



## 转基因皮肤移植对小鼠胸腺细胞亚群的影响\*

张红梅<sup>1</sup> 吴亮其<sup>1</sup> 孙丽娜<sup>2</sup> 赵勇<sup>2</sup>

(1. 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049)

(2. 中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要:**目的 观察同种转基因小鼠皮肤移植急性排斥对受体小鼠胸腺细胞亚群组成的影响。方法 以 BALB/c 小鼠作为供体, C57BL/6 为受体, 建立小鼠同种转基因皮肤移植模型, 于术后第7天拆线, 第10天取胸腺, 制备胸腺单细胞悬液, 通过流式细胞仪检测胸腺细胞各个亚群的比例。结果 与对照组相比, 同种转基因皮肤移植小鼠胸腺明显萎缩, 胸腺细胞总数明显减少, 胸腺细胞亚群细胞数量显著降低, 同时, 调节性 T 细胞及胸腺细胞发育和迁出不同阶段细胞绝对数均减少。结论 皮肤移植排斥反应明显抑制受体小鼠胸腺及胸腺细胞的发育。该研究结果提示, 急性移植排斥反应对中枢免疫器官胸腺中的 T 细胞发育分化具有重要影响。

**关键词:** 同种转基因皮肤移植; 小鼠; 排斥反应; 胸腺细胞

**中图分类号:** Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2014)01-0001-05

器官移植近几十年来发展迅速, 已成为临床治疗各种终末期疾病的有效手段。然而, 器官移植后的免疫排斥反应是导致移植物长期存活的主要障碍, 也是导致慢性排斥反应和移植物失效的最重要危险因素。因此, 排斥反应的发生机制和防治依然是移植免疫学需要探讨的重要问题<sup>[1]</sup>。T 细胞在排斥反应发生的机制中发挥核心作用<sup>[2]</sup>。作为中枢免疫器官, 胸腺是 T 细胞发育和成熟的必需场所, 在外周 T 细胞免疫重建中发挥着重要作用。胸腺缺失(如 NUDE 小鼠)将导致机体外周 T 细胞缺乏<sup>[3]</sup>。同种转基因移植排斥反应对受体自身的胸腺细胞是否造成损伤尚目前未见报道。因此, 本研究应用同种转基因小鼠皮肤移植模型, 观察急性免疫排斥反应对受体中枢免疫器官胸腺中 T 细胞发育的影响。结果表明, 在移植排斥反应的同时, 受体胸腺发生明显萎缩, 胸腺细胞总数及各亚群细胞绝对数均显著减少。说明同种转基因皮肤移植排斥反应影响受体小鼠胸腺细胞的正常发育。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物:** 6—8 周龄 C57BL/6 小鼠、BALB/c 小鼠, 雌性, SPF 级, 购自北京维通利华实验动物中心, 生产许可证号 SCXK 京 2012-0001。所有 SPF 级小鼠均按照中国科学院动物研究所实验动物管理委员会规定饲养于本所 SPF 级 IVC 动物房, 所有实验均严格遵照国际实验动物应用和管理条例进行。

**1.1.2 实验器材:** 流式细胞仪, 倒置生物显微镜, 200 目滤网。实验器材均为本实验室自配。

**1.1.3 试剂及抗体:** 牛血清白蛋白(BSA); PBS 粉末; PE-Cy5-anti-CD8; FITC-anti-CD4; APC-anti-CD4; Cy5-anti-CD4; PE-anti-CD69; PE-anti-CD25; FITC-anti-CD44; PE-anti-CD62L; PE-anti-Foxp3; PE-anti-TCR-β; PE-anti-CD24。抗体均购自 BD 公司。

#### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组:** 本实验分为 C57BL/6 不移植对

收稿日期: 2013-12-09

\* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)资助(No. 2010CB945301); 国家自然科学基金(No. CB1130055); 中国科学院创新工程重要方向项目(YSC-X2-YW-R-238)

作者简介: 张红梅(1987-), 女, 在读硕士。研究方向: 移植免疫学。

通信作者: 赵勇, 男, 研究员。E-mail: zhaoy@ioz.ac.cn

照组和同种异基因皮肤移植实验组,实验组小鼠于术后第7天拆线,第10天取胸腺,制备胸腺单细胞悬液,每组至少6只小鼠。

**1.2.2 皮肤移植模型的建立:** 0.875%戊巴比妥钠按每20g体质量120 $\mu$ L的用量行腹腔注射麻醉,在供体BALB/c小鼠尾部取1cm $\times$ 1cm大小皮片,将其植于受体C57BL/6小鼠背部同样面积的植床上。术后第7天拆线并每天观察移植皮片情况,判定移植排斥反应的发生。

**1.2.3 胸腺单细胞悬液的制备:** 在小鼠皮肤移植第10天取对照组和实验组小鼠胸腺,用毛玻片在PBS中轻轻研磨制成单细胞悬液,1700 r/min离心5 min,弃上清,用PBS洗涤重悬后计数,调整细胞终密度至 $5 \times 10^6$ /mL。

**1.2.4 细胞表面分子染色及流式分析:** 取来自对照组和实验组小鼠胸腺组织的单个细胞悬液,使每管细胞总数为 $5 \times 10^5$ /100 $\mu$ L,加入各种抗体每管10 $\mu$ L,轻轻混匀,4 $^{\circ}$ C避光,静置30 min。PBS洗3次后,用流式细胞仪检测,应用FCS Express V3软

件进行分析。

### 1.3 统计方法

实验数据均以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,统计分析采用不配对t检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著,均具有统计学意义(图中\*代表 $P < 0.05$ ,\*\*代表 $P < 0.01$ ,\*\*\*代表 $P < 0.001$ )。

## 2 结果

### 2.1 同种异基因皮肤移植排斥反应导致受体小鼠胸腺萎缩及胸腺细胞数量减少

为研究急性排斥反应对受体胸腺的损伤,我们建立了小鼠的同种异基因皮肤移植模型。结果表明,皮肤移植第10d的排斥反应导致受体小鼠的胸腺发生萎缩(图1-A);胸腺质量(图1-B)及胸腺细胞总数较不移植对照组均显著降低( $P < 0.001$ )(图1-C)。说明急性排斥反应影响受体胸腺组织。

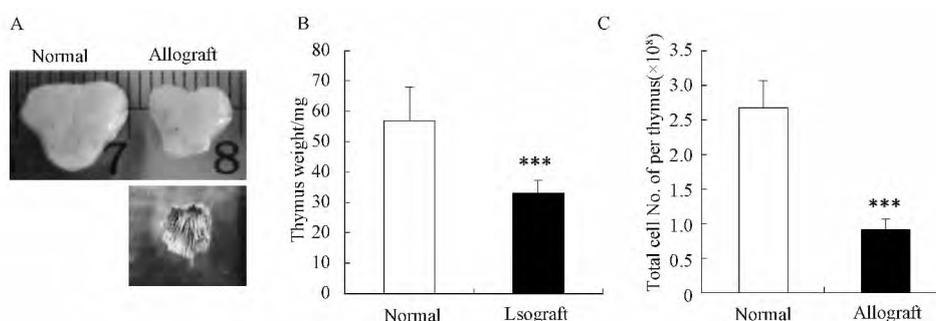


图1 异种皮肤移植排斥导致小鼠胸腺萎缩

注:与对照组比较,\*\*\* $P < 0.001$ 。

Fig.1 Mouse skin allograft rejection results in thymus atrophy

Note: \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

### 2.2 同种异基因皮肤移植排斥影响胸腺细胞亚群

除细胞数量外,细胞的表型也是胸腺细胞发育的重要指标。为进一步探明同种异基因皮肤移植排斥反应对胸腺细胞亚群的影响,我们对排斥反应中小鼠胸腺细胞亚群的表型进行流式细胞测定。结果显示:CD4 $^-$ CD8 $^-$ 双阴性(Double negative, DN)细胞、CD4 $^+$ CD8 $^+$ 双阳性(Double positive, DP)细胞以及CD4 $^+$ 或CD8 $^+$ 单阳性(Single positive, SP) T细胞虽然比例没有差异(图2-A, B),但细胞绝对数均显著低于对照组(图2-C);另外, DN1(CD44 $^+$ CD25 $^-$ )细胞、DN2(CD44 $^+$ CD25 $^+$ )细胞、DN3(CD44 $^-$ CD25 $^+$ )细胞、DN4(CD44 $^-$ CD25 $^-$ )细胞比

例没有变化(图2-D, E),但细胞绝对数明显降低(图2-F)。说明同种异基因皮肤移植排斥反应会导致胸腺发育受损并影响胸腺细胞的早期发育阶段。

### 2.3 同种异基因皮肤移植排斥对胸腺细胞发育各阶段标志无明显影响

我们也检测了皮肤移植排斥对胸腺细胞发育各阶段所特有的特异性表面标志,结果显示:TCR- $\beta$ 、CD24、CD69、CD62L在DP、CD4SP、CD8SP中的表达比例与对照组均没有差异,仅在细胞绝对数上明显低于不移植组(图3A-E),提示皮肤排斥对胸腺发育各阶段标志表达无明显影响。

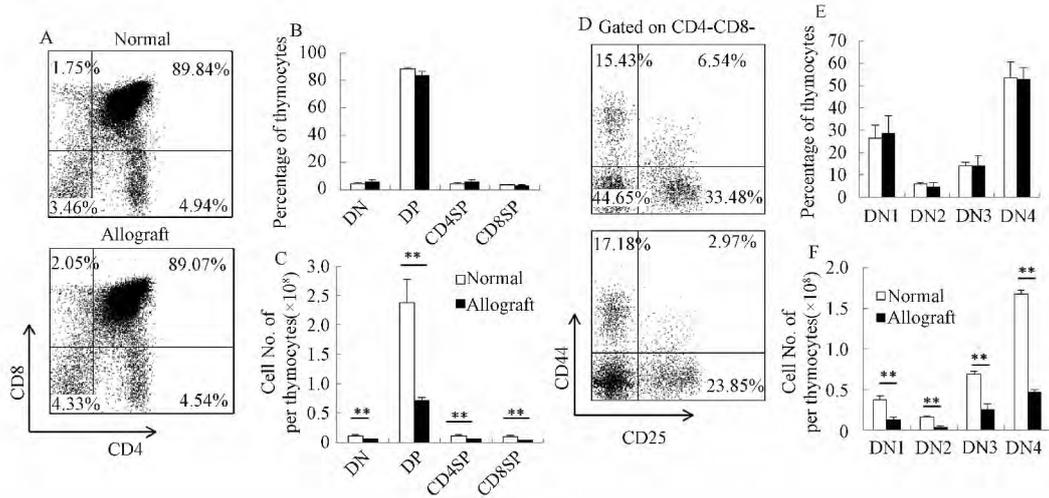


图 2 皮肤移植排斥影响胸腺细胞的亚群

注: 与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ .

Fig. 2 Mouse skin allograft rejection impairs the subsets of thymocytes

Note: \*\* $P < 0.01$  vs control group.

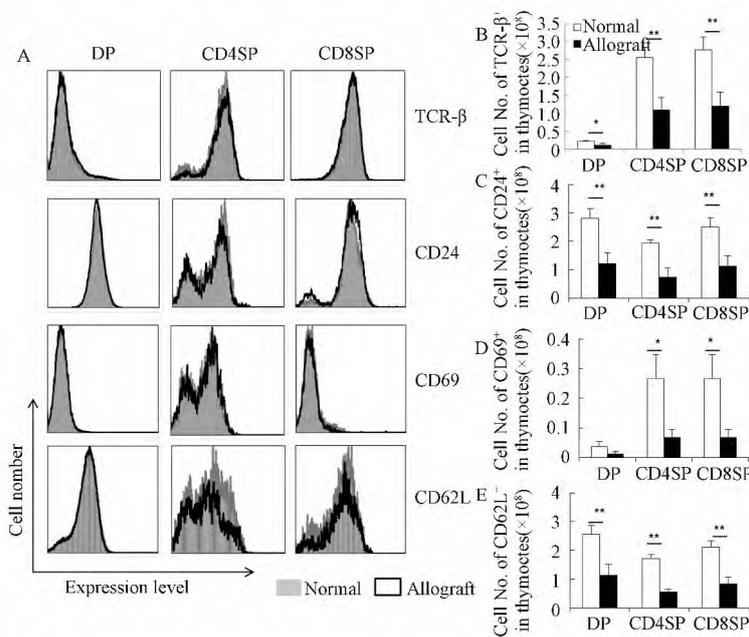


图 3 皮肤移植排斥对胸腺细胞发育阶段标志的影响

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

Fig. 3 Mouse skin allograft rejection impacts the development of thymocytes

Note: \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group.

### 2.4 同种异基因皮肤移植排斥使胸腺调节性 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 细胞绝对数减少

检测了皮肤移植排斥过程中胸腺中具有免疫抑制作用的调节性 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 细胞的变化特点。结果显示,调节性 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 细胞的表达比例无显著差异,仅在细胞绝对数上明显低于不移植对

照组(图 4 A—C)。

### 3 讨论

胸腺是 T 淋巴细胞发育分化的主要场所。骨髓来源的胸腺前体细胞在胸腺内的分化发育大致分

为三个阶段: 不表达 CD4 和 CD8 分子的称为 DN 细胞; 当 DN 细胞开始表达 CD4 和 CD8 时进而分化为

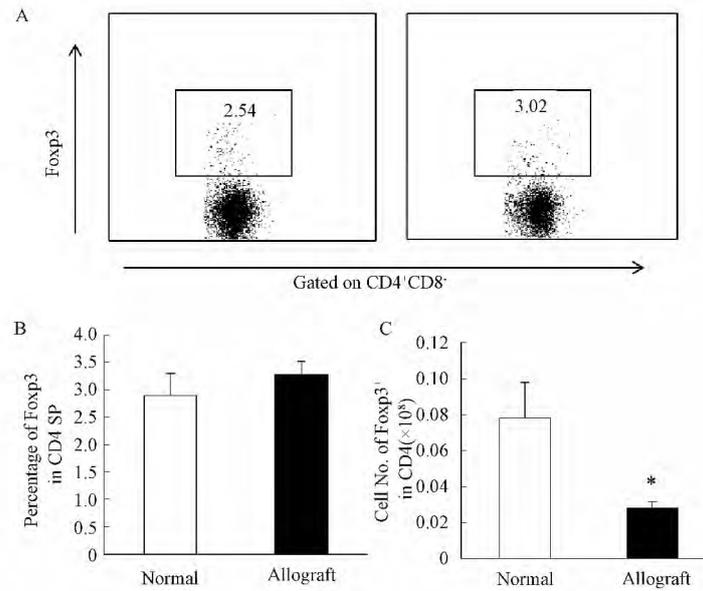


图 4 皮肤移植排斥导致胸腺中调节性 T 细胞减少

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ .

Fig. 4 Mouse skin allograft rejection affects the Tregs in the thymus

Note: \*  $P < 0.05$  vs control group.

双阳性 DP 细胞; 最后 DP 细胞经过阳性和阴性选择过程, 发育分化成为单阳性 CD4SP 或 CD8SP 成熟的有功能的 T 细胞, 进而迁移至外周淋巴器官<sup>[4]</sup>。成熟的 T 细胞一方面能识别自身 MHC 分子, 具有免疫功能, 另一方面具有对自身抗原耐受的能力。胸腺输出 T 细胞数量与质量直接影响免疫系统的整体功能<sup>[5]</sup>。双阴性细胞的发育又能根据 CD44 和 CD25 的表达情况分成 4 个阶段 (DN1-DN4)。我们通过检测胸腺细胞发育不同阶段的表面分子发现, 皮肤移植排斥对胸腺亚群细胞的比例没有影响, 但各亚群细胞绝对数均显著降低, 提示皮肤移植排斥对胸腺各亚群细胞具有相同的影响。

调节性 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 细胞是机体调控不适当或者过强免疫应答的关键, 它们可以主动地抑制效应 T 细胞的功能, 维持免疫系统对自身成分的耐受<sup>[6]</sup>。皮肤移植排斥使胸腺中调节性 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 细胞明显减少, 提示皮肤移植排斥反应阻断胸腺中调节性 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 细胞的发育成熟。

胸腺细胞发育过程中各阶段都有特异性的表面标志。研究表明: CD69 是淋巴细胞活化最早表达的膜表面分子, 一般表达于活化后的细胞表面<sup>[7]</sup>。在双阳性细胞选择阶段高表达, 向单阳性阶段逐渐发育成熟过程中则渐渐表达下降, 而输出到外周的

成熟 T 细胞只有在活化状态才再次上调表达。因此, CD69 是双阳性细胞发育的一个标志<sup>[8]</sup>。CD69 表达降低说明双阳性阶段的胸腺细胞发育受损。CD24 是 T 细胞稳态增殖的必要条件<sup>[9]</sup>, 主要表达于发育中的 T 细胞和大部分 B 细胞及抗原提呈细胞等, 多数情况下, CD24 以较高的水平表达于祖细胞或代谢旺盛的细胞, 较低水平的表达于分化成熟的细胞<sup>[10]</sup>, 即在 T 细胞发育成熟过程中 CD24 的表达会下调<sup>[11]</sup>。有研究者发现表达于抗原提呈细胞表面的 CD24 通过参与共刺激调节通路来介导 T 细胞的免疫反应<sup>[12,13]</sup>。CD62L 是初始 T 细胞 (即从未接触到特异性抗原的一类 T 细胞) 表面的归巢受体, 它可以介导循环系统中的初始 T 细胞归巢于外周淋巴组织, 在这里初始 T 细胞被相应抗原激活, 成为成熟 (记忆) T 细胞, 其表面的 CD62L 分子表达下调, 成为 CD62L 阴性 T 细胞<sup>[14,15]</sup>。因此, T 细胞在胸腺中发育成熟的过程中 CD24 及 CD69 表达下调; 从胸腺迁出外周的 T 细胞增多则会上调 CD62L 的表达。我们研究结果表明, 皮肤移植排斥对胸腺细胞发育过程的表面标志无明显影响。

研究结果表明, 同种异基因皮肤移植排斥影响整个胸腺细胞的发育过程。我们推测胸腺细胞死亡或者增殖减慢可能是引起胸腺细胞数减少的原因。

另外, T淋巴细胞是机体细胞免疫的重要执行和调节细胞, 是参与异种器官移植急性排斥反应的主要效应细胞<sup>[16]</sup>。在移植器官的免疫应答中, 多种细胞因子参与并发挥重要的免疫调节作用, 因此, 关于急性排斥反应如何影响胸腺发生萎缩或者通过哪种细胞因子发挥作用有待研究和探讨。

### 参考文献

- [1] Hricik D E, Poggio E D, Woodside K J, *et al.* Effects of cellular sensitization and donor age on acute rejection and graft function after deceased-donor kidney transplantation [J]. *Transplantation*, 2013, **95**(10): 1254—1258.
- [2] Benichou G, Yamada Y, Yun S H, *et al.* Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts [J]. *Immunotherapy* 2011, **3**(6): 757—770.
- [3] Lina Sun, Haiying Luo, Hongran Li, *et al.* Thymic epithelial cell development and differentiation: cellular and molecular regulation [J]. *Protein Cell* 2013, **4**(5): 342—355.
- [4] Xi Xu, Shusong Zhang, Pingping Li, *et al.* Maturation and Emigration of Single-Positive Thymocytes [J]. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013 Article ID 282870.
- [5] Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2006, **6**: 127—135.
- [6] Vokaer B, Charbonnier L M, Lemaître P H, *et al.* IL-17A and IL-2-Expanded Regulatory T Cells Cooperate to Inhibit Th1-Mediated Rejection of MHC II Disparate Skin Grafts [J]. *PLoS One*. 2013, **8**(10): e76040.
- [7] Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation [J]. *Trends Immunol*, 2005, **26**(3): 136—140.
- [8] Yagi H, Kamba R, Chiba K, *et al.* Immunosuppressant FTY720 inhibits thymocyte emigration. *Eur J Immunol*, 2000, **30**(5): 1435—1444.
- [9] Li O, Zheng P, Liu Y. CD24 expression on T cells is required for optimal T cell proliferation in lymphopenic host [J]. *J Exp Med* 2004, **200**(8): 1083—1089.
- [10] Fang X, Zheng P, Tang J, *et al.* CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol*. 2010, **7**(2): 100—103.
- [11] Hubbe M, Altevogt P. Heat-stable antigen/CD24 on mouse T lymphocytes: evidence for a costimulatory function [J]. *Eur J Immunol*, 1994, **24**(3): 731—737.
- [12] Liu Y, Jones B, Aruffo A, *et al.* Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth [J]. *J Exp Med*, 1992, **175**(2): 437—445.
- [13] Liu Y, Wenger R H, Zhao M, *et al.* Distinct costimulatory molecules are required for the induction of effector and memory cytotoxic T lymphocytes [J]. *J Exp Med*, 1997, **185**(2): 251—262.
- [14] Weninger W, Crowley M A, Manjunath N, *et al.* Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells [J]. *J Exp Med* 2001, **194**(7): 953—966.
- [15] Corey M C, Bart T E, Jinghai Wu, *et al.* Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration [J]. *Nature* 2006, **442**(7100): 299—302.
- [16] Agorogiannis E I, Regateiro F S, Howie D, *et al.* Th17 Cells Induce a Distinct Graft Rejection Response That Does Not Require IL-17A [J]. *American Journal of Transplantation*, 2012, **12**: 835—845.

## Impact of Skin Allograft Rejection on Thymocyte Subsets in Mice

ZHANG Hong-mei<sup>1</sup>, WU Liang-qi<sup>1</sup>, SUN Li-na<sup>2</sup>, ZHAO Yong<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(2. State Key Laboratory of Bio-membrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract: Objective** To investigate the impacts of allograft rejection on the development of thymocyte subsets in a mouse allogeneic skin transplantation model. **Method** Skin tissues from BALB/c mice were transplanted into C57BL/6 mice. The total cell number of thymocytes and their subsets in allo-skin-grafted recipients were analyzed by flow cytometry. **Result** In allo-skin transplantation group, the thymus weight was decreased, the quantities of thymocytes and their subsets including DN, DP, CD4SP and CD8SP cells were significantly decreased compared with the control mice. **Conclusion** The data showed that the acute rejection significantly impacts the development of T cells in the thymus.

**Key words:** skin allograft; mice; rejection; thymocytes