

· 论 著 ·

## 供体抗原特异性的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 对心脏移植小鼠体内 B 细胞功能的影响\*

肖 亚, 黄赤兵, 张良甫, 王平贤, 范明齐, 冯嘉瑜  
(第三军医大学新桥医院泌尿外二科, 重庆 400037)

**摘要:**目的 观察供体抗原特异性的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 对同种异系心脏移植小鼠受体 B 细胞功能的影响。方法 以 Balb/c 小鼠为供体、C57bl/6 小鼠为受体建立小鼠心脏移植模型, 于术前 1 d、术后 2 周分别将供体抗原特异性的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg (1×10<sup>6</sup>) 于尾静脉注入受体体内, 术后 1 个月抽取小鼠外周血, 分离 B 细胞, 检测其在抗 IgM 抗体刺激下的增殖情况, 检测小鼠外周血 IgG、IgA 水平, 以判断应用 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 后小鼠体内 B 细胞功能状态。实验组: 术前、术后 2 周使用 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg (n=8); 阳性对照组: 术前、术后未使用 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg (n=8); 空白对照组: 未移植小鼠 (n=8)。结果 实验证实, 实验组 B 细胞增殖水平最低, 空白对照组其次, 阳性对照组最高, 3 组差异均有统计学意义 (P<0.05)。外周血 IgG、IgA 水平检测证实, 实验组与空白对照组比较差异无统计学意义 (P>0.05), 二者明显低于阳性对照组 (P<0.01)。结论 经尾静脉注入 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 后心脏移植受体体内 B 细胞的功能可明显受到抑制, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 可通过对 B 细胞的这一作用调节受体免疫状态, 从而达到控制排斥反应, 诱导免疫耐受的作用。

**关键词:** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg; B 细胞; 抗体; 小鼠; 心脏移植

中图分类号: R654.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)14-1789-03

### The influence of donor antigenic specificity regulatory T cells exert to B cell's function of rats after heart transplantation in mice\*

XIAO Ya, HUANG Chi-bing, ZHANG Gen-fu, et al.

(Second Department of Urology, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract: Objective** To study the influence of donor antigenic specificity CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells exert to B cell's function of rats after heart transplantation in mice. **Methods** We first established heart transplantation model in rats, Balb/c rats as donor, C57bl/6 rats as recipient. The day before the operation and the day after two weeks of the operation, donor antigenic specificity CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells (1×10<sup>6</sup>) was injected to the recipient by caudal vein. After one month, we drew the peripheral blood of recipient rat, isolated B cells, and detected the proliferation level of B cells under the stimulation of IgM antibody. The level of IgG and IgA in the peripheral blood of recipient rat was detected too. So we could evaluate the functional status of B cells in vivo after heart transplantation. The experiment was divided into 3 groups: experimental group (n=8), donor antigenic specificity CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells was injected to the recipient before and after operation; positive control group (n=8), donor antigenic specificity CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells wasn't injected to the recipient before and after operation; blank group (n=8), normal rats without transplantation. **Results** The experiment proved that the proliferation level of B cells was lowest in experimental group, and highest in positive control group. There was significant deviation in three groups (P<0.05). The level of IgG and IgA in the peripheral blood wasn't significant deviation between experimental group and blank group (P>0.05), while the level of these two group was significantly lower than the level of positive control group. **Conclusion** The functional of recipient's B cells was suppressed when donor antigenic specificity CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells was injected to the recipient by caudal vein, which shows that donor antigenic specificity CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells can adjust the immune state of recipient by this way. That provides us a new way to suppress rejection and induce immune tolerance after heart transplantation.

**Key words:** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg; B cells; Antibody; rat; kidney transplantation

由于免疫抑制剂的发展以及配型技术和临床移植水平的提高, 心脏移植近期(术后 1 年内)效果已显著改善。然而, 迄今为止, 尚无阻抑慢性排斥发生和发展的有效药物与临床干预手段。在对慢性排斥临床病例的观察和实验研究中, 抗原抗体复合物在移植物的沉积和由此介导的内皮细胞慢性损伤是慢性排斥共同的临床表现<sup>[1-3]</sup>。因此, 欲抑制心脏移植术后慢性排斥, 则必须干预 B 细胞排斥性抗体形成<sup>[4]</sup>。本实验拟探讨 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 体内应用对小鼠心脏移植受体 B 细胞功能的影响, 研究 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 在移植术后控制排斥反应, 诱

导免疫耐受中的作用机制, 为推动 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 的临床应用奠定基础。

#### 1 材料与方 法

**1.1 实验动物及主要仪器、试剂** Balb/c 小鼠 30 只, 雌雄不限, 体质量 20~25 g。C57bl/6 小鼠 30 只, 雌雄不限, 体质量 25~30 g, 由第三军医大学大坪医院动物实验中心提供; FITC-labeled Anti Rat CD8、FITC-labeled Anti Rat CD25 (美国 Pharmingen 公司); 抗 FITC 抗体——磁珠(百奥科生物技术有限公司); 免疫磁珠分选(MACS)磁力架、auto MACS 磁性分离

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571863)。

柱(德国 Miltenyi 公司); IgA、IgG 抗体检测试剂盒(迈新公司);  $^3\text{H-TdR}$ (中国原子能研究所)。

## 1.2 实验方法

**1.2.1  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg 供体抗原特异性的诱导** 以 0.3% 戊巴比妥钠注射液(1 mL/100 g 体重)腹腔注射将 C57bl/6 小鼠麻醉,无菌条件下切取小鼠脾脏,将其剪碎,研磨后过 200 目筛网及 400 目尼龙网滤器,以小鼠淋巴细胞分离液分离小鼠脾脏单个核细胞,置于含 10% BSA 的 RPMI-1640 培养液中备用。无菌条件下切取 Balb/c 小鼠心脏,制备心组织匀浆抗原。将 C57bl/6 小鼠脾脏单个核细胞与 Balb/c 小鼠心脏组织匀浆抗原在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下混合培养 24 h。采用 T 细胞纯化柱分离供体抗原特异性诱导后的 Balb/c 小鼠脾脏 T 细胞,以 CD8-FITC 抗体和抗 FITC 标记的磁珠相结合阴性选择法剔除  $\text{CD8}^+$  T 细胞,再以 CD25-FITC 抗体和抗 FITC 标记的磁珠相结合的阳性选择法分选获得  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 细胞,流式细胞仪检测所获细胞纯度<sup>[5]</sup>。将细胞浓度调整为  $2 \times 10^6/\text{mL}$ ,备用。

**1.2.2 小鼠心脏移植模型的建立** 以 Balb/c 小鼠为供体, C57bl/6 小鼠为受体建立小鼠心脏移植模型,对 Chenzh 的小鼠颈部异位心脏移植模型进一步改进。方法:在颈总动脉远心端将其横断,向近心端剖开,将此断端与供心升主动脉吻合,静脉吻合仍采用端侧吻合的方法。建立了小鼠颈部异位心脏移植模型。术后通过视诊、触诊及心电图检查,观察移植心搏动情况。移植受体于术前及术后 30 min 各给予青霉素 100 万 u/kg 各 1 次,预防感染。术后腹腔注射环孢霉素  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,连续 10 d。

实验分组:实验组( $n=8$ ),受体于术前 1 d、术后 2 周分别经尾静脉注入供体抗原特异性的  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg 各  $1 \times 10^6$ ;阳性对照组( $n=8$ ),建立小鼠心脏移植模型,术前、术后不给予抗排斥措施;空白对照组( $n=8$ ),正常未进行心脏移植的 C57bl/6 大鼠。

**1.2.3 心脏移植受体体内 B 细胞功能的检测** 于心脏移植术后 1 个月切取小鼠脾脏,分离单个核细胞,按试剂盒说明检测血清中 IgG、IgA 水平。以尼龙毛柱分离获得小鼠 B 细胞,将其置于含 10% BSA 的 RPMI-1640 培养液中培养,以 IgM 抗体刺激 B 细胞增殖,培养 72 h 后掺入  $^3\text{H-TdR}$ (5 uCi/mL),并继续培养 18 h,以细胞收集仪收集细胞至玻璃纤维膜上,液体闪烁测定 cpm 值,判断各组 B 细胞增殖水平。

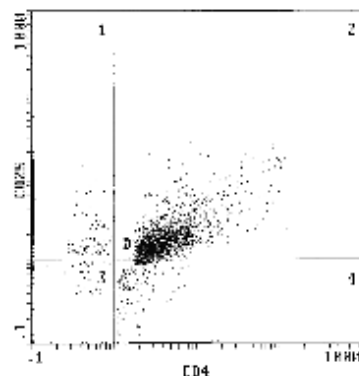
**1.3 统计学方法** 实验数据采用 SPSS12.0 软件进行统计分析。结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。统计方法为单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 流式细胞仪检测供体抗原特异性的  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg 纯度** 经流式细胞仪检测以免疫磁珠法分离所获供体抗原特异性的  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg 纯度为 87.3%(图 1),达到实验要求。

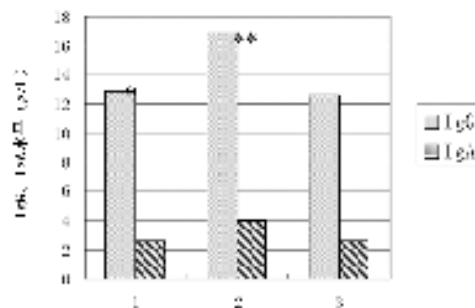
**2.2 小鼠心脏移植受体 IgG、IgA 水平的检测** 正常 C57bl/6 小鼠外周血 IgG 水平为  $(12.58 \pm 1.49) \text{ g/L}$ , IgA 水平为  $(2.58 \pm 0.16) \text{ g/L}$ 。以 Balb/c 小鼠为供体, C57bl/6 小鼠为受体建立心脏移植模型后,受体在给予  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg 干预时术后 1 个月外周血 IgG 水平为  $(12.83 \pm 1.60) \text{ g/L}$ , IgA 水平为  $(2.61 \pm 0.23) \text{ g/L}$ 。受体在没有  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg 干预时术后 1 个月外周血 IgG 水平为  $(16.81 \pm 1.33) \text{ g/L}$ , IgA 水平为  $(3.97 \pm 0.41) \text{ g/L}$ ,3 组之间差异均有统计学意义(图 2)。实验结果证实供体抗原特异性的  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg 经尾静脉注入受体大

鼠体内后对其体内的 B 细胞的分泌功能产生了明显的影响。



$\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg 纯度为 87.3%。

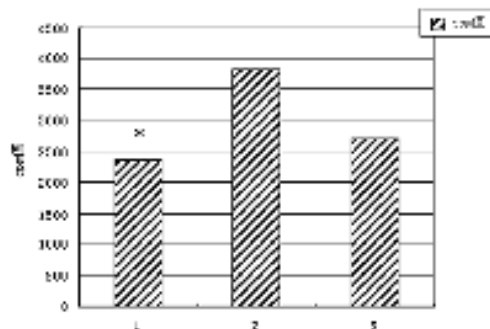
图 1 免疫磁珠法分离所获  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T 细胞纯度



1:实验组;2:阳性对照组;3:空白对照组。与空白对照组比较,\*  $P > 0.05$ ;与实验组和空白对照组比较,\*\*  $P < 0.05$ ;与阳性对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠脾脏中 IgG、IgA 水平

**2.3 小鼠心脏移植受体 B 细胞增殖能力的检测** 正常 C57bl/6 小鼠脾脏 B 细胞在 IgM 抗体刺激下培养 90 h 后 cpm 值为  $2717.39 \pm 356.23$ ;以 Balb/c 小鼠为供体, C57bl/6 小鼠为受体建立心脏移植模型后,受体在给予  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg 干预时脾脏 B 细胞在 IgM 抗体刺激下培养 90 h 后 cpm 值为  $2351.11 \pm 135.09$ ;无  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg 干预时脾脏 B 细胞在 IgM 抗体刺激下培养 90 h 后 cpm 值为  $3819.80 \pm 232.26$ 。3 者之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 3)。实验结果证实  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg 进入受体体内后对 B 细胞的增殖能力产生了显著的影响。



1:实验组;2:阳性对照组;3:空白对照组。与空白对照组比较,\*  $P < 0.05$ 。

图 3 B 细胞体外刺激培养增殖水平

**2.4 小鼠移植心脏存活情况观察** 实验组小鼠移植心脏存活时间为  $(93.63 \pm 14.04) \text{ d}$ ,长于阳性对照组的  $(72.38 \pm 11.08)$

d,二者差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示供体抗原特异性的  $CD4^+CD25^+$  Treg 在受体体内能够特异性地阻断 B 细胞对移植心脏的免疫反应,从而达到控制排斥反应程度,诱导免疫耐受,延长移植存活时间的作用。

表 1 实验组与阳性对照组小鼠移植心脏存活时间(d)

组别	实验条件	移植肾存活时间
实验组	移植受体,给予 $CD4^+CD25^+$ Treg 治疗	$93.63\pm 14.04^*$
阳性对照组	移植受体	$72.38\pm 11.08$

与阳性对照组比较,\*: $P<0.05$ 。

### 3 讨 论

同种器官移植中排斥反应主要由受体的抗原特异性 T 细胞介导,这些抗原特异性 T 细胞对移植体不反应或低反应是诱导耐受的关键。20 世纪 90 年代初,Qin 等<sup>[5]</sup>发现,采用非清除性抗 CD4 单抗可使小鼠产生对移植物的耐受,将耐受小鼠  $CD4^+$  T 细胞过继输入未移植同品系小鼠,可使其获得对同基因移植物的耐受,这一过程可连续传代,表明过继输入的  $CD4^+$  T 细胞具有特殊的功能,可使受体针对移植体抗原的 T 细胞产生耐受,该现象被称作传染性耐受(Infectious tolerance)。但并非所有  $CD4^+$  T 细胞均具有传染性致耐受能力,直到近年,才进一步明确:该类  $CD4^+$  T 细胞是一群  $CD4^+CD25^+$  T 细胞,它们通过细胞-细胞直接接触机制“传染”抗原特异性的抑制信号给  $CD4^+$  细胞,使之成为具有抑制功能的 Th,抑制受体抗原特异性  $CD4^+$  T、 $CD8^+$  T 对移植抗原的反应,控制排斥反应<sup>[6]</sup>。器官移植是挽救终末期患者的有效手段,自 20 世纪 80 年代中期,强力免疫抑制剂应用于临床,急性排斥反应得到了有效的控制。目前在临床治疗中,慢性排斥反应是移植后器官功能丧失的主要原因。因此,探索一条控制慢性排斥反应的治疗措施已成为器官移植领域的当务之急。既往的研究证实,抗原抗体复合物在移植组织上的沉积、轻度的细胞性排斥和由此引起的血管内皮细胞损伤与激活,并触发不适当的修复反应等<sup>[1-3]</sup>是引起慢性排斥反应的主要机制。其中由移植体抗原刺激启动的体液免疫应答生成抗体并由此而形成的抗原抗体复合物,与通过激活补体和抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用,是导致慢性排斥反应发生的最主要致病因素。B 细胞是机体惟一的抗体形成细胞,所以欲控制慢性排斥反应的主要致病因素——体液免疫应答,则必须调控体液免疫的主要功能执行细胞——B 淋巴细胞<sup>[7-10]</sup>。迄今,国内外在这方面采取的干预措施有:利用特异性的单克隆或多克隆抗体阻断受体本身的排斥性抗体与移植体抗原的结合,或阻断清除受体排斥性 B 细胞等<sup>[8]</sup>。但这些措施由于有效靶阻率很低、费用昂贵,且不良反应很多,因此没有成为也够不上调控慢性排斥反应的理想的常规应用手段。

在前期实验中证实,体外淋巴细胞混合培养中,与  $CD4^+CD25^+$  Treg、供体淋巴细胞混合培养时 B 细胞功能可明显受到抑制,表现为细胞培养上清中的 IgG、IgA 水平明显降低。进一步的研究证实  $CD4^+CD25^+$  Treg 对效应性 B 细胞的抑制作用主要是通过细胞间直接接触机制发生作用,TGF- $\beta_1$  和 CTLA4 在这一机制中起着一定作用。以供心脏组织匀浆抗原刺激可使受体  $CD4^+CD25^+$  Treg 获得供体抗原特异性,其抑制效应性淋巴细胞对供体抗原的反应能力明显增强,而不影响效应性 T 细胞对第 3 方抗原的免疫应答<sup>[9]</sup>。 $CD4^+CD25^+$  Treg 细胞具有负调 B 细胞抗体形成的这一免疫学特性,使其具备

了对抗慢性排斥反应的潜能。基于以上实验结果,作者推测采用供体特异性的  $CD4^+CD25^+$  Treg 细胞体内应用,可选择性阻抑受体内的供体反应性 B 细胞,从免疫应答起始阶段阻断供体反应性 B 细胞产生供体抗原特异性抗体,而不造成对受体免疫功能的进一步阻抑,从而达到控制慢性排斥反应的理想状态。在本实验中,在体使用了供体抗原特异性的  $CD4^+CD25^+$  Treg,从实验结果可以看出,小鼠心脏移植受体应用供体抗原特异性  $CD4^+CD25^+$  Treg 后,其外周血清中 IgG、IgA 水平与空白对照组比较差异无统计学意义,二者均明显低于阳性对照组,提示体内应用的供体抗原特异性的  $CD4^+CD25^+$  Treg 特异性地阻断了 B 细胞对移植心脏的免疫反应。体外刺激实验进一步证实供体抗原特异性的  $CD4^+CD25^+$  Treg 在体应用后 B 细胞的增殖活性明显降低。

本实验验证了供体抗原特异性的  $CD4^+CD25^+$  Treg 在体应用后对 B 细胞的特异性免疫抑制作用,进一步阐明 Treg 细胞对抗慢性移植排斥反应的免疫学机制,为推动抗移植后慢性排斥反应的深入研究和对开发利用 Treg 细胞作为介导其他实体器官移植耐受的临床应用工具细胞铺垫理论、应用和实验支持基础。

### 参考文献:

- [1] He X, Johnston A. Early acute rejection does not affect chronic allograft nephropathy and death censored graft failure[J]. Transplantation Proceedings, 2004, 36(10): 2993.
- [2] Yvo WJ, Sijpkens SA, Joosten, et al. Chronic rejection in renal transplantation[J]. Transplantation Reviews, 2003, 17(3):117.
- [3] Scott HA, Laurence A, Turka, et al. Immunotherapy as a means to induce transplantation tolerance[J]. Current Opinion in Immunology, 2002, 14(5):660.
- [4] Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, et al. Homeostasis and anergy of  $CD4^+CD25^+$  suppressor T cells in vitro[J]. Nature Immunology, 2002, 3(1):33.
- [5] Qin S, Cobbold SP, Pope H, et al. "Infectious" transplantation tolerance[J]. Science, 2005, 259(97):974.
- [6] Lechler RI, Ng WF, Camara NO. Infectious tolerance Mechanisms and implications[J]. Transplantation, 2007, 72(8 Suppl):S29.
- [7] 王琦,郑峻松,张良甫,等. Foxp3 基因转染小鼠  $CD4^+CD25^-$  T 细胞对同种 T 细胞增殖反应的影响[J]. 重庆医学, 2006, 35(4):1671.
- [8] Kathryn J, Wood, Shimon S. Regulatory lymphocytes:regulatory T cells in transplantation tolerance[J]. Nature Reviews Immunology, 2003, 3:199.
- [9] Wood K, Luo SQ, Ahmed A. Regulatory T cells:potential in organ transplantation [J]. Transplantation, 2004, 77(1):6.
- [10] Park YH, Min SK, Lee JN, et al. Risk factors on graft survival of living donor kidney transplantation[J]. Transplantation Proceedings, 2004, 36(7):2023.