DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.014
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004 

文章编号:1000-5404(2004)23-2117-03

论著

# 混合胸腺移植诱导皮肤移植物免疫耐受的实验研究

解志杰,吴 军,郑峻松,彭双发 (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,重庆市 器官移植基础研究所,重庆 400038)

提 要:目的 通过建立混合胸腺移植模型,对混合胸腺移植诱导皮肤移植物免疫耐受及其机制进行初步研究。方法 混合胎胸腺移植3个月后,进行异基因皮肤移植,观察异种皮肤移植物的存活情况,并利用流式细胞仪检测各组受体动物外周血中$CD4^+CD25^+$T细胞的百分率,利用免疫组化观察宿主骨髓源细胞在胸腺移植物内的分布情况。利用脾细胞过继转移,观察对异种供体抗原已产生耐受的受者脾细胞,能否将耐受状态过继转移至正常BALB/c小鼠。结果 混合胸腺移植3个月后,受体外周血白细胞中$CD4^+CD25^+$T细胞的百分率为(2.83±0.20)%,与正常BALB/c小鼠相比,相差不显著。免疫组化染色显示,在移植胸腺内宿主源MHC-Ⅱ分子阳性细胞主要位于髓质,并具有典型树突样外观。将对F344大鼠皮肤已产生耐受的脾细胞,过继转移至免疫健全的BALB/c小鼠,可特异延长胸腺供体来源的F344大鼠皮肤移植物的平均存活时间。结论 通过胸腺移植诱导的免疫耐受,主要是以胸腺内的中枢排除机制以及调节性T细胞的免疫抑制作用为主,而且此种耐受具有一定的"可转传性"。

关键词:胸腺移植;免疫耐受;皮肤移植
中图法分类号:R392.4;R622.1;R655.7 文献标识码:A

# Tolerance to donor skin graft by grafting with mixed fetal F344 rat and BALB/c mouse thymus in nude mice

XIE Zhi-jie, WU Jun, ZHENG Jun-song, PENG Shuang-fa (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To establish the model of mixed thymus transplantation by grafting with fetal F344 rat thymus and BALB/c mouse thymus in nude mice and to explore the mechanisms of tolerance to donor skin graft. Methods Three months after mixed thymic graft transplantation, skin grafting was performed and the reconstitution of $CD4^+CD25^+$ T cell subsets in the recipients was detected by flow cytometry. The expressions of host MHC class Ⅰ and MHC class Ⅱ in thymic grafts were observed by immunohistochemistry. Viable whole splenocytes from mixed thymus-grafted nude mouse were adoptively transferred into syngeneic normal BALB/c mice. Then full thickness F344 rat skin and third-party C57BL/6 mouse skin samples were grafted simultaneously. Results After mixed thymus transplantation, efficient reconstitution of mouse $CD4^+CD25^+$ T cells in the peripheral blood was observed. Thymic grafts showed densely repopulating thymocytes that stained with mAbs for mouse MHC class Ⅰ in the deep cortex and medulla compartments. Furthermore, host-derived MHC class Ⅱ positive cells with the appearance of dendritic cells were clearly present and well distributed in the medulla. In adoptive splenocyte transfer experiments, F344 rat skin grafts were significantly prolonged as compared with the third-party allogeneic C57BL/6 mouse skin grafts. Conclusion Tolerance to donor skin grafts can be transferred by splenocytes from tolerant mice to secondary recipients. The major mechanisms involved in the induction of tolerance may be central deletion within the thymic graft and immune regulation of regulatory T cells.

**Key words**: thymus transplantation; immune tolerance; skin grafting

大量证据表明,异种胸腺可支持受者T细胞的重建和诱导异种供体特异性的T细胞耐受[1]。我们的前期研究结果显示将同系小鼠胎胸腺混入异种大鼠胎胸腺后再进行移植,移植的胎胸腺组织能够在受者体内正常发育,并且可重建受者T细胞的免疫功能。体外功能检测显示,受者中重建的脾细胞对异种供体胸腺来源的大鼠抗原刺激表现为特异性的低反应[2]。本研究在此基础上对混合胸腺移植诱导异种供体特异性的T细胞耐受进行初步研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200261)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200261)
作者简介:解志杰(1970-),男,河北省卢县人,博士研究生,医师,主要从事移植免疫及耐受诱导方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752863
通信作者:吴 军,电话:(023)68754006
收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-11-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

BALB/c(H-2d)裸小鼠(受者), 6~8周, BALB/c(H-2d)近交系小鼠(同系胸腺供体), 购自第三军医大学实验动物中心。F344(RT1A[1])近交系大鼠(异种胸腺供体)和C57BL/6(H-2b)近交系小鼠(第三方无关供体), 购自中国医学科学院实验动物繁育场。

### 1.2 主要试剂及仪器

PE labled hamster anti-mouse CD4(IgG1κ)、FITC labled rat anti-mouse CD25(IgG$_{2a}$κ)、Biotin-抗小鼠H-2K$^{d}$(MHCⅠ)抗体及Biotin-抗小鼠I-A$^{d}$(MHCⅡ)抗体均购自Pharmingen公司。FACSCalibur流式细胞仪(为Beckton Dickinson公司生产)。

### 1.3 实验分组

移植受者共分2组: 正常BALB/c小鼠, 混合胸腺移植3个月后裸小鼠, 每组5只。

### 1.4 方法

1.4.1 混合胸腺移植模型的建立 参照文献[2]进行。

裸小鼠经1%异戊巴比妥钠盐(100 mg/kg)腹腔注射麻醉。将孕15 d F344胎大鼠和孕14 d BALB/c胎小鼠的胸腺组织切成小块, 约1 mm$^3$大小, 放在100目的钢网上, 用玻璃棒压榨、混合均匀, 用12号腰穿针行左肾包膜下穿刺, 将混合均匀的胎胸腺组织植入裸小鼠左肾包膜下(每个受者接受胎大鼠和胎小鼠胸腺各1叶)。术毕, 逐层关闭腹腔。SPF级饲养室分笼饲养。混合胸腺移植3个月后, 进行皮肤移植实验。

1.4.2 皮肤移植 将各组受体小鼠用1%异戊巴比妥钠麻醉后, 俯卧位固定, 在其胸背侧两侧完全切除面积1~1.5 cm$^2$的皮肤, 彻底止血后, 将预先制备的相应大小的F344大鼠和C57BL/6小鼠全层去毛的胸背部全厚皮肤缝植于创面, 常规打包加压包扎。

结果观察: 于术后第6天去除敷料, 开始每天从颜色、温度、质地等方面观察记录移植皮肤的存活情况, 以坏死总面积≥90%定义为排斥。

1.4.3 移植胸腺组织学观察 混合胸腺移植后3个月的裸鼠被活检, 移植胸腺冰冻切片, 常规免疫组化染色, 一抗分别为Biotin-抗小鼠H-2Kd(MHCⅠ)抗体及Biotin-抗小鼠I-Ad(MHCⅡ)抗体。

1.4.4 流式细胞仪检测CD4$^+$CD25$^+$T细胞 混合胸腺移植3个月后, 取受者外周血0.5ml, 经红细胞裂解液裂解后, 获得外周血白细胞。用PE-抗小鼠CD4和FITC-抗小鼠CD25进行双标记, 4 ℃, 30 min。PBS漂洗2次, FACSCalibur流式细胞仪检测。对照组用PE labled hamster IgG1κ和FITC labled rat IgG2aκ进行标记。

1.4.5 脾细胞过继转移实验[3] 无菌分离混合胎胸腺(F344+BALB/c)移植后皮肤移植物长期存活的受者脾细胞, 调整细胞浓度为2×10$^7$/ml。经尾静脉注射, 将脾细胞过继转移至免疫健全的正常BALB/c小鼠(1×10$^7$/只), 共4只。脾细胞注射后, 进行异基因皮肤移植, 右侧移植供体胸腺来源F344大鼠的全层皮片, 左侧移植第三方无关供体C57BL/6小鼠的全层皮片, 常规打包加压包扎。

结果观察: 于术后第6天去除敷料, 开始每天从颜色、充盈、温度、质地等方面观察记录移植皮肤的存活情况, 以坏死总面积≥90%定义为排斥。

### 1.5 统计学处理

计量数据以$\bar{x}\pm s$表示, 采用SPSS统计软件行配对$t$检验及两均数$t$检验。

## 2 结果

### 2.1 各组动物中移植皮肤存活情况

混合胎胸腺(F344+BALB/c)移植3个月后, 受者裸小鼠胸背部两侧同时进行异基因皮肤移植, 实验结果显示, 胸腺供体来源的F344大鼠皮肤移植物平均存活时间为(78.00±34.89) d; 而同时移植的第三方无关供体C57BL/6皮肤移植物平均存活时间为(13.00±1.00)d, 二者存在显著的差异。在正常免疫健全的BALB/c小鼠上, 移植的F344大鼠皮肤移植物平均存活时间为(6.75±0.50)d, 见表1。

表1 各组动物中移植皮肤存活情况($n$=5)

Tab 1 Mean survival time of skin grafts in different groups ($n$=5)

| Group | Donor | Mean survival time(d) | $t$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|
| Mixed thymus grafted nude mice | F344 | 78.00±34.89 | 3.851 | 0.014 |
| | C57BL/6(third-party) | 13.00±1.00 | | |
| Normal BALB/c mice | F344 | 6.75±0.50 | 4.026 | 0.010 |

### 2.2 移植胸腺的组织学观察

HE染色显示, 移植胸腺存在正常的皮质和髓质结构, 含有大量的胸腺细胞, 髓质内可见胸腺小体[2]。免疫组化染色显示, 在移植胸腺内受体来源的MHC-Ⅰ和MHC-Ⅱ分子均有不同程度表达。MHC-Ⅰ分子主要在皮质深层和髓质中的胸腺细胞上表达, MHC-Ⅱ分子主要在髓质表达, 阳性细胞具有典型树突样外观。

### 2.3 各组动物外周血中CD4$^+$CD25$^+$T细胞的重建情况

混合胎胸腺移植3个月后, CD4$^+$CD25$^+$T细胞占受体外周血白细胞的百分率为(2.83±0.20)%, 与正常BALB/c小鼠(1.93±0.47)%相比, 相差不显著。

### 2.4 脾细胞过继转移实验

在F344大鼠皮肤移植物长期存活(POD 138 d)的BALB/c裸小鼠脾细胞中, CD4$^+$CD25$^+$T细胞的百分率为2.48%。在过继转移脾细胞后的正常BALB/c小鼠上, 移植的胸腺供体来源的F344大鼠皮肤平均存活时间显著延长, 为(16.25±0.96)d, 与正常BALB/c小鼠对照组比较相差非常显著; 而同时移植的第三方无关供体C57BL/6小鼠的皮肤移植物很快排斥, 其平均存活时间为(7.50±0.58)d, 与胸腺供体来源的F344大鼠皮肤移植物平均存活时间相比, 二者相差非常显著, 见表2。

表2 过继转移脾细胞后移植皮肤的存活情况($n$=5)

Tab 2 Mean survival time of skin grafts in adoptive splenocyte transfer experiments ($n$=5)

| Group | Donor | Mean survival time(d) | $t$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|
| Normal BALB/c mice after splenocyte transferring | F344 | 16.25±0.96 | 18.267 | 0.0003 |
| | C57BL/6(third-party) | 7.50±0.58 | | |
| Normal BALB/c mice | F344 | 6.75±0.50 | 19.000 | 0.00002 |

## 3 讨论

T细胞耐受可发生在中枢(即胸腺)或外周。诱导T

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞耐受的机制可分为无能、抑制以及克隆排除等。目前证据表明,胸腺移植后对供体和自身的耐受主要是通过在胸腺移植物内的中枢耐受排除机制[4]。文献[5]报道表明某些外周机制也可能参与了耐受的诱导和维持。本实验对胸腺移植诱导耐受的机制进行了初步研究。

### 3.1　移植胸腺内的阳性和阴性选择

胸腺内的胸腺上皮细胞和骨髓源细胞通过阳性和阴性选择,共同决定T细胞库,但每种细胞类型在胸腺细胞选择过程中的作用仍存在一定的争论。Zhao 等[6]首次证明了异种MHC分子能够介导胸腺细胞的阳性选择而不需要宿主MHC分子的参与。进一步研究发现,猪MHC分子也能够介导小鼠胸腺细胞的阴性选择。

异种胸腺中供体MHC分子能够介导宿主胸腺细胞的阴性和阳性选择,那么宿主骨髓源细胞是否也参与发育中胸腺细胞的阴性选择?Lee 等[7]通过将胎猪胸腺/肝脏组织植入 I-E$^+$ (BALB/c 裸小鼠)和 I-E$^-$ (胸腺切除的B10小鼠)两种受者中,发现在猪胸腺移植物内,小鼠I-E参与了对发育过程中小鼠胸腺细胞的阴性选择,而且这种阴性选择很可能是由小鼠 Ia$^+$ 树突状细胞所介导。本实验免疫组化染色也显示,在混合胎胸腺移植的胸腺移植物内,宿主型MHC Ⅱ类抗原阳性细胞在移植胸腺的髓质中长期存在,并具有典型的树突样外观。这也间接表明宿主骨髓源细胞参与了对小鼠胸腺细胞的阴性选择,排除自身反应性T细胞。

### 3.2　免疫调节作用

除胸腺内的克隆排除机制之外,可能还存在另一种重要的机制,即来源于胸腺移植物内的调节性细胞群体,下调宿主中效应T细胞的抗供体反应。对于外周调节性T细胞的存在、鉴定以及功能存在很多争论。不清楚其抑制作用是由独特的细胞群体介导,还是由在不同条件下可介导抑制、辅助或细胞毒作用的细胞介导。

已有很多报道证实体内存在调节性T细胞,并且是胸腺依赖的。目前认为调节性T细胞可共表达CD4和CD25分子,其特异性的表面标志物尚不能确定[8]。我们的实验结果显示,通过混合胎胸腺移植,受者裸小鼠的外周血中可检测到 CD4$^+$ CD25$^+$ 双阳性T淋巴细胞,而且其百分率与正常 BALB/c 小鼠相比无显著差别,这说明通过胸腺移植可有效重建受者外周血中的调节性T细胞。

我们利用脾细胞过继转移实验也发现,将混合胎胸腺移植后供体皮肤移植物长期存活受者的脾细胞(含2.48%的CD4$^+$ CD25$^+$ 双阳性T淋巴细胞),经尾静脉注射,过继转移至免疫健全的正常 BALB/c 小鼠,可显著延长胸腺供体来源F344大鼠皮肤移植物的存活(从6.75 d延长至16.25 d),而迅速排斥同时移植的第三方无关供体C57BL/6小鼠的皮肤移植物。这说明受者淋巴细胞中的确存在某种抑制性细胞群体,极有可能是 CD4$^+$ CD25$^+$ 双阳性T淋巴细胞,特异性下调受者体内效应T细胞的抗供体免疫反应,而不影响对无关供体移植物的免疫排斥反应。但过继转移耐受受者的脾细胞,未能使胸腺供体来源的F344大鼠皮肤移植物长期存活,可能是由于过继转移的脾细胞中 CD4$^+$ CD25$^+$ 双阳性T淋巴细胞数量不足或细胞的寿命较短,不能充分抑制受者体内的效应T细胞对异种抗原的攻击。另一种可能是除调节性T细胞的免疫调节作用外,可能还存在其它机制参与外周耐受的维持。在猪Ⅰ类MHC分子不匹配的肾同种移植模型中证实,短期应用环孢素的情况下,胸腺对外周T细胞的耐受诱导起作用,而不是耐受的维持[9]。

综合以上分析,我们可以初步得出这样的结论,通过胸腺移植诱导的供体特异性免疫耐受,可能主要依赖于胸腺内的中枢克隆清除机制,特别是在耐受的诱导期,而耐受一旦诱导成功后,耐受的维持主要依赖于外周机制,包括调节性T细胞的免疫调节作用,并且这种耐受具有一定的"可转传性"。

参考文献:


[1] Zhao Y, Rodriguez Barbosa J I, Swenson K, *et al*. Highly disparate xenogeneic skin graft tolerance induction by fetal pig thymus in thymectomized mice: Conditioning requirements and the role of coimplantation of fetal pig liver[J]. Transplantation, 2001, 72(10): 1608-1615.

[2] 解志杰, 吴　军, 郑峻松, 等. 混合胸腺裸小鼠移植模型的建立及重建T细胞功能的体外研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(3): 193-195.

[3] Morimoto T, Nishigaki-Maki K, Ohno K, *et al*. Transplantation of xenogeneic embryonic thymus to athymic nude mice induces acquisition of distorted immunity[J]. Transplant Proc, 2000, 32(5): 956-957.

[4] Zhao Y, Swenson K, Sergio J J, *et al*. Skin graft tolerance across a discordant xenogeneic barrier[J]. Nat Med, 1996, 2(11): 1211-1216.

[5] Le Douarin N, Corbel C, Bandeira A, *et al*. Evidence for a thymus-dependent form of tolerance that is not based on elimination or anergy of reactive T cells[J]. Immunol Rev, 1996, 149: 35-53.

[6] Zhao Y, Sergio J J, Swenson K, *et al*. Positive and negative selection of functional mouse CD4 cells by porcine MHC in pig thymus grafts[J]. J Immunol, 1997, 159(5): 2100-2107.

[7] Lee L A, Gritsch H A, Sergio J J, *et al*. Specific tolerance across a discordant xenogeneic transplantation barrier[J]. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91(23): 10864-10867.

[8] Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, *et al*. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4[J]. J Exp Med, 2000, 192(2): 303-310.

[9] Yamada K, Gianello P R, Ierino F L, *et al*. Role of the thymus in transplantation tolerance in miniature swine. I. Requirement of the thymus for rapid and stable induction of tolerance to class I-mismatched renal allografts [J]. J Exp Med, 1997, 186(4): 497-506.


(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net