

文章编号:1005-6947(2005)05-0347-04

· 实验研究 ·

免疫缺陷树突状细胞诱导异种胰岛细胞移植耐受

赵刚, 王芳, 王春友

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 胰腺外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究受体来源免疫缺陷树突状细胞(dendritic cell, DC)诱导异种胰岛细胞移植的免疫耐受作用及其机制。方法 从BALB/C小鼠骨髓干细胞诱导分化免疫缺陷DC,负载Wistar大鼠MHC抗原。将上述DC通过尾静脉回输糖尿病小鼠体内(预处理组),7d后分别将Wistar或SD大鼠胰岛细胞移植于受体鼠肾包膜下。观察移植物存活时间,检测T细胞增殖及TH1/TH2细胞因子的表达。结果 与对照组相比,预处理组胰岛细胞存活时间明显延长($P < 0.05$),而以SD大鼠胰岛细胞作为供体的移植物存活时间无明显改变。免疫缺陷DC预处理受体鼠T细胞增殖反应微弱,且TH1/TH2细胞因子表达明显下降。结论 负载异种MHC抗原的免疫缺陷型DC预处理受体可诱导抗原特异性T细胞无能,以及TH1/TH2细胞因子的低表达,从而有效地延长异种胰岛细胞存活时间。

关键词: 胰岛移植; 移植耐受; 树突状细胞

中图分类号: R617; R657.5

文献标识码: A

Immune-deficient dendritic cells can induce tolerance to transplantation of xenogenic islet cells

ZHAO Gang, Wang Fang, WANG Chun-you

(Pancreatic Surgery Center of Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether host derived immune-deficient dendritic cells (DC) were capable of inducing immunological tolerance to islet xenografts and to ascertain its mechanism. **Methods** Immune-deficient DC were obtained from marrow of BALB/C mice by inductive differentiation, and loaded with MHC antigen of Wistar rat. The loaded DC were injected into diabetic model mice through tail vein, and, 7 days later, islet of Wistar or SD rats were implanted beneath the renal capsule. Survival time of grafts was monitored. Mixed lymphocyte culture and TH1/TH2 cytokine expression were observed. **Results** Compared to the untreated mice, the survival time of Wistar islets was significantly prolonged in the pretreated mice ($P < 0.05$), but the survival time of SD islets was not significantly prolonged. T lymphocytes of immune-deficient DC pretreated mice showed mild proliferative reaction, and the expression of TH1/TH2 cytokine was significantly lower. **Conclusions** Immune-deficient DC pretreated with donor MHC antigen can induce antigen-specific nonfunction of T cells and low expression of TH1/TH2 cytokines, and thus can effectively prolong the survival time of islet xenografts.

Key words: Islets Langerhans Transplantation; Transplantation Tolerance; Dendritic Cell

CLC number: R617; R657.5

Document code: A

基金项目:湖北省卫生厅青年科技人才基金项目(QJX2005-4)。

收稿日期:2004-09-22; **修订日期:**2005-04-18。

作者简介:赵刚(1975-),男,湖北武汉人,华中科技大学同济医学院附属协和医院主治医师,博士,主要从事胰腺外科方面的研究。

通讯作者:王春友 电话:027-85726273(O); E-mail:cywang52@hotmail.com。

异种胰岛细胞移植可解决胰岛细胞供体来源不足的难题,但强烈的异种排斥反应限制其临床应用。免疫隔离装置不能有效延长胰岛细胞存活,而免疫抑制剂不可避免地损伤胰岛细胞的功能,因而诱导免疫耐受成为理想的解决途径^[1]。以往研究表明,免疫缺陷树突状细胞(dendritic cell, DC)可有

效诱导同种移植耐受,但对其在异种移植中作用研究甚少。本实验以大鼠对小鼠的胰岛细胞移植为模型,通过负载抗原的免疫缺陷 DC 预处理受体,观察其免疫耐受诱导作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及试剂

BALB/C 小鼠, Wistar 大鼠, SD 大鼠均由本校同济医学院实验动物中心提供;重组小鼠粒-单细胞集落刺激因子 (rmGM-CSF)、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、白细胞介素 4 (rmIL-4) 均购自美国 SBG 公司;RPMI 1640 及胎牛血清购自 GIBICO 公司;荧光标记兔抗小鼠主要相容性复合物-II (MHC-II), CD80, CD86 和 NLDC-145 单克隆抗体购自深圳晶美公司;V 型胶原酶及链脲佐菌素购自 Sigma 公司;Ficoll 400 购自 Pharmacia 公司。

1.2 方 法

1.2.1 DC 体外培养 无菌获取 BALB/C 小鼠骨髓细胞悬浮于 RPMI1640 完全培养基(含 100 U/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 10 mmol/L HEPES 和 10% 新生小牛血清)中,添加 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ GM-CSF + 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ TFG- β 后置于 CO_2 培养箱中培养,隔日换液并吸去未贴壁细胞;培养 9~10 d 后收获漂浮细胞即为免疫缺陷 DC^[2]。用兔抗鼠 MHC-II, CD80, CD86 和 NLDC-145 单克隆抗体标记后用流式细胞仪检测表面分子的表达情况。

1.2.2 BALB/C 小鼠 DC 负载异种 MHC 抗原 获取 Wistar 大鼠脾细胞悬液,加入 3 mol/L KCl, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下持续搅拌 16 h。40 000 r/min 离心 60 min, 将上清置于透析袋中,在 500 g/L 蔗糖溶液中浓缩;置 PBS 液中透析 16 h, 40 000 r/min 离心 60 min, 取上清即为 MHC 抗原。1 $\times 10^6$ /ml 免疫缺陷 DC 与 100 mg/L Wistar 大鼠 MHC 抗原在 RPMI 1640 完全培养基中置于 CO_2 培养箱内培养 4 h 后冲洗 2 次, RPMI 1640 重悬后备用。

1.2.3 糖尿病小鼠模型的建立及预处理 BALB/C 小鼠腹腔注入 20 g/L 的链脲佐菌素(60 mg/kg), 注药后第 2~4 天用微量血糖仪检测;连续 2 次空腹血糖高于 16.8 mmol/L 者选为糖尿病模型。在移植前第 7, 4, 1 天分别取 0.5 mL 负载 Wistar 大鼠 MHC 抗原的 DC 悬液通过尾静脉回输糖尿病 BALB/C 小鼠,作为受体鼠接受胰岛细胞移植。

1.2.4 异种胰岛细胞移植及排斥反应监测 逆行胰管注射 V 型胶原酶, Ficoll 连续密度梯度分离纯化大鼠胰岛细胞,将胰岛细胞悬液 1 mL 吸入无菌的 Teflon 管离心后备用。将 DC 预处理后糖尿病小鼠用 10 g/L 的戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,暴露左肾下极并作一小切口,将沉积于 Teflon 管的约 300~400 个胰岛细胞注入,缝合肌肉和皮肤。术后监测血糖,每周 3 次。随机血糖连续低于 11.2 mmol/L 作为胰岛细胞移植存活标准;随机血糖连续 2 次以上高于 11.2 mmol/L 表示胰岛细胞被排斥,功能丧失。

1.2.5 实验分组 每组 12 只。(1)对照组:先用 0.5 mL RPMI1640 培养液输入糖尿病小鼠,然后给 Wistar 大鼠移植胰岛细胞。(2)预处理组:先用 0.5 mL 负载 Wistar 大鼠 MHC 抗原的免疫缺陷 DC 悬液回输糖尿病小鼠,然后移植 Wistar 大鼠胰岛细胞。(3)无关供体组:先用 0.5 mL 负载 Wistar 大鼠 MHC 抗原的免疫缺陷 DC 预处理糖尿病小鼠,然后移植 SD 大鼠胰岛细胞。

1.2.6 单向混合淋巴细胞反应 分别以对照组小鼠及预处理组小鼠的脾脏淋巴细胞为效应细胞,以 Wistar 大鼠和 SD 大鼠脾脏淋巴细胞为刺激细胞进行混合淋巴细胞培养,以刺激指数(刺激指数 = 实验组 A 值 / 对照组 A 值)评定细胞增殖程度。

1.2.7 胰岛细胞移植受体肾脏白细胞介素 2 (IL-2), IL-4, IL-10 以及干扰素- γ (IFN- γ) mRNA 表达 参照试剂盒说明提取受体肾脏总 RNA,在 50 μL 体积中进行两步法逆转录 PCR (RT-PCR)。小鼠 β -actin, IL-2, IL-4, IL-10 及 IFN- γ 的扩增引物序列如下: β -actin sense 为 5' CCT AGC ACC ACG AAG ACA 3', antisense 为 5' AGC CAT GCC AAA TGT CTC3'; IL-2 sense 为 5' GCT CTA CAG CGG AAG CAC AG 3'; antisense 为 5' GTC AGA GCC CTT TAG TTT TAC AA3'; IFN- γ sense 为 5' CTG GCA AAA GGA TGG TGA CA 3'; antisense 为 5' CCT CAA ACT TGG CAA TAC TC 3'; IL-4 sense 为 5' GAT CAT CGG CAT TTT GAA C 3'; antisense 为 5' AGT GAT GTG GAC TTG GAC TC 3'; IL-10 sense 为 5' CTG CCT GCT CTT ACT GAC TG 3', antisense 为 5' TGG AGC TTA TTA AAA TCA CTCT 3'。将上述 RT-PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,以 β -actin 为内参照,通过 TJTY-300 型图像分析系统测定各基因的相对表达量。

1.2.8 病理检测 移植动物存活达 60 d 以上或移植物功能丧失者,取移植物受侧肾进行甲醛固定后石蜡包埋,行 HE 染色。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 DC 的体外扩增

每只小鼠可获取 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个 DC。GM-CSF + TFG- β 诱导的 DC 为免疫缺陷 DC (MHC-II⁺, NLDC-145⁺ 和 CD80 低表达、CD86 低表达)。

2.2 胰岛细胞移植存活情况

对照组小鼠胰岛细胞平均存活时间为 (8.2 ± 1.1) d; 而预处理组小鼠 Wistar 胰岛细胞存活时间缩短,平均为 (6.0 ± 1.1) d (与阴性对照组相比, $P < 0.05$); 无关供体组的 SD 胰岛细胞平均存活时间为 (8.2 ± 1.1) d, 与对照组胰岛细胞无差异 (图 1)。

图 1 各组胰岛细胞存活情况

2.3 单向混合淋巴细胞反应

以 Wistar 大鼠淋巴细胞为刺激细胞时,对照组小鼠淋巴细胞增殖指数为 3.12, 而预处理组淋巴细胞增殖活性明显下降 ($SI = 1.13$, $P < 0.001$)。当以 SD 大鼠淋巴细胞为刺激细胞时,两组小鼠淋巴细胞增殖活性无统计学差异 ($SI = 3.24, 3.19$)。

2.4 TH1/TH2 细胞因子检测

对照组小鼠受体肾 IL-2, IL-4 和 IL-10 表达增强, IFN- γ 无明显改变; 而预处理组 IL-2, IFN- γ , IL-4 和 IL-10 均明显表达降低 ($P < 0.05$); 无关供体组细胞因子表达与对照组无明显差异 (图 2)。

注:† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 2 各组受体肾组织 IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ mRNA 表达

2.5 病理检查结果

HE 染色显示糖尿病小鼠的胰岛细胞明显萎缩,部分纤维化。对照组及无关供体组胰岛细胞移植结构不清,发生脂肪样变或玻璃样变,移植物周围大量淋巴细胞浸润,肾包膜纤维化并增厚。免疫缺陷 DC 处理组移植物周围无明显淋巴细胞浸润,胰岛细胞形态正常。

3 讨论

异种胰岛细胞移植的主要难点之一在于如何缓解或阻止急性异种排斥反应的发生。抗免疫排斥药在一定程度上可缓解异种排斥反应,但不同程度地损伤胰岛细胞功能,而免疫隔离装置并不能有效地使胰岛细胞长期存活并稳定释放胰岛细胞素。因此诱导免疫耐受是解决排斥反应的最佳途径^[3-5]。近来研究表明,DC 在同种器官移植中发挥重要调节作用,既参与移植排斥反应的发生,也可在某些条件下诱导免疫耐受的发生。如未成熟 DC, 转染 IL-10 或 CTLA-4 基因的 DC 表面共刺激分子表达缺陷,使 T 细胞在接受抗原刺激信号的同时缺乏协同刺激信号,导致 T 细胞抗原特异性的无反应状态即无能,从而诱导同种胰岛细胞移植物的长期存活^[6]。然而,对于 DC 在异种移植中的作用以及是否可以诱导耐受的研究甚少。

异种移植供、受体间的 MHC 分子差异较大,必需的黏附分子及细胞因子缺乏或与受体不匹配,导致 MHC 抗原的直接递呈方式难以进行。本研究的前期实验表明,在异种移植中受体 DC 将供体 MHC 抗原摄取后激活初始 (naive) T 细胞,以间接递呈方式启动异种排斥反应^[7]。因此本实验采用受体小

鼠 DC 作为抗原递呈细胞,以供体大鼠 MHC 为抗原,将抗原负载 DC 后再回输小鼠体内并接受大鼠胰岛细胞移植。此模型可更好地反映异种胰岛细胞移植排斥反应以及 DC 对排斥反应的作用。

实验中观察到应用 GM-CSF + TGF- β 后,可从骨髓干细胞定向诱导分化大量共刺激信号表达缺陷的 DC,即免疫缺陷 DC;这与 Strobl 等^[8]对人 DC 的培养中观察到的结果是一致的。负载异种 MHC 抗原的免疫缺陷 DC 预处理后,胰岛细胞移植存活时间明显延长 ($P < 0.05$)。但用 SD 大鼠胰岛细胞作为移植时,异种排斥反应很快发生。这表明免疫 DC 诱导的是抗原特异性的异种移植耐受,而不是非特异性的免疫抑制。

为进一步探讨免疫缺陷 DC 诱导异种移植耐受的机制,本实验通过混合淋巴细胞培养及检测 TH1/TH2 细胞因子的表达,观察 T 细胞的增殖及功能。免疫缺陷 DC 预处理后淋巴细胞对 Wistar 大鼠淋巴细胞无明显增殖反应,但对 SD 大鼠淋巴细胞仍表现出中度增殖反应。表明免疫缺陷 DC 由于表面 CD80 和 CD86 表达缺陷,诱导了 T 细胞的无能。此外,与同种移植耐受中 TH1 细胞因子下调而 TH2 细胞因子上调的免疫漂移现象不同^[9],本实验观察到 TH1/TH2 细胞因子表达均明显下调。此结果提示免疫细胞因子参与异种移植的机制不同于同种移植。其具体机制值得深入研究。

参考文献:

- [1] Emerich DF. Islet transplantation for diabetes: current status and future prospects [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2002, 2(8): 793 - 803.
- [2] Inaba K, Inaba M, Romani N, *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor [J]. *J Exp Med*, 1992, 176(6): 1693 - 1702.
- [3] Krook H, Wennberg L, Hagberg A, *et al.* Immunosuppressive drugs in islet xenotransplantation: a tool for gaining further insights in the mechanisms of the rejection process [J]. *Transplantation*, 2002, 74(8): 1084 - 1089.
- [4] 沈滨, 张建国, 杨维良, 等. FTY720 在鼠类异种胰岛移植排斥反应中的作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(12): 906 - 909.
- [5] 李小荣, 陈道谨, 吕新生, 等. 胎肝胰岛细胞联合移植治疗糖尿病大鼠 [J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(3): 161 - 164.
- [6] Morelli AE, Thomson AW. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction [J]. *Immunol Rev*, 2003, 196(1): 125 - 146.
- [7] 赵刚, 王春友, 王芳, 等. 未成熟树突状细胞在异种移植中的免疫递呈及调节作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(4): 446 - 448.
- [8] Strobl H, Knapp W. TGF- β 1 regulation of dendritic cells [J]. *Microbes Infect*, 1999, 1(15): 1283 - 1290.
- [9] Barbara JA, Turvey SE, Kingsley CI, *et al.* Islet allograft rejection can be mediated by CD4+, alloantigen experienced, direct pathway T cells of TH1 and TH2 cytokine phenotype [J]. *Transplantation*, 2000, 70(11): 1641 - 1649.

中华医学会第 15 届全国外科学术会议征文通知

经中华医学会批准,由中华外科学会主办的第 15 届全国外科学术会议将于 2005 年 10 月 12 ~ 15 日在山东省济南市召开。本次会议将以外科肿瘤综合治疗和腹部大器官移植为主题全面检阅自 2001 年第 14 届全国外科学术会议以来国内普通外科领域临床及基础研究情况。会议将邀请大陆、港台及国外著名专家就外科领域基础与临床进展、外科医生的培养、外科医生与法律等话题做专题演讲。本次会议将致力于进一步规范外科疾病临床诊疗行为,推进外科医生的规范化培养,服务于国民卫生保健事业,促进外科医生队伍的法制建设。

征文内容:外科基础(休克、感染、创伤、营养、监护)、甲状腺和乳腺、胃肠、肝、胆、胰、脾、血管及腹壁等普外科领域常见病多发病的预防、诊断、综合治疗进展,普外科领域新技术、新方法应用经验及新理论、新概念等。

征文要求:(1)未公开发表的论文,(2)请寄 3500 字以内全文及 800 字以内的摘要打印稿一份,摘要应包括目的、方法、结果和结论,请附上软盘。不投摘要者将不能投入论文汇编,(3)请注明单位地址及邮编,并加盖公章。

论文截稿日期:2005 年 7 月 30 日(以当地邮戳为准)。来稿请寄:北京市西城区阜内大街 133 号,中华普通外科杂志编辑部,邮编 100034,请在信封左下角注明“第 15 届全国外科会议征文”字样。征文恕不退稿,请自留底稿。

本次会议是中华医学会一类学术会议,会议将向正式代表颁发中华医学会论文证书,并授予中华医学会继续教育学分。