DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.019
第25卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 9
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

文章编号:1000-5404(2003)09-0789-03

论著

异体耳廓移植后局部淋巴结 MIP-3β 的含量变化及趋化活性的研究

曹 川[1],李世荣[1],郑 红[2],孙志成[1],雷 晓[3],王珍祥[1],吴 军[3] (第三军医大学附属西南医院:[1]整形外科;[2]中心实验室;[3]全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究异体耳廓移植后局部淋巴结内趋化因子 MIP-3β 的含量变化及对树突状细胞的趋化作用。方法 进行吻合血管的大鼠同种异体耳廓移植,ELISA 法测定术后局部淋巴结 MIP-3β 的含量变化趋势,应用改良 Boyden 小室进行淋巴结组织液对体外培养树突状细胞的趋化实验。结果 同系移植组术后局部淋巴结 MIP-3β 含量升高,持续至术后第2天,以后恢复至正常水平;异系移植组 MIP-3β 含量持续上升,后期显著高于正常淋巴结内的表达水平,其对体外培养树突状细胞的趋化作用增强,这种趋化作用可被 MIP-3β 抗体所阻断。结论 器官移植后局部引流淋巴结内 MIP-3β 表达增高,促进树突状细胞的迁移运动,可能是同种异体移植排斥反应启动与进展的重要因素。

关键词:趋化因子;树突状细胞;异体移植;引流淋巴结
中图法分类号:R392.11;R617;R764.91 文献标识码:A

Study on the alteration of MIP-3β content in local draining lymph nodes after auricle allotransplantation and chemotaxis to dendritic cell

CAO Chuan, LI Shi-rong, ZHENG Hong, SUN Zhi-cheng, LEI Xiao, WANG Zhen-xiang, WU Jun (Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the alteration of MIP-3β content in draining lymph nodes after auricle allotransplantation and their chemotaxis to dendritic cell. **Methods** The auricles were transplanted from BN to Lewis rats under microsurgery. The content alteration of MIP-3β in head and neck draining lymph nodes was evaluated by ELISA and their chemotaxis to dendritic cell was detected in modified Boyden chamber. **Results** The content of MIP-3β in DLNs of isograft groups increased within 2 d after operation and then recovered to normal level while that of allograft displayed the increasing trend continuously and their homogenate showed enhanced chemotaxis to cultured DC *in vitro*, which could be blocked by MIP-3β antibody. **Conclusion** The expression of MIP-3β in DLN is enhanced after allotransplantation, which accelerates DC migration and antigen presence. It may be one of the reasons to induce and promote allo-antigen presence and rejection response.

Key words: chemokine; dendritic cell; allotransplantation; draining lymph node

巨噬细胞炎性蛋白3β(Macrophage inflammatory protein 3β,MIP-3β)是主要由淋巴结副皮质区产生一类 CC 族趋化因子,特异性趋化成熟树突状细胞(Dendritic cells, DC)向淋巴组织迁移[1~3]。外周非成熟 DC 摄取与处理抗原后表型发生变化,在 MIP-3β 的趋化作用下迁移至局部淋巴结进行抗原递呈而激活免疫。DC 的迁移是其完成抗原递呈所必须的重要环节[1,4]。器官移植后,移植区局部的异体抗原也需经 DC 的处理与携带并迁移至受体的淋巴系统递呈给T淋巴细胞才能激活免疫排斥反应。本实验应用同种异体大鼠耳廓移植模型,检测移植后同侧头颈部引流淋巴结内 MIP-3β 含量的动态变化以及不同时相淋巴组织液对体外培养 DC 的趋化作用,揭示趋化因子在异体移植中调控树突状细胞迁移与抗原递呈的机制,探讨通过拮抗趋化、阻断 DC 迁移而抑制排斥和诱导耐受的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 Lewis 近交系大鼠 RT1[l] 144只(北京医科大学实验动物所)、Brown-Norway(BN)近交系大鼠 RT1[n] 48只(中科院实验动物中心),体质量(250±15) g;异系移植以 BN 鼠为供体、Lewis 鼠为受体进行(BN→Lewis),同系移植在 Lewis 鼠之间进行(Lewis→Lewis)。

1.1.2 主要试剂与材料 小鼠抗大鼠 MIP-3β 单克隆抗体及兔抗大鼠 MIP-3β 多克隆抗体(PeproTech,英国);重组大鼠 IL-4 与 GM-CSF (R&D,美国);小鼠抗大鼠 OX62 单克隆抗体(Pharmingen,美国);XTS-6A 外科手术显微镜(江苏镇江光学仪

作者简介:曹 川(1971-),男,湖北省武汉市人,主治医师,讲师,主要从事移植免疫与显微外科方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)65410784

收稿日期:2002-04-19;修回日期:2002-06-20

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

器厂)；内切式组织匀浆器(上海跃进医疗器械厂)；低温高速离心机(HITACHI)；改良 Boyden 小室(江苏麒麟医疗用品厂)；PVP 聚碳酸滤膜(Kurabou，日本)。

1.2 方法

1.2.1 鼠耳移植手术及局部引流淋巴结组织液的获取 参照 Chiu 等[5]的方法进行吻合血管的大鼠异体耳廓移植并加以改进：手术显微镜下操作，从颈外动脉根部及面后静脉中部剪断血管取下耳廓复合组织皮瓣，以颈外动脉与面后静脉为供体耳廓血管蒂；于受体颈外动脉中段(颌外动脉分支水平)与供耳动脉蒂吻合，面后静脉根部与供耳静脉蒂吻合进行移植。异系移植与同系移植各分为6组，每组6～8只受体大鼠，分别于术后12 h、1、2、3、5、7 d手术收集移植耳同侧头颈部淋巴结，称重后置组织匀浆器中，以每克组织加 10 ml PBS 于冰上充分研磨制成匀浆，4 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min，取上清保存于 −20 ℃。

1.2.2 大鼠DC的分离培养及活化 采用 GM-CSF 联合 IL-4 诱导的方法从大鼠骨髓细胞分离与培养 DC[6]：无菌条件下将大鼠股骨与胫骨的骨髓组织全部冲出至培养皿内并以 200 目尼龙网过滤；加入红细胞裂解液静置裂解去除红细胞；调节细胞密度为 5×10^5/ml 种至24孔板，每孔加入 GM-CSF 500 U/ml、IL-4 1 000 U/ml，37 ℃、5%CO_2 孵箱培养；第3天吸弃培养上清，去除非贴壁细胞，保留贴壁细胞，每孔补充培养基及 GM-CSF、IL-4；同法隔日更换培养上清；第9天大部分 DC 已悬浮，吸取培养上清的悬浮 DC 细胞，加入新培养孔中，补充培养基及 GM-CSF、IL-4，每孔再加250 ng/ml LPS 活化 DC，继续培养 24 h 至成熟。小鼠抗大鼠 OX62 单抗标记后以流式细胞仪检测 DC 纯度。

1.2.3 ELISA 法半定量检测移植后引流淋巴结 MIP-3β 的含量变化 以 0.1 mol/L pH 9.6 的碳酸钠缓冲液稀释 MIP-3β 抗体为 10 μg/ml，包被聚苯乙烯酶联检测板；检测时，每孔加入 100 μl 淋巴结匀浆上清液，用封板胶纸封住反应孔，37 ℃孵育 2 h(以 BSA-PBS 代替组织液作为空白对照)；洗涤后每孔再加入 100 μl BSA-PBS 稀释的 0.1 μg/ml 兔抗大鼠 MIP-3β 抗体，37 ℃孵育 1 h；应用生物素标记的羊抗兔 IgG 及辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液反应，加入新配制的邻苯二铵显色液，酶标仪在 492 nm 波长测定各孔 A 值。每组上清作3个复孔，取其平均值。

1.2.4 淋巴组织液对培养 DC 的体外趋化实验 取淋巴结匀浆上清液 250 μl 加入改良 Boyden 室的下室，将 PVP 聚碳酸膜光面向下盖在液面上，装入上室旋紧外固定圈，上室加入 250 μl 1×10^6/ml 成熟 DC 细胞悬液，37 ℃、5%CO_2 孵箱静置 5 h；吸去上室中的培养液与悬浮细胞，PBS 漂洗 10 min，70%甲醇固定聚碳酸膜 30 min；苏木精染液染色 15 min，水洗后用含 1%盐酸的乙醇浸泡至细胞核呈紫红色，将膜晾干，高倍镜下计数趋化细胞。以 PBS 作为空白对照，按对照孔每视野约 10 个左右细胞的深度，随机计数样品孔 5 个视野中的全部细胞，计算趋化指数(Chemotactic index，CI)。取正常 Lewis 大鼠(0 h 组)及术后 1、3、5 d 的淋巴结上清标本进行检测，结果用 3 个重复室 CI 的平均值表示。每组标本再设重复加入终浓度为 0.5 μg/ml 小鼠抗大鼠 MIP-3β 单抗。

$$\text{趋化指数(CI)}=\frac{\text{迁移到待测样品液的细胞数}}{\text{迁移到空白对照液的细胞数}}$$

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。

2 结果

2.1 耳移植后局部引流淋巴结 MIP-3β 的动态变化

检测结果显示，正常大鼠(0 h 组)淋巴组织液 A 值为0.237±0.022，非相关组织(肌肉)匀浆上清 A 值为 0.057，说明正常情况下淋巴结内有一定量的 MIP-3β 表达。同系移植的大鼠受体初期 MIP-3β 含量升高，持续至术后第 2 天($P<0.01$)，以后恢复至正常水平；异系移植组局部淋巴结 MIP-3β 含量术后 12 h 与同系移植组无显著差异($P>0.05$)，以后持续上升，至后期显著高于正常大鼠及同系移植组淋巴结 MIP-3β 的表达水平($P<0.01$)，见表1。

2.2 耳移植后局部淋巴组织液对 DC 的趋化作用

正常大鼠淋巴结对 DC 有一定的趋化作用。同系耳廓移植术后第1天局部淋巴结组织液的趋化能力增强($P<0.05$)，第3天及第5天基本恢复正常($P>0.05$)；异系移植组术后局部淋巴结组织液对 DC 的趋化作用逐步上升($P<0.01$)；应用 MIP-3β 抗体后各组淋巴组织液对 DC 的趋化作用减弱($P<0.01$)，见表2。

表 1 耳移植后局部引流淋巴结 MIP-3β 含量的动态变化(A，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Dynamic changes of MIP-3β in draining lymph nodes after auricle allograft (A，$\bar{x}\pm s$)

Group	Time after operation						
	0 h	12 h	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d
Isograft	0.237±0.022	0.259±0.023 *	0.389±0.027 **	0.302±0.031 **	0.243±0.022	0.229±0.026	0.231±0.015
Allograft	0.237±0.022	0.260±0.029 *#	0.456±0.032 **##	0.589±0.038 **##	0.675±0.035 **##	0.889±0.032 **##	0.872±0.045 **##

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* 0 h；#：$P>0.05$，##：$P<0.01$ *vs* isograft

表 2 耳移植后局部引流淋巴结组织液对 DC 的趋化作用(CI，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The chemotaxis of draining lymph nodes after auricle allograft (CI，$\bar{x}\pm s$)

Group	0 h	1 d	3 d	5 d
Isograft	3.19±0.36	4.49±0.31 *	3.31±0.38 **	3.15±0.22 **
Isograft+MIP-3βAb	2.20±0.39 #	3.06±0.28 #	2.16±0.31 #	2.27±0.29 #
Allograft	3.19±0.36	5.61±0.28 *	7.44±0.61 *	9.50±0.55 *
Allograft+MIP-3βAb	2.20±0.39 #	3.18±0.42 #	5.94±0.55 #	8.50±0.58 △

*：$P<0.01$，**：$P>0.05$ *vs* 0 h；#：$P<0.01$ *vs* isograft；△：$P<0.05$ *vs* allograft+MIP-3βAb

3 讨论

机体免疫功能的发挥是通过各种免疫细胞在体内的迁移循环及相互作用来完成的，这些迁移运动都在趋化因子/趋化因子受体的作用下进行[1,7]。以往研究较多的是趋化因子对中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞等免疫效应细胞的趋化作用，近年来研究表明树突状细胞等抗原递呈细胞也受趋化因子的作用，通过在

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

体内不同部位的迁移完成抗原递呈。已知 DC 是目前发现功能最强的抗原递呈细胞, 全身所有抗原递呈细胞中惟有 DC 才能激活初始型 T 细胞[4,6]。器官移植后受体的免疫效应系统并不能直接对供体抗原产生反应, 供体抗原必须经 DC 的处理与递呈才能被受体免疫系统所识别, 因此 DC 是移植免疫排斥发生的关键因素, 趋化因子控制 DC 的迁移运动是其参与调节移植免疫反应的另一重要手段。MIP-3β 特异性表达于淋巴结副皮质区[8], 该区是 DC 与初始型 T 细胞相互接触进行抗原递呈的场所。正常情况下淋巴结内的组织细胞分泌一定量的 MIP-3β, 趋化表达 CCR7 受体的成熟 DC 向淋巴组织迁移, 维持 DC 正常的生理循环; 炎症、应激情况下趋化因子的分泌增加, 促进 DC 的迁移与抗原递呈, 加强免疫反应; 进入淋巴组织内的 DC 自身也可产生 MIP-3β, 进一步促使更多 DC 向淋巴组织移动[3,8], 这也是趋化因子参与免疫应激反应的一种正反馈调控机制。

本实验对移植术后局部引流淋巴结 MIP-3β 含量测定显示, 术后 12～24 h 同系移植与异系移植组 MIP-3β 表达均上升, 且二者增高程度相近, 说明在移植后初期, 由于局部创伤、缺血/再灌注损伤等手术因素产生一些致炎因子, 引起机体局部淋巴组织反应, 产生趋化因子增加。术后第 3 天同系移植组 MIP-3β 表达下降并逐渐恢复正常, 而异系移植组表达仍继续上调。其原因可能由于异系移植的受体出现排斥反应, 排斥损伤造成局部炎症反应加重, 促进趋化因子表达的进一步增强; 另一方面从外周迁移进入淋巴结的 DC 增多, 这些 DC 也可分泌 MIP-3β, 促使后者浓度的进一步升高。这些都显示出排斥过程中淋巴组织保持对 DC 持续的趋化作用。趋化实验的结果显示异体移植后局部淋巴结对 DC 的趋化能力显著增强, 并与 MIP-3β 的增高趋势一致, 这种作用可被 MIP-3β 抗体所拮抗。提示可应用 DC 特异性趋化因子抗体或拮抗剂, 抑制树突状细胞向淋巴组织的迁移而阻断抗原递呈达到免疫抑制的目的。

最近有研究表明, 递呈抗原的 DC 数量在引起 T 细胞活化或是耐受的分化方向上起着重要的调控作用[9]: 只有在炎症、抗原刺激情况下大量 DC 进入淋巴结才能刺激 T 细胞使之活化产生相应的免疫反应; 而在没有炎症发生情况下, DC 以生理状态的低剂量向淋巴组织迁移, 虽然也能递呈抗原, 但由于其数量很少, 不能完全活化 T 细胞, 反而导致对特异抗原的耐受[10], 这也是后天外周免疫耐受形成的机制之一。这一点说明 DC 的数量对于调节免疫反应发生的状态具有重要作用。根据 DC 的这种迁移特性, 如果在移植后通过拮抗 MIP-3β 的趋化作用将进入淋巴组织的 DC 数量控制在一定的低量状态, 有可能诱导抗原特异性免疫耐受。

同种异体耳廓移植是全耳再造的一种新的手段, 通过移植具有正常人体形态的异体耳廓可真正达到完美重建外耳的目的, 这一技术能够克服传统的全耳再造方法的不足, 为耳缺损患者带来新的希望。由于头颈部恒定的血管与淋巴结解剖结构, 耳廓移植也是研究异体移植后局部淋巴结反应的良好动物模型。以往对趋化因子在移植免疫中的研究基本上是针对拮抗 T 细胞、单核细胞的浸润以控制排斥反应过程来进行的, 由于免疫排异信号已被激活, 仅仅依靠阻断 T 细胞等效应细胞的浸润只能在一定程度上暂时延缓排斥反应。如能通过阻断 DC 的迁移, 使抗原递呈过程不能发生, 切断供体抗原信息与受体免疫系统的联系, 也能达到免疫抑制的目的。由于这种阻断是抑制抗原信息进入机体免疫系统内部, 处于更上游的水平, 将能达到更佳的效果并可能获得特异性免疫耐受。目前部分趋化因子突变体拮抗剂已研究成功, 通过阻断 DC 的迁移而抑制免疫排斥, 是今后器官移植新的治疗手段, 对进一步揭示移植免疫的本质, 促进器官移植的发展具有重要的意义。

参考文献:

[1] Sallusto F, Mackay C R, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 593－620.

[2] Cyster J G. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs[J]. J Exp Med, 1999, 189(3): 447－450.

[3] Dieu M C, Vanbervliet B, Vicari A, *et al*. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites[J]. J Exp Med, 1998, 188(2): 373－386.

[4] 曹雪涛. 树突状细胞的研究热点及其与疾病的防治[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(3): 163－165.

[5] Chiu D T, Ascherman J A, Patsis M C. Rat ear transplantation: A feasibility study[J]. J Reconstr Microsurg, 1993, 9(1): 33－38.

[6] Inaba K, Inaba 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.

[7] Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 217－242.

[8] Ngo V N, Tang H L, Cyster J G. Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells[J]. J Exp Med, 1998, 188(1): 181－191.

[9] Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation[J]. J Exp Med, 1999, 189(4): 611－614.

[10] Kurts C, Kosaka H, Carbone F R, *et al*. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(＋) T cells[J]. J Exp Med, 1997, 186(2): 239－245.

（编辑　张　宁）

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