

· 论 著 ·

α -黑素细胞刺激素处理的树突状细胞对小鼠心脏移植存活时间的影响

张丽娟^{1,2}, 田野苹^{1*}, 沈娟¹, 闵彦¹, 应楹¹

(1. 第二军医大学基础医学部免疫学教研室, 上海 200433; 2. 辽宁本溪中心医院内科, 本溪 117000)

[摘要] **目的:** 观察 α -黑素细胞刺激素(α -MSH)处理的小鼠骨髓来源的树突状细胞(DC)预防同种异基因小鼠心脏移植排斥反应的效果。**方法:** 在供者 BALB/c 小鼠 DC 培养的过程中加入 α -MSH, 用流式细胞仪分析 DC 的表型变化, 用 ELISA 方法检测培养上清中 IL-12 的分泌水平。在同种异基因心脏移植前, 分别将 α -MSH 处理后 7 d 的 DC(α -MSH-DC)和正常培养 7 d 的 DC(Day7-DC)输至受者 C57BL/6 小鼠体内, 并另设输入 PBS 的小鼠为对照组, 通过颈部 Cuff 法小鼠异位心脏移植模型, 观察心脏移植存活时间, 并用 ELISA 方法测定受者血清细胞因子水平的变化。**结果:** α -MSH-DC 表面分子的表达明显低于 Day7-DC。 α -MSH-DC 培养上清中分泌 IL-12 [(95.2±6.3) pg/ml]的水平也明显低于 Day7-DC[(197.1±10.2) pg/ml]。与 PBS 组[(7.17±0.26) d]相比, Day7-DC 组[(6.25±0.61) d]的心脏移植存活时间缩短;而 α -MSH-DC 组[(15.08±1.32) d]的心脏移植存活时间明显延长。与 Day7-DC 和 PBS 组相比, α -MSH-DC 组移植后血清 IL-2 和 IFN- γ 细胞因子水平明显降低。**结论:** α -MSH 可以抑制体外培养的 DC 表面分子的表达和 IL-12 的分泌; α -MSH 处理的 DC 在体内能延长同种异基因心脏移植物的存活时间。

[关键词] α -黑素细胞刺激素; 树突状细胞; 心脏移植; 移植排斥反应

[中图分类号] R 654.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)02-0143-04

Prolongation of cardiac allograft survival by α -MSH pretreated immature dendritic cells in mice

ZHANG Li-juan^{1,2}, TIAN Ye-ping^{1*}, SHEN Juan¹, MIN Yan¹, YING Ying¹ (1. Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433; China; 2. Department of Internal Medicine, Liaoning Benxi Central Hospital, Benxi 117000)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the preventive effect of α -MSH treated mouse bone marrow-derived dendritic cells (DC) on cardiac allograft rejection. **Methods:** BALB/c-derived DCs were treated with α -MSH during the cell culture. The phenotype characteristics of DCs were determined by FACS and the levels of IL-12 in the culture supernatants of DCs were tested by ELISA. DCs pretreated with α -MSH (α -MSH-DCs) and DCs routinely cultured for 7 d (Day7-DCs) from BALB/c mice were transfused into C57BL/6 mice through tail vein 7 d before transplantation. The mice treated with PBS served as the control group. The graft survival time was observed by heterotopic cervical cardiac transplantation and the levels of cytokines in serum were tested by ELISA in the 3 groups. **Results:** The expressions of CD80, CD86, CD11c and Ia^d on α -MSH-DCs were lower than that on Day7-DCs, and the level of IL-12 [(95.2±6.3) pg/ml] in the culture supernatants of α -MSH-DCs was also lower than that in Day7-DCs [(197.1±10.2) pg/ml]. The cardiac allograft survival time in the Day7-DC group [(6.25±0.61) d] was shorter as compared with that in the PBS group [(7.17±0.26) d], and that in the α -MSH-DC group [(15.08±1.32) d] was significantly longer than that in the PBS group. Th1 cytokines (IL-2, IFN- γ) decreased significantly in the α -MSH-DC group as compared with that in the PBS and Day7-DC group. **Conclusion:** α -MSH can inhibit the expression of CD80, CD86, CD11c and Ia^d on DC and the secretion of IL-12 in DC. Injection of donor-derived DCs treated with α -MSH before transplantation can significantly prolong cardiac allograft survival.

[KEY WORDS] α -melanocyte stimulating hormone; dendritic cells; cardiac transplantation; graft rejection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(2): 143-146]

树突状细胞(dendritic cell, DC)是一类功能最强的专职抗原提呈细胞。已知非成熟 DC 有较强的致耐受活性, 但是这种活性随着 DC 的成熟转变为免疫原性。目前用非成熟 DC 诱导免疫耐受已经成为移植免疫学界十分看好的一种策略。 α -黑素细胞刺激素(α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH)是具有抗急、慢性炎症作用的内源性神经免

疫调节肽, 能抑制多种致炎症因子的表达、分泌和效应。近年的研究^[1]发现, 在人的外周血单核细胞来源的 DC 上, 有 α -MSH 受体 MC-1R 的表达, 用 α -

[基金项目] 上海市科委基础研究重点项目(02JC14027)。

[作者简介] 张丽娟(1972-), 女(汉族), 硕士生。

E-mail: 891158@163.com

* Corresponding author. E-mail: typimm@hotmail.com

MSH 作用于人 DC 可以下调协同刺激分子 CD86 和 CD40 的表达。腹腔单独注射(Nle 4-D-Phe 7)- α -黑素细胞刺激素(NDP- α -MSH)也可以延长大鼠心脏移植物的存活期^[2]。

本研究将 α -MSH 直接预处理的供者来源 DC 输入受者体内,通过颈部 Cuff 法小鼠异位心脏移植模型,观察移植心脏的存活时间,以探讨神经免疫调节肽 α -MSH 处理的供者 DC 诱导移植免疫耐受的能力。

1 材料和方法

1.1 实验动物 8~12 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠(H-2^b), BALB/c 小鼠(H-2^d),体质量 20~25 g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,在无病原的环境中饲养。将受者 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组,每组 6 只。在移植前 7 d, α -MSH-DC 组经尾静脉注入 BALB/c 来源的 α -MSH-DC(2×10^6 细胞/只); Day7-DC 组经尾静脉注入 BALB/c 来源的 Day7-DC(2×10^6 细胞/只); PBS 组经尾静脉注入等量 PBS。3 组 C57BL/6 受者分别于同一条件接受 BALB/c 供心移植。

1.2 器材和试剂 双人双目手术显微镜购自上海医疗器械五厂;7-0、10-0、11-0 的医用无损伤缝线购自上海康洁医疗用品总厂;26-Gauge (26-G, 外径为 0.4 mm), 22-Gauge (22-G, 外径为 0.8 mm) 的 Teflon 硅胶管由本教研室王全兴副教授馈赠。Cuff 长度为 1~2 mm,用 26-G 的 Teflon 硅胶管制作颈内动脉 Cuff, 22-G 的 Teflon 硅胶管制作左肺动脉的 Cuff;显微手术器械购自上海手术器械厂;戊巴比妥钠粉剂购于中国医药集团上海化学试剂公司。rmGM-CSF 和 rmIL-4 购于 R&D 公司。RPMI 1640 完全培养基包括: RPMI 1640 (Gibco 公司)、10%胎牛血清 (Gibco 公司)、2 mmol/L 谷氨酰胺、0.01 mmol/L 丙酮酸钠、0.05 mmol/L 巯基乙醇、20 mmol/L HEPES、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素。检测 IL-2、IL-4、IFN- γ 、IL-12 的 ELISA 试剂盒购于 R&D 公司,检测 IL-10 的 ELISA 试剂盒购于上海森雄科技实业有限公司。不同荧光标记的小鼠 Ia^d-FITC、CD11c-FITC、CD80-PE、CD86-FITC 单抗购于 PharMingen 公司。 α -MSH 购于 Sigma 公司。

1.3 小鼠骨髓来源的 DC 体外扩增培养 参考 Inaba 等^[3]方法并稍作改进: 颈椎脱位法处死 BALB/c 小鼠,无菌取股骨骨髓细胞, Tris-NH₄Cl 溶去红细胞后,加入抗 Ia、B₂₂₀、CD4、CD8 单抗(终质

量浓度均为 10 μ g/ml)及补体,去除 T、B 及 Ia⁺ 细胞,洗 2 次后,以 1×10^6 细胞/孔加入 24 孔板培养,用含有 rmGM-CSF 10 ng/ml 和 rmIL-4 1 ng/ml 的 RPMI 1640 完全培养基培养。培养 3 d 后,吸弃培养基及悬浮细胞,重新加入新鲜 RPMI 1640 完全培养基及 rmGM-CSF 和 rmIL-4,以后隔天半量换液,细胞培养至第 6 天,收集疏松贴壁的增殖性细胞聚集集体,置新培养板培养过夜,第 2 天收集悬浮细胞即为富集的第 7 天骨髓来源的 DC (bone marrow-derived dendritic cell, BMDC)。 α -MSH 处理组于培养开始每孔加入 α -MSH,终浓度为 10^{-11} mol/L。

1.4 DC 的表型分析 收获经 α -MSH 处理 7 d 的 DC (α -MSH-DC) 和正常培养 7 d 的 DC (Day7-DC),用 PBS 洗 2 遍后,加入离心管,悬浮成每管 1×10^5 细胞/100 μ l PBS,分别加入 Ia^d、CD80、CD86、CD11c 荧光抗体(终浓度为 5 μ g/ml),置 4 $^{\circ}$ C 标记 45 min, PBS 洗 2 遍,用 FACS (FACScan, Becton Dickinson 公司产品)进行表型分析。

1.5 小鼠颈部异位心脏模型的制作 整个操作在清洁环境下进行,显微镜放大倍数为 10 倍。以 BALB/c 小鼠为供者,手术前注射 50 U/ml 肝素生理盐水 1 ml,随后注射 0.1% 的戊巴比妥钠进行麻醉。开胸显露下腔静脉,注入 4 $^{\circ}$ C 肝素生理盐水 1 ml 进行全身肝素化及降温,随后将心脏连同肺部完整切除后,迅速置于 4 $^{\circ}$ C 乳酸林格液冰水混合物中,进行修整。结扎下腔静脉、上腔静脉及肺静脉,游离左肺动脉至左侧肺门处,切断左肺动脉供装 Cuff 用,右肺动脉结扎。完全游离主动脉,在无名动脉水平予以切除修整。将受者 C57BL/6 小鼠麻醉后,切开右侧颈部皮肤,在血管夹封闭下,断开近心端颈外静脉和颈内动脉,左肺动脉套入受者右侧颈外静脉,受者颈内动脉套入供心的主动脉。在热盐水迅速复温的同时,开放血流,30 s 左右,心脏恢复搏动。术后每天观察,目视及直接触摸均不见心脏跳动视为排斥。

1.6 细胞因子的检测 收集培养 7 d 的 α -MSH-DC 和 Day7-DC 的上清,测定 IL-12 水平;在心脏移植后第 7 天取各组外周血血清,检测 IL-4、IL-10、IL-2 和 IFN- γ 。各种细胞因子检测采用 ELISA 试剂盒,具体操作按试剂盒说明书进行。

1.7 统计学处理 所有数据用统计软件 SPSS 处理,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据用 ANOVA 分析;两组间数据采用 *t* 检验,若方差不齐,采用非参统计检验。

2 结果

2.1 DC 的表型分析 FACS 分析 DC 的表型见图 1, α -MSH-DC 表达低水平的 Ia^d、CD11c、CD80 和

CD86 表面分子, 而 Day7-DC 表达高水平的 Ia^d、CD11c、CD80 和 CD86 表面分子。 α -MSH-DC 表面分子 Ia^d、CD11c、CD80 和 CD86 的表达明显低于 Day7-DC。

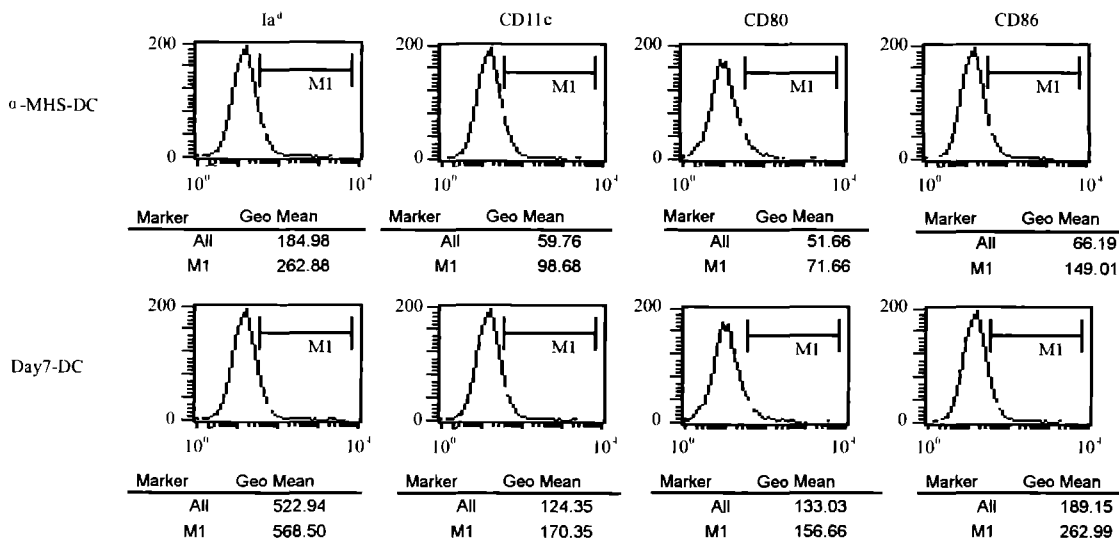


图 1 DC 的表型分析

Fig 1 Phenotypical analysis of DCs

2.2 DC 分泌 IL-12 水平的变化 α -MSH-DC 分泌 IL-12 的水平 (95.2 ± 6.3) pg/ml 明显低于 Day7-DC 分泌 IL-12 的水平 (197.1 ± 10.2) pg/ml, 有显著差异 ($P < 0.01$)。

2.3 移植心脏的存活时间 小鼠颈部异位心脏模型的手术成功率为 95% (18/19), 平均手术时间在 40~50 min。PBS 组移植心脏的存活时间为 (7.17 ± 0.26) d; α -MSH-DC 组移植心脏存活时间延长至 (15.08 ± 1.32) d, 与 PBS 组和 Day7-DC 组比较都有显著的差异 ($P < 0.01$); 而 Day7-DC 组移植心脏存活时间缩短至 (6.25 ± 0.61) d, 与 PBS 组比较有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.4 移植术后外周血细胞因子的水平 由图 2 显示, 与 Day7-DC 和 PBS 组比较, 移植后第 7 天 α -MSH-DC 组血清 IL-2 和 IFN- γ 水平都显著降低 ($P < 0.01$), 而 Day7-DC 和 PBS 组各因子水平无显著差异; 3 组间 IL-4 和 IL-10 的水平无显著差异。

3 讨论

DC 是惟一能够激活初始型 T 细胞的、功能最强的专职抗原提呈细胞, 故在识别和提呈抗原、启动免疫应答、诱导急性移植排斥反应中起关键作用。近年来的研究表明, DC 是一类异质性细胞群体, 具有不同的亚群和不同的功能状态, 不仅对启动和增

强免疫应答具有特别重要的作用, 而且还具有诱导免疫耐受的作用^[4,5]。随着 DC 发育成熟, 其表型特性和功能均可发生很大的变化, 例如 CD80、CD86 和 MHC 分子表达增高, 大量产生和分泌 IL-12, 促进 Th1 型反应^[6], 成熟 DC 的这些变化使其获得了强大的免疫激活能力。而表面缺乏共刺激分子, 特别是缺乏 CD80 (B7-1) 和 CD86 (B7-2) 的不成熟 DC 能在体外诱导同种异体抗原特异性的 T 细胞无能^[7], 或抗原特异性 T 细胞凋亡^[8]。有研究表明, 用 TGF- β 处理的小鼠 DC 可以使其协同刺激分子表达明显下调, 将此种供者 DC 在移植前给予受者,

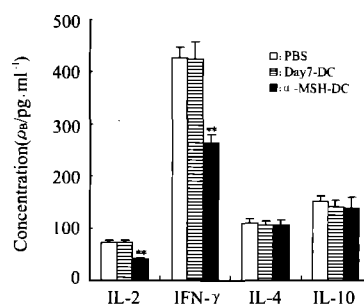


图 2 移植后 7 d C57BL/6 受者小鼠血清细胞因子水平的变化

Fig 2 Cytokine level in serum from C57BL/6 recipients 7 d after transplantation

** $P < 0.01$ vs PBS group; $n = 6$

能明显延长同种异基因小鼠心脏移植物的存活时间^[9]。用 IL-10 培养小鼠 BMDC, 在体外能诱导抗原特异性 T 细胞的低反应性^[10]。

本实验用有明确抗炎作用的神经免疫调节肽 α -MSH 处理小鼠 BMDC, 发现经 α -MSH 处理的 BMDC 与未处理组比较的确表达低水平的 CD80、CD86、CD11c、Ia 表面分子, 分泌低水平的 IL-12。将 α -MSH 处理的低表达表面分子的供者 DC 输入受者小鼠体内, 7 d 后再进行心脏移植术, 发现可明显延长同种异基因心脏移植物的存活时间。目前认为未成熟 DC 有诱导免疫耐受的作用, 那么 α -MSH 可能是通过抑制 DC 的成熟而发挥其免疫抑制作用。由于供者来源的 α -MSH-DC 低表达表面分子, 在与受者 naive T 细胞相互作用时, 抑制了共刺激通路, 使与之接触的 T 细胞对刺激无反应或低反应, 从而导致对移植物的耐受。但 α -MSH-DC 在体内环境下可能会逐渐成熟, 表面分子的表达随之增多, 限制了它诱导移植免疫耐受的效果。而 Day7-DC 表达高水平的表面分子, 进入体内后可以激活受者特异的 naive T 细胞, 从而加强了排斥反应, 使得移植物存活时间缩短。用 α -MSH 基因修饰 DC, 并联合应用封闭协同刺激分子的细胞毒性 T 细胞相关抗原 4 与免疫球蛋白 Fc 段的融合蛋白 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4-immunoglobulin, CTLA-4-Ig), 可能是更有效防治器官移植排斥反应的措施。

有研究显示, 抑制 T 辅助细胞 (Th1) 分泌促炎性细胞因子 (如 IL-2 和 IFN- γ) 有利于诱导免疫耐受^[11,12]。我们用 α -MSH 作用于 DC, 抑制了 DC 分泌 IL-12, 将这种 DC 输入受者小鼠体内, 发现与 Day7-DC 和 PBS 组相比, α -MSH-DC 组移植后 7 d 血清中 Th1 细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 的分泌水平都显著下降, 从而使 Th 反应向有利于免疫耐受的方向发展, 这可能也是 α -MSH-DC 诱导移植免疫耐受的机制之一, 但 3 组间 Th2 细胞因子 IL-4 和 IL-10 的水平无明显的差别。

由于品系纯、遗传背景清楚, 小鼠心脏移植模型是进行移植排斥反应免疫学研究的理想动物模型。经不断探索, 到目前为止已有腹部吻合法、颈部吻合法和颈部 Cuff 法^[13] 3 种模型制作方法。小鼠颈部异位心脏移植模型与腹部异位模型相比移植心脏的跳动更易观察, 对受者的创伤明显减小, 其中颈部 Cuff 法还具有操作简单、结果观察直观可靠的特点。因此, 本实验采用的是颈部 Cuff 法小鼠异位心脏移植模型。实验证实, 该方法手术成功率高

(95%), 手术时间短 (40~50 min), 移植心脏的跳动容易观察。但需要注意的是, 在操作过程中对组织的创伤会加速排斥反应的发生。因此, 在手术时应尽量保持无菌, 在套 Cuff 管时, 不能过分拉伸血管, 并尽可能减少手术镊插入血管时对血管内壁的损伤, 这都有利于提高手术的成功率。

【参考文献】

- [1] Becher E, Mahnke K, Brzoska T, et al. Human peripheral blood-derived dendritic cells express functional melanocortin receptor MC-1R[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 885(20):188-195.
- [2] Gatti S, Colombo G, Buffa R, et al. Alpha-melanocyte stimulating hormone protects the allograft in experimental heart transplantation [J]. *Transplantation*, 2002, 74(12): 1678-1684.
- [3] 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.
- [4] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity [J]. *Nature*, 1998, 392(6673):245-252.
- [5] Thomson AW, Lu L. Dendritic cells as regulators of immune reactivity: implications for transplantation [J]. *Transplantation*, 1999, 68(1):1-8.
- [6] Becher B, Blain M, Giacomini PS, et al. Inhibition of Th1 polarization by soluble TNF receptor is dependent on antigen-presenting cell-derived IL-12[J]. *J Immunol*, 1999, 162(2): 684-688.
- [7] Lu L, McCaslin D, Starzl TE, et al. Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145+, MHC class II+, B7-1dim, B7-2-) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes[J]. *Transplantation*, 1995, 60(12):1539-1545.
- [8] Lutz MB, Kukutsch NA, Menges M, et al. Culture of bone marrow cells in GM-CSF plus high doses of lipopolysaccharide generates exclusively immature dendritic cells which induce alloantigen-specific CD4 T cell anergy *in vitro* [J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30(4):1048-1052.
- [9] Lu L, Li W, Fu F, et al. Blockade of the CD40-CD40 ligand pathway potentiates the capacity of donor-derived dendritic cell progenitors to induce long-term cardiac allograft survival [J]. *Transplantation*, 1997, 64(12):1808-1815.
- [10] Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, et al. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells [J]. *J Immunol*, 1997, 159(10):4772-4780.
- [11] Hancock WW, Sayegh MH, Zheng XG, et al. Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(24):13967-13972.
- [12] Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, et al. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge *in vivo* inhibits Th1 cytokines but spares Th2 [J]. *J Exp Med*, 1995, 181(5):1869-1874.
- [13] Tomita Y, Zhang QW, Yoshikawa M, et al. Improved technique of heterotopic cervical heart transplantation in mice [J]. *Transplantation*, 1997, 64(11): 1598-1601.

【收稿日期】 2004-09-28

【修回日期】 2004-12-22

【本文编辑】 尹 茶