论著

文章编号:1000-5404(2012)22-2292-05

树突状细胞对大鼠牙移植后组织学及 Th1/Th2 细胞因子影响的研究

邹林洪[1],王豫蓉[2],张琳林[1],明志强[2],单春城[1],李闻颖[2],陈允嘉[2] (402160 重庆,重庆医科大学附属永川医院口腔科[1];400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院正畸科[2])

[摘要] **目的** 研究不同来源树突状细胞(dendritic cell,DC)对大鼠同种异体牙移植后免疫排斥反应的抑制效果。**方法** 用BN大鼠60只、Lewis大鼠80只分别作为供、受体建立牙移植模型,将动物完全随机分为4组,每组各20只:A组为同基因牙移植组,将Lewis大鼠牙移植到Lewis大鼠;B、C、D组为同种异体牙移植组,将BN大鼠牙移植到Lewis大鼠;A、B组于术前7 d通过尾静脉输注PBS 0.5 ml于受体大鼠体内,C组于术前7 d通过尾静脉输注1×10^6/只的供体致耐受DC于受体大鼠体内,D组于术前7 d通过尾静脉输注1×10^6/只的受体致耐受DC于受体大鼠体内。各组于术后第1、2、4、8周随机处死5只大鼠,行移植牙病理学检查和ELISA检测外周血清IL-2、IFN-γ、IL-4、IL-10浓度。**结果** C、D组IL-2、IFN-γ在各时间点均高于A组低于B组,IL-4、IL-10在各时间点均高于A、B组($P<0.05$)。C组IL-2在第1周时低于D组,到第8周时则高于D组($P<0.05$)。C组IL-4、IL-10在第1、2周时高于D组,到第8周时则低于D组($P<0.05$)。C、D组牙根吸收较B组有所减少但仍高于A组($P<0.05$),C、D组牙根吸收在2、4周时没有差异,在8周时D组低于C组($P<0.05$)。C、D组炎性细胞浸润较B组均明显减轻但重于A组。**结论** 供、受体致耐受DC均可抑制大鼠同种异体移植牙的排斥反应,减轻排斥反应程度。供体致耐受性DC对早期急性排斥反应抑制更明显,受体致耐受性DC对晚期慢性排斥反应抑制更明显。

[关键词] 树突状细胞;牙移植;免疫耐受;免疫排斥

[中图法分类号] R392.11;R392.4;R782.12 [文献标志码] A

Effect of dendritic cells on histology and Th1/Th2 cytokines after tooth transplantation in rats

Zou Linhong[1], Wang Yurong[2], Zhang Linlin[1], Ming Zhiqiang[2], Shan Chuncheng[1], Li Wenying[2], Chen Yunjia[2] ([1]Department of Stomatology, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 402160; [2]Department of Orthodontics, Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the inhibitory effects of different sources of dendritic cells (DCs) on immunological rejection after allogeneic tooth transplantation in rats. **Methods** The donor and recipient tooth transplantation models were isolated from respectively 60 BN rats and 80 Lewis rats, and the rats were divided randomly. Group A was a syngeneic transplantation group, in which Lewis teeth were transplanted to Lewis rats, while group B, group C and group D were allogeneic transplantation groups, in which BN teeth were transplanted to Lewis rats. The recipients in group A and B were injected with PBS *via* the tail vein at the 7th day before the operation, and the recipients in group C and group D were injected with 1×10^6 donor and recipient tolerogenic DCs at the 7th day before the operation, respectively. Five rats that were randomly selected from each group were sacrificed at 1, 2, 4 and 8 weeks after operation, and the pathological examinations of the transplanted teeth were performed. The concentrations of IL-2, IFN-γ, IL-4 and IL-10 in the peripheral blood were detected using ELISA. **Results** At each time point, the levels of IL-2 and IFN-γ in group C and group D were higher than those in group A, but were lower than those in group B. Additionally, the levels of IL-4 and IL-10 were higher in group C and group D than in group A and group B ($P<0.05$). Compared with group D,

[基金项目] 重庆市教育委员会科学技术研究项目(KJ100302)

[通信作者] 王豫蓉,电话:(023)89035822,E-mail:rywmin66@yahoo.com.cn

the level of IL-2 in group C was lower at 1 week but higher at 8 weeks ($P<0.05$), and the levels of IL-4 and IL-10 were higher at 1 and 2 weeks but lower at 8 weeks ($P<0.05$). The root resorption in group C and group D was less than that in group B but was more than that in group A ($P<0.05$). Compared with group C, root resorption in group D was similar at 2 and 4 weeks but less at 8 weeks ($P<0.05$). The degree of inflammatory cell infiltration in group C and group D was lower than that in group B but was higher than that in group A ($P<0.05$). **Conclusion** Donor and recipient tolerogenic DCs may inhibit immunological rejection after allogeneic tooth transplantation in rats. Donor tolerogenic DCs have greater inhibitory effect on early acute immunological rejection, while recipient tolerogenic DCs showed greater inhibitory effect on later chronic immunological rejection.

[**Key words**] dendritic cells; tooth transplantation; immune tolerance; immunological rejection

Supported by the Projects of Science and Technology Research of Chongqing Education Committee(KJ100302). Corresponding author: Wang Yurong, Tel: 86-23-89035822, E-mail: rywmin66@yahoo.com.cn

牙移植是修复缺失牙、恢复咀嚼功能的有效方法之一。免疫排斥反应的发生,使移植牙受到破坏是导致移植失败的重要原因。因此,消除异体牙移植后免疫排斥反应,是临床上急需解决的问题。树突状细胞(dendritic cell, DC)是已知的功能最强大的专职性抗原提呈细胞,在诱导免疫应答及免疫耐受形成中起重要作用。通过树突状细胞诱导作为细胞治疗减轻同种异体免疫反应或促进免疫耐受,是近年来受到关注的移植耐受诱导的新方法。DC已在不同器官移植领域进行了大量研究,并取得了肯定的结果[1-2]。本课题组前期实验已证明未成熟树突状细胞能够明显降低小鼠颈部皮下异位移植同种异体移植牙的免疫排斥反应[3]。本研究旨在通过利用致耐受DC诱导同种异体牙移植后形成免疫低反应或耐受,使移植牙能够长期存留并发挥功能,为临床研究和应用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

培养供、受体致耐受DC分别为Brown-Norway(BN)、Lewis大鼠,雄性,6~8周,体质量分别为120~160、150~200 g,各2只,均为SPF级。牙移植:供体为BN大鼠雄性,10~12周,体质量180~230 g,共60只;受体为Lewis大鼠,雄性,10~12周,体质量260~320 g,共80只,均为清洁级;均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,代养于重庆医科大学实验动物中心,实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。主要试剂:rrGM-CSF、rrIL-4、rrIL-10均为Peprotech公司产品。IL-2、IL-4、IL-10和IFN-γ ELISA试剂盒购于北京四正柏生物科技有限公司。

1.2 大鼠骨髓来源致耐受DC的培养及流式细胞术检测

无菌条件下取大鼠股骨和胫骨,收集骨髓细胞悬液,红细胞裂解液裂解并洗涤后将细胞以含10%胎牛血清的RPMI1640混悬成2×10^6/ml的细胞悬液,接种于6孔培养板中,每孔4 ml,再加入rrGM-CSF、rrIL-4至终浓度分别为10、8 ng/ml,放入37 ℃,含5% CO_2的孵箱中培养。培养至48 h轻轻吹打细胞,吸去悬浮细胞半量换液,补充等量细胞因子。继续培养至第5天半量换液,并补充等量细胞因子,并加入rrIL-10至终浓度10 ng/ml。培养至第7天,收集所有悬浮细胞用于实验。流式细胞术检测结果显示培养的细胞高表达OX62,低表达CD86、CD80、MHC-Ⅱ,符合未成熟DC的表型,是具有致耐受作用的DC。

1.3 动物模型的建立及分组

将实验完全随机分为4组,每组各20只:A组为同基因牙移植组,将Lewis大鼠牙移植到Lewis大鼠;B、C、D组为同种异体牙移植组,将BN大鼠牙移植到Lewis大鼠。A、B组于术前7 d通过尾静脉输注PBS 0.5 ml于受体大鼠体内,C组于术前7 d通过尾静脉输注1×10^6/只的供体致耐受DC于受体大鼠体内,D组于术前7 d通过尾静脉输注1×10^6/只的受体致耐受DC于受体大鼠体内。

牙移植模型的建立:将BN大鼠右上颌第一磨牙植入Lewis大鼠右上颌第一磨牙牙槽窝作为异体牙移植组。将Lewis大鼠右上颌第一磨牙植入Lewis大鼠右上颌第一磨牙牙槽窝作为同基因牙移植组。

1.4 标本组织的获取

术后第1、2、4、8周每组随机处死5只大鼠,左心室抽血3~4 ml并提取血清-80 ℃保存。4%的多聚甲醛灌注固定后,取上颌骨右侧第一磨牙及其周围组织,4%多聚甲醛固定24 h,10% EDTA脱钙液脱钙,常规石蜡浸渍包埋。垂直于移植牙近中牙根长轴,将标本连续切片(厚度4 μm)。

1.5 细胞因子的测定

分别采用双抗体夹心ELISA检测试剂盒检测大鼠血清中IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-10的含量。严格按照试剂盒说明操作。

1.6 根吸收率的分析

标本切片常规HE染色,选取近中牙根进行观察分析。按照Andreason[4]的方法,经过牙根管的中央星形画8条直线,这些线与牙根面相交产生16个点,每个标本切出2张切片共32个点观察牙根面情况并记录结果。采用牙根吸收点数进行统计分析。

1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，对数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 外周血清细胞因子检测结果

同一实验组不同时间可以看出：A组4种细胞因子在各时间点比较均无统计学意义（$P>0.05$）。B组IL-2、IFN-γ在1、2周均维持在很高水平，在4、8周逐渐降低，IL-4、IL-10在1、2周均维持在很低水平，在4、8周有所增高（$P<0.05$）。C组IL-2、IFN-γ在1、2周均维持在较高水平，4、8周逐渐降低（$P<0.05$），IL-4各时间点均维持在较高水平无明显变化，IL-10各时间点均维持在较高水平，到第8周时有所升高（$P<0.05$）。D组IL-2、IFN-γ在1、2周均维持在较高水平，4、8周逐渐降低，IL-4、IL-10在1、2周均维持在较高水平，在4、8周时明显升高（$P<0.05$）。

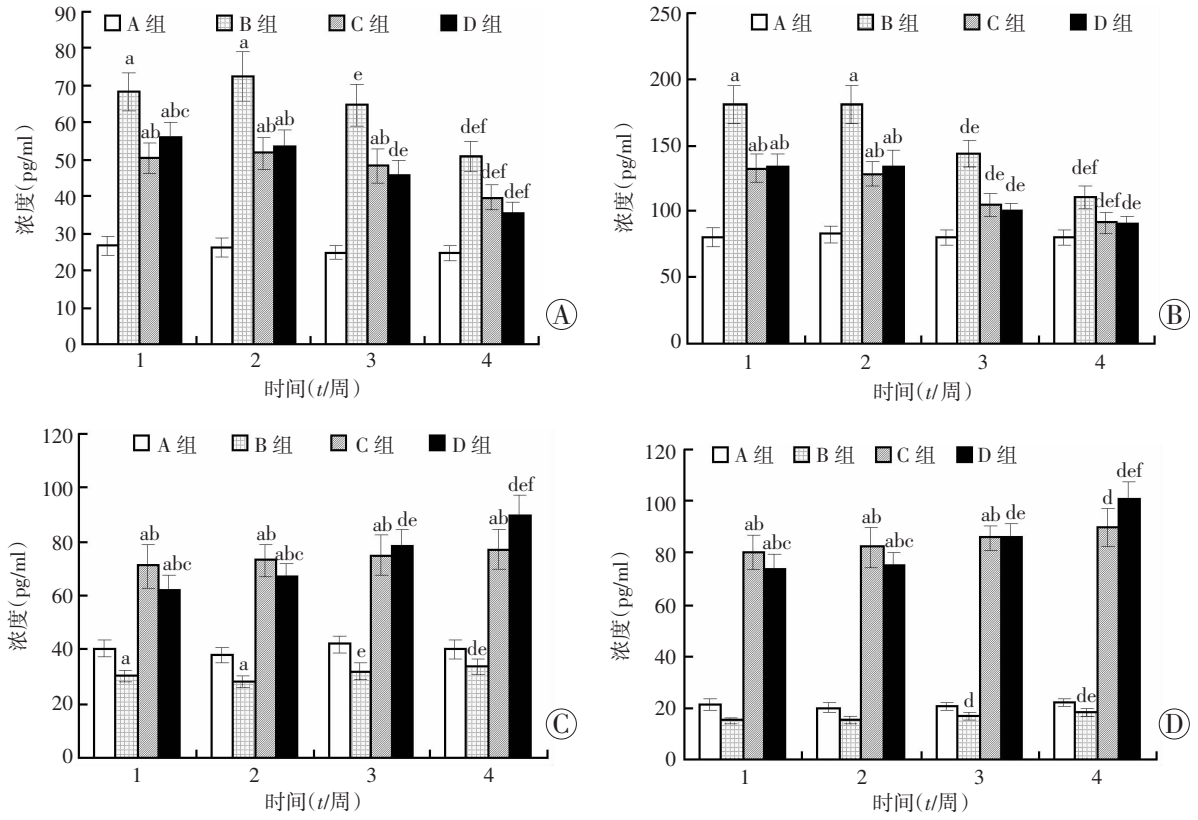
同一时间不同实验组可以看出：A组IL-2、IFN-γ在各时间点均低于B、C、D组，IL-4、IL-10在各时间点均低于C、D组（$P<0.05$）。B组IL-2、IFN-γ在各时间点均高于A、C、D组，IL-4、IL-10在各时间点均低于C、D组，IL-4在1、2、4周低于A组，IL-10在1周低于A组（$P<0.05$）。C、D组IL-2、IFN-γ在各时间点均高于A组低于B组，IL-4、IL-10在各时间点均高于A、B组（$P<0.05$）。C组IL-2在第1周时低于D组，到第8周时则高于D组（$P<0.05$）。C组IL-4、IL-10在第1、2周时高于D组，到第8周时则低于D组（$P<0.05$）。见图1。

2.2 组织病理学观察

从牙根吸收情况可以看出：在第2周时各组牙根均出现吸收，B、C、D随着时间推移在4、8周吸收均明显增加，A组仅在第4周时出现吸收增加（$P<0.05$）。A组吸收最少，B组吸收最多，C、D组吸收较B组有所减少但仍高于A组（$P<0.05$）。C、D组吸收在2、4周时没有差异，在8周时D组低于C组（$P<0.05$）。第8周时A组牙骨质存在轻度、表浅的吸收。B组牙骨质存在广泛、严重的吸收，部分区域已经深入牙本质。C、D组牙骨质存在中等程度的吸收。

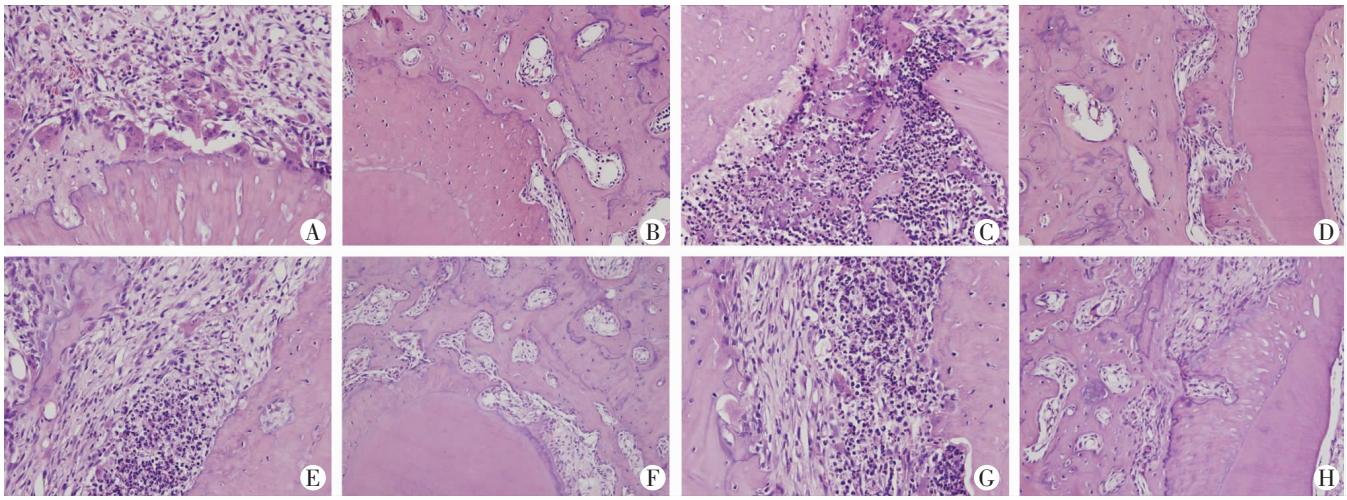
各实验组牙根周围、牙髓腔及附近牙槽骨腔隙内均可见一定程度中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润。B组炎性细胞浸润最为严重部分可见坏死淡染区域。A组炎性细胞浸润最轻。C、D组炎性细胞浸润较B组均明显减轻但重于A组。各组第1、2周时炎性细胞浸润均为最严重，随着时间推移均有所减轻，到第8周时A、C、D组已无明显的炎性细胞浸润，B组仍有极少量的炎症细胞浸润，见图2。

从外周血清细胞因子变化、炎症细胞浸润及牙根吸收情况可以看出：A组各时间点均未出现明显的排斥反应，B组各时间点的排斥反应均最严重，C、D组排斥反应较B组明显减轻但重于A组。B、C、D组排斥反应在第1、2周均重于3、4周。C组第1、2周时排斥反应轻于D组，到第8周时则比D组严重。见图3。



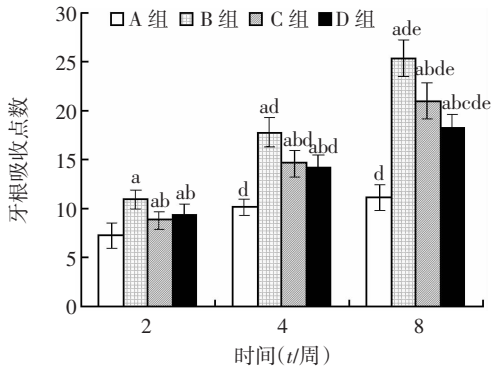
a：$P<0.05$，与A组比较；b：$P<0.05$，与B组比较；c：$P<0.05$，与C组比较；d：$P<0.05$，与第1周比较；e：$P<0.05$，与第2周比较；f：$P<0.05$，与第4周比较

图1　各组血清IL-2（A）、INF-r（B）、IL-4（C）、IL-10（D）浓度在不同时间点的检测结果



A、C、E、G：为 A、B、C、D 组移植后第 1 周（×400）；B、D、F、H：分别为 A、B、C、D 组移植后第 8 周（×200）

图 2　各组移植后不同时间移植牙病理观察（HE）



a：$P<0.05$，与 A 组比较；b：$P<0.05$，与 B 组比较；c：$P<0.05$，与 C 组比较；d：$P<0.05$，与第 2 周比较；e：$P<0.05$，与第 4 周比较

图 3　移植后不同时间段各组牙根吸收点数

3　讨论

异体移植牙的免疫应答是一种复杂的反应，诱导受体特异性免疫耐受的产生是解决移植免疫排斥反应的有效途径[5]。受体 T 细胞应答并产生抗原特异性 T 细胞的激活和大量增殖，是机体对抗原产生免疫反应或耐受的关键环节，DC 是激活初始型 T 细胞的关键因素。Nouri-Shirazi 等[6]和 Raimondi 等[7]认为未成熟的 DC 可致敏受体来源的 T 细胞诱导免疫耐受，从而使移植物的存活时间延长。Min 等[8]认为致耐受性 DC 可以诱导体内初始型 T 细胞成为调节性 T 细胞，而调节性 T 细胞又反馈诱导 DC 前体成为致耐受性 DC，形成一种“致耐受性回路”，可以诱导移植耐受的形成。

细胞因子网络是参与免疫识别、应答反应的重要成分，是决定免疫反应发生方向的主要因素之一。Th1/Th2 类细胞因子的偏移是排斥反应发生的重要机制[9-10]。Th1/Th2 平衡理论[11-12]认为：Th2/Th1 比值升高，表示产生移植耐受，Th2/Th1 比值下降则发生免疫排斥。故通过调节 Th1 和 Th2 之间的平衡，使其平衡发生倾向 Th2 细胞的偏移，来诱导免疫耐受已成为可能[12-13]。

Th1 认为是介导移植排斥反应的重要效应细胞[14]，其分泌的核心细胞因子主要有 IL-2、IFN-γ、IL-12 等。移植后急性排斥反应与 IL-2、IFN-γ 等水平的升高密切相关[15-16]。Th2 则主要产生 IL-4、IL-10 等细胞因子，认为对移植具有保护作用，可以诱导免疫耐受[17-18]，在移植排斥反应和自身免疫病的诱导过程中发挥重要作用。

本实验通过对 Th1、Th2 相关细胞因子变化的研究可以看出，供、受体来源的致耐受 DC 均可以抑制以 Thl 型免疫反应为特征的移植排斥反应，对 Th2 型细胞因子的产生有明显的促进作用，可以在一定程度上诱导免疫耐受。C、D 组牙根吸收及炎症细胞浸润减少，也表明输入供、受体来源的致耐受 DC 后的移植排斥反应程度有所降低。

C、D 组 Th1、Th2 相关细胞因子及牙根吸收情况的变化可以看出：不同来源的致耐受 DC 对同种异体牙移植后的排斥反应抑制程度有所不同。这是与不同来源的 DC 细胞在诱导免疫耐受所干预的途径不同有关。供体 DC 通过直接识别途径（direct recognition）直接活化抗原特异性 T 细胞，引起早期、急性细胞排斥反应，从而导致移植物排斥。受体 DC 通过间接识别途径（indirect recognition）参与 T 细胞激活，对于移植排斥反应的发生和发展起到了重要的推动作用。目前认为直

接识别在急性排异反应中起重要作用,而间接识别则是慢性排异反应的主要原因[19-21]。因此本研究提示供体来源的致耐受DC通过干预直接识别途径对降低早期急性排异反应更显著,受体来源的致耐受DC通过干预间接识别途径对降低晚期慢性排异反应更显著。

综上所述,Th1类细胞因子IL-2、IFN-γ的表达与移植排斥相关,其表达水平越高,排斥反应越强;Th2类细胞因子IL-4和IL-10的表达与诱导移植耐受、抑制排斥反应有重要关系,其表达水平越高,对排斥反应抑制越明显。输注供、受体致耐受性DC,均可抑制Th1类细胞因子,诱导T淋巴细胞向Th2细胞偏倚,诱导Th2型细胞反应,显著地升高Th2/Th1比值,明显抑制了大鼠同种异体移植牙的排斥反应,减轻排斥反应程度,减少牙根吸收。供体致耐受性DC对早期急性排斥反应抑制更显著,受体致耐受性DC则对晚期慢性排斥反应抑制更显著。故可通过利用致耐受DC调节Th1和Th2之间的平衡,使其平衡发生倾向Th2细胞的偏移,上调Th2细胞因子,抑制Thl细胞因子,从而使受者处于对供者抗原的免疫低反应状态,是诱导同种异体牙移植免疫耐的有效途径之一。

参考文献:

[1] 曾金华, 邱明链, 陈丽红, 等. 人凋亡相关因子配体及人转化生长因子-β1基因共修饰树突状细胞诱导大鼠肝移植免疫耐受的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(10): 1670-1673.

[2] Hattori T, Saban D R, Emami-Naeini P, *et al*. Donor-derived, tolerogenic dendritic cells suppress immune rejection in the indirect allosensitization-dominant setting of corneal transplantation [J]. J Leukoc Biol, 2012, 91(4): 621-627.

[3] 李闻颖, 邓锋, 王豫蓉, 等. 供体骨髓来源的未成熟树突状细胞抑制小鼠同种异体牙移植后排斥反应的效果研究[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(3): 354-357.

[4] Andreasen J O. Relationship between cell damage in the periodontal ligament after replantation and subsequent development of root resorption. A time-related study in monkeys[J]. Acta Odontol Scand, 1981, 39(1): 15-25.

[5] 郑苏文, 姚宇锋. 受体树突状细胞诱导供体特异性的免疫低反应及其可能机制[J]. 江苏医药, 2012, 38(6): 654-656.

[6] Nouri-Shirazi M, Thomson A W. Dendritic cells as promoters of transplant tolerance [J]. Expert Opin Biol Ther, 2006, 6(4): 325-339.

[7] Raimondi G, Thomson A W. Dendritic cells, tolerance and therapy of organ allograft rejection[J]. Contrib Nephrol, 2005, 146: 105-120.

[8] Min W P, Zhou D, Ichim T E, *et al*. Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance [J]. J Immunol, 2003, 170(3): 1304-1312.

[9] Cobbold S P, Graca L, Lin C Y, *et al*. Regulatory T cells in the induction and maintenance of peripheral transplantation tolerance[J]. Transpl Int, 2003, 16(2): 66-75.

[10] Battaglia M, Stabilini A, Draghici E, *et al*. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance[J]. Diabetes, 2006, 55(1): 40-49.

[11] Chen Z M, O'Shaughnessy M J, Gramaglia I, *et al*. IL-10 and TGF-beta induce alloreactive $CD4^+CD25^-$ T cells to acquire regulatory cell function[J]. Blood, 2003, 101(12): 5076-5083.

[12] Matsuda C, Ito T, Song J, *et al*. Therapeutic effect of a new immunosuppressive agent, everolimus, on interleukin-10 gene-deficient mice with colitis[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 148(2): 348-359.

[13] Walsh P T, Taylor D K, Turka L A. Tregs and transplantation tolerance [J]. J Clin Invest, 2004, 114(10): 1398-1403.

[14] Vuillefroy-de-Silly R, Coulon F, Poirier N, *et al*. Transplant tolerance is associated with reduced expression of cystathionine-γ-lyase that controls IL-12 production by dendritic cells and TH-1 immune responses[J]. Blood, 2012, 119(11): 2633-2643.

[15] Wang Y L, Tang Z Q, Gao W, *et al*. Influence of Th1, Th2, and Th3 cytokines during the early phase after liver transplantation [J]. Transplant Proc, 2003, 35(8): 3024-3025.

[16] Qin L, Guan H G, Zhou X J, *et al*. Blockade of 4-1BB/4-1BB ligand interactions prevents acute rejection in rat liver transplantation [J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(2): 212-215.

[17] Lin X G, Zhou Q, Wang L, *et al*. Pregnancy estrogen drives the changes of T-lymphocyte subsets and cytokines and prolongs the survival of H-Y skin graft in murine model[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(18): 2593-2599.

[18] Mori F, Barni S, Cianferoni A, *et al*. Cytokine expression in $CD3^+$ cells in an infant with food protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES): case report [J]. Clin Dev Immunol, 2009, 2009: 679381.

[19] Zhang Y, Zhang C. Role of dendritic cells in cardiovascular diseases [J]. World J Cardiol, 2010, 2(11): 357-364.

[20] Illigens B M, Yamada A, Anosova N, *et al*. Dual effects of the alloresponse by Th1 and Th2 cells on acute and chronic rejection of allotransplants[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(11): 3000-3009.

[21] Mirenda V, Berton I, Read J, *et al*. Modified dendritic cells coexpressing self and allogeneic major histocompatibility complex molecules: an efficient way to induce indirect pathway regulation [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(4): 987-997.

(**收稿**:2012-07-31;**修回**:2012-09-11)

(编辑 张 维)