

网络出版时间: 2016-10-12 13:23:00 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161012.1323.004.html>

肝窦内皮细胞诱导 T 细胞免疫耐受

景亚青¹, 刘 义¹, 韩 菲², 袁晶华¹, 李克秋¹, 李 光¹

摘要 目的 探讨肝窦内皮细胞(LSEC)对T细胞的耐受作用。方法 CD3和CD28抗体活化的人T细胞和人LSEC混合培养,检测48h时单独培养和混合培养T细胞的凋亡情况和细胞因子白细胞介素2(IL-2)、白细胞介素4(IL-4)和白细胞介素10(IL-10)的表达量及分泌量。结果 和LSEC混合培养的T细胞凋亡率显著高于单独培养的T细胞,混合培养的T细胞中IL-2的表达量没有发生明显变化,IL-4的表达量显著升高,IL-2/IL-4的值降低,IL-10的表达量增加。IL-2、IL-4和IL-10细胞因子分泌情况和表达量一致。结论

LSEC可通过降低T细胞数目和改变细胞因子分泌两种途径诱导T细胞产生耐受。

关键词 LSEC; T细胞耐受; 混合培养; 凋亡检测; 细胞因子
中图分类号 R 392

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)11-1569-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.004

肝脏是人体最大的有消化和排毒功能的脏器,容易受到伤害。肝脏功能失调会导致各种并发症的产生。目前,肝移植是治疗各种终末期肝病(肝癌、肝硬化)最重要的手段^[1]。和其他器官移植相比,肝脏更容易产生耐受。肝是人体重要的免疫器官,人的肝脏有两个血液供应途径:门静脉和肝动脉^[2],分别含有胃肠道和系统免疫的抗原,环境的复杂性要求肝脏既可以抵御外来抗原还可以防止肝脏细胞被破坏。肝脏可通过外周耐受途径,防止免疫细胞(特别是T细胞)对肝造成损伤。肝的免疫耐受作用主要由非实质细胞发挥^[3],肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cell, LSEC)是肝脏内含量最多的非实质细胞,其功能与移植物的存活状态有关^[4-5]。本研究通过LSEC对体外活化的T细胞凋亡情况和细胞因子分泌情况进行分析,探讨其对活化T细胞的耐受作用。

2016-06-27 接收

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(编号: 2012AA021003)

作者单位: ¹天津医科大学基础医学院遗传学系,天津 300070

²天津医科大学第二医院检验科,天津 300211

作者简介: 景亚青,女,助理实验师;

李 光,女,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: lig@tmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 细胞株 人原代LSEC株购自上海复蒙生物科技有限公司。富含血小板的白膜购自天津市血液中心。

1.2 主要试剂 内皮细胞培养基(endothelial cell medium, ECM)购自美国ScienCell公司;淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物技术公司;CD3免疫磁珠购自德国Miltenyi公司;Annexin V/7-AAD凋亡检测试剂盒购自美国eBioscience公司;IL-2、IL-4和IL-10 ELISA检测试剂盒购自北京达科为生物技术有限公司;TRIzol、MLV-cDNA合成试剂盒和Real-time PCR检测试剂盒购自美国Invitrogen公司。

1.3 方法

1.3.1 LSEC复苏 将1 ml 10 μ g/ml纤连蛋白溶液加到10 cm培养皿中,轻轻晃动使液体均匀附在培养皿底,37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中孵育过夜。将含有10⁵个LSEC的冻存管放置到37 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中,缓慢转动冻存管至完全融化,将液体移至已包被好的培养皿中,并加入ECM培养基,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂恒温培养箱培养16 h后进行细胞换液,并继续培养。待细胞生长至覆盖90%培养皿时,进行胰酶消化传代培养。

1.3.2 T细胞分离活化 将人白膜细胞和生理盐水等体积混合并吹打均匀,轻轻加入到含等体积淋巴细胞分离液的离心管中,使分离液和细胞层界限清晰,2 000 r/min室温离心20 min,吸出中间的细胞层,PBS清洗2次,进行细胞计数。

取10⁸个淋巴细胞悬液离心,加入800 μ l预冷的磁珠缓冲液重悬细胞,4 $^{\circ}$ C孵育15 min,加入12 ml磁珠缓冲液,1 200 r/min离心10 min。用1 ml磁珠缓冲液重悬细胞,将细胞过MS分离柱,1 000 r/min离心10 min,制备细胞悬液,计数细胞数目。

吸取T细胞悬液50 μ l放入1.5 ml离心管中,加入1 μ l FITC标记的CD3抗体,4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。将细胞悬液1 000 r/min离心5 min,PBS清洗2次,并加入1 ml 4%多聚甲醛重悬细胞,流式细胞仪(BD verse,美国BD公司)分析T细胞含量。

磁珠分选得到的 T 细胞加入含 $1 \mu\text{g/ml}$ CD3 和 $1 \mu\text{g/ml}$ CD28 抗体的 1640 培养基(包括 15% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素抗生素溶液)中培养 24 h。

1.3.3 LSEC 和 T 细胞混合培养 生长状况良好的 LSEC 进行传代,计数细胞,将 10^5 个 LSEC 接种到纤连蛋白包被的 6 孔板中, 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养过夜。吸去 ECM 培养液,调整 T 细胞浓度,分别将 2×10^5 个 T 细胞接种到含或不含 LSEC 的 6 孔板中, 37°C 、5% CO_2 培养 48 h。

1.3.4 AnnexinV/7-AAD 凋亡检测 将培养的 T 细胞吸出, 100 r/min 离心 4 min,吸去上清液, PBS 清洗细胞。 100 r/min 离心 4 min 后,吸去上清液,加入 1 ml 溶液悬浮细胞。单独培养的 T 细胞和混合培养的 T 细胞进行 PE 标记的 AnnexinV 和 7-AAD 染色 30 min, PBS 清洗细胞 2 次,加入 1 ml 4% 多聚甲醛溶液重悬细胞,采用 BD verse 细胞仪检测细胞凋亡情况, FlowJo 7.6.1 软件分析 T 细胞凋亡情况。

1.3.5 mRNA 表达水平 TRIzol 法提取单独培养 48 h T 细胞和混合培养 48 h T 细胞的 mRNA,采用 Nanodrop 仪(Nanodrop 2000,美国 Thermo 公司)检测 mRNA 的浓度和纯度,选用 MLV-cDNA 逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA。采用荧光定量 PCR 仪(7500 Fast,美国 ABI 公司)检测 IL-2、IL-4、IL-10 的 mRNA 水平,引物序列见表 1。根据扩增的 Ct 值计算基因表达量,以 48 h 单独培养的 T 细胞为参照计算 $\Delta\Delta\text{Ct}$,基因相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

表 1 Real-time PCR 检测 mRNA 表达情况引物序列

基因名称	引物序列
GADPH	F: 5'-CCAAGGTCATCCATGACAATT-3' R: 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTT-3'
IL-2	F: 5'-TAACCTCAACTCCTGCCACA-3' R: 5'-GGCCTTCTTGGCATGTAA-3'
IL-4	F: 5'-GCAGTTCCACAGGCACAAG-3' R: 5'-CTGGTTGGCTTCCTCACAG-3'
IL-10	F: 5'-CCAAGACCCAGACATCAAGG-3' R: 5'-AAGGCATTCTTCACCTGCTC-3'

1.3.6 细胞因子含量测定 采用双夹心酶标法检测细胞因子 IL-2、IL-4 和 IL-10 的分泌情况,按照 ELISA 检测试剂盒说明书检测单独培养的 LSEC、单独培养的 T 细胞和混合培养细胞 48 h 时上清液中细胞因子的分泌情况。采用 ELISACal 软件绘制细胞因子标准曲线,并根据标准曲线和样本吸光度值计算细胞因子的分泌量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,两组间比较采用独立样本 t 检验,3 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 LSEC 和 T 细胞生长情况 LSEC 解冻后均匀的悬浮在 ECM 中,经过 16 h 的过夜培养, LSEC 呈梭形贴附在培养皿底部生长,更换新的 ECM 培养 48 h 时 LSEC 贴壁生长,细胞形态为鹅卵形或梭形,细胞表面光滑,折光率较强。CD3 免疫磁珠分离得到 1.5×10^7 个 T 细胞,得率为 15%,纯化的 T 细胞比例由 62.7% 增加到 98.3%,见图 1。培养 24 h 后的 T 细胞形态均一,大小一致,透光率较高。培养 48 h 的 T 细胞与 LSEC 混合培养,24 h 后观察 T 细胞贴附在 LSEC 细胞表面,两者状态较好,见图 2。

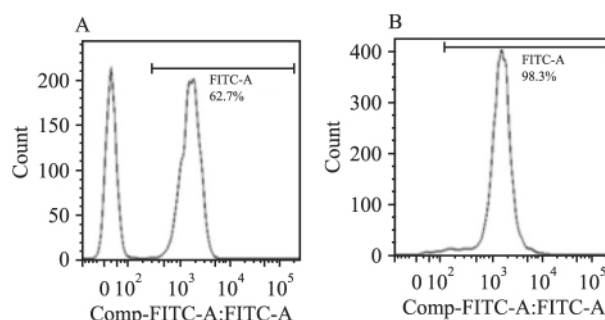


图 1 白膜和 CD3 磁珠分选后 T 细胞比例

A: T 细胞在白膜淋巴细胞的比例; B: CD3 磁珠分选后 T 细胞的比例

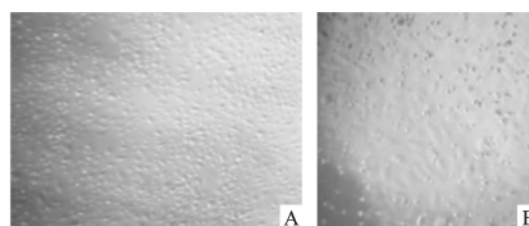


图 2 单独培养和混合培养下的 LSEC

A: 单独培养的 LSEC $\times 100$; B: T 细胞和 LSEC 混合培养 $\times 200$

2.2 LSEC 促进 T 细胞凋亡 由图 3 可见,单独培养的 T 细胞凋亡率为 $(9.70 \pm 0.36)\%$,与 LSEC 混合培养的 T 细胞早期凋亡率为 $(17.43 \pm 0.70)\%$,混合培养 T 细胞凋亡率明显高于单独培养的 T 细胞($t=9.76$, $df=4$, $P=0.0006$),说明 LSEC 可有效诱导 T 细胞凋亡。

2.3 细胞因子 IL-2、IL-4 及 IL-10 的 mRNA 表达水平 单独培养的 T 细胞和混合培养的 T 细胞 mRNA 检测结果表明: IL-2 mRNA 的表达量两者没有明显变化,混合培养的 T 细胞 IL-4 和 IL-10 mRNA 的

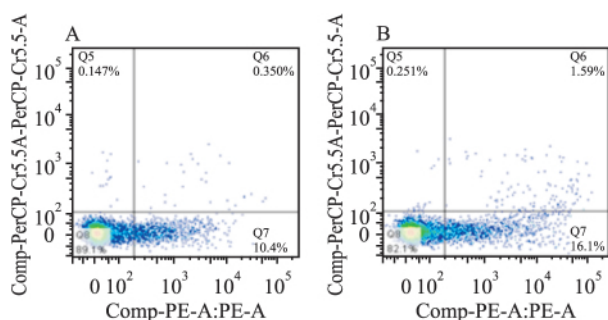


图3 AnnexinV/7-AAD 检测 T 细胞凋亡情况

A: T 细胞 48 h 凋亡情况; B: LSEC 混合培养的 T 细胞凋亡情况

表达量显著高于单独培养的 T 细胞,混合培养的 T 细胞 IL-2 和 IL-4 mRNA 的比值显著低于单独培养的 T 细胞 (IL-2 $t = 2.10$, $df = 4$, $P = 0.1032$; IL-4 $t = 7.67$, $df = 4$, $P = 0.0016$; IL-2/IL-4 $t = 16.22$, $df = 4$, $P < 0.0001$; IL-10 $t = 12.43$, $df = 4$, $P = 0.0002$) ,见图 4。

2.4 细胞因子 IL-2、IL-4 及 IL-10 的分泌情况

ELISA 法检测细胞因子的分泌情况,统计结果显示与 LSEC 共培养的 T 细胞,上清液中 IL-4 和 IL-10 的分泌量增加,IL-2 的分泌量无明显变化,表明 LSEC 可降低 IL-2/IL-4 的值并有效刺激 IL-10 的分泌,有利于诱导免疫偏离,与 mRNA 表达检测结果一致,见图 5 (FIL-2 = 157.60, $P < 0.0001$; FIL-4 =

88.54, $P < 0.0001$; FIL-10 = 30.47, $P = 0.007$)。

3 讨论

肝脏是实体器官移植中比较容易产生耐受的器官,其它器官(皮肤、心脏、肾)连同肝脏共同移植可降低排斥的发生率,从而增加器官存活时间^[6]。LSEC 属于肝脏的非实质细胞的组成部分,约占非实质细胞的 50%,含量最多^[7]。1970 年,Edie Wisse 第一次有确切的证据指出 LSEC 是一种新的细胞类群。LSEC 在肝窦腔内将肝细胞和血液分开,内皮层不含有基底细胞层,在肝细胞和内皮细胞间形成一个空隙,称为 Disse 间隙,可以防止肝细胞和窦腔直接接触^[8]。LSEC 构成了肝脏与外界接触的第一道防线,可进行物质交换并参与免疫反应,与肝脏的移植耐受过程有关。耐受大鼠血清中 LSEC 透明质酸含量比排斥大鼠的低,大分子蛋白的摄取速度较快,表明 LSEC 在机体免疫耐受中可能发挥重要作用^[9]。LSEC 表面有清道夫受体、甘露糖受体,参与细胞的吞噬作用,表面分子 MHC-I 和 MHC-II 可将抗原呈递给 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞,表面分子 L-SIGN、ICAM 可以将细胞黏附到 LSEC。解剖学和分子生物学特征表明 LSEC 在免疫调节过程中发挥了作用。

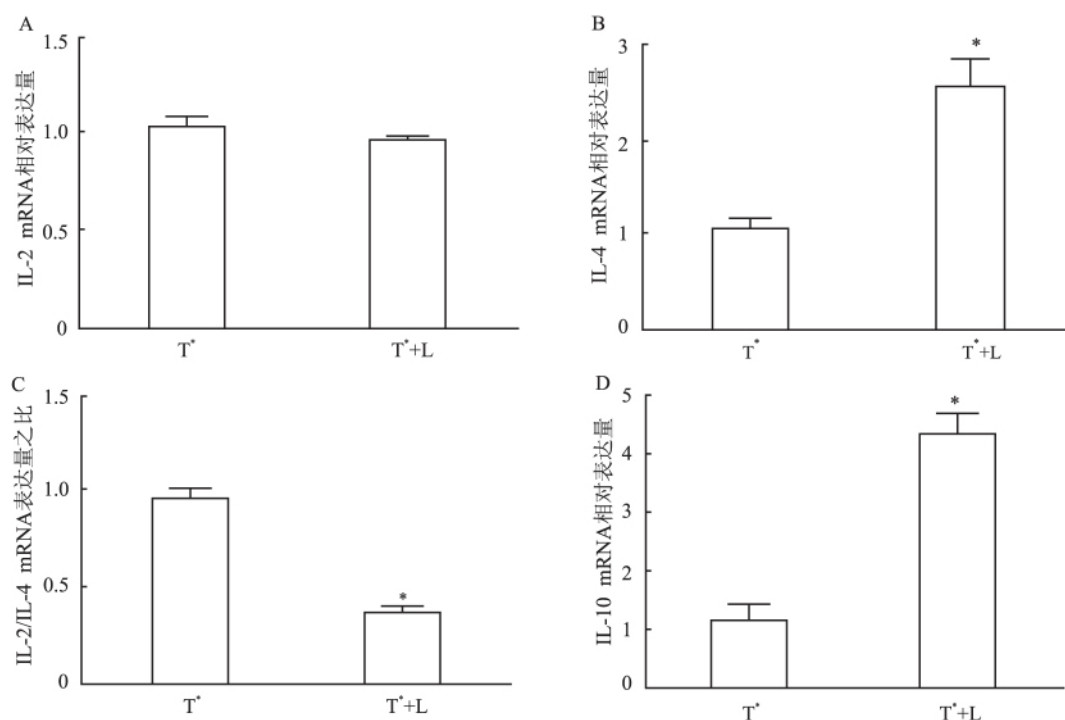


图4 IL-2、IL-4 和 IL-10 的 mRNA 表达含量

T*: 单独培养的 T 细胞; T* + L: 混合培养的 T 细胞,与 T* 比较: * $P < 0.05$

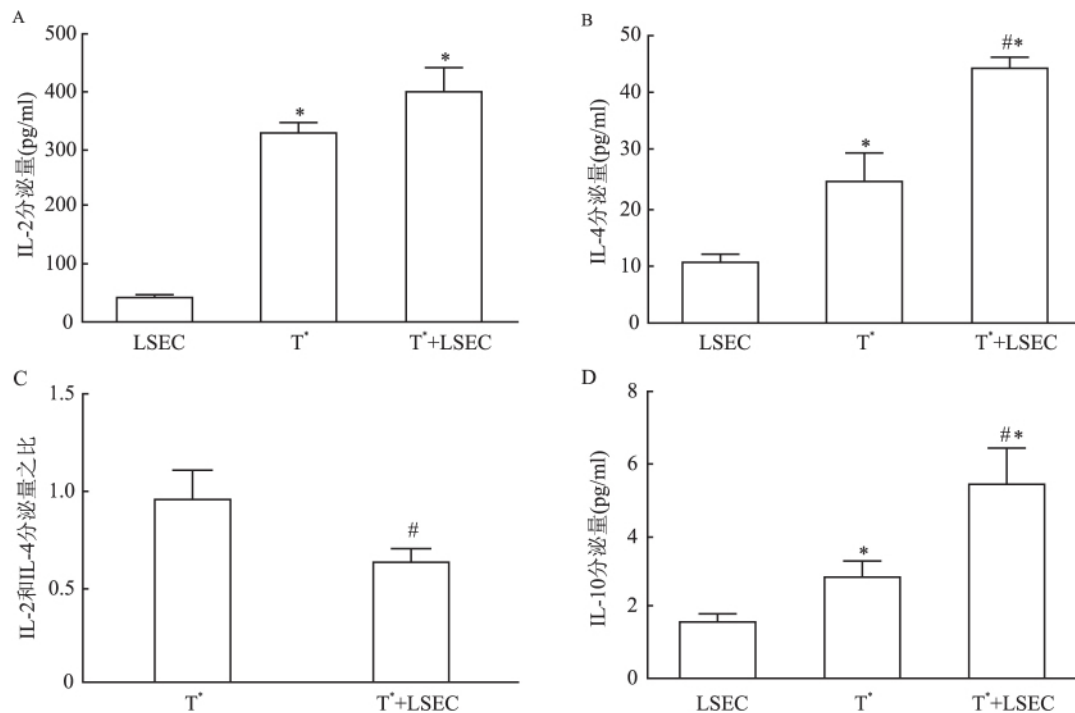


图5 IL-2、IL-4 和 IL-10 分泌情况

T* : 单独培养的 T 细胞; 与 LSEC 比较: * $P < 0.05$; 与 T* 比较: # $P < 0.05$

器官移植后免疫排斥反应的发生主要是由细胞免疫反应造成的,活化的 T 细胞可识别外来的移植物抗原,对移植物发生免疫反应造成移植物丧失功能^[10]。移植耐受患者中,免疫反应性 T 细胞含量减少,而可诱导免疫耐受的调节性 T 细胞含量增加^[11]。在本实验中 LSEC 可促进 CD3 抗体和 CD28 抗体联合活化的 T 细胞凋亡,减少 T 细胞数量,降低免疫反应。T 细胞细胞因子的分泌发生改变是 T 细胞耐受的形成途径之一。在 T 细胞耐受中,主要通过 Th1 和 Th2 细胞因子的比例决定^[12]。Th 细胞是 T 细胞的一种重要的细胞亚群,可以通过分泌细胞因子来调节机体的免疫应答。Th1 细胞主要分泌 IL-2、 γ -干扰素及肿瘤坏死因子,介导细胞免疫应答,在抗感染、器官移植排斥反应和自身免疫性疾病的诱导过程中起重要作用。Th2 细胞产生 IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10 和 IL-13,介导体液免疫。有研究^[13-14]表明,在器官移植中,长期存活的移植患者可检测到高表达的 IL-10,而在发生急性排斥反应的移植患者中,几乎检测不到 IL-10。Th1 和 Th2 细胞所诱导的免疫反应能互相调节或产生交叉调节作用^[15-16],其动态平衡对诱导和维持免疫耐受十分重要。Th2 可下调 Th1 诱发的排斥反应,消除损伤效应,从而有助于建立移植免疫耐受。本实验中和 LSEC 混合培养的 T 细胞 IL-2/IL-4 的比值降低, Th1

细胞功能受到抑制, Th2 细胞功能增强, Th2 分泌的免疫抑制因子 IL-10 增多^[12]。T 细胞因子分泌的改变也表明 LSEC 可促进 T 细胞耐受。本研究结果表明, LSEC 可通过促进 T 细胞凋亡和调节 Th1/Th2 细胞因子分泌两种方式诱导 T 耐受。

参考文献

- [1] Bosch A, Dumortier J, Maucourt-Boulch D, et al. Preventive administration of UDCA after liver transplantation for primary biliary cirrhosis is associated with a lower risk of disease recurrence [J]. J Hepatol, 2015, 63(6): 1449-58.
- [2] DeLeve L D. Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration [J]. J Clin Invest, 2013, 123(5): 1861-6.
- [3] Spiering R, Margry B, Keijzer C. DEC205+ dendritic cell-targeted tolerogenic vaccination promotes immune tolerance in experimental autoimmune arthritis [J]. J Immunol, 2015, 194(10): 4804-13.
- [4] Jenne C N, Kubes P. Immune surveillance by the liver [J]. Nat Immunol, 2013, 14(10): 996-1006.
- [5] Karimi M H, Geramizadeh B, Malek-Hosseini S A. Tolerance induction in liver [J]. Int J Organ Transplant Med, 2015, 6(2): 45-54.
- [6] Topilsky Y, Raichlin E, Hasin T, et al. Combined heart and liver transplant attenuates cardiac allograft vasculopathy compared with isolated heart transplantation [J]. Transplantation, 2013, 95(6): 859-65.
- [7] Igarashi Y, Onoe T, Ohdan H. The role of liver sinusoidal endothelial cells in induction of carbohydrate reactive B cells tolerance through the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway [J]. Transplantation, 2015, 99(11): 2325-36.

(下转第 1578 页)

Expression and localization of human protein EBI3 and its mutants

Xing Xuemei, Geng Huiwu, Pan Linxin, et al

(Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To analyze expression and the reason of different localization among wild-type EBI3 (epstein-barr virus-induced gene 3) and its mutants in mammalian cell lines. **Methods** Based on the analysis of amino acid sequence from NCBI database, the human EBI3 eukaryotic expression plasmids pcDNA3.1-EBI3-FLAG was constructed, its mutants pcDNA3.1-EBI3(1-135)-FLAG and pcDNA3.1-EBI3(125-230)-FLAG which contained single FN3 domain in amino terminal or carboxy terminal and EBI3 Asp210 point mutant pcDNA3.1-EBI3-D210A-FLAG were also constructed; Western blot analysis was applied to detect the expression of the recombinant eukaryotic expression plasmids in mammalian HEK 293T cells and immunofluorescence technique was used to detect the cellular localization in COS7 cell lines. **Results** The recombinant eukaryotic expression plasmids with downstream FLAG-tag of human wild-type EBI3 and its mutants were successfully constructed; Western blot showed that the recombinant proteins could stably express in HEK293T cells; confocal fluorescence microscopy results indicated the significant changes in localization of the mutants of EBI3. **Conclusion** The eukaryotic expression plasmids of human wild-type EBI3 and its mutants can successfully express in HEK 293T and COS7 cells. The localization of its deletion mutants in COS7 cells change significantly, indicating domain structure in amino terminal may play an important role in EBI3 protein correct location; the Asp210 of EBI3 also affects the localization of EBI3 within the cell.

Key words EBI3; plasmid construction; Western blot; immunofluorescence

(上接第 1572 页)

- [8] DeLeve L D. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis [J]. *Hepatology*, 2015, 61(5): 1740-6.
- [9] Ge X, Nowak G, Ericzon B G. Liver sinusoidal endothelial cell function in rejected and spontaneously accepted rat liver allografts [J]. *Transpl Int* 2008, 21(1): 49-56.
- [10] Matignon M, Aissat A, Canoui-Poitine F, et al. Th-17 alloimmune responses in renal allograft biopsies from recipients of kidney transplants using extended criteria donors during acute T cell-mediated rejection [J]. *Am J Transplant* 2015, 15(10): 2718-25.
- [11] Denney H A, Whittle R J, Lai J, et al. Regulatory T cells in chronic Graft-Versus-Host disease after extracorporeal photopheresis: correlation with skin and global organ responses, and ability to taper steroids [J]. *Transplantation*, 2016 [Epub ahead of print].
- [12] Li B, Tian L, Diao Y. Exogenous IL-10 induces corneal transplantation immune tolerance by a mechanism associated with the altered Th1/Th2 cytokine ratio and the increased expression of TGF- β [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(6): 2245-50.
- [13] Ingelsten M, Gustafsson K, Olausson M, et al. Rapid increase of interleukin-10 plasma levels after combined auxiliary liver-kidney transplantation in presensitized patients [J]. *Transplantation*, 2014, 98(2): 208-15.
- [14] Shouval D S, Biswas A, Goettel J A, et al. Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function [J]. *Immunity*, 2014, 40(5): 706-19.
- [15] Obremski K. Changes in Th1 and Th2 cytokine concentrations in ileal Peyer's patches in gilts exposed to zearalenone [J]. *Pol J Vet Sci*, 2014, 17(1): 53-9.
- [16] Hu A, Li Q, Shi H, et al. Donor-derived bone marrow transfusion produces mixed chimerism and promotes a Th2 shift in Th1/Th2 balance in rat heterotopic small bowel transplantation [J]. *Dig Liver Dis*, 2012, 44(12): 988-94.

T cell immune tolerance induced by LSEC

Jing Yaqing¹, Liu Yi¹, Han Fei², et al

(¹Dept of Genetics, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070;

²Dept of Clinical Laboratory, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211)

Abstract Objective To explore the role of LSEC on T cell tolerance. **Methods** T cell apoptosis, cytokine (IL-2, IL-4 and IL-10) expression and secretion of human T cells activated by CD3/CD28 alone and mixed-cultured with human LSEC were detected. **Results** The ratio of cell apoptosis was higher in mixed-cultured T cells than T cells alone. The gene expressions of IL-4 and IL-10 were higher in mixed-cultured T cells than T cells alone, while gene expression of IL-2 had no significant difference in mixed-cultured T cells than T cells alone. The cytokine secretion of IL-2, IL-4 and IL-10 was consistent with gene expression. **Conclusion** LSEC could induce T cell tolerance by decreasing T cell number and altering cytokine secretion.

Key words LSEC; T cell tolerance; mixed culture; apoptosis detection; cytokine