

供体特异性输血通过 CD47-SIRP α 信号 负调控树突状细胞诱导移植耐受

吴小剑¹, 何晓生¹, 吴现瑞¹, 金常光², 杨永广³, 兰平^{1*}

(1.中山大学附属第六医院(附属胃肠肛门医院)结直肠外科,广东 广州,510655; 2.辽河油田中心医院 呼吸内科,辽宁 盘锦 124010; 3.哈佛大学麻省总医院器官移植生理研究中心,波士顿,02129)

摘要:【目的】探讨 CD47-SIRP α 信号在供体特异性输血诱导移植耐受中的作用及其机制。【方法】将受体 bm1 小鼠按不同的移植前预处理分为 3 组:CD47 WT-DST 组、CD47 KO-DST 组、Non-DST 组。7 d 后移植 CD47 WT/B6 皮片,比较 3 组皮肤移植物的存活时间;DST 后 5、24 h 行流式细胞术检测各组受体抗原呈递细胞的活化情况;DST 后 5、24 h 行流式细胞术和组织免疫学检测供体细胞在受体组织内的分布和存活情况。【结果】CD47 WT-DST 组的皮肤移植植物存活时间[MST=(46.77 \pm 20.01)d]明显比 Non-DST 组延长($P < 0.0001$),而 CD47 KO-DST 组明显加快皮肤移植植物排斥反应,其皮肤移植植物存活时间[MST=(13.73 \pm 4.56)d]甚至比 Non-DST 组还短($P < 0.05$)。行 CD47 KO-DST 的受体小鼠体内,DC 上 CD86 的表达水平明显高于 CD47 WT-DST 组和 Non-DST 组(在 5 h, $P < 0.01$;在 24 h, $P < 0.001$)。同样,I-Ab (MHC-II)表达水平在 CD47 KO-DST 的受体小鼠体内也明显高于 CD47 WT-DST 和 Non-DST 组(在 5 h, $P < 0.01$;在 24 h, $P < 0.05$)。CD47 KO 的供体脾细胞在受体体内很快被受体清除。【结论】DST 诱导耐受作用中供体细胞表达 CD47 是必需的,供受体间的 CD47-SIRP α 引发负性调节信号,负反馈调控 DC 的成熟和活化,抑制其抗原呈递作用,进而诱导供体特异性耐受。

关键词: 供体特异性输血; 树突状细胞; 皮肤移植; 免疫耐受

中图分类号: R350 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2010)06-0807-05

Preventing Activation of Dendritic Cells through Donor CD47 and Recipient Signal-Regulatory Protein- α Interaction

WU Xiao-jian¹, HE Xiao-sheng¹, WU Xian-rui¹, JIN Chang-guang², YANG Yong-guang³, LAN Ping^{1*}

(1. Department of Colorectal Surgery, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China; 2. Department of Internal Medicine, Liaohu Youtian Central Hospital, Panjin 124010, China; 3. Transplantation Biology Research Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02129, USA)

Abstract: 【Objective】 To determine possible mechanism of donor CD47 and recipient signal-regulatory protein- α interaction on allograft tolerance induction by donor-specific transfusion. 【Methods】 Groups of bm1 mice were randomized to undergo CD47 WT-DST, CD47 KO-DST and Non-DST control. All animals also received skin allograft 7 days later and compared the survival of skin graft in these 3 groups. Then, selected bm1 recipients were sacrificed at the indicated time points after DST. Nucleated cells were harvested, assessed the expression of the activation marker (ie., CD80, CD86, and MHC class II) on recipient CD11c+ cells in the different groups by flow cytometric analysis, and checked the distribution of CD47 WT and KO donor cells in lymph nodes, spleen of bm1 recipients at 5 h and 24 h post-DST by flow cytometric analysis and histologic analysis. 【Results】 CD47 WT-DST significantly prolonged skin graft survival (MST = 46.77 \pm 20.01 days) compared to that in Non-DST group (MST = 19.75 \pm 3.15 days) ($P < 0.0001$). However, bm1 mice receiving CD47 KO-DST rejected donor skin quickly, and the survival of

收稿日期: 2010-04-02

基金项目: 中山大学医科青年教师科研启动基金(3171913)

作者简介: 吴小剑,副教授,E-mail: wxjmqy2003@yahoo.com; *通信作者: 兰平,教授,博士生导师,研究方向: 胃肠外科、移植免疫,E-mail: lpzm@yahoo.com

donor skin grafts in this group (MST = 13.73 ± 4.56 days) was even shorter than that in Non-DST group ($P = 0.025$). CD86 and MHC class II were significantly enhanced on DCs in bm1 recipients of CD47 KO-DST compared to that in CD47 WT-DST recipients. CD47 KO splenocytes are rapidly cleared by recipients after injection as DST. 【Conclusions】 CD47 expression on donor cells is required for tolerance induction by DST. The underlying mechanism of allograft acceptance after DST may be: CD47-SIRP α signaling plays an important role in maintaining the immature or semimature state of recipient DCs after DST, which is needed for inducing T cell tolerance.

Key words: donor-specific transfusion; dendritic cells; skin transplantation; immune tolerance

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(6): 808-812]

供体特异性输血 (donor-specific transfusion, DST) 是指在行移植手术前将供体的全血、脾细胞或骨髓细胞等输入受者体内, 间隔一定时间后再行移植。DST 诱导免疫耐受确切的机制尚不清楚, 这在一定程度上阻碍了其在临床上的进一步应用。信号调节蛋白 (signal regulatory proteins, SIRPs) 广泛表达于巨噬细胞和树突状细胞 (dendritic cell, DC), 其胞外配体 CD47 表达于所有组织的不同细胞上, 两者结合为 CD47-SIRP α 信号对免疫细胞进行负性调节作用, 能防止 DC 成熟和活化, 进而抑制 T 淋巴细胞的成熟和迁移以及共刺激分子的表达, 抑制免疫反应^[1]。而用于 DST 的供体细胞 CD47 的表达及 CD47-SIRP α 信号负调节受体 DC, 抑制 T 细胞活化促使 DST 诱导免疫耐受未见报道。本研究首先分析了供体细胞 CD47 在 DST 诱导小鼠皮肤移植存活时间中的作用, 并进一步研究了 DST 的供体细胞上 CD47 的表达对受体体内免疫细胞活性变化的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE) 标记的抗小鼠 CD86, CD80, I-A^b (MHC-II) 和 A20 (CD45.2) 单克隆抗体, 别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, APC) 标记的抗小鼠 CD11c, Mac-1, CD8 单克隆抗体 (Pharmingen 公司产品, San Diego, CA)。荧光染料 2 羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯 (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE) 购自 (Molecular Probes, Eugene, OR)。骨髓细胞培养液 (500 mL Media 199; 5 mL HEPES 缓冲液; 5 mL DNA 酶; 40 μ L 的庆大霉素), FACS 液 (100 mL 10X Hanks 平衡盐溶液; 900 mL 双蒸水; 210 μ L 1 mmol/L NaOH; 1 g NaN₃; 1 g 牛血清白蛋白)。

1.2 主要仪器

Canton II 流式细胞仪: 美国 BD 公司; Nikon Eclipse TE2000-U 荧光显微镜: 日本 Nikon 公司; 倒置显微镜: 德国莱卡公司; 台式离心机: 美国贝克曼公司。

1.3 实验动物

C57BL/6 (B6, H2^b) 小鼠, B6.C-H2^{bm1.AyJ} (bm1) 小鼠, C57BL/6-transgenic (UBC-GFP) 30 Scha/J 小鼠均购自 Jackson Laboratories 公司 (Bar Harbor, Maine, USA); 遗传背景为 B6 的 CD47 基因敲除小鼠 (CD47 KO, CD47^{-/-}) 由 Oldenborg PA 实验室惠赠; CD47 KO/GFP⁺ 的 C57BL/6 小鼠由 CD47 KO 的 C57BL/6 小鼠和 C57BL/6-transgenic (UBC-GFP) 30 Scha/J 小鼠逆代杂交产生。B10.A/Cr (H2a) 小鼠和 B6-LY5.2/Cr 同系小鼠购自 Frederick Cancer Research Facility 公司 (FCRF, Frederick, MD)。所有小鼠鼠龄均为 6 ~ 8 周, 雌性。根据美国国家科学院和国立卫生研究院公布的实验动物饲养和使用指南进行动物的饲养。所有动物实验方案必须遵守麻省总医院实验动物委员会的有关规定。

1.4 脾细胞悬液的制备

供体小鼠以颈椎脱臼法处死后取出脾脏, 放入骨髓细胞培养液中, 剪成 1 mm³ 大小的碎片, 研磨后经网筛滤过, 离心 5 min 弃上清, 每个脾脏加入 0.5 mL 红细胞裂解液充分混匀后快速加入 4.5 mL 骨髓细胞培养液, 洗涤 2 次, 调整浓度为 1×10^7 /mL 的脾细胞悬液。台盼蓝染色法判断细胞活性大于 90%。

1.5 供体特异性输血

取 1 mL (含 1×10^7 个供体细胞) 上述脾细胞悬液在移植前 7 d 经尾静脉输入受体小鼠内。

1.6 皮肤移植及其存活情况的观察

分别取供体小鼠和第三方移植对照 B10.A 小鼠尾部全层皮肤 1 cm \times 0.5 cm 大小的皮片, 受者

小鼠以 10 g/L 戊巴比妥麻醉,备皮后分别于上背部两侧剪取并移走 1 cm \times 0.5 cm 大小皮片,显露移植床,将供体小鼠和第三方 B10.A 小鼠尾部皮片分别移植于受体小鼠上背部的右侧和左侧的移植床上,妥善包扎伤口。于移植后第 7 天开始每日观察移植植物。判断移植皮片出现排斥反应的依据:①皮片变干、变硬;②4/5 以上的表皮脱落;③皮片缩小至原面积的 2/5;④皮片成活后又脱落。符合上述任何 1 条即为移植排斥反应的开始(图 1)。



图 1 皮肤移植及其存活情况的观察

Fig.1 skin grafting and the survival of skin graft

the right graf was surviving, and the left graft was defined as rejected.

1.7 实验动物分组

CD4 WT 或 CD47 KO 的 B6 小鼠为供体;bm1 小鼠为受体;B10.A 小鼠用于提供第三方皮肤移植植物。分为 3 组:①CD47 WT-DST 组:于移植前行 CD47 WT/B6 小鼠为供体脾细胞的 DST;②CD47 KO-DST 组:于移植前行 CD47 KO/B6 小鼠为供体脾细胞的 DST;③Non-DST 组:在术前未作任何处理。

1.8 比较各组皮肤移植物的存活时间

将受体 bm1 小鼠按上述分组,分别进行 CD47 WT-DST,CD47 KO-DST 或不进行 DST 处理,7 d 后所有受体小鼠行皮肤移植。比较 3 组皮肤移植物的存活时间。

1.9 流式细胞术检测 DST 后受体抗原呈递细胞的活化情况

将 GFP⁺的 CD47 WT 或 CD47 KO 的 B6 小鼠脾细胞经尾静脉输入受体 bm1 小鼠,分组同上,分别将上述 3 组的受体 bm1 小鼠在不同的时间点

(行 DST 后 5 h、24 h)眼眶取外周血,同时处死小鼠,取出脾脏、淋巴结、胸腺、骨髓、肺,制备浓度为 1×10^6 /mL 的外周血单个核细胞、脾脏、淋巴结、胸腺、骨髓、肺细胞悬液。分别取 1 mL 离心弃上清后依次加各种单克隆抗体(2.4 G,CD80-PE,CD86-PE,I-Ab-PE,CD11c-APC,Mac-1-APC),放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱暗处孵育 30 min 后,再用 FACS 液洗涤,上机检测,每一样品检测 10 000 个细胞。

1.10 流式细胞术和组织免疫学检测 DST 供体细胞在受体组织内分布和存活情况

分别将 1×10^7 个 GFP⁺的 CD47 WT 或 CD47 KO 的 B6 小鼠脾细胞经尾静脉输入受体 bm1 小鼠,在不同的时间点(行 DST 后 5、24 h)处死小鼠,取出脾脏、淋巴结、骨髓,制备成单细胞悬液,用 FACS 液洗涤和重悬,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,直接用流式细胞术比较供体细胞的百分率。

CD47 KO 或 CD47 WT 的供体细胞经 CFSE 染色(按 CFSE 试剂盒说明书进行)后,经尾静脉输入受体 bm1 小鼠,24 h 后处死小鼠,取出脾脏和淋巴结,用 Histo PrepTM 冰冻组织包埋液包埋,冰冻切片厚 5 μ m,干燥后置入荧光显微镜下观察 CFSE 阳性细胞在脾脏、淋巴结中的数量和分布情况。同时用流式细胞术检测 CFSE 阳性细胞在这些组织中的分布来验证组织免疫学检查结果。

1.11 统计学处理

移植物的生存时间用平均存活时间(mean survival time,MST)表示,通过 GraphPad Prism 4.03 数据分析和作图软件进行比较分析。MST 的组间比较用 Kaplan-Meier。所有实验数据均为计量资料,用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。组间差异比较用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD47 KO-DST 能明显加快皮肤移植物的排斥

未行 DST 的皮肤移植植物发生排斥反应快[MST = (19.75 \pm 3.15)d],CD47 WT-DST 组的皮肤移植植物存活时间[MST = (46.77 \pm 20.01)d]明显比 Non-DST 组延长($P < 0.0001$),而 CD47 KO-DST 组明显加快皮肤移植植物排斥反应,其皮肤移植植物存活时间[MST = (13.73 \pm 4.56)d]甚至比 Non-DST

组还短 ($P < 0.05$)。所有组的第三方 B10.A 皮片均在移植后 10 ~ 14 d 完全排斥, 其皮肤移植存活时间 [MST = (11.88 ± 0.87)d] 在 3 组间无统计学差异。(图 2)

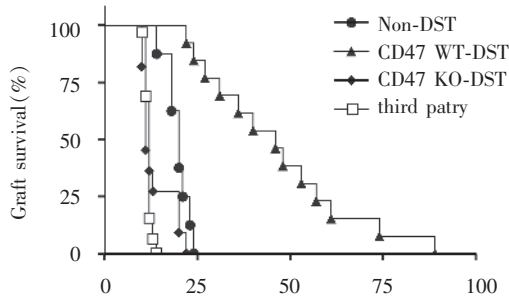


图 2 DST 供体细胞的 CD47 表达对皮肤移植存活时间的影响

Fig.2 Effect of DST with CD47 KO splenocytes on the survival of skin allografts.

2.2 DST 供体细胞 CD47 对受体 DC 上 CD86 和 MHC- II 表达的影响

在 CD11c⁺ 的细胞 (DC) 中, 行 CD47 KO-DST 的受体小鼠体内, DC 上 CD86 的表达水平明显高于 CD47 WT-DST 组和 Non-DST 组 (在 5 h, $P < 0.01$; 在 24 h, $P < 0.001$)。DC 上 CD86 的表达水平在 CD47 WT-DST 组和 Non-DST 组间无明显差异 ($P > 0.05$, 图 3)。同样, I-Ab (MHC- II) 表达水平在 CD47 KO-DST 的受体小鼠体内也明显高于 CD47 WT-DST 和 Non-DST 组 (在 5 h, $P < 0.01$; 在 24 h, $P < 0.05$), DC 上 MHC- II 表达水平在 CD47 WT-DST 组和 Non-DST 组间无明显差异 ($P > 0.05$, 图 4)。

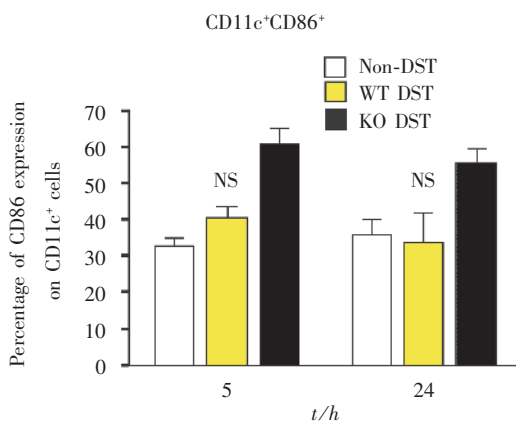


图 3 DST 供体细胞 CD47 对受体 DC 上 CD86 表达的影响

Fig.3 Effect of DST with CD47 KO splenocytes on the expression of CD86 on recipient DCs.

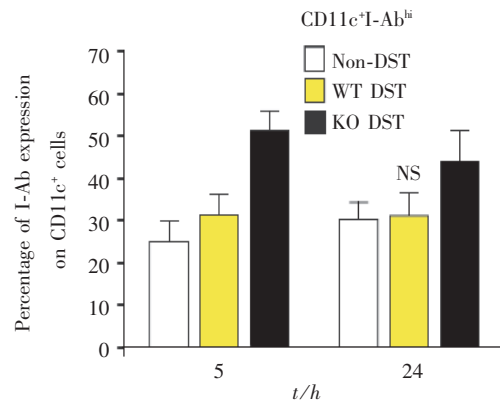


图 4 DST 供体细胞 CD47 对受体 DC 上 MHC- II 表达的影响

Fig.4 Effect of DST with CD47 KO splenocytes on the expression of MHC class II on recipient DCs.

2.3 CD47 KO 的供体脾细胞在 DST 很快被受体清除

在进行 DST 后 5 h 和 24 h, CD47 WT-DST 组中有较多的供体细胞存在于脾脏和淋巴结中。然而, 在 CD47 KO-DST 组中几乎看不到供体细胞 (图 5, 6)。

3 讨论

近年来, 在动物模型和临床上均已证实移植前对受体进行 DST 是诱导移植免疫耐受的一个极有前景和较为可靠的手段^[2,3], 让研究者们重新审视和重视 DST 诱导移植免疫耐受的价值。目前认为 DST 可能的机制有: ①克隆排除: Iwakoshi 等^[4]认为外周异体抗原特异性的 CD8⁺ T 淋巴细胞克隆的清除是 DST 诱导耐受的一个重要机制; ②诱导 T 细胞无能: 在 DST 过程中, 活化的 CD4⁺ Th2 细胞释放细胞因子 (IL-4, IL-10), 能抑制促炎症性反应 T (CD4⁺, CD8⁺) 细胞的活化和释放细胞因子 (IL-2, IFN- γ), 诱导反应性 T 细胞无能^[5]; ③产生调节性 T 细胞: Vignes 等^[6]发现 CD8⁺ TCR V β 18-D β 1-J β 2.7 T 细胞克隆在 DST 诱导移植免疫耐受中起着重要作用; ④调节细胞因子产物: DST 能明显延长大鼠移植肝的存活时间, DST 明显降低了移植肝内 IFN- γ , IL-12, IL-18 水平, 却明显增加了 IL-4, IL-10, TGF- β 水平^[7]; ⑤形成微嵌合体^[7-8]: 产生于与移植 MHC 部分匹配细胞的嵌合状态, 能够维持特异性免疫耐受状态, 使得移植得以维持存活; ⑥提供可溶性 MHC 抗原^[9]以及上述机制

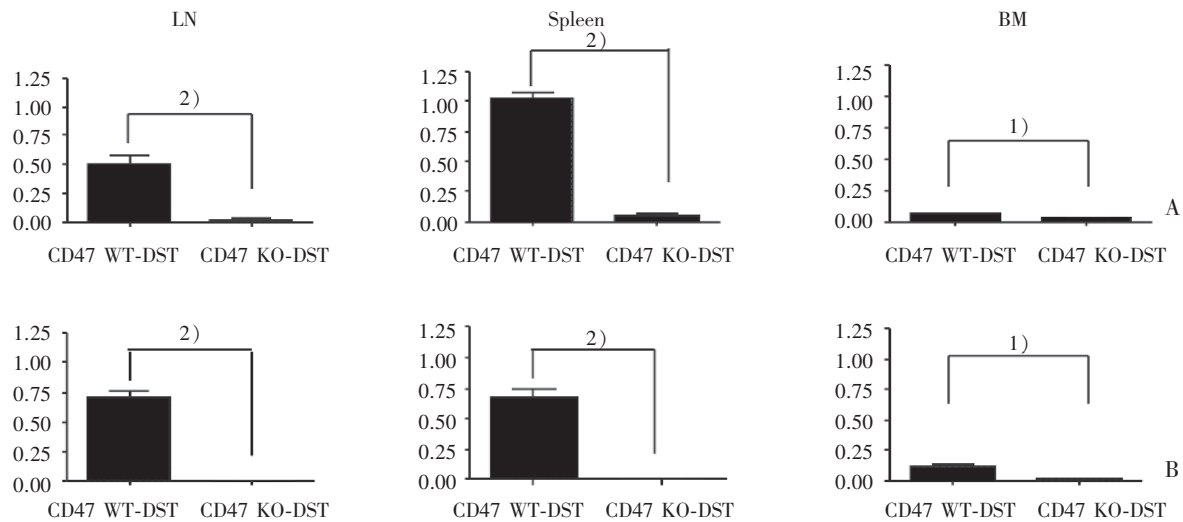


图 5 流式细胞术检测行 DST 后 CD47 KO 的供体脾细胞

Fig.5 The clearance of CD47 KO donor cells was quicker than CD47 WT donor cells in recipients

A: at the indicated time points 5 h after DST; B: at the indicated time points 5 h after DST .and the percentages of donor cells were analysed by flow cytometry. In CD47 WT-DST recipients, more donor cells were detected in the spleen and LN compared to BM. However, only few donor cells were seen in these tissues from CD47 KO DST recipients. 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.001$

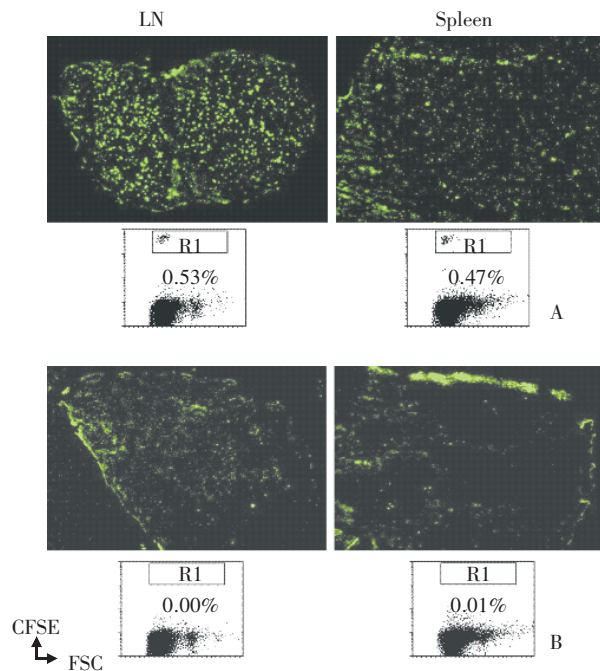


图 6 组织免疫学检测行 DST 后 CD47 KO 的供体脾细胞
Fig.6 The clearance of CD47 KO donor cells was quicker than CD47 WT donor cells in recipients

Only few donor cells were seen in these tissues from CD47 KO-DST recipients (B), while donor cells were clearly detected in these tissues from CD47 WT-DST recipients (A).

的协同作用^[5,7]延长了移植物的长期生存。也有作者^[10]在缺乏抗原呈递细胞的受体内发现 DST 不能

诱导特异性的免疫耐受的建立,间接地证明了抗原识别的间接途径在 DST 的免疫调节中发挥重要作用,然而,其在间接的抗原呈递过程中如何诱导免疫耐受仍不清楚。

对 DST 的确切机制进行探讨将推动其在临床的应用,并有可能为诱导移植免疫耐受开辟新途径。本研究分析了供体细胞 CD47 的表达对 DST 诱导皮肤移植存活时间的影响,发现供体细胞表达 CD47 的 DST 具有免疫抑制和诱导耐受的作用。然而,CD47 表达缺失的 DST 却明显加快了皮肤移植物的排斥反应,说明在 DST 的免疫抑制和诱导耐受作用中供体细胞表达 CD47 是必需的。

由于受体内的 DC 是机体免疫反应的始动者,在免疫反应应答中具有独特的重要地位。我们进一步通过流式细胞术分析 DST 后受体内抗原呈递细胞的变化,行 CD47 KO-DST 的受体内 DC 细胞上 CD86 和 MHC-II 表达水平的上调表明:CD47 KO-DST 促进 DC 的成熟活化进而刺激 T 细胞增殖和分化,加快皮肤移植物的排斥;而 CD47 WT-DST 能防止 DC 上 CD86 和 MHC-II 上调和活化,即防止 DC 的成熟和分化,诱导 T 细胞耐受。进一步结果显示行 DST 后 CD47 KO 的供体脾细胞很快被受体清除。

CD47-SIRP α 间的连接是种属特异性的^[11-12],

即不同种属间的 CD47 和 SIRP α 不能匹配,也就不能发挥其负调节信号的作用。我们当前的研究为解释 DST 不能诱导异种移植的免疫耐受^[13]提供了有力的证据。在此我们首次提出 DST 诱导免疫耐受的新机制:CD47-SIRP α 引发负性调节信号,负反馈调控 DC 的成熟和活化,抑制其抗原呈递作用,诱导特异性 T 细胞耐受,进而延长小鼠皮肤移植存活时间。在此基础上,我们的后续研究拟进一步提取和纯化供体小鼠 CD47-Fc 融合蛋白,力图通过在行 DST 的同时将供体小鼠 CD47-Fc 融合蛋白一起输入受体体内,加强供体来源的 CD47 与受体树突状细胞上的 SIRP α 结合,其特异性抑制受体树突状细胞成熟和 T 细胞的增殖活化的负性调节作用将更为明显,由此引起的供体特异性免疫耐受作用也更强。可能为诱导移植免疫耐受开辟新途径。

参考文献:

- [1] Wang H, Madariaga ML, Wang S, et al. Lack of CD47 on nonhematopoietic cells induces split macrophage tolerance to CD47null cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(8): 13744-13749.
- [2] Pearl JP, Xu H, Leopardi F, et al. CD154 blockade, sirolimus, and donor-specific transfusion prevents renal allograft rejection in cynomolgus monkeys despite homeostatic T-cell activation [J]. Transplantation, 2007, 83(9): 1219-1225.
- [3] Pirenne J, Kawai M. Tolerogenic protocol for intestinal transplantation [J]. Transplant Proc, 2006, 38(6): 1664-1667.
- [4] Iwakoshi NN, Mordes JP, Markees TG, et al. Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8⁺ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner [J]. J Immunol, 2000, 164(1): 512-521.
- [5] Takeuchi T, Lowry RP, Konieczny B. Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance [J]. Transplantation, 1992, 53(6): 1281-1294.
- [6] Vignes C, Chiffolleau E, Douillard P, et al. Anti-TCR-specific DNA vaccination demonstrates a role for a CD8⁺ T cell clone in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion [J]. J Immunol, 2000, 165(1): 96-101.
- [7] Liang J, Yamaguchi Y, Matsuda T, et al. Post-transplant infusion of donor-specific blood induces immunological unresponsiveness in rat hepatic allografts [J]. Transplantation, 2000, 70(9): 1363-1371.
- [8] Hayashi Y, Yamazaki S, Kanamoto A, et al. Splenocytes can replace chimeric cells and maintain allograft tolerance [J]. Transplantation, 2007, 84(9): 1168-1173.
- [9] Masroor S, Itescu S, Artrip JH, et al. Induction of tolerance in rodent cardiac allotransplantation using an MHC class I-derived peptide and cyclosporin A [J]. Ann Thorac Surg, 1998, 65(1): 144-148.
- [10] Koji K, Xueli Y, Hugh A, et al. Mechanism of Action of Donor-Specific Transfusion in Inducing Tolerance: Role of Donor MHC Molecules, Donor Co-stimulatory Molecules, and Indirect Antigen Presentation [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(9): 2423-2428.
- [11] Ide K, Wang H, Liu J, et al. Role for CD47-SIRP α signaling in xenograft rejection by macrophages [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(12): 5062-5066.
- [12] Takenaka K, Prasolava TK, Wang JCY, et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells [J]. Nat Immunol, 2007, 8(12): 1313-1323.
- [13] Yang YG, Sykes M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future [J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(7): 519-531.

(编辑 王晓鹰)