DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.020
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)14-1269-03

论著

间接抗原递呈途径在同种异体表皮细胞移植排斥反应中的作用研究

陈希炜,王锡华,罗高兴,罗奇志,马 兵,易绍萱,贺伟峰,王儒鹏,唐 进 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨间接同种异型识别在体外培养的同种异体表皮细胞移植排斥反应中的作用。方法 体外分离培养人表皮细胞(Epidermal cells, EC)、异体人外周血淋巴细胞(Peripheral bloo lymphocytes, PBL)和单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBM,含单核细胞)。将毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4Ig)腺病毒载体转染EC。转染与未转染的EC中均加入异体PBL或PBM共同培养,应用氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷(^{3}H-TdR)掺入法,测定各培养系中PBL、PBM增殖情况。结果 CTLA4Ig腺病毒载体能成功转染EC并表达相应蛋白。未转染的EC刺激异体PBL轻度增殖($P<0.05$),以及刺激含单核细胞的PBM明显增殖($P<0.01$);经CTLA4Ig腺病毒载体转染的EC刺激PBL、PBM增殖则明显减弱($P<0.05$)。结论 间接同种异型识别在EC排斥中发挥了重要作用,CTLA4Ig能明显减轻该作用。

关键词:人表皮细胞;CTLA4Ig腺病毒表达载体;外周血淋巴细胞;外周血单核细胞
中图法分类号:R392.11;R622$^+$.1 文献标识码:A

Effect of indirect allo-recognition on the rejection of epidermal cells

CHEN Xi-wei, WANG Xi-hua, LUO Gao-xing, LUO Qi-zhi, MA Bing, YI Shao-xuan, HE Wei-feng, WANG Ru-peng, TANG Jin (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of the indirect allo-recognition on the rejection of epidermal cells. **Methods** Human epidermal cells (EC), allogeneic human peripheral blood lymphocytes (PBL) and mononuclear cells (PBM, including monocytes) were isolated and cultured *in vitro*. ECs were transfected with CTLA4Ig-adenovirus vector. Allogeneic PBLs or PBMs were added to the transfected and non-transfected ECs with simple cultured PBLs or PBMs as the control. The proliferation of PBLs and PBMs was determined by ^{3}H-TdR incooperation. **Results** ECs were successfully transfected with CTLA4Ig-adenovirus vector and expressed corresponding proteins. The non-transfected ECs could stimulate slight proliferation of allogeneic PBLs ($P<0.05$) but remarkable proliferation of PBMs (including monocytes) ($P<0.01$). The proliferation reaction of PBLs and PBMs decreased significantly ($P<0.05$) after the stimulation of ECs transfected with CTLA4Ig-adenovirus vector. **Conclusion** Indirect allo-recognition might play an important role in the rejection of epidermal cell, but the role can be markedly decreased by CTLA4Ig.

Key words: human epidermal cells; peripheral blood lymphocytes; peripheral blood monocytes; CTLA4Ig

及时有效地早期创面覆盖是治疗严重烧伤的重要途径。近年来,表皮细胞膜片培养技术、皮肤组织工程的快速发展,以及表皮细胞的基础研究的开展,为烧伤创面覆盖开辟了一条具有良好临床应用前景的道路。而表皮细胞是其中最关键的细胞成分之一。深入认识表皮细胞的免疫学特性,将有助于促进该细胞的应用研究的快速发展。本研究以体外培养的人表皮细胞刺激异体外周血淋巴细胞和单个核细胞,来探讨间接同种异型识别对异体表皮细胞移植排斥反应的作用,为临床应用表皮细胞移植提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

无血清表皮细胞培养基(K-SFM,美国Gibco公司),淋巴细胞分离液(天津血液研究所),pCTLA4Ig质粒及CTLA4Ig腺病毒表达载体(由本所易绍萱等[1]构建),腺病毒表达载体试剂盒(日本TakaBa公司),λ噬菌体包装试剂盒(美国Stratagene公司),质粒提取转染试剂盒及内切酶(德国Roche公司),^{3}H-TDR(1 mCi/ml,中国原子能研究所)。

1.2 人表皮细胞(EC)分离与培养[2]

将幼儿包皮(西南医院泌尿外科手术切除标本)用DispaseII-胰蛋白酶消化法制成单细胞悬液,接种于35 mm培养皿,用无血清表皮细胞培养基培养约10 d后,达亚融合状态时收获备用。

基金项目:国家自然科学基金资助重大项目(3993430-2);国家自然科学基金资助面上项目(39970756)
作者简介:陈希炜(1963-),男,福建省莆田市人,主管技师,主要从事移植免疫、生物工程和超微形态学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68754148-8080
通信作者:吴 军,电话:(023)68754006,E-mail:junwupro@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-01-09;修回日期:2003-04-15

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

1.3 人外周血淋巴细胞及单核细胞分离[3]

取健康人外周新鲜血(西南医院血库),用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,用 RPMI1640 完全培养基,含 rIL-2 1 000 ml,于 37 ℃,5%CO_2(体积比)孵箱进行培养。通过反复贴壁,分别收获贴壁的单核细胞(PBM)及悬浮的外周血淋巴细胞(PBL)。

非特异性酯酶染色证明单核细胞纯度为 97.8%。流式细胞仪(美国 Beckman 公司)分析,$CD3A^+$及 $CD19A^+$的淋巴细胞纯度为 95.9%。

1.4 人源 CTLA4Ig 腺病毒表达载体转染体外培养的人表皮细胞[4]

在转染液的滴度为每毫升 1×10^9 个噬斑形成单位,37 ℃条件下,用含人源 CTLA4Ig 腺病毒表达载体的转染液转染体外培养的人表皮细胞(Transfected EC, tEC),1 h。

1.5 人表皮细胞与同种异体人外周血淋巴细胞培养[5]

调整去除单核细胞的人外周血单个核细胞与人表皮细胞及转染人 CTLA4Ig 的人表皮细胞的细胞密度为 1×10^5/ml,将两人 PBL-EC(同种异体)等体积混合后接种于 96 孔板,在 37 ℃,5%CO_2 条件下,培养 6 d。终止培养前 18 h,加入^{3}H-TDR(终浓度为 92.5× kBq/ml)。收集细胞于负压抽吸的 0.45 μm 微孔膜上,在负压的吸引下,以 0.01 mol/L PBS 洗涤膜 3 次,无水乙醇固定,60 ℃干燥 10 min,用液体闪烁计数仪(美国 Beckman 公司)测定每分钟计数值。

1.6 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 8.0 统计程序处理,进行方差分析,方差齐性检验和 t 检验。

2 结果

2.1 CTLA4Ig 腺病毒表达载体转染表皮细胞后 CTLA4Ig 表达

免疫组化检测人表皮细胞 CTLA4Ig 的表达,发现 CTLA4Ig 阳性表达,见图 1。

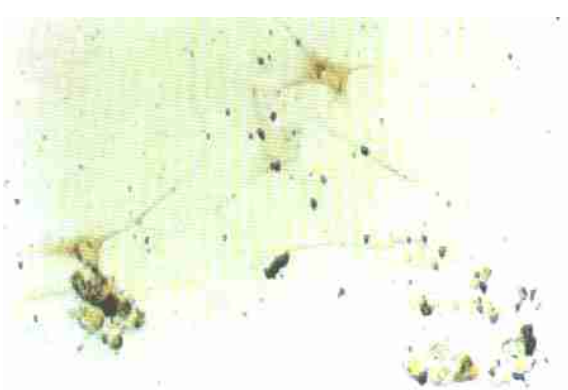


图1 **CTLA4Ig** 腺病毒载体转染 **24 h** 的表皮细胞膜上有明显的黄色 **CTLA4Ig** 蛋白表达 (ABC× 40)

Fig 1 Epidermal cells infected CTLA4Ig-adenovirus vector for 24 h could successfully express yellow CTLA4Ig protein on its cell membrane (ABC× 40)

2.2 人表皮细胞与同种异体人外周血淋巴细胞培养

人表皮细胞与同种异体的贴壁处理后的人外周血淋巴细胞混合培养后,细胞增殖反应不明显;在加入同一个人外周血来源的单核细胞后,细胞增殖反应明显增强,两组之间差异显著。而经腺病毒转染人源 CTLA4Ig 后的人表皮细胞,与同种异体的贴壁处理后的人外周血淋巴细胞及再加入同一个人外周血来源的单核细胞混合培养后,细胞增殖反应较未转染组明显减弱,见表 1。

表 **1** 人表皮细胞与异体外周血淋巴细胞培养(**CPM**, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The proliferation reaction of allogeneic PBLs and PBMs after stimulation of HECs(CPM, $\bar{x}\pm s$)

Group	proliferation of lymphocytes
PBL	2 367±512
PBL+PBM	2 189±376
EC+PBL	7 853±1675 *
EC+PBL+PBM	19 267±4383 **
tEC+PBL	4 001±504 *#
tEC+PBL+PBM	10 265±2143 **#

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* PBL or PBL+PBM; #: $P<0.05$ *vs* EC+PBL or EC+PBL+PBM

3 讨论

现代免疫学研究表明[6]:T 细胞对同种异体抗原的识别存在两条途径,一是直接识别,即受者 T 细胞直接识别由供者抗原递呈细胞(Antigen presenting cells, APC)提交的同种异体 MHC 分子。这一途径被认为是同种异体反应中 T 细胞活化的主要途径,但是,移植物表面的 HLA 分子也可以从细胞表面脱落,被受者 APC 细胞摄取,进行处理加工与自体 MHC-Ⅱ分子一起递呈给受者 T 细胞,称之为间接识别。表皮细胞虽然表达 HLA-Ⅰ类抗原,但其本身不具备抗原递呈能力,同时也不表达共刺激分子,因而,表皮细胞自身的抗原性较弱。然而我们的实验中,培养表皮细胞也能诱导一定程度的免疫应答,可能是因为反应细胞中混有少量的抗原递呈细胞(PBL 在该反应系统中的纯度为 95.9%)。虽然传代培养的表皮细胞自身抗原性很弱,但在有受者的抗原递呈细胞存在的条件下,受者的淋巴细胞有明显的免疫应答,这说明传代培养的表皮细胞移植后是会发生免疫应答,而且若受者的抗原递呈细胞也存在时,此免疫反应是极强的。我们过去的工作也证实,供受者抗原递呈细胞均存在时,两者的抗原递呈细胞在递呈抗原时有协同作用[3]。之所以有的学者能在移植培养的表皮细胞 100 d 后仍能用 PCR 检查到它的存在,其可能的解释是绝大多数的表皮细胞虽已被排斥,但敏感的 PCR 仍能查到剩余的及少数细胞,但从移植物本身而言,实际已被排斥。这种现象在移植中称为"微小嵌合"[7],而这种"微小嵌合"的机制

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

迄今尚不清楚。

同种异体排斥反应是一个 T 细胞依赖的过程。初始T 细胞的完全激活需要双重信号的刺激, 既需要 T 细胞受体(T cell receptors, TCR)提供的抗原特异性信号, 即 TCR 和抗原递呈细胞(APC)加工处理的抗原肽 MHC 复合物结合(第一信号), 又必须有抗原非特异性共刺激信号(第二信号)。若缺乏第二信号的辅助, T 细胞将处于克隆无能(Anergy)或无应答状态。CTLA4Ig 与 B7 有高度的亲和力而竞争性抑制由 CD28/B7 产生的协同刺激信号, T 细胞不能被激活, 从而抑制同种移植的排斥反应[8]。表皮细胞能在受者抗原递呈细胞存在的条件下刺激受者的免疫应答, 我们考虑能否通过阻断其刺激分子的手段使得表皮细胞诱导淋巴细胞免疫无能或无应答。诸多的实验已证实, 用 CTLA4Ig 能有效诱导淋巴细胞的免疫无应答[8,9]。我们实验也表明, 经 CTLA4Ig 转染的表皮细胞其抗原性明显降低, 并且 CTLA4Ig 腺病毒表达载体转染体外培养的表皮细胞后 6 h 即可见有 CTLA4Ig 融合蛋白的表达, 24 h 后达到较稳定的峰值。通过表达载体导入表皮细胞并使之表达, 则可能用于未来的培养表皮移植或表皮细胞复合真皮的移植。这为我们制备高质量、长期存在甚至终生存活的表皮细胞移植物提供了一个有效的途径。

参考文献:

[1] 易绍萱, 吴　军. 人CTLA-4胞外区 cDNA 的克隆及 Ig 融合蛋白表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(9): 834－837.

[2] Hammond E J, Ng R L, Staney M A, *et al*. Prolonged survival of cultured keratinocyte allografts in the nonimmunosuppressed mouse[J]. Transplantation, 1987, 44(1): 106－112.

[3] Wu J, Barisoni D, Arnato U. Donor's and recipient's antigen presenting cells co-operatively enhance the allo-reactive proliferation of peripheral blood lymphocytes[J]. Life Sci, 1994, 54(14): 1009－1017.

[4] 黄赤兵, 吴　军, 贺伟峰, 等. 共刺激阻断剂CTLA4Ig 基因重组腺病毒的构建与鉴定[J]. 重庆医学, 2002, 31(8): 682－683.

[5] Wu J, Barisoni D, Menapace L, *et al*. A novel approach to extend the survival of skin xenografts without entailing general immunosuppression or systemic toxicity[J]. Burns, 1993, 19(4): 289－296.

[6] Fangmann J, Dalchau R, Sawyer G J, *et al*. T-cell recognition of donor class I major histocompatibility complex peptides during allograft rejection [J]. Transplant Proc, 1993; 25(1Pt1): 187－188.

[7] Zhao Y B, Zhao X F, Li A, *et al*. Clinical observations and methods for identifying the existence of cultured epidermal allografts[J]. Burns, 1992, 18(1): 4－8.

[8] 杨世昕, 吴　军, 卞修武, 等. CTLA4Ig 基因表达对鼠皮肤移植免疫抑制作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 759－761.

[9] 罗高兴, 吴　军, 易绍萱, 等. 重组腺病毒载体局部介导 CTLA4Ig 延长小鼠异体移植皮肤的存活[J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(1): 37－39.

(编辑　张　宁)

欢迎邮购人民军医出版社医学图书
欢迎索取图书目录(免费赠送)

人民军医出版社是由解放军总后卫生部主管的医学卫生类图书权威出版机构, 已出版的图书种类有: 基础医学类、临床内科学类、外科学类、神经病学类、中医中药学类、临床药物学类、医学教材教辅类、医疗管理类、护理医学类、卫生科普类、保健食疗类、特种医学类等 1 000 多个品种。欢迎订购我社图书, 购书请按定价从邮局汇款, 款到寄书, 免邮寄费。批量购买价格从优。

地址: 北京市复兴路 22 号甲 3 号人民军医出版社邮购部　　收款人: 谢传炎　邮编: 100036

电话: (010)66885576　51927262

部分图书目录(定价: 元)

书　名	定　价	书　名	定　价	书　名	定　价
前列性炎	43.00	实用药物手册	68.00	全国医院概况	220.00
现代性医学	108.00	实用急诊手册	65.00	医院信息系统建设与运用	65.00
男性不育症	68.00	医师处方手册	59.00	现代医院医疗质量管理	24.00
医学答辩技巧	29.00	执业全科医师必备	120.00	医院成本核算	20.00
医师执业法律常识	13.00	实用门诊医师手册	85.00	医院管理与医学统计	17.00
医患权益与保护	18.00	医疗护理技术操作常规	198.00	医学电子仪器维修手册	68.00
医疗纠纷与法律责任	19.80	现代立体放射治疗学	39.80	常用医疗仪器原理与维护	66.00
中国药酒配方大全	38.00	现代肿瘤放射治疗学	79.00	医院管理与信息利用	18.00

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