基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0354-04

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

李闻颖,邓 锋,王豫蓉,陈允嘉,胡 辉
(重庆医科大学附属口腔医院正畸科,重庆 400015)

【摘 要】目的:研究供体小鼠骨髓来源的未成熟树突状细胞(Immature dendritic cell, imDC)对小鼠同种异体牙移植后排斥反应的抑制效果。方法:运用 50 U/ml 粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)诱导出小鼠骨髓来源 imDC,流式细胞术鉴定细胞表型,并于同种异体牙移植前 1 周以 2×10^6 个/只回输入受者体内,组织病理切片观察 imDC 对小鼠同种异体牙移植后排斥反应的抑制效果。结果:imDC 回输组与未回输 imDC 的同种异体牙移植组相比,淋巴细胞浸润减少、炎症反应减轻。结论:imDC 可以减轻同种异体牙移植后的排斥反应。

【关键词】树突状细胞;同种异体移植;牙移植;排斥反应;
【中国图书分类法分类号】Q813.1;R392.12 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-08

Suppression effects of immature dendritic cells on allogenic teeth rejection in mice

LI Wen-ying, et al
(*Department of Orthodontics, the Affiliated Stomatologic Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the suppressive effects of immature dendritic cells derived from donor bone on mice allogenic teeth rejection. *Methods*: immature dendritic cells derived from mice bone marrow were generated with 50 U/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; the phenotype were analyzed by flow cytometry. 2×10^6 imDC per mouse were administered to the recipients through tail vein 7 days before allogenic teeth transplantation. The suppressive effects of imDC on transplantation rejection were observed through histological section. *Results*: The infiltration of lymph cell and Inflammatory reaction in allogenic teeth transplantation group were reduced after administration of imDC to the recipients. *Conclusion*: The allogenic teeth rejection could be lessened by imDC.

【Key words】Dendritic cells; Allogenic graft; Tooth transplantation; Rejection

同种异体牙属于天然牙,移植后病人美观舒适无异物感,较义齿修复有无法比拟的优势,而且正畸矫治常需拔牙减数,为异体供牙提供了丰富来源,因此,同种异体牙移植在临床上有广阔的应用前景。但 Zaleski 和 Goldsteinl 等[1,2]均证实同种异体牙具有免疫原性,移植后存在排斥反应,目前虽进行过一些关于抑制异体牙移植后排斥反应的研究,但效果欠佳,这在很大程度上限制了同种异体牙移植的临床运用。树突状细胞(Dendritic cell, DC)是目前已知的功能最强大的专职性抗原提呈细胞(Antigen presenting cells, APCs),在诱导免疫应答及免疫耐受形成中起重要作用[3]。当 DC 主要以未成熟树突状细胞(Immature dendritic cells, imDC)方式存在时,由于其刺激 T 细胞增殖能力极弱,主要参与免疫耐受的诱导。由于 imDC 可以诱导特异性免疫耐受的特性,已有研究将 imDC 应用于抑制心脏、角膜等器官移植后产生的排斥反应中[4-6]并取得肯定效果。因此,本研究旨在运用 imDC 诱导特异性免疫耐受的特性,观察其对小鼠同种异体牙移植后排斥反应的抑制作用。

作者介绍:李闻颖(1982-),女,硕士,
研究方向:树突状细胞与异体牙移植排斥反应。
通讯作者:王豫蓉,女,副教授,E-mail: rywmin66@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 采用 6~8 周近交系小鼠,雄性。C57BL/b 小鼠作为异体牙供者单倍型 H-2d, Balb/c 小鼠作为牙移植受者单倍型 H-2b,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 RPMI1640 培养液(含 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、2 mmol/L L- 谷胺酰胺、50 μmol/L 2- 巯基乙醇)本室配制、10%胎牛血清(美国 Gibco 公司)、rmGM-CSF(英国 Peprotech 公司)、流式单克隆抗小鼠 CD11c、CD80、CD86、

抗小鼠 MHC Ⅱ 类分子抗体(美国 eBioscience 公司)、小鼠淋巴细胞分离液(天津 TBD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 骨髓制备 Inaba[7]法稍加改动。颈椎脱臼处死C57BL/b小鼠,2%碘酊浸泡 10 min,75%乙醇脱碘,无菌条件下取双侧股骨、胫骨,剥除附着的肌肉,1 ml 注射器抽取 RPMI1640,分别从骨两端插入骨髓腔反复冲洗直至变白,清洗骨髓细胞,加入淋巴细胞分离液,吸取中间白膜层,清洗所获细胞,以含 10%胎牛血清的 RPMI1640 混悬成 2×10^6 个 /ml 的细胞悬液。

1.2.2 imDC 的培养 将细胞悬液接种于 6 孔培养板中,每孔 4 ml,置于 37℃,5%CO_2 培养箱中孵育。3 h 贴壁后吸走上清液,重新加入全培养液,加入 50 U/ml 重组小鼠粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, rmGM-CSF)(前期实验得出最适浓度),隔天半量换培养液,并补充等量细胞因子。以光学倒置相差显微镜观察细胞形态及数量。连续培养至第 7 d,轻轻吹打培养板,收集悬浮细胞用于实验。

1.2.3 流式细胞术分析 在培养的第 7 d 每组收集约(1~5)$\times10^5$ 个 DC,离心后悬于 100 μl PBS,加入 MHC Ⅱ 类分子及共刺激分子 CD11c、CD80、CD86 荧光标记抗体。4℃避光孵育 30 min,离心去上清液,加 1 ml PBS 清洗细胞后,将细胞重悬于 0.5 ml PBS 避光置于 4℃,即刻上机检测。

1.2.4 细胞回输 收获培养第 7 d 的 imDC,重悬于 0.01 mol PBS 缓冲液,同种异体牙移植组 Balb/c 小鼠 2×10^6 个/只尾静脉回输。

1.2.5 新鲜异体牙及自体牙制备 无菌条件下取 C57BL/b 小鼠的下颌切牙,眼科剪细致剥离牙体周围骨组织,生理盐水漂洗牙体组织数遍,将上述新鲜同种异体牙立即移植。同样方法取 Balb/c 小鼠下颌切牙,制得新鲜自体牙。

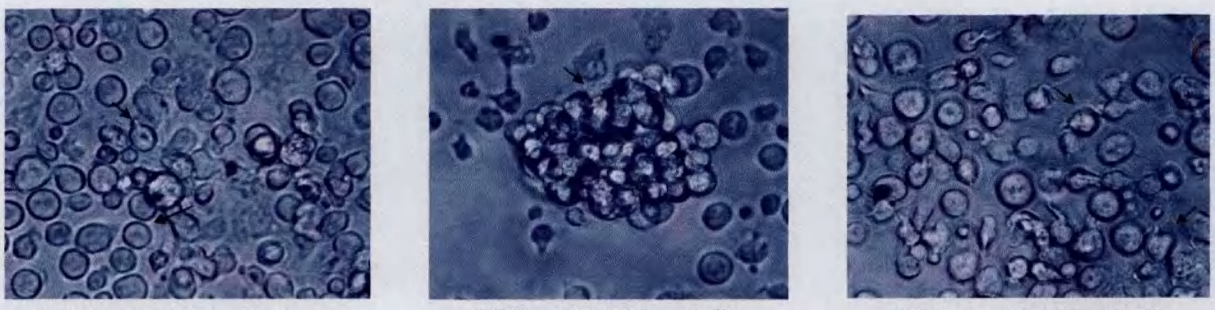
1.2.6 受者分组及同种异体牙移植模型和自体牙移植模型的建立 每组 10 只 Balb/c 小鼠,将受者分为 3 组:A 组于同种异体牙移植术前 7 d 尾静脉以 2×10^6 个/只回输 imDC;B 组于同种异体牙移植术前 7 d 尾静脉输入 PBS;C 组于自体牙移植术前 7 d 尾静脉输入 PBS。参照文献[12]的方法,细胞回输后 1 周,腹腔麻醉并固定 Balb/c 小鼠,右侧耳部周围皮肤备皮,75%乙醇消毒,钝性分离右侧耳部后缘,制备皮下袋,将新鲜 C57BL/b 小鼠下颌切牙植入其中,缝合,作为同种异体牙移植,根据尾静脉注射情况分为 A 组和 B 组;将 Balb/c 小鼠下颌切牙植入其中,作为自体牙移植的 C 组。

1.2.7 排斥反应观察 牙移植术后,每日观察各组受者局部皮肤皮温、颜色;移植术后第 7 d,处死全部处理组受者,取下移植物,放入 10%中性的福尔马林液中固定 48 h,放入脱矿液(10%盐酸 +20%甲酸 +70%蒸馏水)中脱矿,清水冲洗 24 h,10%的中性的福尔马林液中固定 24 h,酒精逐级脱水(50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、100%),二甲苯透明,浸蜡,包埋,切片(厚度 4 μm),HE 染色,显微镜下观察,进行组织学评估。

2 结 果

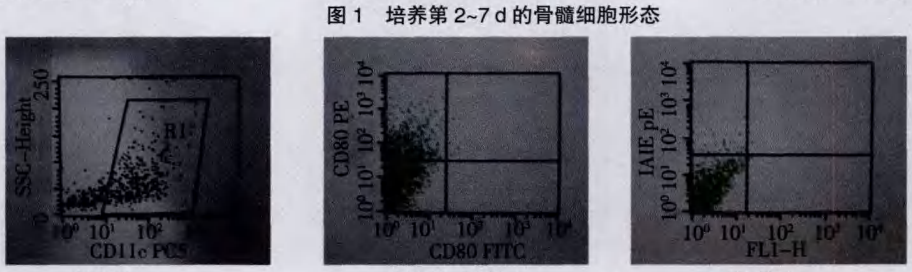
2.1 细胞形态学观察

细胞贴壁 3 h 除去未贴壁细胞,可见贴壁细胞呈圆形、胞体小,边缘清晰,均匀分布,在培养液中悬浮生长。每只小鼠约能分离出 $1\sim2\times10^7$ 个单个核细胞。补充含 GM-CSF 的完全培养基后第 2 d,可见贴壁细胞体积增大,表现出贴壁细胞聚集生长趋势。培养第 4 d,可见半贴壁 DC 集落形成,细胞表面偶可见少量细小突起。培养第 7 d,细胞集落开始减少,DC 从集落中脱落释放出来,呈半悬浮状。



培养第 2 d 细胞图片 ×400 倍　　培养第 4 d 细胞图片 ×400 倍　　培养第 7 d 细胞图片 ×400 倍

图 1 培养第 2~7 d 的骨髓细胞形态



CD11C⁺　　CD86^{low} CD80^{-}　　MHC Ⅱ^{low}

图 2 DC 表型

2.2 流式细胞术细胞表型分析

收集第 7 d 的细胞，经不同荧光抗体染色后流式细胞仪上机检测。以流式单克隆抗小鼠 CD11c 抗体首先检测出阳性表达的细胞，再检测 $CD11c^+$ 细胞的 MHC Ⅱ类分子及 CD80、CD86 表达。结果显示，培养的 DC 高表达 CD11c，低表达 CD86、MHC Ⅱ，几乎不表达 CD80，为未成熟 DC 表型。

2.3 移植后受者移植部位大体观察

术后第 1 d，所有实验 Balb/c 小鼠均存活，各组别移植部位愈合良好，皮温正常，皮肤无红肿、渗出、缝线无脱落；术后第 3 d，A 组与 C 组移植部位仍表现出良好愈合，B 组移植部位皮肤颜色开始呈粉红色，并逐渐变成深红色，可见透明渗出液体，皮温较对侧高；术后第 7 d，各个组别部分小鼠缝线开始自行脱落，A 组移植部位愈合良好，皮温正常，皮肤无明显红肿，偶见少量透明结痂；B 组移植部位皮肤呈紫红色，耳廓肿胀，皮温较高，其中 1 只 Balb/c 小鼠移植同种异体牙已排异至体外；C 组移植部位皮肤较对侧无明显差异，未见红肿、渗出及结痂。取下标本后可见，A 组皮肤组织均包裹移植牙良好，轻微充血；B 组皮肤组织包裹移植牙较松弛，约 1/2 的标本，移植牙部分裸露于包裹皮肤组织外，皮肤组织充血水肿明显；C 组皮肤组织包裹移植牙紧密，未见明显充血水肿。

2.4 组织病理学检测结果

A 组：中性粒细胞及部分淋巴细胞浸润受植部位周围皮肤组织、牙髓，移植牙周围组织血管可见扩张、充血，出现小范围细胞变性和单核细胞浸润。

B 组：单核细胞、浆细胞及大量淋巴细胞浸润周围皮肤组织及牙髓，牙髓出现坏死、髓腔内有微小脓肿形成，移植牙周围组织血管扩张充血出血，可见大量红细胞浸润。

C 组：植部位周围皮肤形态结构基本正常，仅毛细血管轻度扩张充血，移植牙周围可见中性粒细胞浸润，偶见少量淋巴细胞，牙髓内有较多量中性粒细胞浸润。

3 讨 论

同种异体牙移植作为一种器官移植，移植后免疫排斥反应的发生，是导致移植失败和阻碍其应用于临床的重要原因。目前关于抑制同种异体牙移植排斥的方法主要有以下几种[8-12]：组织相容性配型试验、移植前根管治疗、除去移植牙牙周膜、冷冻处理移植牙、放射线处理异体牙、氟化液浸泡移



A 组移植部位愈合良好



组织包裹移植牙较紧密，轻微充血



B 组移植部位皮肤呈紫红色，耳廓肿胀



移植牙部分裸露于包裹皮肤组织外，充血出血明显



C 组皮肤愈合良好，未见充血出血



皮肤组织包裹移植牙紧密，未见明显充血水肿

图 3 术后第 7 d 各组别移植部位大体观察



A 组：炎症细胞浸润，可见小范围细胞变性和单核细胞浸润



B 组：大量中性粒细胞及淋巴细胞浸润，牙髓坏死，微小脓肿形成，血管扩张充血



C 组：有中性粒细胞浸润，偶见少量淋巴细胞

图 4 术后第 7 d 各组别 HE 染色图（×400 倍）

植牙等。这些方法可以不同程度延长同种异体牙的存活时间,均存在各种缺陷,因此,寻找新的消除同种异体牙移植后免疫排斥反应的途径,成为临床上急需解决的问题。imDC 作为抑制移植后免疫排斥反应的一种新方法,已在多个器官移植实验中进行研究并证实有效,但至今尚未见运用于同种异体牙移植。因此,本研究将 imDC 运用于同种异体牙移植的实验中,以研究其对同种异体牙移植排斥反应的抑制作用。

我们通过前期实验确定了培养本实验所需 imDC 的 GM-CSF 浓度为 50 U/ml,经过 7 d C57BL/b 小鼠骨髓来源 DC 的培养,收获细胞,经流式细胞仪检测显示:$CD11c^{+}$,$CD86^{low}$,$CD80^{-}$,$MHC\ II^{low}$,符合未成熟树突状细胞表型,为 imDC。在实验中采用了主要组织相容性复合体(MHC)完全不同的 Balb/c 小鼠和 C57BL/b 小鼠,选择 Balb/c 小鼠作为牙移植受体,分别建立同种异体牙移植模型和自体牙移植模型。

为研究 imDC 对于同种异体牙移植排斥反应的抑制作用,于移植术前 7 d 将所培养的 imDC 通过尾静脉回输入受者体内,结果显示,A 组皮肤无明显红肿,组织均包裹移植牙良好,轻微充血,镜下见有炎症细胞浸润,但未见大量淋巴细胞,表现出程度较轻的排斥反应;B 组移植部位皮肤呈紫红色,耳廓肿胀,组织包裹移植牙松弛,标本充血、出血,镜下见淋巴细胞浸润、血管明显扩张充血、牙髓坏死,甚至同种异体牙被排斥出体外,表现出较重的排斥反应;C 组没有表现明显的移植排斥反应。上述结果表明,供体小鼠骨髓来源的 imDC 可以减轻同种异体牙移植排斥反应,但不能完全消除移植排斥反应。

目前还不能完全确认 imDC 在体内诱导 T 细胞耐受的机制,根据移植的嵌合理论,体外扩增供者 imDC 输入受者体内,可以促进建立供者和受者的嵌合状态和阻断共刺激通路,诱导供者抗原特异性耐受。T 细胞活化需要双信号,除了 APC 上 MHC 抗原肽与 T 细胞的 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)相互作用传递第一信号,还需要共刺激分子传递第二信号。缺乏第二信号将使 T 细胞无能。有研究发现,未成熟的供者树突状细胞诱导的免疫耐受是由于 imDC 不能向 T 细胞传递第二信号,引起了 T 细胞无能。

对小鼠移植免疫学的研究发现,imDC 介导的免疫耐受的机制可能主要是通过诱导调节性 T 细胞(T-regulatory cell, Treg 细胞)来实现的。在无免疫调节因子存在的情况下,用同种异体 imDC 反复刺激天然 $CD4^{+}$T 细胞,可使其分化为非增殖性 $CD25^{+}CD4^{+}$T-reg 细胞,并产生高水平的 IL-10,但不分泌 IL-2、IL-4 和 IL-5,在接受刺激后增殖能力非常弱。这种 T-reg 细胞通过细胞之间的直接接触依赖方式作用于 Th1 细胞,抑制其特异性的抗原增殖反应和细胞因子的产生[13]。

与其他关于尾静脉回输 imDC 抑制同种异体移植物排斥反应的研究结果相似,本实验回输 imDC 后,虽然减轻了同种异体牙移植后的排斥反应,但排斥反应仍然存在,并未完全消除。这可能与 imDC 进入受者体内后生物学性状发生改变;在移行过程中发育成熟;供体衍生细胞的类型和剂量以及 DC 输注时间和时机等因素有关。此外,免疫耐受的形成往往需要多种耐受机制参与,并不完全依赖与某种单一的耐受机制,这也在一定程度上限制了 imDC 诱导理想的免疫耐受状态。

综上所述,本研究认为,运用供体来源的 imDC 可减轻同种异体牙移植后的排斥反应,但不能完全消除排斥反应。对于输注 imDC 的途径、时间和剂量以及对于异体牙移植排斥反应的远期抑制作用等问题尚有待深入研究。

后续实验中,我们将针对以上问题,通过修饰 imDC,改变输注剂量、时机以及输注途径等方法,进行进一步研究,以期为抑制同种异体牙移植后的排斥反应提供一种新的解决方法。

参 考 文 献

[1] Zaleski M, Obersztyn A, Rymaszewska-Kossakowska T, et al. Immunizing properties of allogeneic dental pulp grafts in rabbits[J]. Transplantation, 1967, 5(4): 589-596.

[2] Goldstein B H, Tissot R G, Laskin D M, et al. Histocompatibility and tooth transplantation in the rabbit[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1975, 39(6): 929-933.

[3] 陈 跃, 王宝龙. 树突状细胞与免疫耐受[J]. 国际免疫学杂志, 2006, 29(5): 314-318.

[4] Manfred B. Lutzl, Rakesh M. Suri. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo[J]. Eur. J. Immunol, 2000, 30(7): 1813-1822

[5] 闫 峰, 蔡 莉, 惠延年, 等. TGF β 2-DC 对小鼠同种异体角膜移植排斥反应的抑制作用[J]. 国际眼科杂志, 2007, 4(7): 346-349.

[6] Tiao M M, Lu L, Tao R, et al. Prolongation of cardiac allograft survival by systemic administration of immature recipient dendritic cells deficient in NF-κB activity[J]. Ann Surg, 2005, 241(3): 497-505.

[7] Inaba K, In aba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte-macrophage colony stimulating factor[J]. J Exp Med, 1992, 176(6): 1693-1702.

[8] Iványi D, Komínek J. Tooth allografts in children matched for HLA[J]. Transplantation, 1977, 23(3): 255-260.

[9] Shulman LB. Allogenic tooth transplantation[J]. J Oral Surg, 1972, 30(6): 395-409.

[10] 付 强. ^{60}CO 照射处理异体牙移植免疫原性的实验研究 [J]. 临床口腔医学杂志, 1997, 13(3): 151-153.

[11] Schwartz O, Andreasen JO. Allotransplantation and autotransplantation of mature teeth in monkeys: the influence of endodontic treatment [J]. J Oral Maxillofac Surg, 1988, 46(8): 672-681.

[12] Riviere GR. Influence of serum on cultured murine tooth organ allotransplants[J]. J Dent Res, 1984, 63(8): 1072-1074.

[13] 赵 勇. 移植免疫耐受[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002. 85-104.

(责任编辑:关蕴良)