



申请代码	H1006
受理部门	
收件日期	
受理编号	8177060840



国家自然科学基金 申 请 书

(2017 版)

资助类别:	面上项目		
亚类说明:			
附注说明:	常规面上项目		
项目名称:	TGF- β 诱导MDSCs联合常用免疫抑制剂预防排斥反应及其机制研究		
申 请 人:	王玮	电 话:	010-85231383
依托单位:	首都医科大学		
通讯地址:	北京市朝阳区工体南路8号朝阳医院泌尿外科		
邮政编码:	100020	单位电话:	010-83911069
电子邮箱:	zico73@medmail.com.cn		
申报日期:	2017年02月24日		

国家自然科学基金委员会



基本信息

申请人信息	姓名	王玮	性别	男	出生年月	1973年02月	民族	汉族
	学位	博士	职称	主任医师	每年工作时间(月)	6		
	电话	010-85231383		电子邮箱	zico73@medmail.com.cn			
	传真			国别或地区	中国			
	个人通讯地址	北京市朝阳区工体南路8号朝阳医院泌尿外科						
	工作单位	首都医科大学/首都医科大学附属北京朝阳医院						
	主要研究领域	移植免疫耐受						
依托单位信息	名称	首都医科大学						
	联系人	邵雪梅	电子邮箱	xmshao@ccmu.edu.cn				
	电话	010-83911069	网站地址	http://www.ccmu.edu.cn/				
合作研究单位信息	单位名称							
项目基本信息	项目名称	TGF- β 诱导MDSCs联合常用免疫抑制剂预防排斥反应及其机制研究						
	英文名称	Effects of TGF- β induced MDSCs combined with immunosuppressor on preventing transplantation rejection						
	资助类别	面上项目				亚类说明		
	附注说明	常规面上项目						
	申请代码	H1006. 器官移植与移植免疫						
	基地类别							
	研究期限	2018年01月01日 -- 2021年12月31日				研究方向: 肾脏移植		
	申请直接费用	61.4100万元						
中文关键词		肾脏移植; 髓系抑制细胞; 免疫抑制剂; 免疫耐受; 转化生长因子- β						
英文关键词		Kidney Transplantation; Myeloid suppressor cells; Immunosuppressive Agents; Immune Tolerance; Transforming Growth Factor- β						



中文摘要	<p>TGF-β 诱导肾移植受者体内在免疫抑制功能方面起重要作用的髓系抑制性细胞 (MDSCs) 作用目前仍不详, 有待进一步研究。我们近期初步研究表明, 肾移植受者外周血MDSCs持续显著增多, 其对T细胞诱导的细胞免疫有明显抑制作用, 提示该变化可能与TGF-β 诱导MDSCs后引起的免疫低下以及相关特异性免疫耐受有关。因此, 在本课题中, 通过扩大样本量, 系统研究TGF-β 对器官移植受者髓系抑制性细胞的相关数据, 如细胞数量、抑制功能、表型、效应分子的影响规律及相关机制进行研究, 分析该方向临床应用意义。通过免疫系统人源化相关小鼠动物模型的研究, 解析TGF-β 诱导对髓系抑制性细胞 (MDSCs) 作用的分子通路。该研究对理解髓系抑制性细胞在器官移植后特异性免疫耐受诱导的作用机制具有重要意义, 未来临床应用价值广阔。</p>
英文摘要	<p>The mechanisms of how transforming growth factor (TGF-β) induced myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), which play a profound role in negatively regulating the immunological system, in kidney transplant recipients are still unknown, needs further research. Preliminary study demonstrated that MDSCs developed and remained stable in the peripheral blood of kidney transplantation recipients. The effects of MDSCs inhibiting T cells response are significant, which indicated the relevance with immune tolerance induction by TGF-β. Based on observation, firstly, we aim to perform a large-scale fundamental animal experiments to analyze the impacts on the number, phenotype, suppressive activity, and functional molecules of MDSCs by TGF-β and how to applied in clinic in kidney transplantation recipients; secondly, to explore the molecular pathways of the effects on human MDSCs by TGF-β with mice model. The study may offer us the chance to understand the functional mechanisms of MDSCs, may play a significant application value in clinical treatment.</p>



项目组主要参与者（注：项目组主要参与者不包括项目申请人）

编号	姓名	出生年月	性别	职 称	学 位	单位名称	电话	电子邮箱	证件号码	每年工作 时间（月）
1	杨晓勇	1971-08-11	男	副主任医师	博士	首都医科大学	010-85231383	dr_xiaoyongyang@163.com	41300119710811055X	2
2	王伟	1982-08-16	男	主治医师	博士	首都医科大学	010-85231383	wangww627@163.com	370783198208166712	6
3	苏路路	1988-07-08	男	医师	硕士	首都医科大学	010-85231383	sddpsululu@163.com	370923198807080376	6
4	张希诺	1986-01-22	男	博士生	硕士	首都医科大学	010-85231383	13716330034@163.com	210105198601223131	10
5	孙泽家	1990-10-02	男	硕士生	学士	首都医科大学	010-85231383	szj5076@sina.com	110105199010025353	10
6	李馨	1991-01-28	女	硕士生	学士	首都医科大学	010-85231383	cyyylixin@163.com	14020319910128704X	10

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
7	2	1	1		1	2



国家自然科学基金项目资金预算表

项目编号: 8177060840

项目负责人: 王玮

金额单位: 万元

序号	科目名称	金额	备注
	(1)	(2)	(3)
1	一、直接费用	61.4100	
2	1、设备费	0.0000	
3	(1)设备购置费	0.00	
4	(2)设备试制费	0.00	
5	(3)设备改造与租赁费	0.00	
6	2、材料费	32.21	实验试剂及耗材、动物费用等
7	3、测试化验加工费	13.20	流式细胞仪、酶标仪检测费
8	4、燃料动力费	0.00	
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	4.00	住宿费 、交通费、会议注册费、国际合作费
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	4.00	文献查阅, 发表文章审稿、版面费
11	7、劳务费	8.00	研究生劳务费
12	8、专家咨询费	0.00	
13	9、其他支出	0.00	
14	二、自筹资金来源	0.0000	



预算说明书（定额补助）

（请按《国家自然科学基金项目资金预算表编制说明》中的要求，对各项支出的主要用途和测算理由及合作研究外拨资金、单价 ≥ 10 万元的设备费等内容进行详细说明，可根据需要另加附页。）

本课题共申请资助经费61.41万元，其中直接费用61.41万，具体预算说明如下：

1. 仪器设备费（0万元）

本课题实验仪器可基于现有实验室仪器可实现，无仪器添加需要。

[1]设备购置费 无

[2]设备试制费 无

[3]设备改造与租赁费 无

2. 材料费（32.21万元）

（1）原材料/试剂/药品购置费（21.8万元）

[1]流式细胞仪应用主要荧光标记抗体及细胞亚群分选试剂盒（6.6万元）

抗体4000/支*9支+试剂盒6000/盒*5盒=6.6万元

[2]分子生物学试剂（8万元）

DNA及RNA提取、反转录、细胞转染、免疫印迹等相关试剂共8.00万元

[3]细胞培养用试剂（7.20万元）

细胞因子2000元/支*28支+培养基50元/瓶*80瓶+动物血清3000元/瓶*4瓶=7.20万元

（2）实验动物费（8.01万元）

实验动物主要为免疫人源化小鼠及饲养费，为行皮肤移植购买C57BL/6、BALB/c等SPF

级小鼠300元/只*80只+饲养费4.00万元=6.40万元

实验耗材培养板1000元/箱*5箱+培养皿800元/包*8包+培养瓶1000元/箱*1箱+吸头100元/包*20包+离心管50元/包*30包+EP管0.02元/个*10000个=1.61万元

（3）其他试剂和耗材共2.40万元

按每年0.6万元计，4年共2.40万元

合计32.21万元

3. 测试化验加工费（13.2万元）

测试化验加工费是指在课题研究实施过程中支付的检验、测试、化验及加工等费用，共计13.2万元，主要体现在以下几个方面：

流式细胞仪检测，300元/小时，实验时间2小时/次，即600元/次，每年使用20次，4年合计4.8万元（600元/次 \times 20次/年 \times 4年=4.8万元）；

激光共聚焦显微镜观测，200元/小时，实验时间1小时/次，即200元/次，每年使用60次，4年共计3.2万元（200元/次 \times 60次/年 \times 4年=4.8万元）；

酶标仪检测，40元/小时，实验时间1小时/次，即40元/次，每年使用100次，4年共计1.6万（40元/次 \times 100次/年 \times 4年=1.6万元）

其他检测费用，按0.5万元/年计，4年共计2万元

合计13.2万元

4. 燃料动力费

无

5. 差旅/会议/国际合作与交流费（4万元）

本实验期间为参加相关国际合作与交流，会议注册费用及往返差旅费用，按1万元/年计算。

6. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费（4万元）

主要用于支付研究过程中资料信息查询及发表文章的审稿费、版面费等共计4万元（每篇SCI



文章从文献查阅到发表版面费合计约1万元，共发表3~4篇左右SCI论文）。

7. 劳务费（8万元）

用于直接参加项目研究生等的劳务费

博士劳务费800元/月，每人每年工作时间为10个月，4年合计劳务费3.2万元（800元/月×10月×4年=3.2万元）；

硕士生劳务费600元/月，每人每年工作总的时间为10个月，4年合计劳务费4.8万元（600元/月×10月×4年×2人=4.8万元）；

以上劳务费共计8万元。

8. 专家咨询费（0万元）

无

9. 其他支出（0万元）

无

NSFC 2017



正文：参照以下提纲撰写，要求内容翔实、清晰，层次分明，标题突出。**请勿删除或改动下述提纲标题及括号中的文字。**

（一）立项依据与研究内容（4000-8000 字）：

1. 项目的立项依据（研究意义、国内外研究现状及发展动态分析，需结合科学研究发展趋势来论述科学意义；或结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。附主要参考文献目录）：

肾脏移植已经成为治疗终末期肾病的最佳手段，但是移植后排斥反应仍为肾移植术后长期生存的最大障碍。目前应用的免疫抑制剂可显著降低急性排斥反应发生率，但是对慢性排斥反应几乎束手无策，所以慢性排斥是造成移植物丢失的主要原因之一。不仅如此，肾脏移植术后，患者需长期服用免疫抑制剂，使机体免疫防御功能明显降低，可引发致命性的感染和恶性肿瘤，所以控制移植后排斥反应的最佳方法为诱导免疫耐受。这种免疫耐受只针对移植物，特异性强，可持续性好，且不影响受者的系统免疫功能。

1.1髓系抑制性细胞(Myeloid-derived Suppressor Cells, MDSCs)

1.1.1 MDSCs的简介

MDSCs是一组骨髓来源的异质性细胞群，是树突状细胞、巨噬细胞、粒细胞的前体，具有强大的负向免疫调节作用。MDSCs通常存在于外周血，淋巴结及骨髓中；在病理（如肿瘤，自体免疫疾病，创伤，烧伤等）情况下，MDSCs会在肿瘤组织和炎症组织周围大量汇集[1]。

1.1.2 MDSCs的来源与分化

在人类骨髓中，造血干细胞（Hematopoietic Stem Cells, HSTs）的分化通路为：

共同髓系祖细胞（Common Myeloid Progenitor Cells, CMPs）→未成熟髓细胞（Immature Myeloid Cells, IMCs）→迁移至外周免疫器官→分化为成熟的树突状细胞，粒细胞及巨噬细胞→进入相应的器官、组织发挥免疫功能[2-3]。

在病理条件下，这些髓系来源的前体细胞成熟受阻，转为分化为具有免疫抑制功能的MDSCs[2]。

1.1.3 MDSCs的表型和分类

目前尚未发现MDSCs独一无二的分子标志，但现有分子标志物可粗略区分MDSCs和其他类型的细胞。公认的MDSCs的表型标志如下[4-5]

小鼠MDSCs分型：粒细胞样的G-MDSCs（CD11b+Ly6C-Ly6G+）



单核细胞样的M-MDSCs (CD11b+Ly6C+Ly6G-)

人类MDSCs分型：粒细胞样的MDSCs (CD33+CD11b+CD14-CD15+)

单核细胞样的MDSCs (CD33+CD11b+CD14+CD66b+ MDSCs)

1.1.4 MDSCs的扩增和激活

MDSCs扩增的机制

诱导MDSCs扩增的因素主要包括环氧化酶-2 (Cyclooxygenase, COX2)，前列腺素类干细胞因子 (Prostanoid Stem Cell Factors, PSCF)，巨噬细胞集落刺激因子 (Macrophage Colony Stimulating Factor, M-CSF)，白细胞介素-6 (Interleukin, IL-6)，粒单核细胞集落刺激因子 (Grain of Monocyte Colony Stimulating Factor, GM-CSF) 和血管内皮细胞生长因子 (Vascular Endothelial cell Growth Factor, VEGF) 等。在肾脏移植后，上述因子的表达升高，JAK-STAT通路激活，S100A8/A9蛋白表达增高，并且与MDSCs表面羧化物-N-聚糖结合，从而抑制MDSCs的分化成熟，促进其扩增[5-6]。

MDSCs活化的机制

MDSCs发挥免疫功能不仅需要扩增，还需要诱导活化。这些诱导因子包括 γ -干扰素 (Interferon- γ , IFN- γ)，Toll样受体 (Toll Like Receptor, TLR) 配体，IL-13，IL-4和转化生长因子 (Transforming growth factor β , TGF- β)，通过STAT6，STAT1，NF- κ B通路发挥作用。IFN- γ 与膜表面受体结合，激活STAT1信号通路，促进精氨酸酶-1 (Arginase-1, Arg-1) 和诱导型一氧化氮合酶 (Inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS) 合成；IL-4和IL-3与IL-4R α 结合，激活STAT6信号通路，促进Arg-1和TGF- β 合成；TLR作用于靶基因—骨髓分化初级反应基因88 (MyD88)，激活NF- κ B信号通路，介导MDSCs扩增[5, 53-54]。

1.1.5 MDSCs的免疫抑制作用的信号通路

(1) 转录因子 (STAT) 家族信号途径

STAT3可调控骨髓分化途径，通过促进髓系细胞的生成和抑制其分化加速MDSCs的产生，并且通过诱导MYC、BCL-XL等为MDSCs提供存活环境。STAT6和STAT1的激活以及Toll样受体介导的NF- κ B的激活都可以上调Arg-1和iNOS，促进抑制性细胞因子 (如TGF- β) 的产生。除此之外，STAT1、STAT6可以协同STAT3共同作用，上调表达活性氧物质 (Reactive Oxygen Species, ROS)，介导免疫抑制作用[5, 8]。

(2) S100钙结合信号蛋白途径

S100钙结合信号蛋白A8 (S100A8) 和A9 (S100A9) 通过与NADPH氧化酶复合体结合，使



后者激活，增强ROS的产生，引发抑制作用[5, 12]。

1.1.6 MDSCs抑制免疫系统的机制

(1) MDSCs抑制T细胞活性

a. MDSCs可通过细胞表面的解聚素和金属蛋白酶结构域17 (ADAM17), 这种酶能够裂解L-选择素的胞外结构域，从而下调T细胞表面L-选择素表达，阻断白细胞和内皮细胞相互作用，T细胞无法向炎症处聚集，无法发挥免疫抑制作用[5-7, 11]。

b. MDSCs高表达Arg-1将底物L-精氨酸耗竭，导致T细胞表面CD3 ζ 链合成受阻，细胞周期调节蛋白D3表达下降、周期素依赖性蛋白激酶4表达下调，使T细胞增殖受阻，从而抑制了特异性T细胞免疫反应[7, 8]。

c. MDSCs高表达的iNos则使机体内NO产生增加，从而抑制了T细胞JAK3和STAT5信号通活性，使MHC II类分子表达降低，并能诱导T细胞的凋亡。同时，MDSCs的STAT3信号通路加强，NADPH氧化酶2合成增加，使得ROS生成增加，NO和ROS相互作用，导致过亚硝酸盐产生增加，从而使细胞表面T细胞受体 (T Cell Receptor, TCR) 和CD8分子被硝化，T细胞的抗原识别功能受损[7-9]。

d. 除此之外，MDSCs还能通过与抗原递呈细胞竞争摄取胞外胱氨酸来抑制T细胞激活，因为胱氨酸和半胱氨酸是T细胞激活所必需的氨基酸[10, 14]。

(2) MDSCs抑制巨噬细胞活性

MDSCs主要是通过下调巨噬细胞分泌的IL-12水平来抑制巨噬细胞活性，达到免疫抑制效果。IL-12是最重要的Th1型细胞因子之一，是活化的自然杀伤NK细胞和T细胞的生长因子，并能诱导NK细胞和T细胞分泌IFN- γ 。吞噬细胞作为固有免疫细胞，它分泌的IL-12可刺激T细胞增殖，IL-12本身也可诱导IFN- γ 的生成，增强巨噬细胞活性。因此IL-12作为连接固有免疫和适应性免疫的桥梁，在肿瘤，炎症，移植等方面均发挥了重要作用。在病理条件下，MDSCs可分泌高水平的IL-10，使巨噬细胞分泌IL-12减少，巨噬细胞活性受到抑制[1, 15-16]。

(3) MDSCs抑制NK细胞机制

MDSCs产生的TGF- β 与NK细胞表面受体结合，下调NK细胞膜表面活化型NKG2D受体，NK细胞分泌细胞毒性细胞因子的能力受限，对靶细胞杀伤力下降[11-13]。

(4) MDSCs与Treg细胞

目前观点认为，MDSCs不仅通过自身的分子通路发挥免疫抑制功能，还可以间接调控Treg的功能，在移植免疫耐受中发挥协同作用。MDSCs分泌的IL-10、CTLA4 (CD152) 和IFN-



γ 可增加Foxp3+Treg细胞数量，从而间接通过Treg发挥免疫调节作用[17-20]。

MDSCs发挥作用的分子通路多种多样，目前研究较多的分子如下[20-27]：

分子类型	靶细胞	作用机制
Arg-1	T细胞 NK细胞	将L-精氨酸作为底物分解，T细胞CD3 ζ 链合成原料减少，增殖受阻
iNOS	T细胞 NK细胞	分解L-精氨酸，抑制MHC-II表达，抑制增殖，诱导凋亡
ROS	T细胞 NK细胞	诱导NADPH 氧化酶亚单位上调，抑制STAT3 信号通路
IDO	T 细胞	消耗T细胞增殖所必须的色氨酸，使T细胞停滞于G0期，无法增殖

IDO: Indoleamine-2,3-Dioxygenase 吲哚胺-2,3-双加氧酶

1. 1. 7 MDSCs在移植免疫耐受中的作用

MDSCs可通过直接抑制T、NK、巨噬细胞功能，亦通过调控Treg细胞间接发挥免疫调节作用，是建立免疫耐受的基本基础。Dugast AS等人[32]的研究报道，CD28抗体诱导的大鼠肾移植免疫耐受模型中发现，MDSCs表达的iNOS在移植肾中汇聚，抑制T细胞功能，介导了免疫耐受，而给予iNOS抑制剂后可破坏已经建立的免疫耐受。Bronte V等人[33]认为Arg-1和iNOS在抑制T细胞功能中扮演重要角色，而L-精氨酸既是Arg-1和iNOS的底物，又是TCR的CD3 ζ 链的原料，其重要性不言而喻。在心脏移植排斥模型中，注射IL-33会显著延长移植物存活时间，主要是由于IL-33可诱导MDSCs增多。ILT2抑制性受体处理的小鼠外周血MDSCs会明显增加，介导免疫耐受的建立。外源性IL-13可刺激MDSCs产生免疫抑制能力更强的亚群并上调Arg-1的表达，但不影响iNOS的表达。多次注射脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导MDSCs，可抑制T细胞增殖和Th1/Th2细胞因子产生，将这群MDSCs过继给正常小鼠，可以显著延长同种异体皮肤移植物的存活时间。GM-CSF体系诱导的MDSCs可抑制T细胞增殖，体系中加入TNF- α 后可进一步增强MDSCs的免疫抑制功能，主要是通过iNOS通路发挥作用。



[35-40, 54]

综上所述, 提高MDSCs的数量和能力是诱导免疫耐受的有效方法之一, 目前有多种诱导体系可体外获取有功能的MDSCs。GM-CSF可诱导骨髓祖细胞成为MDSCs; GM-CSF和IL-6体外诱导的MDSCs可显著延长胰岛存活时间; GM-CSF、G-CSF和IL-13诱导的MDSCs可预防移植物抗宿主病。除了GM-CSF外, M-CSF也可使骨髓祖细胞分化为具有免疫作用的M-MDSCs。使用复合细胞因子如IL-3, IL-6, TPO, FLT3L, VEGF, M-CSF培养骨髓干细胞可诱导MDSCs形成; 在小鼠移植物抗宿主病模型中, 这些MDSCs可抑制T细胞活化; 而TNF- α 可增强MDSCs的免疫抑制功能, 与GM-CSF联合应用培育出的MDSCs免疫抑制能力明显增强; 在小鼠皮肤移植模型中, 皮片存活时间延长[37, 44-45, 47]。

我们在前期研究中, 通过M-CSF+TGF- β 体系诱导出了具有免疫调节功能的M-MDSC, 对T细胞具有强大的抑制作用, 相较于M-CSF诱导体系明显增强。

除了MDSCs之外, 目前研究较多的免疫耐受诱导方法如下[5, 34, 41-43, 53]:

类型	方法	主要作用机制
免疫抑制剂	雷帕霉素	促进CD4+CD25+Treg形成, 增殖和存活
抗体制剂	抗胸腺细胞免疫球蛋白	多克隆抗体清除胸腺细胞, 可能促进Treg形成
	阿伦单抗	清除CD52+T、B、NK及部分单核细胞
	艾库组单抗	拮抗补体蛋白C5, 阻断补体介导的细胞毒作用。可能阻断LFA: ICAM通路
共刺激信号阻断剂	贝拉希普	阻断CD28: CD80/86共刺激通路
蛋白酶体抑制剂	硼替佐米	蛋白酶体抑制剂, 诱导成熟浆细胞凋亡
细胞治疗	骨髓移植	诱导嵌合体形成, 形成中枢性免疫耐受



	Treg	抑制炎症因子产生，下调共刺激和粘附分子，分泌抑制性细胞因子如IL-10, TGF- β ，IL-35等
	树突状细胞	促进Treg扩增，分泌IL-10和TGF- β ，阻止由危险信号和CD40配体引起的活化
	巨噬细胞	汇聚CD4+CD25+FoxP3+细胞，促进活化T细胞的清除
	间充质干细胞	抑制T细胞的增殖和活化，分泌IL-10, IDO和NO，抑制IFN- γ 和IL-17

1.2 免疫抑制剂

临床上常用的免疫抑制剂包括：

免疫抑制剂分类	临床常用药物
皮质类固醇	泼尼松，甲泼尼龙
钙调磷酸酶抑制剂	他克莫司，环孢素
抗细胞增殖剂	吗替麦考酚酯，麦考酚钠，咪唑立宾，来氟米特
雷帕霉素靶蛋白抑制剂	雷帕霉素，依维莫司
其他	共刺激信号阻断剂贝拉希普，生物制剂等

目前有循证医学表明能够影响MDSCs的包括皮质激素，他克莫司，环孢素，雷帕霉素。

1.2.1 皮质激素

通过阻断T细胞和抗原提呈细胞来源的细胞因子及细胞因子受体的基因表达来发挥免疫抑制作用，主要抑制抗原提呈细胞—树突状细胞的功能，同时还可以抑制NF- κ B在核内的转位，从而阻断了T淋巴细胞IL-2，巨噬细胞IL-1和IL-6的分泌，发挥免疫抑制作用。除此之外，还具有非特异性免疫抑制作用，通过阻断Ca⁺载体对单核细胞和其他淋巴细胞起作用，抑制单核细胞向炎症区域聚集，抑制趋化因子的产生及血管扩张剂的合成和释放，免



疫抑制效能广泛，系统，强力。[58-59]

1.2.2 他克莫司/环孢素

钙调磷酸酶是一个二磷体丝氨酸/苏氨酸磷酸化酶，在T细胞活化过程中将细胞膜信号传导至细胞核，刺激IL-2合成这一信号转导通路的必须限速分子。钙离子/钙调神经蛋白信号转导通路在调节对T细胞激活和分化起关键作用的细胞因子的产生方面起重要作用。而他克莫司和环孢素同属钙调磷酸酶抑制剂，可阻断上述通路，抑制T细胞的活化和增殖。

[58-59]

1.2.3 雷帕霉素

特异性作用于mTOR, 使mTOR羧基末端发生磷酸化，失去分解活性，从而阻断了T淋巴细胞和B淋巴细胞钙依赖型/非依赖型信号转导通路，抑制了T细胞增殖过程中G1期向S期的转变，阻止B细胞的G0期，抑制细胞增殖和迁移。[50, 51, 58-59]

1.3 MDSCs联合免疫抑制剂诱导免疫耐受

在临床上，免疫抑制剂是移植患者的必要治疗手段，预防排斥反应效果良好，但药物所带来的机会性感染，恶性肿瘤仍严重威胁着患者健康。有证据表明，**他克莫司，环孢素，糖皮质激素，雷帕霉素**等常用的免疫抑制剂，不仅可通过药物自身通路抑制免疫系统，还可促进MDSCs形成或增强其免疫调节作用[49, 52, 55-56, 58]。

临床上常用免疫抑制剂及与MDSC作用关系[49, 52, 55-58]：

免疫抑制剂	类型	与MDSC关系
他克莫司	钙调磷酸酶抑制剂	FK506BP51可参与IFN γ 或LPS介导的iNOS, Arg-1, ROS表达上升, FK506可通过此通路增强MDSCs活性
环孢素	钙调磷酸酶抑制剂	上调MDSCs的IDO表达, IDO增强MDSCs免疫抑制活性, 并且可促进Treg的分化和激活
雷帕霉素	mTOR受体抑制剂	上调MDSCs的iNOS表达, 增强MDSCs免疫调节能力, 并促进



		MDSCs聚集
糖皮质激素	皮质类固醇	抑制炎症性细胞因子产生， 促进MDSCs扩增，上调Treg细胞

既然免疫抑制剂可通过各自的途径影响MDSCs, 那么MDSCs联合免疫抑制剂是否能成为优秀的免疫耐受诱导方案, 预防排斥反应呢? 因此我们作出假设: MDSCs联合免疫抑制剂可诱导并增强免疫耐受, 延长移植物存活时间, 降低药物不良反应发生率。为验证这一假设, 我们的课题组拟进行如下工作:

(1) 建立MHC不匹配的小鼠肾脏移植模型

(2) 将TGF- β 体外诱导的MDSC与不同免疫抑制剂联合应用, 分为空白对照组, MDSCs组, MDSCs+环孢素A组, MDSCs+他克莫司组, MDSCs+雷帕霉素组, MDSCs+糖皮质激素组, 观察移植物生存情况

(3) 通过病理组织活检, 分析皮片排斥反应差异

(4) 通过聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)检测MDSCs表达产物, 并利用基因敲除小鼠, 探究在皮肤移植模型中, MDSCs与免疫抑制剂协同发挥作用的分子通路

本课题组研究的顺利实施将为免疫耐受诱导方案提供全新的思路, MDSCs联合免疫抑制剂联合应用具有广阔前景, 未来便于在临床进行推广, 可减少排斥反应, 改善移植物生存, 降低药物副反应, 造福广大器官移植患者。

参考文献

1. Serafini P., Borrello I., Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Seminars in Cancer Biology*. 2006;16(1):53-65.
2. Gabrilovich D. I., Bronte V., Chen S.-H., et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Research*. 2007;67(1):425-426.
3. Youn J.-I., Nagaraj S., Collazo M., Gabrilovich D. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of Immunology*. 2008;181(8):5791-5802.
4. Bartmann C., Junker M., Segerer S. E., Hausler S. F., Krockenberger M., Kammerer U.



- CD33(+) /HLA-DR(neg) and CD33(+) /HLA-DR(+/-) cells: rare populations in the human decidua with characteristics of MDSC. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2016;75(5):539–556.
5. Boros P, Ochando JC, Chen SH, Bromberg JS: Myeloid-derived suppressor cells: natural regulators for transplant tolerance. *Human immunology* 2010, 71(11):1061-1066.
6. Rodriguez P. C., Zea A. H., Culotta K. S., Zabaleta J., Ochoa J. B., Ochoa A. C. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(4):21123–21129
7. Rodriguez P. C., Quiceno D. G., Ochoa A. C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*. 2007;109(4):1568–1573.
8. Sawanobori Y., Ueha S., Kurachi M., et al. Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood*. 2008;111(12):5457–5466.
9. Parker K. H., Sinha P., Horn L. A., et al. HMGB1 enhances immune suppression by facilitating the differentiation and suppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Research*. 2014;74(20):5723–5733.
10. Zhao Y, Wu T, Shao S, Shi B, Zhao Y: Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* 2016, 5(2):e1004983.
11. Vaknin I, Blinder L, Wang L, et al. A common pathway mediated through Toll-like receptors leads to T- and natural killer-cell immunosuppression. *Blood*. 2008;111(3):1437–1447.
12. Nausch N., Galani I. E., Schlecker E., Cerwenka A. Mononuclear myeloid-derived ‘suppressor’ cells express RAE-1 and activate natural killer cells. *Blood*. 2008;112(10):4080–4089.
13. Li H. Q., Han Y. M., Guo Q. L., Zhang M. G., Cao X. T. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF- β 1. *The Journal of Immunology*. 2009;182(1):240–249.
14. Hu C.-E., Gan J., Zhang R.-D., Cheng Y.-R., Huang G.-J. Up-regulated myeloid-derived suppressor cell contributes to hepatocellular carcinoma development by impairing dendritic cell function. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2011;46(2):156–164.
15. Saleem SJ, Conrad DH: Hematopoietic cytokine-induced transcriptional regulation and Notch



- signaling as modulators of MDSC expansion. *International immunopharmacology* 2011, 11(7):808-815.
16. Lui S. L., Chan K. W., Tsang R., Yung S., Lai K. N., Chan T. M. Effect of rapamycin on renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Transplant International*. 2006;19(10):834–839.
17. Poschke I., Mao Y., Adamson L., Salazar-Onfray F., Masucci G., Kiessling R. Myeloid-derived suppressor cells impair the quality of dendritic cell vaccines. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2012;61(6):827–838.
18. Greifenberg V., Ribechini E., Rößner S., Lutz M. B. Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN- γ treatment impairs DC development. *European Journal of Immunology*. 2009;39(10):2865–2876.
19. Rolinski J., Hus I. Breaking immunotolerance of tumors: a new perspective for dendritic cell therapy. *Journal of Immunotoxicology*. 2014;11(4):311–318. doi:
20. Beury D. W., Parker K. H., Nyandjo M., Sinha P., Carter K. A., Ostrand-Rosenberg S. Cross-talk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages, and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors. *Journal of Leukocyte Biology*. 2014;96(6):1109–1118.
21. Ostrand-Rosenberg S., Sinha P., Beury D. W., Clements V. K. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Seminars in Cancer Biology*. 2012;22(4):275–281.
22. Mantovani A., Sica A., Allavena P., Garlanda C., Locati M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Human Immunology*. 2009;70(5):325–330.
23. Ostrand-Rosenberg S., Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *Journal of Immunology*. 2009;182(8):4499–4506.
24. Bunt S. K., Clements V. K., Hanson E. M., Sinha P., Ostrand-Rosenberg S. Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009;85(6):996–1004.
25. Thakur A., Schalk D., Tomaszewski E., et al. Microenvironment generated during EGFR targeted killing of pancreatic tumor cells by ATC inhibits myeloid-derived suppressor cells through COX2 and PGE2 dependent pathway. *Journal of Translational Medicine*. 2013;11(1,



article 35)

26. Shin J.-S., Ebersold M., Pypaert M., Delamarre L., Hartley A., Mellman I. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature*.

2006;444(7115):115–118.

27. Thibodeau J., Bourgeois-Daigneault M.-C., Huppé G., et al. Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *European Journal of Immunology*. 2008;38(5):1225–1230.

28. Terabe M., Matsui S., Park J.-M., et al. Transforming growth factor- β production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(11):1741–1752

29. Hongo D., Tang X., Baker J., Engleman E. G., Strober S. Requirement for interactions of natural killer T cells and myeloid-derived suppressor cells for transplantation tolerance. *American Journal of Transplantation*. 2014;14(11):2467–2477.

30. Safinia N., Scotta C., Vaikunthanathan T., Lechler R. I., Lombardi G. Regulatory T cells: serious contenders in the promise for immunological tolerance in transplantation. *Frontiers in Immunology*. 2015;6, article 438

31. Dugast AS, AS, Haudebourg T, Coulon F. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* 2008, 180: 7898-7906.

32. Bronte V, Wang M, Overwijk WW, Surman DR, Pericle F, Rosenberg SA. Apoptotic death of CD8⁺T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1⁺/Gr-1 cells. *J Immunol* 1998, 161:5313-5320

33. Huang B., Pan P.-Y., Li Q., et al. Gr-1⁺CD115⁺ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Research*. 2006;66(2):1123–1131.

34. Garcia M. R., Ledgerwood L., Yang Y., et al. Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(7):2486–2496.

35. Kim Y. J., Chang S. Y., Ko H. J. Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel



- disease. *Intestinal Research*. 2015;13(2):105–111.
36. Haile L. A., von Wasielowski R., Gamrekashvili J., et al. Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology*. 2008;135(3):871–881.
37. Yang F, Li Y, Wu T, Na N, Zhao Y, Li W, Han C, Zhang L, Lu J, Zhao Y: TNF α -induced M-MDSCs promote transplant immune tolerance via nitric oxide. *Journal of molecular medicine* 2016, 94(8):911-920.
38. Dilek N., Poirier N., Usal C., Martinet B., Blancho G., Vanhove B. Control of transplant tolerance and intra-graft regulatory T cell localization by Myeloid-derived suppressor cells and CCL5. *Journal of Immunology*. 2012;188(9):4209–4216.
39. Meng F., Chen S., Guo X., et al. Clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in human renal transplantation with acute T cell-mediated rejection. *Inflammation*. 2014;37(5):1799–1805.
40. Hock B. D., Mackenzie K. A., Cross N. B., et al. Renal transplant recipients have elevated frequencies of circulating myeloid-derived suppressor cells. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 1460;27(1):402–410.
41. Zhang W., Liang S., Wu J., Horuzsko A. Human inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 amplifies CD11b+Gr1+ myeloid-derived suppressor cells that promote long-term survival of allografts. *Transplantation*. 2008;86(8):1125–1134.
42. De Wilde V., Van Rompaey N., Hill M., et al. Endotoxin-induced myeloid-derived suppressor cells inhibit alloimmune responses via heme oxygenase-1. *American Journal of Transplantation*. 2009;9(9):2034–2047.
43. Adeegbe D., Serafini P., Bronte V., Zoso A., Ricordi C., Inverardi L. In vivo induction of myeloid suppressor cells and CD4+foxp3+ T regulatory cells prolongs skin allograft survival in mice. *Cell Transplantation*. 2011;20(6):941–954.
44. Marigo I., Bosio E., Solito S., et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBP β transcription factor. *Immunity*. 2010;32(6):790–802.
45. Chou H.-S., Hsieh C.-C., Charles R., et al. Myeloid-derived suppressor cells protect islet transplants by B7-H1 mediated enhancement of T regulatory cells. *Transplantation*. 2012;93(3):272–282.



46. Arakawa Y., Qin J., Chou H.-S., et al. Cotransplantation with myeloid-derived suppressor cells protects cell transplants: a crucial role of inducible nitric oxide synthase. *Transplantation*. 2014;97(7):740–747.
47. Bryant J., Lerret N. M., Wang J.-J., et al. Preemptive donor apoptotic cell infusions induce IFN- γ -producing myeloid-derived suppressor cells for cardiac allograft protection. *The Journal of Immunology*. 2014;192(12):6092–6101.
48. Nakamura T., Nakao T., Yoshimura N., Ashihara E. Rapamycin prolongs cardiac allograft survival in a mouse model by inducing myeloid-derived suppressor cells. *American Journal of Transplantation*. 2015;15(9):2364–2377.
49. Zhou Z., French D. L., Ma G., et al. Development and function of myeloid-derived suppressor cells generated from mouse embryonic and hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 2010;28(3):620–632.
50. Highfill S. L., Rodriguez P. C., Zhou Q., et al. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood*. 2010;116(25):5738–5747.
51. Kim YS, Kim YJ, Lee JM, Kim EK, Park YJ, Choe SK, Ko HJ, Kang CY: Functional changes in myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumor growth: FKBP51 contributes to the regulation of the immunosuppressive function of MDSCs. *Journal of immunology* 2012, 188(9):4226-4234.
52. Ochando JC, Chen SH: Myeloid-derived suppressor cells in transplantation and cancer. *Immunologic research* 2012, 54(1-3):275-285.
53. Saleem SJ, Conrad DH: Hematopoietic cytokine-induced transcriptional regulation and Notch signaling as modulators of MDSC expansion. *International immunopharmacology* 2011, 11(7):808-815.
54. Wang X, Bi Y, Xue L, Liao J, Chen X, Lu Y, Zhang Z, Wang J, Liu H, Yang H et al: The calcineurin-NFAT axis controls allograft immunity in myeloid-derived suppressor cells through reprogramming T cell differentiation. *Molecular and cellular biology* 2015, 35(3):598-609.
55. Wu T, Zhao Y, Wang H, Li Y, Shao L, Wang R, Lu J, Yang Z, Wang J, Zhao Y: mTOR masters monocytic myeloid-derived suppressor cells in mice with allografts or tumors. *Scientific reports* 2016, 6:20250.



56. Yang F, Li Y, Wu T, Na N, Zhao Y, Li W, Han C, Zhang L, Lu J, Zhao Y: TNF α -induced M-MDSCs promote transplant immune tolerance via nitric oxide. *Journal of molecular medicine* 2016, 94(8):911-920.
57. Zhang K, Bai X, Li R, Xiao Z, Chen J, Yang F, Li Z: Endogenous glucocorticoids promote the expansion of myeloid-derived suppressor cells in a murine model of trauma. *International journal of molecular medicine* 2012, 30(2):277-282.
58. Gummert JF, Ikonen T, Morris RE. Newer immunosuppressive drugs: A review. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1366-1380.
59. European Medicines agency. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on clinical investigation of immunosuppressants for solid organ transplantation. London, July 2008. Doc. Ref. CHMP/EWP/263148/06

2. 项目的研究内容、研究目标，以及拟解决的关键科学问题（此部分为重点阐述内容）；

2.1 研究目标

2.1.1 建立 TGF- β 诱导的 MDSCs 与免疫抑制剂（mTORi、CNI 以及糖皮质激素等）联合应用的移植免疫耐受诱导方案。

2.1.2 明确 TGF- β 诱导的 MDSCs 与免疫抑制剂（mTORi、CNI 以及糖皮质激素等）联合应用诱导移植免疫耐受的细胞分子机制。

2.2 拟解决的关键科学问题

尽管免疫抑制剂对于急性排斥反应疗效显著，但需长期维持，且过量服用可能导致严重不良反应。近年来，MDSCs 为内源性调节性免疫成分，因其免疫抑制功能受到极大关注。将 MDSCs 与常用免疫抑制方案联合应用，达到协同作用，从而减低药物毒副作用并诱导免疫耐受的思路具有广泛前景。前期工作中我们应用 TGF- β 诱导出具有较强免疫抑制功能的 MDSCs，并可稳定存在。在本课题中，借助 MHC 不匹配和性别不匹配两种小鼠肾脏移植模型，尝试将 TGF- β 诱导的 MDSCs 和常用免疫抑制剂联合应用，在不同移植模型中观察其预防排斥反应和诱导移植免疫耐受的效率。

一直以来，MDSCs 被认为是多种细胞所构成的异质性集合。在不同的疾病环境中，MDSCs 的组成和作用机制差别较大。在明确 MDSCs 临床应用价值的同时，其作用机制的



探讨也同样具有学术意义。本课题中,我们通过流式细胞学、分子生物学和生物化学实验手段,利用 MDSCs 相关效应分子特异性抑制剂,希望阐明 MDSCs 在移植环境中的具体作用及其机制,丰富我们对于 MDSCs 的理解和认识。

2.3 研究内容

TGF- β 诱导的 MDSCs 与常用免疫抑制剂(他克莫司、环孢素 A、雷帕霉素和糖皮质激素)联用,应用 MHC 不匹配和性别不匹配两种小鼠肾移植模型,验证其预防排斥反应、诱导免疫耐受的可行性。

(1)应用 MHC 不匹配小鼠肾移植模型,TGF- β 诱导的 MDSCs 与他克莫司、环孢素 A、雷帕霉素和糖皮质激素联用,观察排斥反应发生和免疫耐受建立情况。

以 BALB/c 鼠为供者,C57BL/6 (B6) 鼠为受者构建 MHC 不匹配肾移植模型。将实验小鼠分为 6 组,每组 10 只:对照组;MDSCs 组;他克莫司+MDSCs 组;环孢素 A+MDSCs 组;雷帕霉素+MDSCs 组;糖皮质激素+MDSCs 组。观察移植肾排斥情况,记录尿量并检测血肌酐浓度。流式检测血清抗供体抗体(IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 TCR)滴度水平和抑制性细胞因子浓度(TGF- β 和 IL-10)。术后 14 天和 28 天进行组织学检查,进行免疫荧光和 HE 染色,确定肾移植内 MDSCs 和淋巴细胞浸润,明确 MDSCs 在移植内的数量和作用效果。流式细胞学分析免疫细胞亚型(CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、B 细胞、NK 细胞和树突状细胞)。应用小鼠脾脏分选 MDSCs,流式细胞学检测数量(百分数、绝对数)、功能(体外 T 细胞增殖实验、MLR 及 T 细胞分泌细胞因子水平)和表型(CD11b、F4/80、CD11c、CD80/86、I-Ab、CD62L 等)差异。

(2)应用 MDSCs 相关效应分子特异性抑制剂,探讨移植环境中 MDSCs 在动物模型内的作用机制。

a.分选 MDSCs,进行分子生物学研究,初步探讨 MDSCs 的效应途径。

获取上文各组小鼠脾脏分选 MDSCs,进行 qRT-PCR 和 Western blot,检测细胞内 iNOS、ROS、IDO 和 ARG1 等 mRNA 和蛋白水平;流式细胞学检测表达不同效应分子的 MDSCs 比例;提取 T 细胞增殖实验培养基上清液,ELISA 法测定 NO、ROS、IDO 浓度和 ARG1 活性。推测 MDSCs 在移植模型中发挥免疫抑制作用的机制。

b.应用 iNOS、ROS、IDO 和 ARG1 特异性抑制剂,明确 MDSCs 在移植模型中的免疫抑制作用机制。

获取上文各组小鼠脾脏分选 MDSCs,实验组应用 iNOS、ROS、IDO 和 ARG1 特异性抑制剂,对照组应用生理盐水。分别进行体外 T 细胞增殖实验、混合淋巴细胞培养(MLR),



并检测上述实验中 T 细胞分泌细胞因子 (IFN- γ 、IL-6、IL-17 等) 的水平, 比较实验组和对照组抗原非特异性和抗原特异性免疫抑制功能差异。

3. 拟采取的研究方案及可行性分析 (包括研究方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明);

研究方法和关键技术

● 肾移植模型:

以BALB/c鼠为供者, C57BL/6 (B6) 鼠为受者构建MHC不匹配肾移植模型。供体手术: 以异氟烷吸入麻醉, 麻醉满意后, 取腹正中切口, 用显微血管镊小心游离左侧输尿管, 上至左肾下极, 下至其入膀胱处, 避免损伤输尿管。游离左肾, 剪开肾周脂肪囊, 沿肾背面游离直至腹主动脉, 续而沿肾动脉水平上下游离腹主动脉, 向上游离至横膈下, 向下游离至肾动脉水平下0.8cm。游离左肾静脉至其汇入下腔静脉处, 电凝、剪断左肾上腺下静脉及精索静脉。游离完毕于肾血管周围注射1%利多卡因生理盐水以减轻血管痉挛, 用显微血管夹在肾静脉水平上约0.5cm夹闭远端腹主动脉, 在肾动脉水平下端近0.6cm处用30G针头斜行向心穿刺腹主动脉, 用4℃肝素生理盐水(80U/ml)缓慢灌注3min, 同时沿肾静脉汇入下腔静脉处剪断肾静脉, 让灌注液流出, 直至左侧肾脏呈土黄色, 用10-0丝线在肾动脉水平上下端、腹主动脉穿刺点上端结扎腹主动脉, 于肾动脉水平上0.2cm斜行剪断腹主动脉。于输尿管膀胱入口处剪断输尿管, 将供肾放入4℃UW液中保存。供肾修整: 在4℃UW液中修整肾动脉、肾静脉和输尿管。去除血管表面多余脂肪, 将肾动脉断端修整略成弧形, 避免损伤动脉内膜, 以防止血栓形成。同样修整肾静脉断端使之光滑平整, 游离输尿管末端约0.3cm, 肾动静脉切口两端分别用11-0丝线自外向内穿一针做牵引。受体手术: 麻醉及手术切口同供体手术。术前肌注阿托品10 μ g, 用拉钩分别自左右两侧拉开腹肌, 显露腹主动脉及下腔静脉。钝性分离左侧肾脏, 分离肾动脉并结扎之, 然后贴近肾脏分离肾静脉并结扎, 在肾动、静脉结扎线远心端切断血管, 继而分离左侧输尿管并结扎、剪断, 切除左侧肾脏。于肾静脉水平下游离腹主动脉及下腔静脉0.8cm, 电凝或结扎其间的小血管分支, 用显微弯镊于血管下游离相连的结缔组织, 直至确定血管已完全游离。补充0.5ml生理盐水, 用显微血管夹分别在游离血管段的近心端及远心端夹闭腹主动脉及下腔静脉, 分别在腹主动脉及下腔静脉上行一与供肾动静脉断端等长的椭圆形切口, 用肝素水冲洗干净血管腔, 将修好的供肾用湿盐水纱布托着置于游离好的血管段旁, 用11-0丝线依次行肾静脉与下腔静脉、肾动脉与腹主动脉端侧吻合, 吻合方式均为双定点连续端侧吻合。静脉吻合每侧约需6~7针, 动脉吻合只需3针即可, 针距应尽可能均匀,



且使血管壁外翻以防止血栓形成。血管吻合完毕松开血管夹,可见移植肾颜色迅速变红润。

● 脾脏单细胞悬液的制备:

脱颈处死小鼠,75%酒精中浸泡 3min,在超净工作台中用手术剪刀剪开腹壁取脾,置于 PBS 中。分别用毛玻片在 PBS 中研磨制备单细胞悬液,脾细胞直接收集到 15ml 离心管中 1700rpm/min 离心 5min,沉淀用培养液重悬。脾细胞收集离心后,沉淀加入 1ml 红细胞裂解液处理 40sec,再加入 10ml PBS 终止,最后离心用培养液重悬,200 目滤网过滤。最后调整细胞浓度,台盼兰染色排除死细胞,计细胞总数。

● 流式细胞染色之表面染色:

- 1) 用FCM缓冲液将单细胞悬液浓度调整成 5×10^6 /ml, 每管加入 100 μ L;
- 2) 每管加入 10 μ L 非特异性阻断抗体 2.4G2;
- 3) 加入特异性荧光抗体或抗体组合, 4 $^{\circ}$ C避光作用 30min;
- 4) 加入 3ml 冷的 FCM 缓冲液, 1700rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 7min;
- 5) 重复第 4 步 1 次, 以去除游离的荧光抗体;
- 6) 用 300 μ L 冰冷的 FCM 缓冲液重悬细胞, 轻轻混匀后准备上机检测。

● 流式细胞染色之细胞内染色:

- 1) 细胞计数后, 用完全 1640 培养基调成 4×10^6 /ml 浓度, 加 500 μ L 至 24 孔板;
- 2) 配置含 PMA, Ionomycin 和 Golgi Stop 的 20%FBS 的 1640, 每孔加入 500 μ L, 终浓度 PMA 为 100ng/ml, Ionomycin 1 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 6 小时, 收集细胞;
- 3) 弃净上清, 用 250 μ L BD 固定液, 4 $^{\circ}$ C 固定 30min;
- 4) 加入 500 μ L 稀释好的 1xPerm/Wash 缓冲液 (10xPerm/Wash 缓冲液, 用三蒸水配置), 1700rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 7min, 弃净上清;
- 5) 重复第 4 步 1 次, 弃净上清;
- 6) 加入荧光标记的特异性抗体, 4 $^{\circ}$ C, 孵育 30min;
- 7) 用 500 μ L 1xPerm/Wash 缓冲液洗涤 2 次后用 300 μ L 冰冷的 FCM 缓冲液重悬细胞, 轻轻混匀, 准备上机检测

● MDSC 抑制 T 细胞增殖实验

CFSE标记脾脏细胞: 用PBS重悬脾脏细胞, 调整细胞浓度到 $2 \sim 4 \times 10^7$ /ml, 取 1ml 加入 CFSE 至终浓度为 5 μ M, 37 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 5min, 加入 10ml 1640 培养液终止染色, 1700rpm/min 离心 5min 后在用完全 1640 重悬后用于后续实验。



MDSC抑制ConA刺激的脾细胞增殖: CFSE标记好的脾细胞调节浓度到 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 加入ConA至 $2\text{ug}/\text{ml}$, 按每孔 100ul 铺于平底 96 孔板中, MDSC同样调整到 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 直接或倍比稀释后每孔加入 100ul , 使脾细胞和MDSC总体积为 200ul , ConA终浓度为 $1\text{ug}/\text{ml}$ 。刺激 3 天后收集细胞染色, 分析CD4 或CD8 阳性T细胞中CFSE稀释比例。

● 流式检测血清中抗供者抗原抗体

1) 收集肾移植 0 天 7 天 14 天 21 天小鼠外周血, 室温静置 4h 后离心去上层血清冻于 -80°C 冰箱中。

2) 5×10^5 供者BALB/c 小鼠脾细胞重悬于 90ul 流式染色缓冲液中, 加入收集的血清 10ul , 2.4G2 10ul , 混匀后 4 度放置 30 分钟。

3) 流式染色缓冲液洗三遍后将细胞重悬于 90ul 流式染色缓冲液中, 加入 10ul 1:200 稀释后的 FITC-goat-anti-mouse IgG, IgG1, IgG2a 或是 IgG2b 抗体和 10ul PE-Rat-anti-mouse TCR, 混匀后 4 度放置 30 分钟。

4) 流式染色缓冲液洗三遍后将细胞重悬于 200ul 流式染色缓冲液中流式检测。

5) 血清中抗体相对含量=在 TCR+的门中移植后血清 FITC 通道的平均荧光强度-移植前阴性血清 FITC 通道的平均荧光强度。

● NO 浓度的测定

1) 配制不同浓度的标准液 (0、4、8、12、16、20 μm) 各 100ul 用来绘制标准曲线, 同时收集培养后的细胞培养液或小鼠血清 100ul 。

2) 加入 1 号试剂 0.4ml , 然后加入 2 号试剂 0.2ml , 加入后马上振荡器混匀, 放置 10 分钟。

3) 4000 转/min, 离心 10 分钟。

4) 取 400ul 上清液, 加入 0.2ml 显色剂, 混匀, 15 分钟后比色 (550nm)。

5) 取 200ul 加入 96 孔板, 纵向设计平行样。酶标仪检测。

● 精氨酸酶活性测定

1) MDSC 与 T 细胞共培养 2 天后, 96 孔板离心去培养液, 每孔加入 100ul 0.1% Triton X-100。

2) 摇匀 30 分钟后, 每 5min 混一次。

3) 加入 100ul 25mM 的 Tris-HCL 和 20ul 10mM 的 MnCl_2 (Tris-HCL 终浓度为 12.5mM , MnCl_2 终浓度为 1mM , Mn^{2+} 可以激活精氨酸酶, 精氨酸酶最适 PH 9.8)。

4) 56°C 加热 10min 激活精氨酸酶活性。



- 5) 加入 100ul 的 0.5ML-精氨酸 (PH9.7), 37°C 反应 60-120min (一般孵育 1 小时即可使精氨酸降解)。
- 6) 加入 900ul of H₂SO₄ (96%)/H₃PO₄ (85%) /H₂O (1/3/7,v/v/v) 终止反应, 加入 40ul of 9% isonitrosopropiophenone (2-异亚硝基苯丙酮, 用无水乙醇溶解 w/v)
- 7) 准备标准品, 尿素 1ml (144mg/ml 酸配合液配制), 加入 40ul 9% 2-异亚硝基苯丙酮
- 8) 将样品和标准品, 95°C 加热 30min, 每 5min 看颜色变化, 不能颜色太深 (一般反应 7min)
- 9) 将煮好的标准品用酸混液倍比稀释检测得标准曲线, 原液, 100ul 尿素: 100ul 混酸, 取上者 100ul: 100ul 混酸, 依次, 分别为 144, 72, 36, 18, 9, 4.5, 0 mg/ml。最后用 540nm 酶标仪检测。注: 1 个单位酶活性定义为: 1min 催化 1umol 尿素所需的酶量。

3.1 可行性分析

3.1.1 项目有良好的前期工作基础, 科学假说和验证手段可行

前期工作中, 我们将骨髓前体细胞用 M-CSF 和 TGF- β 联合培养 7 天, 结果发现该方式诱导出的 MDSCs 具有较强的抑制 T 细胞增殖能力, 并进一步分析其表型 (详见工作基础)。既往文献报道, mTORi、CNI 及糖皮质激素等对于 MDSCs 的扩增和激活可能具有促进作用。因此, 本课题提出将 TGF- β 诱导的 MDSCs 和上述药物联合应用, 期待建立新的免疫抑制方案, 减少药物毒副作用, 具有合理性。目前, 我们已成功建立稳定的肾脏移植模型用于研究 (详见工作基础), 验证手段可行, 可以保证项目的顺利实施。

3.1.2 课题团队相关经验丰富

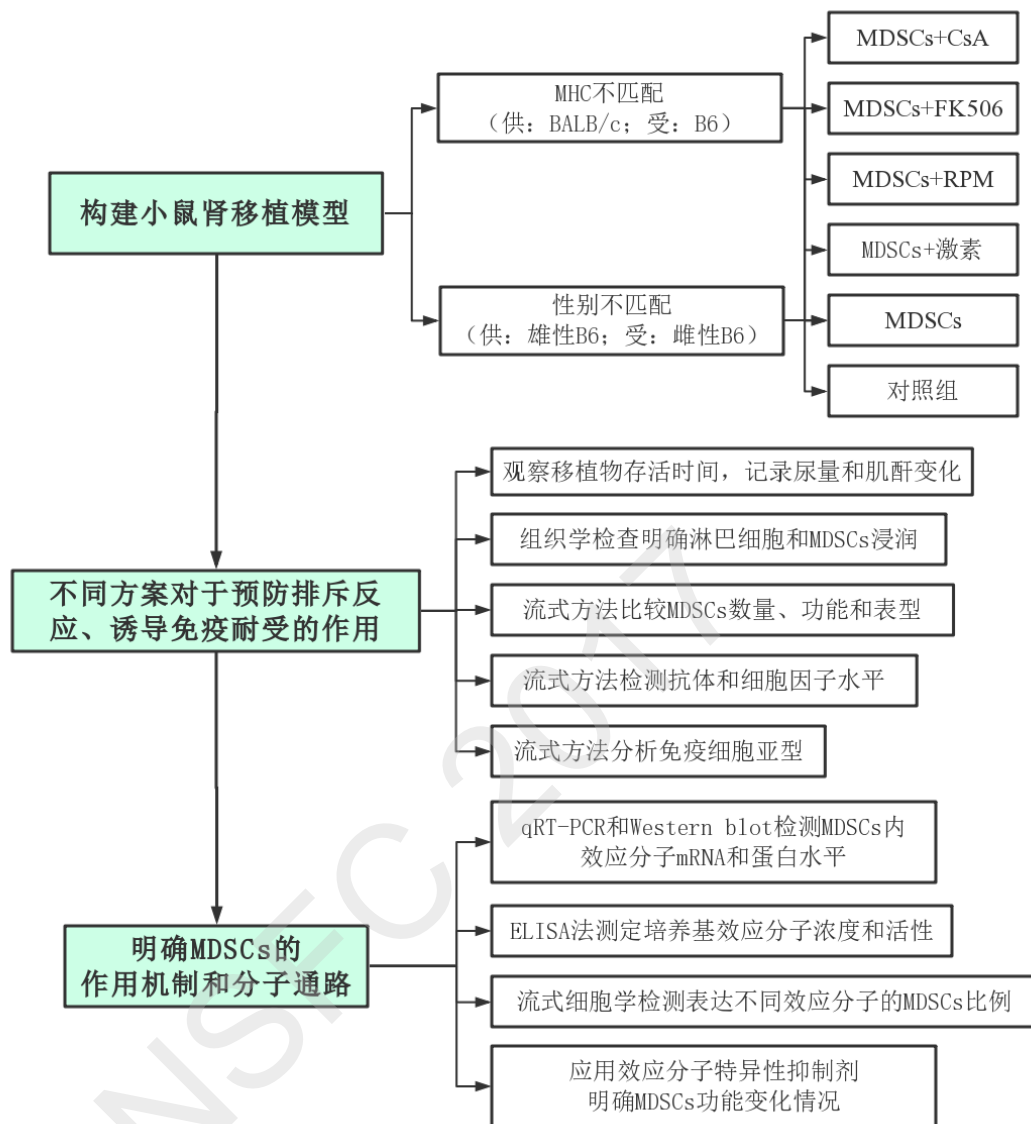
申请人长期从事肾移植相关领域临床工作, 掌握本领域研究进展和前沿动态。近年来以移植免疫耐受作为研究重点, 开展相关基础研究, 申请多项相关课题。目前于美国约翰霍普金斯医学院进行博士后深造, 具有相关研究经验。课题组成员熟练掌握分子生物学、流式细胞学、细胞生物学、免疫学和实验动物学相关技术, 可独立或合作进行实验, 保证上述研究内容顺利开展。

3.1.3 硬件条件完备

本研究计划的开展和实施依托于北京朝阳医院医学研究中心。该中心为国家重点实验室, 拥有生物标本库、分子生物学平台、细胞生物学平台、动物实验平台等一流的实验研究平台, 仪器设备先进、齐全, 可保证所有工作的进行。

3.2 技术路线

如下图所示:



4. 本项目的特色与创新之处;

既往研究中，肾移植术后免疫抑制主要通过阻滞效应性免疫成分发挥作用而实现，对于内源性具有免疫调节功能的成分关注不多。本课题在前期工作基础上，通过体外诱导MDSCs，与常用免疫抑制剂联合应用，探究此类方案对于预防排斥反应、诱导免疫耐受的效果，将内源性具有免疫抑制作用的成分与外源性药物结合，极具临床意义，在研究选题和视角上具有创新性。

近年关于MDSCs的研究主要集中在肿瘤领域，而在移植环境中的数据相对缺乏，亟待阐明。MDSCs属于异质性细胞群体，不同环境中的细胞表型和功能差异较大。本课题拟开展研究工作，分析MHC不匹配和性别不匹配小鼠肾脏移植模型中MDSCs可能的作用机制，具有较高学术意义，且既往研究相对欠缺，其结果将丰富我们对于MDSCs作用机制的认识，



具有较高理论原创性。

5. 年度研究计划及预期研究结果（包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等）。

年度计划：

2018/01-2018/12 应用 MHC 不匹配小鼠肾移植模型，TGF- β 诱导的 MDSCs 与他克莫司、环孢素 A、雷帕霉素和糖皮质激素联用，观察排斥反应发生和免疫耐受建立情况。

2019/01-2019/12 应用性别不匹配小鼠肾移植模型，TGF- β 诱导的 MDSCs 与他克莫司、环孢素 A、雷帕霉素和糖皮质激素联用，观察排斥反应发生和免疫耐受建立情况。

2020/01-2020/12 分选 MDSCs，进行分子生物学研究，初步探讨 MDSCs 的效应途径。

2021/01-2021/12 应用 iNOS、ROS、IDO 和 ARG1 特异性抑制剂，明确 MDSCs 在移植模型中的免疫抑制作用机制。

预期结果

（1）确定 TGF- β 诱导的 MDSCs 与常用免疫抑制剂联合应用，对于预防排斥反应、诱导免疫耐受的作用；明确 MDSCs 在预防排斥反应、诱导免疫耐受中的作用机制和分子通路。

（2）发表 SCI 论文 1-2 篇；核心杂志论文 2-3 篇。

（3）培养博士研究生 1-2 名，硕士研究生 2-3 名。

（4）参加美国移植年会和中华医学会器官移植年会，发表相关数据。

（二）研究基础与工作条件

1. 研究基础（与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩）；

M-CSF 与 TGF- β 诱导的 M-MDSCs 的表型，功能特点及其机制

首先，在 M-CSF 诱导 MDSC 中加入 TGF- β 后 MDSCs 的体外抑制功能显著增强（图 1A、1B）。流式表型检测发现，CD124 表达显著上调（图 1C）。其次，M-CSF 与 TGF- β 诱导的 M-MDSCs 对 T 细胞活化标志 CD25 和 CD69 的表达没有显著影响（图 2）。

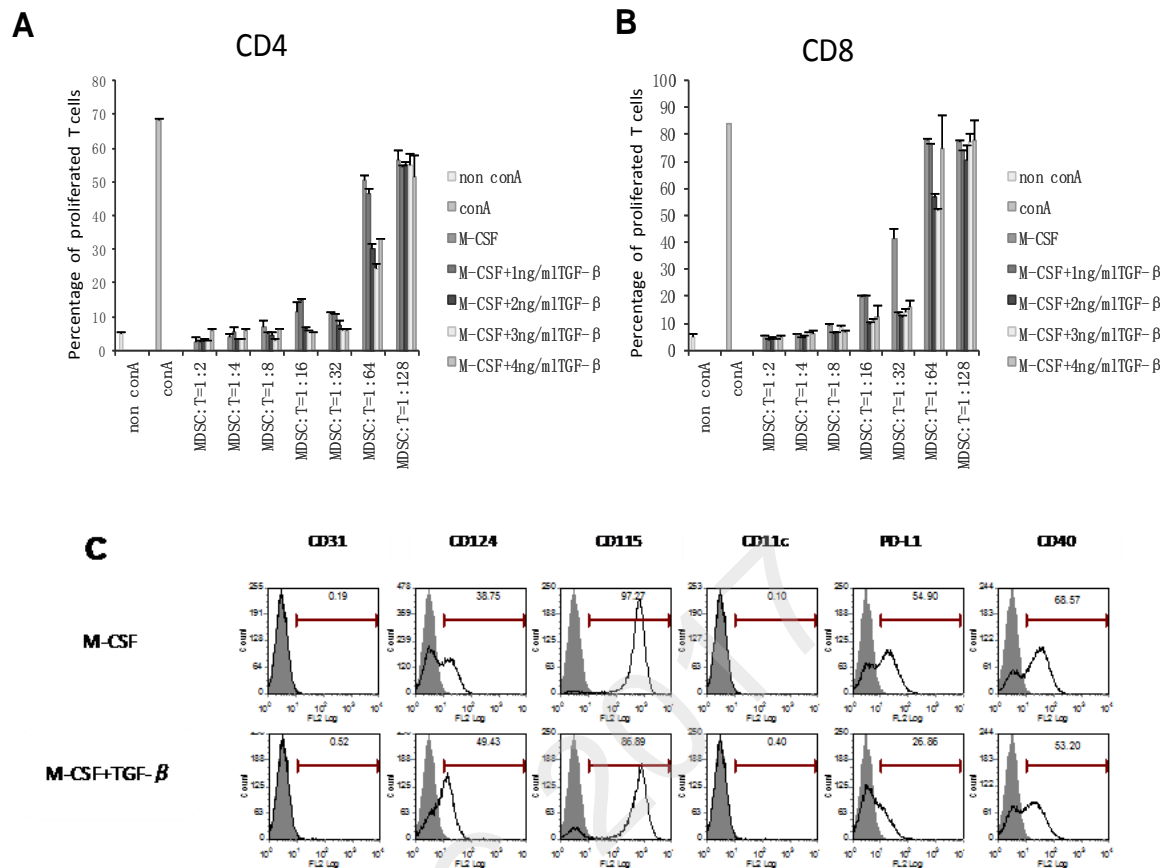


图 1 M-CSF 与 TGFβ 诱导 M-MDSCs 的抑制功能以及表型鉴定

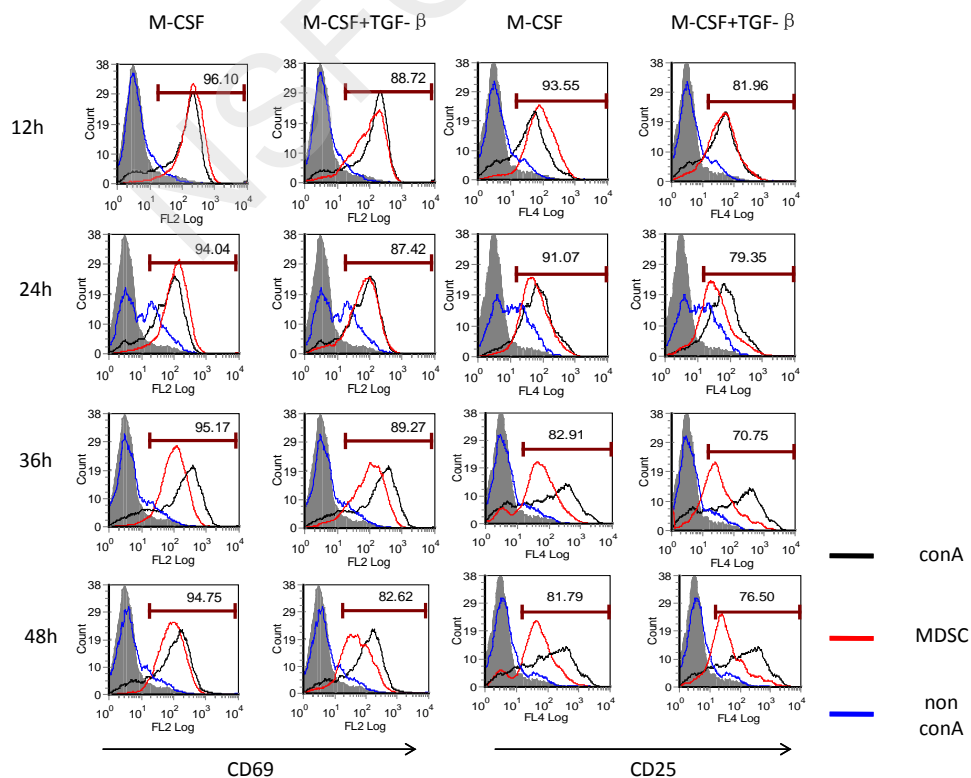


图 2 M-CSF 与 TGFβ 联合诱导 M-MDSCs 对 T 细胞活化的影响

以 BALB/c 鼠为供者, C57BL/6 (B6) 鼠为受者构建 MHC 不匹配肾脏移植模型 (图 3),



性别不匹配肾脏移植模型技术要点与之类似。

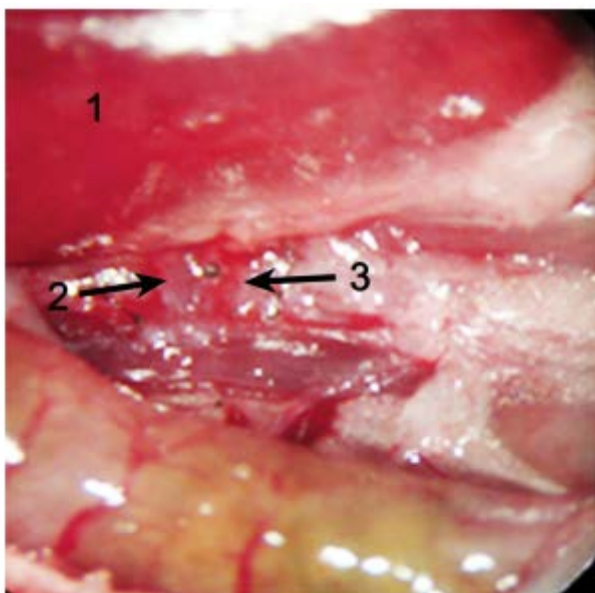


图3 应用成功建立的异基因肾移植模型，其中1为供肾，2为肾静脉，3为肾动脉。应用CD11b-PE和Gr-1-FITC抗体标记，可见小鼠Gr-1^{lo}CD11b⁺单核细胞样MDSCs（M-MDSCs）和Gr-1^{hi}CD11b^{hi}粒细胞样MDSCs（G-MDSC）（图4）。

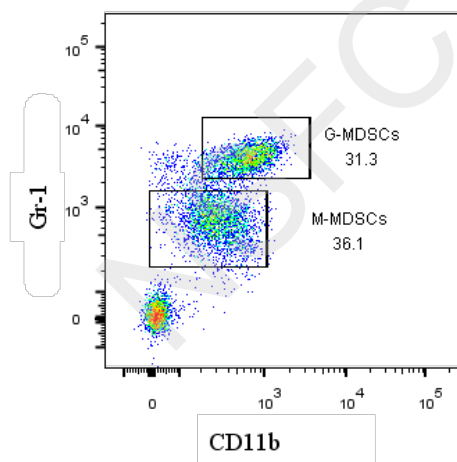


图4 肾移植小鼠体内可检出单核细胞样MDSCs（M-MDSCs）和粒细胞样MDSCs（G-MDSC）

2. 工作条件（包括已具备的实验条件，尚缺少的实验条件和拟解决的途径，包括利用国家实验室、国家重点实验室和部门重点实验室等研究基地的计划与落实情况）；

- (1) 本研究计划的开展和实施依托于北京朝阳医院医学研究中心。该中心为国家重点实验室，拥有生物标本库、分子生物学平台、细胞生物学平台、动物实验平台等一流的实验研究平台，仪器设备先进、齐全，可保证所有工作的进行。



- (2) 申请人长期从事肾移植相关领域临床工作，掌握本领域研究进展和前沿动态。近年来以移植免疫耐受作为研究重点，开展相关基础研究，申请多项相关课题。目前于美国约翰霍普金斯医学院进行博士后深造，具有相关研究经验。课题组成员熟练掌握分子生物学、流式细胞学、细胞生物学、免疫学和实验动物学相关技术，可保证上述研究内容顺利开展。

3. 正在承担的与本项目相关的科研项目情况（申请人和项目组主要参与者正在承担的与本项目相关的科研项目情况，包括国家自然科学基金的项目和国家其他科技计划项目，要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、与本项目的关系及负责的内容等）；

无

4. 完成国家自然科学基金项目情况（对申请人负责的前一个已结题科学基金项目（项目名称及批准号）完成情况、后续研究进展及与本申请项目的关系加以详细说明。另附该已结题项目研究工作总结摘要（限 500 字）和相关成果的详细目录）。

无

（三）其他需要说明的问题

1. 申请人同年申请不同类型的国家自然科学基金项目情况（列明同年申请的其他项目的项目类型、项目名称信息，并说明与本项目之间的区别与联系）。

无

2. 具有高级专业技术职务（职称）的申请人或者主要参与者是否存在同年申请或者参与申请国家自然科学基金项目的单位不一致的情况；如存在上述情况，列明所涉及人员的姓名，申请或参与申请的其他项目的项目类型、项目名称、单位名称、上述人员在该项目中是申请人还是参与者，并说明单位不一致原因。

无

3. 具有高级专业技术职务（职称）的申请人或者主要参与者是否存在与正在承担的国家自然科学基金项目的单位不一致的情况；如存在上述情况，列明所涉及人员的姓名，正在承担项目的批准号、项



目类型、项目名称、单位名称、起止年月，并说明单位不一致原因。

无

4. 其他。

无

NSFC 2017



王玮 简历

首都医科大学，首都医科大学附属北京朝阳医院，主任医师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

1. 1999/9 - 2004/7，首都医科大学，泌尿外科，博士，导师：管德林
2. 1991/9 - 1996/7，首都医科大学，临床医学，学士，导师：无

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾进入博士后流动站（或工作站）从事研究，请列出合作导师姓名）：

1. 2013/11-至今，首都医科大学，首都医科大学第三临床医学院，主任医师
2. 2007/11-2013/10，首都医科大学，首都医科大学附属北京朝阳医院，副主任医师
3. 2002/11-2007/10，首都医科大学，首都医科大学附属北京朝阳医院，主治医师
4. 1996/8-2002/10，首都医科大学，首都医科大学附属北京朝阳医院，住院医师

曾使用其他证件信息（申请人应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）：

主持或参加科研项目（课题）及人才计划项目情况：

1. 国家自然科学基金，81050014，预处理树突细胞扩增Treg细胞协同诱导特异性移植免疫耐受的研究，2013/01-2016/12，10万元，已结题，参加
2. 北京市自然科学基金，7142057，硫化氢对尿毒症加速性AS中TGF- β /Smad通路及其阻遏子c-Ski的调控机制，2014/01-2016/12，18.00万元，已结题，参加
3. 北京市优秀人才培养计划，2013D003034000044，CYP3A5基因多态性与肾移植术后患者早期他克莫司的应用关系，2013/06-2016/05，3万元，已结题，主持
4. 高等学校博士学科点专项科研基金，20121107120026，CD4+CD25+FoxP3+调节性T细胞诱导供体特异性移植免疫耐受的研究，2013/01-2015/12，4万元，已结题，主持
5. 北京卫生系统高层次技术人才培养计划，2011-3-018，CYP3A5基因多态性与他克莫司血药浓度关系的研究，2011/05-2014/04，31.5万元，已结题，主持
6. 首医基础临床基金，10JL38，肾移植术后早期撤除激素与MDR1基因多态性关系的研究，2010/01-2012/12，5万元，已结题，主持
7. 北京市科技新星计划，2008B63，MDR1基因多态性与肾移植术后激素个体化应用的研究，2009/02-2011/12，28万元，已结题，主持

代表性研究成果和学术奖励情况

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注



明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）

一、期刊论文

1. 第一作者论文

(1) **Wang W^(#)**, Feng SJ, Li H^(*), Zhang XD, Wang SX, Correlation of Lower Concentrations of Hydrogen Sulfide with Activation of Protein Kinase C β II in Uremic Accelerated Atherosclerosis Patients, Chinese Medical Journal (English). , 2015.10.11, 128 (11) : 1465~1470

(2) **Wang W^(#)**, Zhang XN^(#), Yin H, Li XB, Hu XP, Liu H, Wang Y, Zhang XD^(*), Effects of Bailing capsules for renal transplant recipients: a retrospective clinical study, Chin Med J (Engl), 2013.03.15, 126 (10) : 1895~1899

(3) **Wang W^(#)**, Yin H, Li XB, Hu XP, Yang XY, Liu H, Ren L, Wang Y, Zhang XD^(*), A Retrospective Comparison of the Efficacy and Safety in Kidney Transplant Recipients with Basiliximab and anti-thymocyte globulin., Chin Med J (Engl), 2012.03.15, 125 (6) : 1135~1140

(4) **Wang W^(#)**, Tian H, Yin H, Liu H, Zhang XD^(*), Attitudes toward organ donation in China., Chin Med J (Engl), 2012.01.11, 125 (6) : 56~62

(5) **Wang W^(#)**, Li XB, Yang XY, Zhang XD^(*), Forkhead box protein 3 mRNA expression in the peripheral blood of kidney-transplant recipients with acute rejection., Chin Med J (Engl), 2011.04.15, 124 (12) : 1775~1778

(6) **Wang W^(#)**, Li XB, Yin H, Yang XY, Liu H, Ren L, Hu XP, Wang Y, Zhang XD^(*), Factors affecting the long-term renal allograft survival., Chin Med J (Engl), 2011.06.15, 124 (8) : 1850~1853

(7) **WANG Wei^{(#)(*)}**, ZHANG Xiao-dong, GUN De-lin, LU Yue-ping, MA Lin-lin, HU Xiao-peng, ZHANG Peng, WANG Yong, CHEN Xiao, Relationship between MDR1 polymorphism and blood concentration of cyclosporine A, Chinese Medical Journal , 2005.12.20, 118 (24) : 2097~2100

(8) **王玮^{(#)(*)}**, 张小东, 马麟麟, 吕月平, 胡小鹏, 张鹏, 王勇, 管德林, 肾移植中他克莫司的血药浓度与多药耐药基因多态性的关系, 中华医学杂志, 2005.12.07, 85 (46) : 3277~3280

(9) **王玮^(#)**, 张小东, 丁洁, 马麟麟, 胡小鹏, 王勇, 陈晓, 管德林^(*), 肾移植患者的多药耐药基因外显子26基因型与术后他克莫司用量的关系, 中华器官移植杂志, 2006.12.05, 27 (12) : 728~731



(10) 王玮^(#), 张小东^(*), 李晓北, 胡小鹏, 尹航, 刘航, 任亮, 王勇, 移植肾动脉狭窄的诊治20例报告, 中华器官移植杂志, 2009.11.05, 30 (11): 692~695

(11) 王玮^(#), 尹航, 胡小鹏, 李晓北, 杨晓勇, 任亮, 王勇, 张小东^(*), 生理盐水替代HTK 保存液保存活体供肾的临床研究, 器官移植, 2011.09.05, 2 (5): 269~272

(12) 王玮^(#), 张小东^(*), 马麟麟, 王勇, 胡小鹏, 陈晓, 杨勇, 多囊肾患者肾移植术后的临床效果, 临床泌尿外科杂志, 2006.05.05, 21 (5): 331~333

(13) 王玮^{(#)(*)}, 管德林, 张小东, 马麟麟, 陈晓, 胡小鹏, 赵勇, 多药耐药基因多态性与免疫抑制剂应用关系的研究, 中华泌尿外科杂志, 2006.04.05, 27: 89~91

(14) 王玮^{(#)(*)}, 李晓北, 丁毅, 尹航, 刘航, 胡小鹏, 王勇, 张小东, 肾移植术后侵袭性肺曲霉菌病16例诊治分析, 中华医学杂志, 2010.01.20, 90 (2): 110~112

(15) 王玮^(#), 尹航, 李晓北, 杨晓勇, 任亮, 刘航, 张鹏, 胡小鹏, 王勇, 张小东^(*), 肾移植术后并发双侧自体肾盂和输尿管移行细胞癌16例, 中华器官移植杂志, 2011.08.05, 32 (8): 474~476

(16) 蒋一航^(#), 王玮^(#), 胡小鹏, 尹航, 刘航, 任亮, 王伟, 范博涵, 张小东^(*), N GAL与Cys c对于肾移植术后早期肾功能恢复的预测作用, 中华医学杂志, 2015.01.13, 95 (2): 112~115

(17) 王玮^{(#)(*)}, 李晓北, 尹航, 刘航, 任亮, 杨晓勇, 胡小鹏, 王勇, 张小东, 肾移植术后合并卡氏肺囊虫肺炎的早期诊断与治疗, 中华器官移植杂志, 2010.04.05, 31 (4): 227~230

(18) 王玮^(#), 刘航, 尹航, 李晓北, 杨晓勇, 任亮, 胡小鹏, 王勇, 张小东^(*), 免疫吸附在高致敏肾移植受者中的应用, 中华医学杂志, 2010.09.28, 90 (36): 2532~2535

2. 通讯作者论文(勿与第一作者论文重复)

(1) Sun ZJ^(#), Du X, Su LL, Zhang XD, Wang Y, Ren L, Wang W^(*), Successful Renal Transplantation in a Patient with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Treated with Eculizumab in China., Chinese Medical Journal (English)., 2016.06.05, 129 (11): 1379~1381

(2) Sun ZJ^(#), Du X, Su LL, Zhang XD, Wang W^(*), Efficacy and Safety of Basiliximab Versus Daclizumab in Kidney Transplantation: A Meta-Analysis., Transplantation Proceedings, 2015.10.01, 47,: 2439~2445

(3) Li H^(#), Feng SJ, Su LL, Wang W^(*), Zhang XD, Wang SX, Serum Hepcidin Predicts Uremic Accelerated Atherosclerosis in Chronic Hemodialysis Patients with Diabetic Nephropathy, Chinese Medical Journal (English), 2015.10.11, 128 (10): 1351~1357



(4) Liang Xue^(#), **Wang Wei**^(*), Li Han, Water and sodium restriction on cardiovascular disease in young chronic hemodialysis patients., Chin Med J (Engl), 2013.05.15, 126 (9) : 1667~1672

(5) DU X^(#), **WANG W**^(*), Sun ZJ, Su LL, Zhang XD, Meta-analysis on the Safety and Efficacy of the Reperfusion Use of a Single High Dose of Anti-T-Lymphocyte Globulin Fresenius in Kidney Transplantation., Transplantation Proceedings, 2016.07.20, 48 (6) : 2017~2022

(6) Li Han^(#), Li Xiaobei^(#), Feng Sujuan, Zhang Guizhi, **Wang Wei**^(*), Wang Shixiang, Sleep disorders and its related risk factors, Chinese Medical Journal (English)., 2014.04.01, 127 (7) : 1289~1293

(7) 田惠中^(#), **王玮**^(*), 刘航, 张小东, 肾移植术后并发肺结核的早期诊治与预防, 中华健康管理学杂志, 2011.12.05, 5 (6) : 345~348

(8) 张希诺^(#), 李寒, **王玮**^(*), 张征, 尹航, 邱葵, 刘航, 王伟, 胡小鹏, 肾移植受者口服马替麦考酚酯和麦考酚钠肠溶片的临床研究, 中华器官移植杂志, 2014.08.01, 35 (8) : 464~468

3. 既非第一作者又非通讯作者论文

(1) YAO Qing-chun^(#), **WANG Wei**, LI Xiao-bei, YIN Hang, ZHANG Xiao-dong^(*), Expression characteristics of major histocompatibility complex class I-related chain A antibodies and immunoadsorption effect in sensitized recipients of kidney transplantation, Chinese Medical Journal, 2011.05.06, 124 (5) : 669~673

(2) LI Shi-hai^(#), **WANG Wei**, HU Xiao-peng, YIN Hang, REN Liang, YANG Xiao-yong, LIU Hang, ZHANG Xiao-dong^(*), Monitoring immune function after rapid corticosteroid reduction in kidney transplant recipients, Chinese Medical Journal, 2011.05.08, 124 (5) : 679~682

(3) Shihai Li^(#), **Wei Wang**, Xiaopeng Hu, Liang Ren, Hang Yin, Xiaoyong Yang, Hang Liu, Xiaodong Zhang^(*), The effects of early rapid corticosteroid reduction on cell-mediated immunity in kidney transplant recipients, Transplant Immunology, 2010.09.03, 24: 127~130

(4) 蒋一航^(#), **王玮**, 胡小鹏, 王伟, 尹航, 刘航, 任亮, 杨晓勇, 范博涵, 张小东^(*), 稳定期肾移植受者吗替麦考酚酯暴露量研究的药代学和药效学试验, 中华器官移植杂志, 2015.10.01, 36 (4) : 217~224

二、专著

(1) **王玮**, 宋文利, 张小东, 移植影像学, 人民卫生出版社, 384000, 2011.04.01

(2) **王玮**, 代华平, 移植感染, 人民卫生出版社, 1362000, 2013.08.01



三、获得学术奖励

- (1) **王玮** (1/1), 中华医学科技奖-肾脏移植免疫抑制个体化用药方案的建立与应用, 中华医学会, 科技进步, 省部一等奖, 2012.12.18
(王玮)

NSFC 2017



除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字

参与者 简历

杨晓勇，首都医科大学，首都医科大学附属北京朝阳医院，副主任医师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

2003/09–2006/07，首都医科大学，北京朝阳医院，博士，导师：高居忠

2000/09–2003/07，郑州大学医学院，郑州大学附属第一医院，硕士，导师：张卫

1989/09–1994/07，郑州大学医学院，临床医学系

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾进入博士后流动站(或工作站)从事研究，请列出合作导师姓名)：

2015/09–至今，首都医科大学，首都医科大学附属北京朝阳医院，泌尿外科，副主任医师

2013/01–2015/01，哈佛大学医学院附属Brigham and women's Hospital进行博士后研究工作，从事老年供体储备能力及B细胞在器官移植排斥中的作用，合作导师：Tullius SG

2006/09–2015/08，首都医科大学，首都医科大学附属北京朝阳医院，泌尿外科，主治医师

1994/09–2000/08，河南省信阳市人民医院，外科，医师

曾使用其他证件信息（申请人应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

无

主持或参加科研项目(课题)及人才计划项目情况(按时间倒序排序)：

1. 国家自然科学基金主任基金，81050014，预处理树突细胞扩增Treg细胞协同诱导特异性移植免疫耐受的研究，2011/01–2011/12，10万元，已结题，参加。

代表性研究成果和学术奖励情况（每项均按时间倒序排序）

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加以说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称(或会议论文集名称及起止页码)、会议



地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）

一、期刊论文（仅不列此项时可删除该标题）

请按如下顺序列出：

1. 第一作者论文（仅不列此项时可删除该标题）

（1）**杨晓勇#**，姚庆春，胡小鹏，王玮，尹航，任亮，刘航，张小东*。雷帕霉素体外预处理树突细胞调节Treg/Th17细胞诱导小鼠移植免疫耐受.，中华医学杂志，2015，95(30)：2469-2473.

（2）**杨晓勇#**，姚庆春，王玮，齐曼，洪希莹，刘晨妹，尹航，刘航，任亮，胡小鹏，张小东*。树突细胞共刺激分子表达与免疫抑制剂干预，中国组织工程研究，2015，19（24）：3876-3881.

（3）**杨晓勇#**，任亮，王玮，刘航，胡小鹏，张小东*。肾移植受者BK病毒感染的单中心回顾性研究，首都医科大学学报，2015，36(3)：459-464.

（4）**杨晓勇#**，李世海，任亮，王玮，尹航，刘航，胡小鹏，张小东*。肾移植后早期受者BK病毒DNA拷贝数的影响因素研究，中华器官移植杂志，2012，33(8)：477-480.

（5）**杨晓勇#**，张小东，高居忠*。雷帕霉素诱导致耐受性树突细胞的实验研究，中华细胞与干细胞移植杂志，2010，2（1）：16-19.

（6）**杨晓勇#**，张小东，高居忠*。不同免疫抑制剂对树突细胞抗原递呈功能影响的比较研究，中华细胞与干细胞移植杂志，2009，1：31-34.



除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字

参与者 简历

王伟，首都医科大学，首都医科大学附属北京朝阳医院，主治医师

邮箱：wangww627@163.com

身份证号：370783198208166712

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

2009/09-2012/06，首都医科大学，泌尿外科学，博士，导师：杨勇

2006/09-2009/06，天津医科大学，泌尿外科学，硕士，导师：赵耀瑞

2001/09-2006/06，滨州医学院，临床医学系

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾进入博士后流动站（或工作站）从事研究，请列出合作导师姓名）：

2015/10-至今，首都医科大学附属北京朝阳医院，泌尿外科，主治医师

2012/08-2015/10，首都医科大学附属北京朝阳医院，泌尿外科，住院医师

曾使用其他证件信息（申请人应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

无

主持或参加科研项目（课题）及人才计划项目情况（按时间倒序排序）：

(1) 首都医科大学重点实验室开放研究课题，IL-17表达与移植肾慢性排斥反应的相关性研究，2015/05-2017/05，5万元，未结题，主持

(2) 首都医科大学基础-临床科研合作基金，1140170035，IL-17在肾移植排斥反应中作用及机理的研究，2014/05-2016/05，5万元，已结题，主持

代表性研究成果和学术奖励情况（每项均按时间倒序排序）

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加以说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本



人姓名加粗显示。)

一、期刊论文(仅不列此项时可删除该标题)

请按如下顺序列出:

1. 第一作者论文(仅不列此项时可删除该标题)

(1)**Wang Wei**#, Xie Dawei, Hu Xiaopeng, Yin Hang, Liu Hang, Zhang Xiaodong*. Effect of hypothermic machine perfusion on the preservation of kidneys donated after cardiac death-a single-center randomized controlled trial. Artificial Organ, 2017, Feb8. PMID: 28176336

(2)**王伟**#, 张强, 范博涵, 蒋一航, 王玮, 尹航, 胡小鹏, 张小东*. 抗生素使用时间对肾移植围手术期感染的影响, 中国医药, 2015, 11(10): 1676-1678.

(3)**Wei Wang**#, Ning Zhang, Yong Yang*. Involvement of TL1A and DR3 in induction of ischaemia and inflammation in urinary bladder dysfunction in the elderly. Molecular Medicine Reports, 2012, 6: 434-438.

(4)**王伟**#, 赵耀瑞*, 张建华, 李凯, 韩瑞发. 女性膀胱出口梗阻的影像尿动力学特点分析. 天津医科大学学报, 2008, 4: 356-358.



除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字

参与者 简历

苏路路，首都医科大学，首都医科大学附属北京朝阳医院，住院医师

邮箱：sddpsululu@163.com

身份证号：370923198807080376

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

2013/09-2016/06，首都医科大学，第三临床医学院，硕士，王玮

2006/09-2011/06，南昌大学，第二临床医学院

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾进入博士后流动站（或工作站）从事研究，请列出合作导师姓名）：

2016/08-至今，首都医科大学附属北京朝阳医院，急诊科，住院医师

曾使用其他证件信息（申请人应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

无

主持或参加科研项目（课题）及人才计划项目情况（按时间倒序排序）：

（1）北京市自然科学基金，7142057，硫化氢对尿毒症加速性AS中TGF- β /Smad通路及其阻遏子c-Ski的调控机制，2014/01-2016/12，18.00万元，已结题，参加

（2）高等学校博士学科点专项科研基金，20121107120026，CD4+CD25+FoxP3+调节性T细胞诱导供体特异性移植免疫耐受的研究，2013/01-2015/12，4万元，已结题，参加

代表性研究成果和学术奖励情况（每项均按时间倒序排序）

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加以说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本



人姓名加粗显示。)

一、期刊论文（仅不列此项时可删除该标题）

请按如下顺序列出：

1. 既非第一作者又非通讯作者论文（仅不列此项时可删除该标题，序号按实际情况编排）

(1)Ze Jia Sun#, Xin Du, **Lu Lu Su**, Xiao Dong Zhang, Wei Wang *. Successful Renal Transplantation in a Patient with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Treated with Eculizumab in China. Chinese Medical Journal (English),2016 ;129(11):1379-1381.

(2)Han Li# , Su Juan Feng, **Lu Lu Su**, Wei Wang, Xiao Dong Zhang, Shi Xiang Wang*. Serum Heparin Predicts Uremic Accelerated Atherosclerosis in Chronic Hemodialysis Patients with Diabetic Nephropathy Chinese Medical Journal (English). 2015;128(10):1351-1357 .

(3)Ze Jia Sun#, Xin Du, **Lu Lu Su**, Xiao Dong Zhang, Wei Wang *.Efficacy and Safety of Basiliximab Versus Daclizumab in Kidney Transplantation: A Meta-Analysis, Transplantation Proceedings, 2015;47(8):2439-2445.



附件信息

序号	附件名称	备注	附件类型
1	移植感染		代表性论著
2	移植影像学		代表性论著
3	中华医学科技奖		科技奖励

NSFC 2017

**签字和盖章页(此页自动生成, 打印后签字盖章)**

申请人: 王玮

依托单位: 首都医科大学

项目名称: TGF- β 诱导MDSCs联合常用免疫抑制剂预防排斥反应及其机制研究

资助类别: 面上项目

亚类说明:

附注说明: 常规面上项目

申请人承诺:

我保证申请书内容的真实性。如果获得资助, 我将履行项目负责人职责, 严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定, 切实保证研究工作时间, 认真开展工作, 按时报送有关材料。若填报失实和违反规定, 本人将承担全部责任。

签字:

项目组主要成员承诺:

我保证有关申报内容的真实性。如果获得资助, 我将严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定, 切实保证研究工作时间, 加强合作、信息资源共享, 认真开展工作, 及时向项目负责人报送有关材料。若个人信息失实、执行项目中违反规定, 本人将承担相关责任。

编号	姓名	工作单位名称	证件号码	每年工作时间(月)	签字
1	杨晓勇	首都医科大学	41300119710811055X	2	
2	王伟	首都医科大学	370783198208166712	6	
3	苏路路	首都医科大学	370923198807080376	6	
4	张希诺	首都医科大学	210105198601223131	10	
5	孙泽家	首都医科大学	110105199010025353	10	
6	李馨	首都医科大学	14020319910128704X	10	
7					
8					
9					

依托单位及合作研究单位承诺:

已按填报说明对申请人的资格和申请书内容进行了审核。申请项目如获资助, 我单位保证对研究计划实施所需要的人力、物力和工作时间等条件给予保障, 严格遵守国家自然科学基金委员会有关规定, 督促项目负责人和项目组成员以及本单位项目管理部门按照国家自然科学基金委员会的规定及时报送有关材料。

依托单位公章

日期:

合作研究单位公章1

日期:

合作研究单位公章2

日期: