doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.08.016

胸腺内注射供体 BMSCs 对同种异体腹部皮瓣移植排斥的影响 *

张栋梁 宋雅娟 苏映军 陈建武 陈 晨 丁健科 刘 甜 郭树忠△

(第四军医大学西京医院整形外科研究所 陕西 西安 710032)

摘要 目的:将供体骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)胸腺内注射(intrathymic injection,IT)至受体胸腺,探讨其对同种异体腹部皮瓣移植排斥的影响及机制。**方法:**全骨髓贴壁培养法培养并纯化 BN 大鼠 BMSCs,流式细胞术对其表型进行鉴定。受体 Lewis 鼠随机分为 A 组(空白对照组)、B 组(BMSCs 组)、C 组(60Coγ 射线 4Gy 全身照射组)、D 组(全身照射+BMSCs 组),每组 6 只。各组大鼠第 0 天进行同种异体腹部皮瓣移植,A 组移植前 14 天 IT PBS,B 组移植前 14 天 IT 供体 BMSCs,C 组移植前 15 天给予 ^{60}Coγ 射线 4Gy 全身照射,移植前 14 天 IT PBS,D 组除移植前 15 天 4Gy 全身照射外,移植前 14 天 IT 供体 BMSCs。大体观察移植皮瓣存活情况并绘制生存曲线,排斥终点流式检测脾细胞调节性 T 细胞(Treg)比例变化,体外混合淋巴细胞反应检测受体脾淋巴细胞对供体抗原反应性变化。**结果:**全骨髓贴壁培养法能够很好培养出 BMSCs,其 P3 代流式细胞术表型鉴定结果为 CD11b/c、CD45 阴性,CD29、CD90 阳性。B 组的移植皮瓣存活时间与 A 组相比无明显差异(P＞0.05),而 D 组的移植皮瓣平均存活时间较 C 组延长 3.4 天,差异具有统计学意义(P＜0.01),脾细胞 Treg 比例显著增高(P＜0.01),脾淋巴细胞对供体抗原反应性显著降低(P＜0.05)。**结论:**IT 供体 BMSCs 联合 ^{60}Coγ 射线 4Gy 全身照射通过上调受体脾细胞 Treg 比例能有效降低受体脾淋巴细胞对供体抗原的反应性,显著延长同种异体腹部皮瓣移植物存活时间。

关键词:胸腺内注射;骨髓间充质干细胞;同种异体腹部皮瓣移植;免疫耐受

中图分类号:R622 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)08-1465-06

The Effects of Intrathymic Injection of Donor BMSCs on the Survival of Rat Groin Allograft*

ZHANG Dong-liang, SONG Ya-juan, SU Ying-jun, CHEN Jian-wu, CHEN Chen, DING Jian-ke, LIU Tian, GUO Shu-zhong△

(Institute of Plastic Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of intrathymic injection of donor BMSCs (bone marrow mesenchymal stem cells) on the survival of groin allograft in a rat model of groin allotransplantation and its mechanisms. **Methods:** The BN rat BMSCs were cultured and purified with the application of whole bone marrow adherent culture and the phenotypes were identified by flow cytometry. Twenty four recipient lewis rats were randomly divided into four groups, including group A (control group), group B (BMSCs group), group C (4 Gy ^{60}Coγ ray total-body irradiation) and group D (4 Gy total-body irradiation plus BMSCs). Every recipient rat accepted groin allotransplantation on day 0, group A IT (intrathymic injection) PBS on day-14, group B IT BMSCs on day -14, group C accepted 4 Gy 60Coγ ray total-body irradiation on day -15 and IT PBS on day -14. In addition to 4 Gy total-body irradiation, group D IT BMSCs on day -14. The mean survival time of groin allograft, change of Treg (regulatory T cells) ratio of spleen cells and MLR (mixed lymphocyte reaction) at the end of rejection were observed. **Results:** The whole bone marrow adherent culture could effectively culture BMSCs, and the P3 of BMSCs were negative for CD11b/c and CD45 but positive for CD29 and CD90. The mean survival time of groin allograft in group B had no significant difference compared with group A (P＞0.05), while the groin allograft in group D had significantly longer survival time than that of group C (P＜0.01). The ratio of Treg in spleen cells was enhanced significantly (P＜0.01), and in MLR, the reactivity of spleen lymphocytes to donor antigen in group D was significantly lower than those of group C (P＜0.05). **Conclusion:** IT donor BMSCs plus 4 Gy total-body irradiation could effectively reduce the reactivity of recipient lymphocyte to donor antigen and prolong the survival time of groin allograft through up regulation of Treg ratio.

Key words: Intrathymic injection; Bone marrow mesenchymal stem cells; Groin allotransplantation; Immune tolerance

Chinese Library Classification(CLC): R622 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2015)08-1465-06

前言

胸腺是机体重要的中枢免疫器官,是 T 细胞发育、成熟的场所,由造血组织来源的淋巴干细胞均需在胸腺内经过阳性和

* 基金项目:国家自然科学基金重点项目(30830102)

作者简介:张栋梁(1989-),男,硕士研究生,主要研究方向:异体复合组织移植

△通讯作者:郭树忠,电话:02984775306,E-mail: shuzhong@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-08-10 接受日期:2014-09-03)

阴性选择，才能发育为成熟的淋巴细胞输出至外周。此外，由于血 - 胸腺屏障的存在及胸腺缺少输入淋巴管而使外周成熟淋巴细胞不能返回胸腺，其又是一个 " 免疫特惠区 "。BMSCs 具有低免疫原性的特点及广泛的免疫调节作用[1]，可抑制同种异体免疫排斥反应[2]。同时，其具有部位特异性分化能力，即生长分化可适应性的变化并随环境定向分化的能力[3-5]。本研究拟采用 BMSCs 的低免疫原性和免疫调节功能及胸腺为 " 免疫特惠区 " 的特点，将供体骨髓间充质干细胞注射进受体胸腺，使其在受体胸腺微环境中存活，进而部位特异性分化为胸腺间质细胞等具有抗原提呈功能的细胞，从而驯化受体 T 细胞，诱导同种异体腹部皮瓣移植免疫耐受。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Lewis 大鼠(RT11)为受体，BN 大鼠(RT1n)为供体，均为近交系，雄性，200-250 g，购自维通利华，SPF 级条件饲养。胎牛血清(Hyclone)、α -MEM 培养基(Hyclone)、1640 培养基(Corning)、EDTA- 胰酶(Corning)、MTS(Promega)、红细胞裂解液(BD)、破膜 / 固定液及流式 Buffer (eBioscience)、Treg 流式抗体：CD4-FITC、CD25-APC、FOXP3-PE 均购自 Biolegend、同型对照抗体：FITC Mouse IgG1、APC Mouse IgG1、PE Mouse IgG1 均购自 eBioscience。间充质干细胞表型鉴定抗体：CD11b/c-PE、CD29-PE、CD45-FITC、CD90-PE 均购自 eBioscience。

1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs 的分离、培养及纯化 颈椎脱臼法处死 BN 大鼠，75%酒精浸泡 5 min 后，在超净台内逐层剪开皮肤、皮下组织，完整剥离并剪下双侧股骨、胫骨，并用手术刀片刮干净附着肌肉，PBS 洗一遍后剪开干骺端暴露骨髓腔。用 5 mL 注射器抽吸培养液反复冲洗骨髓腔直至骨髓腔变白。将冲出的骨髓细胞悬液 1200 r/min 离心 5 min，弃上清，15 mL 含 10%FBS、1%双抗的 α -MEM 培养液重悬后接种至 75 cm^2 的培养瓶，37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。3 天后首次换液，并用 PBS 洗两遍，弃除未贴壁细胞。后每 3 天换液，直至细胞达到 80%融合，EDTA- 胰酶消化 2-3 min，以 1:3 传代。取第 3、4 代的细胞用于后续试验。

1.2.2 BMSCs 的表型鉴定 第 3 代 BMSCs 经 EDTA- 胰酶消化后，离心，弃上清，PBS 洗两遍并分装至各个流式管，每管细胞数约 1× 10^6，按产品说明书往各管加入适量的 PE-CD11b/c、PE-CD29、FITC-CD45、PE-CD90 及相应的同型对照，4℃ 避光孵育 30 min，PBS 洗两遍后上流式机检测并分析。

1.2.3 手术方法 Lewis 鼠为受体，BN 鼠为供体，以股动静脉为蒂进行同种异体腹部皮瓣移植。过程简述如下：采用戊巴比妥钠麻醉，剂量为 50 mg/kg，腹腔注射给药。供体鼠下腹部用硫化钠脱毛后，找到股动脉搏动点，在其上方设计一 4× 3 cm 皮瓣，皮瓣供养血管为股动静脉发出的腹壁浅动静脉。切开皮瓣边缘直至腹肌肌膜表面，分离出腹壁浅动静脉及股动静脉，而后在腹壁浅动静脉发出点远端结扎并剪断大鼠股动静脉，在大鼠腹股沟韧带外切断股动静脉，皮瓣游离完成。相同范围切除供体皮肤组织，小心解剖股动静脉，上血管夹后剪断，供体股动静脉和受体股动静脉采用端端吻合，吻合完毕后将供体皮瓣缝合至受体创缘，手术完成。IT 步骤简述：逐层切开颈前皮肤、皮下组织及肌肉，剪开胸骨至胸骨角，暴露胸腺上极，在显微镜下以 30G 胰岛素注射针将 40 μL，含 1× 10^6 BMSCs 的细胞悬液或 PBS 注射进每叶胸腺，常规结扎注射点。

1.2.4 实验分组 受体大鼠随机分为 4 组，每组 6 只，均进行同种异体腹部皮瓣移植。A 组为空白对照组，IT PBS；B 组为 BMSCs 组，IT BMSCs；C 组为照射组，^{60}Coγ 射线 4Gy 全身照射；D 组为照射 +BMSCs 组，除 ^{60}Coγ 射线 4Gy 全身照射外，IT BMSCs。以各组大鼠进行腹部皮瓣移植记为第 0 天，IT 在移植前 14 天进行，^{60}Coγ 射线 4Gy 全身照射在移植前 15 天进行。

1.2.5 大体观察皮瓣存活情况 术后每天观察皮瓣变化，观察排斥反应过程，包括皮瓣变红、红斑、皮肤质地变硬、表皮脱屑和皮瓣发黑坏死，以皮瓣组织完全坏死记为排斥反应终点。

1.2.6 病理学检查 各组大鼠于皮瓣排斥终点或移植后第 6 天取移植皮瓣，经福尔马林固定、石蜡包埋、切片后行苏木精 - 伊红(HE)染色，进行病理组织学观察，以各组病理切片中炎症细胞的浸润情况评价移植排斥反应的轻重程度。

1.2.7 混合淋巴细胞反应 各组大鼠于排斥终点处死，无菌取脾脏于 200 目小筛网中，剪碎并研磨制成 4 mL 脾细胞悬液，加于 4 mL 淋巴细胞分离液表面，25℃，2000 r/min 离心 20 min，吸取单个核细胞层，PBS 洗两遍后用含 10%FBS、1%双抗的 1640 培养基调整细胞浓度至 2.5× 10^6/mL，于 96 孔版中每孔加入 100 μL 作为反应细胞，设 3 个复孔。同样方法制备 BN 大鼠脾脏单个核细胞，^{60}Coγ 射线 30Gy 照射后用 1640 培养基调整细胞浓度至 5× 10^6/mL，每孔加入 100 μL 作为刺激细胞，37℃、5%CO_2 孵箱中培养 96 h 后每孔加入 40 μL MTS，继续孵育 2 h 后上酶标仪检测 490 nm 处吸光值。

1.2.8 脾细胞 Treg 比例变化 各组大鼠于排斥终点处死，脾细胞悬液制备方法同上，用红细胞裂解液裂解红细胞后流式洗液洗两遍，按照产品说明书，各管加入适量的 CD4-FITC、CD25-APC 或同型对照抗体，4℃ 避光孵育 30 min，流式洗液洗两遍后加入 1 mL 破膜 / 固定液，4℃、30 min 后 1× Buffer 洗两遍，后加入适量的 Foxp3-PE 或相应的同型对照抗体，4℃ 避光孵育 30 min 后 1× Buffer 洗两遍，200 uL 1× Buffer 重悬后上机检测。

1.2.9 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件分析数据，所有数据均以均数± 标准差($\bar{x}$± s)表示，组间比较采用方差分析，两两比较采用 t 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 的培养及鉴定

利用全骨髓贴壁培养法培养的 BMSCs 原代 3 天后可见明显的克隆样生长，7-10 天后细胞可达 80-90%融合，按 1:3 传代，每 4-5 天需传代 1 次。随着细胞代数的增加，BMSCs 的纯度越来越高，呈典型的长梭形(图 1)。P3 代流式表型鉴定的结果为 CD11b/c、CD45 阴性，CD29、CD90 阳性(图 1)。

2.2 移植皮瓣存活情况的比较和大体观察

以皮瓣完全发黑坏死定义为排斥终点。A 组、B 组、C 组均于术后 5 天左右开始出现局部红斑、皮瓣质地变硬，第 6 天红斑面积扩大、肿胀加重、表皮脱屑，第 7 天皮瓣完全发黑坏死。

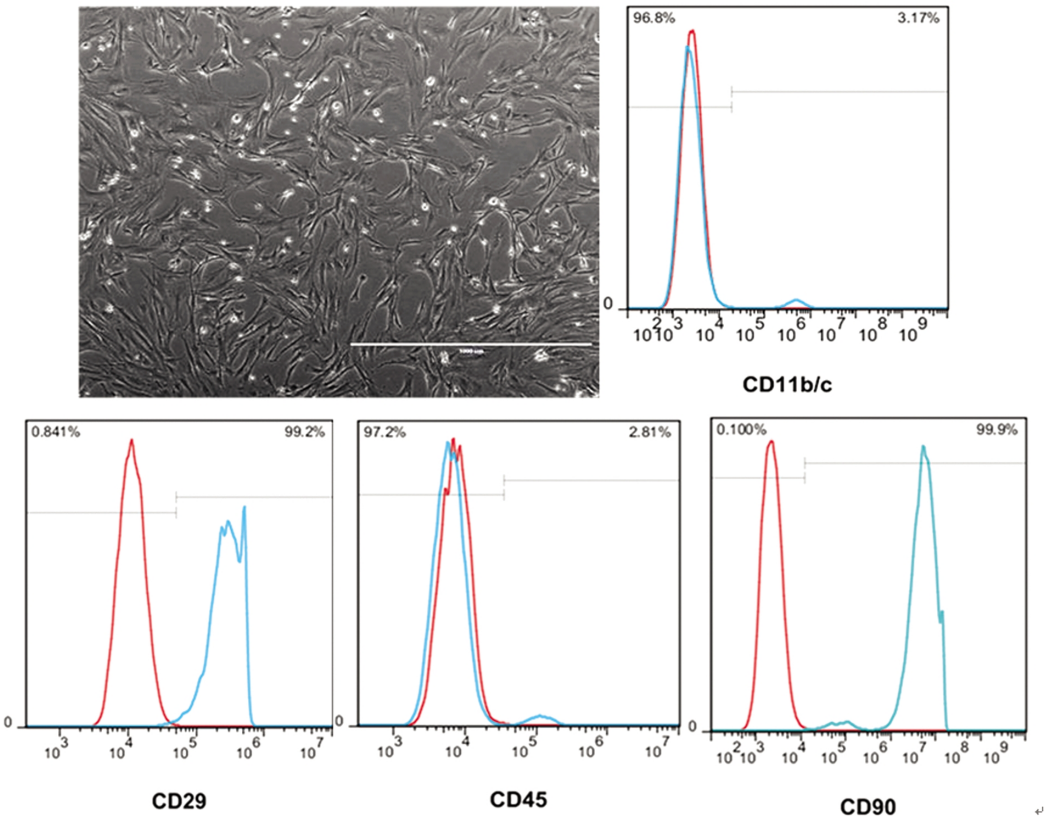

图 1 BMSCs 的培养及表型鉴定结果

Fig. 1 The culture and phenotype identification of BMSCs

注:P3 代 BMSCs 呈典型的长梭形,流式鉴定结果为 CD11b/c、CD45 阴性,CD29、CD90 阳性。

Note: The passage 3 of BMSCs showed a spindle -shaped fibroblastic morphology and were negative for CD11b/cand CD45 but positive for CD29 and CD90.

而 D 组皮瓣则于第 8-9 天开始出现排斥反应,10-11 天皮瓣发黑坏死。各组存活曲线见图 2,平均存活时间分别为:A 组 6.8± 0.41 天、B 组 6.8± 0.75 天、C 组 7.3± 0.52 天、D 组 10.7± 1.03 天。D 组与 C 组比较差异具有统计学意义(P< 0.01)。

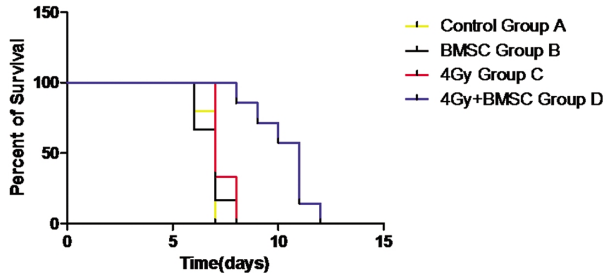

图 2 移植皮瓣存活曲线

Fig.2 Survive curve of groin allograft

注:A 组、B 组存活时间无明显差别,而 D 组较 C 组存活时间显著延长(P< 0.01)。

Note: The survival time of groin allograft in group B have no significant difference with group A (P> 0.05), while group D have a significant longer survival time than group C(P< 0.01).

2.3 移植皮瓣病理学检查

A 组、B 组、C 组术后 6 天移植皮瓣 HE 染色可见真皮层、皮下组织、血管周围有大量单个核细胞浸润,组织水肿较重。而 D 组术后 6 天移植皮瓣组织单个核细胞浸润较前三组少,水肿较轻(图 3)。

2.4 排斥终点各组脾细胞 Treg 比例的比较

各组排斥终点脾脏细胞 $CD4^+CD25^+$Foxp3+Treg 细胞占 $CD4^+$ 细胞的比例见图 4,A 组、B 组、C 组之间比较差异无统计学意义,而 D 组 Treg 比例较 C 组明显增高,差异具有统计学意义(P< 0.01)。

2.5 各组混合淋巴细胞反应的比较

排斥终点取各组大鼠脾脏,分离脾单个核细胞作为反应细胞,分别与经 ^{60}Coγ 射线 30Gy 照射后的供体鼠脾单个核细胞混合培养 96 h 后,加入 MTS 继续孵育 2 h,继而上机检测 490 nm 处的吸光值,结果见图 5。A 组、B 组、C 组之间比较差异无统计学意义,而 D 组吸光值较 C 组明显降低,差异具有统计学意义(P< 0.05),表明 D 组脾单个核细胞对供体抗原的反应性降低。

3 讨论

胸腺是重要的中枢免疫器官,不但是 T 细胞发育、成熟的场所,而且又是一个 " 免疫特惠区 "。由造血组织来源的淋巴干细胞均需在胸腺内经过阳性和阴性选择,阴性选择过程中胸腺皮质和髓质交界处的巨噬细胞和树突状细胞表达高水平的主要组织相容性复合物 (MHC)-Ⅰ和 MHC-Ⅱ类抗原,MHC 抗原与自身抗原肽形成复合物。经过阳性选择的胸腺细胞如能与此

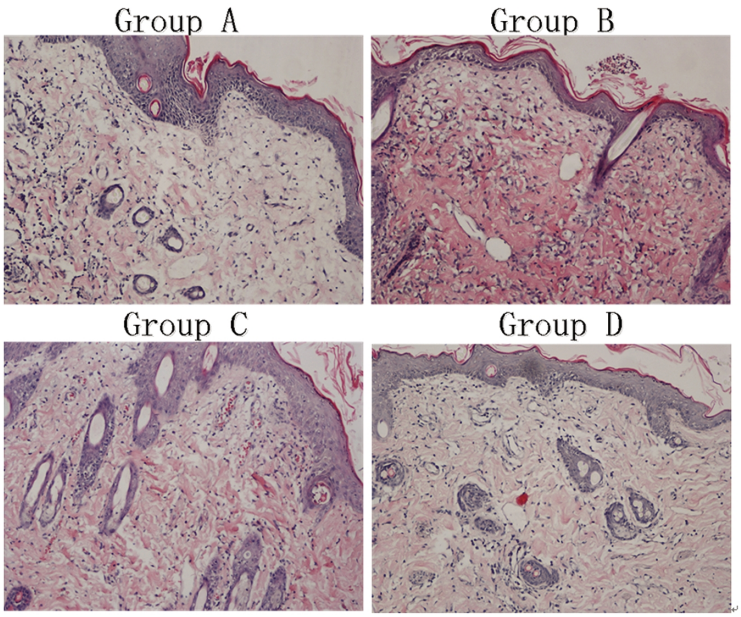

图 3 术后 6 天移植物病理检查(100×):A 组、B 组、C 组术后 6 天可见真皮层、皮下组织、血管周围有大量单个核细胞浸润,而 D 组单个核细胞浸润较少

Fig. 3 Histologic examination of allograft on postoperative d6 (100×): The skin from group A, group B and group C showed dense mononuclear cells infiltration in the dermis, Subcutaneous tissue and Perivascular, while the skin from group D showed moderate mononuclear cells infiltration

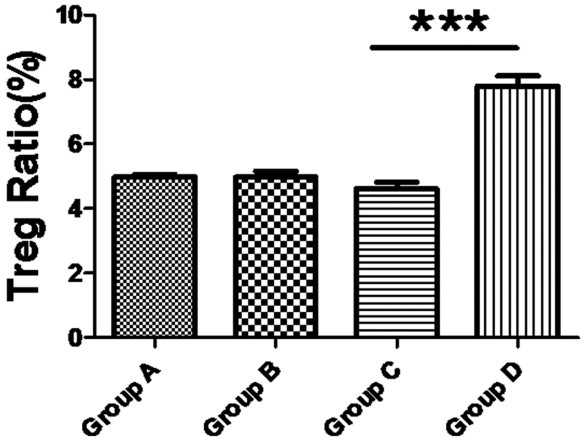

图 4 各组脾细胞 Treg 比例变化

Fig.4 Changes of Treg ratio of spleen cells in different groups

注:排斥终点各组大鼠脾细胞 $CD4^+CD25^+Foxp3+$Treg 细胞占 $CD4^+T$ 细胞的比例。A 组、B 组、C 组之间差异无统计学意义,而 D 组 Treg 比例较 C 组明显增高($P<0.01$)。

Note: The histogram showed percentage of $CD4^+CD25^+Foxp3+$Treg/$CD4^+T$ cells at the end of rejection. There was no significant difference between group A, group B and group C, while the Treg ratio of group D was significantly higher than group C($P<0.01$).

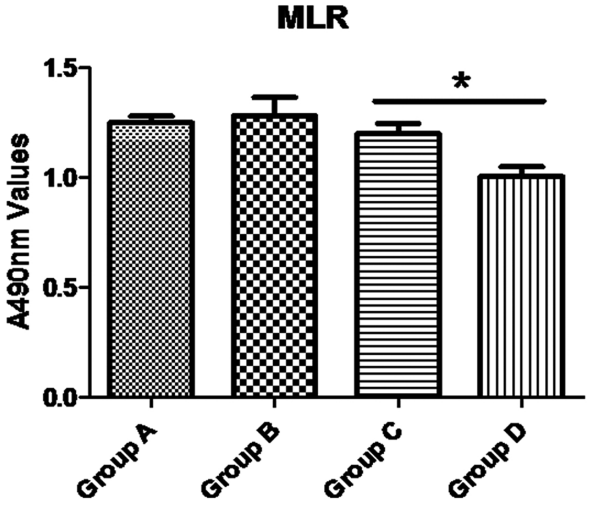

图 5 单向混合淋巴细胞反应

Fig.5 One-way mixed lymphocyte reaction

注:排斥终点各组大鼠脾单个核细胞作为反应细胞,naïve 供体鼠脾单个核细胞作为刺激细胞,检测受体鼠单个核细胞对供体抗原的反应性。A 组、B 组、C 组之间差异无统计学意义,而 D 组反应性较 C 组显著降低($P<0.05$)。

Note: The recipient rat mononuclear cells were used as responder cells and coculture with γ-irradiated naïve donor mononuclear cells to evaluate the reactivity of recipient mononuclear cells to donor antigen. There was no significant difference between group A, group B and group C, while the proliferation of mononuclear cells in group D were statistically significant reduction, compared with group C ($P<0.05$).

复合物高亲和力结合,即被激活而发生程序性死亡;不能识别该复合物的 T 细胞继续发育成熟为能识别外来抗原的单阳性 T 细胞,输出外周。正是 T 淋巴细胞在胸腺内的阴性选择过程赋予了诱导中枢性耐受的可能性。

自 Posselt 等[6]首次报道通过 IT 途径联合单剂量抗淋巴细胞血清(ALS)诱导同种异体胰岛移植免疫耐受以来,相继有学者报道了移植前 IT 联合 ALS 或抗 T 细胞免疫球蛋白以清除外周血中的成熟 T 细胞,然后进行同种异体胰岛、心脏、小肠、肺、肝脏等移植获得免疫耐受,供体抗原包括 MHCⅠ、MHCⅡ抗原肽、脾细胞、T 细胞、B 细胞、DCs、骨髓细胞等[7,8]。IT 诱导移植免疫耐受主要有两方面机制:①受体胸腺微环境内供体反应性 T 细胞的克隆删除:Jones 等[9]报道在 C57BL/10(H-2b)到 BM3.6 小鼠(H-2K,表达特异性抗 H-2Kb 的 $CD8^+$ TCR)心脏移

植模型中，IT C57BL/10 脾脏细胞联合抗 CD4 单克隆抗体成功诱导免疫耐受，受体胸腺内抗供体抗原特异性的 $CD8^+$ 单阳性和 $CD4^+CD8^+$ 双阳性胸腺细胞分别有 76%和 70%被克隆删除，且这种克隆删除依赖于特异性 TCR 的表达水平，而注射第三方抗原无此作用。Chen 等[10]将 OVA 抗原肽 IT 至具有特异性针对 OVA 抗原肽 TCR 的转基因小鼠，发现大部分供体特异性双阳性胸腺细胞和部分单阳性胸腺细胞发生凋亡，且未成熟的双阳性胸腺细胞发生凋亡的时间比相对成熟的单阳性胸腺细胞更早，凋亡比例更大。② 外周对供体反应性 T 细胞的克隆无能及调节作用：在 Lewis 到 DA 大鼠的心脏移植模型中，IT 供体脾脏细胞联合 ALS 能使 66.7%的心脏移植物长期存活，长期耐受的受体鼠脾脏细胞中供体特异性 Treg 细胞比例增加，将此脾脏细胞静脉注射至经低剂量照射的 naïve DA 鼠，24 小时后移植 Lewis 心脏，发现移植心脏长期存活(即 " 传染性耐受 ")[11]。Reemtsen 等[12]在同种异体心脏移植模型中也有类似报道，提示了供者特异性 Treg 细胞在 IT 途径免疫耐受诱导和维持中起着关键作用。Trani 等[13]将流感病毒血凝素 PR8 分子 MHC-Ⅱ限制性抗原肽(S1)IT 至具有特异性抗 S1 的 TCR 转基因小鼠，发现特异性抗 S1 的胸腺细胞数量呈 S1 剂量依赖性减少。然而，此种抗原特异性克隆删除是不完全且短暂的，IT 4 周后抗 S1 特异性胸腺细胞数量恢复正常。此外，IT S1 后外周淋巴结中抗 S1 特异性 T 细胞数量并不发生改变。此种情况下受体却长期耐受供体移植皮片。进一步研究发现，IT S1 抗原肽后，胸腺内产生供体特异性 Treg 细胞并输出外周，从而诱导外周中存在的抗 S1 特异性 T 细胞无能，参与移植皮片免疫耐受的诱导和维持。

BMSCs 的免疫调节功能目前已受到广泛认可。其可通过分泌 2，3-IDO、HGF、TGF-β、iNOS、PGE2、IL-6 等一系列可溶性因子从而抑制 T 细胞的增殖及 IL-2、IFN-γ、TNF-α 分泌、促进 Th1 向 Th2 转化、诱导产生 Treg 细胞、抑制 $CD8^+$T 细胞的细胞毒作用、抑制单核细胞和 $CD34^+$ 造血祖细胞向 DCs 分化及 DCs 的成熟、抑制 NK 细胞的增殖、IFN-γ 的分泌及其细胞毒作用[1]。Bartholomew 等[14]首次将体外扩增的 MSCs 应用于移植免疫，发现静脉输注异基因 MSCs 能够延长狒狒 MHC 不合的皮肤移植存活时间。此后，相继报道了静脉输注 MSCs 能够延长同种异体肾、胰岛、复合组织、皮肤、肝等移植物存活时间[15-19]。在对所移植的 MSCs 进行追踪时发现，异基因 MSCs 能够归巢至胸腺。供体 MSCs 静脉注射联合 2 周 Rapa 使同种异体心脏移植物长期耐受，7、30、100 天在胸腺、骨髓腔、脾脏、淋巴结、移植物均发现 GFP+MSCs，且胸腺内最多[20]。小鼠全身照射后，CM-DiI 染剂示踪和免疫组化等方法发现静脉输注的异基因 MSCs 能归巢到胸腺存活 30 天以上，从而抑制骨髓移植后 GVHD 的发生[21]。经全身照射的小鼠，骨髓移植的同时移植冲出骨髓细胞的骨块，供者骨髓来源基质细胞可以替代受体部分胸腺基质细胞并参与受体胸腺细胞的阳性选择[22]。综上，移植后的 MSCs 迁移归巢至胸腺可能在其发挥免疫调节功能中起着重要作用。Haoyue Huang 等[23]在同种异体心脏移植模型中间接证明了此观点。其将供体 MSCs IT 至受体胸腺，成功延长了心脏移植物存活时间，且效果比通过静脉注射途径移植 MSCs 效果更佳。

BMSCs 具有部位特异性分化能力，即生长分化可适应性的变化并随环境定向分化的能力。Liechty 等[3]将人 MSC 腹内注射至妊娠早期的胎羊。人 MSC 迁移到到各种组织中持续存在达 13 个月，并经历了部位特异性分化。成为软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、心肌细胞、骨髓基质细胞和胸腺基质细胞。此外，将人 MSCs 局部注射至大鼠纹状体，注射进去的人 MSCs 可部位特异性分化为星形胶质细胞[4]。豚鼠 BMSCs IT 至异种 SD 大鼠，发现异种 BMSCs 能后在受体胸腺微环境中生存并分化为多种组织细胞，如皮质区上皮细胞、被膜下上皮细胞、血管基底层细胞等[5]。那么，同种异体 MSCs 移植后归巢至受体胸腺微环境内是否也经历了部位特异性分化，成为供体来源的胸腺间质细胞等具有抗原提呈功能的细胞，从而驯化受体 T 细胞，发挥其抑制移植免疫排斥的作用？

综上所述，本研究利用 BMSCs 的低免疫原性和免疫调节功能及胸腺为 " 免疫特惠区 " 的特点，将供体 BMSCs 注射进受体胸腺，联合 ^{60}Coγ 射线 4Gy 全身照射通过上调受体脾细胞 Treg 比例，能有效降低受体脾淋巴细胞对供体抗原的反应性，显著延长同种异体腹部皮瓣移植物存活时间。与文献报道单纯胸腺内注射供体 BMSCs 能够延长同种异体心脏移植物存活时间[23]不同，本实验中单纯胸腺内注射 BMSCs 与注射 PBS 相比，移植皮瓣存活时间无明显差异，可能由于本实验供受体 MHC 完全不匹配且皮肤的免疫原性较高有关。而胸腺内注射 BMSCs 联合 4Gy 全身照射组较单纯 4Gy 全身照射组移植皮瓣存活时间显著延长，体外混合淋巴细胞反应显示经胸腺内注射 BMSCs 联合 4Gy 全身照射后，受体脾脏淋巴细胞对供体抗原反应性显著降低。且经此诱导方案处理后，受体脾细胞 Treg 比例显著增高，与前述通过 IT 途径诱导移植免疫耐受的机制相符。排斥终点移植皮瓣病理检查显示，胸腺内注射 BMSCs 联合 4Gy 全身照射组移植皮瓣单个核细胞浸润明显减少，排斥反应较轻。然而，此种诱导方案下，移植皮瓣存活时间延长有限，可能由于 4Gy 全身照射清除受体外周血中存在的供体反应性 T 细胞的能力有限，下阶段将应用清除外周血 T 细胞效果较强的 ALS，并考虑联合免疫抑制剂，以诱导同种异体腹部皮瓣移植免疫耐受。此外，从机理上，还需要对 IT 至受体胸腺微环境的供体 BMSCs 进行追踪，证明其在受体胸腺微环境中能够存活，并且对其分化发育情况进行鉴定。

参 考 文 献(References)

[1] Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, et al. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications [J]. Stem Cell Res Ther, 2010, 1(1): 2

[2] Roemeling-Van R M, Weimar W, Hoogduijn M J. Mesenchymal stem cells: application for solid-organ transplantation [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2012, 17(1): 55-62

[3] Liechty K W, Mackenzie T C, Shaaban A F, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep [J]. Nat Med, 2000, 6(11): 1282-1286

[4] Azizi S A, Stokes D, Augelli B J, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino

rats--similarities to astrocyte grafts [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(7): 3908-3913

[5] 翟光地, 沈振亚. 异种骨髓间充质干细胞胸腺修饰诱导免疫耐受的可行性研究 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2011, 31(4): 474-477
Zhai Guang-di, Shen Zhen-ya. Immunotolerance induced by intrathymic inoculation of xenogeneic bone mesenchymal stem cells [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science), 2011, 31(4): 474-477

[6] Posselt A M, Barker C F, Tomaszewski J E, et al. Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation [J]. Science, 1990, 249(4974): 1293-1295

[7] 陈琳, 孟媛媛, 王立春, 等. 胸腺内注射供体 MHC 抗原对同种异体肢体移植的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2012, 46(5): 441-443
Chen Lin, Meng Yuan-yuan, Wang Li-chun, et al. Efect of intrathymic injection of donor MHC antigens on allogeneic limb transplantation in rats[J]. Journal of Harbin Medical University, 2012, 46(5): 441-443

[8] 罗长江, 焦作义, 李继鹏, 等. 骨髓细胞胸腺内注射对移植肠 CD4、CD8 和 CD25 的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(11): 2208-2210
Luo Chang-jiang, Jiao Zuo-yi, Li Ji-peng, et al. Effect of CD4,CD8 and CD25 on small intestine transplantated by injecting allogenic bone marrow into thymus [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2012, 29(11): 2208-2210

[9] Jones N D, Fluck N C, Roelen D L, et al. Deletion of alloantigen-reactive thymocytes as a mechanism of adult tolerance induction following intrathymic antigen administration [J]. Eur J Immunol, 1997, 27(7): 1591-1600

[10] Chen W, Sayegh M H, Khoury S J. Mechanisms of acquired thymic tolerance in vivo: intrathymic injection of antigen induces apoptosis of thymocytes and peripheral T cell anergy [J]. J Immunol, 1998, 160 (3): 1504-1508

[11] Takayashiki T, Asakura H, Ku G, et al. Infectious tolerance develops after intrathymic alloantigen-induced acceptance of rat heart allografts can be adoptively transferred [J]. Surgery, 2005, 138(2): 254-260

[12] Reemtsen B L, Kato H, Wang T S, et al. Intrathymic immunomodulation and the "infectious" tolerance pathway in allograft recipients[J]. J Surg Res, 1999, 84(1): 1-7

[13] Trani J, Moore D J, Jarrett B P, et al. CD25+ immunoregulatory CD4 T cells mediate acquired central transplantation tolerance [J]. J Immunol, 2003, 170(1): 279-286

[14] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo[J]. Exp Hematol, 2002, 30(1): 42-48

[15] Ge W, Jiang J, Arp J, et al. Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2, 3-dioxygenase expression [J]. Transplantation, 2010, 90(12): 1312-1320

[16] Kim Y H, Wee Y M, Choi M Y, et al. Interleukin (IL)-10 induced by CD11b (+) cells and IL-10-activated regulatory T cells play a role in immune modulation of mesenchymal stem cells in rat islet allografts [J]. Mol Med, 2011, 17(7-8): 697-708

[17] Kuo Y R, Chen C C, Goto S, et al. Modulation of immune response and T-cell regulation by donor adipose-derived stem cells in a rodent hind-limb allotransplant model[J]. Plast Reconstr Surg, 2011, 128(6): 661e-672e

[18] Larocca R A, Moraes-Vieira P M, Bassi E J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells increase skin allograft survival and inhibit Th-17 immune response [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76396

[19] Wan CD, Cheng R, Wang HB, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model[J]. 2008, 7(1): 29-33

[20] Ge W, Jiang J, Baroja M L, et al. Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance [J]. Am J Transplant, 2009, 9(8): 1760-1772

[21] Hu K X, Wang M H, Fan C, et al. CM-DiI labeled mesenchymal stem cells homed to thymus inducing immune recovery of mice after haploidentical bone marrow transplantation [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(9): 1265-1270

[22] Li Y, Hisha H, Inaba M, et al. Evidence for migration of donor bone marrow stromal cells into recipient thymus after bone marrow transplantation plus bone grafts: A role of stromal cells in positive selection[J]. Exp Hematol, 2000, 28(8): 950-960

[23] Huang H, He J, Teng X, et al. Combined intrathymic and intravenous injection of mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft associated with decrease in miR-155 expression[J]. J Surg Res, 2013, 185(2): 896-903

(上接第 1561 页)

[21] Kastler A, Aubry S, Sailley N, et al. CT-guided stellate ganglion blockade vs. radiofrequency neurolysis in the management of refractory type I complex regional pain syndrome of the upper limb [J]. Eur Radiol, 2012, 23(5): 1316-1322

[22] 王宏伟, 田斌斌, 翟文元, 等. 星状神经节阻滞用于治疗乳腺疾病的疗效观察[J]. 中国医师进修杂志, 2011, 34(30): 42-43
Wang Hong-wei, Tian Bin-bin, Zhai Wen-yuan, et a1. Stellate ganglion block for treatment of mammary gland disease curative effect observation [J]. Chinese journal of physician education, 2011, 34(30): 42-43

[23] 王宏伟, 田斌斌, 唐静, 等. 星状神经节阻滞治疗经前期综合征疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(2): 182-183
Wang Hong-wei, Tian Bin-bin, Tang Jing, et a1. Stellate ganglion block treatment of premenstrual syndrome curative effect observation [J]. Modern journal of traditional and western medicine, 2013, 22(2): 182-183