中国科学 C辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 11 期: 1028 ~ 1033
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

论 文

妊娠对于父源性皮肤移植存活时间的影响

寿张飞[①②③], 徐毅芳[②], 肖华婴[②], 周芹[②], 蔡洁茹[②], 杨毅[①], 姜虹[②], 张文杰[③], 陈江华[①②]

① 浙江大学医学院附属第一医院肾脏病中心, 杭州 310003;
② 浙江大学医学院附属第一医院, 卫生部多器官联合移植重点实验室, 杭州 310003;
③ 石河子大学教育部新疆地方病与少数民族高发病重点实验室, 石河子 832003
E-mail: zfshou@zju.edu.cn

收稿日期: 2009-06-23; 接受日期: 2009-07-04
国家自然科学基金(批准号: NSFC30471641 和 NSFC30872389)和浙江省自然科学基金(批准号: Y207088)资助项目

摘要 母胎耐受机制的阐明, 将为器官移植免疫耐受方案的研究提供重要启示. 本研究旨在阐明妊娠状态对父系来源移植皮片的存活是否有保护作用. 2 月龄雌性C57BL/6小鼠和 2~4 月龄BALB/c雄性小鼠同笼受孕. 采用流式细胞技术确定妊娠过程中调节性T细胞(Treg)比例的时间变化规律. 以单向混合淋巴细胞反应(MLR)手段比较研究妊娠对于父系来源脾细胞刺激后产生的增殖反应的影响. 通过同种异体小鼠全厚皮片移植模型, 观察妊娠对于父系来源移植皮片的存活是否具有保护作用. 并用分子生物学技术研究此种效能的可能机制. 结果显示, C57BL/6 小鼠妊娠过程中, Treg占$CD4^+$T细胞的比例从妊娠前的 4.2%逐渐上升, 受孕 8 天左右达到高峰值(6.8%), 此后开始下降并逐渐回复至基线水平. MLR结果表明, 针对父系来源脾细胞的刺激, 妊娠组较对照组呈现显著的低反应性, 其平均刺激指数分别是 7.8 和 13.6(P<0.05). 定量PCR研究表明, 血红素加氧酶-1 和吲哚胺 2,3 双加氧酶mRNA在胎盘高表达, 在脾脏低表达(P<0.05). 父系来源的移植皮片的平均存活时间在妊娠组和非妊娠组分别是 7.67 和 7.08 天, 无统计学差异(P>0.05). 由此认为, 在小鼠妊娠过程中, 尽管出现了具有免疫抑制功能的Treg的比例增加, 尽管有针对父系来源刺激细胞的较低的MLR反应性, 但是单次妊娠对于父系来源的移植皮片的存活, 在本研究条件下, 未能显示具有统计学意义的保护作用.

关键词
调节性 T 细胞
妊娠
母胎耐受
移植耐受
存活时间
混合淋巴细胞反应
父源性皮肤移植
小鼠

器官移植是终末期器官功能衰竭患者最佳选者之一, 但排斥反应是移植成功的巨大障碍. 免疫抑制剂可以有效防治排斥反应, 但这些药物不仅昂贵, 而且总是伴随着多种严重的并发症. 为此, 人们在不断地探索免疫抑制作用更强、副作用更小的新型对策[1].

早在 20 世纪 50 年代, 移植鼻祖Medawar先生就提出了胎儿妊娠在母体内的过程和器官移植在本质上的相似性[2], 近年来的多个研究结果也支持这个论点[3~5]. 尽管母胎耐受的确切机制尚未被完全阐明, 但这个领域的研究肯定会给移植免疫耐受带来重要的启示.

关于母胎耐受的机制, 早期的研究主要关注局部的因素, 如所谓的解剖屏障、非经典型人类白细胞抗原, 如HLA-G, HLA-E在局部的高表达, 母胎耐受分子血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)和吲

引用格式: 寿张飞, 徐毅芳, 肖华婴, 等. 妊娠对于父源性皮肤移植存活时间的影响. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39: 1028—1033

哚胺 2,3 双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)在胎盘以及胎儿的高表达等[6]. 但是, 这些因素并不能解释所有的现象. 最近, 系统因素的重要性日益受到重视. 以动物[7]和人类[8]为对象的研究都表明, 妊娠期间, 调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)无论是绝对值还是其占$CD4^+$ T细胞的百分比都显著上升. Zenclussen教授实验室[9~13]的系列研究发现, Treg在母胎耐受中起着关键的作用, 而且这种对于胎儿的保护作用呈现父系抗原特异性.

Treg能够有效阻止辅助性T细胞以及细胞毒T细胞的活化和扩增, 后两者则是器官移植后排斥反应的重要始动者和效应者[14]. 既然妊娠过程伴随着Treg的绝对数量和相对比例系统性的增加, 而Treg又具有显著的免疫抑制效能, 那么, 妊娠过程是否会对移植产生一定的保护作用呢? 本研究通过妊娠期小鼠皮肤移植模型, 探讨了这种假设.

1 材料与方法

1.1 试剂

TRIzol 和 SYBR green real-time PCR 试剂盒购自上海英俊公司; QIAGEN 小规模质粒抽提试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; MMLV 逆转录 PCR 试剂盒购自 Promega 公司; RPMI-1640 细胞培养基、DMEM 细胞培养基以及 HEPES 购自 Gibco 公司. 流式细胞荧光标记用 FITC-CD4 和 PE-Foxp3 小鼠抗体是德国美天妮公司的产品. 细胞增殖实验用 MTT 购于 Sigma 公司.

1.2 实验动物

重约 18~23 g 的雄性 BALB/c 以及雌性 C57BL/6 小鼠购自上海 SLAC 实验动物中心. 小鼠饲养在标准鼠笼中, 12 h 白昼/12 h 黑夜间隔, 定期供应饲料, 自由饮水. 2 月龄雌性 C57BL/6 小鼠和 2~4 月龄 BALB/c 雄性小鼠同笼交配, 每天两次检查阴道栓的形成, 一旦查实有阴道栓的出现, 便将雌雄鼠分笼. 这天定义为受孕 0 天(E0). 所有的动物实验都严格遵循浙江大学和石河子大学有关实验动物的操作规范条例.

1.3 标本收集和处理

妊娠前、妊娠后 0, 4, 8, 12, 16, 20 天(即从 E0~E20)以及分娩后 7 天, 这 8 个时间点, 分别随机选取 3~5 只小鼠处死(n=3~5/每时间点). 妊娠 14 天(E14)的小鼠也同法处死, 脾脏和胎盘组织或迅速液氮冻存以备后续分子生物学研究, 或即刻处理后行流式细胞学分析(flow cytometry, FCM)和混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR).

1.4 流式细胞法确定妊娠过程中 Treg 变化规律

常规处理脾脏组织, 制备单细胞悬液供流式细胞分析用. 荧光抗体如下: FITC-CD4 大鼠抗小鼠抗体, PE-Foxp3 抗小鼠抗体. 结果分析使用软件 CXP 2.0(042111).

1.5 单向混合淋巴细胞反应

采用MTT法[15]确定细胞增殖变化. 实验选用脾单细胞悬液. 在U形底 96 孔微滴度板中, 经丝裂霉素C(25 μg/mL, Amresco)处理后的取自雄性BALB/c小鼠的 2×10^5个/孔脾细胞(刺激细胞), 和 2×10^5个/孔反应细胞在 0.2 mL; RPMI-1640 完全培养基中共培养 72 h. 实验组和对照组的反应细胞分别来自E14 C57BL/6 雌性小鼠和同月龄未妊娠C57BL/6 雌性小鼠的脾脏. 相应的单独反应细胞和经过丝裂霉素C处理的单独刺激细胞也包含在反应板中以检测本底水平. 在 570 nm波段下读取吸光度(Bio-Rad, Tokyo, Japan), 结果以刺激指数(SI)表示: $SI=(A_{实验组}-A_{刺激细胞})/A_{反应细胞}$.

1.6 PCR 和实时定量 PCR 检测

妊娠 14 天的雌性 C57BL/6 小鼠脾脏和胎盘组织被用来作 PCR 和实时定量 PCR 检测. 总 RAN 用 Trizol 试剂盒提取, 后用 MMLV 逆转录. 管家基因 *GAPDH* 被用作内参照. PCR 和实时定量 PCR 检测通用引物如下: GAPDH-F, 5′-ACCCAGAAGACTGTG-GATGG-3′, GAPDH-R, 5′-CACATTGGGGGTAGGA A-CAC-3′; HO1-F, 5′-AGA-GAAGGCTTTAAGCTGGT-GAT-3′, HO1-R, 5′-GGAAGTAGAGTGGGGCA-TA-GA-CT-3′; IDO-F, 5′-AGCTTCGAGAAGTTGAAAA GC-3′, IDO-R, 5′-ATTCCCAGAAGGACATCAAGAC-TC-3′. PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳观察. 实时定量 PCR 则使用 Stratagene Mx3000P QPCR System 进行. 管家基因 GAPDH 仍被用作内参照. 反应参数如下: 1 个循环的 95℃10 min; 40 循环 95℃ 15 s 以及 60 ℃ 1 min. 目的基因的表达通过内参照 GA-

PDH得以标准化, 数据分析则由基于 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法[16]的仪器自带软件Stratagene MxPro QPCR完成. 以同样方法和条件先后进行 3 次独立检测.

1.7 皮肤移植

皮肤移植方法参考相关文献[17]. 简述如下: 取雄性BALB/c小鼠尾部 0.6 cm×0.6 cm全厚皮片一块, 移植至妊娠 6 天(E6)C57BL/6 小鼠喉部侧方相应大小的移植床(实验组, n=12); 另一组移植受者为同月龄未妊娠C57BL/6 小鼠(对照组, n=12). 移植后局部涂以凡士林, 再用无菌绑带以不影响小鼠呼吸的松紧度包扎固定, 4 天后取除绑带, 此后每天检查观察移植皮肤存活情况, 如果大于 80%的移植区域皮肤疤痕形成或者皱缩, 则判定为排斥反应发生.

1.8 数据统计分析

数据趋于正态分布, 用平均数±标准差表示. 组间差异通过 t 检验完成. 移植皮肤存活时间资料则用SPSS13.0 中的 Kaplan-Meier 进行. P<0.05 被定义为有统计学意义.

2 结果

2.1 C57BL/6 小鼠妊娠期 Treg 动力学变化规律

通过流式细胞技术, 获得了C57BL/6 小鼠妊娠期Treg比例的时间变化规律, 包括妊娠前和分娩后各一个时间点(图 1). 妊娠前, Treg 占 $CD4^+$ T 细胞($Treg/CD4^+$)约为 4.2%, 尽管数值没有达到统计学显著性差异, 妊娠当天(E0)就可见到此比例的上升. 此后, $Treg/CD4^+$继续升高, 妊娠后 4, 8, 12 和 16 天, 此值分别是 5.8%, 6.8%, 6.5%和 5.6%. 妊娠的后期, $Treg/CD4^+$逐渐下降, 如临近分娩的E20, 此值为 5%. 分娩后一周左右, $Treg/CD4^+$比例恢复到基线水平.

2.2 妊娠状态对于单向混合淋巴细胞反应的影响

如图 2 所示, 妊娠组和对照组的平均刺激指数 SI 分别是 7.8 和 13.6, 差异具有统计学显著意义(P<0.05).

2.3 机体 HO-1 和 IDO 在系统和局部的表达情况

应用 PCR 和实时定量 PCR 方法, 比较了妊娠 14 天 C57BL/6 小鼠 HO-1 和 IDO 在系统和局部的表达情况, 脾脏和胎盘组织分别代表系统和局部. 如图 3 所示, 定量 PCR 结果和常规 PCR 结果很吻合, 在胎盘和脾脏, HO-1 的相对表达值分别是 2.2 和 1.5(P<0.05); 类似地, IDO 的相应数据分别是 0.9 和 0.55(P<0.05), 差异显著.

2.4 妊娠对于父源性皮肤移植存活的影响

父源性皮肤移植存活时间在妊娠状态的 C57BL/6 小鼠受者和同月龄未妊娠 C57BL/6 对照小鼠受者分别是和(7.67±0.89)和(7.08±1.08)天, 差异不显著(P>0.05). 相应的存活时间曲线见图 4.

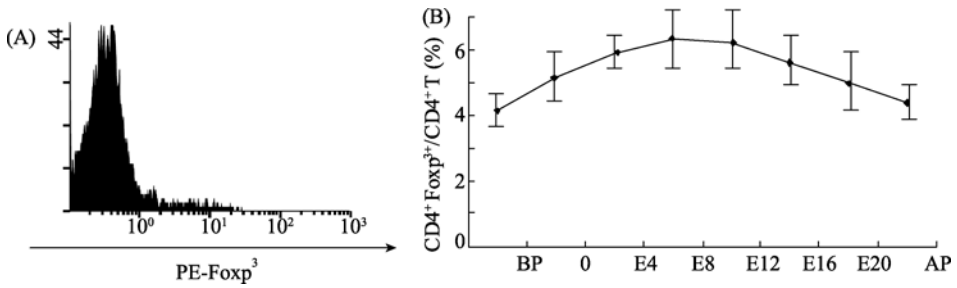


图 1 C57BL/6 小鼠妊娠期间调节性 T 细胞比例时间变化规律

(A) 小鼠脾细胞以PE-Foxp3 抗体标记后的代表性流式细胞检测图; (B) 妊娠期间调节性T细胞占$CD4^+$ T细胞总数比例的时间变化规律

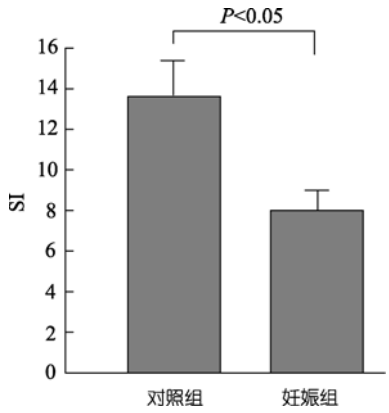


图 2 妊娠对单向混合淋巴细胞反应的影响

3 讨论

尽管已经有不少文献报道了小鼠和人类妊娠期间Treg变化现象[7,8]，要研究妊娠对于父源性皮肤移植的影响，如果缺少了对于Treg变化的观察，都是不完善的. 所以，本研究从妊娠过程中Treg占$CD4^+$ T细胞的比例变化开始. 正如预期，本实验结果和以往的报道非常吻合.

最近，Robertson等人[18]发现，Treg的比例上升变化在妊娠的极早期就出现了. 他们发现，在交配小鼠射精后即刻的阴道黏膜内即可检测到父源性抗原和父源性抗原提呈细胞(APC)，由此推测，对于父源性抗原的提呈可以早至交配射精时. 因此，本实验时间点的选取也包含了妊娠当天(E0). 实验结果也表明，妊娠当天就有Treg比例的提升趋势. 但这种极早期的Treg变化现象后面的确切机制有待于进一步探索.

Treg占$CD4^+$ T细胞的比例从C57BL/6 小鼠妊娠早期即出现上升，同时，单向混合淋巴细胞反应也表明妊娠状态对于父源性抗原的刺激呈现明显的抑制作用. 但是，目前的实验尚不能建立此间的因果关系. 若要确定是否是Treg/$CD4^+$ T比例的上升导致了妊娠状态下低MLR反应，则必须研究将妊娠状态下升高了的Treg/$CD4^+$ T比例干预至正常甚至进一步下降后，MLR反应会发生什么样的变化. 然而，考虑到很多文献[11~13]证实了Treg的强大免疫抑制活性，因此有理由推测是Treg的比例上升导致了MLR的反应低下.

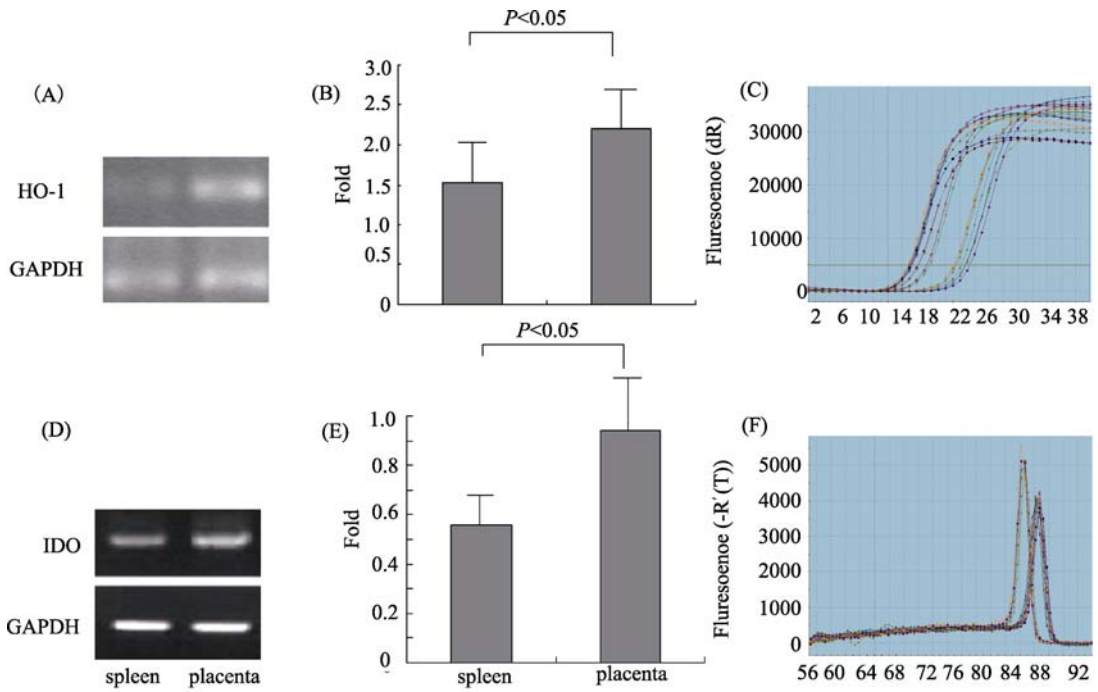


图 3 系统(脾脏)和局部(胎盘)HO-1 和 IDO 表达比较

(A) HO-1 常规 PCR; (B) HO-1 实时定量 PCR; (C) 实时定量 PCR 扩增曲线; (D) IDO 常规 PCR; (E) IDO 实时定量 PCR; (F) 实时定量 PCR 熔解解曲线. 使用标本源自妊娠 14 天(E14)C57BL/6 小鼠的相应组织, 3 次独立实验，每次实验使用 5 只小鼠

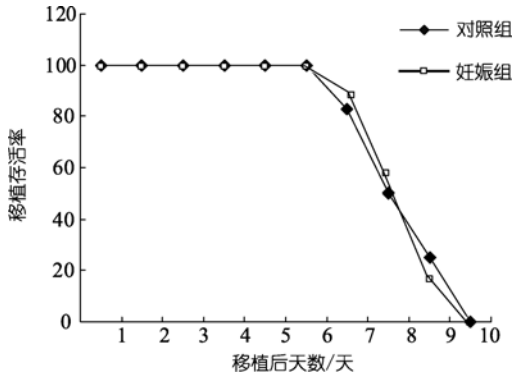


图 4　妊娠对父源性皮肤移植存活的影响

尽管C57BL/6 小鼠妊娠过程伴随Treg/CD4$^+$T比例的上升, 尽管C57BL/6妊娠小鼠来源的脾细胞对于父源性抗原的刺激呈现出了显著的低反应性, 但本研究最关键实验未能显示妊娠状态对于父源性的皮肤移植具有明确的保护作用. 分析可能与以下因素有关: (1) 尽管C57BL/6 小鼠妊娠过程伴随Treg/CD4$^+$T比例的上升是一个系统的全身性的变化, 但是母胎耐受的关键机制可能还是依赖于局部的重要因子, 如HO-1, IDO和TGF-β1[11]. 脾脏(代表系统性因素)和胎盘(代表局部性因素)中HO-1 和IDO表达的比较研究结果也支持这一解释; (2) 尽管妊娠小鼠中Treg在母体接触父源性抗原的即刻起就有比例的上升, 同时Treg的效能呈现抗原特异性, 但这种抑制性保护作用的强度可能有赖于抗原刺激的次数. Smith和Powell[19]的早期研究发现, 多次妊娠能够对父源性的皮肤移植起保护作用. 本实验室已开始探究相同交配对象在不同妊娠次数下对于父源性皮肤移植保护作用的影响; (3) 在移植模型中, 相同供-受体的配对情况下, 移植后免疫反应由弱到强的次序是肝脏、肾脏、胰腺、心脏、肺、肠和皮肤[20]. 可见, 所有移植模型中, 皮肤移植虽然在方法学上似乎最简单, 但将产生最强烈的排斥反应. 妊娠可能产生的一定的保护作用可能被强烈的排斥反应所掩盖. 本实验室计划也用其他的移植模型来探讨妊娠状态可能产生的保护作用; (4) 移植最佳时间点的选择还有待探讨. 本研究, 选择在妊娠后第 6 天, 这是权衡移植手术对于母胎安全的结果. 本实验结果表明, Treg比例上升的高峰在妊娠后的 8 天左右而非 6 天左右, 单纯从免疫学的角度考虑, 也许选择妊娠后第 8 天就能显示出明确的保护作用, 但那时造成妊娠小鼠流产的可能性也会更大, 因此最佳时间点的选择还有待进一步摸索, 相应的实验正在进行中.

4　结论

尽管C57BL/6 小鼠妊娠过程伴随Treg/CD4$^+$ T比例的上升, 尽管C57BL/6妊娠小鼠来源的脾细胞对于父源性抗原的刺激呈现出了显著的低反应性, 但单次妊娠, 在现有实验条件下对父源性皮肤移植之存活无明确保护作用.

致谢　感谢传染病诊治国家重点实验室的姚航平教授给与的帮助.

参考文献

1　Shou Z, Xiao H, Xu Y, et al. *SHARP*-2 gene silence by lentiviral-based short hairpin RNA interference prolonged rat kidney transplant recipients survival time. J Int Med Res, 2009, 37: 766—778
2　Billingham R E, Brent L, Medawar P B. Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature, 1953, 172: 603—606[DOI]
3　Guleria I, Sayegh M H. Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance. J Immunol, 2007, 178: 3345—3351
4　Platt J L. New concepts in alloimmune recognition. Cell Immunol, 2007, 248: 1—3
5　Riley J K. Trophoblast immune receptors in maternal-fetal tolerance. Immunol Invest, 2008, 37: 395—426[DOI]
6　Markert U R, Fitzgerald J S, Seyfarth L, et al. Lessons from reproductive immunology for other fields of immunology and clinical approaches. Chem Immunol Allergy, 2005, 89: 169—179[DOI]
7　Aluvihare V, Kallikourdis M, Betz A. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nat Immunol, 2004, 3: 266—271[DOI]
8　Somerset D A, Zheng Y, Kilby M D, et al. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive

$CD25^+CD4^+$ regulatory T-cell subset. Immunology, 2004, 112: 38—43[DOI]

9 Thuere C, Zenclussen M L, Schumacher A, et al. Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy. Am J Reprod Immunol, 2007, 58: 514—523[DOI]

10 Schumacher A, Wafula P O, Bertoja A Z, et al. Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. Obstet Gynecol, 2007, 110: 1137—1145

11 Zenclussen A C. Regulatory T cells in pregnancy. Springer Semin Immunopathol, 2006, 28: 31—39[DOI]

12 Zenclussen A C, Gerlof K, Zenclussen M L, et al. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. Eur J Immunol, 2006, 36: 82—94[DOI]

13 Zenclussen A C, Gerlof K, Zenclussen M L, et al. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy induced $CD4^+CD25^+$ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. Am J Pathol, 2005, 166: 811—822

14 Waldmann H, Chen T C, Graca L, et al. Regulatory T cells in transplantation. Semin Immunol, 2006, 18: 111—119[DOI]

15 Bishara A, Kedar E, Leshem B, et al. A short human and mouse MLR assay utilizing lymphokine(IL-2, IL-3) secretion as an early activation event. Transplantation, 1991, 51: 1104—1109

16 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods, 2001, 25: 402—408[DOI]

17 Endo S, Sakamoto Y, Kobayashi E, et al. Regulation of cytotoxic T lymphocyte triggering by PIR-B on dendritic cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 14515—14520[DOI]

18 Robertson S A, Guerin L R, Bromfield J J. Male seminal constituents activate expansion of the T regulatory cell pool in early pregnancy. J Reprod Immunol, 2006, 71: 150 (Abstract)[DOI]

19 Smith R N, Powell A E. The adoptive transfer of pregnancy-induced unresponsiveness to male skin grafts with thymus-dependent cells. J Exp Med, 1977, 146: 899—904[DOI]

20 Monk N J, Hargreaves R E, Simpson E, et al. Transplant tolerance: models, concepts and facts. J Mol Med, 2006, 84: 295—304[DOI]