

负载异体抗原对低剂量粒细胞巨噬细胞集落刺激因子诱导的树突状细胞免疫学性状的影响



王强 彭毅志 王逸涛 王永权 游波

【摘要】 目的 观察低剂量粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)诱生的未成熟树突状细胞(GM^{low}DC)对异体抗原的摄取能力,以及负载异体抗原后细胞表型和功能的改变。方法 对处于增殖期的 C₅₇BL/6 小鼠单个核细胞(MNC)作氚标记亮氨酸(³H-Leu)掺入处理,制备³H-Leu 标记的抗原上清液。将此抗原上清液分别与昆明小鼠 GM^{low}DC 和成熟树突状细胞(DC)孵育 30、60、90 min,检测细胞每分钟放射性荧光闪烁计数(cpm)值;用流式细胞仪检测负载异体抗原前后 GM^{low}DC 表面 I^A/I^E、CD80 分子的表达情况。分离 C₅₇BL/6 小鼠的 T 淋巴细胞,根据加入的刺激因素分组并进行同种混合淋巴细胞反应(MLR):对照组(不加刺激因素)、GM^{low}DC 组、GM^{low}DC + 异体抗原组、GM^{low}DC + 异体抗原 + 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4Ig(CTLA-4Ig)组。检测各组细胞 cpm 值,计算刺激指数(SI)。结果 加入异体抗原上清液后 30、60、90 min,GM^{low}DC 的 cpm 值均明显高于同时相点的成熟 DC($P < 0.05$ 或 0.01)。负载异体抗原前,GM^{low}DC 细胞表面 I^A/I^E 的表达率为(32 ± 8)%,CD80 的表达率为(25 ± 10)%;负载后两者分别为(54 ± 10)%、(71 ± 18)%,均明显升高($P < 0.05$ 或 0.01)。MLR:GM^{low}DC + 异体抗原组细胞 cpm 值明显高于对照组($P < 0.05$),SI > 2.0;GM^{low}DC 组以及 GM^{low}DC + 异体抗原 + CTLA-4Ig 组细胞 cpm 值与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),SI 均 < 2.0。结论 GM^{low}DC 具有较强的抗原摄取能力,负载抗原后,细胞在表型及功能上渐趋成熟。应用 CTLA-4Ig 可阻断其免疫应答效应,建立免疫耐受。

【关键词】 树突状细胞; 抗原; 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子; 免疫耐受; 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4

The influence of antigen loading on the immunological characteristics of dendritic cells induced by low concentrations of granulocyte macrophage colony stimulating factor WANG Qiang, PENG Yi-zhi, WANG Yi-tao, WANG Yong-quan, YOU Bo. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

Corresponding author: PENG Yi-zhi, Email: yizhipen@mail.tmmu.com.cn, Tel: 023-68754175

【Abstract】 Objective To investigate the influence of low doses of granulocyte macrophage colony stimulating factor on the allogeneic antigen(Ag) ingestion capacity of immature dendritic cells(GM^{low}DC), and subsequently the changes in the cellular phenotype and function. Methods Mononuclear cells from C57BL/6 mice was labelled with ³H-Leu to make Ag supernatant. The Ag supernatant was cocultured with GM^{low}DC or mature DC for 30, 60 and 90 mins, then cpm value were determined. The changes in I^A/I^E and CD80 on cell surface after antigen ingestion were determined with flow cytometry(FCM). By using mixed lymphocyte reaction(MLR), the cells were divided into control(non-sensitized T lymphocyte), GM^{low}DC, GM^{low}DC and allogeneic antigen, GM^{low}DC and allogeneic antigen and CTLA-4 Ig groups. The cpm value in each group was recorded and the stimulation index(SI) was calculated. Results Upon 30, 60 and 90 mins of allogeneic Ag stimulation, the cpm value of GM^{low}DC was obviously higher than that of mature DC($P < 0.05$ or 0.01). In addition, the expression of I^A/I^E and CD80 before allogeneic Ag ingestion were significantly higher than those after Ag ingestion(I^A/I^E: 32 ± 8% vs 54 ± 10, $P < 0.05$; CD80: 25 ± 10% vs 71 ± 18%, $P < 0.01$). MLR: Compared with control group, the cpm value in GM^{low}DC with allogeneic Ag group was increased markedly($P < 0.05$), with SI higher than 2.0, while no difference was found among control, GM^{low}DC group, GM^{low}DC and allogeneic Ag and CTLA-4Ig groups($P > 0.05$), with SI lower than 2.0 Conclusion Though GM^{low}DC exhibits powerful antigen ingestion capacity, the cell

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271341)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信(讯)作者:彭毅志,Email:yizhipen@mail.tmmu.com.cn,电话:023-68754175

phenotype and function will get mature gradually. Immune tolerance can be established by incubating GM^{low} DC with CTLA-4Ig.

【Key words】 Dendritic cells; Antigens; Granulocyte macrophage colony stimulating factor; Immune tolerance; Cytotoxic T lymphocyte antigen 4

树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内惟一能激活初始型 T 淋巴细胞的抗原呈递细胞,在机体免疫应答过程中发挥着重要作用。近年来许多研究表明,DC 不仅是免疫反应的启动者,它还以多种方式参与免疫调节,扮演着“管理者”和“细胞调控者”的角色,应用未成熟 DC 可以在主要组织相容性复合物(MHC)不相合的情况下诱导移植免疫耐受^[1]。要实现抗原特异性免疫耐受,对所用 DC 的要求是:具有供者抗原特异性,即已经负载了供者特异性抗原;具有致耐受性。虽然供者源未成熟 DC 天然具备供者抗原特异性和致耐受性,但临床在实施移植术前短时间内获取大量纯化后的供者未成熟 DC 可行性较小。利用未成熟 DC 抗原摄取能力强的特性,让其俘获反复冻融法制备的全细胞抗原,不失为一种简便有效的方法。目前已知,低剂量粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)培养体系中诱生的未成熟 DC(GM^{low} DC),可以对抗内毒素/脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等物质的促成熟作用^[2]。本研究以此为基础,观察 GM^{low} DC 对异体抗原的摄取能力,以及负载异体抗原后其细胞表型和功能的改变,试图为今后 GM^{low} DC 的临床应用探寻一条切实可行的途径。

材料与方 法

一、材料

1. 主要试剂与仪器来源:重组鼠 GM-CSF(rmGM-CSF)、重组鼠白细胞介素 4(rmIL-4)购自美国 Sigma 公司;小鼠淋巴细胞分离液 Ficoll 购自中国医学科学院生物工程研究所,密度 1.077;氚标记亮氨酸(³H-Leu)、氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR)由中国原子能研究所提供;大鼠抗小鼠 CD80 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;大鼠抗小鼠 I^A/I^E 单克隆抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗大鼠 IgG 二抗购自美国 Phar Mingen 公司;细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4Ig(CTLA-4Ig)购自美国 Ancell 公司;DMEM 细胞培养基购自美国 Hyclone 公司。FACS Caliber 型流式细胞仪为美国 BD 公司产品;LS6000TA 型液体闪烁计数仪为美国 Beckman 公司产品。

2. 动物来源:体重 25~30 g 的雌性 C₅₇BL/6 小

鼠、雌性昆明小鼠由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供,并由该中心监测所售动物的健康指标。

二、实验方法

1. 昆明小鼠骨髓 GM^{low} DC 和成熟 DC 悬液的制备:参照文献[3]操作。

2. ³H-Leu 标记的异体抗原上清液的制备:按本所常规方法制备 C₅₇BL/6 小鼠单个核细胞(MNC)悬液,以 2×10^5 /ml 接种于 24 孔板,1 ml/孔,随后加入 rmGM-CSF(终浓度为 25 μ g/L)。培养 2 d 后,于倒置相差显微镜下观察细胞形态,每孔加入 7.4×10^4 Bq ³H-Leu,轻轻振荡混匀后,置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 孵箱中继续孵育 24 h。取部分孔细胞,检测 ³H-Leu 掺入情况;收集剩余细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)调整细胞含量为 1×10^6 /ml,于液氮和 37 $^{\circ}$ C 条件下反复冻融 6 次,制成细胞碎片悬液,用孔径 0.22 μ m 滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

3. DC 抗原摄取能力的测定:取已培养好的昆明小鼠 GM^{low} DC 和成熟 DC 悬液,调整细胞含量为 1×10^5 /ml,加入 24 孔板中,1 ml/孔,分为 GM^{low} DC 组和成熟 DC 组。各组细胞均加入标记后的异体抗原上清液 250 μ l,孵育 30、60、90 min,每时相点 5 个复孔。培养结束后收集细胞,用 β 液体闪烁计数仪检测每分钟放射性荧光闪烁计数(cpm)值。本实验重复 3 次。

4. 细胞表面标志物检测:取昆明小鼠 GM^{low} DC,同上加入异体抗原上清液使其负载异体抗原(细胞含量调至 5×10^5 /ml),随后分别在含大鼠抗小鼠 CD80、I^A/I^E 单克隆抗体(各 5 μ g)的 PBS 中冰浴 30 min。PBS 洗涤细胞 2 次后,加入 FITC 标记的羊抗大鼠 IgG,冰浴 30 min。PBS 洗细胞 2 遍后,将其重新悬浮于 1 ml PBS 中,立即用流式细胞仪进行检测。同法检测负载异体抗原前 GM^{low} DC 的相同指标。

5. 同种混合淋巴细胞反应(MLR):按本所常规方法制备 C₅₇BL/6 小鼠 T 淋巴细胞悬液。取 96 孔圆底培养板,分 4 组,每组 5 个复孔。(1)对照组:每孔加入未致敏 T 淋巴细胞 2×10^5 个;(2)GM^{low} DC 组:每孔加入 GM^{low} DC 和未致敏 T 淋巴细胞各 1×10^5 个;(3)GM^{low} DC + 异体抗原组:每孔加入已负载异体抗原的 GM^{low} DC 和未致敏 T 淋巴细胞各 $1 \times$

10^5 个; (4) GM^{low} DC + 异体抗原 + CTLA-4Ig 组: 取部分已负载异体抗原的 GM^{low} DC, 加入 CTLA-4Ig (每 1×10^6 个细胞加 $100 \mu\text{g}$) 孵育 8 h, 洗涤细胞 2 遍后, 以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 悬浮于 DMEM 中, 每孔加入该细胞和未致敏 T 淋巴细胞各 1×10^5 个。以上每组每孔终体积均为 $200 \mu\text{l}$ 。各孔细胞置于 37°C 、体积分数 5% CO_2 孵箱中培养 72 h (培养结束前 16 h, 在各孔中加入 $3.7 \times 10^4 \text{ Bq } ^3\text{H-TdR}$)。收集细胞, 用液体闪烁计数器检测 cpm 值。本实验重复 3 次, 计算刺激指数 (SI), $\text{SI} = \text{各实验组 cpm 值} \div \text{对照组 cpm 值}$, $\text{SI} \geq 2.0$ 表示能够刺激 T 淋巴细胞增殖。

三、统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件进行均值配对, 行 t 检验。

结 果

1. $^3\text{H-Leu}$ 标记 $C_{57}\text{BL/6}$ 小鼠 MNC 的掺入情况: MNC 加入 rmGM-CSF 培养 2 d 后, 倒置相差显微镜下可见有大量细胞疏松地贴附于培养孔底, 呈簇状生长, 形如葡萄串, 表明细胞已进入对数生长期。加入 $^3\text{H-Leu}$ 继续孵育 24 h 后, 测得每 1×10^5 个 MNC 的 cpm 值为 $(4\ 508 \pm 674) \text{ min}^{-1}$, 即 $^3\text{H-Leu}$ 已成功掺入到细胞内。

2. DC 抗原摄取能力的测定: GM^{low} DC 组细胞各时相点 cpm 值均明显高于成熟 DC 组 ($P < 0.05$ 或 0.01)。随着孵育时间的延长, GM^{low} DC 组 cpm 值逐渐升高, 90 min 时与 60 min 时比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 两组 DC 抗原摄取能力的比较 (min^{-1} , $\bar{x} \pm s$)

组别	孵育时间 (min)		
	30	60	90
成熟 DC 组	61 ± 42	105 ± 43	135 ± 38
GM^{low} DC 组	$388 \pm 24^*$	$3\ 327 \pm 105^{\#}$	$3\ 416 \pm 90^{\#}$

注: 表中数据为每 1×10^5 个细胞的 cpm 值, 本实验重复 3 次; 与同时相点成熟 DC 组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

3. 细胞表面标志物的检测: 负载异体抗原前, GM^{low} DC 细胞表面 I^A/I^E 的表达率为 $(32 \pm 8)\%$, CD80 的表达率为 $(25 \pm 10)\%$; 负载抗原后两者分别为 $(54 \pm 10)\%$ 、 $(71 \pm 18)\%$, 均较负载前明显升高 ($P < 0.05$ 或 0.01)。

4. MLR: 与对照组相比, GM^{low} DC + 异体抗原组细胞 cpm 值明显升高 ($P < 0.05$), $\text{SI} > 2.0$; 而 GM^{low} DC 组及 GM^{low} DC + 异体抗原 + CTLA-4Ig 组细胞 cpm 值与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), SI 均 < 2.0 。见表 2。

表 2 各组 DC 激发未致敏 T 淋巴细胞增殖能力的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	重复测定次数	cpm 值 (min^{-1})	SI
对照组	3	491 ± 70	—
GM^{low} DC 组	3	515 ± 167	1.1
GM^{low} DC + 异体抗原组	3	$3\ 679 \pm 1\ 028^*$	7.5
GM^{low} DC + 异体抗原 + CTLA-4Ig 组	3	442 ± 84	0.9

注: “—”表示无此项; 与对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

同种异体皮肤移植为早期、有效地覆盖大面积深度烧伤创面提供了一条较佳的思路, 但移植后的排斥反应制约了该技术的应用。近年来随着免疫学的发展, 人们观察到, 联合移植来自同一供者的皮肤及未成熟 DC, 能成功地诱导免疫耐受, 经在啮齿类动物身上验证效果良好^[4]。但是在临床皮肤移植工作中, 由于供者源未成熟 DC 不易获得, 迫切需要找到可在第三方未成熟 DC 表面负载供者抗原的有效方法。目前已建立了多种方法制备携带异体抗原的 DC 疫苗, 如: 利用携带相关抗原基因的病毒载体 (逆转录病毒、腺病毒等) 转染 DC; 将相关抗原肽段或编码抗原的质粒 DNA 通过电穿孔技术直接转染入 DC 等。但通过这些方法转入第三方未成熟 DC 内的仅是某个单一的抗原分子, 直接影响了其进入体内后发挥免疫功能, 同时转染效率和生物安全性不高等因素也限制了这些方法的临床应用。异体抗原上清与 DC 共孵育制备 DC 疫苗的技术, 优势在于它已包含了供者的全部抗原物质, 并不需要事先获得供者的抗原肽表位序列, 可使第三方未成熟 DC 同时携带供者的多个抗原决定簇, 从而多克隆地影响受者体内的 T 淋巴细胞。

目前, 文献报道较多的是通过检测细胞摄取 FITC 标记的葡聚糖 (dextran) 后荧光强度的改变, 来获知其抗原摄取能力 (吞噬能力)^[5]。此外, 已知细胞摄入酵母多糖后所产生的超氧离子可导致细胞色素 c 减少, 通过测定细胞色素 c 的含量, 亦可以评价细胞的吞噬功能^[6]。但这些方法都只能间接地反映细胞的抗原摄取能力, 且检测结果也会受一些因素的影响, 如颗粒的大小等。如何能更直观地测定 DC 对抗原的摄取情况? 本研究中, 笔者采用 $^3\text{H-Leu}$ 标记处于对数生长期的供者 MNC, 利用反复冻融法制备标记后的抗原上清液, 在与未成熟 DC 共孵育后, 通过测定 cpm 值直接获知细胞对抗原的摄取情况^[7]。本研究结果表明, GM^{low} DC 具有较强的抗原摄取能力, 当其与标记抗原上清液共孵育后, 其 cpm 值较成熟 DC 明显升高 ($P < 0.05$ 或 0.01); 并且随

着孵育时间的延长, GM^{low} DC 摄取抗原的量渐增。但是抗原摄取、加工和呈递是一个非常复杂的过程, 有效地摄取并不代表一定能有效地呈递, 进入细胞内的抗原物质是否都有效呈递到细胞表面, 还需要进行更深入的研究。

本研究中关于细胞表面标志物的检测结果显示, GM^{low} DC 摄入抗原后, 细胞表面 MHC-II 类分子和协同刺激分子的表达均上调, 并且获得了较强的诱导未致敏 T 淋巴细胞增殖的能力。由此说明, GM^{low} DC 在表型和功能上已渐趋成熟, 可以引发机体的免疫应答, 但这对于希望依靠其建立抗原特异性免疫耐受是不利的。同时笔者还观察到, 当应用 CTLA-4Ig 阻断细胞表面的 B7-CD28 信号通路时, 其 cpm 值与对照组比较差异无统计学意义 (P > 0.05), SI < 2.0, 提示这一条件不能有效地激活 T 淋巴细胞产生应答。

综上所述, GM^{low} DC 具有较强的抗原摄取能力。利用这一特性, 可以便捷地为自身“装填”供者抗原, 但在获得供者抗原特异性的同时, GM^{low} DC 也丧失了致耐受能力, 此时联合应用 CTLA-4Ig 可以建立

抗原特异性的免疫耐受, 可供今后 GM^{low} DC 应用于临床皮肤移植作参考。

参 考 文 献

- 1 Thomas EI, Robert Z. Prevention of allograft rejection by in vitro generated tolerogenic dendritic cells. *Transplant Immunol*, 2003, 11:295-306.
- 2 王强, 彭毅志. 低剂量粒细胞巨噬细胞集落刺激因子诱导的小鼠骨髓未成熟树突状细胞抗成熟特性的研究. *中华烧伤杂志*, 2004, 20:327-329.
- 3 王强, 彭毅志. 小鼠骨髓未成熟树突状细胞体外扩增及鉴定. *中华烧伤杂志*, 2003, 19:332-335.
- 4 Masatoshi E, Holger H. Promotion of skin graft tolerance across MHC barriers by mobilization of dendritic cells in donor hemopoietic cell infusions. *J Immunol*, 2002, 169: 2390-2396.
- 5 Lorenzo M, Mickael JY. Phenotype and function of myeloid dendritic cells derived from African green monkey blood monocytes. *J Immunol Methods*, 2005, 10:214-232.
- 6 Reise SC, Stahl PD. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med*, 1993, 178:509-519.
- 7 Suss J, Egerer R. A phagocytosis capacity assay: parallel measurement of the phagocytosis and the intracellular killing in granulocytes and the influence of some substances on these processes. *Zentralbl Bakteriell*, 1991, 275: 248-255.

(收稿日期: 2006-02-21)

(本文编辑: 罗勤)

· 病例报告 ·

特重度烫伤合并败血症和脓毒性休克一例

薛文君 王德昌 冷向锋

患儿男, 2岁5个月。因不慎掉入锅内被热水烫伤, 伤后在院外治疗。随后病情加重, 伤后27d转入笔者单位。入院时患儿体温不升, 呼之不应, 皮肤湿冷, 瞳孔对光反射、压眶反应消失, 血压未测, 心率 > 140次/min, 血象升高(白细胞计数 > 30 × 10⁹/L, 中性粒细胞 0.90)。患儿创面恶臭, 皮下有弥漫性小隧道, 呈蜂窝状。急诊查血钾为 1.97 mmol/L。创面细菌培养结果为奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌。血液细菌培养结果为金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、斯氏普罗威登斯菌。入院诊断: (1)特重度烫伤, 总面积 83%, 其中深Ⅱ度 21%、Ⅲ度 62% TBSA。(2)脓毒性休克。(3)败血症。

入院后立即复苏并纠正脓毒性休克, 根据患儿血生化指标纠正水、电解质紊乱; 应用广谱抗生素控制感染, 并根据创面、血液细菌培养结果及时调整抗生素。入院后第8天开始静脉滴注氟康唑 100 mg, 每天1次; 皮下注射重组人生长激素(上海联合赛尔生物工程有限公司) 1.6 mg, 每天1次; 根据患儿病情, 每天或隔天1次静脉滴注人体白蛋白和血浆, 同时口服肠内营养制剂(能全力, 安徽新力药业股份有限公

司) 100 ml, 每天3次, 减轻患儿低蛋白血症; 应用能量合剂改善患儿心、脑功能; 给予还原型谷胱甘肽改善肝、肾功能。加强护理, 定时翻身排痰和行雾化治疗, 改善肺功能; 对坏死并感染的焦痂创面应用肿胀技术分次切痂, 切痂面积分别为 13%、27%、13% TBSA, 之后行大张异体皮 + 自体微粒皮移植术、肉芽创面植皮术, 并应用纳米敷料和生物敷料 A(断层猪皮, 威海华特保健品有限公司) 交替覆盖创面, 换药时外用成纤维细胞生长因子 2、表皮生长因子。创面全部愈合, 患儿血钾恢复至 5.12 mmol/L, 其他血生化指标和心、脑、肺、肝、肾功能均恢复正常。住院 87 d, 患儿痊愈出院。

讨论 特重度烫伤合并败血症、脓毒性休克的病死率极高, 救治也较困难。在抢救过程中需防治脓毒症和多器官功能衰竭(MOF)等并发症。应尽快、正确地处理创面; 积极而持续地行肠内、肠外营养支持; 合理地应用抗菌、真菌药物; 妥善地保护脏器功能; 及时纠正水、电解质失衡; 应用多种生长因子, 并严格执行消毒隔离等措施。同时应用肿胀技术切痂, 使解剖层次更清楚, 也可减少术中出血, 降低手术风险。

(收稿日期: 2005-07-22)

(本文编辑: 莫愚)

作者单位: 250021 济南, 山东省立医院烧伤整形科