

Jagged1 在树突状细胞介导淋巴细胞诱导皮肤移植免疫耐受中的作用

陈玲¹, 邢飞跃¹, 狄静芳¹, 陈笛¹, 廖继东²

(1. 暨南大学组织移植与免疫中心; 2. 暨南大学医学院实验中心, 广东广州 510632)

[摘要] 目的: 探讨 Jagged1 在树突状细胞(DC)介导淋巴细胞诱导同种异基因皮肤移植免疫耐受中的作用。方法: C57BL/6 小鼠为供体, BALB/c 小鼠为受体行皮肤移植术, 受体小鼠分为对照组, Jagged1 + DAPT 处理组和 Jagged1 处理组。取供体小鼠淋巴细胞加入经 rmIL-4 和 rmGM-CSF 处理 9 d 的供体骨髓细胞中, 当日和隔日分别加入 Jagged1 和 DAPT。2 d 后取淋巴细胞, 于皮肤移植第 0 天、第 2 天和第 4 天, 经尾静脉注入受体小鼠。观察皮肤移植存活时间和移植病理变化, 并检测受体小鼠混合淋巴细胞反应和迟发型超敏反应。结果: Jagged1 处理组的皮肤移植平均存活 83.6 d, 显著长于其它各组($P < 0.01$); Jagged1 处理组移植皮片内浸润的炎细胞数量明显减少; 在混合淋巴细胞反应中, Jagged1 处理组小鼠对供体小鼠呈现低反应性($P < 0.01$), 而对第三方无关供体 KM 小鼠表现强烈的增殖反应, Jagged1 处理组小鼠在迟发型超敏反应中也表现出显著的低反应性($P < 0.01$)。结论: 输注 Jagged1 联合 DC 处理的淋巴细胞诱导受体获得供体抗原特异性的免疫耐受。

[关键词] Jagged1; 树突状细胞; 淋巴细胞; 骨髓细胞; 皮肤移植

[中图分类号] R392.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)02-0147-05

Effect of Jagged1 on the immunotolerance of skin transplantation induced by dendritic cell-mediated lymphocytes

CHEN Ling¹, XING Fei-yue¹, DI Jing-fang¹, CHEN Di¹, LIAO Ji-dong²

(1. Institute of Tissue Transplantation and Immunology;

2. Experiment Center of Medical College; Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To explore the effect of Jagged1 on the skin allograft immunotolerance induced by dendritic cell-mediated lymphocytes. **Methods:** The skin grafts from C57BL/6 mice were transplanted to BALB/c mice. The recipients were divided into three groups: control group, Jagged1 plus DAPT group and Jagged1 group. The lymphocytes of the donor mice were added to bone marrow cells of the donor which had been pretreated with rmIL-4 and rmGM-CSF for 9 d. Meanwhile, Jagged1 and DAPT were added to them on day 1 and day 2 respectively. Two days later the lymphocytes were collected and injected into the recipient mice via tail vein on day 0, day 2 and day 4 after skin transplantation. Then the survival time and pathological change of skin graft was observed, mixed lymphocyte reaction (MLR) and

[收稿日期] 2007-12-27

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目资助(30471635); 广东省自然科学基金资助项目资助(04010451, 5006033); 暨南大学引进优秀人才科研启动基金资助项目资助(51204058)

[作者简介] 陈玲(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 移植免疫; 通讯作者: 邢飞跃, Tel: 33010358; E-mail: tfyxing@jnu.edu.cn

delayed type hypersensitivity (DTH) of the recipient were detected. **Results:** The average survival time of skin graft in Jagged1 group was 83.6 d, which was significantly prolonged compared with other groups ($P < 0.01$). The inflammatory cells of Jagged1 group in the skin graft were significantly reduced. The recipient of the Jagged1 group appeared hyporesponsiveness to the donor ($P < 0.01$), but hyperresponsiveness to KM mice in MLR. They were showed distinguished hyporesponsiveness also in DTH ($P < 0.01$). **Conclusion:** Infusion of the lymphocytes treated by Jagged1 combined with dendritic cells can induce recipients to obtain immunotolerance of donor antigenic specificity.

[Key words] Jagged1; dendritic cell; lymphocyte; bone marrow cell; skin transplantation

树突状细胞(dendritic cell, DC)是一类重要的专职抗原递呈细胞。DC能够显著刺激初始型T细胞,在体内可经血液、淋巴循环不断移行、迁移,并在各个成熟阶段发挥着不同的免疫活性。Jagged1是哺乳动物细胞膜上Notch受体的主要配体之一,在抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC),如DC、B细胞和巨噬细胞表面表达丰富,介导DC成熟和分化^[1]。Jagged1与其受体结合后,激活Notch信号通路,能够诱导外周成熟T淋巴细胞分化成为产生高水平IL-10的1型调节性T细胞(regulatory T cell 1, Tr1)或产生高水平TGF- β 的Th3细胞,在诱导免疫耐受中发挥着重要作用^[2-3]。目前,有关Jagged1在树突状细胞介导淋巴细胞诱导免疫耐受中的作用,特别是通过体内移植模型探讨其作用尚未见报道,本实验应用Jagged1联合DC处理淋巴细胞的方法在同种转基因小鼠间成功地诱导了皮肤移植免疫耐受。

1 材料和方法

1.1 实验动物

供者为C57BL/6小鼠,受者为BALB/C小鼠,第三方鼠为KM鼠。所用小鼠均为雄性,8~10周龄,体质量(20 ± 2)g,SPF级,购自南方医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂和仪器

Jagged1蛋白购自R&D Systems公司, γ -分泌酶抑制剂DAPT购自Sigma公司,rmIL-4和rmGM-CSF购自Peprotech公司,6/0羊肠手术缝合线由上海浦东金环医疗用品有限公司提供,显微外科器械生产于上海医疗器械有限公司手术器械厂,显微外科手术镜为德国Leica公司产品,流式细胞仪(FACSCalibur)购自美国Becton Dickinson公司。

1.3 实验分组及处理

将18只BALB/C小鼠随机分为3组,每组6只。A组:Jagged1 + DAPT处理组;B组:Jagged1处理组;C组:对照组。

1.4 皮肤移植

取C57BL/6小鼠背部全厚皮片,约1 cm²,刮除皮下脂肪,移植于BALB/C小鼠背部移植床上,对皮后用纱布包扎伤口。于皮肤移植3 d后剪开纱布,开始每日观察移植物的颜色、硬度、有无结痂、脱落及皮片红润柔软程度。如皮片干缩变硬,则判为移植植物开始排斥;皮片结痂脱落则判为完全排斥,皮片柔软红润则判为存活或耐受。

1.5 骨髓细胞和淋巴细胞的制备

(1)骨髓细胞 将供者C57BL/6断髓处死,无菌条件下取股骨和胫骨,用PBS冲出骨髓细胞(BMCs),充分吹打以免细胞聚集,200目不锈钢网筛过滤;收集细胞,离心(300 g, 5 min)。裂解红细胞,避光8 min,离心(300 g, 5 min);洗涤细胞2次后,细胞重悬于RPMI1640完全培养液中,调整细胞密度为 5×10^9 /L。

(2)淋巴细胞 将BALB/C、C57BL/6或KM小鼠断髓处死,无菌分离双侧腋窝、锁骨下、腹股沟浅表淋巴结和肠系膜淋巴结,去掉被膜,机械研磨,于200目不锈钢网筛过滤;收集细胞,用冷PBS离心(300 g, 5 min);洗涤细胞2次后,细胞重悬于RPMI1640完全培养液中,调整细胞密度为 2×10^9 /L。

1.6 移植动物的治疗

取上述制备的骨髓细胞,参照Lutz法^[4],略有改良。按 1×10^7 细胞数/孔铺于6孔培养板中,第0天每孔加入2.5 μ g/L rmIL-4和10 μ g/L rmGM-CSF,置于37 $^{\circ}$ C、体积分数5% CO₂培养箱中孵育。第3天和第6天收集培养液离心(300 g, 5 min),弃

上清,用完全培养基重悬后放回原孔,分别加入同剂量的 rmIL-4 和 rmGM-CSF。同时取该诱导细胞,用抗小鼠 CD11c-FITC 抗体染色,在流式细胞仪(FACS)下检测表达 CD11c 细胞百分比为(78.21% \pm 6.91%),成功建立了体外诱导小鼠骨髓细胞向 DC 分化的模型。第9天取上述 C57BL/6 小鼠淋巴细胞,按等细胞数加入骨髓细胞中,于当日和隔日分别加入 500 μ g/L Jagged1 和 5 μ M DAPT。2 d 后取培养液上清离心(300 g, 5 min),用 EasySep Kit (StemCell)收集非贴壁淋巴细胞,洗涤细胞 2 次后重悬计数,回输小鼠体内,即在皮肤移植当日由鼠尾静脉注射细胞 1×10^7 个/只,隔日 1 次,共 3 次。

1.7 检测方法

(1)移植皮片组织病理学检查 植皮小鼠在术后第 15 天,各组随机处死小鼠一只;留置移植皮片,冰冻包埋,用冰冻切片机将冰冻包埋的标本切成 5 μ m 厚的切片,将切片按常规苏木素-伊红染色,脱水,封片后光学显微镜下观察组织的病理学变化情况。

(2)单向混合淋巴细胞反应(MLR) 皮肤移植后第 90 天,各组随机处死小鼠一只,将小鼠淋巴细胞悬液种于 96 孔细胞培养板上,每孔 100 μ L(细胞密度为 2×10^9 /L),作为反应细胞;另取 C57BL/6 小鼠和 KM 小鼠的淋巴细胞制备相同细胞数浓度的细胞悬液,作为刺激细胞。加入丝裂霉素 C 最终质量浓度为 25 μ g/mL,以此处理刺激细胞,以抑制其增殖。各组均作 3 个复孔培养。置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 孵箱孵育 72 h。终止培养前 4 h 每孔加入 20 μ L 质量分数 5% 噻唑蓝(MTT),混匀后再培养 4 h。细胞培养终止后,弃上清,每孔加体积分数 10% 二甲基亚砜 100 μ L,充分混匀,静置数分钟,使染料充分溶解。用酶标仪于 540 nm 波长测各孔的光密度值;读取数据,取 3 复孔的平均值,MLR 的强度以吸光度(A)表示,即以实验孔光密度值与 RPMI1640 空白孔光密度值之差作为各实验组的增殖指标。

(3)迟发型超敏反应(DTH)的测定 于移植后 100 d,受体小鼠(每组 $n = 4$)腹股沟皮下注射 10^7 (100 μ L) 供体淋巴细胞预致敏,7 d 后于左后脚掌注射 10^7 (50 μ L) 相同的淋巴细胞,右后脚掌注射 50 μ L 生理盐水作为对照。24 h 后以游标卡尺测量两脚掌的厚度,取其差值作为 DTH 指标。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 软件(10.0 版)进行统计分析,所得数据以均数 \pm 标准差表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 移植皮肤的存活情况

对照组移植皮片多于 7 ~ 15 d 内出现干缩变硬直至脱落,平均存活(12.4 \pm 1.9) d。而 Jagged1 + DAPT 处理组移植皮片在 7 d 时色泽红润,皮片柔软,大多在 2 周左右才出现干缩,3 周左右坏死脱落,平均存活(23.8 \pm 1.3) d, Jagged1 + DAPT 处理组与对照组之间存在明显差异($P < 0.01$)。Jagged1 处理组免疫排斥反应轻微,移植皮片表面红润柔软,真皮-表皮界限明显,表皮下有血管形成,平均存活(83.6 \pm 13.3) d, Jagged1 处理组与对照组和 Jagged1 + DAPT 处理组都有显著差异($P < 0.01$) (表 1,图 1)。

表 1 Jagged1 对小鼠移植皮肤开始排斥时间和存活时间的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	排斥区间/d	排斥时间/d	存活区间/d	存活时间/d
对照	5	7-10	8.2 \pm 1.3	10-15	12.4 \pm 1.9
Jagged1	5	35-74	55.0 \pm 15.5 ¹⁾²⁾	66-100	83.6 \pm 13.3 ¹⁾²⁾
Jagged1 + DAPT	5	15-19	17.4 \pm 1.5 ¹⁾	22-25	23.8 \pm 1.3 ¹⁾

1)与对照组比较, $P < 0.01$; 2)与 Jagged1 + DAPT 组比较, $P < 0.01$

2.2 移植皮片组织病理学检查

同种异基因皮肤移植术后 15 d,光学显微镜下,移植皮片组织病理学结果显示(图 2),对照组和 Jagged1 + DAPT 处理组真皮与脂肪组织内见大量炎细胞浸润。与对照组和 Jagged1 + DAPT 处理组相比, Jagged1 处理组移植皮片内炎细胞浸润明显减轻。

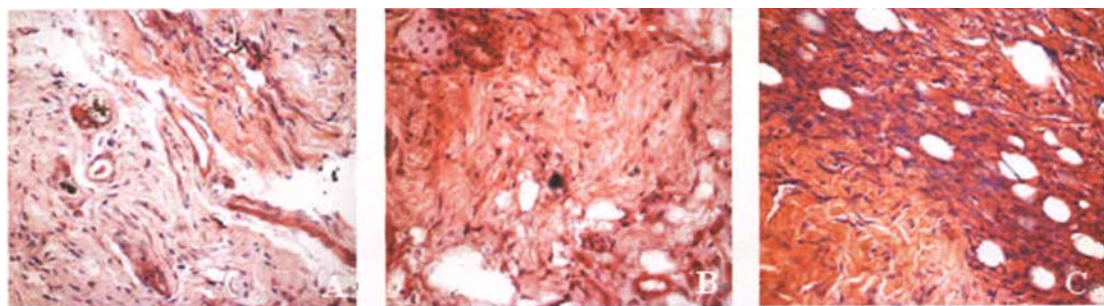
2.3 单向混合淋巴细胞反应(MLR)

皮肤移植后第 90 天,对以 C57BL/6 小鼠作为移植供者的各实验组,采用正常供者 C57BL/6 小鼠及第三方 KM 小鼠的淋巴细胞刺激各移植受者 BALB/C 小鼠的淋巴细胞,进行混合淋巴细胞反应。在 C57BL/6 小鼠淋巴细胞作刺激细胞的 MLR 中, Jagged1 + DAPT 处理组的 A 值与对照组无明显差异($P > 0.05$),而 Jagged1 处理组的 A 值与对照组比较有显著差异($P < 0.01$), Jagged1 处理组与 Jagged1 + DAPT 处理组之间也有明显差异($P < 0.05$)。在 KM 小鼠淋巴细胞作刺激细胞的 MLR 中,各实验组均表现强烈的增殖反应,与对照组比较,各组之间均无明显差异($P > 0.05$)。以上结果表明,经 Jagged1 处理的受体小鼠的 MLR 特异性地降低(图 3)。



A: Jagged1 + DAPT 组; B: Jagged1 组; C: 对照组

图 1 移植后 15 d 各组移植皮片的排斥情况



A: Jagged1 + DAPT 组; B: Jagged1 组; C: 对照组

图 2 移植后 15 d 各组移植皮片的病理切片 (400 ×)

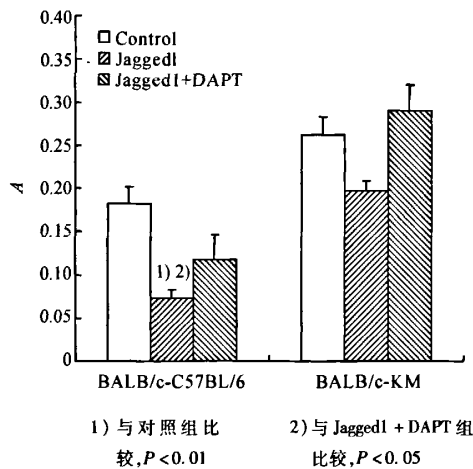


图 3 受体 BALB/C 小鼠淋巴细胞对异基因供体和第三方供体的 MLR

2.4 耐受小鼠对供体淋巴细胞的迟发型超敏反应 (DTH)

皮肤移植 100 d, Jagged1 组 BALB/c 小鼠对供体 C57BL/6 小鼠淋巴细胞的 DTH 反应明显降低, 结果显示 Jagged1 组脚掌肿胀度 (0.38 ± 0.10) mm 显著低于对照组的脚掌肿胀度 (0.57 ± 0.14) mm, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

皮肤移植后的免疫排斥反应是典型的细胞性排斥反应, T 细胞功能直接决定移植皮肤的存活情况。目前已知 T 细胞的充分活化至少需要接受 2 个以上的刺激信号: 第一信号是 TCR 识别 MHC-抗原多肽复合物, 第二信号是在识别抗原的同时还需要共刺激分子的参与。仅有第一信号刺激, T 细胞不会发生增殖分化和产生细胞因子, 反而表现为无应答的耐受状态^[5]。DC 作为免疫应答的启动者和调控者, 是机体内最重要的一群抗原提呈细胞。Jagged1 在抗原提呈细胞的细胞膜上表达丰富, 属 I 型单次跨膜糖蛋白^[6], 通过与邻近细胞表面 Notch1 结合激活 Notch 信号通路, 能诱导 DC 成熟并介导机体免疫耐受^[7-8]。

本实验采用经 Jagged1 和 DC 处理的供体淋巴细胞通过尾静脉输注成功诱导了同种异基因皮肤移植耐受, 并应用特异性阻断剂 DAPT 阻断 Jagged1-Notch 信号通路, 发现 DAPT 能在一定程度上逆转 Jagged1 在树突状细胞介导淋巴细胞诱导免疫耐受中的作用。Jagged1 处理组移植皮片存活时间显著大于 Jagged1 + DAPT 处理组和对照组。在对供体

C57BL/6小鼠的MLR中,Jagged1处理组的A值与对照组和Jagged1 + DAPT处理组之间存在显著差异,但对第三方无关供体KM小鼠的MLR中,各实验组和对照组间无显著差异,结果表明Jagged1处理组诱导了特异性的免疫耐受。Jagged1是Notch受体的一个配体, γ -分泌酶抑制剂DAPT是Notch信号通路的阻断剂,因此,结果提示Jagged1-Notch信号通路在树突状细胞介导淋巴细胞诱导免疫耐受中起着重要的作用。

近年来发现负载Jagged1的DC与Tr关系密切,Hoyne等^[8]给免疫过的小鼠分别注射Jagged1⁺DC和Jagged1⁻DC,观察到注射Jagged1⁺DC的小鼠的T细胞对同一抗原的反应性降低了3/4,导致90%的T细胞扩增反应被抑制,而Jagged1⁻DC组小鼠的T细胞对同一抗原的反应性则增强;同时注射Jagged1⁺DC组淋巴结细胞中IL-2和INF- γ 的水平显著降低,提示Jagged1可诱导DC介导免疫耐受。也有人认为DC诱导CD4⁺T细胞分化形成Th2是导致免疫耐受的主要原因^[9]。DC通过Notch信号通路指导T细胞的分化,DC的Toll样受体识别内生细菌、病毒等病原体,并将它们内化,IL-12是强有力的促进Th1分化的细胞因子,在Jagged1的参与下诱导CD4⁺T细胞分化成Th2,同时生成IL-4。推测本实验形成的耐受机制:Jagged1为Notch1受体的配体,DC细胞膜上的Jagged1和Notch1与CD4⁺T细胞表面相应的Notch受体和配体相互作用,诱导CD4⁺T细胞分化形成Tr或Th2,从而介导免疫耐受。因此,Jagged1对DC和Th细胞的影响可能为免疫耐受的临床应用提供新的治疗靶点。

目前,研究Jagged1在DC上的作用仅限于体外实验,通过构建Jagged1胞外段导入载体,表达Jagged1的APC与T细胞共培养的方式,未见Jagged1应用于体内实验和临床的疗效及毒理研究。本实验采用可溶性Jagged1,有利于剂量的控制和正确评价其药效和毒理作用,且通过体内移植模型应用Jagged1联合DC介导淋巴细胞诱导较深程度的免疫耐受,避免了传统骨髓移植耐受中的射线照射以及既

往应用免疫抑制剂产生的毒副作用,对于临床移植耐受的诱导具有一定的参考价值,也为器官移植排斥反应防治提供了新的途径。

[参考文献]

- [1] YAMAGUCHI E, CHIBA S, KUMANO K, et al. Expression of Notch ligands, Jagged1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice[J]. Immunology Letters, 2002, 81 (5): 59-64.
- [2] VIGOUROUX S, YVON E, WAGNER H, et al. Induction of antigen-specific regulatory T cells following overexpression of a Notch ligand by human B lymphocytes[J]. J Virol, 2003, 77(20): 10872-10880.
- [3] YVON E S, VIGOUROUX S, ROUSSEAU R F, et al. Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells[J]. Blood, 2003, 102 (10): 3815-3821.
- [4] LUTZ M B, KUKUTSCH N, OGILVIE A L, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow[J]. J Immunol Methods, 1999, 223(1): 77-92.
- [5] 邱文洪, 王国华, 朱慧芬, 等. hIL-10修饰树突状细胞对实验动物淋巴细胞增殖及胞毒效应的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2003, 19 (8): 527-529.
- [6] GRAY G E, MANN R S, MITSIADES E, et al. Human ligands of the Notch receptor[J]. Am J Pathol, 1999, 154(3): 785-794.
- [7] CHENG P, NEFEDOVA Y, MIELE L, et al. Notch signaling is necessary but not sufficient for differentiation of dendritic cells[J]. Blood, 2003, 102 (12): 3980-3988.
- [8] HOYNE G F, LE ROUX I, CORSIN-JIMENEZ M, et al. Serrate1-induced Notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4⁺T cells[J]. Int Immunol, 2000, 12(2): 177-185.
- [9] LEHAR S M, BEVAN M J. Immunology: polarizing a T-cell response[J]. Nature, 2004, 430 (6996): 150-151.

[责任编辑:李弘,朱颖嫒]