

• 论 著 •

髓源树突状细胞对Ⅱ型胶原诱导关节炎小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的影响*

龚艳杰, 魏 明[△]

郑州大学第五附属医院输血科, 河南郑州 450052

摘要:目的 研究髓源树突状细胞(BMDCs)对Ⅱ型胶原诱导关节炎(CIA)小鼠 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg 细胞)的影响及作用机制。方法 从 40 只雄性 BALB/c 小鼠中,随机选择 10 只颈椎脱臼法处死,收集来自骨髓的单核细胞,用白细胞介素(IL)-4、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)及脂多糖(LPS)分别诱导使其成为未成熟树突状细胞(imDC)及成熟树突状细胞(mDC),同时应用流式细胞术对细胞表型进行分析,采用免疫印迹法(Western blotting)检测共刺激分子 CD80、CD86 和主要组织相容性复合体(MHCⅡ)蛋白表达。另取上述小鼠 30 只,采用Ⅱ型胶原免疫,建立类风湿关节炎(RA)小鼠模型。在免疫之后第 6 天,按照随机数字表法把小鼠分为空白对照组(10 只)、imDC 组(10 只)和 mDC 组(10 只),分别沿小鼠尾静脉注射磷酸盐缓冲液(PBS)、imDC 和 mDC;于免疫之后第 7 天对 3 组小鼠进行免疫强化操作,于免疫强化之后第 21 天检测 3 组小鼠的关节变形情况,并测定关节炎指数(AI)评分;酶联免疫吸附试验(ELISA)及 Western blotting 测定小鼠血清转化生长因子(TGF)- β 和 IL-10 的表达,流式细胞术检测小鼠脾脏组织 Treg 细胞比例。结果 髓源单核细胞经 IL-4+GM-CSF 诱导后,其共刺激分子 CD80、CD86、MHC-Ⅱ表达率分别为 36.80% $\pm$ 5.86%、32.80% $\pm$ 6.42%、56.80% $\pm$ 5.36%,即为 imDC;经 IL-4+GM-CSF+LPS 诱导后,其共刺激分子 CD80、CD86、MHC-Ⅱ表达率分别为 90.03% $\pm$ 7.38%、89.87% $\pm$ 7.10%、93.03% $\pm$ 7.76%,即为 mDC;结果表明,树突状细胞(DC)成功诱导分化为 imDC 和 mDC。强化免疫后第 21 天,imDC 组 AI 评分[(7.28 $\pm$ 1.45)分]显著高于 mDC 组[(13.78 $\pm$ 2.14)分]和空白对照组 AI 评分[(12.31 $\pm$ 1.83)分],差异有统计学意义($P<0.05$);imDC 组血清 IL-10 和 TGF- β [(11.32 $\pm$ 2.17)pg/mL 和 (27.15 $\pm$ 4.71)pg/mL]显著高于 mDC 组[(5.47 $\pm$ 1.83)pg/mL 和 (11.64 $\pm$ 2.67)pg/mL]及空白对照组[(4.96 $\pm$ 1.79)pg/mL 和 (12.06 $\pm$ 2.25)pg/mL],差异均有统计学意义($P<0.05$);imDC 组脾脏 Treg 细胞比例(4.62% $\pm$ 1.03%)显著高于 mDC 组(3.05% $\pm$ 0.87%)和空白对照组(3.03% $\pm$ 0.91%),差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 髓源 imDC 可缓解 CIA 小鼠的病情,促进抗炎细胞因子 IL-10 和 TGF- β 表达,加快 Treg 细胞增殖,从而导致免疫耐受。

关键词: 类风湿关节炎; 胶原诱导; 树突状细胞; 调节性 T 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.09.013

中图法分类号:R446.61;R593.22

文章编号:1673-4130(2023)09-1085-06

文献标志码:A

Effects of bone marrow derived dendritic cells on CD4⁺CD25⁺Treg cells in type Ⅱ collagen-induced arthritis mice*

GONG Yanjie, WEI Ming[△]

Department of Clinical Laboratory, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China

Abstract: Objective To investigate the effects of bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) on CD4⁺CD25⁺Treg cells in type Ⅱ collagen-induced arthritis (CIA) mice and its mechanism. **Methods** From 40 male BALB/c mice, 10 were randomly selected to be sacrificed by cervical dislocation method, and murine marrow-derived monocytes were isolated and collected. Immature dendritic cells (imDCs) and mature dendritic cells (mDC) were induced by interleukin (IL)-4, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and lipopolysaccharide (LPS), and their cell phenotypes were confirmed with flow cytometry. The expressions of costimulatory molecules CD80, CD86 and MHCⅡ were detected by Western blotting. Another 30 mice were selected and immunized with type Ⅱ collagen to establish rheumatoid arthritis (RA) mice models. On day 6 after first immunization, mice were divided into blank control group ($n=10$), imDC group ($n=10$) and mDC

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20190429)。

作者简介:龚艳杰,女,主管技师,主要从事自身免疫性疾病研究。 [△] 通信作者, E-mail: gushiweiming@126.com。

group ($n=10$) according to random number table method. Phosphate buffer solution (PBS), imDC and mDC were injected through the caudal vein respectively. On day 7 after immunization, the three groups of mice were subjected to immunization enhancement. The joint deformation of the three groups of mice was observed on day 21 after immunization enhancement, and the arthritis index (AI) was determined. The expressions of serum TGF- β and IL-10 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blotting, while the proportion of Treg cells was determined by flow cytometry. **Results** After induction by IL-4 + GM-CSF, the expression rates of CD80, CD86 and MHC-II of were $36.80\% \pm 5.86\%$, $32.80\% \pm 6.42\%$ and $56.80\% \pm 5.36\%$ respectively, which were imDCs. After induction by IL-4 + GM-CSF + LPS, the expression rates of CD80, CD86 and MHC-II were $90.03\% \pm 7.38\%$, $89.87\% \pm 7.10\%$ and $93.03\% \pm 7.76\%$ respectively, which were mDCs. The results showed that DCs was successfully induced into imDCs and mDCs. On day 21 after immunization, AI score of imDC group [(7.28 ± 1.45) points] was significantly higher than that of mDC group [(13.78 ± 2.14) points] and blank control group [(12.31 ± 1.83) points], and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Serum IL-10 and TGF- β [(11.32 ± 2.17) pg/mL and (27.15 ± 4.71) pg/mL] in imDC group were significantly higher than those in mDC group [(5.47 ± 1.83) pg/mL and (11.64 ± 2.67) pg/mL] and blank control group [(4.96 ± 1.79) pg/mL and (12.06 ± 2.25) pg/mL], and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The proportion of spleen Treg cells in imDC group ($4.62\% \pm 1.03\%$) was significantly higher than that in mDC group ($3.05\% \pm 0.87\%$) and blank control group ($3.03\% \pm 0.91\%$), with statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** ImDC derived from bone marrow is likely to alleviate the disease in CIA mice, promote the expression of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β , and accelerate the proliferation of Treg cells, leading to immune tolerance.

Key words: rheumatoid arthritis; collagen-induced; dendritic cells; regulatory T cells

类风湿关节炎(RA)是一类较为多见的自身免疫性疾病,以滑膜、骨及软骨的进展性损伤为显著特点,最后能够使关节出现形状改变、硬化强直等现象,具有特别高的致残率^[1-2]。实验研究表明,包括淋巴细胞、滑膜细胞、树突状细胞(DC)等免疫细胞通过分泌各种细胞因子参与 RA 的发病^[3-4]。DC 是目前已知的作用最大的专职抗原提呈细胞(APC)之一,是固有免疫及获得性免疫之间的重要纽带,其在保持人体免疫耐受和免疫应答之间的平衡中发挥重要作用^[5-6]。有研究表明,当未成熟树突状细胞(imDC)低表达 CD80、CD86、主要组织相容性复合体(MHC II)等细胞因子时,能使特异性免疫应答的较低潜能活化^[7-9];也有研究表明,imDC 在克罗恩病、多发性硬化症等自身免疫性疾病的动物模型上能诱导幼稚 T 细胞(Tn)向调节性 T 细胞(Treg)分化,促进抗炎因子如白细胞介素(IL)-10、转化生长因子(TGF)- β 的表达,诱导免疫耐受,抑制炎症性病变^[10]。本实验通过制作 II 型胶原(CII)诱导关节炎(CIA)小鼠模型,利用 imDC 和成熟树突状细胞(mDC)对其进行干预操作,以探讨 imDC 对 CIA 的作用及其作用机制,为临床开展 RA 细胞治疗提供新的方案。

1 材料与方法

1.1 实验动物 40 只 6~8 周龄的雄性 BALB/c 小鼠饲养于郑州大学动物实验中心无特定病原体(SPF)环境中,自由进食及进水,试验操作中对动物的处理遵照动物伦理学的规则,动物许可证号:SYXK(豫)

2017-0028。其中 10 只小鼠用于获取骨髓源单核细胞,另外 30 只用于制作 CIA 动物模型。

1.2 仪器与试剂 CII、完全弗氏佐剂(CFA)、冰醋酸、脂多糖(LPS)购自美国 Sigma 公司,重组小鼠白细胞介素(rmIL)-4 和重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)购自美国 PeproTech 公司,三氢-吡啶菁型染料标记的抗鼠 CD11c 单抗(PE-Cy7-anti-CD11c)、藻蓝蛋白(PE)标记的抗小鼠 CD25 单抗、CD86 单抗(APC-anti-CD25、APC-anti-CD86)、藻红蛋白标记的抗小鼠 CD80 单抗(PE-anti-CD80)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 CD4 单抗以及 MHC II 单抗购自美国 BD 公司,抗 IL-10、抗-TGF- β 和抗 β -actin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,荧光标记山羊抗兔二抗及荧光标记大鼠抗山羊二抗购自英国 Abcam 公司,TGF- β 和 IL-10 ELISA 试剂盒购自德国 R&D 公司。FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司,倒置相差显微镜 IX71 型购自日本 Olympus 公司。

1.3 方法

1.3.1 小鼠 BMDCs 的分离^[11]及培养 取 10 只 BALB/c 小鼠,用颈椎脱臼的方法将其处死,分离小鼠的股骨以及胫骨,再使用 RPMI 1640 培养基洗涤 3 次,除去两边的骨髓,用 1 mL 的细空针吸取 RPMI 1640 培养基,多次洗涤骨髓空腔,同时使其完全分散开来,于 25℃ 下 2 000 r/min 离心 10 min,弃上层清液,收集骨髓单核细胞,按 1 : 1 的比例滴加红细胞

裂解液, 25 ℃ 放置 2 min, 待裂解结束, 1 500 r/min 离心 5 min, 除去上层清液, 用培养基重悬细胞, 使细胞浓度达到 1×10^6 /L, 以 4 毫升/孔的密度将其种于 6 孔板内, 每孔中加入含 GM-CSF (20 ng/mL) + IL-4 (10 ng/mL) 的 RPMI 1640 培养基 2 mL, 5% CO₂、37 ℃ 培养箱中孵育, 培养第 3 天用 6 孔板内的单孔悬浮培养液 2 mL, 加入全新的 6 孔板内再培养, 每孔再加入含 GM-CSF (20 ng/mL) 及 IL-4 (10 ng/mL) 的 RPMI 1640 培养基 2 mL, 5% CO₂、37 ℃ 培养箱中继续培养, 培养 7 d 时, 采集悬浮及半贴壁的细胞即为 imDC。同时设置同型对照组。采用相同培养方法, 培养第 6 天于 6 孔板中加入含 LPS (1 μg/mL) RPMI 1640 培养基 2 mL, 5% CO₂、37 ℃ 培养箱中培养 24 h, 收获的细胞即为 mDC。在光学显微镜下观察其形态同时采集照片。

1.3.2 小鼠 BMDCs 的电镜形态观察 取上述培养的 DC, 以 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上层清液, 用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次。用 50 μL PBS 重新悬浮细胞, 把细胞悬浮液滴在多聚赖氨酸包被的盖玻片上, 37 ℃ 的恒温电烤箱中加热 15 min, 然后待细胞自然沉于盖玻片上。细胞沉淀之后, 用冷的 PBS 缓慢漂洗 3 次, 再在 4 ℃ 下用冷的 pH 7.4、3% 戊二醛固定 1 h。再用 PBS 洗涤 3 次, 每次约 30 min, 用 1% 锇酸固定 1 h。PBS 漂洗 3 次, 然后使用不同浓度的乙醇慢慢逐步脱水, 置换、干燥镀膜。采用电子显微镜观察细胞形态并记录。

1.3.3 小鼠 BMDCs 的表型检测 取上述 imDC 和 mDC, 将细胞调整为 1×10^6 /mL, 在 100 μL 反应体系中分别加入 1 μL 的三氢-吡啶菁型染料标记的抗鼠 CD11c 单抗、0.3 μL 用 PE 标记的抗小鼠 CD80 单抗、0.6 μL 用 PE 标记的抗小鼠 CD25 单抗以及 CD86 单抗, 0.9 μL 用 FITC 标记的 MHC II 单抗, 4 ℃ 黑暗条件下反应 30 min, 用 PBS 漂洗 2 次, 除去尚未结合上的抗体, 滴加 4% 的多聚甲醛进行固定之后, 同时做空白对照, 采用流式细胞仪检测, 并用 FlowJo 软件进行结果分析。

1.3.4 小鼠 BMDCs 共刺激分子 CD80、CD86 和 MHC II 蛋白表达 用蛋白质裂解液提取蛋白, 测定蛋白质浓度 (Bradford 法)。将蛋白质样品进行 10% 的 SDS-PAGE 电泳, 把转移蛋白质于聚偏氟乙烯膜上。于 25 ℃ 下封闭 1 h, 加入兔抗人 CD80 多克隆抗体 (1 : 1 000) 以及兔抗人 CD86 多克隆抗体 (1 : 1 000), 25 ℃ 下培育 2 h, 同时用小鼠抗人 GAD-PH 单克隆抗体 (1 : 2 000) 作为内参照。洗涤之后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗 (1 : 2 000) 反应 1 h, 然后加 ECL 发光剂, 暗室 X 光胶片曝光, 在 10 ~ 20 min 内显影及定影。用 Quantity One 系统对目的条带的灰度值进行计算分析, 用目的

条带灰度和内参条带灰度比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.3.5 CIA 小鼠模型及实验分组 在 C II 中滴加 0.1 mol/L 的冰醋酸, 将其在 4 ℃ 条件下缓慢溶解, 得到 2 mg/mL 的溶液, 4 ℃ 冰箱静置一夜之后, 把 C II 溶液和 CFA 按照 1 : 1 的比例混匀即为乳化剂, 用 30 只小鼠对其进行首次免疫, 取 50 μL 的 C II 乳化剂在每只小鼠的尾根部和背部等部位进行皮下注射。首次免疫之后的第 6 天, 依照随机原则把小鼠分为 imDC 组 (10 只)、空白对照组 (10 只) 和 mDC 组 (10 只)。每组小鼠都从尾静脉注入相异的干预剂, 其中 imDC 组静注含有 1×10^6 个 imDC 的 PBS 100 μL, mDC 组静注含有 1×10^6 个 mDC 的 PBS 100 μL, 空白对照组静注 100 μL 的 PBS。首次免疫后 1 周时, 各组小鼠分别再进行 1 次免疫强化, 使用的药物及剂量与首次免疫相同。

1.4 观察指标

1.4.1 关节炎指数 (AI) 评分 测定在免疫强化的同一天对两组小鼠的 AI 评分进行测定, 之后每隔 7 d 测定 1 次, 一共测定 4 次 (用时 3 周), 检测方法采用 5 级评分法进行评估。0 级: 正常的关节; 1 级: 关节发红但是不肿; 2 级: 关节有轻微红肿; 3 级: 关节中等程度红肿; 4 级: 关节重度红肿同时伴有功能受限。AI 评分为每只小鼠四肢关节评分的汇总, 最高分为 16 分。各实验组所有小鼠关节炎的总得分除以该组小鼠的数量为该组小鼠的平均 AI 评分。

1.4.2 血清 IL-10 及 TGF-β 水平检测 于免疫强化之后第 21 天, 在各组小鼠眼眶上取血 1.0 mL, 以 2 000 r/min 离心 15 min, 收集上层清液, 遵照 ELISA 试剂盒的说明书测定小鼠血清 IL-10 及 TGF-β 水平。

1.4.3 流式细胞术测定 CD4⁺ 于强化免疫第 21 天处死 3 组小鼠, 取出脾脏, 在冰浴条件下分离脾细胞, 裂解红细胞, 用 PBS 洗涤 3 次, 用免疫磁珠试剂盒分选 CD4⁺ T 细胞, 使细胞的浓度变为 4×10^6 /100 μL, 接种至含 RPMI 1640 培养基的 24 孔培养板, 5% CO₂、37 ℃ 的培养箱中培育 48 h, 收集各组细胞, PBS 洗涤 3 次, 使细胞浓度达到 1×10^6 /mL, 用 FITC 标记的 CD4 单抗以及 PE 标记的抗小鼠 CD25 单抗, 4 ℃ 黑暗条件下反应 30 min, PBS 漂洗 2 次, 滴加 4% 的多聚甲醛固定, 同时做空白对照, 最后放于流式细胞仪进行测定。

1.4.4 免疫印迹法检测 检测小鼠脾脏组织 IL-10 和 TGF-β 蛋白表达在 4 ℃ 条件下 (冰水中) 将上述脾脏组织匀浆裂解, 提取蛋白。使用紫外分光光度计测量蛋白质浓度。蛋白质的单孔上样量为 25 μg。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电泳后, 将蛋白质转到 PVDF 膜上, 再使用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 将膜洗涤 3 次, 之后分别孵育羊抗

小鼠的抗 IL-10(1 : 100)、TGF-β(1 : 1 000)抗体及抗 β-actin(1 : 5 000)抗体,4 ℃放置一夜;用 TBST 将膜洗涤 3 次之后,再用 IL-10 及 TGF-β 孵育辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(1 : 5 000),反应 2 h 之后,用 TBST 将膜再洗涤 3 次。最后,Luminol Ecl Reagent 显影,并采用 Image J 软件对图像做灰度值扫描。

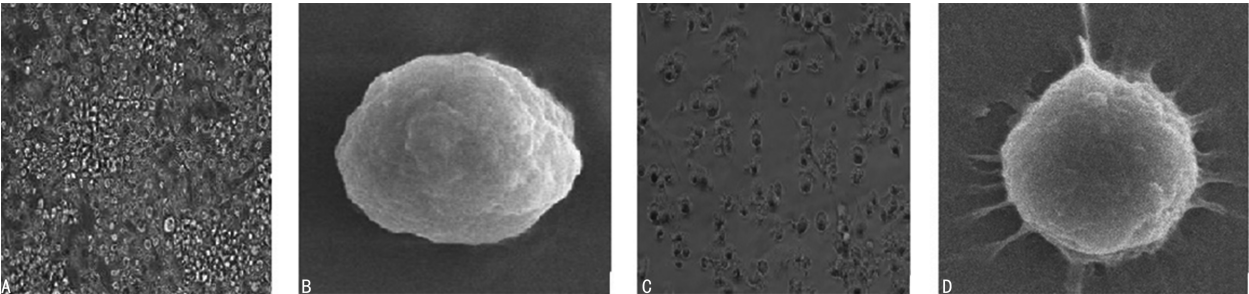
1.5 统计学处理 应用 SPSS20.0 版统计学软件分析数据,服从正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,组间进一步两两比较采用 LSD-*t* 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠 BMDCs 的体外培养形态变化 分离的小鼠骨髓细胞,经 GM-CSF 加 IL-4 诱导后培养的第 3 天,能够见到具有树突状突起的细胞,形态上体积小,比较圆润,贴壁生长,不牢固,同时也有集落样生长现象。培养第 5 天细胞的突起慢慢增加,细胞团也慢慢增加,细胞的形态体积逐渐变大,细胞膜上的树突状

突起变多,剧烈晃动时会从培养板上脱离,见图 1A、1B。骨髓细胞经 GM-CSF + IL-4 + LPS 诱导后第 8 天,悬浮细胞的形态逐渐变大,突起显著变多变长,细胞膜上也慢慢伸出显著的树突样结构,长短不均,集中生长,见图 1C、1D。

2.2 小鼠 BMDCs 细胞表型分析 髓源单核细胞经 IL-4 + GM-CSF 诱导后,其共刺激分子 CD80、CD86、MHC-II 表达率分别为 $36.80\% \pm 5.86\%$ 、 $32.80\% \pm 6.42\%$ 、 $56.80\% \pm 5.36\%$,即为 imDC;经 IL-4 + GM-CSF + LPS 诱导后,其共刺激分子 CD80、CD86、MHC-II 表达率分别为 $90.03\% \pm 7.38\%$ 、 $89.87\% \pm 7.10\%$ 、 $93.03\% \pm 7.76\%$,即为 mDC。与 imDC 组比较,mDC 组标志性分子 CD11c,以及共刺激分子 CD80、CD86 和 MHC II 表达率显著升高,差异均统计学意义($P < 0.05$)。结果表明 DC 成功诱导分化为 imDC 和 mDC。



注:A 为 imDC 第 5 天倒置显微镜下($\times 100$);B 为 imDC 第 5 天扫描电镜下($\times 3\ 000$);C 为 mDC 第 8 天倒置显微镜下($\times 100$);D 为 mDC 第 8 天扫描电镜下($\times 3\ 000$)。

图 1 小鼠 BMDCs 体外培养形态变化

2.3 小鼠 BMDCs CD80、CD86 和 MHC II 蛋白表达 与 imDC 组比较,mDC 组的 CD80、CD86 和 MHC II 蛋白表达明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);表明 imDC 受到刺激后,共刺激分子 CD80、CD86 和 MHC II 表达会明显上升,进一步证实 imDC 和 mDC 诱导分化成功。见图 2。

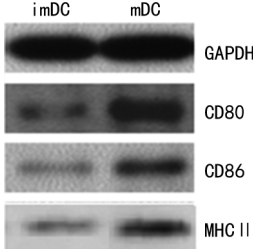


图 2 树突状细胞 CD80/CD86 和 MHC II 蛋白表达

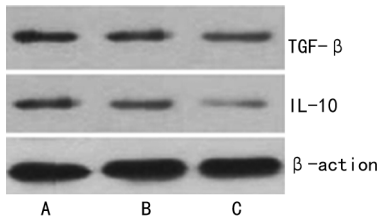
2.4 CIA 小鼠 AI 的变化 首次免疫之后,3 组小鼠的足部均有不同程度的轻微肿胀,但仅位于趾间关节,并没有畸形或者是强直现象。强化免疫之后第 1 天(首次免疫后第 7 天),imDC 组和空白对照组肿胀加重,累及踝关节,但部分小鼠症状开始逐步缓解。强化免疫后第 21 天,imDC 组 AI 评分[(7.28 ± 1.45)

分]显著高于 mDC 组[(13.78 ± 2.14)分]和空白对照组 AI 评分[(12.31 ± 1.83)分],差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 CIA 小鼠血清 IL-10 和 TGF-β 水平变化 强化免疫后第 21 天,imDC 组血清 IL-10 和 TGF-β [(11.32 ± 2.17)pg/mL 和 (27.15 ± 4.71)pg/mL]显著高于 mDC 组[(5.47 ± 1.83)pg/mL 和 (11.64 ± 2.67)pg/mL]及空白对照组[(4.96 ± 1.79)pg/mL 和 (12.06 ± 2.25)pg/mL],差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 CIA 小鼠脾脏 IL-10 和 TGF-β 蛋白表达 强化免疫后第 21 天,imDC 组 CIA 小鼠脾脏 IL-10 和 TGF-β 蛋白表达均明显高于 mDC 组和空白对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

2.7 CIA 小鼠脾脏 Treg 细胞变化 强化免疫后第 21 天,imDC 组脾脏 Treg 细胞比例($4.62\% \pm 1.03\%$)显著高于 mDC 组($3.05\% \pm 0.87\%$)和空白对照组($3.03\% \pm 0.91\%$),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A 为 imDC 组;B 为 mDC 组;C 为空白对照组。

图 3 小鼠脾脏 IL-10 和 TGF- β 蛋白表达

3 讨 论

RA 起病通常是由人体内免疫耐受被破坏、体液免疫亢进^[12]造成的。DC 作为机体内仅存的能够使初始 T 细胞发生免疫应答的抗原提呈细胞^[13],在 RA 的发生发展中起着关键的作用。有研究提出,imDC 在很大程度上能够诱导 Treg 细胞产生,同时使自身免疫性 T 淋巴细胞发挥清除作用来维持机体的免疫稳态^[14-16]。这为 RA 患者体内自身反应性 T 淋巴细胞的清扫,以及免疫耐受重建提供了新的治疗希望。但是对于机体内能够捕捉自身抗原的 DC 来说,使其处于 imDC 状态则能很大程度上控制 RA 的病情,甚至将其彻底治愈。

在众多的自身免疫性疾病的动物模型上,imDC 作为一种含有重大使用价值的细胞疗法,可以诱导机体产生免疫耐受,从而治疗炎性疾病。CIA 小鼠模型能够有效地仿照 RA 患者的病理生理特征及其免疫系统的微生态,是一种被大家所公认的 RA 动物模型,可用于 imDC 相关实验研究。本研究结果表明,小鼠髓源单核细胞被诱导分化成为 imDC 之后,能够使共刺激分子 CD80、CD86 和 MHC II 等细胞因子出现低表达现象,这类细胞的表型不具有强大的活化特异性免疫反应的功能,从而致使以 Th17 细胞为首的 T 淋巴细胞产生无效应答^[16]。在本研究中,CIA 小鼠经再次免疫强化之后,mDC 组及空白对照组小鼠的足部病理变化与 imDC 组相比较为严重,说明在同源的小鼠体内 imDC 的确可以在一定程度上缓解关节炎的进展,改善病情。有文献提出,imDC 进入体内之后可以增加抗炎细胞因子 IL-10 及 TGF- β 的表达,对炎症因子产生强烈的抑制效果,从而缓解组织处的病变^[18]。本研究结果表明,小鼠免疫强化之后的第 21 天,imDC 组 CIA 小鼠血清、脾脏的 IL-10 和 TGF- β 均显著高于 mDC 组和对照组,结果与上述文献报道一致。相关类型抗炎介质表达增加的过程中,有许多免疫学者认为是 imDC 激活 Treg 细胞群,激发了巨大的免疫耐受反应^[19]。Treg 细胞作为特异性免疫的负向调控因子,在炎症过程处于剧烈状态下或者有自身的组织细胞受到攻击时,能够由相关细胞因子刺激 Tn 的分化从而使其产生。有研究表明,imDC 在整个的变化过程中产生了相当关键的作用,被活化的 Treg 细胞能够产生大量的 IL-10 及 TGF- β ,从而达到免疫

耐受及抗炎的目的^[20]。本研究结果表明,小鼠强化免疫之后第 21 天,imDC 组小鼠脾脏 Treg 细胞比值与 mDC 组及空白对照组相比显著增高,这提示 imDC 诱导免疫耐受的途径可能是由于 Treg 细胞群受到某种因素的刺激进而获得增殖所致。

因此,imDC 能够诱导 Treg 细胞的产生及体内自身反应性 T 细胞的清除,目前这是 RA 研究的热点,至于怎样用最佳的药物保持递呈自身抗原 DC 在 imDC 状态当前尚未发现。但是,随着免疫学、分子生物学以及基因组学等先进性学科快速发展,以后的科研探究有望就如何调节 imDC 来重建自身免疫性疾病患者免疫耐受进行讨论,为 RA 的治疗乃至彻底治愈提供最佳的治疗策略。

参考文献

- [1] ALETAHA D,SMOLEN J S. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review[J]. JAMA, 2018, 320(13):1360-1372.
- [2] MABEY T, HONSAWEK S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis[J]. World J Orthop, 2015,6(1):95-105.
- [3] SUWANDI J S, TOES R E, NIKOLIC T, et al. Inducing tissue specific tolerance in autoimmune disease with tolerogenic dendritic cells[J]. Clin Exp Rheumatol, 2015, 33(4 Suppl 92):S97-S103.
- [4] 黄自坤,李雪,邓桢,等. 类风湿关节炎患者外周血 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞 TIGIT 的表达和意义[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2017, 37(5):325-330.
- [5] ROSENTHAL K S, MIKECZ K, STEINER H L, et al. Rheumatoidarthritis vaccine therapies: perspectives and lessons from therapeutic ligand epitope antigen presentation system vaccines for models of rheumatoid arthritis[J]. Expert Rev Vaccines, 2015, 14(6):891-908.
- [6] BEK S, BOJESEN A B, NIELSEN J V, et al. Systematic review and meta-analysis: pharmacogenetics of anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis[J]. Pharmacogenomics J, 2017, 17(5):403-411.
- [7] PEARCE E J, EVEN S B. Dendritic cell metabolism[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(1):18-29.
- [8] ZHAO Y, ZHANG A, DU H, et al. Tolerogenic dendritic cells and rheumatoid arthritis: current status and perspectives[J]. Rheumatol Int, 2012, 32(4):837-844.
- [9] 郑静娴,李洋. 抗原负载的致耐受树突状细胞治疗类风湿关节炎的机制研究进展及挑战[J]. 中华风湿病学杂志, 2016, 20(3):200-204.
- [10] DERKSEN V, HUIZINGA T W J, VAN DER WOUDE D. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis[J]. Semin Immunopathol, 2017, 39(4):437-446.
- [11] 李立强,焦尤杏,张武,等. 骨髓来源未成熟树突状细胞干预大鼠原位肝移植的排斥反应[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(3):2025-2029.

2020,14(2):94-99.

[5] SCHATTNER S, SCHATTNER J, MUNDER F, et al. A tug-of-war model explains the saltatory sperm cell movement in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes by kinesins with calponin homology domain[J]. *Front Plant Sci*, 2021,11:601282.

[6] NAKAMURA H, KUKITA Y, KUNIMASA K, et al. α -Methylacyl-CoA racemase; a useful immunohistochemical marker of breast carcinoma with apocrine differentiation[J]. *Hum Pathol*, 2021,116:39-48.

[7] 中华医学会内分泌学分会, 中华医学会外科学分会内分泌学组, 中国抗癌协会头颈肿瘤专业委员会等. 甲状腺结节和分化型甲状腺癌诊治指南[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2012,28(10):779-797.

[8] SAIDY B, KOTECHEA S, BUTLER A, et al. PP1, PKA and DARPP-32 in breast cancer: a retrospective assessment of protein and mRNA expression[J]. *J Cell Mol Med*, 2021,25(11):5015-5024.

[9] MELTZER D E, PARNES B, CHAI R. Papillary thyroid carcinoma metastasis to the pituitary: a case report[J]. *Clin Imaging*, 2021,74:41-44.

[10] 金海龙, 张毅, 潘炯. 淋巴结转移率与甲状腺乳头状癌患者术后复发及预后的相关性[J]. *中国综合临床*, 2019,35(1):14-17.

[11] NI Y B, TSANG J Y S, SHAO M M, et al. GATA-3 is superior to GCDFP15 and mammaglobin to identify primary and metastatic breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2018,169(1):25-32.

[12] 李文燕, 蒋小英, 熊令根. 增殖细胞核抗原、巨大囊肿病液体蛋白-15、雄激素受体在乳腺癌中的表达及其与临床病理参数的关系[J]. *中国民间疗法*, 2022,30(2):94-97.

[13] LAURENT E, BEGUERET H, BONHOMME B, et al. SOX10, GATA 3, GCDFP15, androgen receptor, and mammaglobin for the differential diagnosis between triple-negative breast cancer and TTF1-negative lung adenocarcinoma[J]. *Am J Surg Pathol*, 2019,43(3):293-302.

[14] PALANI S, GHOSH S, IVORRA-MOLLA E, et al. Calponin-homology domain mediated bending of membrane-associated actin filaments[J]. *Elife*, 2021,10:e61078.

[15] ONO S. Diversification of the calponin family proteins by gene amplification and repeat expansion of calponin-like motifs[J]. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2021,78(5):199-205.

[16] 李世玉, 张群霞, 王志刚, 等. 浸润性乳腺癌超声及造影表现与 P63 及 Calponin 的相关性[J]. *中国医学影像学杂志*, 2018,26(9):641-645.

[17] HARRIS A R, BELARDI B, JREIJ P, et al. Steric regulation of tandem calponin homology domain actin-binding affinity[J]. *Mol Biol Cell*, 2019,30(26):3112-3122.

[18] 简华勇, 李廷超. 老年乳腺癌组织中 HER-2、GCDFP15 及 Calponin 表达与术后复发转移的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2021,41(11):2301-2304.

(收稿日期:2022-06-22 修回日期:2022-12-09)

(上接第 1089 页)

[12] BURMESTER G R, FEIST E, DTIRNER T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014,10(2):77-88.

[13] WAISMAN A, LUKAS D, CLAUSEN B E, et al. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance[J]. *Semin Immunopathol*, 2017,39(2):153-163.

[14] GUO C, HU F, YI H, et al. Myeloid-derived suppressor cells have a proinflammatory role in the pathogenesis of autoimmune arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2016,75(1):278-285.

[15] ZHANG H, WANG S, HUANG Y, et al. Myeloid-derived suppressor cells are proinflammatory and regulate collagen-induced arthritis through manipulating Th17 cell differentiation[J]. *Clin Immunol*, 2015,157(2):175-186.

[16] SCHINNERLING K, SOTO L, GARCÍA-GONZÁLEZ P, et al. Skewing dendritic cell differentiation towards a tolerogenic state for recovery of tolerance in rheumatoid arthritis[J]. *Autoimmun Rev*, 2015,14(6):517-527.

[17] TORRES-AGUILAR H, AGUILAR-RUIZ S R, GONZÁLEZ-PÉREZ G, et al. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4⁺ T cells[J]. *J Immunol*, 2010,184(4):1765-1775.

[18] CHEN L, ZHENG L, HE W, et al. Cotransfection with IL-10 and TGF- β 1 into immature dendritic cells enhances immune tolerance in a rat liver transplantation model[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014,306(7):575-581.

[19] LEAVY O. Regulatory T cells: young AIREs go on to rule[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015,15(5):269.

[20] PARK M J, LEE S H, KIM E K, et al. Interleukin-10 produced by myeloid-derived suppressor cells is critical for the induction of Tregs and attenuation of rheumatoid inflammation in mice[J]. *Sci Rep*, 2018,8(1):3753.

(收稿日期:2022-07-28 修回日期:2022-12-21)