

可溶性 CD83 促进耐受性 DCs 和 T_{reg} 细胞增殖和免疫耐受的分子机制

宋奇锋,高良辉,李 望,张译中

摘要 目的 探索可溶性 CD83 (sCD83) 发挥免疫抑制活性的分子机制。**方法** 分离 6~8 周龄 C57B/6 小鼠骨髓祖细胞培养骨髓衍生树突细胞 (DCs) 和脾脏内 CD4⁺ T 细胞。分别向细胞培养物中加入 10 μ l PBS 处理 (Control 组) 或 10 μ l 10 μ g/ml 的可溶性 CD83 处理 (sCD83 组)。流式细胞术测定 DCs 中的非成熟 DCs (imDCs) 和 CD4⁺ T 细胞中的 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T 细胞,即调节性 T (T_{reg}) 细胞的细胞计数所占百分比。Western blot 测定 imDCs 胞内吡哆胺 2,3-双加氧酶 (IDO) 的表达水平及 T_{reg} 细胞内磷酸酶及张力蛋白同源物 (PTEN)、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt)、蛋白激酶 B (Akt)、细胞核和细胞质核因子- κ B 亚基 RelB 和程序性细胞死亡蛋白-1 (PD-1) 的表达水平。ELISA 测定 DCs 培养上清液中犬尿酸的水平以及 imDCs 和 CD4⁺ T 细胞共培养系统中白细胞介素 (IL)-10、转化生长因子- β (TGF- β) 和 IL-12 的水平。**结果** 与 Control 组相比,sCD83 组表达表面标志物 CD40、CD83、CD86、II 类主要组织相容性复合物 (MHC II) 的 DCs 细胞计数所占百分比降低 ($P < 0.05$);DCs 培养上清液中犬尿酸的水平上升 ($P < 0.05$)。与 Control 组相比,sCD83 组 T_{reg} 细胞计数所占百分比升高 ($P < 0.05$);胞内 PTEN 和细胞质 RelB 的表达增强 ($P < 0.05$),而 p-Akt、细胞核 RelB 和 PD-1 的表达降低 ($P < 0.05$);Akt 的表达水平差异无统计学意义。在 imDCs 与 CD4⁺ T 细胞共培养物上清液中,与 Control 组相比,sCD83 组 IL-10 和 TGF- β 的水平升高 ($P < 0.05$),IL-12 的水平降低 ($P < 0.05$)。**结论** sCD83 能够抑制 CD4⁺ T 细胞核内 RelB 的水平调节相关细胞因子的分泌,影响 DCs 和 T_{reg} 细胞的细胞间通讯,促进耐受性 imDCs 和 T_{reg} 细胞的增殖。

关键词 免疫抑制剂;可溶性 CD83;耐受性 DCs;调节性 T 细胞;核因子- κ B 亚基 RelB;吡哆胺 2,3-双加氧酶

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1300-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.009

2023-06-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81560265);海南省自然科学基金(编号:821RC707)

作者单位:海南医学院第一附属医院肝胆胰外科,海口 570100

作者简介:宋奇锋,男,主治医师;

高良辉,男,主任医师,责任作者,E-mail:1057872686@qq.com

由于移植后免疫抑制等方法的改进,肝移植后的存活率逐步提高,并已成为终末期肝病的主要治疗方法。肝移植后,需要长期进行免疫抑制,以避免严重的急慢性排斥反应和移植丢失。目前,免疫抑制剂仍主要为钙调神经磷酸酶抑制剂 (calcineurin inhibitors, CNIs),但存在移植后并发症如肾损伤、新发癌症、病原体感染等^[1-2]。未来需要开发新的针对特定炎症细胞的选择性免疫抑制剂。CD83 是免疫球蛋白超家族成员,有膜结合或可溶性形式两种。可溶性 CD83 (soluble CD83, sCD83) 具有免疫抑制功能^[3-5]。抗 CD83 特异性抗体在移植抗宿主病 (graft-vs-host disease, GVHD) 的临床前模型中显示出良好的功效,且不会影响病毒或肿瘤特异性记忆 T 细胞的反应^[6]。但二者具体的作用方式和机制仍不清楚。该研究拟探讨 sCD83 对未成熟树突细胞 (dendritic cells, DCs) 和调节性 T (regulatory T, T_{reg}) 细胞数量和比例的影响,以及其发挥免疫抑制的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 2 只 6~8 周龄 C57B/6 小鼠,体重 (22 $\pm$ 3) g,购自海南省药物研究所有限责任公司;实验动物生产许可证号:SCXK (琼) 2020-0007。小鼠饲养于恒温 (23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、恒湿、12 h/12 h 光/暗循环的标准 SPF 级鼠房,饲喂啮齿类动物标准饲料,自由进食和饮水。

1.1.2 试剂与仪器 sCD83 (货号:SRP6207)、重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) (货号:SRP3201)、重组小鼠白细胞介素 (interleukin, IL)-4 (货号:SRP3211)、蛋白酶抑制剂混合物 (P8465) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (货号:16140071)、RPMI-1640 (货号:31800022) 购自美国 Thermo Fisher 公司;细胞核蛋白提取试剂盒 (P1202-50) 购自北京普利莱生物有限公司;Alexa fluor 488 标记的兔抗小鼠 CD40

(货号: ab302971)、CD86(货号: ab290990)、CD83(货号: ab286828)、II类主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex class II, MHC II)(货号: ab203323)、Alexa fluor 488 标记的兔 IgG 单抗(货号: ab199091)、FITC 标记的抗 CD4 单克隆抗体(货号: ab59474)、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的抗 CD25 单克隆抗体(货号: ab210335)、抗 FOXP3 单克隆抗体(货号: ab218773)以及兔抗小鼠-磷酸酶和张力蛋白同源物单抗(phosphatase and tensin homolog, PTEN)(货号: ab267787)、兔抗小鼠蛋白激酶 B 单抗(protein kinase B, Akt)(货号: ab283852)、兔抗小鼠磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated-protein kinase B, p-Akt)单抗(Thr 308)(货号: ab8933)、兔抗小鼠核因子 κ B 亚基 RelB 单抗(货号: ab33907)、兔抗小鼠程序性细胞死亡蛋白-1(programmed cell death 1, PD-1)单抗(货号: ab52587)购自美国 Abcam 公司;淋巴细胞分离液(货号: 70-HLSM1077)购自杭州联科生物公司;CD4⁺ T 细胞分离试剂盒(货号: 130-091-301)、抗 FITC MicroBeads(货号: 130-048-701)、抗 PE MicroBeads(货号: DXT-130-097-054)、LS + 磁珠分选柱(货号: 130-042-401)、MiniMACS Starting Kit(货号: 130-090-312)购自德国 Miltenyi Biotec 公司;小鼠 IL-10(货号: ml037888)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)(货号: ml057830)、IL-12(货号: ml037881)和犬尿酸(货号: ml042437) ELISA 试剂盒购自上海酶联生物有限公司;流式细胞仪(型号: Calibur)购自美国 BD 公司;酶标仪(型号: Synergy H4)购自美国 BioTek 公司。

1.2 方法

1.2.1 体外细胞实验分组和处理方法 体外细胞实验分为 2 组: Control 组, 向细胞培养物中加入 10 μ l PBS 处理; sCD83 组: 向细胞培养物中加入 10 μ l 10 μ g/ml 的可溶性 CD83(溶解于 PBS 缓冲液)处理^[7]。

1.2.2 DCs 的分离和培养 从 C57B/6 小鼠骨髓祖细胞培养骨髓衍生的 DCs。实验方法为: 通过 CO₂ 室息法安乐死小鼠, 分离其股骨和胫骨, 使用冰预冷的 PBS 缓冲液将其中的骨髓冲洗下来, 置于 10 ml 离心管中, 于 4 $^{\circ}$ C 以 220 r/min 离心 10 min, 收获细胞沉淀。使用补充有 15% FBS 的 RPMI-1640 培养液重悬细胞沉淀并转移至 6 孔板中, 添加含有 100 U/ml 青链霉素的 RPMI-1640 + 15% FBS 培养液, 并加入终浓度均为 10 ng/ml 的重组小鼠 GM-

CSF 和重组小鼠 IL-4, 置细胞于 37 $^{\circ}$ C 恒温湿润的 CO₂ 细胞培养箱中对其进行培养。次日去除非贴壁细胞并更换为新鲜的含有终浓度均为 20 ng/ml 重组 GM-CSF 和 10 ng/ml 重组小鼠 IL-4 的 RPMI-1640 + 15% FBS 培养液继续培养。每隔 1 d 更换 1 次新鲜培养液, 3 d 后开始收获松散贴壁的聚集增殖的 DCs^[7]。

1.2.3 流式细胞术测定 DCs 表面标志物 DCs 用 Alexa fluor 488-标记的兔抗小鼠 CD40、CD86、CD83、MHC II 单克隆抗体进行染色, Alexa fluor 488 标记的兔 IgG 单抗作为 Isotype control。然后使用 Calibur 流式细胞仪对表达对应表面标志物的细胞进行计数。

1.2.4 T_{reg} 细胞的分离和流式细胞术分选 通过 CO₂ 室息法安乐死小鼠, 取小鼠脾脏, 放入盛有 Hank's 溶液的细胞培养皿中。使用组织研磨棒在 200 目的尼龙筛网上旋转挤压脾脏, 使组织内的细胞通过筛网。然后去掉尼龙筛网, 将细胞悬液收集至一个 15 ml 离心管中, 于 4 $^{\circ}$ C 以 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。向细胞沉淀中加入 5 ml 红细胞裂解液, 充分重悬细胞沉淀, 于室温孵育 2 min, 于 4 $^{\circ}$ C 以 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。加入冰预冷的 Hank's 溶液再次重悬细胞沉淀, 加入淋巴细胞分离液, 离心使细胞分层, 吸取血浆和淋巴细胞分离液之间的单核细胞层, 其中含有淋巴细胞和单核细胞。加入等体积 Hank's 溶液稀释单核细胞层, 室温以 800 r/min 离心 10 min, 保留细胞沉淀, 弃上清液。再次加入 Hank's 溶液重悬细胞沉淀。使用 CD4⁺ T 细胞分离试剂盒纯化 CD4⁺ CD25⁻ 和 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞, 即 T_{reg} 细胞。将细胞重悬于含牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的 PBS 缓冲液(pH 7.2, 另含 0.5% BSA 和 2 mmol/L EDTA)中。淋巴细胞用 FITC-标记的抗-CD4 单抗和抗-FITC MicroBeads 标记, 然后在 LS⁺ 磁珠分选柱上纯化。然后 CD4⁺ T 细胞与 MiniMACS Starting Kit 中的释放试剂共同孵育, 去除结合的微珠。使用 PE 标记的抗 CD25 单抗和抗 PE MicroBeads 分选 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞。通过流式细胞术使用 PE-标记的抗-FOXP3 单抗分析 T 细胞, 分选并计数 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T 细胞, 即 T_{reg} 细胞。

1.2.5 T_{reg} 细胞核和胞质蛋白提取 使用细胞核蛋白提取试剂盒提取 T_{reg} 细胞核蛋白。收集分选获得的 T_{reg} 细胞, 每次提取 (1 ~ 2) $\times 10^7$ 个细胞/样品。在 4 $^{\circ}$ C 下以 880 r/min 离心细胞 5 min。加入 1 ml

冰预冷的试剂盒自带的 Buffer-1, 振荡重悬细胞, 冰水浴孵育 5 min。加入 50 μ l 试剂盒自带的 Reagent-A 试剂, 剧烈振荡混合, 冰水浴孵育 5 min。然后再次剧烈振荡。使用 22 号针头反复多次抽吸细胞裂解物, 利用剪切力充分裂解细胞。在光学相差显微镜下观察未裂解细胞应少于 5%, 然后进行下一步。将制备好的细胞匀浆物转移至一个新的 EP 管中, 在 4 $^{\circ}$ C 下以 1 100 r/min 离心细胞 3 min, 然后再在 4 $^{\circ}$ C 下沉淀细胞核; 上清液为细胞质溶液, 转移至一个新 EP 管中, 备用。加入 0.5 ml 试剂盒自带的 Buffer-2 重悬细胞核。在 4 $^{\circ}$ C 下以 2 200 r/min 离心细胞 10 min, 洗细胞核。重复洗细胞核 1 次。在光学相差显微镜下观察细胞核应游离分散于清亮背景下, 而无颗粒物质(此为细胞质成分残留)。弃上清液, 用 100 μ l 试剂盒自带的缓冲液重悬细胞核, 进行下游细胞核总蛋白的提取。使用 RIPA 裂解液分别裂解细胞质和细胞核提取物, 随后按照标准操作分别提取其总蛋白质即可。

1.2.6 混合淋巴细胞反应 将来源于小鼠骨髓的原代同种异体骨髓衍生 DCs 与分离获得的 CD4⁺ T 细胞按照 DC : T 细胞 = 1 : 5 的比例进行混合, 置于 6 孔板中共培养。向混合细胞中添加 RPMI-1640 + 10% FBS 的完全培养液, 连续共培养 3 d, 收集细胞培养物上清液, 进行下游 ELISA 测定。

1.2.7 ELISA 测试 按照试剂盒说明书给出的操作指南, 使用小鼠 IL-10、TGF- β 、IL-12 和犬尿酸 ELISA 试剂盒对细胞上清液中的相应项目成分进行测定。使用酶标仪进行检测。

1.2.8 Western blot 检查 使用 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂)对细胞进行裂解, 提取其总蛋白质。室温下使用含 10% 脱脂奶粉的 TBS 缓冲液对 PVDF 膜进行封闭 1 h。随后向 PVDF 膜上滴加一抗工作液, 于 4 $^{\circ}$ C 共同孵育过夜。次日向 PVDF 膜上滴加二抗工作液, 于室温共同孵育 1 h。抗体工作浓度如下: PTEN(稀释度 1 : 1 500), p-Akt(Thr 308)(稀释度 1 : 1 000), Akt(稀释度 1 : 1 500), 细胞核 RelB(稀释度 1 : 2 000)、细胞质 RelB(稀释度 1 : 1 500)、PD-1(稀释度 1 : 1 000)。使用 ECL 化学发光底物对目的条带进行显影。

1.3 统计学处理 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。使用 GraphPad Prism v8 软件进行统计学分析。两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 sCD83 促进未成熟 DCs (immature DCs, imDCs) 增殖并上调吲哚胺 2,3-双加氧酶 (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 的表达 与 Control 组相比, sCD83 组表达表面标志物 CD40、CD83、CD86、MHC II 的 DCs 细胞计数降低 ($P < 0.05$), 见图 1A、B。Western blot 结果显示, 分选获得的低表达 CD40、CD83、CD86、MHC II 的 imDCs 胞内 IDO 的表达水平升高 ($P < 0.05$), 见图 1C、D。ELISA 结果显示, 与 Control 组相比, sCD83 组 DCs 细胞培养上清液中犬尿酸的水平升高 ($t = 11.12, P < 0.05$), 见图 1E。

2.2 sCD83 促进 T_{reg} 细胞增殖并调节 PTEN/Akt 通路 流式细胞术结果显示, 与 Control 组相比, sCD83 组 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T 细胞, 即 T_{reg} 细胞计数升高 ($P < 0.05$), 见图 2A、B; Western blot 结果显示, 与 Control 组相比, 分选获得的 T_{reg} 细胞内 PTEN 的表达水平升高 ($P < 0.05$), p-Akt (Thr 308) 的表达水平降低 ($P < 0.05$), Akt 的表达水平无明显变化, 见图 2C、D。

2.3 sCD83 抑制 T_{reg} 细胞核内 RelB 并下调 PD-1 的表达 Western blot 结果显示, 分选获得的 T_{reg} 细胞核内 RelB 的表达水平降低 ($P < 0.05$), 胞质 RelB 的表达水平升高 ($P < 0.05$), PD-1 的表达水平降低 ($P < 0.05$)。见图 3A、B。

2.4 sCD83 对 imDCs 与 T_{reg} 细胞共培养物中免疫抑制因子的表达水平的影响 用 ELISA 测定 imDCs 与 CD4⁺ T 细胞共培养物上清液中 IL-10、TGF- β 和 IL-12 的水平, 与 Control 组相比, sCD83 组 IL-10 和 TGF- β 的水平升高 ($P < 0.05$), IL-12 的水平降低 ($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

DCs 是高度特化且功能多样的抗原呈递细胞 (APCs), 负责控制先天性和适应性免疫反应。DCs 起源于骨髓祖细胞, 可通过不同刺激分化为免疫反应性或免疫耐受性 DCs。在器官移植中, DCs 在决定移植器官的命运方面发挥着至关重要的作用: 宿主对移植器官的排斥或接受, 取决于 DCs 的免疫耐受性或免疫反应性功能^[8]。研究^[8]显示, 免疫耐受性 DCs 与同种异体移植物的存活率呈正相关, 在非人灵长类动物的各种器官移植模型中, 免疫耐受性 DCs 能够延长同种异体移植物的存活率。已有研

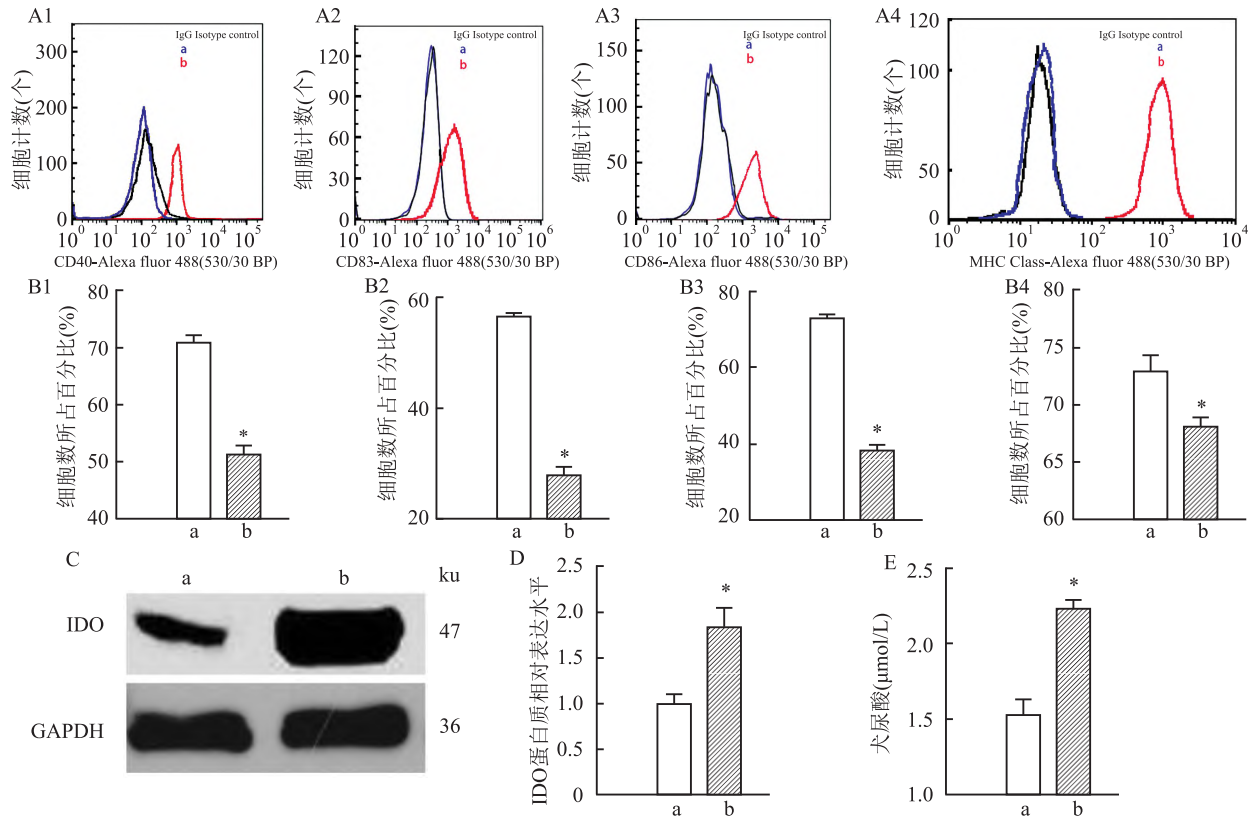


图1 体外培养 DCs 中 imDCs 的定向分化情况测定

A、B:流式细胞术测定体外培养 DCs 中表达表面标志物的 DCs 细胞计数结果图和统计结果柱状图;1:CD40;2:CD83;3:CD86;4:MHC II;
C、D:Western blot 测定分选获得的 imDCs 胞内 IDO 蛋白质的表达水平结果图和统计结果柱状图;E:ELISA 测定体外培养 DCs 细胞上清液中犬尿酸的水平;a:Control 组;b:sCD83 组;与 Control 组比较: * $P < 0.05$

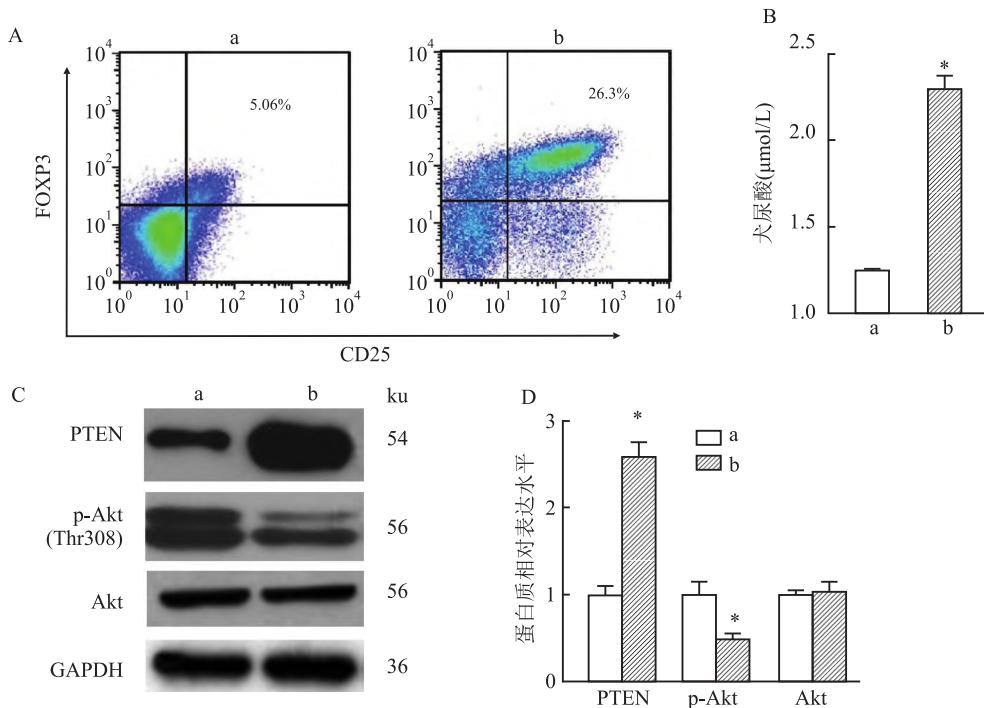


图2 体外培养 CD4⁺ T 细胞中 T_{reg} 细胞的定向分化情况测定

A、B:流式细胞术测定体外培养 CD4⁺ T 细胞中 T_{reg} 细胞的定向分化情况结果图和统计结果柱状图;C、D:Western blot 测定分选获得的 T_{reg} 胞内 PTEN、p-Akt 和 Akt 蛋白质的表达水平结果图和统计结果柱状图;a:Control 组;b:sCD83 组;与 Control 组比较: * $P < 0.05$

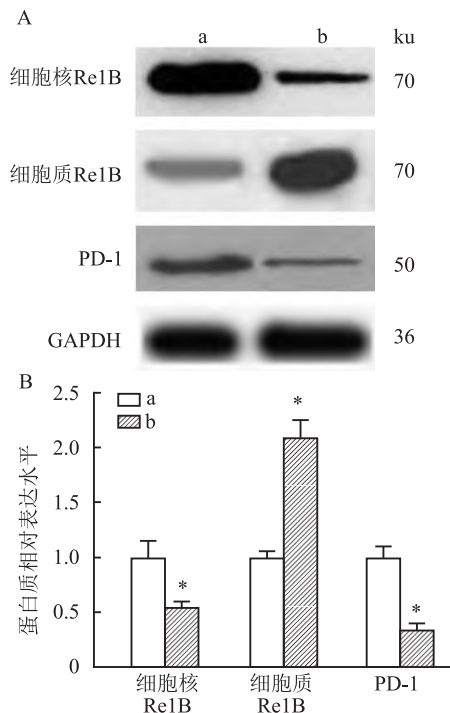


图3 T_{reg} 细胞中 RelB 和 PD-1 的表达情况测定

A、B: Western blot 测定分选获得的 T_{reg} 细胞核内、胞质内 RelB 和 PD-1 的表达情况结果图和柱状图统计结果; a: Control 组; b: sCD83 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

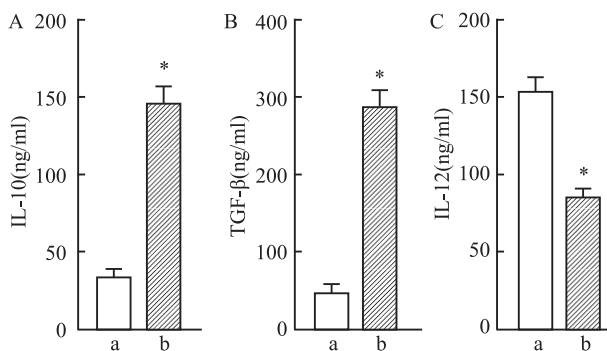


图4 ELISA 测定 imDCs 与 $CD4^+$ T 细胞共培养物上清液中免疫抑制因子的表达情况

A: IL-10; B: TGF-β; C: IL-12; a: Control 组; b: sCD83 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

究^[9]显示,通过调节细胞表面分子防止 DCs 成熟可维持 DCs 的免疫耐受性,imDCs 在维持免疫耐受中十分关键。与成熟 DCs 相比,imDCs 表面标志物 CD40、CD83、CD86 和 MHC II 表达下调。本研究结果显示,与 Control 组相比,sCD83 处理后表达表面标志物 CD40、CD83、CD86、MHC II 的 DCs 细胞计数所占百分比降低,表明在 DCs 细胞群内,有更多的 imDCs,进而可能会介导维持机体的免疫耐受状态。

T_{reg} 细胞是 $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ T 细胞,在人

和小鼠中来源于胸腺和外周 $CD4^+$ T 细胞。 T_{reg} 细胞在维持宿主免疫耐受方面也发挥重要功能。 T_{reg} 细胞可以通过释放 TGF-β 和 IL-10,下调 IL-12 的表达使 DCs 保持未成熟状态^[10]。转录因子 RelB 是核因子-κB 家族成员,在介导免疫反应中起关键作用。在细胞水平上,RelB 表达主要限于 DCs、T 细胞、B 细胞和单核细胞中。当其转位至细胞核中,RelB 作为核因子-κB 转录因子的组分发挥促进 DCs 成熟的功能;而胞质内 RelB 为无活性状态^[11]。与髓源性 DCs 成熟相关的表面标志物,如 MHC II、CD80、CD86 和 CD40,在 RelB 缺陷型小鼠中表达减少^[12]。本研究结果显示,与 Control 组相比,sCD83 处理后 imDCs 与 $CD4^+$ T 细胞共培养物上清液中 IL-10 和 TGF-β 的水平升高,IL-12 的水平降低,且 sCD83 能够下调 $CD4^+$ T 细胞核内 RelB 的水平,说明 sCD83 可能通过调节 $CD4^+$ T 细胞核内 RelB 的水平,调控相关细胞因子的表达,从而促进 imDCs 与 T_{reg} 细胞协同作用,增强两种细胞发挥免疫耐受活性的功能。

IDO 是免疫调节因子,并且与色氨酸代谢相关。IDO 可促进色氨酸分解为犬尿酸并调节 T_{reg} 细胞的分化,以维持 T 细胞的免疫耐受性^[13]。与此同时,微环境中的犬尿酸水平升高也能通过正反馈回路促进 IDO 的上调表达。干扰素-γ 可通过激活 Toll-样受体 3 (TLR3)-依赖的 IDO/犬尿酸通路增强犬骨髓间充质干细胞的免疫耐受能力^[14]。本研究中也显示,sCD83 处理后,imDCs 胞内 IDO 的表达水平上调,并促进了 DCs 细胞群培养物上清液中犬尿酸的水平。说明 sCD83 也能通过调节 IDO 和犬尿酸的水平对 DCs 发挥免疫抑制功能。

最近的报道^[15]显示,在体实验中 PD-1 调节 T_{reg} 细胞的免疫抑制功能,PD-1 表达缺陷后 T_{reg} 细胞的免疫抑制功能得以发挥,从而改善了实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠和糖尿病小鼠的疾病进展,说明了 PD-1 表达缺陷对于强效发挥 T_{reg} 细胞免疫抑制功能的体内意义。本研究结果也支持这一研究结论,与 Control 组相比,sCD83 处理后下调了 PD-1 的表达水平。小鼠 T_{reg} 细胞中 PTEN 基因缺失会破坏 T_{reg} 细胞的免疫耐受性表型的稳定性,这会阻止移植植物或肿瘤在其微环境中形成免疫耐受^[16]。p-Akt 抑制 T_{reg} 细胞的发育^[17]。相对高水平的 T_{reg} 细胞对于宿主免疫耐受十分重要,而本次研究结果表明,sCD83 能够通过下调核内 RelB 的水平、上调 PTEN,抑制 PD-1 和 Akt,促进 $CD4^+$ T 细胞向 T_{reg} 细胞的分化,维持免疫耐受状态。

基于以上研究,推断 sCD83 的免疫抑制活性,很可能是通过调节 CD4⁺ T 细胞核内 RelB 的水平,促进其向 T_{reg} 细胞方向分化,调节细胞因子 IL-10、TGF-β 和 IL-12 的分泌,影响 DCs 和 T_{reg} 细胞的细胞间通讯,并影响 IDO 和 PD-1 的表达和 PTEN/Akt 通路的活性,以进一步维持免疫耐受状态所需要的 imDCs 和 T_{reg} 细胞的细胞数量和比例。即 sCD83 能够通过抑制 T_{reg} 细胞核内 RelB 的水平调节相关细胞因子的分泌影响 DCs 和 T_{reg} 细胞的细胞间通讯,促进耐受性 imDCs 和 T_{reg} 细胞的增殖。然而,该研究未深入探索 sCD83 调节核内 RelB 的水平的具体分子机制,这是进一步要研究的内容。

参考文献

- [1] 于 瑞,叶海丹,陈利芬,等. 肝移植受者免疫抑制剂症状困扰与服药依从性的相关性研究[J]. 实用器官移植电子杂志, 2022,10(3):237-41.
- [2] 张 文,朱传龙. 肝移植后免疫抑制状态下继发感染对策及展望[J]. 医学研究生学报, 2022,35(7):673-9.
- [3] Grosche L, Knippertz I, König C, et al. The CD83 molecule-an important immune checkpoint[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 721.
- [4] Xiong L, Wang D, Lin S, et al. Soluble CD83 inhibits acute rejection by up regulating TGF-β and IDO secretion in rat liver transplantation [J]. *Transpl Immunol*, 2021, 64:101351.
- [5] McHugh J. Soluble CD83: a proresolving mediator in inflammatory arthritis? [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15(6):319.
- [6] Shrestha B, Walton K, Reff J, et al. Human CD83 – targeted chimeric antigen receptor T cells prevent and treat graft-versus-host disease [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(9):4652-62.
- [7] Zhang Y X, Zhang G F, Liu Y L, et al. GDF15 regulates malat-1 circular RNA and inactivates NFκB signaling leading to immune tolerogenic DCs for preventing alloimmune rejection in heart transplantation[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:2407.
- [8] Huang H, Lu Y, Zhou T, et al. Innate immune cells in immune tolerance after liver transplantation[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2401.
- [9] Machcińska M, Kotur M, Jankowska A, et al. Cyclosporine A, in contrast to rapamycin, affects the ability of dendritic cells to induce immune tolerance mechanisms[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2021, 69(1):27.
- [10] Liu M, Li S, Li M O. TGF-β control of adaptive immune tolerance: a break from T_{reg} cells[J]. *Bioessays*, 2018, 40(11): e1800063.
- [11] Chung C Y, Ysebaert D, Berneman Z N, et al. Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance [J]. *Clin Dev Immunol*, 2017, 2013:972865.
- [12] Seki T, Yamamoto M, Taguchi Y, et al. Visualization of RelB expression and activation at the single-cell level during dendritic cell maturation in Relb-venus knock-in mice[J]. *J Biochem*, 2018, 158(6):485-95.
- [13] Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(3):727-42.
- [14] Deng J, Li D, Huang X, et al. Interferon-γ enhances the immunosuppressive ability of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells by activating the TLR3-dependent IDO/kynurenine pathway[J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(9):8337-47.
- [15] Tan C L, Kuchroo J R, Sage P T, et al. PD-1 restraint of regulatory T cell suppressive activity is critical for immune tolerance[J]. *J Exp Med*, 2021, 218(1):e20182232.
- [16] Munn D H, Sharma M D, Johnson T S, et al. IDO, PTEN-expressing Tregs and control of antigen-presentation in the murine tumor microenvironment[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(8):1049-58.
- [17] Abdullah L, Hills L B, Winter E B, et al. Diverse roles of Akt in T cells[J]. *Immunometabolism*, 2021, 3(1):e210007.

The mechanisms of soluble CD83 in promoting proliferation ability of tolerant DCs and T_{reg} cells and in sustaining immune tolerance status

Song Qifeng, Gao Lianghui, Li Wang, Zhang Yizhong

(Dept of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570100)

Abstract Objective To explore the molecular mechanisms of immunosuppressive activity of soluble CD83 (sCD83). **Methods** Bone marrow-derived dendritic cells (DCs) and CD4⁺ T cells in the spleen were isolated from bone marrow progenitor cells of 6-8-week-old C57B/6 mice. DCs and CD4⁺ T cells were treated with 10 μl PBS (Control group) or 10 μl 10 μg/ml soluble CD83 (sCD83 group), respectively. Immature DCs (imDCs) in DCs and CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T cells (T_{reg} cells) in CD4⁺ T cells were determined by flow cytometry. Western blot was used to determine the expression levels of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in imDCs and the expres-

(下转第 1312 页)

- the rapid antidepressant effects of ketamine[J]. *Trends Neurosci*, 2019, 42(3):179–91.
- [13] Yang Y, Cui Y, Sang K, et al. Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression[J]. *Nature*, 2018, 554(7692):317–22.
- [14] Li K, Zhou T, Liao L, et al. β CaMKII in lateral habenula mediates core symptoms of depression[J]. *Science*, 2013, 341:1016–20.

Effects of an ultradian light on periodic expression of glutamate receptors in the SCN and LHB

Li Jiayi, Jin Qiaoling, Wang Liecheng, Cheng Juan

(Dept of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract *Objective* To explore the effects of an ultradian light cycle on the periodic expression of glutamate receptors in the suprachiasmatic nucleus and the lateral habenula nucleus. *Methods* An ultradian light cycle T7 (3.5 hours/3.5 hours light; dark) was used to establish an ultradian light cycle model group and T24 (12 hours/12 hours light; dark) was used to establish control group. The expression of key proteins in the brain regions of the suprachiasmatic nucleus (SCN) and the lateral habenula (LHB) of the hypothalamus were analyzed by Western blot. Including glutaminergic receptors, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptors, and downstream signaling molecules. *Results* Western blot results showed that the expression of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor subunit 2 (GluR2) in SCN under Zeitgeber time (ZT) 1 and ZT 5 increased under an ultradian light cycle compared with normal photoperiod ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the overall expression of GluR2 in T7 group was higher than that in T24 group ($P < 0.01$), the overall expression of GluR2 in LHB group T7 was lower than that in T24 group ($P < 0.01$). Compared with T24 photoperiod, the overall expression of N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit 2 (NR2B) in SCN increased under T7 photoperiod ($P < 0.05$), the overall expression of phosphorylation of extracellular signal-related kinase (P-ERK) in LHB significantly increased under T7 photoperiod ($P < 0.05$). *Conclusion* An ultradian light cycle would cause an up-regulating of GluR2 and NR2B expression, a down-regulating of GluR2 expression and up-regulating P-ERK expression in LHB. **Key words** an ultradian light cycle; lateral habenula; suprachiasmatic nucleus; glutamate receptors

(上接第 1305 页)

sion levels of phosphatase and tensin homolog (PTEN), phosphorylated-Akt serine/threonine kinase 1 (p-Akt), Akt, nucleus NF- κ B subunit (RelB), cytoplasm RelB and programmed cell death 1 (PD-1) in T_{reg} cells. ELISA was used to determine the level of kynurenine in DCs culture supernatant, and the levels of interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor- β (TGF- β) and IL-12 in imDCs and $CD4^+$ T cells co-culture system. *Results* Compared with Control group, the percentage of DCs cell counts expressing the surface markers of CD40, CD83, CD86 and major histocompatibility complex class-II (MHC II) in sCD83 group decreased ($P < 0.05$), with the level of kynurenine in DCs culture supernatant increased ($P < 0.05$). Compared with Control group, the percentage of T_{reg} cell counts in sCD83 group increased ($P < 0.05$), with the expression levels of PTEN and cytoplasm RelB enhanced ($P < 0.05$), while the expression levels of p-Akt, nucleus RelB and PD-1 decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression level of Akt between the two groups. In the imDCs and $CD4^+$ T cells co-cultured supernatants, compared with Control group, the levels of IL-10 and TGF- β increased, and the level of IL-12 decreased in sCD83 group ($P < 0.05$). *Conclusion* sCD83 can inhibit $CD4^+$ T cells nucleus RelB levels and regulate cytokines secretion so as to have an effects on cellular crosstalk of imDCs and T_{reg} cells and promote imDCs and T_{reg} cells proliferation.

Key words immunosuppressive agent; soluble CD83; tolerant DCs; T_{reg} cells; RelB; indoleamine 2,3-dioxygenase