

骨髓来源未成熟树突状细胞干预大鼠原位肝移植的排斥反应

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3509>李立强¹, 焦龙杏¹, 张武², 闫文涛¹, 李健³, 李明皓⁴

2095-4344.3509

投稿日期: 2020-06-15

送审日期: 2020-06-19

采用日期: 2020-07-11

在线日期: 2020-10-20

中图分类号:

R459.9; R392-3; R617

文章编号:

2095-4344(2021)13-02025-05

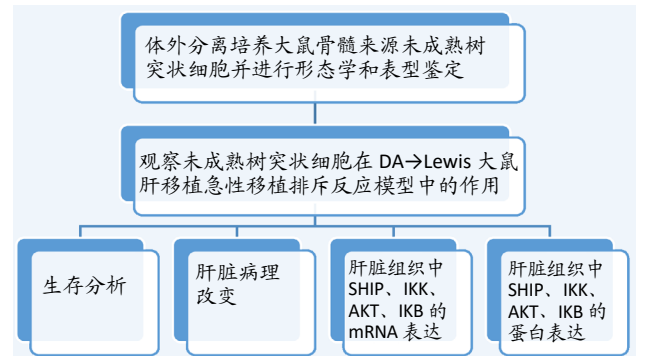
文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点一

△人体内大部分树突状细胞处于非成熟状态, 表达低水平的共刺激因子和黏附因子, 体外激发同种混合淋巴细胞增殖反应的能力较低, 同时未成熟树突状细胞具有极强的抗原吞噬能力;

△未成熟树突状细胞可以降低大鼠原位肝移植的重急性排斥反应, 延缓肝脏的存活时间, 降低同种异体肝脏移植的T细胞免疫应答能力。



文题释义:

树突状细胞: 已知机体内功能最强的抗原提呈细胞, 能诱导免疫应答的产生, 同时在诱导免疫耐受和参与免疫应答的调节中也起着重要生物学作用, 目前认为不同发育阶段有着不同的细胞表型, 并与其功能密切相关, 未成熟状态几乎不表达CD40、CD80/CD86、MHC-II等协同刺激分子和黏附分子, 不能使初始细胞活化、增殖产生免疫应答, 从而诱导免疫低反应或抗原免疫特异性耐受。

肝移植: 是治疗终末期肝病的有效方法, 肝脏是移植“免疫特惠”器官, 移植后排斥反应虽然没有其他器官如心、肺、胰和肾等严重, 但移植肝的排斥问题, 仍然是目前有待解决的一大难题。未成熟树突状细胞诱导免疫耐受或免疫低反应被普遍认为是一种有效的方法。

摘要

背景: 未成熟树突状细胞具有很强的抗原摄取加工能力, 但由于缺乏多种共刺激分子不能使初始T细胞活化、增殖产生免疫应答, 可导致T细胞无能, 从而诱导免疫低反应或抗原免疫特异性耐受, 同时未成熟树突状细胞可诱导同种异体抗原特异性T细胞的低反应性, 从而延长移植器官的存活时间。

目的: 探讨未成熟树突状细胞对大鼠原位肝移植术后肝脏排斥反应的影响及相关机制。

方法: 根据DA和Lewis大鼠体重成对随机分配成3组, 均利用“二袖套”方法建立DA→Lewis大鼠肝移植模型。对照组不给予任何处理; 环孢素组术后第2天开始给予10 mg/kg环孢素A, 1次/d, 共7 d; 未成熟树突状细胞组术前1 d经阴茎背静脉注射DA大鼠骨髓来源未成熟树突状细胞(1×10^6 /只), 连续注射2次, 间隔10 min。术后7 d取大鼠肝脏, 苏木精-伊红染色观察病理改变, qRT-PCR和Western blot检测SHIP、AKT、IKK、IKB mRNA以及蛋白的表达。

结果与结论: ①与对照组相比较, 环孢素组和未成熟树突状细胞组生存时间较长, 差异有显著性意义($P < 0.05$); ②环孢素组和未成熟树突状细胞组大鼠肝组织汇管区单核细胞和淋巴细胞浸润较少, 肝小叶结构未被明显破坏, 肝动脉、门静脉和胆管的炎症细胞明显少于对照组, 未达到重急性排斥反应水平; ③与对照组比较, 环孢素组和未成熟树突状细胞组IKB mRNA表达升高, SHIP、AKT、IKK mRNA表达下降, 差异均有显著性意义($P < 0.05$); ④与对照组比较, 未成熟树突状细胞组SHIP、IKB蛋白表达升高, IKK、AKT蛋白表达下降, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 与对照组比较, 环孢素组SHIP、IKK蛋白表达下降, AKT、IKB蛋白表达升高, 差异有显著性意义($P < 0.05$); ⑤结果表明, 未成熟树突状细胞有减缓急性排斥反应的功能, 延迟肝脏成活时间, 降低同种异体肝脏移植的T细胞免疫应答能力。

关键词: 肝移植; 免疫排斥; 未成熟树突状细胞; 排斥反应; T细胞; 免疫应答; 大鼠

Effect of immature dendritic cells derived from bone marrow on rejection of orthotopic liver transplantation in rats

Li Liqiang¹, Jiao Longxing¹, Zhang Wu², Yan Wentao¹, Li Jian³, Li Minghao⁴

¹Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ²Wuzhong People's Hospital, Wuzhong 751100, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ³Hefei Changrong Hospital, Hefei 230001, Anhui Province, China; ⁴Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750002, Ningxia Hui Autonomous Region, China

¹宁夏医科大学, 宁夏回族自治区银川市 750004; ²吴忠市人民医院, 宁夏回族自治区吴忠市 751100; ³合肥长荣医院, 安徽省合肥市 230001; ⁴宁夏回族自治区人民医院肝胆外科, 宁夏回族自治区银川市 750002

第一作者: 李立强, 男, 1992年生, 安徽省定远县人, 汉族, 宁夏医科大学在读硕士, 医师, 主要从事肝移植免疫耐受方向研究。

通讯作者: 李明皓, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 宁夏回族自治区人民医院肝胆外科, 宁夏回族自治区银川市 750002

<https://orcid.org/0000-0001-8856-1387> (李立强)

基金资助: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (81560114), 项目负责人: 李明皓; 宁夏重点研发项目 (2019BEG03039), 项目负责人: 李明皓

引用本文: 李立强, 焦龙杏, 张武, 闫文涛, 李健, 李明皓. 骨髓来源未成熟树突状细胞干预大鼠原位肝移植的排斥反应 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(13):2025-2029.



Li Liqiang, Master candidate, Physician, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Corresponding author: Li Minghao, MD, Chief physician, Professor, Master's supervisor, Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750002, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Immature dendritic cells have strong antigen uptake and processing ability, but the lack of a variety of costimulatory molecules cannot activate and proliferate initial T cells to produce immune response, which can lead to T cell anergy, thus inducing low immune response or antigen immune specific tolerance. Simultaneously, immature dendritic cells can induce hyporeactivity of allogeneic antigen-specific T cells, thus prolonging the survival time of transplanted organs.

OBJECTIVE: To investigate the effect of immature dendritic cells on liver rejection after orthotopic liver transplantation in rats and its mechanism.

METHODS: According to the weight of DA and Lewis rats, the rats were randomly divided into three groups, and the liver transplantation model of DA-Lewis rats was established by "two-cuff" method. The rats of control group received no measures. The rats of cyclosporine group were treated with 10 mg/kg cyclosporine from the second day after operation, once a day, for 7 days. The rats of the immature dendritic cell group were injected with 1×10^6 immature dendritic cells from bone marrow of DA rats one day before operation through dorsal penile vein; the injection was repeated twice with an interval of 10 minutes. The livers of all these rats were removed 7 days after operation. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes. The mRNA and protein expressions of SHIP, AKT, IKK and $IK\beta$ in these three groups were detected by qRT-PCR and western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the control group, the survival time of cyclosporine group and immature dendritic cell group was significantly longer ($P < 0.05$). (2) In cyclosporine group and immature dendritic cell group, the number of infiltrating mononuclear cells and lymphocytes in the portal area of liver tissue was less, the structure of hepatic lobule was not significantly damaged, and the inflammatory cells in hepatic artery, portal vein and bile duct were significantly less than those in control group, which did not reach the level of severe acute rejection. (3) Compared with the control group, the mRNA expression of $IK\beta$ in the cyclosporine group and immature dendritic cell group was increased, while the mRNA expression of SHIP, AKT and IKK significantly decreased ($P < 0.05$). (4) Compared with the control group, the expression of SHIP and $IK\beta$ protein significantly increased, IKK and AKT protein significantly decreased in the immature dendritic cell group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of SHIP and IKK protein significantly decreased, AKT and $IK\beta$ protein expression significantly increased in the cyclosporine group ($P < 0.05$). (5) Results confirm that immature dendritic cells can slow down the severe acute rejection, delay the survival time of liver and reduce the T cell immune response ability of allogeneic liver transplantation.

Key words: liver transplantation; immune rejection; immature dendritic cells; rejection; T cell; immune response; rat

Funding: the Regional Science Fund Project of National Natural Science Foundation of China, No. 81560114 (to LMH); the Key Research & Development Project in Ningxia, No. 2019BEG03039 (to LMH)

How to cite this article: LI LQ, JIAO LX, ZHANG W, YAN WT, LI J, LI MH. Effect of immature dendritic cells derived from bone marrow on rejection of orthotopic liver transplantation in rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(13):2025-2029.

0 引言 Introduction

原发性肝癌是临床上比较常见的恶性肿瘤，其病死率居高不下^[1]。目前针对原发性肝癌最常见的治疗方法是部分肝切除或者全部肝切除甚至可以进行换肝治疗^[2-3]。肝切除患者的5年生存率较低，换肝治疗患者的生存满意度较高^[4]，但是换肝后需要使用免疫抑制剂，长期大量使用免疫抑制剂存在机会性感染以及恶性肿瘤发生率增加的风险。诱导受者对移植体形成免疫耐受是解决移植排斥反应的关键，也是移植免疫学领域的研究热点^[5]。因此，学者们一直都在寻找一种有效的方法，使移植器官能在不应用免疫抑制剂的情况下长期、有功能的存活。器官移植细胞免疫的基础是受者T细胞对供者抗原的免疫识别、活化和增殖。抗原的识别需要抗原提呈细胞的参与，其中树突状细胞是目前已知抗原提呈功能最强的细胞，它在固有免疫及特有免疫方面具有重要的作用。研究证实树突状细胞具有激活Treg细胞的作用^[6-10]。事实上在Treg细胞之前，树突状细胞就因为其在肝移植中被发现具有诱导耐受作用而被引入移植耐受研究中^[11-12]。研究认为供肝大量存在的树突状细胞在移植后迁移入受者体内诱导了免疫耐受。树突状细胞分为成熟树突状细胞和未成熟树突状细胞，其中成熟树突状细胞表面高表达主要组织相容性复合物以及CD40、CD80等共刺激分子，进而激活T淋巴细胞，诱导免疫应答^[13-14]；未成熟树突状细胞具有很强的抗原摄取加工能力，但由于缺乏多种共刺激分子不能使初始T细胞活化、增殖产生免疫应答，不能激活T细胞的第二信号，可导致T细胞无能，从而诱导免疫低反应或抗原免疫特异性耐受^[14]。已有证据表明，小鼠骨髓来源树突状细胞可以降低共刺激分子的表达，进而减弱抗原提呈能力^[15]。抗原呈递细胞表面共刺激分子与T细胞表面的有关受体相结合，使T细胞活化，其中CD80/CD86是最重要、研究较多的一条共刺激通路。该实验通过探讨供体骨髓源性未成熟树突状细胞对大鼠

原位肝移植术后排斥反应的影响，从而寻找一种可以诱导肝移植受者对供肝产生免疫耐受的方法。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学与动物模型实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年3月至2020年1月在宁夏医科大学基础医学院厚生楼实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级雄性DA大鼠和Lewis大鼠各40只，8-10周龄，体质量250-300g，均购买于南京卡文斯生物技术有限公司。

1.3.2 实验试剂 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)试剂(TaKaRa公司)；SHIP、AKT、IKK、 $IK\beta$ 等抗体(美国Abcam公司)；重组大鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、重组大鼠白细胞介素4(PEPROTECH公司)；RPMI1640培养液、PBS、胎牛血清(Biological Industries公司)；红细胞裂解液(天津市灏洋生物技术有限公司)；PE标记的抗大鼠CD80抗体(CD80-PE)、PE标记的抗大鼠CD86抗体(CD86-PE)、PE标记的抗大鼠CD40抗体(CD40-PE)、抗大鼠MHC II抗体(MHC II-APC)(美国Becton Dickinson公司)；提取RNA和蛋白的试剂盒(美国Omega公司)；免疫磁珠OX-62抗体、MiniMACS分离器、MS柱(德国Miltenyi Biotec有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 DA大鼠骨髓来源未成熟树突状细胞的培养 取1只DA大鼠，腹腔注射1.0 mL 10%水合氯醛致死，用体积分数为75%乙醇浸泡约10 min，取出双侧股骨，在超净台中用无菌剪刀剪断两端骨髓，显露骨髓腔，用5 mL注射器吸取适量PBS反复冲洗骨髓腔，直至骨髓腔发白。收集冲洗下来的骨髓细胞冲洗液，1 000×g离心15 min，弃上清，用RPMI1640培养液重悬细胞并调整细胞数为 2×10^6 ，接种于6孔板中，加

入 20 $\mu\text{g/L}$ 重组大鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、10 $\mu\text{g/L}$ 重组大鼠白细胞介素 4, 隔日半量换液, 适时补充细胞因子, 至第 7 天收集悬浮细胞, 离心重悬后加入免疫磁珠 OX-62 并特异性结合大鼠未成熟树突状细胞表面特异性分子 OX-62, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 将 MS 柱放入磁珠分选器中, 磁珠 buffer 湿润柱子后, 细胞悬液通过分选柱, 收集 OX-62 阳性细胞即为未成熟树突状细胞, 倒置显微镜观察细胞形态以及流式细胞术鉴定。

1.4.2 动物分组及造模 DA 大鼠和 Lewis 大鼠根据体质量成对随机分为 3 组, 每组 20 只, 供体是 DA 大鼠, 受体是 Lewis 大鼠。对照组术前未做任何处理, 术后向腹腔内喷洒含 0.1 g 氨苄青霉素乳酸林格氏液约 1 mL, 以及从阴茎背静脉注入生理盐水和碳酸氢钠液共 1 mL 进行补液, 以补充血容量; 环孢素组术后第 2 天开始注射环孢素 A, 每只 10 mg/kg, 1 次/d, 连续注射 1 周; 未成熟树突状细胞组术前 1 d 经阴茎背静脉注射从 DA 大鼠骨髓中分离出的未成熟树突状细胞悬液 500 μL (PBS 重悬, 含 1×10^6 细胞)^[16-17], 连续注射 2 次, 间隔 10 min, 共 1 mL, 注射时间约 30 min。

采用经过改良的 Kamada “二袖套管” 方法建立稳定的 DA \rightarrow Lewis 大鼠原位肝移植急性排斥反应模型^[18]。以术后大鼠存活 72 h 为大鼠建模成功标准, 72 h 内死亡的大鼠给予及时补充, 每组留取 5 只移植大鼠观察其生存时间。

1.4.3 肝组织病理检测 移植后 7 d, 取 3 组 Lewis 大鼠肝组织进行苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察肝脏组织病理变化。根据 Banff 系统评估急性免疫排斥病理改变, 其中排斥活动指数是根据汇管区、胆管和静脉内皮炎症损伤的轻、中、重度来评分, 总分为 9 分, 0-2 分为无排斥, 3 分为交界性改变, 4-5 分为轻度排斥, 6-7 分为中度排斥, 8-9 分为重度排斥。

1.4.4 Western blot 检测 SHIP、AKT、IKK、IK β 的蛋白表达 提取各组肝组织蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min 使蛋白变性。取变性后的蛋白 40 μg 加入上样孔中, 80 V 电压电泳 2 h, 直至溴酚蓝跑至底部停止电泳, 然后 250 mA 恒压电流转膜至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h, PBST 清洗 3 次 $\times 10$ min, 再加入 1 : 1 000 稀释的 SHIP、AKT、IKK、IK β 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBST 清洗 3 次 $\times 10$ min, 加入 1 : 5 000 稀释的二抗, 室温孵育 90 min, PBST 清洗 3 次 $\times 10$ min, 加入 ECL 发光液进行曝光, 使用凝胶成像系统分析灰度值。

1.4.5 qRT-PCR 检测 SHIP、AKT、IKK、IK β 的 mRNA 表达 采用 Trizol 方法从肝组织中提取 SHIP、AKT、IKK、IK β 全 RNA, 反转录后通过 qRT-PCR 技术检测 SHIP、AKT、IKK、IK β 的 mRNA 表达水平, 以 β -actin 为内参。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 循环 40 次。每个样本设 3 个复孔, 根据各组 Ct 值计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值。引物由上海生工代为设计以及合成。引物序列见表 1。

1.5 主要观察指标 ①各组大鼠术后的精神状态、饮食情况等; ②移植后 7 d 进行肝脏苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察肝脏组织病理变化; ③ Western blot 和 qRT-PCR 检测 SHIP、AKT、IKK、IK β 的蛋白和 mRNA 表达。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 计量资

表 1 | SHIP、AKT、IKK、IK β 的引物

Table 1 | Primers for SHIP, AKT, IKK and IK β

基因	上游引物	下游引物
SHIP	5'-ATG AAG AAC AAG CAC TCG GAG CAG-3'	5'-TCA GCA GAG TCG TCC CGT GTC-3'
AKT	5'-CCA CGA CCG CCT CTG CTT TG-3'	5'-GAC ACA ATC TCC GCA CCG TAG AAG-3'
IKK	5'-CGG TGG CAC AAT CAG GTG ACA G-3'	5'-CGT TGG GAT GGT TCA GCC TTC TC-3'
IK β	5'-AGG ACG AGG ATT ACG AGC AGA TGG-3'	5'-GCC AAG TGC AGG AAC GAG TCT C-3'

料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。生存分析用乘积极限法 (Kaplan-Meier 法) 制作生存曲线。

2 结果 Results

2.1 大鼠骨髓来源树突状细胞的培养和鉴定 大鼠骨髓来源树突状细胞经培养 4 h 后, 大部分细胞都已经贴壁, 经隔天半量换液后, 悬浮细胞数逐渐增多, 细胞出现突起; 第 7 天时收集悬浮细胞进行 OX-62 免疫磁珠分选阳性未成熟树突状细胞, 倒置光学显微镜下观察细胞有数个短小的突起, 见图 1。

2.2 流式细胞术鉴定未成熟树突状细胞表型 流式细胞术鉴定未成熟树突状细胞表面 CD40、CD80、CD86、MHC-II 类分子等共刺激分子表达较低, 分别为 21%, 14.8%, 23.6%, 24.5%, 符合未成熟树突状细胞的表型表达, 见图 2。

2.3 各组大鼠生存时间 对照组 5 只大鼠生存时间分别为 7, 10, 10, 12, 12 d, 建模成功率为 60%; 环孢素组 5 只大鼠生存时间为 33, 45, 60, 83, 98 d, 建模成功率为 75%; 未成熟树突状细胞组 5 只大鼠存活时间为 30, 36, 58, 65, 82 d, 建模成功率为 70%。根据生存时间绘制生存曲线, 见图 3, 与对照组相比较, 环孢素组和未成熟树突状细胞组生存时间较长, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

移植后大鼠皮毛蓬松和晦暗、眼神呆滞、饮食差以及对外界的刺激反应不灵敏。移植后数天, 生存下来的大鼠毛色恢复如初, 眼睛对外界刺激敏感, 活动好。

2.4 肝移植后肝脏的病理变化 光镜下观察各组病理切片, 见图 4。对照组肝组织显示重急性排斥反应, 大量的淋巴细胞聚集于汇管区, 难以看见明显的肝小叶结构, 可见明显的出血、坏死。环孢素组汇管区出现为数不多的单核细胞浸润, 但未侵及肝实质, 未累及血管和胆管, 肝动脉、门静脉和胆管炎细胞浸润未达到急性排斥的诊断标准。未成熟树突状细胞组的汇管区三体 (肝动脉、门静脉和胆管) 炎性单核细胞较少, 也未侵及肝实质, 同样也未达到重急性排斥标准。

2.5 各组肝组织 SHIP、AKT、IKK、IK β mRNA 和蛋白的表达 见图 5, 6。与对照组比较, 环孢素组和未成熟树突状细胞组 IK β 的 mRNA 表达升高, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 环孢素组、未成熟树突状细胞组 SHIP、AKT、IKK 的 mRNA 表达下降, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。环孢素组 SHIP、IKK、IK β mRNA 表达低于未成熟树突状细胞组, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 环孢素组 AKT mRNA 表达高于未成熟树突状细胞组, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

与对照组比较, 未成熟树突状细胞组 SHIP、IK β 蛋白表达升高, IKK、AKT 蛋白表达下降, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 环孢素组 SHIP、IKK 蛋白表达下降, AKT、

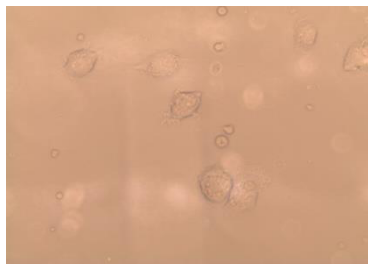


图1 | 倒置荧光显微镜下未成熟树突状细胞形态(×400)
Figure 1 | Morphology of immature dendritic cells under inverted fluorescence microscope (×400)

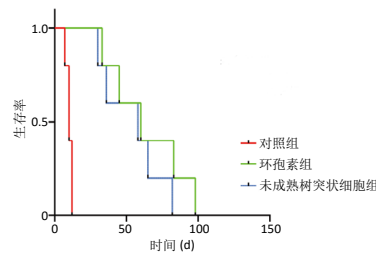
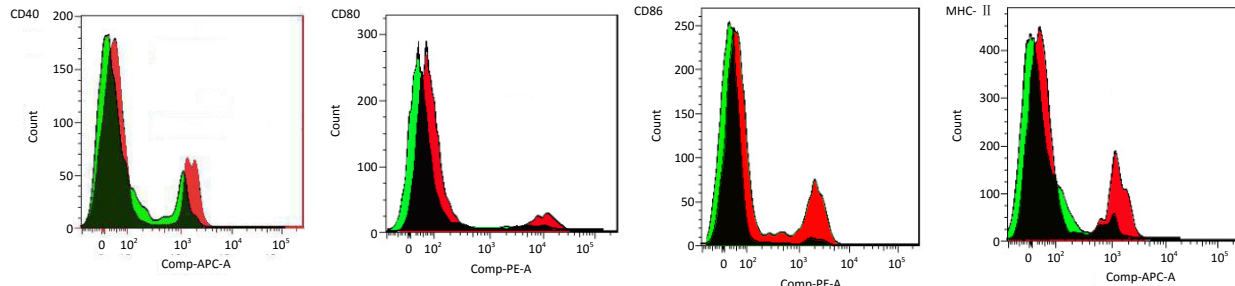


图3 | 各组大鼠生存曲线(Kaplan-Meier法)
Figure 3 | Survival curve of rats in each group (Kaplan-Meier method)



图注: 未成熟树突状细胞表面 CD40、CD80、CD86、MHC- II 类分子等共刺激分子表达较低

图2 | 流式细胞术鉴定未成熟树突状细胞表型

Figure 2 | Flow cytometry of phenotype in immature dendritic cells

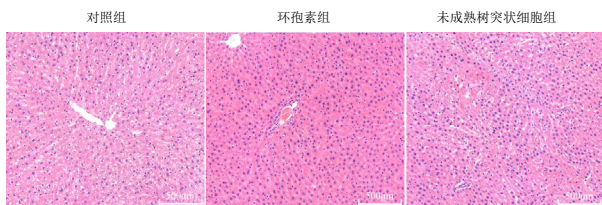
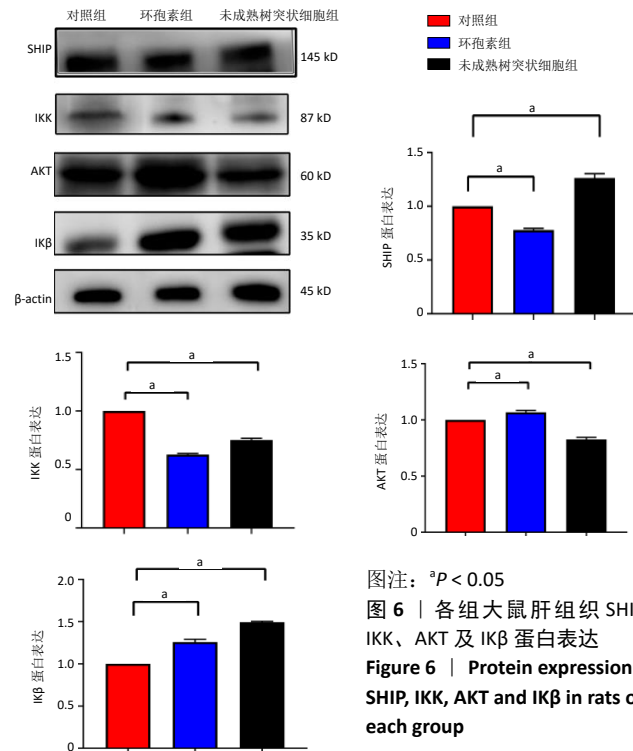
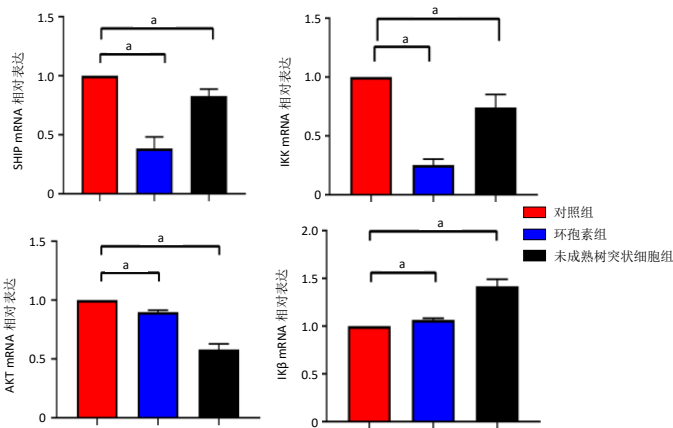


图4 | 各组大鼠肝移植后7d病理形态(苏木精-伊红染色, ×200)
Figure 4 | Pathological morphology of the rats in each group at 7 days after liver transplantation (hematoxylin-eosin staining, ×200)



图注: ^a*P* < 0.05

图6 | 各组大鼠肝组织 SHIP、IKK、AKT 及 IKβ 蛋白表达
Figure 6 | Protein expression of SHIP, IKK, AKT and IKβ in rats of each group



图注: ^a*P* < 0.05

图5 | 各组大鼠肝组织 SHIP、AKT、IKK 及 IKβ 的 mRNA 表达

Figure 5 | mRNA expression of SHIP, AKT, IKK and IKβ in rats of each group

IKβ 蛋白表达升高, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。环孢素组 SHIP、IKK、IKβ 蛋白表达低于未成熟树突状细胞组, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 环孢素组 AKT 蛋白表达高于成熟树突状细胞组, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论 Discussion

肝脏一直被认为是免疫特惠器官, 相比心、肺、肾移植, 肝移植后的急性排斥反应较小, 但肝移植术后严重的排斥反应目前仍然需要解决^[19-20]。在排斥反应发生过程中, 首先是树突状细胞在同种异体移植物的免疫应答过程中提呈抗原,

进而激活受体的 T 细胞, 然后是受体的免疫系统 (主要是 T 细胞) 对同种植物的识别和活化, 由 T 细胞介导的同种异体移植物的免疫应答通过多种机制直接或者间接激活受体的免疫系统, 从而导致炎症的发生、发展, 进而使外来的移植物被排斥^[21]。目前大多数研究通过影响直接和间接识别过程来达到低反应免疫性甚至是免疫耐受。未成熟树突状细胞低表达 MHC 分子、缺乏共刺激分子 CD40 以及其他分子表达, 进而干扰了间接识别途径, 使其不能激活 T 细胞^[19, 22-24]。T 细胞的识别能力受主要组织相容性复合体 (MHC) 的类型限制, 只能识别与其对应的供者 MHC (直接识别) 或受者 MHC (间接识别)^[19, 22-24]。供者 MHC 限制性 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞足以对同种异体移植物产生排斥反应, 它们是经 T 细胞受

体 (TCR) 介导直接 (“同源”) 相互作用从而产生一系列效应分子来完成的^[25]。相反, “非同源”受者 MHC 限制性 CD4⁺ T 细胞必须与中介的受者 APC 相互作用^[26-27]。目前大部分研究都是使用供体来源的未成熟树突状细胞通过直接识别途径诱导肝移植免疫耐受甚至是免疫低下。由于供者来源未成熟树突状细胞低表达 MHC 分子、缺乏共刺激分子的表达, 干扰了直接识别途径, 故不能激活 T 细胞^[28]。受体来源未成熟树突状细胞是通过间接识别途径诱导肝移植免疫低反应性, 但是间接识别后的 CD4⁺ T 细胞可调控 B 细胞并激活巨噬细胞, 进而增强移植排斥反应^[29]。OH 等^[30]也已经证实了经过白细胞介素 10 处理过的树突状细胞能通过诱导外周免疫耐受来延长移植物的生存时间。TAKAYAMA 等^[31]采用反转录病毒转导小鼠树突状细胞产生白细胞介素 10, 诱导树突状细胞表面协同刺激分子和黏附分子下调, 输入供体的未成熟树突状细胞, 明显削弱受体刺激活性, 并诱导 T 细胞的低反应性^[32]。

前期体外实验显示, 未成熟树突状细胞只能轻度刺激同种异型 T 细胞增殖, 未成熟树突状细胞可以在体外降低 T 细胞的免疫耐受作用。该实验术前给予供体骨髓来源未成熟树突状细胞, 其发挥的肝脏保护作用非常接近环孢素组; 苏木精-伊红染色显示未成熟树突状细胞组能够减缓肝脏的重急性排斥反应; qRT-PCR 和 Western blot 也证实了未成熟树突状细胞组可以抑制重急性排斥反应。

综上所述, 大鼠骨髓来源未成熟树突状细胞对于大鼠原位肝移植术后生存时间以及肝脏病理排斥反应均有明显的改善作用, 但是所有移植大鼠并不能长期存活, 说明在体内微环境的作用下, 有可能使未成熟树突状细胞逐渐成熟, 使已经形成的免疫低反应性进一步减弱。未成熟树突状细胞通过吞噬作用的内吞途径连续吞噬组织和抗原, 从而导致树突状细胞活化。激活的树突状细胞通过下调内吞作用和上调表面蛋白来控制其向淋巴组织迁移, 从而经历成熟过程, 进而树突状细胞介导的抗原呈递可启动适应性免疫反应^[33]。因此, 这种方法如何长期维持免疫低反应性以及诱导抗原特异性免疫耐受需进一步探索。未成熟树突状细胞在诱导肝移植免疫耐受方面起着重要作用, 但是由于其诱导特异性免疫耐受仅仅在大鼠模型中获得成功, 在灵长类等大型动物实验模型中诱导免疫耐受仍有巨大挑战。

致谢: 感谢宁夏医科大学基础医学院提供的实验设备。

作者贡献: 实验设计为李明皓, 实验实施为李立强、焦龙杏, 实验评估为张武、闫文涛, 资料收集为李健。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金地区科学基金项目(81560114)”“宁夏重点研发项目(2019BEG03039)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经宁夏医科大学第三临床医学院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 2020-WZ-008。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过宁夏医科大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- SATRIANO L, LEWINSKA M, RODRIGUES PM, et al. Metabolic rearrangements in primary liver cancers: cause and consequences. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(12):748-766.
- CAI XJ, ZHENG Q, JIANG GY. Current status and prospect of surgical treatment of liver cancer. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2019;57(7):494-499.
- RAWAL N, YAZIGI N. Pediatric Liver Transplantation. *Pediatr Clin North Am*. 2017; 64(3):677-684.
- CHAO JS, ZHAO SL, OU-YANG SW, et al. Post-transplant infection improves outcome of hepatocellular carcinoma patients after orthotopic liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2019;25(37):5630-5640.
- PAGE EK, DAR WA, KNECHTLE SJ. Tolerogenic therapies in transplantation. *Front Immunol*. 2012;3:198.
- JONULEIT H, SCHMITT E, STEINBRINK K, et al. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol*. 2001;22(7):394-400.
- YAMAZAKI S, IYODA T, TARBELL K, et al. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med*. 2003; 198(2):235-247.
- LANGHANS B, NISCHALKE HD, KRÄMER B, et al. Increased peripheral CD4+ regulatory T cells persist after successful direct-acting antiviral treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2017;66(5):888-896.
- EZZELARAB M, THOMSON AW. Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. *Semin Immunol*. 2011;23(4):252-263.
- LEI H, REINKE P, VOLK HD, et al. Mechanisms of Immune Tolerance in Liver Transplantation-Crosstalk Between Alloreactive T Cells and Liver Cells With Therapeutic Prospects. *Front Immunol*. 2019;10:2667.
- ONO Y, PEREZ-GUTIERREZ A, NAKAO T, et al. Graft-infiltrating PD-L1hi cross-dressed dendritic cells regulate antidonor T cell responses in mouse liver transplant tolerance. *Hepatology*. 2018;67(4):1499-1515.
- THOMSON AW, LU L. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunol Today*. 1999;20(1):27-32.
- THÉRY C, AMIGORENA S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(1):45-51.
- WANG KL, GUO L, SHI RF, et al. Bioimmunological characteristics of mature or immature murine dendritic cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2011;91(45):3225-3228.
- 李立, 张升宁, 冉江华, 等. 受体来源未成熟树突状细胞诱导大鼠肝移植免疫低反应性的实验研究 [J]. *中国普外基础与临床杂志*. 2009,16(1):32-38.
- PÊCHE H, TRINITÉ B, MARTINET B, et al. Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors. *Am J Transplant*. 2005;5(2):255-267.
- BÉRIQUO G, PÊCHE H, GUILLONNEAU C, et al. Donor-specific allograft tolerance by administration of recipient-derived immature dendritic cells and suboptimal immunosuppression. *Transplantation*. 2005;79(8):969-972.
- KAMADA N, CALNE RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation*. 1979; 28(1):47-50.
- MISRA N, BAYRY J, LACROIX-DESMAZES S, et al. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol*. 2004;172(8):4676-4680.
- JIANG Y, QUE W, ZHU P, et al. The Role of Diverse Liver Cells in Liver Transplantation Tolerance. *Front Immunol*. 2020;11:1203.
- NOURI-SHIRAZI M, GUINET E. Direct and indirect cross-tolerance of alloreactive T cells by dendritic cells retained in the immature stage. *Transplantation*. 2002;74(7):1035-1044.
- HE W, CHEN L, ZHENG L, et al. Prolonged survival effects induced by immature dendritic cells and regulatory T cells in a rat liver transplantation model. *Mol Immunol*. 2016;79:92-97.
- MAYER A, ZHANG Y, PERELSON AS, et al. Regulation of T cell expansion by antigen presentation dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(13):5914-5919.
- LIU J, YU Q, WU W, et al. TLR2 Stimulation Strengthens Intrahepatic Myeloid-Derived Cell-Mediated T Cell Tolerance through Inducing Kupffer Cell Expansion and IL-10 Production. *J Immunol*. 2018;200(7):2341-2351.
- SCHROTH S, GLINTON K, LUO X, et al. Innate Functions of Dendritic Cell Subsets in Cardiac Allograft Tolerance. *Front Immunol*. 2020;11:869.
- 张桐硕, 王越. 同种异体移植的直接和间接识别: 决定移植排斥反应机制的途径 [J]. *实用器官移植电子杂志*, 2018,6(4): 250.
- BLAZAR BR, TAYLOR PA, SEHGAL SN, et al. Rapamycin, a potent inhibitor of T-cell function, prevents graft rejection in murine recipients of allogeneic T-cell-depleted donor marrow. *Blood*. 1994;83(2):600-609.
- DAI H, ZHENG Y, THOMSON AW, et al. Transplant Tolerance Induction: Insights From the Liver. *Front Immunol*. 2020;11:1044.
- BECKER PD, RATNASOTHY K, SEN M, et al. B lymphocytes contribute to indirect pathway T cell sensitization via acquisition of extracellular vesicles. *Am J Transplant*. 2020. doi: 10.1111/ajt.16088. Online ahead of print.
- OH BC, LEE HM, LIM DP, et al. Effect of immature dendritic cell injection before heterotopic cardiac allograft. *Transplant Proc*. 2006;38(10):3189-3192.
- TAKAYAMA T, NISHIOKA Y, LU L, et al. Retroviral delivery of viral interleukin-10 into myeloid dendritic cells markedly inhibits their allostimulatory activity and promotes the induction of T-cell hyporesponsiveness. *Transplantation*. 1998; 66(12):1567-1574.
- CHEN L, ZHANG L, ZHU Z, et al. Effects of IL-10- and FasL-overexpressing dendritic cells on liver transplantation tolerance in a heterotopic liver transplantation rat model. *Immunol Cell Biol*. 2019;97(8):714-725.
- DE WINDE CM, MUNDAY C, ACTON SE. Molecular mechanisms of dendritic cell migration in immunity and cancer. *Med Microbiol Immunol*. 2020;209(4):515-529.