

# 携带供者抗原的第三方树突状细胞诱导小鼠皮肤移植耐受的研究



王强 彭毅志 王逸涛 王永权 游波 王元元 赵晓辉

**【摘要】** 目的 了解携带供者抗原的第三方树突状细胞(DC)是否具有与供者源未成熟 DC 相似的免疫功能。方法 雌性 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠、BALB/c 小鼠和昆明小鼠分别为皮肤移植的供者、受者和第三方。将 40 只 BALB/c 小鼠分为对照组、环磷酰胺组、供者源未成熟 DC 组、第三方未成熟 DC 组、携带供者抗原第三方 DC 组,每组 8 只。后 4 组大鼠皮肤移植术前 4 d 用环磷酰胺(200 mg/kg)预处理,对照组同法给予等量等渗盐水。后 3 组术前 2 d 用 1 ml 相应 DC 悬液( $1 \times 10^7$  个/ml)预处理,并在术后 12 d 重复给予 1 ml DC 悬液( $1 \times 10^7$  个/ml)1 次;前 2 组于上述 2 个时相点同法给予等量等渗盐水。记录各组皮片平均成活时间(MST)并于术后 5 d 对皮片进行组织学观察。结果 与对照组( $16.1 \pm 3.5$ )d 比较,供者源未成熟 DC 组和携带供者抗原第三方 DC 组小鼠移植皮片的 MST 明显延长,分别为( $38.3 \pm 7.7$ )、( $34.9 \pm 7.7$ )d ( $P < 0.01$ );携带供者抗原第三方 DC 组与供者源未成熟 DC 组皮片的 MST 相近 ( $P > 0.05$ ),但与第三方未成熟 DC 组( $23.7 \pm 2.7$ )d 比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。镜下见携带供者抗原第三方 DC 组移植皮片结构较清楚、排列有序,与供者源未成熟 DC 组情况相近。结论 携带供者抗原的第三方 DC 与供者源未成熟 DC,均可在一定程度上建立抗原特异性免疫耐受。

**【关键词】** 树突状细胞; 皮肤移植; 免疫耐受; 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4

Study on the induction of skin transplantation tolerance against rejection in mice by third-party dendritic cells loaded with donor's antigens WANG Qiang, PENG Yi-zhi, WANG Yi-tao, WANG Yong-quan, YOU Bo, WANG Yuan-yuan, ZHAO Xiao-hui. 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@tmmu.com.cn, Tel: 023-68754175

**【Abstract】** Objective To investigate whether the third-party dendritic cells(DC) incubated with donor's antigens possess the similar immune functions with donor derived immature DC. Methods Female C<sub>57</sub>BL/6, BALB/c and Kunming mice were used as skin transplant donors, recipients and third-party, respectively. Forty BALB/c mice were randomly divided into A (normal control), B (cyclophosphamide administration), C (CTX and donor derived immature DC), D (CTX and third-party immature DC), E (CTX and third-party DC loaded with donor's antigens) groups, with 8 mice in each group. The mice in group B, C, D and E were given CTX(200mg/Kg) 4 days before operation, while those in group A were given equivalent amount of normal saline(NS). Then in group C, D and E, DC at a dose of  $1 \times 10^7$ /ml were intraperitoneally injected with 2 days before grafting and 12 days after operation, but the mice in group A and B were given NS in the same manner. Mean survival time (MST) of skin grafts was recorded, and biopsies of grafts on 5 and 10 post-operation days (POD) were harvested for histologic examination. Results Compared with group A [ $16.1 \pm 3.5$ ]d, MST of skin grafts in group C [ $38.3 \pm 7.7$ ]d and E [ $34.9 \pm 7.7$ ]d were significantly prolonged ( $P < 0.01$ ), while no obvious difference was observed between group C and E ( $P > 0.05$ ), but there was statistically significant difference in MST between group D [ $23.7 \pm 2.7$ ]d and E ( $P < 0.05$ ). In addition, clear epithelial structure and infiltration of inflammatory cells were observed in specimens from both groups C and E. Conclusion Both donor derived immature DC and third-party DC loaded with donor's antigens can partly induce donor specific transplantation tolerance.

**【Key words】** Dendritic cells; Skin transplantation; Immune tolerance; Cytotoxic T lymphocytic associated antigen 4

基金项目:国家自然科学基金(30672173)

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(王强现在武警浙江省总队医院烧伤整形科,314000)

通讯作者:彭毅志,Email:yizhipen@sina.com,电话:023-68754175

树突状细胞(dendritic cell, DC)是已知的机体内功能最强的专职抗原呈递细胞。它是一类具有膜样或树突状突起、能够启动并调节免疫反应的细胞总称,并且由于其来源和发育阶段不同,存在着功能异质性。DC既可以引发免疫应答也可以诱导免疫耐受,此双重作用与它的成熟状态相关<sup>[1]</sup>。动物实验结果证实,应用来自同一供者的未成熟 DC 和实质性脏器联合移植,可显著延长移植物的成活时间<sup>[2,3]</sup>。但在临床皮肤移植手术中,未成熟 DC 主要来自健康志愿捐献者,与异体皮来源并不一致,严重影响了皮肤移植后的成活质量。如果让第三方未成熟 DC 负载皮肤供者抗原,是否可以使其发挥与供者源未成熟 DC 相似的免疫功能呢?在本研究中,笔者观察了携带供者抗原的第三方 DC 对异基因小鼠皮肤移植中皮片成活的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物及主要试剂来源

选取 8~12 周龄的健康雌性 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠 10 只、BALB/c 小鼠 40 只、昆明小鼠 10 只(第三军医大学大坪医院实验动物中心)。重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、重组小鼠白细胞介素 4 购自美国 Sigma 公司;DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司;细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 Ig(CTLA-4 Ig)购自美国 Ancell 公司;环磷酰胺购自上海华联制药有限公司。

### 1.2 DC 悬液的制备

C<sub>57</sub>BL/6 小鼠、昆明小鼠未成熟 DC 悬液的制备参照文献[4]操作。

参照文献[5]制备携带供者抗原的第三方 DC 悬液:用淋巴细胞分离液获取 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠单个核细胞悬液,用磷酸盐缓冲液(PBS)调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml,于液氮和 37℃ 条件下反复冻融 6 次制成细胞碎片悬液,用孔径 0.22 μm 的滤膜过滤,将抗原上清液置于 4℃ 冰箱中保存备用。取已制备好的昆明小鼠未成熟 DC 悬液( $1 \times 10^6$  个/ml)与 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠抗原上清液按 1:5 体积比混合,同时于每毫升昆明小鼠未成熟 DC 悬液中加入 100 μg CTLA-4 Ig,于 37℃ 条件下孵育 8 h,用 PBS 洗涤 3 次,收集 DC,重新悬浮于等渗盐水中,制成  $1 \times 10^7$  个/ml 的细胞悬液待用。

### 1.3 实验分组及处理

**1.3.1 分组情况** 将 BALB/c 小鼠分为 5 组,每组 8 只。(1)对照组:仅行皮肤移植,其余处理用相

应剂量等渗盐水代替;(2)环磷酰胺组:除经腹腔注射环磷酰胺和行皮肤移植外,其余处理用相应剂量等渗盐水代替;(3)供者源未成熟 DC 组:皮肤移植前经腹腔注射环磷酰胺和 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠未成熟 DC;(4)第三方未成熟 DC 组:皮肤移植前经腹腔注射环磷酰胺和昆明小鼠未成熟 DC;(5)携带供者抗原第三方 DC 组:皮肤移植前经腹腔注射环磷酰胺和携带 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠抗原的昆明小鼠 DC。

**1.3.2 具体操作** 在皮肤移植术前 4 d,各组 BALB/c 小鼠经腹腔注射环磷酰胺(200 mg/kg)或等量等渗盐水。术前 2 d 经腹腔注射相应 DC 悬液( $1 \times 10^7$  个/ml)1 ml 或等量等渗盐水。用眼科剪剪去其背部皮肤,形成约 1.5 cm × 1.5 cm 的创面,以取自 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠的全厚皮片覆盖,缝合、包扎、固定。术后 12 d 各组再次经腹腔注射 1 ml 相应 DC 悬液( $1 \times 10^7$  个/ml)或等量等渗盐水。

### 1.4 观察指标

**1.4.1 皮片平均成活时间(median survival time, MST)** 移植术后每天观察各组 BALB/c 小鼠移植皮片颜色、质地等,将皮片完全发黑坏死或干燥成痂、脱落作为皮片排斥标准<sup>[6]</sup>,记录皮片从移植到发生排斥的时间,计算 MST。

**1.4.2 组织形态学变化** 皮肤移植术后 5 d,取供者源未成熟 DC 组和携带供者抗原第三方 DC 组小鼠移植部位皮片组织,制成切片,固定后行 HE 染色并在光学显微镜下观察。

### 1.5 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析及 Student-Newman 检验。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠移植皮片 MST 比较

与对照组小鼠(16.1 ± 3.5) d 比较,供者源未成熟 DC 组、第三方未成熟 DC 组、携带供者抗原第三方 DC 组移植皮片的 MST 均明显延长,分别为(38.3 ± 7.7)、(23.7 ± 2.7)、(34.9 ± 7.7) d ( $P < 0.01$ );环磷酰胺组的 MST 为(15.3 ± 2.8) d,与对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );携带供者抗原第三方 DC 组的 MST 较第三方未成熟 DC 组显著延长( $P < 0.05$ ),而与供者源未成熟 DC 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。术后各组小鼠所植皮片均未发生感染。

### 2.2 组织形态学观察结果

皮肤移植术后 5 d,供者源未成熟 DC 组和携带

供者抗原第三方 DC 组小鼠移植皮片组织结构较清楚,纤维组织排列有序,局部有炎性细胞浸润,两组差异不明显。见图 1,2。

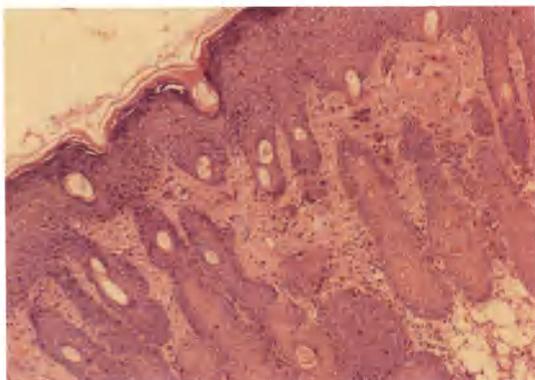


图 1 术后 5 d,供者源未成熟树突状细胞组小鼠皮片结构清晰、有序,局部有炎性细胞浸润 HE × 100

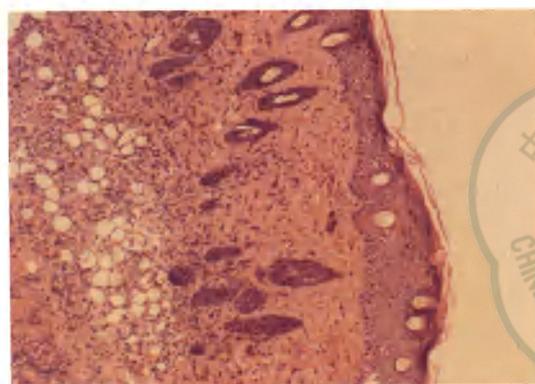


图 2 术后 5 d,携带供者抗原第三方树突状细胞组小鼠皮片结构清晰、有序,局部有炎性细胞浸润 HE × 100

### 3 讨论

自体皮源不足是大面积深度烧伤治疗的瓶颈。近年来器官移植领域取得的一些重大进展,启发了人们开展异体皮肤移植的设想。但事实证明,移植后的排斥反应使异体皮仅可作为生物敷料使用,并不能成为创面永久覆盖物。Eto 和 Hackstein<sup>[7]</sup>在啮齿类动物皮肤移植的研究中观察到,联合移植来自同一供者的皮肤和未成熟 DC,能成功诱导耐受。临床上由于活体献皮较罕见,患者往往接受的是来自不同供者的皮肤和未成熟 DC,即第三方模式。第三方的未成熟 DC 由于其表面并不携带皮肤供者抗原,进入受者体内后,要发挥诱导耐受的作用首先必须摄取、加工、呈递供者抗原,其作用大打折扣。利用未成熟 DC 在体外对抗原摄取能力强的特点,我们便捷地为其“装填”上供者抗原,但在获得供者抗原特异性的同时,其表面主要组织相容性复合物 II 类分子及 CD80 等协同刺激信号表达上调,此时联

合应用 CTLA-4 Ig 封闭协同刺激分子,可建立抗原特异性的免疫耐受<sup>[5]</sup>。

CTLA-4 是 T 淋巴细胞活化中重要的负向调节分子,它与 B7 的亲合力是 CD28 的 20 倍以上,免疫反应的最终结局取决于 CD28 介导的 T 淋巴细胞激活与 CTLA-4 介导的 T 淋巴细胞抑制之间的平衡状态。CTLA-4 Ig 是 CTLA-4 分子胞外区与免疫球蛋白  $\gamma 1$  铰链区及  $CH_2$ 、 $CH_3$  基团组成的融合蛋白,可以阻断 B7 与 CD28 的结合。它不但可以封闭 B7、诱导免疫耐受,还可以影响免疫细胞的分化,调节免疫反应<sup>[8]</sup>。

在本研究中笔者观察到,携带供者抗原的第三方 DC 在体内延长异体皮成活的能力与供者源未成熟 DC 相近 ( $P > 0.05$ ),而较未经处理的第三方未成熟 DC 有明显提高 ( $P < 0.05$ ),这表明与供者抗原上清液和 CTLA-4 Ig 共孵育后的第三方 DC 可以替代供者源未成熟 DC 发挥诱导免疫耐受的作用。镜下见携带供者抗原第三方 DC 组小鼠的移植皮片生长情况良好,白细胞趋化功能正常,结合术后皮片均未发生感染的情况,说明应用携带供者抗原第三方 DC 后,只是特异性降低了对供者抗原的应答,并没有影响小鼠的免疫防御能力。但笔者并未观察到该组移植皮片长期成活的现象,这可能与输入的 DC 自我增殖能力差且不能持久、稳定地发挥作用有关<sup>[9]</sup>;同时,机体的免疫应答是一个复杂过程,免疫平衡是由多种机制共同维系的,仅从某一途径着手控制其作用非常有限。联合诱导多种机制同时起作用的移植耐受,应当是今后研究的重要方向。本研究中还观察到,单纯使用环磷酰胺对移植皮片的成活无明显影响,但与未成熟 DC 联合应用后可显著延长皮片的成活时间 ( $P < 0.01$ )。这说明未成熟 DC 除了依靠协同刺激分子的缺乏诱导 T 淋巴细胞无能外,还可能在辅助因素影响下通过分泌一些细胞因子诱导抑制性 T 淋巴细胞以诱导免疫耐受,但显然这种作用是短暂的<sup>[10]</sup>。

笔者认为,与供者抗原上清液和 CTLA-4 Ig 共孵育后的第三方 DC 不仅获得了供者抗原特异性,也具备了诱导免疫耐受的能力。本实验结果为第三方未成熟 DC 应用于临床皮肤移植的系统研究提供了新的思路。

### 参考文献

- [1] Fairchild PJ, Waldmann H. Dendritic cells and prospects for transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol*, 2000, 12 (5): 528 - 535.

[2] Ichim TE, Zhong R. Prevention of allograft rejection by in vitro generated tolerogenic dendritic cells. Trends Immunol, 2003, 11 (3/4): 295 - 306.

[3] Guillot C, Menoret S. Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA-4Ig. Blood, 2003, 101(8): 3325 - 3333.

[4] 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(6): 332 - 335.

[5] 王强, 彭毅志. 负载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. 中华烧伤杂志, 2006, 22(3): 211 - 214.

[6] Levite M, Reisner Y. Induction of prolonged tolerance to third-party skin grafts following fully allogeneic bone marrow transplantation in mice. Transplantation, 1993, 55(3): 633 - 638.

[7] Eto M, Hackstein H. Promotion of skin graft tolerance across MHC barriers by mobilization of dendritic cells in donor hemopoietic cell infusions. J Immunol, 2002, 169(5): 2390 - 2396.

[8] Hwang KW, Sweatt WB. Cutting edge: targeted ligation of CTLA-4 in vivo by membrane-bound antibody prevents rejection of allogeneic cells. J Immunol, 2002, 169(2): 633 - 637.

[9] Kaneko K, Morelli AE, Wang Z, et al. Alloantigen presentation by ethylcarbodiimide-treated dendritic cells induces T cell hyporesponsiveness, and prolongs organ graft survival. Clin Immunol, 2003, 108(3): 190 - 198.

[10] Lechler R, Ng WF. Dendritic cells in transplantation-friend or foe? Immunity, 2001, 14(4): 357 - 368.

(收稿日期: 2006 - 12 - 26)  
(本文编辑: 赵敏)

· 经验交流 ·

## 治疗Ⅲ度烧伤面积 ≥ 80% TBSA 患者 19 例

李淑荣

1986 年 5 月—2006 年 5 月, 笔者单位共收治 19 例Ⅲ度面积 ≥ 80% TBSA 的烧伤患者, 其中 8 例救治成功, 现总结如下。

### 1 临床资料

本组患者中男 17 例、女 2 例, 年龄 19 ~ 66 岁, 休克期度过平稳者 11 例、不平稳者 8 例。休克期度过不平稳的患者早期均发生脓毒症或脏器功能不全, 其中 7 例死亡; 休克期度过平稳的患者仅 5 例发生脓毒症或脏器功能不全, 其中 4 例死亡。

### 2 治疗方法与讨论

#### 2.1 防治休克

**2.1.1 重视早期补液** 大面积深度烧伤患者休克期度过平稳与否, 直接影响其预后。伤后由于大量血浆样体液外渗, 造成有效血容量不足, 同时伴有大量红细胞破坏, 携氧能力减弱, 导致组织缺氧。特别是在伤后第 1 个 24 h, 必须根据具体病情掌握补液量和补液速度(肾功能损害较轻的成年患者, 补液量与尿量的体积比应维持在 5:1 左右), 以较好地预防和控制休克的发生和发展。笔者单位收治的休克期度过不平稳患者中, 有 2 例为伤后 5 h 入院, 早期补液明显不足, 属重度休克。休克期度过平稳的 11 例患者均于伤后 2 h 内入院, 入院后第 1 个 24 h 成人补液量均超过 10 000 ml (10 360 ~ 14 860 ml), 尿量 66 ml/h, 补液量与尿量体积比为 (5~6):1。

**2.1.2 保障氧供** Ⅲ度面积 ≥ 80% TBSA 的患者常合并不同程度的吸入性损伤。中重度吸入性损伤者宜尽早行气管切开, 保持气道通畅, 迅速改善组织氧供, 使机体处于良好状态, 增强抗病能力, 为后续手术处理创面做准备。

#### 2.2 处理创面

机体烧伤后免疫功能紊乱、体液大量丢失、细菌大量繁殖。随着时间延长, 细菌向深部组织侵袭, 导致创面脓毒症发生。本组中抢救成功的 8 例患者, 均尽早行切削痂术, 及时封闭创面, 从根本上控制了感染和炎症反应。

(1) 焦痂切除: 以手术清除为主, 对颜面部、会阴等特殊部位采取保痂疗法。若患者入院早、抢救及时、病情平稳, 可在伤后 48 h 内手术, 首次切痂面积建议尽可能大, 第 2 次手术的时间间隔视患者情况而定, 大部分焦痂宜在伤后 2 周内清除。Ⅲ度创面若集中于四肢, 最适宜行焦痂切除, 面颈部和会阴常规行保痂治疗。一般切痂顺序是“先四肢、后躯干”, 但也须结合全身和创面具体情况考虑。若患者感染严重, 可能有部分坏死肌肉或病灶焦痂及躯干部有限呼吸的环形焦痂, 要尽早切除; 如肢体肌肉广泛坏死, 应考虑截肢; 对暂不切除且感染较轻的焦痂, 要尽量保持干燥, 创面外涂磺胺嘧啶银糊剂。(2) 创面覆盖: 焦痂清除后, 必须及时覆盖、封闭创面。大面积Ⅲ度烧伤患者的自体皮源较少, 可移植大张异体皮, 其上开洞嵌植自体皮或行微粒皮移植术。

#### 2.3 防治感染及保护脏器功能

严重烧伤后, 引发的过度炎症反应容易导致严重感染和多脏器功能衰竭, 这也是目前大面积Ⅲ度烧伤患者的主要死亡原因。笔者认为, 防治感染应从提高机体抗病能力及控制病原菌着手, 早期给予肠内肠外营养、正确处理创面、合理应用抗生素和采取必要的消毒隔离措施均很重要。在治疗过程中, 注意进行分泌物细菌培养, 选择敏感抗生素。一旦观察到早期感染征象, 要及时选用高效抗生素或联合用药, 做到用药及时、停药果断。

(收稿日期: 2007 - 01 - 18)  
(本文编辑: 赵敏)

作者单位: 255069 山东淄博, 山东铝业公司医院普外科