DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.004
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

文章编号:1000-5404(2004)03-0193-03

论著

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

解志杰,吴 军,郑峻松,彭双发,易绍萱,陈希炜 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 建立混合胸腺移植模型,并在体外观察重建T细胞的功能状况。方法 首先建立混合胸腺裸小鼠左肾包膜下移植模型,流式细胞仪检测受体动物外周血中T细胞的重建情况,并利用刀豆素A(concanavalin A, Con A)增殖实验和混合淋巴细胞培养检测其体外功能状态。结果 混合胸腺移植3个月后,移植的胸腺组织在裸小鼠肾包膜下能够正常发育,并有效重建了受体外周血中的$CD4^+$T和$CD8^+$T细胞。体外功能检测显示,受体的脾细胞对Con A的刺激有良好的反应性,并对供体胸腺来源的F3Q44大鼠抗原刺激表现为特异性的低反应。结论 混合胸腺移植不仅在数量上可重建受体裸小鼠外周血中$CD4^+$T和$CD8^+$T细胞,而且受体中重建的T细胞还可发挥正常的免疫功能。

关键词:胸腺移植;T细胞重建;T细胞功能
中图法分类号:R322.53;R392.12;R617 文献标识码:A

Functions of reconstituted T cells *in vitro* by grafting with mixed fetal thymus in nude mice

XIE Zhi-jie, WU Jun, ZHENG Jun-song, PENG Shuang-fa, YI Shao-xuan, CHEN Xi-wei (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 observe the functions of the reconstituted T cells in the recipients. Methods Transplantation model was established by implantation of the mixed fetal thymic tissue under the kidney capsule in nude mice. The reconstitution of T cell subsets in peripheral blood of the recipients was detected by flow cytometry. The *in vitro* functional status of the reconstituted T cells in the nude mice and mouse splenocytes was stimulated with Con A mitogens, allogeneic and xenogeneic splenocytes. Results At 3 months after mixed thymus transplantation, efficient reconstitution of mouse $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells in the peripheral blood was observed. The levels of mouse $CD4^+$ T cells and CD8+T cells in peripheral white blood cells were similar to those of the normal euthymic mice. Con A stimulation and mixed lymphocyte reaction assay revealed that mouse lymphocytes showed a strong response to either the stimulation of allogeneic (C57BL/6 mouse) cells or Con A mitogens, and were tolerant for donor F344 rat antigens. Conclusion Mixed thymus transplantation can support the reconstitution of $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells in nude mice. Furthermore, the function of reconstituted T cells is normal *in vitro*.

Key words: thymus transplantation; T cell reconstitution; T cell function

同种异基因器官供体严重短缺的现状,促使人们积极探索异种移植的可能性。大量证据表明,异种胸腺移植是一种重建受者有功能的T细胞库有效的方法,并且可诱导异种供体特异性的T细胞耐受[1~3]。但将两种不同种属来源的胸腺组织混合后再进行移植诱导耐受的研究尚少见报道。本研究首次将同系小鼠胎胸腺混入异种大鼠胎胸腺后再进行移植,探索混合胸腺移植的可行性,并对移植胎胸腺的发育、受者T细胞的重建以及重建T细胞的功能进行了初步研究,旨在为通过胸腺移植诱导供体特异性的免疫耐受提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c裸小鼠(受体),6~8周龄,BALB/c(H-2^d)近交系小鼠,第三军医大学实验动物中心提供。

F344(RT$1A^1$)近交系大鼠,C57BL/6(H-2^b)近交系小鼠,购自中国医学科学院实验动物繁育场。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(03200261)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (03200261)
作者简介:解志杰(1970—),男,河北省卢龙县人,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:2003-06-15;修回日期:2003-08-12

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

1.2 主要试剂及仪器

PE labled hamster anti-mouse CD3($IgG_1\kappa$)、FITC labled rat anti-mouse CD4($IgG_2a\kappa$)、FITC labled rat anti-mouse CD8($IgG_2a\kappa$)均购自Pharmingen公司。^{3}H-TdR购自中国同位素北京原子能研究所。FACSCalibur流式细胞仪(为Beckton Dickinson公司生产)，液体闪烁计数仪(为Beckman公司生产)。

1.3 方法

1.3.1 混合胸腺移植模型的建立[1,4] 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×1 mm×1 mm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一叶)。术毕，逐层关闭腹腔。SPF级饲养室分笼饲养。

1.3.2 移植胸腺的组织学观察 混合胸腺移植3个月后，裸小鼠被活检，移植胸腺用10%中性福尔马林液固定，石蜡包埋，切片，HE染色。

1.3.3 流式细胞仪检测外周血中$CD3^+CD4^+$，$CD3^+CD8^+$ T细胞的百分率[4] 混合胸腺移植3个月后，取受者外周血0.5 ml，经红细胞裂解液裂解后，获得外周血白细胞。用PE-抗小鼠CD3和FITC-抗小鼠CD4或FITC-抗小鼠CD8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 $IgG_2a\kappa$进行标记。BALB/c($H\text{-}2^d$)裸小鼠为免疫缺陷对照组；BALB/c($H\text{-}2^d$)近交系小鼠为免疫健全对照组。每组动物各为3只。

1.3.4 刀豆素A(Cencanavalin A，Con A)诱导脾细胞增殖的检测[2] 无菌分离各组实验动物的脾细胞，于96孔细胞培养板中每孔加入100 μl细胞悬液(1×10^6/孔)。每实验组各设3个复孔，另设3孔不加入Con A作为细胞增殖的本底对照。实验孔Con A的终浓度为12.5 μg/ml。37 ℃，5% CO_2培养箱中培养4 d，结束培养前18 h，每孔加入1 μCi的^{3}H-TdR。结束培养时，用自动细胞收集器将细胞收集在玻璃纤维滤纸上，液闪仪计数其CPM值，并计算刺激指数(stimulation index，SI)＝CPM(反应细胞与Con A)/CPM(反应细胞与培养基)。

1.3.5 单向混合淋巴细胞反应[2] 反应细胞的准备：无菌分离正常BALB/c小鼠、混合胸腺移植后裸小鼠和正常裸小鼠的脾细胞，用完全RPMI1640培养液调整细胞浓度为4×10^6/ml。

刺激细胞的准备：无菌分离C57BL/6小鼠、F344大鼠和受体BALB/c裸小鼠的脾细胞，经丝裂霉素C处理30 min，完全培养基洗涤3次。细胞重悬后，用完全RPMI1640培养液调整细胞浓度至4×10^6/ml。

于96孔细胞培养板中每孔加入反应细胞和刺激细胞各100 μl细胞悬液，每实验组设立3个复孔。37 ℃，5% CO_2培养箱中培养4 d，结束培养前18 h，每孔加入1 μCi的^{3}H-TdR。结束培养时，用自动细胞收集器将细胞收集在玻璃纤维滤纸上，液闪仪计数其CPM值，并计算刺激指数(SI)＝CPM(反应细胞与刺激细胞)/CPM(反应细胞与培养基)。

1.4 统计学方法

采用SPSS统计软件，对计量资料进行t检验。

2 结果

2.1 移植胸腺的组织学观察

混合胸腺移植3个月后组织学观察显示，移植的胸腺组织位于肾包膜下，与肾脏实质分界清楚。移植胸腺存在正常的皮质和髓质结构，皮质和髓质内充满大量的胸腺细胞，与正常BALB/c小鼠胸腺的镜下结构相似，见图1。

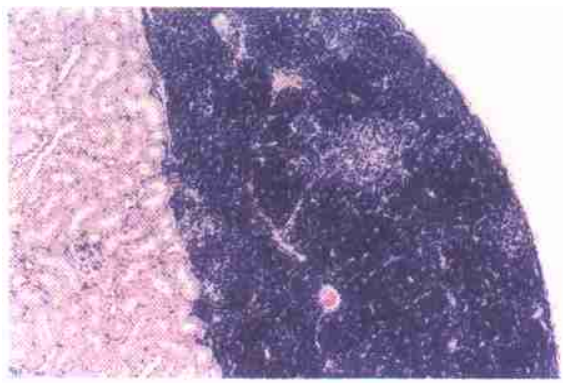


图1 移植胸腺具有正常的皮质和髓质结构，与肾脏实质分界清楚 (HE×100)

Fig 1 Grafted thymus showed normal configuration of cortical and medullary zones and with clear demarcation from kidney (HE×100)

2.2 混合胸腺移植后受体中T细胞的重建情况

混合胸腺移植3个月后，利用FACS技术检测受体裸小鼠外周血白细胞中$CD3^+CD4^+$ T细胞和$CD3^+CD8^+$ T细胞的重建水平。在正常的BALB/c裸小鼠外周血中，存在有少量的$CD3^+CD4^+$ T细胞和$CD3^+CD8^+$ T细胞，其占外周血白细胞的百分率分别为(1.43±0.57)%和(1.06±0.28)%；混合胎胸腺移植3月后，受体裸小鼠外周血中$CD3^+CD4^+$ T细胞和$CD3^+CD8^+$ T细胞的百分率显著增高，而且与免疫健全小鼠相比无显著差别($P>0.05$)(表1)。

表1 混合胸腺移植后裸小鼠外周血中$CD3^+CD4^+$ T细胞和$CD3^+CD8^+$ T细胞的重建情况(%，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Reconstitution of $CD3^+CD4^+$ T cell and $CD3^+CD8^+$ T cell in peripheral blood of the recipient nude mice grafted with mixed fetal thymus (%，$\bar{x}\pm s$)

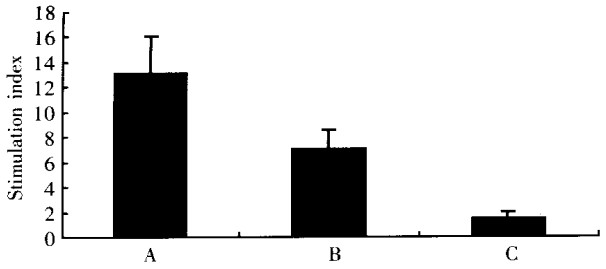
Group	$CD3^+CD4^+$ T cell	$CD3^+CD8^+$ T cell
Normal BALB/c nude mice	1.43±0.57	1.06±0.28
Mixed thymus grafted nude mice	13.22±4.38△	9.69±2.98△
Normal BALB/c mice	12.66±0.36	8.27±0.80

△：$P<0.01$，*vs* normal BALB/c nude mice

2.3 混合胸腺移植后受体动物中重建T细胞的体外反应性

2.3.1 Con A刺激增殖实验 正常BALB/c小鼠和混合胸腺移植后裸小鼠的脾细胞对Con A的刺激均具有良好的反应性，SI均大于2，而正常BALB/c裸小鼠的脾细胞对Con A的刺激不能产生有效的增殖反应，其SI远小于2，见图2。

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

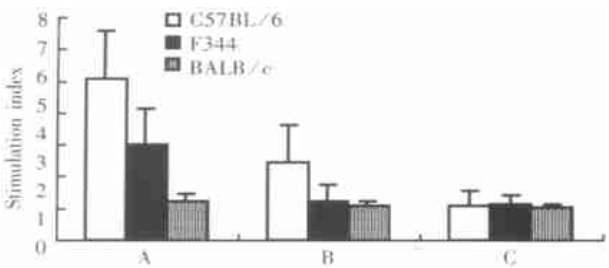


A: Normal mouse; B: Mixed thymus grafted mouse; C: Normal nude mouse

图 2　不同组别脾细胞对 Con A 刺激的体外反应性

Fig 2　Reactivity of mouse splenocytes to Con A stimulation *in vitro* in different groups

2.3.2　单向混合淋巴细胞反应　　正常 BALB/c 小鼠脾细胞对同种异体 C57BL/6 小鼠和异种 F344 大鼠的脾细胞均具有良好的反应性, SI 均大于 2, 而正常 BALB/c 裸小鼠的脾细胞无论对同种异体 C57BL/6 小鼠还是对异种 F344 大鼠的淋巴细胞抗原均不能产生有效的增殖反应, 其 SI 均远小于 2, 见图 3。混合胸腺移植后裸小鼠中的脾细胞对胸腺供体来源 F344 大鼠和受体裸小鼠的脾细胞抗原表现为低反应(SI< 2), 而对第 3 方无关供体 C57BL/6 小鼠的脾细胞有较好的反应性(SI> 2)。



A: Normal mouse; B: Mixed thymus grafted mouse; C: Normal nude mouse

图 3　不同组别脾细胞单向混合淋巴细胞反应

Fig 3　Mixed lymphocyte reaction *in vitro* in different groups

3　讨论

以前在协调型(concordant)和非协调型(discordant)异种胸腺移植的鼠模型研究中已证实, 异种胸腺可支持受体动物 T 细胞的重建和诱导供体特异性的 T 细胞耐受[1,2]。但异种胸腺移植面临的主要问题是宿主 T 细胞在异种胸腺内成熟后不能产生对宿主抗原足够的自身耐受, 而产生多器官的自身免疫损害[5,6]。

本研究首次将同系小鼠胎胸腺混入异种大鼠胎胸腺后再进行移植, 探索混合胸腺移植的可行性。结果显示, 混合胸腺移植 3 月后, 移植的混合胎胸腺组织在裸小鼠的肾包膜下可正常发育, 具有正常的皮质和髓质结构。通过流式细胞仪检测发现, 混合胎胸腺移植能够有效重建受体裸小鼠外周血白细胞中 $CD3^+$ $CD4^+$ T 和 $CD3^+$ $CD8^+$ T 细胞, 而且重建的水平与正常 BALB/c 小鼠相比无显著差异。

一般认为, T 细胞的 MHC 限制性是由胸腺的 MHC 所决定[3]。为了解在混合胸腺内成熟的宿主 T 细胞是否具有正常的免疫功能, 我们在体外利用 Con A 刺激增殖实验和单向混合淋巴细胞反应, 对受体动物中重建的 T 细胞功能进行了初步研究。机体内淋巴细胞在受到特异性或非特异性的异己抗原刺激后, 导致细胞活化, 细胞因子合成以及活化的细胞发生增殖。细胞增殖反应可在一定程度上反映细胞的功能状态。结果显示, 混合胸腺移植 3 月后, 受体裸小鼠中重建的 T 细胞对 Con A 的刺激具有良好的反应性, 这表明通过混合胸腺移植重建的 T 细胞在体外具有正常的免疫反应性。Zhao 等[7]研究也发现, 在猪胸腺内发育的小鼠 T 细胞, 具有极好的宿主 MHC 限制性免疫反应能力, 包括有能力清除机会性感染, 被选择的 T 细胞对小鼠的 MHC 有足够的交叉反应性。本实验还显示, 在体外单向混合淋巴细胞培养中, 重建的宿主 T 细胞对异种胸腺供体来源的 F344 大鼠和受体裸小鼠抗原均表现为特异性的低反应, 而对第三方无关供体 C57BL/6 小鼠的抗原具有较好的反应性。这表明混合胸腺移植后重建的 T 细胞在体外可产生对异种供体和受体抗原特异性的免疫耐受或低反应。

上述实验结果表明, 混合胎胸腺移植不但能够有效重建受体外周血中的 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞, 而且重建的 T 细胞在体外还具有正常的免疫反应力, 并且对胸腺供体来源的 F344 大鼠抗原保持特异性的低反应性。下一步我们将观察混合胸腺移植能否预防宿主自身免疫损害的发生, 以及能否在活体上诱导异种供体移植物的长期存活。

参考文献:

[1] Zhao Y, Rodriguez B 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] Nikolic B, Gardner J P, Scadden D T, *et al*. Normal development in porcine thymus grafts and specific tolerance of human T cells to porcine donor MHC[J]. J Immunol, 1999, 162(6): 3402－3407.

[3] Dorling A. Clinical xenotransplantation: pigs might fly[J]? Am J Transplant, 2002, 2(8): 695－700.

[4] 解志杰, 吴　军, 郑峻松, 等. 耐受 T 细胞抑制 NK 细胞和巨噬细胞对皮肤移植物的排斥[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(21): 1892－1895.

[5] Nishigaki-Maki K, Takahashi T, Ohno K, *et al*. Autoimmune diseases developed in athymic nude mice grafted with embryonic thymus of xenogeneic origin[J]. Eur J Immunol, 1999, 29(10): 3350－3359.

[6] 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.

[7] Zhao Y, Swenson K, Sergio J J, *et al*. Pig MHC mediates positive selection of mouse $CD4^+$ T cells with a mouse MHC-restricted TCR in pig thymus grafts[J]. J Immunol, 1998, 161(3): 1320－1326.

(编辑　张　宁)

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