵育 1 h。洗涤后加入化学发光试剂反应 2 min, 采用全自动化学发光仪显影, Image-Pro Plus 6.0 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算 p-STAT3/STAT3 比值。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验; 方差不齐时, 组间两两比较采用 Dunnett T3 检验。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 并用 log-rank 检验对比生存曲线。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD4⁺Tm 分离

通过皮肤致敏模型获得 C57BL/6 小鼠脾脏 CD4⁺Tm, 经磁珠分选纯化后, 流式细胞术检测结果显示, CD4⁺Tm 细胞 (CD4⁺CD44⁺CD62L⁺) 比例达 (91.8±3.0)% (图 1)。

2.2 Static 对小鼠脾脏 CD4⁺Tm 增殖活性的影响

与 Control 组比较, 脾脏淋巴细胞刺激后的 CD4⁺

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列
IFN-γ	上游: 5'-CTGAGACAATGAACGCTACACACT-3'
	下游: 5'-CTTTTCTTCCACATCTATGCCACTT-3'
IL-2	上游: 5'-GACCTCTGCGGCATGTTCTG-3'
	下游: 5'-GCTGACTCATCATCGAATTGGC-3'
IL-10	上游: 5'-CTGAGGCGCTGTCATCGATT-3'
	下游: 5'-AGGTCCTGGACTCCAGCAGA-3'
TGF-β1	上游: 5'-TGACGTCACCTGGAGTTGTACGG-3'
	下游: 5'-GGTTCATGTCATGGATGGTGTC-3'
GAPDH	上游: 5'-AAGCCCATCACCATCTTCC-3'
	下游: 5'-CCTGCCTCACCACCTTCTTG-3'

Tm 增殖活性升高 ($P<0.05$)。随着 Stattic 干预浓度升高, CD4⁺Tm 增殖活性逐渐降低 (均为 $P<0.05$, 图 2)。

2.3 Stattic 对小鼠心脏移植存活时间的影响

各组小鼠心脏移植生存曲线见图 3, 与 HTx 组比较, Tm/HTx 组心脏移植存活时间缩短; 与 Tm/HTx 组比较, Tm/HTx+Stattic 组小鼠心脏移植存活时间延长 (均为 $P<0.05$)。

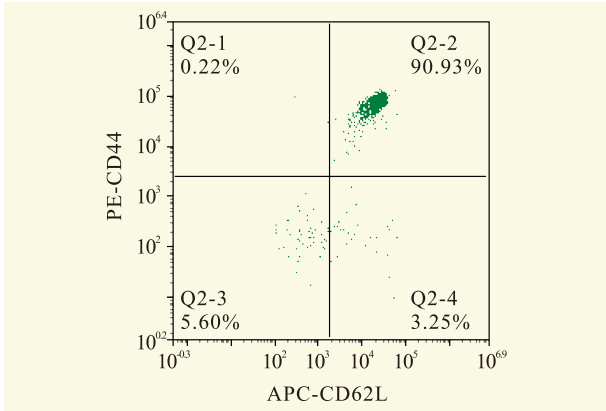
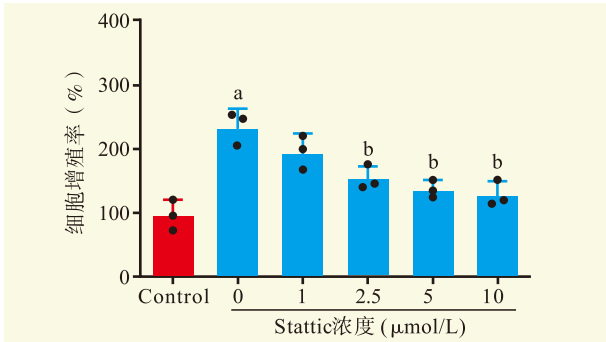


图 1 流式细胞术检测 CD4⁺Tm 细胞

Figure 1 Flow cytometry detection of CD4⁺Tm cells



注: 与 Control 组比较, ^a $P<0.05$; 与 0 $\mu\text{mol/L}$ Stattic 组比较, ^b $P<0.05$ 。

图 2 各组 CD4⁺Tm 增殖活性比较

Figure 2 Comparison of CD4⁺Tm proliferation activity among various groups

2.4 Stattic 对小鼠心脏移植组织病理学的影响

HTx 组小鼠心脏移植组织中大部分心肌纤维结构和心肌细胞形态正常, 局部出现心肌纤维断裂并有少量炎症细胞浸润; Tm/HTx 组小鼠心脏移植组织中部分心肌纤维断裂, 排列疏松, 心肌细胞形态异常, 并有大量炎症细胞浸润; Tm/HTx+Stattic 组小鼠心脏移植组织病理损伤减轻, 心肌纤维排列较为紧密, 炎症细胞浸润减少 (图 4)。

2.5 Stattic 对小鼠免疫细胞因子水平的影响

与 Non-HTx 组比较, HTx 组小鼠血清 IFN- γ 和 IL-2 含量升高, IL-10 和 TGF- β 1 含量降低; 与 HTx 组比较, Tm/HTx 组小鼠血清 IFN- γ 和 IL-2 含量升高, IL-10 和 TGF- β 1 含量降低; 与 Tm/HTx 组比较, Tm/HTx+Stattic 组小鼠血清 IFN- γ 和 IL-2 含量降低, IL-10 和 TGF- β 1 含量升高 (均为 $P<0.05$, 图 5)。

与 HTx 组比较, Tm/HTx 组小鼠心脏移植组织中 IFN- γ 和 IL-2 mRNA 相对表达量升高, IL-10 和 TGF- β 1 mRNA 相对表达量降低; 与 Tm/HTx 组比较, Tm/HTx+Stattic 组小鼠心脏移植组织中 IFN- γ 和 IL-2 mRNA 相对表达量降低, IL-10 和 TGF- β 1 mRNA 相对表达量升高 (均为 $P<0.05$, 图 6)。

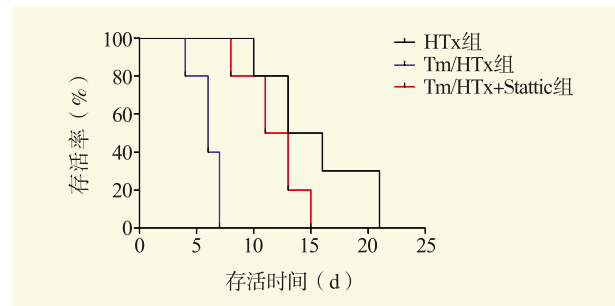


图 3 各组小鼠心脏移植生存曲线

Figure 3 Survival curves of heart allografts of mice among various groups

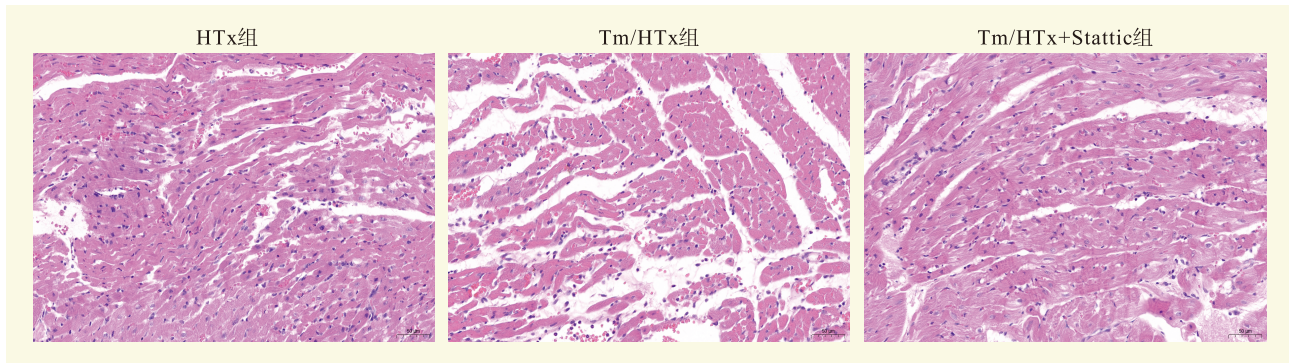
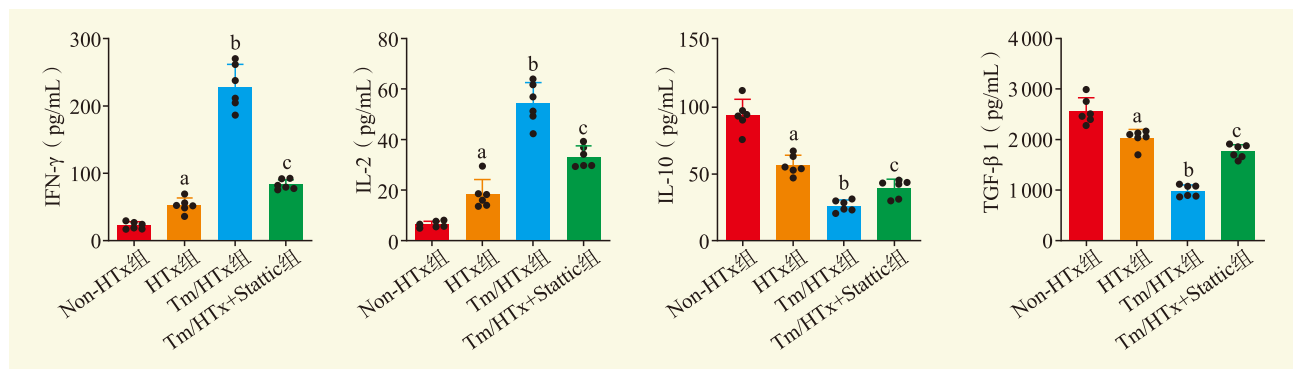


图 4 小鼠心脏移植组织病理学形态变化 ($\times 200$)

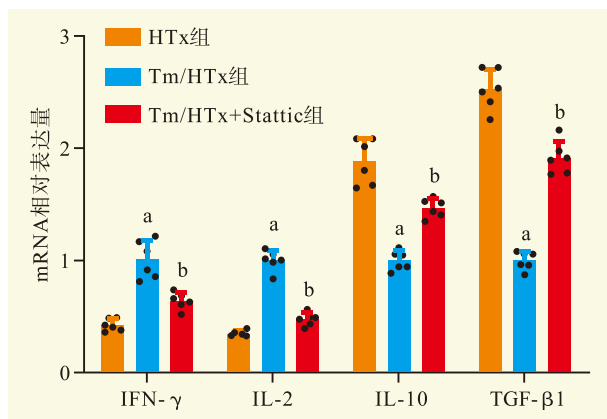
Figure 4 The pathological morphological changes of heart transplant tissue in mice



注：与 Non-HTx 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 HTx 组比较，^b $P < 0.05$ ；与 Tm/HTx 组比较，^c $P < 0.05$ 。

图 5 各组小鼠血清中炎症因子水平比较

Figure 5 Comparison of inflammatory factor levels in serum of mice among different groups



注：与 HTx 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 Tm/HTx 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 6 各组小鼠心脏移植组织中炎症因子 mRNA 水平比较

Figure 6 The mRNA levels of inflammatory factors in graft heart of mice among various groups

2.6 Static 对小鼠脾脏 CD4⁺Tm 比例的影响

与 Non-HTx 组 [(14.0±2.0)%] 比较，HTx 组 [(34.0±3.7)%] 小鼠脾脏淋巴细胞中 CD4⁺Tm 比例升高；与 HTx 组比较，Tm/HTx 组 [(47.9±4.5)%] 小鼠脾脏淋巴细胞中 CD4⁺Tm 比例升高；与 Tm/HTx 组比较，Tm/HTx+Static 组 [(27.3±2.7)%] 小鼠脾脏淋巴细胞中 CD4⁺Tm 比例降低（均为 $P < 0.05$ ，图 7）。

2.7 Static 对心脏移植组织中 STAT3 蛋白表达的影响

与 HTx 组比较，Tm/HTx 组小鼠心脏移植组织中 p-STAT3/STAT3 水平升高；与 Tm/HTx 组比较，Tm/HTx+Static 组小鼠心脏移植组织中 p-STAT3/STAT3 水平降低（均为 $P < 0.05$ ，图 8）。

3 讨论

同种异体记忆辅助 T 细胞可以诱导强大的同种

异体抗体反应，该反应通常与器官移植预后不良有关^[10, 20-22]。由 T 细胞（主要是 CD4⁺T 细胞）介导的急性排斥反应仍然是心脏移植受者在 1 年内死亡的主要原因之一^[23]。然而，目前临床上常用的免疫抑制药几乎是以初始 T 细胞为靶点，而 Tm 与初始 T 细胞在激活和归巢途径上都有明显不同，Tm 介导的急性排斥反应成为免疫抑制药使用后仍然会移植失败的主要原因^[24]。有研究显示，抑制由同种异体 CD4⁺Tm 介导的排斥反应，可降低 IL-2 和 IFN- γ 的表达，提高 IL-10 和 TGF- β 1 的表达，进而诱导裸鼠心脏移植长期存活^[9, 25]。本研究结果显示，从皮肤移植致敏实验获得的同种异体 CD4⁺Tm 使心脏移植小鼠的排斥反应增强，其心脏移植存活时间短于未注射 CD4⁺Tm 的小鼠，心脏移植组织病理损伤严重，血清 IFN- γ 和 IL-2 水平及心脏移植组织 IFN- γ 和 IL-2 mRNA 表达水平升高，而血清中 IL-10 和 TGF- β 1 水平及心脏移植组织中 IL-10 和 TGF- β 1 mRNA 表达水平降低，脾脏组织中 CD4⁺Tm 比例升高，提示同种异体 CD4⁺Tm 可改变心脏移植受体小鼠体内免疫微环境，从而介导小鼠心脏移植后的急性排斥反应，缩短心脏移植存活时间。Nian 等^[26] 研究证实，靶向 CD4⁺Tm 以减少其细胞因子（IL-2、IL-17 和 IFN- γ ）的产生和增殖，可显著延长同种异体移植物的存活时间。因此，有效抑制 CD4⁺Tm 介导的急性排斥反应可为心脏移植长期存活奠定基础。

本研究还发现，同种异体 CD4⁺Tm 注射使小鼠心脏移植组织中 STAT3 磷酸化水平升高，推测 STAT3 激活可能在 CD4⁺Tm 介导的心脏移植排斥反应中发挥一定的作用。STAT3 以单体形式存在于细胞质中，当其因 SH2 结构域内的 Y705 处磷酸化、二聚化而被激活时，易位至细胞核中调节下游靶基因表达，从而

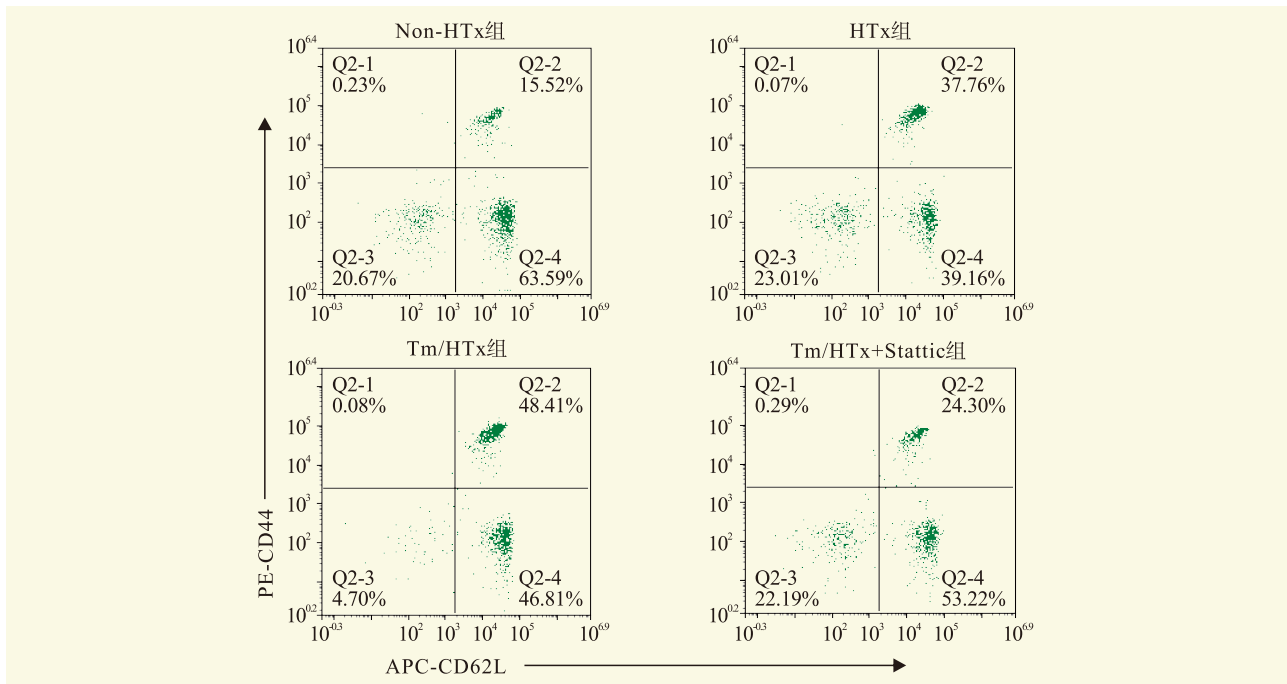
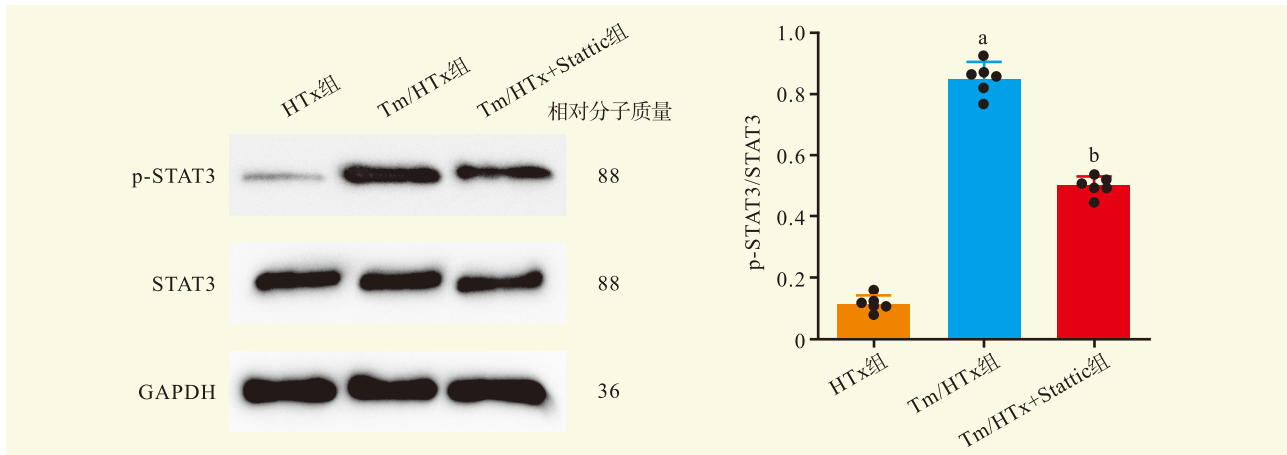


图 7 各组小鼠脾脏淋巴细胞中 CD4⁺Tm 比例

Figure 7 CD4⁺Tm ratio in splenic lymphocytes of mice in various groups



注：与 HTx 组比较，^a*P*<0.05；与 Tm/HTx 组比较，^b*P*<0.05。

图 8 小鼠移植心脏中 p-STAT3 和 STAT3 蛋白表达水平

Figure 8 The protein expression levels of p-STAT3 and STAT3 in graft hearts of mice

参与胚胎发育、免疫应答等多种生理功能^[27-29]。STAT3 被认为是一种致癌转录因子，在肿瘤方面的研究较多^[30-32]。在免疫排斥反应方面，有研究显示，增强 STAT3 的磷酸化水平会促进 CD4⁺T 细胞的分化及增殖，介导辅助性 T 细胞 17 分化成熟，从而促进小鼠角膜移植排斥反应^[33]。同样，STAT3 在大小鼠心脏移植急性排斥反应和延迟性排斥反应中也会被激活，抑制 STAT3 活化可降低排斥反应，延长心脏移植植物存活时间^[13, 34]。前期研究结果证实抑制 STAT3 激活可减轻 Tm 的免疫反应，降低心脏移植物的记忆

反应，从而促进移植植物存活^[35]。STAT3 已成为一个具有很大研究价值的靶点，STAT3 抑制剂的开发可能为 STAT3 相关疾病提供更多的治疗策略，而且一部分靶向 STAT3 的抑制剂已进入临床试验阶段^[36-37]。Stattic 作为特异性 STAT3 抑制剂，可有效抑制 STAT3 的 SH2 结构域 Y705 和 S727 位点发生磷酸化，并调节细胞因子的分泌^[38]。但 Stattic 能否通过抑制 STAT3 磷酸化降低心脏移植小鼠急性排斥反应尚不清楚。本研究中，体外实验结果显示 Stattic 干预可抑制 CD4⁺Tm 增殖，体内实验结果亦显示 Stattic 干预

降低心脏移植小鼠脾脏中 CD4⁺Tm 占比, 提示 Static 干预可抑制 CD4⁺Tm 的增殖与归巢。而且, Static 干预使 IL-2 和 IFN- γ 水平降低, IL-10 和 TGF- β 1 水平升高, 明显降低小鼠心脏移植后的排斥反应, 延长心脏移植存活时间。

综上所述, 同种异体的 CD4⁺Tm 加剧小鼠心脏移植后的排斥反应, STAT3 抑制剂 Static 可抑制 CD4⁺Tm 的增殖与归巢, 通过减轻 CD4⁺Tm 介导的急性排斥反应, 延长小鼠心脏移植物的存活时间。然而, Static 在减弱 CD4⁺Tm 作用以延长心脏移植存活时间的同时, 是否会对受体保护性免疫功能及并发症产生影响还需进一步研究, 在后续研究中将增加动物数量并延长观察时间以评估 Static 对心脏移植小鼠其他方面的影响。鉴于抑制 STAT3 有助于心脏移植长期存活, STAT3 可能是缓解心脏移植排斥反应的潜在靶点, 为临床心脏移植排斥反应防治靶向药的研发提供了重要方向。

参考文献:

- [1] BENCK L, SATO T, KOBASHIGAWA J. Molecular diagnosis of rejection in heart transplantation[J]. *Circ J*, 2022, 86(7): 1061-1067. DOI: 10.1253/circj.CJ-21-0591.
- [2] ABDRAKHIMOV B, KAYEWA E, WANG Z. Prediction of acute cardiac rejection based on gene expression profiles[J]. *J Pers Med*, 2024, 14(4): 410. DOI: 10.3390/jpm14040410.
- [3] KONG D, HUANG S, MIAO X, et al. The dynamic cellular landscape of grafts with acute rejection after heart transplantation[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2023, 42(2): 160-172. DOI: 10.1016/j.healun.2022.10.017.
- [4] KOPECKY B J, DUN H, AMRUTE J M, et al. Donor macrophages modulate rejection after heart transplantation[J]. *Circulation*, 2022, 146(8): 623-638. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.057400.
- [5] KÜNZLI M, MASOPUST D. CD4⁺ T cell memory[J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(6): 903-914. DOI: 10.1038/s41590-023-01510-4.
- [6] 阳诺, 郭建极, 周华富. 器官移植中记忆性 T 细胞的研究进展[J]. *微创医学*, 2020, 15(6): 783-786. DOI: 10.11864/j.issn.1673.2020.06.27.
YANG N, GUO J J, ZHOU H F. Research progress of memory T cells in organ transplantation[J]. *J Minim Invasive Med*, 2020, 15(6): 783-786. DOI: 10.11864/j.issn.1673.2020.06.27.
- [7] SAHA I, CHAWLA A S, OLIVEIRA A P B N, et al. Alloreactive memory CD4 T cells promote transplant rejection by engaging DCs to induce innate inflammation and CD8 T cell priming[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121(34): e2401658121. DOI: 10.1073/pnas.2401658121.
- [8] ABOU-DAYA K I, TIEU R, ZHAO D, et al. Resident memory T cells form during persistent antigen exposure leading to allograft rejection[J]. *Sci Immunol*, 2021, 6(57): eabc8122. DOI: 10.1126/sciimmunol.abc8122.
- [9] WANG F, CHEN J, SHAO W, et al. Anti-CD44 monoclonal antibody inhibits heart transplant rejection mediated by alloantigen-primed CD4⁺ memory T cells in nude mice[J]. *Immunol Invest*, 2010, 39(8): 807-819. DOI: 10.3109/08820139.2010.497833.
- [10] GORBACHEVA V, FAN R, FAIRCHILD R L, et al. Memory CD4 T cells induce antibody-mediated rejection of renal allografts[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(11): 3299-3307. DOI: 10.1681/ASN.2015080848.
- [11] KAMINSKIY Y, MELENHORST J J. STAT3 role in T-cell memory formation[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2878. DOI: 10.3390/ijms23052878.
- [12] LIANG C L, WEI Y Y, CHEN Y, et al. Zhen-Wu-Tang ameliorates lupus nephritis by diminishing renal tissue-resident memory CD8⁺ T cells via suppressing IL-15/STAT3 pathway[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2024, 174: 116597. DOI: 10.1016/j.biopha.2024.116597.
- [13] ZHANG M, XU M, WANG K, et al. Effect of inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway on the Th17/IL-17 axis in acute cellular rejection after heart transplantation in mice[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 77(5): 614-620. DOI: 10.1097/FJC.0000000000001007.
- [14] 乔迪, 胡赤, 吴珏, 等. STAT3/iNOS 通路在慢性阻塞性肺疾病伴气道重塑中的作用[J]. *广西医学*, 2022, 44(22): 2634-2640, 2678. DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2022.22.11.
QIAO D, HU C, WU J, et al. Effect of STAT3/iNOS pathway in chronic obstructive pulmonary disease complicated with airway remodeling[J]. *Guangxi Med J*, 2022, 44(22): 2634-2640, 2678. DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2022.22.11.
- [15] INUI H, KAWAKITA T, MURAYAMA M, et al. Effects of STAT inhibitors in mouse models of endometriosis[J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(8): 2449-2456. DOI: 10.1007/s43032-023-01202-2.
- [16] 华梦晴, 高培宇, 方芳, 等. IL-6 通过激活 JAK2/STAT3 信号通路增强小鼠肺泡巨噬细胞的吞噬功能[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2024, 40(1): 13-18. DOI: 10.13423/j.cnki.cjcmi.009693.
HUA M Q, GAO P Y, FANG F, et al. IL-6 enhances the phagocytic function of mouse alveolar macrophages by activating the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2024, 40(1): 13-18. DOI: 10.13423/j.cnki.cjcmi.009693.
- [17] LIU J, LIANG L, LI D, et al. JAK3/STAT3 oncogenic pathway and PRDM1 expression stratify clinicopathologic features of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(6): 3219-3232. DOI: 10.3892/or.2019.7112.
- [18] 张安臣. MiR155 在心脏移植排斥反应的作用及机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
- [19] PENG J, HUANG H, HUAN Q, et al. Adiponectin deficiency enhances anti-tumor immunity of CD8⁺ T cells in rhabdomyosarcoma through inhibiting STAT3 activation[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 847088. DOI: 10.3389/fonc.2022.847088.
- [20] ALEXANDER K L, FORD M L. The entangled world of memory T cells and implications in transplantation[J]. *Transplantation*, 2024, 108(1): 137-147. DOI: 10.1097/TP.0000000000004647.
- [21] GILL R G, BURRACK A L. Diverse routes of allograft

- tolerance disruption by memory T cells[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 580483. DOI: 10.3389/fimmu.2020.580483.
- [22] CHEN Y, LIU Z, LIU F, et al. T cell specific deletion of IRF4 with Ox40-Cre impairs effector and memory T cell responses in heart transplantation[J]. *Clin Immunol*, 2023, 252: 109647. DOI: 10.1016/j.clim.2023.109647.
- [23] LI H, CHEN Y, JIN Q, et al. Noninvasive radionuclide molecular imaging of the CD4-positive T lymphocytes in acute cardiac rejection[J]. *Mol Pharm*, 2021, 18(3): 1317-1326. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c01155.
- [24] 王思名. 记忆性 CD4⁺T 细胞在环孢素 A 作用下介导小鼠异位心脏移植急性排斥反应的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2011.
- [25] QIU S, LV D. Triptolide inhibits CD4⁺ memory T cell-mediated acute rejection and prolongs cardiac allograft survival in mice[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(4): 2817-2822. DOI: 10.3892/etm.2017.4867.
- [26] NIAN Y, ISKE J, MAENOSONO R, et al. Targeting age-specific changes in CD4⁺ T cell metabolism ameliorates alloimmune responses and prolongs graft survival[J]. *Aging Cell*, 2021, 20(2): e13299. DOI: 10.1111/ace1.13299.
- [27] 马杰, 陈韵之, 田蕾. 黄芩多糖通过调节 JAK2/STAT3 通路和 IL-23/IL-17 炎症轴改善 DSS 诱导的 UC 模型小鼠的炎症[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2023, 44(3): 423-429. DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0308.
- MA J, CHEN Y Z, TIAN L. Scutellaria baicalensis polysaccharides alleviates the inflammation of DSS-induced UC model mice by regulating JAK2/STAT3 pathway and IL-23/IL-17 inflammatory axis[J]. *J Sun Yat Sen Univ (Med Sci)*, 2023, 44(3): 423-429. DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0308.
- [28] PORIA D K, SHESHADRI N, BALAMURUGAN K, et al. The STAT3 inhibitor stattic acts independently of STAT3 to decrease histone acetylation and modulate gene expression[J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100220. DOI: 10.1074/jbc.RA120.016645.
- [29] LU X, XU Y, LI X, et al. Selective STAT3 inhibitor STX-0119 alleviates osteoarthritis progression by modulating the STAT3/PPAR γ signaling pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 227: 116420. DOI: 10.1016/j.bcp.2024.116420.
- [30] WU A, FANG D, LIU Y, et al. Nuclear translocation of thioredoxin-1 promotes colorectal cancer development via modulation of the IL-6/STAT3 signaling axis through interaction with STAT3[J]. *Theranostics*, 2023, 13(14): 4730-4744. DOI: 10.7150/tno.85460.
- [31] 于艳艳, 康霞, 范林林, 等. LINC00626 通过 JAK1/STAT3/KHSRP 信号轴调控结肠癌转移的恶性进展[J]. *实用医学杂志*, 2024, 40(12): 1643-1650. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2024.12.006.
- YU Y Y, KANG X, FAN L L, et al. LINC00626 promotes the malignant process of colorectal cancer metastasis through the JAK1/STAT3/KHSRP axis[J]. *J Pract Med*, 2024, 40(12): 1643-1650. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2024.12.006.
- [32] YOU Y, CHEN X, CHEN X, et al. Jiawei Yanghe Decoction suppresses breast cancer by regulating immune responses via JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 316: 116358. DOI: 10.1016/j.jep.2023.116358.
- [33] CAO Q, LI Y, LI Y, et al. Loss of miR-673-5p expression in the cornea promotes rat corneal allograft rejection by promoting Th17 cell differentiation mediated by JAK2/STAT3[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(18): 1409. DOI: 10.21037/atm-21-2051.
- [34] 罗浩军, 涂刚, 李振华, 等. 信号传导蛋白和转录激活物 3 参与调节大鼠异种心脏移植延迟性排斥反应[J]. *中华器官移植杂志*, 2014, 35(1): 46-49. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2014.01.012.
- LUO H J, TU G, LI Z H, et al. Involvement of signal transducer and activator of transcription 3 in delayed xenograft rejection in mice-to-rats cardiac transplantation as a regulator[J]. *Chin J Organ Transplant*, 2014, 35(1): 46-49. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2014.01.012.
- [35] 李师亮, 方明, 周彦. 桂皮醛通过 mTOR 和 STAT3 调控记忆性 T 细胞促进心脏移植长期存活的作用及机制研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(3): 413-420. DOI: 10.3969/j.issn.1674-070X.2023.03.008.
- LI S L, FANG M, ZHOU Y. Mechanism of cinnamaldehyde in regulating long-term survival of cardiac grafts induced by memory T cells through mTOR and STAT3[J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2023, 43(3): 413-420. DOI: 10.3969/j.issn.1674-070X.2023.03.008.
- [36] SONG J, WANG J, TIAN S, et al. Discovery of STAT3 inhibitors: recent advances and future perspectives[J]. *Curr Med Chem*, 2023, 30(16): 1824-1847. DOI: 10.2174/0929867329666220819093117.
- [37] WANG K N, ZHOU K, ZHONG N N, et al. Enhancing cancer therapy: the role of drug delivery systems in STAT3 inhibitor efficacy and safety[J]. *Life Sci*, 2024, 346: 122635. DOI: 10.1016/j.lfs.2024.122635.
- [38] MIKYSKOVA R, SAPEGA O, PSOTKA M, et al. STAT3 inhibitor Stattic and its analogues inhibit STAT3 phosphorylation and modulate cytokine secretion in senescent tumour cells[J]. *Mol Med Rep*, 2023, 27(4): 81. DOI: 10.3892/mmr.2023.12968.

(收稿日期: 2024-08-23)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)