

文章编号:1005-6947(2008)09-0878-05

· 基础研究 ·

抗原特异性 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞对同种异体胰岛移植影响及作用机制研究

张梅, 徐书杭, 徐瑜, 刘翠萍, 茅晓东, 徐宽枫, 刘超

(南京医科大学第一附属医院 内分泌科, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 探讨抗原特异性 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞免疫对同种异体胰岛急性移植排斥反应的影响和机制。方法 用 MACS 分选供体抗原特异性 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞免疫糖尿病 BALB/cByJ 受体小鼠,以 ICR 小鼠胰岛为供体行同种异体胰岛移植。观察移植后小鼠的存活时间、移植前后外周血 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群的变化和移植植物中 Th1/Th2 细胞因子 mRNA 表达水平的变化。结果 抗原特异性 Treg 细胞联合胰岛移植组(C组)胰岛移植植物平均生存期为(34.57 ± 17.15) d,显著长于单纯胰岛移植组(B组)的(10.6 ± 1.82) d ($P < 0.01$);移植后第3天,C组外周血 CD4⁺/CD8⁺ 的值显著低于B组($P < 0.01$);C组移植植物中 IL-10, TGF- β mRNA 表达比B组显著增强。B组移植植物中 IL-1 β , IL-2 及 IFN- γ mRNA 表达明显强于C组。结论 抗原特异性 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞可通过调节 Th2/Th1 之间的反应平衡而延长同种异体胰岛移植植物的存活时间。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(9): 878-882]

关键词: 胰岛/移植; CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞; 免疫耐受; 细胞因子

中图分类号: R 617

文献标识码: A

Mechanism of donor antigen-specific CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells on prolonging islet grafts survival

ZHANG Mei, XU Shuhang, XU Yu, LIU Cuiping, MAO Xiaodong, XU Kuanfeng, LIU Chao
(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: **Objective** To investigate the potential mechanism of antigen-specific CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells on the suppression of rejection for allogeneic islet transplantation in vivo. **Methods** Islets with 8×10^5 antigen-specific Treg were allogeneically transplanted under the kidney capsule of streptozotocin-induced diabetic BALB/cByJ mice. Mean survival time (MST), the ratio of CD4⁺/CD8⁺ T cells, cytokine expression in both tolerant and rejected mice was detected. **Results** In vivo, the mean survival time of recipients with islets and antigen-specific CD4⁺ CD25⁺ Treg group (C group) was (34.57 ± 17.15) days, whereas transplanted islets without Treg treatment (B group) survived a mean time of (10.60 ± 1.82) d ($P < 0.01$). The ratio of CD4⁺/CD8⁺ T cells from antigen-specific CD4⁺ CD25⁺ Treg transplantation group was significantly lower than that from islet transplantation group ($P < 0.01$). The mRNA expressions of IL-10, TGF- β were upregulated in antigen-specific CD4⁺ CD25⁺ Treg transplantation group. However, the mRNA expressions of IL-1 β , IL-2, IFN- γ were similarly upregulated in islet B group. **Conclusions** Allogeneic antigen-specific CD4⁺ CD25⁺ Treg cells can prolong islet graft survival by the mechanism of affecting Th2/Th1 cells responses.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(9): 878-882]

基金项目:江苏省政府医学重点学科项目基金资助(苏卫科教2001-34)。

收稿日期:2008-05-12; **修订日期:**2008-07-30。

作者简介:张梅,女,南京医科大学第一附属医院主治医师,主要从事1型糖尿病及其并发症防治方面的研究。

通讯作者:刘超 E-mail:liuchao@nfmcn.com

Key words: Islets of Langerhans/ transpl; CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells; Immunotolerance; Cytokine

CLC number: R 617

Document code: A

CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)具有独特的免疫抑制功能,通过抑制自身反应性 T 细胞活化与增殖,维持自身免疫耐受,防止自身免疫病发生^[1]。多项研究报道,获得性调节性 T 细胞不仅具有特定的免疫特性,而且能保留调节性细胞的生物学特征如 CD25, Foxp3,从而介导抗原特异性的免疫应答^[2]。以动物模型为基础的研究已经证实,抗原特异性 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞能介导移植物长期存活^[3-5]。但其在体内诱导针对同种抗原的特异性免疫耐受的机制并未完全阐明。本研究以供体抗原诱导抗原特异性 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞作为疫苗,以正常免疫状态的糖尿病小鼠为胰岛移植受体,旨在探讨抗原特异性 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞主动免疫诱导同种异体胰岛移植耐受的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 清洁级 ICR 小鼠,雌雄不拘,体重 25~35 g,购自江苏省实验动物中心;清洁级 BALB/cByJ 小鼠,雄性,体重 25~28 g,购自南京大学模式动物中心。无特殊病原菌饲养级饲养。

1.1.2 试剂和仪器 包括 V 型胶原酶(Sigma, 美国),小牛血清(Hyclone, 美国),RPMI1640 培养液(Gibco, 美国),链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ, Sigma),PE-Cy5-anti-CD3, PE-anti-CD4, FITC-anti-CD25 抗体,血清白细胞介素 4(IL-4)ELISA 试剂盒(eBioscience, 美国),小鼠 CD4⁺CD25⁺T 细胞磁珠分离试剂盒(Miltenyi Biotec 公司, 德国),优越 II 型血糖仪(Roche 公司, 德国),FACSCalibur 流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国)及逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR 试剂盒, TOYOBO, 日本)。

1.2 方 法

1.2.1 分组 STZ 诱发的糖尿病 BALB/cByJ 小鼠为受体,ICR 小鼠为供体。实验分为 4 组:A 组,糖尿病 BALB/cByJ 小鼠对照组($n=5$);B 组,糖尿病 BALB/cByJ 小鼠胰岛移植组($n=5$);C 组,糖尿病 BALB/cByJ 小鼠胰岛移植联合抗原特异性 CD4⁺CD25⁺T 细胞组(8×10^5 个)($n=7$);

D 组,正常对照组($n=5$)。

1.2.2 抗原特异性 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞制备

取制备好的 ICR 小鼠单个核细胞悬液,加入丝裂霉素(Mitomycin, MMC)(25 ug/ml)37℃ 孵育 30 min;磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,1 200 r/min,离心 5 min,重悬于 PBS,调整细胞浓度 2×10^7 /mL,分别免疫 BALB/cByJ 小鼠 0.5 mL/次,尾静脉注射,每周 1 次,连续 3 周。于第 3 次免疫后第 5 天,分别取出被免疫的 BALB/cByJ 小鼠的脾脏制备淋巴细胞悬液。MACS 法分离 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞^[6]。

1.2.3 小鼠胰岛分离 ICR 小鼠,不禁食,1% 戊巴比妥钠麻醉,无菌操作下腹部 V 字型切口,结扎近十二指肠端胆总管,靠肝门近端逆行插入 26G 静脉注射针,破心放血处死动物,将冷胶原酶溶液从插管处灌注 4 mL,迅速完整地摘取胰腺放置含 1 mL 冷胶原酶试管中,于 37℃ 水浴静止消化 12~15 min;在涡流震荡器上震荡 10 s,呈细沙状;再放置冰上,立即加入含 10% 小牛血清的 4℃ Hank's 液,终止消化。30 目不锈钢细胞筛过滤,去除淋巴结等组织。1 000 r/min 离心,2 min,弃上清液,Hank's 液洗涤 2 遍。

1.2.4 糖尿病小鼠模型的制备 BALB/c 小鼠,禁食 12 h,用柠檬酸/柠檬酸钠溶液(pH 4.5)溶解 STZ。按 200 mg/kg 单剂量腹腔注射,48~72 h 后尾静脉采血。动物全血血糖 ≥ 16.7 mmol/L,出现明显消瘦、多食、多饮、多尿,并维持 1 周以上者确定为糖尿病模型建立。

1.2.5 同种异体胰岛移植 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,暴露受体鼠(B, C 组)左肾,从肾下极沿包膜下间隙游离至上极,注射分离的新鲜胰岛(500~600 个),缝合。糖尿病对照组(A 组)肾包膜下注射 30 μ L 生理盐水。移植后第 1 周每日测血糖,自第 2 周起每周测血糖 2 次。以非禁食血糖 < 11.1 mmol/L 判定为移植物存活,移植有效。连续 2 次血糖 > 11.1 mmol/L 为移植物排斥,以出现第一次升高的时间为排斥时间。

1.2.6 外周血 CD4⁺T 细胞及 CD8⁺T 细胞的检测 分别于移植后 1, 3, 5, 7 d 眼眶静脉丛采血 100 μ L,肝素抗凝,分为 2 管,分别加入 PE-Cy5-

anti-CD3, FITC-anti-CD4 或 FITC-anti-CD8 抗体, 4 °C 避光孵育 20 ~ 30 min。加入红细胞裂解液 2 mL, 震荡均匀, 作用 5 min, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 1 200 r/min, 离心 5 min 后, 重新悬浮细胞于 500 μ L 缓冲液。流式细胞仪检测。

1.2.7 移植物标本收集 分别于移植后 1, 3, 5, 7 d 处死取小鼠 ($n = 2$), 取小鼠血清及含有移植胰岛的肾脏、脾脏、淋巴结组织快速置液态氮。-80 °C 保存。所有动物不计入生存期观察。

1.2.8 半定量 RT-PCR 检测移植物中细胞因子的基因表达 取含有移植胰岛的肾脏、脾脏、淋巴结、肝脏等冻存组织抽提 RNA, 半定量 RT-PCR 测定各组织基因的表达量。根据各基因产物大小选择 GAPDH 为内参, 测定各目的基因/内参灰度的值。引物由上海博亚公司合成 (表 1)。

表 1 各基因引物序列及产物大小

基因	引物序列	温度(°C)	PCR产物(bp)
IL-1 β	上游引物 TTCAAGGGACATTAGCCAG	55	158
	下游引物 TGTGCTGGTCTTCATTCAT		
IL-2	上游引物 GTGCTCCTGTCAACAGCGCA	59	129
	下游引物 CTCCTGTAGGTCATCAACAGC		
IL-10	上游引物 GTTGCCAAGCCTTATCGGAA	59	131
	下游引物 CCGCATCCTGAGGCTCTTC		
IFN- γ	上游引物 GAAAAGGAGTCGCTGCTG	58.5	304
	下游引物 AGATACAACCCGCAATCAC		
TGF- β	上游引物 CTTTAGGAAGGACCTGGGTT	57	258
	下游引物 CAGGAGCCGACAATCATGTT		
GAPDH	上游引物 ACCACAGTCCATGCCATCAC	59	432
	下游引物 TCCACCACCTGTTGCTGTA		

1.2.9 血清 IL-4 测定 按酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒说明严格操作测定血清 IL-4 的值。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS10.0 软件处理。两组间比较采用 t 检验; 多组间和组内比较采用方差分析; 存活率用 Kaplan-Meier 分析。 $P < 0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

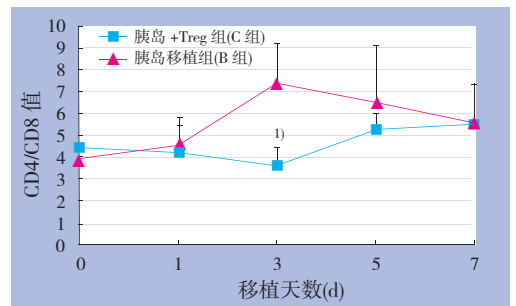
2.1 抗原特异性 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞延长胰岛移植物存活时间

7 只接受 8×10^5 个抗原特异性 CD4⁺ CD25⁺

Treg 细胞联合胰岛移植的糖尿病小鼠 (C 组) 全部在 24 h 内恢复正常血糖 (< 10 mmol/L), 实现了胰岛素的不依赖性。C 组胰岛移植物平均生存期为 (34.57 ± 17.15) d, 显著长于胰岛移植组 (B 组) 的 (10.6 ± 1.82) d 生存时间, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。

2.2 抗原特异性 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞输注对同种异体胰岛移植早期受体外周血淋巴细胞亚群的影响

C 组小鼠在移植后 CD4⁺/CD8⁺ 的值无明显增高, 而 B 组 CD4⁺/CD8⁺ 的值明显升高。移植后第 3 天, C 组 CD4⁺/CD8⁺ 的值显著低于 B 组 ($P < 0.01$) (图 1)。



1) 与 B 组比较, $P < 0.01$

图 1 两组移植后外周血 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值的变化

2.3 抗原特异性 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞对同种异体胰岛移植中 Th1/Th2 相关细胞因子的影响

B 组移植物中白细胞介素 1 β (IL-1 β), 白细胞介素 2 (IL-2) 及干扰素- γ (IFN- γ) mRNA 表达均增强。C 组移植物中白细胞介素 10 (IL-10) mRNA 于不同时点的表达未见上调, 但 mRNA 水平的表达高于同时点的对照组 (B 组); C 组转化生长因子- β (TGF- β) mRNA 的表达随移植时间上调, 第 7 天表达高于同时时间点的 B 组 (图 2)。

2.4 抗原特异性 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞对同种异体胰岛移植后受体体内 IL-4 水平的影响

移植后 1 d, B 组 IL-4 含量则无明显变化, C 组 IL-4 水平呈上升趋势, 较 B 组及正常对照组 (D 组) 有极显著统计学差异 ($P < 0.001$) (图 3)。

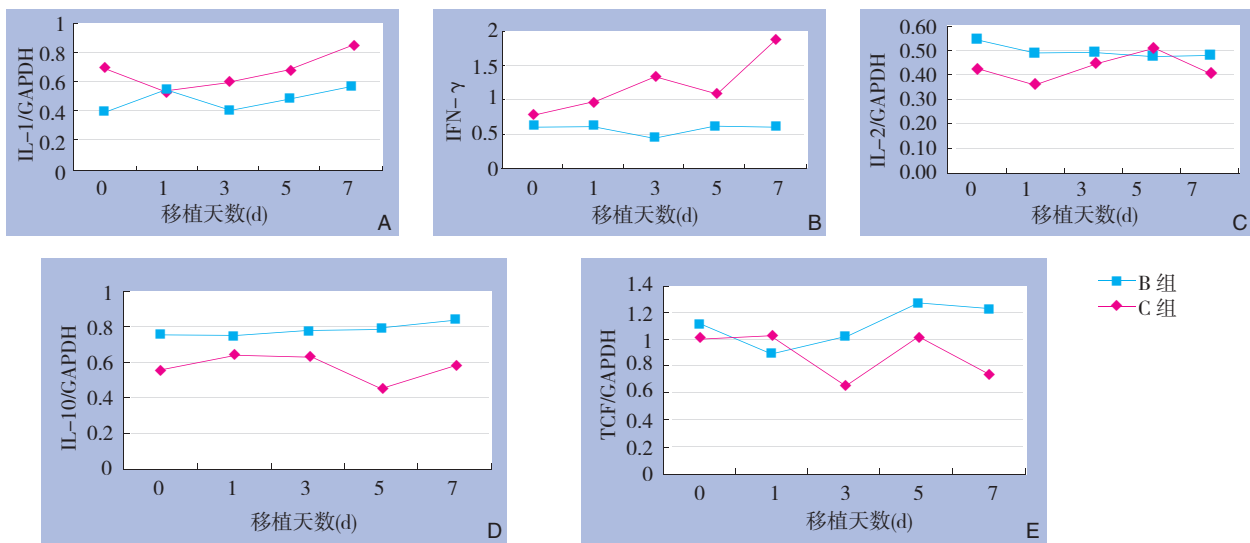
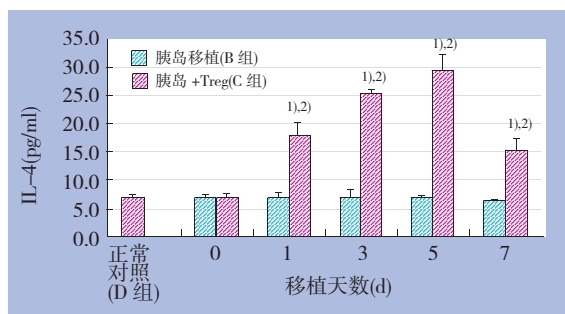


图2 两移植组移植后不同时点细胞因子 mRNA 表达的变化 A:IL-1; B:IFN-γ; C:IL-2; D:IL-10; E:TGF



1) 与 B 组比较, $P < 0.001$; 2) D 组比较, $P < 0.001$

图3 胰岛移植后不同时间点外周血 IL-4 的变化

3 讨论

动物实验和临床研究显示, CD4⁺CD25⁺Treg 细胞在移植免疫耐受中起重要作用。本研究采用供体脾细胞体内输注获得的抗原特异性 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞作为细胞疫苗联合胰岛移植。结果显示,在不使用免疫抑制剂的情况下, B 组多在 10 d 左右发生排斥反应。而 C 组小鼠胰岛移植存活时间明显延长,较对照组有差异显著性。说明抗原特异性 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞可预防移植后排斥反应,是有希望细胞免疫抗排斥反应治疗方法。

目前认为, Th1 细胞是介导移植排斥反应的重要效应细胞。Th1/Th2 两类辅助性细胞之间动态平衡对诱导和维持免疫耐受十分重要, Th2 细胞因子表达的上调和 Th1 细胞因子表达的下降是移植免疫耐受的机制之一^[7]。在 CD4⁺Th 细

胞群中, Th1 细胞主要分泌 IL-1β, IL-2 和 IFN-γ, 促进细胞免疫应答,与器官急性排斥反应有关; Th2 细胞主要分泌 TGF-β, IL-10, 参与体液免疫反应,并可能在移植耐受和迟发性排斥反应中起作用。移植物在受体的长期存活需要 Th1 和 Th2 应答的平衡。胰岛移植后急性排斥反应常发生在术后 7~10 d 内,其机制较复杂,涉及体液和细胞免疫反应,其中又以细胞免疫功能紊乱为主。Th1/Th2 平衡向 Th1 偏移,尤其移植物局部出现 Th1 细胞异常增殖和聚集。活化 Th1 细胞可释放 IL-2, IFN-γ 和 αTNF 等细胞因子介导了对胰岛移植物的损伤^[8]。

自身免疫性疾病动物模型研究显示,调节性 T 细胞在体外是通过细胞与细胞间相互作用而体内则依赖于细胞因子的作用抑制 T 细胞反应。然而,抗原特异性 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞体内诱导针对同种抗原的特异性免疫耐受的机制并未完全阐明,可能与下列因素有关:(1) 细胞因子的作用。可能是分泌的 IL-10 和 TGF-β 通过“旁观者 (Bystander)”效应非特异性下调免疫应答^[9-11]; (2) Th1/Th2 细胞的转化诱导免疫耐受。抗原特异性 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞在输注给受体后,广泛参与受体免疫系统细胞因子的调节,可直接/和间接影响 IL-1, IL-2, IL-10, TGF-β 及 IFN-γ 等的作用,影响淋巴细胞的增殖分化;这些细胞因子在免疫耐受的维持中可能发挥着重要作用。研究证实, CD4⁺CD25⁺Treg 细胞即可调节 Th2/Th1 之间的反应平衡^[12],又能促进

Th2 细胞发育、功能活化和增殖^[13]。本实验的连续检测发现, B 组移植物中 IL-1 β , IL-2 及 IFN- γ mRNA 表达增强, C 组中 IL-10, TGF- β mRNA 表达增强。

IL-4 作为诱导 Th2 细胞分化的关键因子^[14], 它不仅促进 T0 向 T2 分化, 还可以抑制 Th1 细胞增殖, 下调 Th1 细胞因子表达, 从而延长移植物存活时间。体外研究显示, IL-4 能够促进 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的增殖^[15-16], 并维持 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的正常功能。本研究结果发现, 移植后第 1 天, C 组 IL-4 水平即明显上升, B 组 IL-4 水平则无明显变化。反之, IL-4 的水平升高又促进 Treg 细胞功能, 两者相互作用, 调节移植免疫反应, 促进移植物的存活。本文体内实验结果可能与 Treg 细胞的作用有关。

综上所述, 抗原特异性 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞可能抑制初始 T 细胞向 Th1 分化, 调节 Th1/Th2 应答, 在同种异体胰岛移植中发挥免疫抑制作用。因此认为, 抗原特异性 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞在胰岛移植免疫耐受的形成中扮演十分重要的角色。

参考文献:

[1] Walsh PT, Taylor DK, Turk LA. Tregs and transplantation tolerance [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114 (10): 1398 - 1403.

[2] Taylor KN, Shinde-Patil VR, Cohick E, *et al.* Induction of FoxP3⁺ CD4⁺ 25⁺ regulatory T cells following hemopoietic stem cell transplantation: role of bone marrow-derived facilitating cells [J]. *J Immunol*, 2007, 179 (4): 2153 - 2162.

[3] Callaghan CJ, Rouhani FJ, Negus MC, *et al.* Abrogation of Antibody-Mediated Allograft Rejection by Regulatory CD4 T Cells with Indirect Allospecificity [J]. *J Immunol*, 2007, 178 (4): 2221 - 2228.

[4] Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, *et al.* In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance [J]. *Blood*, 2007, 109 (2): 827 - 835.

[5] Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, *et al.* Donor-type

CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation [J]. *J Exp Med*, 2002, 196 (6): 389 - 399.

[6] 韩梅, 王冠军. CD4⁺ CD25⁺ 免疫调节性 T 细胞对 CD4 T 细胞介导的移植物抗宿主病预防作用的研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2006, 22: 323 - 326.

[7] 朱鹏, 陈义发, 张宜江, 等. Th1/Th2 类细胞因子转换对小鼠心脏移植物存活的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16 (10): 982 - 985.

[8] Abdi R, Means TK, Luster AD. Chemokines islet allograft *et* allograft rejection [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2003, 19 (3): 186 - 190.

[9] Thompson C, Powrie F. Regulatory T cells [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4 (4): 408 - 414.

[10] Stock P, Akbari O, Berry G, *et al.* Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity [J]. *Nat Immunol*, 2004 (11), 5: 1149 - 1156.

[11] Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, *et al.* In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4 T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines [J]. *J Exp Med*, 2002, 195 (5): 603 - 616.

[12] Xu D, Liu HY, Komai-Koma M, *et al.* CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania* major infection, and Colitis in Mice [J]. *J Immunol*, 2003, 170 (1): 394 - 399.

[13] Stassen M, Jonuleit H, Muller C. Differential regulatory capacity of CD25⁺ T regulatory cells and pre-activated CD25⁺ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells [J]. *J Immunol*, 2004, 173 (1): 267 - 274.

[14] Pace L, Rizzo S, Palombi C, *et al.* Cutting edge: IL-4-induced protection of CD4⁺ CD25⁻ Th cells from CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell-mediated suppression [J]. *J Immunol*, 2006, 176 (7): 3900 - 3904.

[15] Pace L, Pioli C, Doria G. IL-4 Modulation of CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell-mediated suppression [J]. *J Immunol*, 2005, 174 (12): 7645 - 7653.

[16] Yates J, Rovic F, Mitchell P, *et al.* The maintenance of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function: IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15 preserve optimal suppressive potency in vitro [J]. *Int Immunol*, 2007, 19 (6): 785 - 799.