

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.13.001

探讨 $\gamma\delta$ T 细胞在小鼠胰岛移植排斥反应中的作用*李传贵^{1,2}, 宋亚军², 杨加彩², 黄赤兵^{2△}

(1. 解放军第八十八医院泌尿外科, 山东泰安 271000; 2. 陆军军医大学新桥医院泌尿外科, 重庆 400037)

[摘要] **目的** 通过胰岛移植模型, 观察移植后小鼠血糖及存活时间, 从而探讨肠上皮 $\gamma\delta$ T 细胞在胰岛移植排斥反应中的作用。**方法** 建立小鼠胰岛移植模型, 分为野生型小鼠组、 $\gamma\delta$ 敲基因小鼠组和 $\gamma\delta$ 敲基因回输 $\gamma\delta$ T 细胞小鼠组, 移植后分别于 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29 d 测量空腹血糖, 并于术后两周取移植植物观察病理情况。**结果** 术后野生型小鼠组和 $\gamma\delta$ 敲基因回输 $\gamma\delta$ T 细胞小鼠组移植后血糖升高明显慢于 $\gamma\delta$ 敲基因小鼠组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), $\gamma\delta$ 敲基因回输 $\gamma\delta$ T 细胞小鼠组与野生型小鼠组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。野生型小鼠组存活时间 (27 ± 2) d 及 $\gamma\delta$ 敲基因再回输组小鼠组存活时间 (24 ± 1) d 均明显长于 $\gamma\delta$ 敲基因小鼠组的 (17 ± 3) d, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 肠上皮 $\gamma\delta$ T 细胞作为一种特殊的 T 细胞在胰岛移植排斥反应中起着重要作用。

[关键词] $\gamma\delta$ T 细胞; 血糖; 胰岛移植; 移植排斥反应**[中图法分类号]** R392.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)13-1705-04Study on the effect of $\gamma\delta$ T cell activated in mice islet transplantation rejection*LI Chuangui^{1,2}, SON Yajun², YANG Jiakai², HUANG Chibing^{2△}

(1. Department of Urology, No. 88 Hospital of PLA, Tai'an, Shandong 271000, China;

2. Department of Urology, Xinqiao Hospital of Army Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** After the islet transplantation, observed blood glucose and survival time in the islet transplantation mice model to explore the effect of intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cell in islet transplantation rejection. **Methods** Established the mice model of islet transplantation, divided into wild type mice group, $\gamma\delta$ gene knockout mice group and $\gamma\delta$ gene knockout $\gamma\delta$ T cell reinfusion mice group, observed blood glucose in 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 days after surgery and pathological conditions after two weeks of transplantation. **Results** After transplantation, the rising blood glucose of wild type mice group and $\gamma\delta$ gene knockout $\gamma\delta$ T cell reinfusion mice group were significantly slower than that of $\gamma\delta$ gene knockout mice group ($P < 0.05$), but there was no significant difference in between two groups ($P > 0.05$). The survival time of wild-type mice group was (27 ± 2) days, and $\gamma\delta$ gene knockout $\gamma\delta$ T cell reinfusion mice group was (24 ± 1) days, they were significantly longer than (17 ± 3) days of $\gamma\delta$ gene knockout mice group ($P < 0.05$). **Conclusion** As a special kind of T cells, $\gamma\delta$ T intestinal epithelial cell plays an important role in the islet transplantation rejection.

[Key words] $\gamma\delta$ T cell; blood glucose; islet transplantation; transplant rejection

I 型糖尿病是一种 T 淋巴细胞介导的自身免疫性疾病, 属于器官特异性自身免疫性疾病。目前胰岛移植是治疗 I 型糖尿病的理想方法, Edmonton 方案 (即应用不含激素的免疫抑制剂, 并采用改良的非连续密度梯度离心法分离胰岛, 使胰岛移植治疗 I 型糖尿病的成功率大幅度提高) 的推广, 标志着胰岛移植具备了临床应用的实际价值, 但是胰岛移植后移植植物长期存活仍是一个有待解决的关键问题。其中, 排斥反应是导致移植后器官功能丧失的最主要原因, 是移

植物长期存活的主要障碍^[1-3]。激活后的 $\gamma\delta$ T 细胞可内源性诱导 Treg 细胞、分泌白细胞介素 (IL)-10 和转化生长因子- β (TGF- β) 等免疫抑制因子, 从而发挥免疫抑制作用。结合以上观点, 本文设计小鼠胰岛移植模型, 进一步探讨 $\gamma\delta$ T 细胞在胰岛移植排斥反应中的作用^[3]。

1 材料与方法

1.1 材料 B6BL/c 小鼠, 8~12 周龄, 雄性, 若干, 作为供体, 分离提取胰岛细胞。野生型 C57 小鼠, 8~12

周龄, 雄性, 健康状况良好设为野生型小鼠组; 部分野生型 C57 小鼠用于提取肠上皮内 $\gamma\delta$ T 细胞, 纯化后回输到 $\gamma\delta$ 敲基因小鼠体内以此设立 $\gamma\delta$ 敲基因回输 $\gamma\delta$ T 细胞小鼠组; $\gamma\delta$ 敲基因小鼠, 8~12 周龄, 雄性, 健康状况良好, 设为 $\gamma\delta$ 敲基因小鼠组, 分别建立 I 型糖尿病模型。所有小鼠均购于陆军军医大学动物实验中心, 许可证号: SCXK(渝)201020102、SCXK(军)20102007, 清洁(SPF)级实验动物房笼养 1 周后进行实验, 每组 10 只小鼠。

1.2 实验方法

1.2.1 建立 $\gamma\delta$ 敲基因再回输 $\gamma\delta$ T 细胞小鼠模型

取与 $\gamma\delta$ 敲基因小鼠的同品系野生型 C57 小鼠, 麻醉后浸泡于 75% 乙醇中 10 min, 置于无菌操作台, 开腹后剪取小肠置于无菌 PBS 液中, 彻底清除肠道内容物, 剪成 0.5 cm 小段后放入预先配制的消化液中 (RPMI-1640 液中加入 1 mmol/L 二硫苏糖醇、1.5 mmol/L 乙二醇四乙酸、10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸), 265 r/min, 37 °C 震荡消化 30 min。消化后 200 目过滤, 取悬液 1 500 r/min 离心 5 min, PBS 清洗 1 遍后, 取细胞沉淀于 70% Percoll 混匀, 上层缓慢加入 40% Percoll, 1 360 r/min 离心 20 min (Eppendorf Centrifuge 5424 离心机), 分界面周围的细胞即为肠上皮内淋巴细胞。

取肠上皮内淋巴细胞用含钙、10% 胎牛血清 (FBS)、500 U/mL 青霉素和链霉素及 1 μ L/mL 非必需氨基酸的 RPMI-1640 培养基培养 (赛默飞世尔生物化学制品有限公司), 并以 2 μ L/mL Con A、1 μ L/mL PMA、100 μ L/mL IL-2 (美国 R&D 公司) 及 1 mmol/L 的唑来膦酸 (美国 Sigma 公司) 刺激, 分别于 1、7、14、21、28 d 经流式细胞技术 (美国 Applied Biosystems 公司) 检测其 $\gamma\delta$ T 细胞含量。取经过刺激培养, 且纯度较高的 $\gamma\delta$ T 细胞尾静脉回输给 $\gamma\delta$ 敲除基因小鼠, 每只小鼠输注 5×10^6 个 $\gamma\delta$ T 细胞。

1.2.2 建立胰岛移植模型

1.2.2.1 建立 I 型糖尿病模型 各组小鼠禁食 12 h, 尾尖取血测空腹血糖 (德国罗氏公司)。一次性腹腔注射 1% 链脲佐菌素溶液 150 mg/kg, 72 h 后测空腹血糖, 空腹血糖连续 2 d 高于 16.7 mmol/L, 且出现明显多饮、多食和多尿症状, 说明造模成功^[4]。造模后每天更换小鼠垫料, 保持环境干燥清洁。

1.2.2.2 分离纯化胰岛细胞 Babc 小鼠, 术前禁食 12 h; 用 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后固定四肢成仰卧位, 腹部备皮消毒, 行 V 字型切开腹腔, 充分暴露胆总管和胰管; 用 1 号丝线结扎近十二指肠端胆总管, 结扎时紧贴十二指肠壁; 破心放血; 在胆总管近肝门端用 31G 静脉穿刺针灌注冷的 0.5 mg/mL V 型胶原酶 (美国 Sigma 公司) 2~3 mL, 使胰腺充分膨胀; 迅速摘

取整个胰腺移入预置 2 mL 胶原酶的 50 mL 三角烧瓶中, 放入 38 °C 恒温水浴锅中静止消化; 消化 25 min 后取出烧瓶, 震荡使胰腺组织充分分散, 成泥沙状; 加入 4 °C 含 10% 胎牛血清的 Hanks 液 20 mL 终止消化, 用 50 目不锈钢网过滤, 去除未消化的组织; 将滤过的细胞悬液移入 50 mL 离心管中 4 °C, 1 000 r/min 离心 2 min, 去上清后重复离心 1 次; 将分离好的胰岛组织沉淀用 Histopaque-1077 分离液混悬, 上层加 RPMI-1640 培养基, 2 000 r/min 离心 20 min (缓慢加速, 减速) 后吸取分界面的胰岛细胞, 用 4 °C Hanks 液离心洗涤 2 次备用; 用双硫脲 (DTZ) 染液 1 : 10 与所得胰岛混合 10 min 后镜下观察, 直径 50~150 μ m, 呈猩红色的细胞即为胰岛细胞^[5]。

1.2.2.3 胰岛移植 挑取直径大于 100 μ m 的胰岛 300~400 个 (图 1), 低速离心后加入 PE50 软管内备用。取受体小鼠麻醉, 左肋下开腹, 充分暴露左肾, 于肾下极包膜处剪开一长约 0.3 cm 切口。PE50 管插入肾包膜约 1 cm, 缓慢注入, 同时缓慢退出软管, 为胰岛创造空间 (图 2)。移植后分别于 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29 d 测量空腹血糖, 并于术后两周取移植植物观察病理情况。

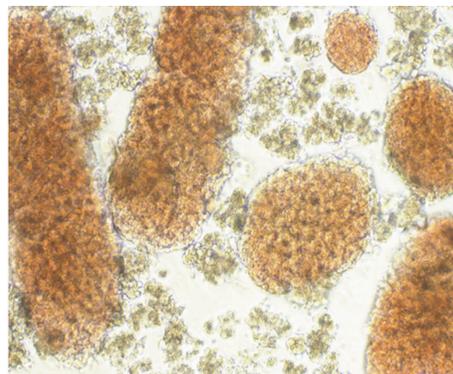


图 1 胰岛细胞团



图 2 胰岛移植

1.3 观察指标 (1) 小鼠小肠 $\gamma\delta$ T 细胞体外刺激培养前后流式细胞技术检测; (2) 血糖值: 每天剪取小鼠尾部血管少许血液检测血糖; (3) 存活时间: 从建立糖尿病模型后开始到小鼠死亡, 记录为存活时间; (4) 病理检查: 移植后两周取肾, HE 染色后在显微镜下

读片。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠小肠 $\gamma\delta$ T 细胞体外刺激培养前后流式细胞技术检测结果 野生型 C57 小鼠分离纯化 $\gamma\delta$ T 细胞,初步比例约占 25%(图 3)。通过进一步刺激培养,28 d 后流式细胞仪鉴定可获得纯度约 60%的 $\gamma\delta$ T 细胞(图 4),并静脉回输至 $\gamma\delta$ 敲基因小鼠体内建立 $\gamma\delta$ 敲基因回输 $\gamma\delta$ T 细胞小鼠。

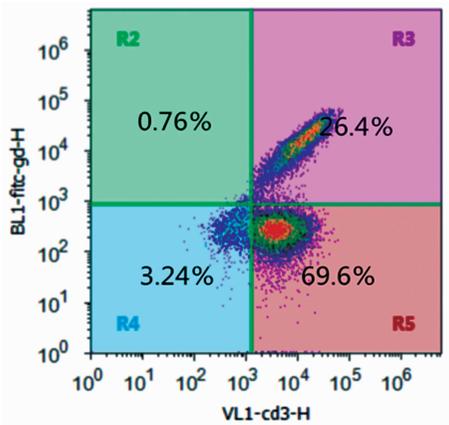


图 3 初步分离纯化后所得 $\gamma\delta$ T 细胞流式图

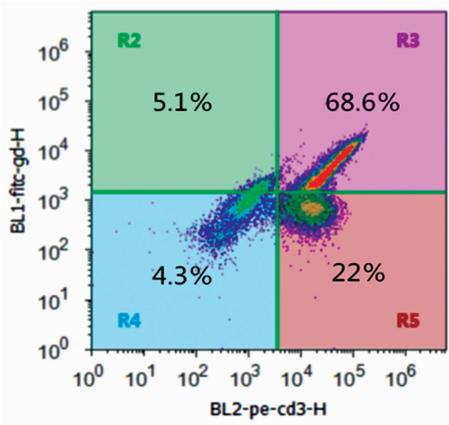


图 4 培养刺激后所得 $\gamma\delta$ T 细胞流式图

2.2 I 型糖尿病小鼠造模及移植后存活情况 各组小鼠建立 I 型糖尿病小鼠均达到 10 只,造模过程中野生型小鼠组出现 1 只因血糖过高死亡,其余两组均有 2 只因感染死亡。野生型小鼠组存活时间(27 ± 2)d 和 $\gamma\delta$ 敲基因再回输小鼠组存活时间(24 ± 1)d 长于 $\gamma\delta$ 敲基因小鼠(17 ± 3)d,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 血糖值 图中野生型小鼠组在(24 ± 2)d 移植物基本被排斥, $\gamma\delta$ 敲基因小鼠静脉再回输 $\gamma\delta$ T 细胞小鼠组在(21 ± 1)d 基本被排斥, $\gamma\delta$ 敲基因型小鼠组在(14 ± 2)d 基本被排斥。野生型小鼠组和 $\gamma\delta$ 敲基因再回输小鼠组血糖升高明显慢于 $\gamma\delta$ 敲基因型小鼠组,

差异有统计学意义($P < 0.05$);而野生型小鼠组和 $\gamma\delta$ 敲基因再回输小鼠组血糖变化无明显差异($P > 0.05$)。见图 5。

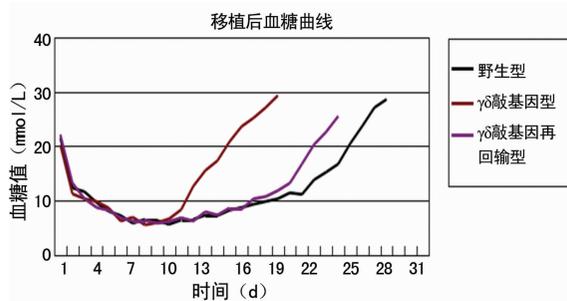


图 5 各组小鼠胰岛移植后血糖变化曲线

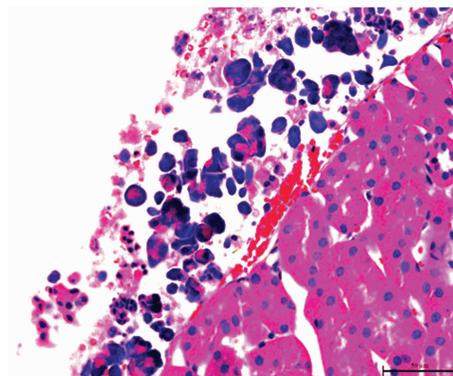


图 6 野生型 C57 小鼠移植病理(HE×200)

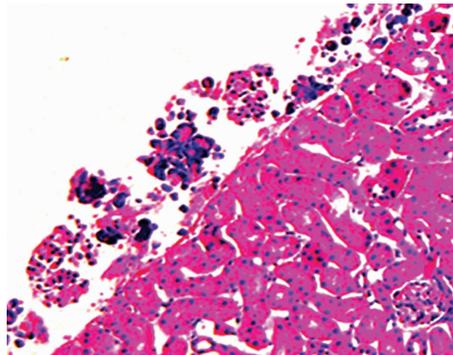


图 7 $\gamma\delta$ 敲基因小鼠移植病理(HE×200)

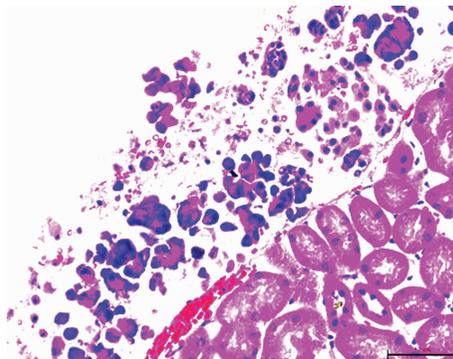


图 8 $\gamma\delta$ 敲基因再回输型小鼠移植病理(HE×200)

2.4 病理检查 观察移植物移植 2 周后细胞形态的完整性,图中 HE 染色,肾组织外蓝色细胞即为小鼠胰岛细胞。显微镜下结果显示宿主野生型 C57 小鼠肾包膜内的胰岛细胞形态规整(图 6), $\gamma\delta$ 敲基因再回

输小鼠组胰岛细胞数量较多,但形态有一定程度的破坏(图 8),而 $\gamma\delta$ 敲基因小鼠胰岛细胞数量少,且形态不规则(图 7)。

3 讨 论

糖尿病是一种严重影响人类生活质量的慢性病,其患病率近年来不断上升,目前的治疗方法,如胰岛素治疗,只能控制病情进展,不能根治此类疾病^[6-8]。而胰岛移植是一种有望彻底根治糖尿病,特别是 I 型糖尿病的治疗方法。但是同种异体胰岛移植后产生的免疫排斥反应,导致移植后胰岛细胞凋亡,是影响胰岛移植成功率的最大障碍。Albert 大学进行的 65 例胰岛移植患者在应用常规药物进行移植后免疫抑制时发现,胰岛移植相对于其他脏器移植有更大比例的患者因出现更复杂且更严重的不良反应而联用更多种类的药物,甚至停用免疫抑制剂,最后导致移植物丢失。因此,如何诱导并维持免疫耐受是一个急需解决的难题,目前诱导和维持免疫耐受的方法很多,如特异性全血输注,脾细胞或骨髓细胞输注等方法^[9-10]。但是由于操作难度大,流程复杂,效率低和不良反应大等原因而不能在临床推广。在免疫耐受的机制中, $\gamma\delta$ T 细胞起着非常重要的作用。 $\gamma\delta$ T 细胞激活后既可以诱导抗原特异性 Treg 细胞增殖,还可以分泌大量的 IL-10、TGF- β 及巨噬细胞移动抑制因子等抑制性细胞因子。现有大量文献证明 Treg 是机体维持自身耐受的重要组成部分,其在治疗胰岛移植排斥反应中起着诱导同种移植耐受和维持自身耐受的双重作用^[11-12]。IL-10 和 TGF- β 作为抑制性细胞因子,是 $\gamma\delta$ T 细胞和 Treg 发挥作用的直接效应分子。这说明通过激活 $\gamma\delta$ T 细胞、扩增 Treg 并分泌 IL-10 和 TGF-B 等细胞因子,可以抑制免疫排斥反应。

本研究中,野生型糖尿病小鼠和 $\gamma\delta$ 敲基因再回输 $\gamma\delta$ T 细胞型糖尿病小鼠移植后血糖很快恢复正常,且能保持 3 周处于正常水平,并且术后存活时间更长,而 $\gamma\delta$ 敲基因型糖尿病小鼠移植后 2 周血糖即重新升高到糖尿病水平。病理结果同样提示移植 2 周后,野生型糖尿病小鼠和 $\gamma\delta$ 敲基因再回输 $\gamma\delta$ T 细胞型糖尿病小鼠肾包膜下仍然有大量形态较规则的胰岛细胞团,而 $\gamma\delta$ 敲基因型糖尿病小鼠肾包膜下只有少量且形态模糊的胰岛细胞团。说明 $\gamma\delta$ T 细胞在胰岛移植后保持移植物存活,维持血糖正常中起着重要作用,对在胰岛移植中寻找诱导免疫耐受提供了一种新的思路,为进一步研究 $\gamma\delta$ T 细胞在胰岛移植诱导免疫耐受中的作用机制及信号靶点奠定了基础。

尽管胰岛移植能治愈糖尿病,且其原理已明确,但是关于移植的时机、具体的量效关系、宿主遗传背景及年龄等具体因素还需要进一步研究^[13]。同时,移

植后如何长期维持移植植物活性的具体方案还不成熟。不过随着 $\gamma\delta$ T 细胞诱导免疫耐受研究的不断深入,胰岛移植治疗糖尿病的应用前景将很广阔。

参考文献

- [1] 卫国红,蔡德鸿,翁建平. 埃德蒙顿方案后的同种异体人胰岛移植进展[J]. 中华糖尿病杂志,2005,13(6):475-477.
- [2] POZZILLI P, MADDALONI E, BUZZETTI R. Combination immunotherapies for type 1 diabetes mellitus[J]. Nat Rev Endocrinol,2015,11(5):289-297.
- [3] 刘长青,宋立江,蒋东升,等. 不同种属和禁食时间对链脲佐菌素诱导糖尿病模型的影响研究[J]. 实用预防医学,2010,17(2):377-378.
- [4] 程愈,申晶,郝好杰,等. 单次大剂量链脲佐菌素诱导的糖尿病模型 β 细胞凋亡的研究及意义探讨[J]. 解放军医学学报,2013,34(7):756-759.
- [5] 肖芳,李文娟,侯新国,等. 大鼠胰岛分离及纯化方案的改进[J]. 山东大学学报,2012,50(3):8-11.
- [6] COGGER K, NOSTRO M C. Recent advances in cell replacement therapies for the treatment of type 1 diabetes [J]. Endocrinology,2015,156(1):8-15.
- [7] JIANG Y, GAO H, KRANTZ A M, et al. Reduced GABAergic inhibition of kidney-related PVN neurons in streptozotocin-treated type 1 diabetic mouse[J]. J Neurophysiol,2013,110(9):2192-2202.
- [8] ZMUDA E J, POWELL C A, HAI T. A Method for murine islet isolation and subcapsular kidney[J]. Transplantation J,2011,3(14):2096.
- [9] GANGEMI A, SALEHI P, HATIPOGLU B, et al. Islet transplantation for brittle type 1 diabetes: the UIC protocol[J]. Am J Transplant,2008,8(6):2650-2661.
- [10] HU M J, RUAN G P, YAO X, et al. Induced autologous stem cell transplantation for treatment of rabbit type 1 diabetes[J]. Cell Biol Int,2013,37(6):624-632.
- [11] CHEN W, PERRUCHÉ S, LI J. CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells and TGF-beta in mucosal immune system: the good and the bad[J]. Curr Med Chem,2007,14(21):2245-2249.
- [12] JING H Z, CHAO Q L, SU J G, et al. Inhaled inactivated-Mycobacterium phlei modulates $\gamma\delta$ T cell function and alleviates airway inflammation in a mouse model of asthma[J]. Asian Pac J Allergy Immunol,2013,31(4):286-291.
- [13] ASHTON-CHESS J, GIRAL M, SOULILLOU J P, et al. Using biomarkers of tolerance and rejection to identify high- and low-risk patients following kidney transplantation[J]. Transplantation,2009,87(9 Suppl):S95-99.