

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.16.004

文章编号: 1005-8982(2017)16-0018-06

供体来源半成熟树突状细胞诱导大鼠肝移植术后免疫低反应的实验研究*

李春满¹, 王伟², 张捷³, 唐波¹, 李刚¹, 董丽英⁴, 朱磊⁵, 付必莽¹

(昆明医科大学第二附属医院 1.肝胆胰外科四病区, 2.泌尿外科一病区, 3.肝胆胰研究所, 4.甲状腺乳腺外科, 5.肝胆胰外科一病区 云南 昆明 650101)

摘要:目的 研究供体来源半成熟树突状细胞(smDC)诱导大鼠肝移植术后免疫低反应的效果,初步分析其作用机制。**方法** 该实验在成功完成大鼠树突状细胞(DC)培养和鉴定的基础上,进行大鼠肝移植术前输注供体来源 DC、术后使用雷帕霉素灌胃,观察大鼠术后血清白细胞介素 10(IL-10)和 γ 干扰素(IFN- γ)、CD4⁺CD25⁺Treg 的变化,并评估急性免疫排斥病理改变。**结果** 使用雷帕霉素后,可以改变血清细胞因子的分泌水平、促进 Lewis \rightarrow BN 大鼠肝移植术后 CD4⁺CD25⁺Treg 的增殖,减轻术后免疫排斥反应,从而延长 Lewis \rightarrow BN 大鼠肝移植术后生存时间。结合术前输注未成熟树突状细胞(imDC)或 smDC,可以增强雷帕霉素的相应作用,进一步诱导大鼠肝移植术后免疫低反应,且 smDC 的作用强于 imDC。**结论** smDC 可以诱导 Lewis \rightarrow BN 大鼠肝移植术后免疫低反应。

关键词: 肝移植;半成熟树突状细胞;免疫排斥;调节性 T 细胞

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Induction of low immune response by donor-derived semi-mature dendritic cells in rats after liver transplantation*

Chun-man Li¹, Wei Wang², Jie Zhang³, Bo Tang¹, Gang Li¹, Li-ying Dong⁴, Lei Zhu⁵, Bi-mang Fu¹
(1. The Fourth Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, 2. The First Department of Urinary Surgery, 3. Hepatobiliary and Pancreatic Research Institute, 4. Department of Thyroid and Breast Surgery, 5. The First Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650101, China)

Abstract: Objective To study the effect of donor-derived semi-mature dendritic cells (smDC) in inducing low immune response of rats after orthotopic liver transplantation and analyze its mechanism. **Methods** In this experiment, based on culture and identification of rat dendritic cells, donor-derived dendritic cells were infused before orthotopic liver transplantation, and Rapamycin was used for gastric lavage after surgery. Then the expression levels of cytokines (IL-10 and IFN- γ) and CD4⁺CD25⁺Treg changes were observed, and the pathological changes of acute immunological rejection were evaluated. **Results** Administration of Rapamycin changed serum cytokine secretion, promoted CD4⁺CD25⁺Treg proliferation after liver transplantation in the Lewis \rightarrow BN rats, alleviated postoperative immune rejection, thus prolonged the survival time after liver transplantation. Preoperative infusion of immature dendritic cells (imDC) or smDC could enhance the effect of Rapamycin and further induce the low immune response after liver transplantation in rats, and the effect of smDC was stronger than that of imDC. **Conclusions** smDC can induce low immune response after liver transplantation of Lewis \rightarrow BN rats.

Keywords: liver transplantation; semi-mature dendritic cell; immune rejection; regulatory T cell

收稿日期: 2016-12-28

* 基金项目: 云南省卫生科技计划项目(No: 2014NS063); 云南省科技计划项目(No: 2014FB053)

[通信作者] 付必莽, Email: lmaxxm@163.com

肝移植是目前治疗终末期肝病唯一有效的方法,移植术后免疫排斥反应是造成移植物功能失活的主要因素,术后需要长期使用免疫抑制剂来抑制排斥反应、进而维持肝脏长期存活^[1]。但是,长期应用免疫抑制剂会增加感染概率,会增加恶性肿瘤的发生风险。如何减少肝移植术后免疫抑制剂的使用并同时保证移植物发生免疫耐受或者免疫低反应性是临床研究的重点。树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内专职抗原提呈细胞,半成熟树突状细胞(semimature dendritic cell, smDC)是新近发现的一种中间态的 DC,对免疫应答具有抑制效应^[2],但对肝移植术后免疫排斥的调节作用仍然有待进一步研究。本研究重点观察供体来源 smDC 对大鼠肝移植术后免疫反应的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

封闭群雄性健康 SPF 级大鼠、体重 250 ~ 280 g, 供体为 Lewis 大鼠,受体为 BN 大鼠,均购于北京维通利华实验动物有限公司。大鼠白细胞介素 10 (Interleukin-10, IL-10)、 γ 干扰素 (Interferon- γ , IFN- γ) ELISA 试剂盒以及 FITC 标记的抗大鼠 CD4 (FITC anti-rat CD4) 及 PE 标记的抗大鼠 CD25 (PE anti-rat CD25) 为美国 eBioscience 公司产品, Bio-tek ELx800 酶标仪为德国 BIO-TEK 公司产品, 流式细胞仪 (FACSCalibur) 为美国 BD 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 实验动物完全随机分为 3 组, 每组 25 对大鼠。雷帕霉素干预组: 术后 1 ~ 7 d 用雷帕霉素 2 mg/(kg·d) 灌胃; 未成熟树突状细胞 (immature dendritic cell, imDC) 干预组: 术前 7 d 经受体阴茎背静脉注射 Lewis 大鼠来源的 imDC 1×10^6 个/只, 术后 1 ~ 7 d 用雷帕霉素 2 mg/(kg·d) 灌胃; smDC 干预组: 术前 7 d 经阴茎背静脉注射 Lewis 大鼠来源的 smDC 1×10^6 个/只, 术后 1 ~ 7 d 用雷帕霉素 2 mg/(kg·d) 灌胃。

1.2.2 复制大鼠肝移植模型 以改良的 kamada 二袖套法复制大鼠肝移植急性排斥反应模型, 双袖套法吻合肝下腔静脉和门静脉, 直接缝合法吻合肝上下腔静脉, 自制胆道支架吻合胆道, 肝动脉不吻合。术后大鼠单笼饲养, 以红外线灯或空调加热, 以便尽快复温, 直至活动自如。术后恢复进水, 自由进食, 连续 3 d (包括手术当天) 予腹腔内注射含 10 万 u

青霉素的生理盐水 3 ml。

1.2.3 指标检测方法 术后第 1、4、7 和 10 天各随机处死 5 只大鼠, 收集肝脏组织并制作病理切片, 对急性免疫排斥病理改变进行评估。收集外周血后分为 2 份, 一份采用酶联免疫吸附试剂盒测定 IFN- γ 和 IL-10 的含量, 另一份用于分离外周血单个核细胞, 孵育 FITC anti-rat CD4 和 PE anti-rat CD25 单克隆抗体后在流式细胞仪上测定 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的含量。其余 5 只观察存活时间。

1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 软件录入和分析数据, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 IFN- γ 和 IL-10 含量

雷帕霉素干预组肝移植术后 1 ~ 7 d, 血清 IFN- γ 水平随着时间延长, 维持在一个较低的水平, 停药后 (10 d) 升高, 同期, 血清 IL-10 水平随着时间延长逐渐升高, 停药后 (10 d) 较前降低; imDC 干预组和 smDC 干预组肝移植术后 1 ~ 7 d 血清 IFN- γ 和 IL-10 水平变化趋势与雷帕霉素组一致, 但整体水平 IFN- γ 比雷帕霉素组偏低、IL-10 比雷帕霉素组偏高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 停药后 (10 d), imDC 干预组和 smDC 干预组血清 IFN- γ 水平升高幅度低于雷帕霉素组, 而同时两组 IL-10 水平继续升高 (与雷帕霉素组降低的情况不同), 2 种细胞因子分泌水平与雷帕霉素组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 两组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 同一时间段两组之间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1、2。

2.2 大鼠外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 流式细胞水平

大鼠肝移植术后外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 水平, 雷帕霉素干预组随着时间延长, 逐渐升高, 各时间段比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); imDC 干预组和 smDC 干预组变化趋势与雷帕霉素组一致, 但整体水平比雷帕霉素组偏高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 同一时间段两组之间比较 smDC 干预组比 imDC 干预组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3、图 1 ~ 3。

2.3 肝脏病理改变

各组可见到随着移植时间的延长, 汇管区三体 (肝动脉、门静脉和胆管汇管) 炎症细胞和淋巴细胞

浸润增加,组织水肿范围扩大,肝实质内散在一些淋巴、单核、中性粒细胞浸润,静脉炎并扩展到肝实质,引起静脉周围肝细胞坏死,术后第 10 天最明显。雷帕霉素干预组中 - 重度静脉炎并扩展到肝实质,引

起静脉周围肝细胞坏死,少数汇管区内有小胆管破坏,Banff 系统评分 III 级,imDC 组、smDC 组肝实质内散在一些淋巴、单核、中性粒细胞浸润,Banff 系统评分 II 级,imDC 组较 smDC 组稍重(见图 4~6)。

表 1 各组大鼠血清 IL-10 的变化 (n=5,pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	1 d	4 d	7 d	10 d	F 值	P 值
雷帕霉素干预组	470.50 ± 28.11	543.24 ± 36.50 ¹⁾	722.50 ± 47.16 ¹⁾²⁾	519.30 ± 101.18 ¹⁾²⁾³⁾	6.831	0.012
imDC 干预组	539.26 ± 86.48 ⁴⁾	645.19 ± 95.06 ¹⁾⁴⁾	886.44 ± 152.10 ¹⁾²⁾⁴⁾	942.50 ± 191.47 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	9.115	0.003
smDC 干预组	546.24 ± 93.75 ⁴⁾	658.66 ± 108.82 ¹⁾⁴⁾	905.65 ± 171.54 ¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾	949.97 ± 219.50 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	8.693	0.006
F 值	7.382	6.772	8.389	10.337		
P 值	0.005	0.008	0.003	0.001		

注:1)与组内 1 d 比较, P<0.05;2)与组内 4 d 比较, P<0.05;3)与组内 7 d 比较, P<0.05;4)与雷帕霉素组比较, P<0.05;5)与 imDC 干预组比较, P<0.05

表 2 各组大鼠血清 IFN-γ 的变化 (n=5,pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

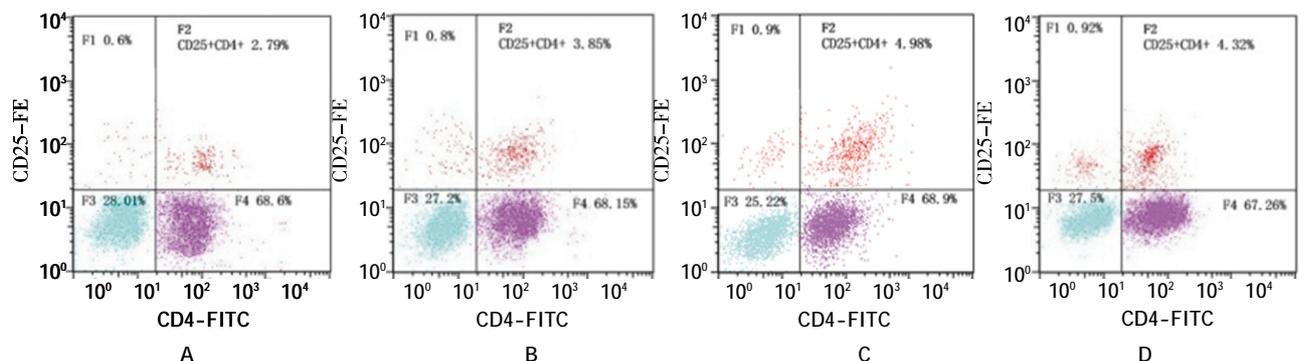
组别	1 d	4 d	7 d	10 d	F 值	P 值
雷帕霉素干预组	326.40 ± 32.57	398.20 ± 36.19 ¹⁾	424.68 ± 38.10 ¹⁾²⁾	709.63 ± 78.15 ¹⁾²⁾³⁾	11.382	0.003
imDC 干预组	249.58 ± 44.02 ⁴⁾	308.20 ± 49.75 ¹⁾⁴⁾	338.54 ± 55.07 ¹⁾²⁾⁴⁾	559.66 ± 89.42 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	9.387	0.008
smDC 干预组	247.50 ± 31.30 ⁴⁾	294.26 ± 40.90 ¹⁾⁴⁾	319.47 ± 52.18 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾	541.58 ± 92.94 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	13.282	0.001
F 值	9.382	7.472	8.683	7.794		
P 值	0.002	0.006	0.003	0.004		

注:1)与组内 1 d 比较, P<0.05;2)与组内 4 d 比较, P<0.05;3)与组内 7 d 比较, P<0.05;4)与雷帕霉素组比较, P<0.05;5)与 imDC 干预组比较, P<0.05

表 3 各组大鼠外周血中 CD4⁺CD25⁺Treg 的变化 (n=5,%, $\bar{x} \pm s$)

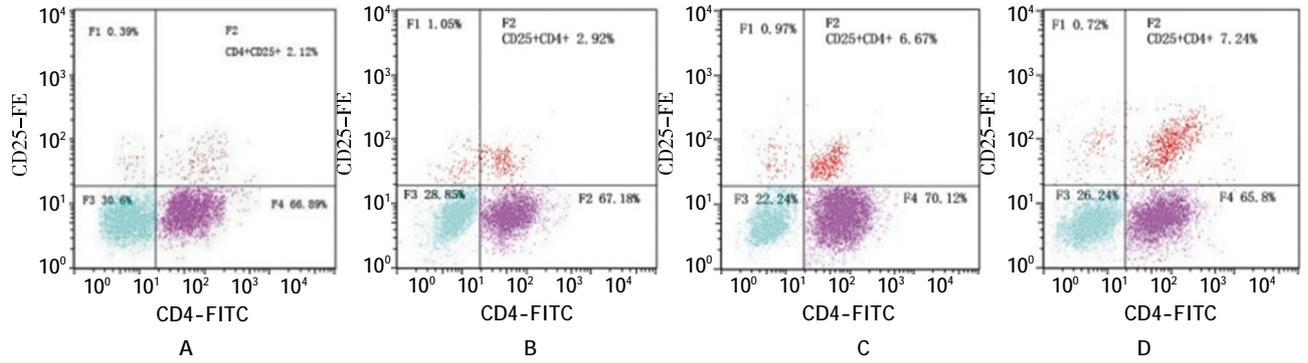
组别	1 d	4 d	7 d	10 d	F 值	P 值
雷帕霉素干预组	2.14 ± 0.27	2.47 ± 0.39 ¹⁾	3.85 ± 0.36 ¹⁾²⁾	5.35 ± 0.44 ¹⁾²⁾³⁾	10.384	0.002
imDC 干预组	2.44 ± 0.22	3.17 ± 0.35 ¹⁾⁴⁾	4.65 ± 0.41 ¹⁾²⁾⁴⁾	7.15 ± 0.84 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	15.482	0.000
smDC 干预组	3.16 ± 0.31 ¹⁾⁴⁾⁵⁾	4.19 ± 0.43 ¹⁾⁴⁾⁵⁾	6.39 ± 0.72 ¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾	10.22 ± 1.25 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	22.129	0.000
F 值	6.897	8.382	11.384	13.922		
P 值	0.009	0.004	0.002	0.001		

注:1)与组内 1 d 比较, P<0.05;2)与组内 4 d 比较, P<0.05;3)与组内 7 d 比较, P<0.05;4)与雷帕霉素组比较, P<0.05;5)与 imDC 干预组比较, P<0.05



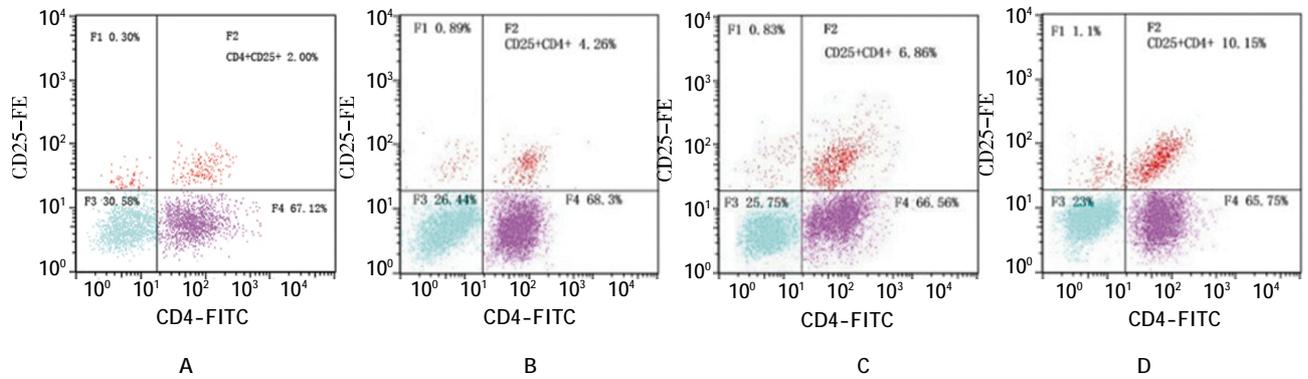
A: 术后第 1 天;B: 术后第 4 天;C: 术后第 7 天;D: 术后第 10 天

图 1 雷帕霉素干预组流式细胞图



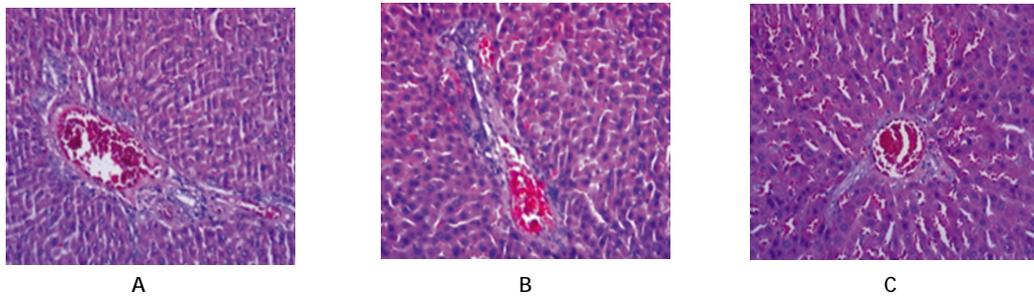
A: 术后第 1 天;B: 术后第 4 天;C: 术后第 7 天;D: 术后第 10 天

图 2 imDC 干预组流式细胞图



A: 术后第 1 天;B: 术后第 4 天;C: 术后第 7 天;D: 术后第 10 天

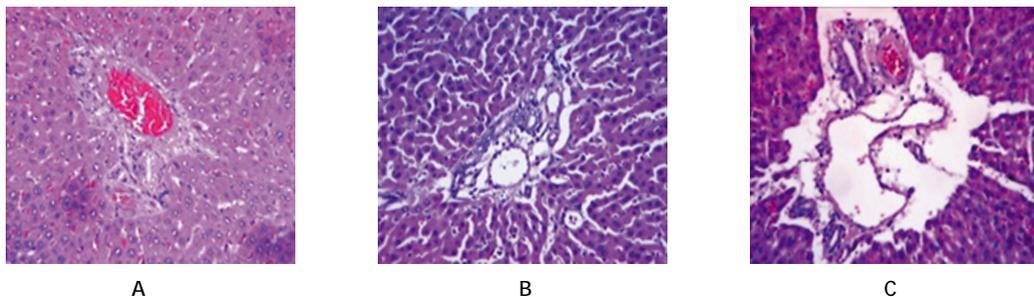
图 3 smDC 干预组流式细胞图



A: 雷帕霉素干预组;B: imDC 干预组;C: smDC 干预组

A: 雷帕霉素干预组;B: imDC 干预组;C: smDC 干预组

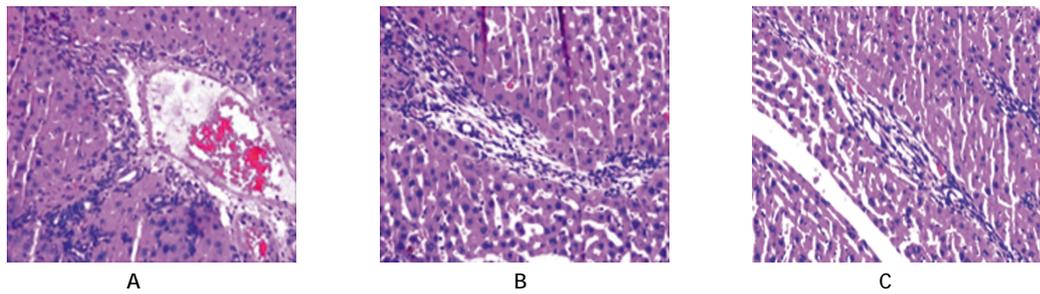
图 4 移植术后第 1 天的病理改变



A: 雷帕霉素干预组;B: imDC 干预组;C: smDC 干预组

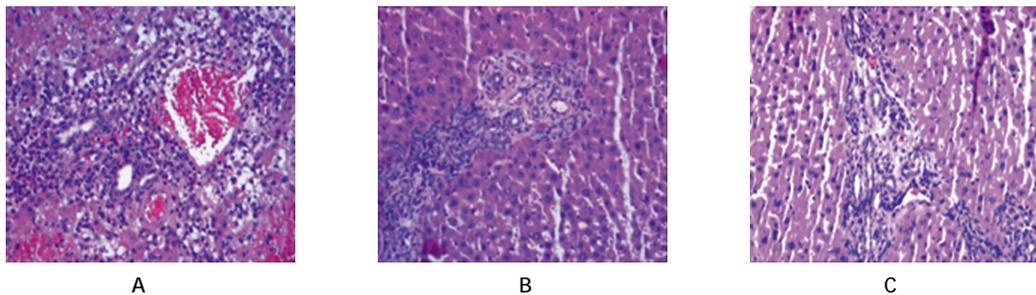
A: 雷帕霉素干预组;B: imDC 干预组;C: smDC 干预组

图 5 移植术后第 4 天的病理改变



A:雷帕霉素干预组;B:imDC 干预组;C:smDC 干预组

图 6 移植术后第 7 天的病理改变



A:雷帕霉素干预组;B:imDC 干预组;C:smDC 干预组

图 7 移植术后第 10 天的病理改变

3 讨论

肝移植是临床上治疗终末期肝病唯一有效的手段,但是受到术后免疫排斥反应以及长期应用免疫抑制剂等因素的影响,移植术后的生存时间有限、整体疗效并不令人满意^[9]。如何抑制肝移植术后的免疫排斥反应、维持机体对移植物的免疫耐受是临床研究的热点。DC 是体内重要的抗原递呈细胞,根据其发育状态的不同分为 imDC 和成熟树突状细胞 (mature dendritic cells, mDC)。处于不同发育状态的 DCs, 在体内执行的免疫功能是不一样的,imDC 诱导免疫耐受,而 mDC 激活免疫排斥反应^[4]。XIN 等^[9]的研究证实,imDC 能够诱导受体对移植物的免疫耐受。

近些年的研究证实存在一种中间发育状态的 DC、即 smDC^[2,6-9],该细胞不分泌 IL-12、IL-6 和 IL-1 β 等促炎因子,却分泌抑制性因子 IL-10,同时可以诱导 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞活化,从而诱导效应 T 细胞低反应以及移植免疫耐受。

CD4⁺CD25⁺Treg 对于免疫耐受的维持具有重要价值^[10]。Treg 细胞本身能够竞争性结合抗原递呈细胞表面的 B7 分子并阻断细胞毒 T 细胞的活化,由其分泌产生的 IL-10、IL-35 也具有抑制免疫排斥反应的作用^[11]。对 3 组大鼠肝移植术后外周血中 Treg

细胞含量的分析证实:smDC 组和 imDC 组大鼠移植术后的外周血 Treg 细胞含量升高,且 smDC 组大鼠外周血 Treg 细胞含量升高更为显著。这就说明 smDC 和 imDC 均能够抑制肝移植术后的免疫排斥反应且 smDC 抑制免疫排斥反应的效应优于 imDC。

在 HE 染色的肝脏组织切片上,随着移植时间的延长,移植肝脏急性排斥反应进展,但与雷帕霉素干预组比较,急性排斥的病理变化减轻,尤其在术后 7 d 停药后,DC 干预组急性排斥的病理变化比雷帕霉素组减轻,说明术前输注 DC 有诱导排斥低反应的作用。

在前期的实验中,笔者尝试过在移植术前 7 和 1 天输注 DC,若不加用雷帕霉素,并不能延长不同品系受体大鼠的生存时间。而在使用雷帕霉素的基础上,术前输注 imDC 和 smDC,受体大鼠的生存期较单用雷帕霉素长,其中 smDC 干预组存活时间最长。说明大鼠肝移植术前予 imDC、smDC 预干预,可延长受体大鼠的术后生存时间。本实验中,受体大鼠在行肝脏移植术前输注供体大鼠不同成熟状态 DC,移植物的存活期较未经干预组延长。但停用雷帕霉素后所有受体均未能达到长期存活,不能得出已诱导免疫耐受的结论,只能得出诱导排斥低反应的结论。

本研究的结论为:仅术前输注一次 DC,伴随 DC 的凋亡或死亡,其作用效果减弱甚至消失。若需诱导免疫耐受,尚需进一步的研究。

参 考 文 献:

- [1] OLDHAFFER F, BOCK M, FALK C S, et al. Immunological aspects of liver cell transplantation[J]. *World J Transplant*, 2016, 6 (1):42-53.
- [2] LUTZ M B, SCHULER G. Immature, semimature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity [J]. *Trends Immunol*, 2002, 23(9): 445-449.
- [3] GARCÍA DE LA G R, SAROBE P, MERINO J, et al. Immune monitoring of immunosuppression withdrawal of liver transplant recipients[J]. *Transpl Immunol*, 2015, 33(2): 110-116.
- [4] CHUNG C Y, YSEBAERT D, BERNEMAN Z N, et al. Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013: 972865.
- [5] XIN H, YANG W, WANG Q, et al. Immune tolerance of skin allograft transplantation induced by immature dendritic cells of a third party carrying donor antigens in mice [J]. *Transplant Proc*, 2013, 45(2): 552-557.
- [6] REGAZZI M B, ALESSIANI M, RINALDI M. New strategies in immunosuppression [J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(6): 2675-2678.
- [7] FU B M, HE X S, YU S, et al. Tolerogenic semimature dendritic cells induce effector T-cell hyporesponsiveness by activation of antigen-specific CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells that promotes skin allograft survival in mice [J]. *Cellular Immunology*, 2010, 261: 69-76.
- [8] FU B M, HE X S, YU S, et al. Tolerogenic semimature dendritic cells induce effector T-cell hyporesponsiveness by the activation of antigen-specific CD4⁺CD25⁺ T-regulatory cells [J]. *Exp Clin Transplant*, 2009, 7(3): 1-6.
- [9] VERGINIS P, LI H S, CARAYANNIOTIS G. Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of thyroglobulin-specific CD4⁺CD25⁺ T cells [J]. *Immunol*, 2005, 174(11): 7433-7439.
- [10] SAFINIA N, VAIKUNTHANATHAN T, FRASER H, et al. Successful expansion of functional and stable regulatory T cells for immunotherapy in liver transplantation [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(7): 7563-7577.
- [11] 徐匹夫, 余后火. 重组人血管内皮抑素介入栓塞治疗对肝癌恶性生物学行为的影响 [J]. *海南医学院学报*, 2015, 21(6): 791-793.

(张蕾 编辑)