

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.53.011

[http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

谢金敏, 汪艳, 包杰, 马永革, 邹志浩, 唐增杰, 董瑞强, 温浩. 预输注 RelB shRNA 慢病毒修饰树突细胞诱导大鼠肝移植免疫耐受[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(53): 9934-9940.

预输注RelB shRNA慢病毒修饰树突细胞诱导大鼠肝移植免疫耐受☆

谢金敏^{1,2}, 汪艳³, 包杰⁴, 马永革², 邹志浩², 唐增杰², 董瑞强⁵, 温浩¹

¹ 新疆医科大学第一附属医院临床医学博士流动站, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市830012; ² 解放军第23医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市830011; ³ 南方医科大学珠江医院肝胆二科, 广东省广州市510280; ⁴ 南方医科大学南方医学院检验医学学科, 广东省广州市510515; ⁵ 石河子大学医学院, 新疆维吾尔自治区石河子市834407

谢金敏☆, 男, 1972年生, 四川绵竹人, 汉族, 博士, 硕士生导师, 副主任医师, 主要从事器官移植与免疫耐受的临床与基础研究。
platransplantation@163.com

通讯作者: 温浩, 博士, 教授, 新疆医科大学第一附属医院临床医学博士流动站, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市830011
Dr.wenhao@163.com

中图分类号: R617
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)53-09934-07

收稿日期: 2012-03-03
修回日期: 2012-04-29
(20120303003/M·C)

文章亮点: RNAi RelB 树突状细胞预输注可以减轻移植肝排斥程度, 延长移植肝生存时间, 这是通过间接途径实现的, 其机制可能与 T 细胞的调节和无能有关。

关键词: 转录因子 RelB; 树突状细胞; RNA 干扰; 肝移植; 免疫耐受; 大鼠

摘要

背景: 肝移植后的排斥反应是威胁患者和移植肝长期存活的主要原因。诱导受者产生特异性免疫耐受是解决排斥反应的理想措施。

目的: 探讨 RNAi RelB 树突状细胞预输注诱导大鼠肝移植特异性免疫耐受的可能性。

方法: 将近交系雄性清洁级 DA(RT1a)大鼠和近交系雄性 SPF 级 Lewis(RT11)大鼠分别作为供、受体, 行原位肝移植手术。术前随机配对分为 4 组: ①对照组, 受体鼠移植前不做预输注。②治疗组: 受体鼠移植前 7 d 静脉输注供体大鼠 RNAi RelB 树突状细胞(5×10^6)。③未成熟树突状细胞组: 受体鼠移植前 7 d 静脉输注供体大鼠未成熟树突状细胞(5×10^6)。④成熟树突状细胞组: 受体鼠移植前 7 d 静脉输注供体大鼠成熟树突状细胞(5×10^6)。

结果与结论: 与对照组、未成熟树突状细胞组以及成熟树突状细胞组相比, 治疗组移植肝的平均生存时间显著延长。移植后第 7 天, 治疗组天冬氨酸转氨酶、总胆红素水平低于对照组、成熟树突状细胞组、未成熟树突状细胞组($P < 0.01$), 移植后第 14 天治疗组、未成熟树突状细胞组天冬氨酸转氨酶、总胆红素均有轻微下降, 两组比较差异仍有显著性意义($P < 0.01$)。移植后第 7 天, 与对照组比较, 对照组、成熟树突状细胞组、未成熟树突状细胞组 γ -干扰素、白细胞介素 2 水平升高($P < 0.01$), 而白细胞介素 4、白细胞介素 10 下降($P < 0.01$); 移植后第 14 天治疗组、未成熟树突状细胞组 γ -干扰素、白细胞介素 2 水平均有下降, 白细胞介素 4、白细胞介素 10 水平均有升高, 两组比较差异仍有显著性意义($P < 0.01$)。对照组、成熟树突状细胞组、未成熟树突状细胞组移植后第 7 天排斥活动指数为 8.0-9.0。未成熟树突状细胞组第 14 天肝细胞、内皮细胞坏死及汇管区炎性细胞浸润进一步增多。治疗组移植后第 7 天排斥活动指数为 6.0-8.0, 第 14 天时排斥活动指数为 4.0-5.0。结果提示 RNAi RelB 树突状细胞预输注可以减轻移植肝排斥程度, 延长移植肝生存时间, 这是通过间接途径实现的, 其机制可能与 T 细胞的调节和无能有关。

Immune tolerance of rat liver transplantation induced by pre-infusion of RNA interference RelB short hairpin RNA lentiviral modified dendritic cells

Xie Jin-min^{1,2}, Wang Yan³, Bao Jie⁴, Ma Yong-ge², Zou Zhi-hao², Tang Zeng-jie², Dong Rui-qiang⁵, Wen Hao¹

Abstract

BACKGROUND: Homograft rejection is the most important factor that limits the survival of recipients and donor organs after liver transplantation. Induced specific immune tolerance is a most satisfactory method to release rejection after transplantation.

OBJECTIVE: To explore the possibility of the specific immune tolerance induced by RNA interference RelB dendritic cells pre-infusion after liver transplantation in rats.

METHODS: A stable rat model of acute rejection was established by allograft liver transplantation from DA (RT1a) rats to Lewis (RT11) rats. Before transplantation, the donor and recipient rats were paired and randomly divided into four groups: (1) Control group: the recipient rats were not injected before liver transplantation. (2) RNA interference RelB treatment group: the recipient rats were pre-injected with RNA interference RelB dendritic cells from donor (5×10^6) via veins at the 7 days before transplantation. (3) Immature dendritic cells group: the recipient rats were pre-injected with immature dendritic cells (5×10^6) from donor via veins at the 7 days before transplantation. (4) Mature dendritic cells group: the recipient rats were pre-injected with mature dendritic cells (5×10^6) from donor via veins at the 7 days before transplantation.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with control group, immature dendritic cells group and mature dendritic cells group, the average survival time of graft renal in RNA interference RelB treatment group prolonged significantly ($P < 0.01$). The content of aspartate aminotransferase and total bilirubin in RNA interference RelB treatment group at 7 days after

transplantation were significantly lower than those in the control group, immature dendritic cells group and mature dendritic cells group ($P < 0.01$), while the content of aspartate aminotransferase and total bilirubin at 14 days after transplantation in RNA interference RelB treatment group and immature dendritic cells group were slightly decreased, and there was significant difference between two groups ($P < 0.01$). At 7 days after transplantation, compared with RNA interference RelB treatment group, the contents of interferon- γ and interleukin-2 were increased in the control group, immature dendritic cells group and mature dendritic cells group ($P < 0.01$), while the contents of interleukin-4 and interleukin-10 were decreased ($P < 0.01$); at 14 days after transplantation, the contents of interferon- γ and interleukin-2 were decreased and the contents of interleukin-4 and interleukin-10 were increased in RNA interference RelB treatment group and immature dendritic cells group, and there was significant difference between two groups ($P < 0.01$). At 7 days after transplantation, the rejection active index in the control group, immature dendritic cells group and mature dendritic cells group was 8.0–9.0. At 14 days after transplantation, more necrosis of hepatocytes and endotheliocyte and inflammatory cells imbibition in header zone were observed in immature dendritic cells group. The rejection active index in RNA interference RelB treatment group at 7 days after transplantation was 6.0–8.0, and rejection active index was 4.0–5.0 at 14 days after transplantation. Pre-injection of RNA interference RelB dendritic cells may contribute to reduce the degree of graft rejection and prolong the survival time of grafted liver, which related to the regulation and immune-incompetent of T cells.

Xie JM, Wang Y, Bao J, Ma YG, Zou ZH, Tang ZJ, Dong RQ, Wen H. Immune tolerance of rat liver transplantation induced by pre-infusion of RNA interference RelB short hairpin RNA lentiviral modified dendritic cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(53): 9934-9940.

Post-doctoral Station of Clinic Medicine, the First Teaching Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830012, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²The 23th Hospital of Chinese PLA, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ³Second Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China; ⁴Department of Laboratory Medicine, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; ⁵Medical College of Shihezi University, Shihezi 834407, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Xie Jin-min☆, Doctor, Master's supervisor, Associate chief physician, Post-doctoral Station of Clinic Medicine, the First Teaching Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830012, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; The 23th Hospital of Chinese PLA, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. platransplantation@163.com

Corresponding author: Wen Hao, Doctor, Professor, Post-doctoral Station of Clinic Medicine, the First Teaching Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830012, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. Dr.wenhao@163.com

Received: 2012-03-03
Accepted: 2012-04-29

0 引言

肝移植已成为目前治疗终末期肝病唯一有效的方法,但肝移植后的排斥反应仍是威胁患者和移植长期存活的主要原因。免疫抑制剂的应用虽然有效地抑制了急性排斥反应,但长期应用免疫抑制剂必然会给移植患者带来许多不良反应和潜在的危险性。诱导受者对供者器官特异性免疫耐受是解决排斥反应最理想的措施,相对免疫抑制疗法,诱导免疫耐受的优势是从根本上避免了排斥反应,又不影响机体的正常抗感染和免疫监视功能,同时避免了药物毒性。

在成功建立DA-Lewis大鼠肝移植急性排斥模型和获取具有诱导T细胞免疫耐受能力的RNAi RelB树突状细胞基础上^[1-2],本实验以DA-Lewis间大鼠原位肝移植模型进行体内实验,探讨RNAi RelB树突状细胞预输注诱导大鼠肝移植特异性免疫耐受的可能性。

1 材料和方法

设计:以动物为观察对象,重复测量设计。

时间及地点:实验于2009年8月至2011年12月在新疆医科大学第一附属医院临床医学博士流动站、南方医科大学珠江医院器官移植免疫研究所、南方医科大学南方医学院检验医学科实验室共同完成。

材料:

实验动物:近交系雄性清洁级DA(RT1a)大鼠48只,8–12周龄,体质量220–250 g,由哈尔滨医科大学第二附属医院实验动物中心提供;近交系雄性SPF级Lewis(RT11)大鼠48只,8–12周龄,体质量180–210 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

实验试剂:

试剂	来源
RelB 的慢病毒干扰片段	利用 Invitrogen 网站上的免费软件设计,由上海生工生物工程有限公司合成
Opti-MEM 培养基、Trizol 试剂、BLOCK-IT™ U6 RNAi Entry Vector 试剂盒	Invitrogen
质粒中量提取试剂盒	Qiagen 公司
G418	Merck 公司
DEPC、AMV 反转录酶、dNTPs、Rnasin、Taq DNA 聚合酶和 DL2000 marker、质粒 DNA 小量纯化试剂盒	TaKaRa 公司
兔抗 RelB IgG(sc-226)、RelB 多克隆抗体	Santa Cruz 公司
大鼠淋巴细胞分离液	上海华美公司
MTT、丝裂霉素 C、Polybrene	Sigma 公司
重组大鼠源性粒细胞单核细胞集落刺激因子(rrGM-CSF)、重组大鼠源性白细胞介素 4(rIL-4)	美国 Peprotech 公司
RNAi RelB 树突状细胞	前期构建 ^[2]
Rat Cytokine/ Chemokine LINCoplex KIT	LINCO Research 公司

实验仪器:

仪器	来源
24 孔以及 96 孔细胞培养板	Corning 公司
超净工作台	上海净化设备制造公司
细胞计数板	浙江医疗器械设备厂
流式细胞分析仪	美国 BD FACSCalibur system
CX7 全自动生化分析仪	美国 Beckman 公司
石蜡切片机	德国 Leica 公司
风热式电热恒温干燥箱	广州市电热干燥设备厂

方法:

近交系DA与Lewis大鼠肝移植急性排斥模型的建立: 参照参考文献[1]。

未成熟树突状细胞、成熟树突状细胞及RNAi RelB树突状细胞的制备: 参照参考文献[2]。

实验分组: 术前将供、受体大鼠随机配对并分为4组, 每组12对。①对照组(Control-DC), 受体鼠术前不做预输注。②治疗组(RNAi RelB-DC): 受体鼠术前7 d静脉输注供体大鼠RNAi RelB树突状细胞(5×10^6)。③未成熟树突状细胞组(imDC): 受体鼠术前7 d静脉输注供体大鼠未成熟树突状细胞(5×10^6)。④成熟树突状细胞组(LPS-DC): 受体鼠术前7 d静脉输注供体大鼠成熟树突状细胞(5×10^6)。

受鼠术后存活时间观察: 观察受体大鼠肝移植后生存时间, 生存小于3 d的不计入统计, 每组各留6只大鼠观察肝移植后生存时间。

血清肝功能测定: 各组受体于肝移植后第7, 14天处死(每组每个时间点3只), 于下腔静脉取血3 mL, 立即离心 $2\,000 \times g \times 10\text{ min}$, 取血清, 冻存于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱。检测指标包括天冬氨酸转氨酶及总胆红素, 方法同参考文献[1]。

肝移植组织病理学检查: 各组受体在肝移植后第7, 14天处死采血检测肝功能的同时, 切取肝移植组织固定于体积分数为10%中性甲醛溶液, 行组织病理学检查, 方法和诊断标准同参考文献[1]。

混合淋巴细胞反应: 各组受体在肝移植后第7, 14天处死采血检测肝功能的同时, 取脾脏, 收集T细胞作为反应细胞, 取供体(DA大鼠)脾脏细胞作为刺激细胞, 用96孔板测定单向混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR), 方法同参考文献[2]。

移植体内细胞因子的检测: 各组受体在肝移植后第7, 14天处死同时采血提取上清液运用luminex液相芯片技术检测细胞因子水平。方法同前参考文献[2]。

主要观察指标: 观察受体大鼠肝移植后生存时间, 血清肝功能, 细胞因子(白细胞介素2、白细胞介素4、白

细胞介素10及 γ -干扰素)水平, 移植肝组织病理学变化。

统计学分析: 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据采用SPSS 16.0统计软件进行分析, 组间比较用成组设计的单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 受体大鼠生存时间与对照组(9 d)、未成熟树突状细胞组(12.5 d)以及成熟树突状细胞组(8.5 d)相比, 治疗组移植肝的中位生存时间(22 d)显著延长($P < 0.01$), 见表1。

表1 各组大鼠术后存活时间比较 Table 1 Survival time of recipient rats after transplantation (d)			
Group	n	Survival time	Medial survival time
Control	6	7, 9, 8, 11, 9, 11	9
RNAi RelB treatment	6	21, 19, 23, 27, 16, 31	22 ^a
Immature dendritic cell	6	9, 13, 11, 14, 12, 15	12.5 ^b
Mature dendritic cell	6	10, 9, 8, 7, 12, 7	8.5 ^b

^a $P < 0.01$, vs. control group; ^b $P < 0.01$, vs. RNAi RelB treatment group; RNAi: RNA interference

2.2 各组大鼠肝功能测定结果 移植后第7天, 与对照组、成熟树突状细胞组、未成熟树突状细胞组比较, 治疗组天冬氨酸转氨酶、总胆红素水平显著降低, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 见表2。移植后第14天治疗组、未成熟树突状细胞组天冬氨酸转氨酶、总胆红素均有轻微下降, 两组比较差异仍有显著性意义($P < 0.01$), 见表3。

表2 各组大鼠肝移植后第7天血清肝功能变化 Table 2 Liver function of recipient rats at 7 d after transplantation in four groups ($\bar{x} \pm s$, n=3)		
Group	AST ($\mu\text{kat/L}$)	TBil ($\mu\text{mol/L}$)
Control	13 523.20 $\pm$ 145.86	96.20 $\pm$ 3.10
RNAi RelB treatment	5 552.11 $\pm$ 73.01 ^a	25.70 $\pm$ 4.91 ^a
Immature dendritic cell	13 188.14 $\pm$ 125.69 ^b	86.45 $\pm$ 5.72 ^b
Mature dendritic cell	13 403.18 $\pm$ 138.36 ^b	91.63 $\pm$ 7.06 ^b

^a $P < 0.01$, vs. control group; ^b $P < 0.01$, vs. RNAi RelB treatment group. AST: aspartate aminotransferase; TBil: total bilirubin; RNAi: RNA interference

表3 各组大鼠肝移植后第14天血清肝功能变化 Table 3 Liver function of recipient rats at 14 d after transplantation in two groups ($\bar{x} \pm s$, n=3)		
Group	AST ($\mu\text{kat/L}$)	TBil ($\mu\text{mol/L}$)
RNAi RelB treatment	4 889.48 $\pm$ 266.39	22.83 $\pm$ 7.82
Immature dendritic cell	10 590.78 $\pm$ 419.58 ^a	66.72 $\pm$ 6.84 ^a

^a $P < 0.01$, vs. control group; AST: aspartate aminotransferase; TBil: total bilirubin; RNAi: RNA interference

2.3 各组大鼠肝脏病理学检查结果 对照组、成熟树突状细胞组、未成熟树突状细胞组移植后第7天见移植肝细胞索状排列紊乱或消失, 肝细胞出现气球样变, 并可见小叶内炎症坏死; 中央静脉血管壁及血管周围炎性细胞浸润; 汇管区大量炎性细胞浸润, 主要为淋巴细胞, 胆管上皮坏死、脱落及增生, 管壁炎性细胞浸润, 血管内膜损伤, 有明显出血。表现为大片肝细胞变性、坏死, 血窦扩张充血, 内皮细胞肿胀明显, 汇管区及中央静脉出现以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润, 汇管区大量单核细胞浸润, 胆管内皮细胞破坏。排斥活动指数为8.0-9.0, 见图1; 未成熟树突状细胞组移植后第14天肝细胞、内皮细胞坏死及汇管区炎性细胞浸润进一步增多。

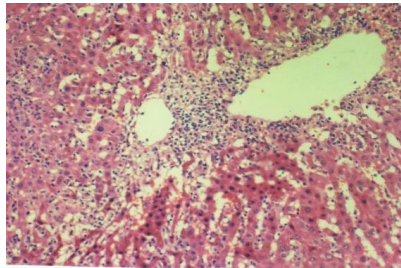


Figure 1 Pathological changes of the liver in the control group, immature dendritic cells group and mature dendritic cells group at 7 d after transplantation ($\times 100$)
图1 对照组、成熟树突状细胞组、未成熟树突状细胞组移植后第7天肝脏病理学变化($\times 100$)

治疗组移植后第7天见肝细胞板排列轻度紊乱, 少量小叶侵犯, 部分肝细胞出现气球样变, 并可见灶状坏死; 中央静脉管壁轻度炎性细胞浸润; 汇管区中等量炎性细胞浸润, 胆管上皮有坏死, 血管充血扩张。排斥活动指数为6.0-8.0, 见图2; 第14天主要表现为大片肝细胞变性、少量坏死, 内皮细胞肿胀减轻, 汇管区及中央静脉出现的炎性细胞浸润减少。排斥活动指数为4.0-5.0, 见图3。

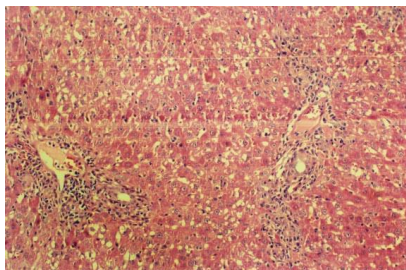


Figure 2 Pathological changes of the liver in RNA interference RelB treatment group at 7d after transplantation ($\times 100$)
图2 治疗组移植后第7天肝脏病理学变化($\times 100$)

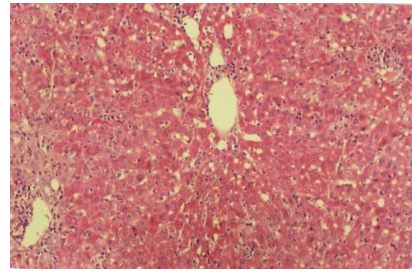


Figure 3 Pathological changes of the liver in RNA interference RelB treatment group at 14 d after transplantation ($\times 100$)
图3 治疗组移植后第14天肝脏病理学变化($\times 100$)

2.4 各组大鼠混合淋巴细胞反应 肝移植后第7天, 治疗组受体脾脏细胞对供体抗原刺激的反应明显低于对照组、未成熟树突状细胞组及成熟树突状细胞组($P < 0.01$); 未成熟树突状细胞组仍有部分刺激脾脏细胞增殖能力(与治疗组相比, $P < 0.01$), 而成熟树突状细胞组脾脏T细胞对供体抗原的增殖能力并未降低(与对照组相比, $P > 0.05$), 见表4; 肝移植后第14天, 治疗组受体脾脏细胞对供体抗原刺激的反应明显低于未成熟树突状细胞组($P < 0.01$)。表明预输注供体大鼠RNAi RelB树突状细胞抑制了受体T细胞对供体抗原刺激增殖能力, 抑制同种T细胞反应是针对供体特异性的, 见表5。

表4 大鼠肝移植后第7天各组混合淋巴细胞反应吸光度值
Table 4 Mixed lymphocyte reaction absorbance value of each group at 7 d after liver transplantation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Group	Number of activated cells in each hole			
	3×10^2	1×10^3	3×10^3	1×10^4
Control	0.152 ± 0.025^b	0.174 ± 0.052^b	0.392 ± 0.043^b	0.561 ± 0.084^b
RNAi RelB treatment	0.025 ± 0.007^a	0.028 ± 0.004^a	0.042 ± 0.008^a	0.054 ± 0.005^a
Immature dendritic cells	0.082 ± 0.052^{ab}	0.125 ± 0.04^{ab}	0.183 ± 0.130^{ab}	0.276 ± 0.047^{ab}
Mature dendritic cells	0.148 ± 0.010^b	0.165 ± 0.046^b	0.385 ± 0.052^b	0.558 ± 0.045^b

^a $P < 0.01$, vs. control group; ^b $P < 0.01$, vs. RNAi RelB treatment group; RNAi: RNA interference

表5 大鼠肝移植后第14天各组混合淋巴细胞反应吸光度值
Table 5 Mixed lymphocyte reaction absorbance value of each group at 14 d after liver transplantation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Group	Number of activated cells in each hole			
	3×10^2	1×10^3	3×10^3	1×10^4
Control	0.018 ± 0.005	0.021 ± 0.004	0.038 ± 0.006	0.043 ± 0.003
Immature dendritic cells	0.078 ± 0.032^a	0.109 ± 0.015^a	0.147 ± 0.088^a	0.201 ± 0.014^a

^a $P < 0.01$, vs. RNAi RelB treatment group; RNAi: RNA interference

2.5 各组大鼠血清细胞因子水平测定 移植后第7天, 治疗组 γ -干扰素、白细胞介素2、白细胞介素4、白细胞介素10水平与对照组、成熟树突状细胞组、未成熟树突状细胞组比较, 差异均有显著性意义($P < 0.01$), 见表6; 移植后第14天, 治疗组、未成熟树突状细胞组 γ -干扰素、白细胞介素2水平均有下降, 但两组之间比较差异仍有显著性意义($P < 0.01$); 治疗组、未成熟树突状细胞组白细胞介素4、白细胞介素10水平均有升高, 但两组之间比较差异仍有显著性意义($P < 0.01$), 见表7。

表6 各组大鼠移植后第7天血清白细胞介素2、白细胞介素4、白细胞介素10及 γ -干扰素水平变化
Table 6 Changes of interleukin-2, interleukin-4, interleukin-10 and interferon- γ levels in the serum of recipient rats at 7 d after transplantation ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, ng/L)

Group	Th1 cytokine		Th2 cytokine	
	Interferon- γ	Interleukin-2	Interleukin-4	Interleukin-10
Control	854.37 $\pm$ 7.29 ^b	271.34 $\pm$ 3.52 ^b	88.00 $\pm$ 1.55 ^b	115.86 $\pm$ 5.93
RNAi RelB treatment	526.13 $\pm$ 5.75 ^a	142.60 $\pm$ 6.07 ^a	211.21 $\pm$ 5.14 ^a	368.24 $\pm$ 469.88 ^a
Immature dendritic cells	763.86 $\pm$ 5.33 ^{ab}	293.06 $\pm$ 6.93 ^b	97.83 $\pm$ 2.13 ^{ab}	125.76 $\pm$ 2.04 ^b
Mature dendritic cells	821.10 $\pm$ 7.10 ^{ab}	304.56 $\pm$ 6.46 ^b	90.85 $\pm$ 5.61 ^b	104.04 $\pm$ 4.42 ^b
F value	15.98	3.80	19.80	0.85
P value	0.000	0.05	0.000	0.50

^a $P < 0.01$, vs. control group; ^b $P < 0.01$, vs. RNAi RelB treatment group: RNA interference

表7 各组大鼠移植后第14天血清白细胞介素2、白细胞介素4、白细胞介素10及 γ -干扰素水平变化
Table 7 Changes of interleukin-2, interleukin-4, interleukin-10 and interferon- γ level in the serum of recipient rats at 14 d after transplantation ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, ng/L)

Group	Th1 cytokine		Th2 cytokine	
	Interferon- γ	Interleukin-2	Interleukin-4	Interleukin-10
Control	377.20 $\pm$ 4.65	96.56 $\pm$ 2.93	247.46 $\pm$ 4.14	397.16 $\pm$ 2.81
Immature dendritic cells	694.40 $\pm$ 4.25 ^a	187.26 $\pm$ 4.40 ^a	82.46 $\pm$ 6.17 ^a	149.03 $\pm$ 3.70 ^a
t value	760.3	880.88	20.060	321.979
P value	0.000	0.000	0.011	0.000

^a $P < 0.01$, vs. control group

胞的发育状态即成熟与否决定了树突状细胞介导的免疫反应的方向, 未成熟树突状细胞倾向于诱导T细胞免疫耐受, 人们把这种具有未成熟表型但能诱导T细胞免疫耐受的树突状细胞称为致耐受树突状细胞。目前, 致耐受树突状细胞已成功用于移植免疫排斥和某些自身免疫性疾病的防治, 如何获得致耐受树突状细胞无疑就成为免疫耐受工作者研究的热门话题^[4]。

目前已知的刺激树突状细胞成熟的方法几乎都是通过激活核转录因子 κ B途径实现的^[5]。RelB作为核转录因子 κ B家族成员之一, 对核转录因子 κ B家族成员分别进行基因敲除的研究结果显示, 其RelB亚基是影响树突状细胞的发育成熟的关键基因^[6]。成熟的骨髓树突状细胞中呈高水平表达, 未成熟的骨髓树突状细胞中呈低水平表达^[7]。RNAi是1998年由Fire等^[8]共同提出的一种基因沉默技术, 该技术可以高效、特异地下调细胞中基因的表达。课题组采用高效特异的RNAi技术, 沉默树突状细胞中RelB基因表达, 得到RelB基因低表达的RNAi RelB树突状细胞, 探讨其免疫耐受和免疫调节能力, 为器官移植免疫耐受的诱导、自身免疫性疾病的防治提供新的研究思路和治疗方法。课题组在有效沉默了RelB基因的基础上, 制备了RNAi RelB树突状细胞, 从细胞形态特征、细胞表面分子表达水平、细胞免疫功能等方面研究表明RNAi RelB树突状细胞的生物免疫学功能表现为未成熟树突状细胞状态, 用脂多糖刺激后, RNAi RelB树突状细胞仍然保持未成熟树突状细胞的形态特点^[2]; 体外实验证实RNAi RelB树突状细胞具有诱导T细胞免疫耐受能力^[2]。其表现为: ①RNAi RelB树突状细胞表面MHC-II类分子、共刺激分子CD40和CD86均呈低表达。②RNAi RelB树突状细胞诱导Th0向Th2细胞偏移, 白细胞介素2和 γ -干扰素分泌受到抑制, 白细胞介素10和白细胞介素4分泌相对占优势。

树突状细胞是通过与T细胞的相互作用来介导细胞免疫反应的。树突状细胞激活T胞产生特异性免疫应答需要3个信号^[9], 树突状细胞表面MHC-抗原肽复合物与T细胞受体的特异性结合提供了第一信号; 树突状细胞表面共刺激分子(CD80、CD86等)和T细胞表面配体(CD28等)的相互作用构成了第二信号; T细胞分泌的相关细胞因子如白细胞介素2等提供第三信号^[10]。这其中的任何一个信号被抑制, 都可能导致T细胞的凋亡、无能、向Th2细胞分化或者在一定条件下分化成调节性T细胞, 诱导免疫耐受的形。Tol树突状细胞诱导移植免疫耐受的机制主要有以下4点: ①未成熟树突状细胞表面缺乏第二信号, 诱导T细胞无能^[11]。②未成熟树突状

3 讨论

树突状细胞是目前为止机体内功能最强的专职抗原提呈细胞。随着对树突状细胞研究的不断深入, 发现树突状细胞是一群在来源、表型、成熟度和功能上均具有高度异质性的细胞群。正是这种异质性决定了树突状细胞在免疫应答和免疫耐受中起重要作用^[3]。树突状细

细胞不能使抗原特异性T细胞进一步激活, 引发T细胞凋亡, 从而导致免疫耐受的产生^[12]。③未成熟树突状细胞主要分泌高水平白细胞介素10、低水平 γ -干扰素, 诱导T细胞向Th2分化, 有利于减轻移植物的急性排斥反应^[13]。④通过诱导Treg细胞的产生, 介导免疫耐受^[14]。本实验用大鼠肝移植急性排斥模型来验证RNAi RelB树突状细胞在体内能否发挥致耐受作用。选择近交系DA至Lewis大鼠的移植模型为经典的急性排斥模型, 术后第7天出现典型重度排斥反应(Banff国际标准), 排斥可靠稳定^[1]。在此基础上进行体内实验, 观察RNAi RelB树突状细胞预输注是否影响T细胞功能, 减少对抗原物质的免疫, 诱导大鼠肝移植免疫耐受。本实验通过体外培养获得受体大鼠的骨髓未成熟树突状细胞、成熟树突状细胞及RNAi RelB树突状细胞于术前1周输入受体大鼠体内, 发现移植前输注供体来源的RNAi RelB树突状细胞可以抑制了受体T细胞对供体抗原刺激增殖能力, 诱导供体特异性的免疫耐受。混合淋巴细胞反应发现肝移植后7 d, 治疗组受体脾脏细胞对供体抗原刺激的反应明显低于对照组、未成熟树突状细胞组及成熟树突状细胞组($P < 0.01$); 未成熟树突状细胞组仍有部分刺激脾脏细胞增殖能力(与治疗组相比, $P < 0.01$), 而成熟树突状细胞组脾脏T细胞对供体抗原的增殖能力并未降低(与对照组相比, $P > 0.05$); 肝移植后14 d, 治疗组受体脾脏细胞对供体抗原刺激的反应明显低于未成熟树突状细胞组($P < 0.01$)。阻断共刺激信号诱导T细胞凋亡或者呈现无能状态, 是促进抗原特异性器官移植耐受的有效方法^[15-16]。T细胞的激活需要双信号, 只有抗原的第一信号刺激, 缺乏第二信号, 可导致相应的T细胞克隆无能状态或不应答。第一信号主要来自T细胞受体与主要组织相容性复合体分子-抗原肽复合物的特异性结合; 第二信号又称协同刺激信号, 主要由抗原呈递细胞和T细胞表面黏附分子对的相互作用所提供。第二信号途径中最重要的是T细胞表面CD28分子与抗原呈递细胞表面相应配体B7-1(CD80)和B7-2(CD86)的结合, 如通过阻断B7/CD28第二信号途径, 可以导致T淋巴细胞无能并延长肝移植动物的存活。从而可以通过外周途径诱导肝移植免疫耐受。组织病理学检查是移植后排斥反应诊断的“金标准”, 本部分结果表明, 对照组、未成熟树突状细胞组以及成熟树突状细胞组大鼠胆管周围炎性细胞浸润, 或伴有局灶性管腔破坏, 小叶间和(或)门静脉内皮细胞下淋巴细胞浸润; 汇管区炎性细胞浸润, 大量淋巴细胞及不等量的中性粒细胞、嗜酸性粒细胞, 以淋巴细胞为主, 排斥活动指数为8.0-9.0; 而治疗

组大鼠门脉周围损害较轻, 排斥活动指数为6.0-7.0。病理组织的改变在肝功能上进一步得到体现, 术后第7天, RNAi RelB树突状细胞组大鼠的天冬氨酸转氨酶、总胆红素水平均低于其他组($P < 0.01$)。术后第14天, 治疗组和未成熟树突状细胞组血清天冬氨酸转氨酶、总胆红素水平均降低, 但RNAi RelB树突状细胞组和未成熟树突状细胞组之间差异显著($P < 0.01$)。表明RNAi RelB树突状细胞组肝功能损害较轻。与对照组、成熟树突状细胞组以及未成熟树突状细胞组相比, 治疗组的平均生存时间显著延长($P < 0.01$)。说明RNAi RelB树突状细胞预输注可以延长移植肝生存时间。致耐受树突状细胞还可对Th1细胞和Th2细胞进行调节。Th1细胞主要分泌白细胞介素2、白细胞介素12、 γ -干扰素等, 参与细胞介导的炎症反应, 激活细胞毒性T淋巴细胞诱发迟发型超敏反应; Th2细胞主要分泌白细胞介素4、白细胞介素10等, 参与体液免疫反应。Th1和Th2细胞及其分泌的细胞因子共同调节机体的免疫应答过程, 二者相互抑制, 相互调节, 保持动态平衡^[17], γ -干扰素选择性地抑制Th2细胞增殖, 而白细胞介素10可以抑制Th1细胞因子的产生。Th1细胞及其分泌的细胞因子介导肝移植术后急性排斥反应, Th2细胞及其细胞因子则与肝移植术后免疫耐受有关。由Th1细胞向Th2细胞的转换与移植耐受密切相关, 伴有白细胞介素4的明显升高, 反之则与移植后的免疫排斥有关, 伴有的 γ -干扰素等的明显升高^[18]。树突状细胞通过自身分泌细胞因子和刺激T细胞分泌细胞因子调节Th0细胞向Th1/Th2细胞分化, 保持二者之间的平衡^[19]。白细胞介素12促使Th0细胞向Th1细胞分化, 白细胞介素4倾向于Th2细胞应答, γ -干扰素等Th1类细胞因子能够诱导未成熟树突状细胞分化为髓系树突状细胞, 这种树突状细胞高水平表达共刺激分子, 促进Th0细胞向Th1细胞分化^[20]; 白细胞介素10等Th2类细胞因子, 在树突状细胞发育的早期能抑制未成熟树突状细胞向成熟发育, 保持未成熟状态, 共刺激分子低表达, 能诱导T细胞耐受。实验对RNAi RelB树突状细胞诱导Th0细胞分化方向进行了检测。研究发现该类树突状细胞分泌的细胞因子以Th2细胞因子(白细胞介素4和白细胞介素10)占主导, 其Th1细胞因子(白细胞介素2和 γ -干扰素)分泌水平显著低于成熟树突状细胞组($P < 0.01$), 与对照组表达Th细胞因子的水平相似, 且即使被脂多糖再刺激也没有改变Th1/Th2细胞因子的比例, 表明该类树突状细胞可诱导Th0细胞向Th2细胞方向偏倚, Th1细胞分泌抑制, Th2分泌相对占优势。本实验结果显示, 术后第7天, RNAi RelB树突状细胞组的白细胞介素2和

γ -干扰素水平低于其他3组($P < 0.01$), 而术后第14天, 两组均有降低, 但RNAi RelB树突状细胞组仍低于未成熟树突状细胞组($P < 0.01$); 术后第7天, 治疗组的白细胞介素4和白细胞介素10水平高于其他3组($P < 0.01$), 而术后第14天, 两组均有升高, 但RNAi RelB树突状细胞组仍高于未成熟树突状细胞组($P < 0.01$)。提示应用供体来源的RNAi RelB树突状细胞给受体预输注, 可以在一定程度上表现为Th1向Th2方向的免疫偏移。

总之, RNAi RelB树突状细胞预输注可以减轻移植肝排斥程度, 延长移植肝生存时间, 这是通过间接途径实现的, 其机制可能与T细胞的调节和无能有关。应用供体RNAi RelB树突状细胞预输注诱导肝移植免疫耐受试验研究为临床肝移植诱导耐受开辟了美好的前景。

致谢: 感谢南方医科大学南方医学院检验医学科在细胞因子液相芯片检测上的帮助。

4 参考文献

- [1] Xie JM, Dong RQ, Li T, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(5):778-782.
谢金敏, 董瑞强, 李涛, 等. 大鼠近交系间原位肝移植急性排斥模型的建立与评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(5): 778-782.
- [2] Xie JM, Bao J, Dong RQ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(53):9986-9990.
谢金敏, 包杰, 董瑞强, 等. RelB shRNA慢病毒感染小鼠骨髓树突状细胞的免疫学效应[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(53):9986-9990.
- [3] Gil-Torregrosa BC, Lennon-Duménil AM, Kessler B, et al. Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. Eur J Immunol. 2004;34(2):398-407.
- [4] Khan S, Greenberg JD, Bhardwaj N. Dendritic cells as targets for therapy in rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. 2009; 5(10):566-571.
- [5] Bao J, Wang Q, Zheng L, et al. Redai Yixue Zazhi. 2010; 10(5): 574-577.
包杰, 王前, 郑磊, 等. 核转录因子RelB抑制途径对骨髓树突状细胞表面分子表达的影响研究[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(5): 574-577.
- [6] Bao J, Zheng L, Wang Q, et al. Jiefangjun Yixue Zazhi. 2009; 34(9):1127-1130.
包杰, 郑磊, 王前, 等. RelB shRNA慢病毒感染小鼠骨髓树突状细胞的免疫学效应观察[J]. 解放军医学杂志, 2009;34(9):1127-1130.
- [7] Bao J, Zheng L, Wang Q, et al. Xibao yu Fenzi Mianyixue Zazhi. 2006;22(6):703-705.
包杰, 郑磊, 王前, 等. 小鼠骨髓成熟与不成熟树突状细胞中 RelB 基因的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(6):703-705.
- [8] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 1998;391(6669):806-811.
- [9] Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2000;18:767-811.
- [10] Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. N Engl J Med. 2004;351(26):2715-2729.
- [11] 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.
- [12] Lu L, Li W, Zhong C, et al. Increased apoptosis of immunoreactive host cells and augmented donor leukocyte chimerism, not sustained inhibition of B7 molecule expression are associated with prolonged cardiac allograft survival in mice preconditioned with immature donor dendritic cells plus anti-CD40L mAb. Transplantation. 1999;68(6):747-757.
- [13] Buonocore S, Flamand V, Goldman M, et al. Bone marrow-derived immature dendritic cells prime in vivo alloreactive T cells for interleukin-4-dependent rejection of major histocompatibility complex class II antigen-disparate cardiac allograft. Transplantation. 2003;75(3):407-413.
- [14] Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. Nat Rev Immunol. 2007;7(8): 610-621.
- [15] Kvist M, Lempesis V, Kanje M, et al. Immunomodulation by costimulation blockade inhibits rejection of nerve allografts. J Peripher Nerv Syst. 2007;12(2):83-90.
- [16] Hosaiwa KA, Wang H, DeVries ME, et al. CD80/CD86 costimulation regulates acute vascular rejection. J Immunol. 2005;175(9):6197-6204.
- [17] Maldonado-López R, Maliszewski C, Urbain J, et al. Cytokines regulate the capacity of CD8 α (+) and CD8 α (-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. J Immunol. 2001; 167(8):4345-4350.
- [18] Sefrioui H, Donahue J, Gilpin EA, et al. Tolerance and immunity following in utero transplantation of allogeneic fetal liver cells: the cytokine shift. Cell Transplant. 2003;12(1): 75-82.
- [19] Liu YJ, Kadowaki N, Rissoan MC, et al. T cell activation and polarization by DC1 and DC2. Curr Top Microbiol Immunol. 2000;251:149-159.
- [20] de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. Springer Semin Immunopathol. 2005;26(3):289-307.

来自本文课题的更多信息——

作者贡献: 实验设计为第一、八作者, 实施为第二、三、四、五、六作者, 实验评估为第二、七作者, 资料收集为第二、三、四、五作者。第一作者成文, 第八作者审核, 第一、八作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。