

抗原葡萄球菌肠毒素B诱导大鼠肾细胞移植免疫耐受形成过程中对CD4⁺CD25⁺T细胞的影响

周力 张川

【摘要】 目的 探讨超抗原葡萄球菌肠毒素B(SEB)诱导大鼠肾细胞移植免疫耐受形成过程中对CD4⁺CD25⁺T细胞的影响情况。方法 10只LEW大鼠作为供体,20只F344大鼠作为受体,设为对照组和SEB组各10只。取供体鼠肾脏细胞注入受体鼠血中建立鼠肾细胞移植模型。SEB组大鼠注射剂量为3.0 mg/kg,对照组大鼠注射同量生理盐水。分别用流式细胞仪法和放射免疫法测定受体鼠血中在移植前后第5、10、20天CD4⁺CD8⁺T细胞数量百分数和IL-2、TGF-β含量,对结果进行比较和统计学分析。结果 肾移植模型成功率100%,SEB组大鼠外周血中CD4⁺CD25⁺T较对照组第5天和第10天明显增高($P<0.05$),但第20天无显著差异。对照组血中IL-2不断增高,在第10天、20天时明显高于SEB组;TGF-β表达量无论对照组及SEB组均逐步增加,但SEB组较对照同期增加显著($P<0.05$)。结论 SEB通过影响CD4⁺CD25⁺T的表达,调节T细胞亚群的分布,对免疫排斥产生调节作用,在诱导免疫耐受中具有一定的作用。

【关键词】 肾移植; 移植耐受; CD4; CD25

To explore the effect of CD4⁺CD25⁺T cell in ectogenic kidney cells-transplanted rats with immunotolerance induced by staphylococcal enterotoxin B ZHOU Li, ZHANG Chuan. Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Corresponding author: ZHOU Li, Email: hydztg@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of CD4⁺CD25⁺T cell in ectogenic kidney cells-transplanted rats with immunotolerance induced by SEB (staphylococcal enterotoxin B). **Methods** 10 LEW rats as donors, 20 F344 rats as receptors, set as control group and SEB group 10 each. Take donor rat kidney cells injected into receptor in rat blood rat renal cell transplantation model was established. SEB group rats injected dose of 3.0 mg/kg, and the control group rats the same amount of saline injections. Cells respectively with the method and avoid method determination of receptors in rat blood transplantation before and after five days, ten days, 20 days of CD4⁺CD8⁺T cell count percentage and IL-2, TGF-β content, comparison and statistical analysis of the results. **Results** Renal transplantation model success rate is 100%; CD4⁺CD25⁺T cell of peripheral blood in SEB group significantly increased than the control group at 5 and 10 days ($P<0.05$), but at 20 days there was no significant difference. Control group in increasing serum IL-2 at 10 and 20 days are significantly higher than SEB group; TGF-β expression quantity regardless of the control group and SEB group gradually increased, but the SEB increased significantly than control group over the same period ($P<0.05$). **Conclusions** SEB influencing the expression of CD4⁺CD25⁺T to adjust the distribution of T cell subgroup, produces regulation to immune rejection, which have a certain role in the induction of immune tolerance.

【Key words】 Kidney transplantation; Transplantation tolerance; CD4; CD25

肾移植是治疗终末期肾病的有效方法,但是急、

慢性排斥反应常导致移植肾失去功能,目前治疗排斥反应主要依靠联合应用免疫抑制剂,但是免疫抑制只能减少其发生的概率,只有诱导机体对移植物的特异性的耐受才是根本的解决方法。越来越多的研究结果表明,CD4⁺CD25⁺T细胞在人类的移植免疫耐受中起重要作用^[1-2]。CD4⁺CD25⁺T细胞可分泌细胞因子IL-2、转化生长因子β(TGF-β),因此T细胞数量升高,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.23.084

基金项目:黑龙江省卫生计生(中医管理局)科技计划攻关项目(GC06C40804)

作者单位:150086 哈尔滨医科大学附属第二医院泌尿外科(周力、张川(现工作单位成都市第五人民医院泌尿外科))

通讯作者:周力, Email: hydztg@163.com

其分泌的细胞因子IL-2、TGF-β也伴随升高。研究发现,超抗原金黄色葡萄球菌肠毒素B亚单位(staphylococcal enterotoxin B, SEB)是一组细菌性外毒素,通过对CD4⁺CD25⁺ T细胞的调节作用可对免疫耐受过程产生重要的影响。本实验通过建立大鼠肾细胞移植模型,研究SEB在诱导免疫耐受过程中CD4⁺CD25⁺ T细胞及其分泌的细胞因子IL-2、TGF-β的变化情况,探讨SEB在诱导免疫耐受过程中的作用机制。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物: 由哈尔滨医科大学附属第二医院动物实验中心提供,选择SPF级,生长8~10周,体重约(200±10)g,LEW大鼠10只作为供体,F344大鼠20只作为受体。

2. 试剂: 超抗原SEB由解放军总医院免疫学教研室提供,抗CD4 T细胞抗体、抗CD8 T细胞抗体由BD公司提供,IL-2抗体、TGF-β试剂盒由BD公司提供。用流式细胞仪测定血中CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞数量;放免法测定血清中IL-2和TGF-β含量。

二、方法

1. 肾移植模型建立: 供、受体均在移植前禁食12h,自由饮水,以10%水合氯醛350mg/kg腹腔注射麻醉,待麻醉满意后术区备皮、固定、络合碘术区消毒三遍、铺无菌巾,取出供体肾脏,HCA液灌洗1.5~2.0ml/min(一般不超过5ml),将供肾动、静脉开口端与受体肾动、静脉作端端吻合。采用10-0无损伤缝合线三点法进行吻合,采用输尿管膀胱置入法处理输尿管,移植后存活约3d,表示模型建立成功。

2. 动物分组及注射: 将实验动物F344大鼠20只随机分成两组,设为对照组和SEB组。SEB组大鼠由静脉注射SEB3mg/kg,每周1次,共2次(间隔3d,首次为移植后第4天)。对照组注射同量生理盐水。

3. 检测指标: 分别在移植后第5、10、20天采用大鼠尾静脉血2ml测定对照组及SEB组,记数1×10⁶个细胞,加入1:1000稀释的荧光标记的抗CD4和抗CD25单抗(BD公司提供)。室温避光放置45min后,离心去上清,PBS洗涤1遍后悬于200μl PBS中,上机检测CD4⁺CD8⁺ T细胞;按照试剂盒说明检测IL-2含量和TGF-β含量。

三、统计学分析

计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,所有数据均用统计学软件SPSS 10.0处理, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

共施行大鼠肾移植20例,术后存活良好均超过3d,未出现感染症状,移植区切口愈合良好。均于术后5~50min苏醒,3~6h后进水、进食,术后尿量检测10~20ml/24h,72h后一般均活动自如。

术后对照组外周血中CD4⁺CD25⁺ T细胞百分数未见明显改变;但注入SEB后大鼠外周血中CD4⁺CD25⁺ T细胞百分数较对照组同期明显升高,以第10天左右达到峰值(2.97±0.31)%,但第20天后则下降至正常水平左右($P > 0.05$),见表1。

表1 对照组与SEB组大鼠肾细胞移植术后外周血CD4⁺CD25⁺T细胞百分数平均值(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第5天	第10天 ^a	第20天
对照组	10	1.45±0.18	1.48±0.23	1.41±0.21
SEB组	10	2.31±0.22	2.97±0.31	1.56±0.19

注: $F = 35.825, ^a P < 0.000$

放射免疫法检测外周血结果显示,对照组大鼠血中IL-2相对表达量分别为在术后第5天明显低于SEB组的($P < 0.05$),第10天SEB组IL-2达到峰值明显低于对照组($P < 0.05$),第20天对照组进一步增高,但SEB组进一步下降,有统计学差异($P < 0.05$);TGF-β的表达则随着SEB的注射次数的增加,表达量不断增高,第20天时明显高于对照组及SEB组第5天及第10天的表达量($P < 0.05$)。但在术后第5天对照组及SEB组未见明显差异($P > 0.05$),见表2。

讨 论

肾移植是治疗终末期肾病的有效方法,但是急、慢性排斥反应常导致移植肾失去功能,最终导致患者死亡。目前治疗排斥反应主要依靠联合应用免疫抑制剂,减少排斥反应的发生。但是这种非特异性的免疫抑制治疗会严重影响全身免疫防御能力。理想的免疫抑制应能针对移植器官的特异免疫耐受同时保留免疫

表2 对照组与SEB组大鼠肾细胞移植术后外周血IL-2、TGF-β相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第5天		第10天		第20天	
		IL-2	TGF-β	IL-2	TGF-β	IL-2	TGF-β
对照组	10	1.13±0.51	1.59±0.20	1.95±0.41	1.74±0.23	2.12±0.46	1.82±0.26
SEB组	10	1.21±0.47	1.57±0.21	1.67±0.21	1.98±0.34	1.13±0.25	2.54±0.33

系统的功能,即免疫耐受。在本组研究中,模型均建立成功,成功率达到100%,为进一步的免疫耐受相关研究奠定了坚实基础。

1. CD4⁺CD25⁺ T细胞与免疫耐受的关系:大量实验发现,有多种T细胞亚群被证实在体内有免疫抑制的作用,这些细胞群包括CD4⁺CD25⁺ T细胞、Th3细胞、NKT细胞等,而CD4⁺CD25⁺ T细胞是研究最多的一种^[3-4]。CD4⁺CD25⁺ T细胞属于CD4⁺ T细胞亚群,被认为在诱导免疫耐受的过程中有着重要的作用。CD4⁺CD25⁺ T细胞可以分泌大量细胞介质如IL-2、TGF-β等。静止的CD4⁺ T细胞只有在接触抗原并活化后才会上调CD25的表达,提示CD4⁺CD25⁺ T细胞的表达通过抗原刺激引发。Hara等^[5]和Porto等^[6]发现在已产生免疫耐受的心脏移植和皮肤移植物中CD4⁺CD25⁺ T细胞数量明显升高,而Kingsley等^[7]也证实了在已形成免疫耐受的同种异体皮肤再次进行移植时,其CD4⁺CD25⁺ T细胞可阻止排斥反应的发生。国内奚瑾等^[8]发现在大鼠角膜移植物的组织和血液中CD4⁺CD25⁺ T细胞数量有短暂的升高过程,我们的实验发现,在建立肾细胞移植模型后大鼠血中CD4⁺CD25⁺ T细胞有一过性升高的趋势,这种变化与免疫耐受形成有关系,具体机制尚不清楚。我们测定了IL-2、TGF-β的相对表达量后发现,TGF-β的升高趋势与CD4⁺CD25⁺ T细胞的变化趋势相平行。但IL-2的表达则随着TGF-β的表达逐渐下降。

2. SEB与免疫耐受的关系:SEB是葡萄球菌产生的系列毒素(SEA~SEP)中的一种。SEB有强大的免疫调节功能,可直接激活T细胞,引起T细胞增殖。SEB可与T细胞受体的Vβ链以及抗原呈递细胞(APC)的二型主要组织相容性复合物(MHC II)结合,将T细胞和APC同时激活,引起T细胞产生大量的炎性介质,如IL-2、TGF-β等^[9-11]。在本组研究中发现,随着SEB的输注其中T细胞亚群发生了变化,同时对照组及SEB组CD4⁺CD25⁺ T的表达量差异明显,说明SEB在免疫耐受的调剂中存在重要的作用。

SEB作为超抗原同普通抗原不同的一点是超抗原可以直接激活5%~30%的T细胞,而普通抗原只能直接激活不到0.01%的T细胞,同时超抗原还可以对免疫系统进行调控,在某些情况下SEB也能产生免疫抑制作用,而这种调控作用被认为可以通过影响CD4⁺CD25⁺ T细胞数量来实现^[12]。研究发现,注射过SEB的小鼠的脾脏细胞具有免疫抑制能力,其脾脏细胞所具有的免疫抑制活性最强,随后即逐渐减弱^[13]。SEB可以刺激T细胞分泌大量的细胞因子IL-2、TGF等,而TGF是一种重要的抑制性细胞因子,CD4⁺CD25⁺ T

细胞通过TGF发挥免疫抑制作用。我们的实验发现SEB组大鼠血中TGF-β含量要比对照组大鼠血中的要高,IL-2随着SEB处理时间的延长,表达量逐渐下降,免疫排斥受到抑制;但本组数据显示SEB可以上调CD4⁺CD25⁺ T细胞的表达产生抑制免疫排斥,主要是通过通过对T细胞亚群的调剂。以往的研究表明^[14],SEB在小鼠骨髓移植中和外周淋巴细胞移植中起到重要抗排斥作用,其特征是可特异性抑制CD4⁺ T细胞而不影响CD8⁺ T细胞,过高或过低剂量的SEB都不能诱导CD4⁺ T细胞的耐受性。SEB诱导的免疫耐受时间长达21~40 d,我们的实验发现SEB的这种作用在第10天左右达到高峰值,第20天后则明显下降至正常水平。如何能够持续抑制免疫排斥,是我们值得进一步深入探讨的课题,同时,在本组实验中仅采用了单一剂量,未对多种剂量进行对比研究,这也是我们进一步研究的方向,明确在何种浓度存在最好的免疫调节作用。

在过去的几十年里,由于免疫抑制剂的发展,显著减少了急性排斥的发生率,同时提高了器官移植物的短、长期生存率。在美国,每年等待进行器官移植的约7万人中,仅2万人能够实现愿望,得不到供体的患者只能在等待中死亡^[15]。因此减少移植后各种排斥反应的发生、提高移植器官的存活时间成为移植学家及免疫学家需要迫切解决的问题。无疑,移植器官与宿主形成免疫耐受的是最完美的结局。通过本组研究证明SEB在促进免疫耐受过程中的具有重要作用,为解决移植后排斥反应问题提供了很好的途径,需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Wang ZO, Orlikowsky T, Dudhane A, et al. Staphylococcal enterotoxin B-induced T-cell anergy is mediated by regulatory T cells. *Immunology*, 1998, 94: 331-339.
- [2] Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*, 2000, 164: 183-190.
- [3] Bennett CL, Ochs HD. IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena. *Curr Opin Pediatr*, 2001, 13: 533-538.
- [4] Bean AG, Freiberg RA, Andrade S, et al. Interleukin 10 protect mice against staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock. *Infect Immune*, 1993, 61: 4937-4939.
- [5] Hara M, Kingsley CI, Niimi M. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens *in vivo*. *J Immunol*, 2002, 168: 1080-1086.
- [6] Porto G, Giordano RJ, Marti LC, et al. Identification of novel immunoregulatory molecules in human thymic regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells by phage display. *PLoS One*, 2011, 6: e21702.
- [7] Kingsley CI, Karim M, Bushnell AR. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4 and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol*, 2002, 168: 1080-1086.
- [8] 奚瑾, 潘志强, 接英, 等. CD4⁺CD25⁺调节性T细胞参与大鼠角膜移植免疫耐受的研究. *中华眼科杂志*, 2007, 43: 1114-1118.

- [9] Thornton AM, Korny PE, Tran DQ, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol*, 2010, 184: 3433-3441.
- [10] Jeffery LE, Burke F, Mura M, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol*, 2009, 183: 5458-5467.
- [11] Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med*, 2002, 195: 1641-1646.
- [12] Kang I, Kim SH, Lee WW, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 enhances the activity of the FOXP3 gene in human CD4⁺ T cells through directly binding to putative VDRE sites in the FOXP3 gene. *J Immunol*, 2010, 184: 42-49.
- [13] 杨旭冉, 张煦, 吴玉章, 等. 超抗原 SEB 的免疫抑制作用及其机制的初步研究. *第三军医大学学报*, 2005, 27: 2239-2241.
- [14] Wan Q, Kozhaya L, Imberg K, et al. Probing the effector and suppressive functions of human T cell subsets using antigen-specific engineered t cell receptors. *PLoS One*, 2013, 8: e56302.
- [15] Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M, Taams LS, et al. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4⁺ T cells in the periphery. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 231-237.
- (收稿日期: 2013-10-28)
(本文编辑: 郝锐)

周力, 张川. 抗原葡萄球菌肠毒素 B 诱导大鼠肾细胞移植免疫耐受形成过程中对 CD4⁺CD25⁺ T 细胞的影响 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(23): 10758-10761.

