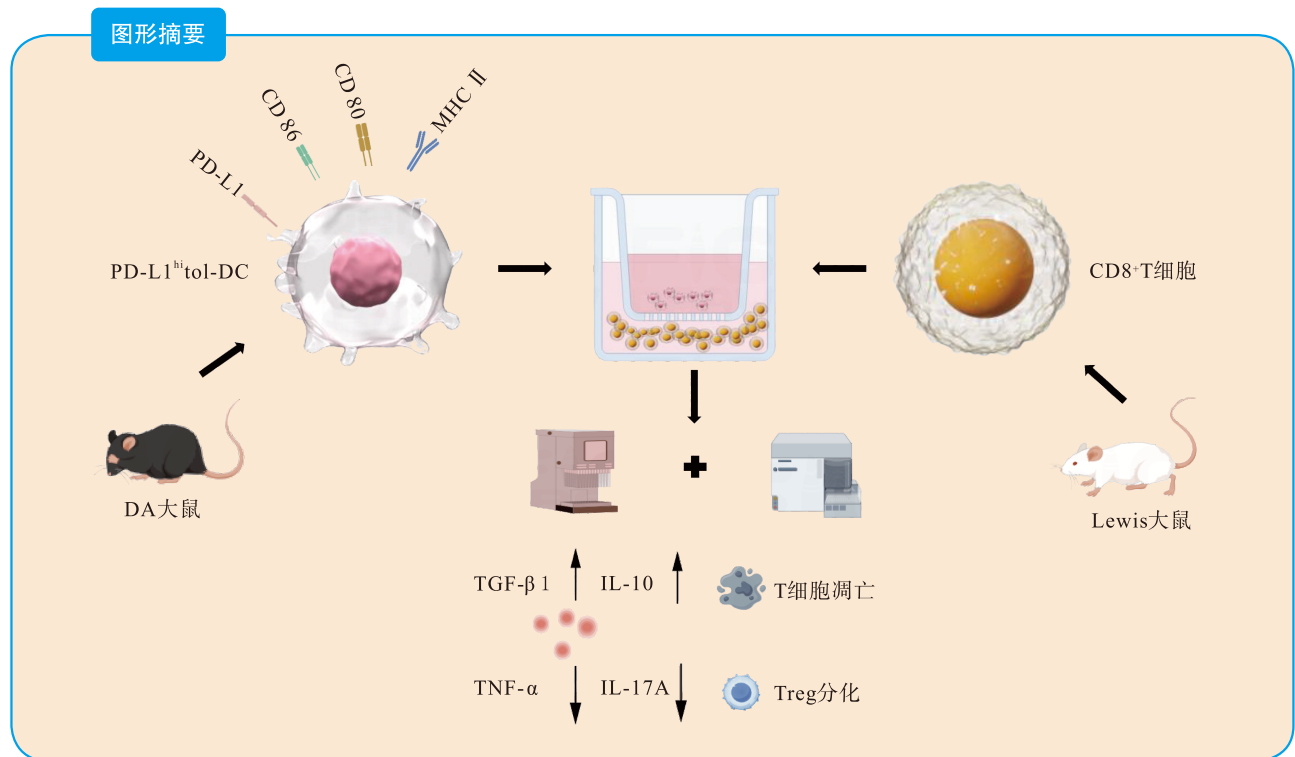


# DA大鼠骨髓来源PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC构建及其免疫学功能鉴定

杨志琦 侯培博 吴浪 刘晶 丁洋 李明皓



**【摘要】** 目的 构建 DA 大鼠骨髓来源程序性细胞死亡蛋白配体 1 (PD-L1)<sup>hi</sup> 耐受性树突状细胞 (tol-DC) 并鉴定其免疫学功能。方法 提取 DA 大鼠骨髓细胞, 联合应用重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子和重组小鼠白细胞介素 (IL)-4, 体外培养 6 d 诱导骨髓细胞分化为未成熟树突状细胞 (imDC); 应用脂多糖刺激细胞成熟, 继续培养 2 d 收集成熟树突状细胞 (mDC); 加入 PD-L1 慢病毒载体病毒原液或同等剂量慢病毒病毒原液, 培养 2 d 后收集 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 和 Lv-imDC。应用倒置相差显微镜及透射电镜观察 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 形态; 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应、蛋白质印迹法及流式细胞术检测细胞表面特异性标志物表达水平。将 imDC、mDC、

DOI: 10.12464/j.issn.1674-7445.2024183

基金项目: 宁夏自然科学基金 (2021AAC03308、2024AAC03450); 宁夏回族自治区人民医院科技创新人才项目 (院党发〔2023〕72号); 宁夏回族自治区人民医院国家自然科学基金预实验项目 (2024GZRYSY0015)

作者单位: 750000 银川, 宁夏回族自治区人民医院 (宁夏医科大学附属自治区人民医院) 肝胆外科

作者简介: 杨志琦 (ORCID 0009-0005-7389-242X), 博士研究生, 主治医师, 研究方向为肝移植免疫耐受, Email: 20220140093@nxmu.edu.cn; 侯培博 (ORCID 0009-0002-6856-477X), 硕士研究生, 研究方向为肝移植免疫耐受, Email: 20202110331@nxmu.edu.cn (杨志琦、侯培博为共同第一作者)

通信作者: 李明皓 (ORCID 0000-0001-5185-1698), 医学博士, 主任医师, 研究方向为肝移植免疫耐受及肝胆胰肿瘤基础与临床研究, Email: liminghao317@163.com

Lv-imDC 及 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 分别与 Lewis 大鼠脾脏来源 CD8<sup>+</sup>T 细胞共培养, 酶联免疫吸附试验检测各组上清液炎症因子水平, 流式细胞术分析各组 T 细胞凋亡及调节性 T 细胞 (Treg) 分化情况。**结果** 经 PD-L1 基因修饰构建的 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 形态符合 tol-DC 特征, 表面 CD80、CD86、主要组织相容性复合体 (MHC) 表达水平较低。与 CD8<sup>+</sup>T 细胞混合培养后, PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 组上清液 IL-10、转化生长因子 (TGF)- $\beta$ 1 水平较高, 肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$ 、IL-17A 水平较低, T 细胞凋亡及 Treg 分化增多。**结论** 通过慢病毒载体过表达 PD-L1 可成功诱导构建 DA 大鼠骨髓来源 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC, 促进抑炎因子分泌及 T 细胞凋亡, 诱导 Treg 分化, 抑制同种异体 CD8<sup>+</sup>T 细胞免疫反应, 这为下一步器官移植免疫耐受研究提供了实验依据。

【关键词】 树突状细胞; 器官移植; 免疫耐受; 免疫抑制; 程序性细胞死亡蛋白配体 1; T 细胞; 调节性 T 细胞; 炎症因子

【中图分类号】 R617, R392.4 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2025) 01-0008-08

### Construction of PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC derived from bone marrow of DA rats and identification of its immunological function

Yang Zhiqi, Hou Peibo, Wu Lang, Liu Jing, Ding Yang, Li Minghao. Department of Hepatobiliary Surgery, People ' s Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, China

Corresponding author: Li Minghao, Email: liminghao317@163.com

【Abstract】 **Objective** To construct programmed cell death protein-ligand 1(PD-L1)<sup>hi</sup> tolerogenic dendritic cell (tol-DC) derived from bone marrow of DA rats and identify its immunological function. **Methods** DA rat bone marrow cells were extracted, combined with recombinant mouse granulocyte macrophage colony-stimulating factor and recombinant mouse interleukin (IL)-4, and cultured for 6 days *in vitro* to induce the differentiation of bone marrow cells into immature dendritic cells (imDC). Lipopolysaccharide was used to stimulate cell maturation and cultured for 2 days to collect mature dendritic cells (mDC). PD-L1 lentiviral vector virus stock solution or equivalent dose lentiviral stock solution was added, and PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC and Lv-imDC were collected after culture for 2 days. The morphology of PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC was observed by inverted phase contrast microscope and transmission electron microscope. Real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, Western blotting and flow cytometry were used to detect the expression level of specific markers on cell surface. CD8<sup>+</sup>T cells derived from Lewis rat spleen were co-cultured with imDC, mDC, Lv-imDC and PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC, respectively. The levels of inflammatory factors in the supernatant of each group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The apoptosis of T cells and the differentiation of regulatory T cells (Treg) in each group were analyzed by flow cytometry. **Results** The morphology of PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC modified by PD-L1 gene was consistent with tol-DC characteristics, and the expression levels of CD80, CD86 and major histocompatibility complex (MHC) on the surface were low. After mixed culture with CD8<sup>+</sup>T cells, the levels of IL-10 and transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 in the supernatant of PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC group were higher, the levels of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and IL-17A were lower, and the apoptosis of T cells and Treg differentiation were increased. **Conclusions** Overexpression of PD-L1 through lentiviral vectors may successfully induce the construction of bone-marrow derived PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC in DA rats, promote the secretion of anti-inflammatory factors and T cell apoptosis, induce the differentiation of Treg, and inhibit the immune response of allogeneic CD8<sup>+</sup>T cells, which provides experimental basis for the next organ transplantation immune tolerance study.

【Key words】 Dendritic cell; Organ transplantation; Immune tolerance; Immunosuppression; Programmed cell death protein-ligand 1; T cell; Regulatory T cell; Inflammatory factor

耐受性树突状细胞 (tolerogenic dendritic cell, tol-DC) 专指具有稳定、半成熟表型和耐受性属性的树突状细胞 (dendritic cell, DC) 亚群<sup>[1]</sup>, 因其显著性诱导 T 细胞免疫耐受的生物学功能, 逐渐被应用到器官移植免疫耐受诱导及自身免疫性疾病治疗领域<sup>[2-3]</sup>。然而, 分离具有耐受性的人成熟树突状细胞

(mature dendritic cell, mDC) 亚群相对困难, 许多从单核细胞来源耐受性树突状细胞 (monocyte-derived tolerogenic dendritic cell, mo-tol DC) 中体外生成方案逐渐被开发出来<sup>[4]</sup>, 通过改变细胞因子分泌, 减少共刺激分子的表达以抑制 T 细胞增殖。

DC 表达的免疫抑制性分子程序性细胞死亡蛋白

配体 1 (programmed cell death protein-ligand 1, PD-L1), 与 T 细胞表达的的程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 相互作用可触发 T 细胞克隆无能<sup>[5]</sup>。基于该细胞生物学机制的临床应用研究已逐渐成熟, 同时也引起了移植免疫学者们的高度关注<sup>[6]</sup>。最新研究表明, PD-L1 可以作为同样具有耐受属性的调节性树突状细胞 (regulatory dendritic cell, DCreg) 的表征<sup>[7]</sup>, 后者通过影响 CD8<sup>+</sup> T 细胞及自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞免疫反应, 介导肝移植免疫耐受调控过程<sup>[8]</sup>。但是, 既往文献中未见利用 PD-L1 的免疫抑制功能体外诱导 tol-DC 生成的相关研究报道。因此, 为了探索 PD-L1 在诱导 tol-DC 方面的应用价值, 本实验通过 PD-L1 慢病毒载体转染 DA 大鼠骨髓来源的未成熟树突状细胞 (immature dendritic cell, imDC) 以构建 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC, 并与 Lewis 大鼠脾脏来源的 CD8<sup>+</sup> T 细胞进行混合培养, 探索 DA 大鼠骨髓来源的 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 对同种异体 CD8<sup>+</sup>T 细胞的免疫学反应机制, 以期为供体来源 tol-DC 干预受体介导器官移植免疫耐受提供更多的实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

无特定病原体级雄性 DA 大鼠及 Lewis 大鼠, 6~8 周龄, 体质量约 250 g, 由宁夏医科大学动物中心购买。实验方案经宁夏医科大学第三临床学院伦理委员会批准, 审批号为伦理 [2023]-NZR-039。实验过程遵循国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和国家法规。实验动物在异氟烷麻醉下进行所有的手术, 并最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

### 1.2 试剂和仪器

粒细胞集落刺激因子和白细胞介素 (interleukin, IL)-4 购自美国 PepreTech 公司; RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自以色列 Biological Industries 公司; 藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记的抗大鼠 CD80 抗体 (CD80-PE)、PE 标记的抗大鼠 CD86 抗体 (CD86-PE)、别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 标记的抗大鼠主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) II 抗体、PE 标记的抗大鼠 PD-L1 抗体 (PD-L1-PE) 均购自北京博奥森生物有限公司; 红细胞裂解液购自天津市灏洋公司; 脂多糖购自美国 Sigma 公司; 酶联免疫吸附试验

(enzyme-linked immune absorbent assay, ELISA) 试剂盒购自武汉基因美科技有限公司; 流式细胞仪购自美国贝克曼公司。

### 1.3 研究内容与方 法

1.3.1 大鼠骨髓细胞分离与 imDC、mDC、Lv-imDC、PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 的体外诱导培养 DA 大鼠异氟烷过量吸入安乐死后 75% 乙醇浸泡 5 min, 无菌取出股骨; 无菌操作下剪开股骨两端, 5 mL 注射针头插入骨髓腔, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 反复冲洗骨髓腔至变白; 收集骨髓细胞后 PBS 重悬, 收集冲洗液离心, 弃上清; RPMI-1640 培养液重悬细胞并调整细胞数接种于细胞培养板, 加入粒细胞集落刺激因子、重组小鼠 IL-4; 隔日半量换液, 补充细胞因子; 连续诱导培养 6 d 收集 imDC<sup>[9-10]</sup>。imDC 加入 1 μg/mL 的脂多糖, 刺激细胞成熟, 细胞培养箱继续培养 2 d 可收集 mDC; 按照感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值为 50, 每孔 imDC 加入预先制备好的 PD-L1 慢病毒载体病毒原液 (同等剂量的慢病毒病毒原液干预 imDC 作为 Lv-imDC 对照组), 培养 24 h 后更换新鲜培养基, 置于培养箱中孵育; 再培养 24 h 后可收集 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 和 Lv-imDC, 应用倒置相差显微镜观察转染前后细胞形态并应用透射电镜鉴定。

1.3.2 CD8<sup>+</sup>T 细胞分离 Lewis 大鼠异氟烷麻醉下开腹取出脾脏, 眼科剪剪碎放置于 100 目细胞筛上, 5 mL 无菌注射器针芯反复碾压脾脏, RPMI-1640 培养基冲洗细胞筛 3 次, 得到单细胞悬液, 然后加入大鼠外周血淋巴细胞分离液 10 mL, 900×g 离心 30 min。按照细胞悬液: 分离液为 1: 2 配比, 调整细胞浓度为 2×10<sup>9</sup>/L, 分装至 EP 管, 经 MACS CD8<sup>+</sup>T 细胞分选试剂盒磁珠分选 CD8<sup>+</sup>T 细胞。

1.3.3 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 收取各组细胞 (每集约 1×10<sup>5</sup> 个细胞), 裂解提取总 RNA, 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测各组细胞表面标志物。以相对表达量 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算各组信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 相对表达量, 引物序列见表 1。

1.3.4 蛋白质印迹法 收集 imDC、mDC、Lv-imDC、PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC (每集约 1×10<sup>5</sup> 个细胞), 裂解提取组织总蛋白。经电泳、转膜后, 室温封闭 2 h (5% 脱脂奶粉)。分别加入 CD80 (1: 5 000)、

CD86 (1:1 000)、MHC II (1:1 000)、GAPDH (1:2 000) 一抗 4 ℃ 孵育过夜。洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1.2 h。洗涤后检测蛋白条带。

1.3.5 流式细胞术 离心收集 imDC、mDC、Lv-imDC、PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC, 检测各组细胞表面标志物表达。

1.3.6 DC 与 CD8<sup>+</sup> T 细胞共培养 收集 CD8<sup>+</sup> T 细胞, PBS 洗涤 1~2 遍, 用 RPMI-1640 完全培养基重悬, 调整细胞浓度, 以每孔 1~5×10<sup>5</sup> 接种于 24 孔培养板。按照 imDC、mDC、Lv-imDC、PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 与 CD8<sup>+</sup> T 细胞比例为 1:10<sup>[11]</sup>, 将 imDC、mDC、Lv-imDC、PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 细胞以 (1~5)×10<sup>4</sup> 分别铺板到 Transwell 小室中, 培养 6 d。

1.3.7 ELISA 收集与 CD8<sup>+</sup> T 细胞共培养的 imDC、mDC、Lv-imDC、PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC, 经离心后收取上清液, 使用 ELISA 试剂盒检测 IL-10、转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)-β、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)-α、IL-17A 水平。

1.3.8 CD8<sup>+</sup> T 细胞凋亡 离心收集经与各组 DC 共培养的 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 预冷 PBS 离心洗涤 2 次, 弃上清, 离心收集 (1~3)×10<sup>6</sup> 个细胞。通过细胞凋亡试剂盒检测各组细胞凋亡情况。

1.3.9 调节性 T 细胞检测 离心收集共培养后的 CD8<sup>+</sup>

T 细胞, 预冷 PBS 离心洗涤 2 次, 弃上清, 加入 PBS 重悬细胞, 调整细胞浓度为 1×10<sup>7</sup>/mL, 进行流式细胞术检测各组调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 分化情况。

#### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 形态学鉴定

倒置相差显微镜下观察 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 生长变化: 转染前 imDC 细胞形态状态, 突起明显 (图 1A); 转染后培养 48 h 的 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 细胞体积变小 (图 1B), 透射电镜显示 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 细胞结构完整、少量突起 (图 1C)。

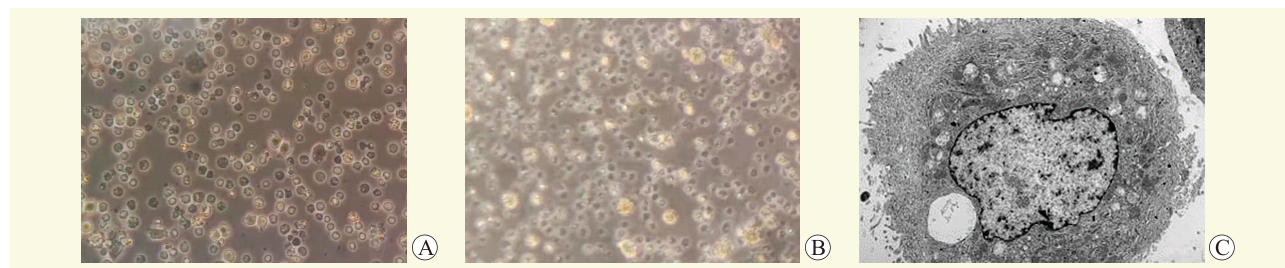
### 2.2 细胞表面标志物检测

RT-qPCR 结果显示, 与 mDC 比较, imDC 的 PD-L1 mRNA 表达更多, 表面成熟标志物 CD80、CD86 及 MHC II mRNA 表达减少; 与 imDC 比较, PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 的 PD-L1 mRNA 表达增多, 表面成熟标志物 CD80、CD86 及 MHC II mRNA 表达减少 (均为 P<0.05, 图 2A)。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequences

基因	扩增长度 (bp)	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
β-actin	150	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTC
PD-L1	88	GAGTATGGCAGCAATGTCAC	CCTTTTCCAGTACACCACT
CD80	178	CTGTCAAATTCGACGCTG	ACCAGAGAGGCTTCACCTAGA
CD86	122	TGTCTCTTTCTGCTGGTCGT	ATCGACTCGTCAACACCACT
MHC II	100	ACAACAAATGAAACCGGAAC	AAAGACTGCTAATGGGTCAG



注: A 图为倒置相差显微镜 imDC 培养 6 d 形态 (×400); B 图为倒置相差显微镜 imDC 转染 PD-L1 后培养 48 h 形态 (×400); C 图为 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 透射电镜形态 (×1 000)。

图 1 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 形态学鉴定

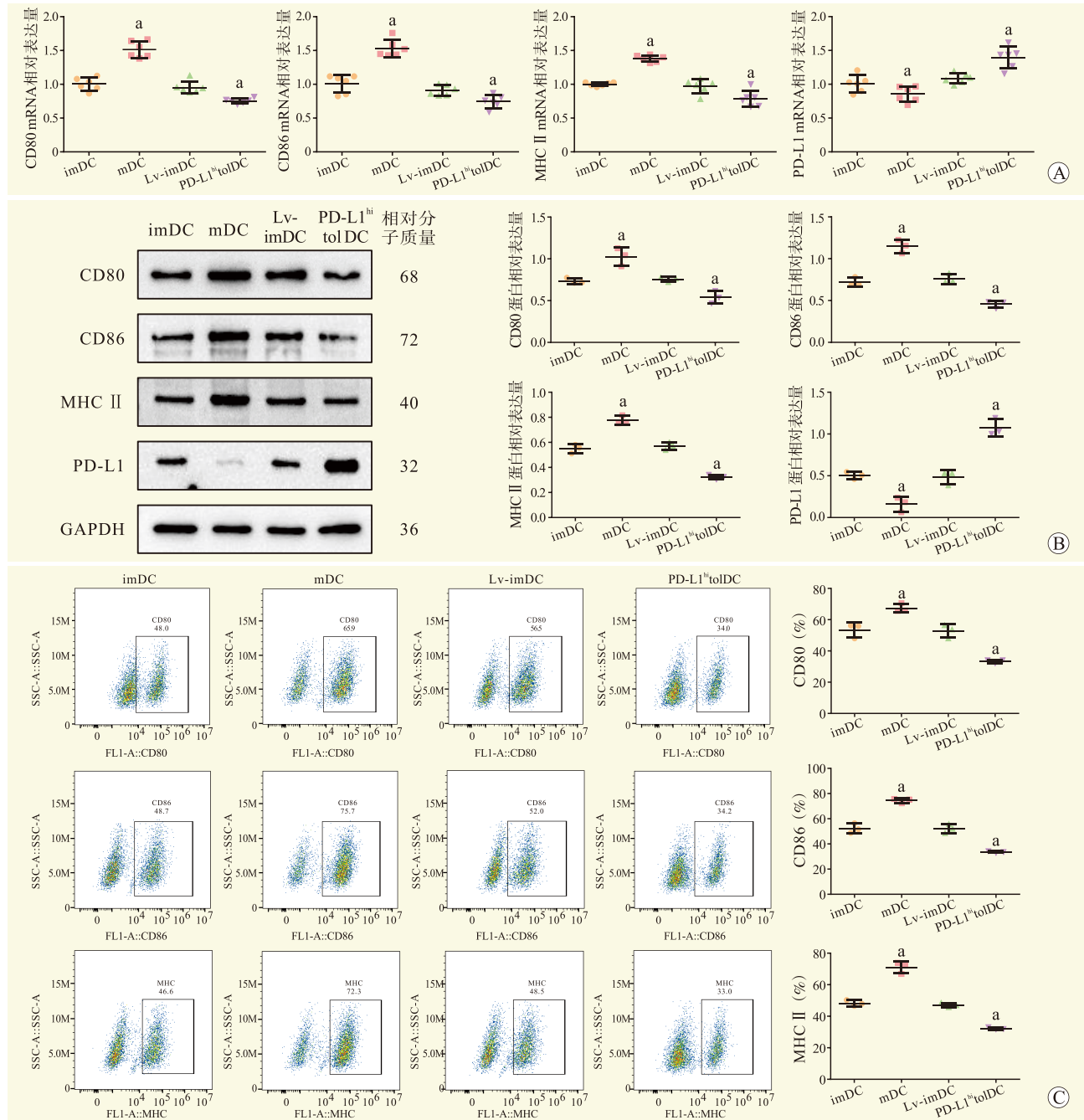
Figure 1 Morphological identification of PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC

蛋白质印迹法结果显示, 与 mDC 比较, imDC 的 PD-L1 蛋白表达增多, 表面成熟标志物 CD80、CD86 及 MHC II 蛋白表达更少; 与 imDC 比较, PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 的 PD-L1 蛋白表达增多, 表面成熟标志物 CD80、CD86 及 MHC II 蛋白表达减少 (均为  $P < 0.05$ , 图 2B)。

流式细胞术进一步发现, 与 imDC 组比较, PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 组 CD80、CD86 及 MHC II 阳性率较低 (均为  $P < 0.05$ , 图 2C)。

### 2.3 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 免疫学功能

与 T 细胞混合培养后, PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 上清液 IL-17A、TNF- $\alpha$  表达减少, IL-10、TGF- $\beta$ 1 表达增多



注: A 图为 RT-qPCR 检测各组细胞表面标志物表达; B 图为蛋白质印迹法检测各组细胞表面标志物表达; C 图为流式细胞术检测各组细胞表面标志物表达。与 imDC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 中 CD80、CD86 及 MHC II 的表达情况

Figure 2 Expression of CD80, CD86 and MHC II in PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC

( $P < 0.05$ , 图 3A)；PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 诱导同种异体 T 细胞凋亡率增加 ( $P < 0.05$ , 图 3B)；PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 诱导同种异体 T 细胞 CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 分化比例增加 ( $P < 0.05$ , 图 3C)。

### 3 讨论

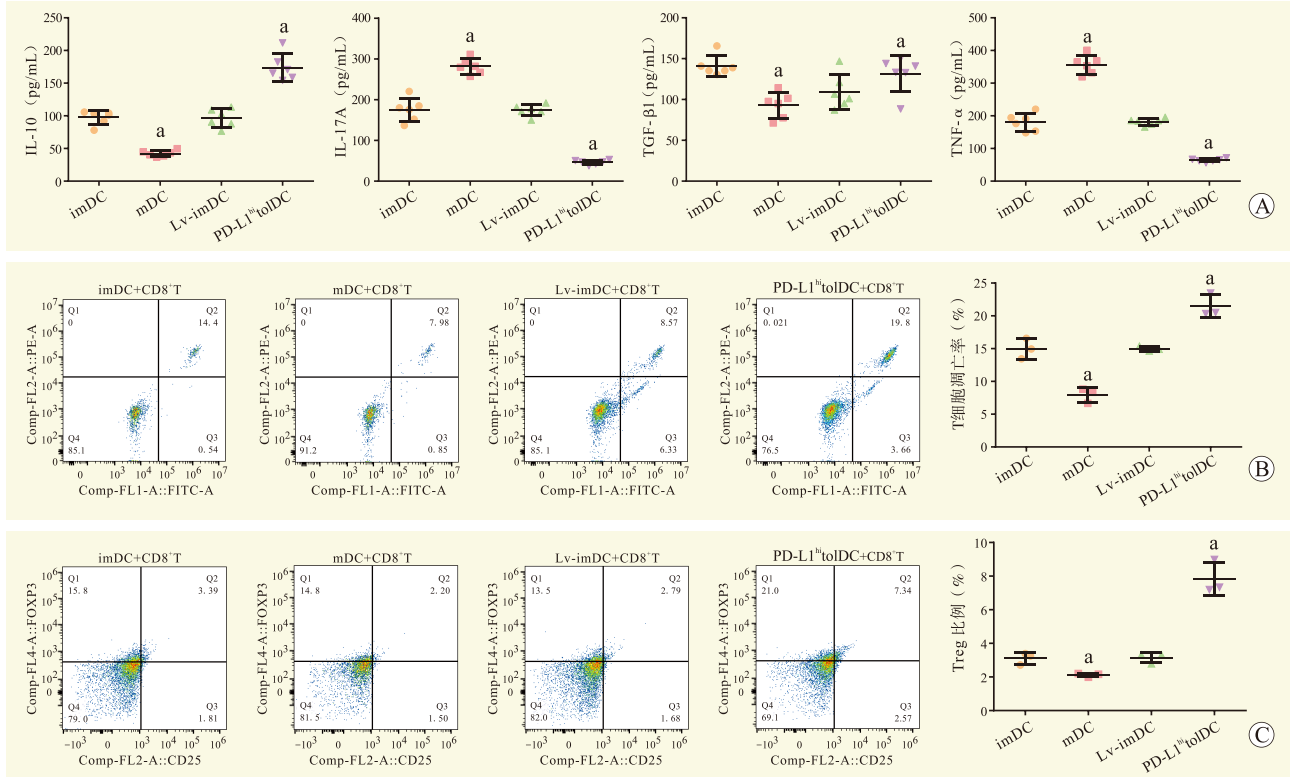
DC 作为经典的抗原提呈细胞，启动 T 细胞的激活，继而介导机体适应性免疫调控过程<sup>[12]</sup>。T 细胞免疫效应的产生需要抗原提呈细胞提供的 3 个主要信号刺激：肽-MHC 复合物，CD80/CD86 分子提供的共刺激信号，以及细胞因子介导的极化信号 IL-12<sup>[13]</sup>。tol-DC 作为 DC 的特殊亚群，由于低或无表达抗原提呈信号而削弱了自身抗原提呈能力，导致 T 细胞不能正常发挥免疫反应效能。在这一免疫细胞学机制的基础上，形成了器官移植免疫耐受诱导的主要策略之一。

相比较于 mDC，imDC 低或无表达 CD40、CD80、CD86 等表面标志物及 MHC，导致其抗原提呈能力减弱，刺激 T 细胞增殖水平降低或凋亡，诱导 Treg 分化，因而被认为是经典的 tol-DC<sup>[14-15]</sup>。然而，人体内 imDC 水平极低，目前又尚无统一的 tol-

DC 体外诱导策略或制备方案<sup>[16]</sup>。本研究尝试性应用 PD-L1 慢病毒载体转染 imDC 构建大鼠骨髓来源的 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC，免疫学功能实验验证表明其具备诱导免疫耐受潜能，期望能够拓展既往研究<sup>[11]</sup>，提高对 PD-L1/PD-1 信号通路参与器官移植免疫耐受的认识。

DC 的成熟程度决定了其抗原提呈能力，而 CD80、CD86 及 MHC 等表达情况间接反映了 DC 的成熟程度<sup>[17]</sup>。本研究通过细胞形态学及分子学双重验证发现，PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 相比较于 imDC、mDC 的突触更少，CD80、CD86 及 MHC II 等表面标志物表达更低、而抑制性分子 PD-L1 表达更高，从 mRNA 及蛋白水平说明经 PD-L1 基因修饰 imDC 构建的 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 的抗原提呈能力进一步减弱，这与既往研究报道的 IL-10 诱导 tol-DC 具有同样的免疫生物学效应<sup>[18]</sup>。本实验的优势在于通过慢病毒载体 PD-L1 基因转染构建 tol-DC，理论上能够维持 DC 更加稳定的免疫耐受性<sup>[19]</sup>。

本研究还发现 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 相比较于 imDC、mDC 分泌产生促炎因子 IL-17、TNF- $\alpha$  更少，而抑炎因子 IL-10、TGF- $\beta$ 1 分泌产生更多，说明 PD-L1 基



注：A 图为各组上清液中炎症因子 IL-10、IL-17A、TGF- $\beta$ 1 和 TNF- $\alpha$  水平；B 图为各组 T 细胞凋亡的情况；C 图为各组 Treg 分化情况。与 imDC 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 的免疫抑制功能

Figure 3 Immunosuppressive functions of PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC

因修饰构建 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 作为抗原提呈细胞向 T 细胞传递促炎第三信号减少、抑炎第三信号增多,是诱导 T 细胞免疫耐受的重要影响因素之一,该结果与 Castenmiller 等<sup>[20]</sup>报道的 tol-DC 耐受性表型特征一致。而进一步分析,炎症因子作为细胞代谢的一部分参与了 tol-DC 诱导免疫耐受的调控过程<sup>[21-22]</sup>。近年来有报道通过改变细胞外代谢环境使得 DC 获得强大的免疫耐受性,以及脂肪酸氧化、氧化代谢和锌稳态等细胞代谢功能与 tol-DC 耐受性相关的机制研究<sup>[23-24]</sup>。这提示我们可以从 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 自身代谢角度进一步改造组织或器官免疫微环境,或可成为诱导免疫耐受的一种策略。

tol-DC 最为重要的免疫学功能评估指标为诱导 T 细胞凋亡及 Treg 分化的能力<sup>[25-26]</sup>。本研究通过 DA 大鼠骨髓来源的前体细胞成功构建 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC,最终实验结果表明,与 imDC、mDC 相比较,PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 诱导 T 细胞凋亡及 Treg 分化的能力更为显著。但是,与既往多数有关 tol-DC 免疫学功能的体外实验研究不同<sup>[27-29]</sup>,本研究选择 Lewis 大鼠脾脏来源的 CD8<sup>+</sup>T 细胞作为反应细胞,观察 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 作为刺激细胞对同种异体 CD8<sup>+</sup>T 细胞的刺激反应,实验设计更加符合同种异体器官移植的实际需求,进一步证实了 PD-L1 诱导 Treg 分化介导免疫耐受的重要性<sup>[30-31]</sup>。

综上所述,本研究通过 PD-L1 基因修饰 imDC 成功构建了一种 tol-DC,具有诱导 T 细胞凋亡及诱导 Treg 分化的免疫学功能,从而拓宽了 tol-DC 的体外诱导途径。然而,PD-L1 增强 imDC 耐受性的细胞内机制尚需进一步研究<sup>[32]</sup>。另外,Treg 是一种双向免疫调控细胞<sup>[33]</sup>,进一步筛选 Treg 亚群对于精准诱导免疫耐受具有重要意义。我们在大鼠肝移植急性排斥反应模型中,将供体大鼠骨髓来源 PD-L1<sup>hi</sup>tol-DC 术前干预受体大鼠,初步研究结果显示受体大鼠生存期有所改善,其体内机制作用在进一步挖掘之中。相信随着供体或受体自身来源的调节性免疫细胞在术前或术后干预移植受体的临床前试验逐渐开展<sup>[34-35]</sup>,基于基因组测序技术及基因编辑技术探索不同策略诱导 tol-DC 调控器官移植免疫反应的体内机制研究或将极大推动其临床应用<sup>[36-38]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] MORANTE-PALACIOS O, FONDELLI F, BALLESTAR E, et al. Tolerogenic dendritic cells in autoimmunity and inflammatory diseases[J]. Trends Immunol, 2021, 42(1): 59-75. DOI: 10.1016/j.it.2020.11.001.
- [2] ZHUANG Q, CAI H, CAO Q, et al. Tolerogenic dendritic cells: the pearl of immunotherapy in organ transplantation[J]. Front Immunol, 2020, 11: 552988. DOI: 10.3389/fimmu.2020.552988.
- [3] PASSERI L, MARTA F, BASSI V, et al. Tolerogenic dendritic cell-based approaches in autoimmunity[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8415. DOI: 10.3390/ijms22168415.
- [4] ŠVAJGER U, ROŽMAN P J. Recent discoveries in dendritic cell tolerance-inducing pharmacological molecules[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 81: 106275. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106275.
- [5] PENG Q, QIU X, ZHANG Z, et al. PD-L1 on dendritic cells attenuates T cell activation and regulates response to immune checkpoint blockade[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4835. DOI: 10.1038/s41467-020-18570-x.
- [6] HANDELSMAN S, OVERBEY J, CHEN K, et al. PD-L1's role in preventing alloreactive T cell responses following hematopoietic and organ transplant[J]. Cells, 2023, 12(12): 1609. DOI: 10.3390/cells12121609.
- [7] MACEDO C, TRAN L M, ZAHORCHAK A F, et al. Donor-derived regulatory dendritic cell infusion results in host cell cross-dressing and T cell subset changes in prospective living donor liver transplant recipients[J]. Am J Transplant, 2021, 21(7): 2372-2386. DOI: 10.1111/ajt.16393.
- [8] TRAN L M, MACEDO C, ZAHORCHAK A F, et al. Donor-derived regulatory dendritic cell infusion modulates effector CD8<sup>+</sup>T cell and NK cell responses after liver transplantation[J]. Sci Transl Med, 2023, 15(717): eadf4287. DOI: 10.1126/scitranslmed.adf4287.
- [9] GOLD M J, ANTIGNANO F, HUGHES M R, et al. Dendritic-cell expression of Shp1 regulates Th2 immunity to helminth infection in mice[J]. Eur J Immunol, 2016, 46(1): 122-130. DOI: 10.1002/eji.201545628.
- [10] 李立强,李明皓,李良,等. Lewis 大鼠骨髓来源成熟和未成熟树突状细胞的提取与鉴别[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(25): 4013-4017. DOI: 10.12307/2024.190.
- [11] LI L Q, LI M H, LI L, et al. Extraction and differentiation of mature and immature dendritic cells from Lewis rat bone marrow[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(25): 4013-4017. DOI: 10.12307/2024.190.
- [12] DAHLQVIST G, RENAUD S, BARJON C, et al. Modulatory effect of rapamycin and tacrolimus on monocyte-derived dendritic cells phenotype and function[J]. Immunobiology, 2021, 226(1): 152031. DOI: 10.1016/j.imbio.2020.152031.
- [13] BOŠNJAK B, DO K T H, FÖRSTER R, et al. Imaging dendritic cell functions[J]. Immunol Rev, 2022, 306(1): 137-163. DOI: 10.1111/imr.13050.
- [14] YIN X, CHEN S, EISENBARTH S C. Dendritic cell regulation of T helper cells[J]. Annu Rev Immunol, 2021, 39: 759-790. DOI: 10.1146/annurev-immunol-101819-025146.
- [15] LUTZ M B, SCHULER G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?[J]. Trends Immunol, 2002, 23(9): 445-449. DOI: 10.1016/s1471-4906(02)02281-0.
- [16] GROUX H, FOURNIER N, COTTREZ F. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells[J]. Semin Immunol, 2004, 16(2): 99-106. DOI: 10.1016/j.smim.2003.12.004.

- [16] ZAHORCHAK A F, DERIGGI M L, MUZZIO J L, et al. Manufacturing and validation of Good Manufacturing Practice-compliant regulatory dendritic cells for infusion into organ transplant recipients[J]. *Cytotherapy*, 2023, 25(4): 432-441. DOI: 10.1016/j.jcyt.2022.11.005.
- [17] LEBLANC-HOTTE A, AUDIGER C, CHABOT-ROY G, et al. Immature and mature bone marrow-derived dendritic cells exhibit distinct intracellular mechanical properties[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 1967. DOI: 10.1038/s41598-023-28625-w.
- [18] PASSERI L, ANDOLFI G, BASSI V, et al. Tolerogenic IL-10-engineered dendritic cell-based therapy to restore antigen-specific tolerance in T cell mediated diseases[J]. *J Autoimmun*, 2023, 138: 103051. DOI: 10.1016/j.jaut.2023.103051.
- [19] COMI M, AMODIO G, PASSERI L, et al. Generation of powerful human tolerogenic dendritic cells by lentiviral-mediated IL-10 gene transfer[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1260. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01260.
- [20] CASTENMILLER C, KEUMATIO-DOUNGTSOP B C, REE R V, et al. Tolerogenic immunotherapy: targeting DC surface receptors to induce antigen-specific tolerance[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 643240. DOI: 10.3389/fimmu.2021.643240.
- [21] BOURQUE J, HAWIGER D. Life and death of tolerogenic dendritic cells[J]. *Trends Immunol*, 2023, 44(2): 110-118. DOI: 10.1016/j.it.2022.12.006.
- [22] IBERG C A, BOURQUE J, FALLAHEE I, et al. TNF- $\alpha$  sculpts a maturation process in vivo by pruning tolerogenic dendritic cells[J]. *Cell Rep*, 2022, 39(2): 110657. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110657.
- [23] GARCÍA-GONZÁLEZ P A, MAGGI J, SCHINNERLING K, et al. Regulation of tolerogenic features on dexamethasone-modulated MPLA-activated dendritic cells by MYC[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1171. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01171.
- [24] SEN K, PATI R, JHA A, et al. NCoR1 controls immune tolerance in conventional dendritic cells by fine-tuning glycolysis and fatty acid oxidation[J]. *Redox Biol*, 2023, 59: 102575. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102575.
- [25] KENISON J E, STEVENS N A, QUINTANA F J. Therapeutic induction of antigen-specific immune tolerance[J]. *Nat Rev Immunol*, 2024, 24: 338-357. DOI: 10.1038/s41577-023-00970-x.
- [26] 杨志琦, 李明皓. 耐受性树突状细胞在肝移植免疫耐受中的作用研究进展[J]. *器官移植*, 2024, 15(4): 575-580. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2024039.
- YANG Z Q, LI M H. Research progress on the role of tolerogenic dendritic cells in immune tolerance of liver transplantation[J]. *Organ Transplant*, 2024, 15(4): 575-580. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2024039.
- [27] ŠVAJGER U, TEŠIĆ N, ROŽMAN P. Programmed death ligand 1 (PD-L1) plays a vital part in DC tolerogenicity induced by IFN- $\gamma$ [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 107978. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107978.
- [28] BOSTEELS V, MARÉCHAL S, DE NOLF C, et al. LXR signaling controls homeostatic dendritic cell maturation[J]. *Sci Immunol*, 2023, 8(83): eadd3955. DOI: 10.1126/sciimmunol.add3955.
- [29] NAVARRO-BARRIUSO J, MANSILLA M J, QUIRANT-SÁNCHEZ B, et al. Vitamin D<sub>3</sub>-induced tolerogenic dendritic cells modulate the transcriptomic profile of T CD4<sup>+</sup> cells towards a functional hyporesponsiveness[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 599623. DOI: 10.3389/fimmu.2020.599623.
- [30] LIU H, BAKTHAVATSALAM R, MENG Z, et al. PD-L1 signal on liver dendritic cells is critical for Foxp3(+)CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg and liver tolerance induction in mice[J]. *Transplant Proc*, 2013, 45(5): 1853-1855. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.03.015.
- [31] NAKANO R, YOSHIDA O, KIMURA S, et al. Donor plasmacytoid dendritic cells modulate effector and regulatory T cell responses in mouse spontaneous liver transplant tolerance[J]. *Am J Transplant*, 2021, 21(6): 2040-2055. DOI: 10.1111/ajt.16412.
- [32] VOGEL A, MARTIN K, SOUKUP K, et al. JAK1 signaling in dendritic cells promotes peripheral tolerance in autoimmunity through PD-L1-mediated regulatory T cell induction[J]. *Cell Rep*, 2022, 38(8): 110420. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110420.
- [33] DIKIY S, RUDENSKY A Y. Principles of regulatory T cell function[J]. *Immunity*, 2023, 56(2): 240-255. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.01.004.
- [34] THOMSON A W, SASAKI K, EZZELARAB M B. Non-human primate regulatory T cells and their assessment as cellular therapeutics in preclinical transplantation models[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 666959. DOI: 10.3389/fcell.2021.666959.
- [35] BEDNARSKI J J, ZIMMERMAN C, BERRIEN-ELLIOTT M M, et al. Donor memory-like NK cells persist and induce remissions in pediatric patients with relapsed AML after transplant[J]. *Blood*, 2022, 139(11): 1670-1683. DOI: 10.1182/blood.2021013972.
- [36] DUNETON C, WINTERBERG P D, FORD M L. Activation and regulation of alloreactive T cell immunity in solid organ transplantation[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2022, 18(10): 663-676. DOI: 10.1038/s41581-022-00600-0.
- [37] WONG P, CINA D P, SHERWOOD K R, et al. Clinical application of immune repertoire sequencing in solid organ transplant[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1100479. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1100479.
- [38] MA Y, SHI R, LI F, et al. Emerging strategies for treating autoimmune disease with genetically modified dendritic cells[J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 262. DOI: 10.1186/s12964-024-01641-7.

(收稿日期: 2024-08-08)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)