文章编号:1000-5404(2005)10-1003-03

论著

选择素在大鼠同种异体皮肤移植皮片的表达

王军琳,金 岩,刘晓亮 (第四军医大学口腔医院病理科,西安 710032)

提 要:目的 通过检测选择素 P、选择素 E 在同种异体大鼠皮肤移植后免疫排斥反应中的表达,研究组织工程皮肤的组织相容性。**方法** 取 SD 大鼠皮肤和实验室培养的组织工程 SD 大鼠皮肤移植于成年 Wistar 大鼠,移植成功后取不同时间点标本用免疫组织化学方法检测选择素 P、选择素 E 在组织中的表达。**结果** 同种异体皮肤移植组,选择素 P、选择素 E 有显著表达,组织工程皮肤移植后,局部组织中水平显著低于同种异体皮肤移植组。**结论** 选择素 P、选择素 E 的改变与同种异体皮肤移植后的免疫排斥反应呈正相关,组织工程皮肤只具有很弱的免疫原性,不引起显著的排斥反应。

关键词:组织工程;选择素 E;选择素 P;免疫排斥
中图法分类号:R392.11; R392.13; R622.1 **文献标识码**:A

Expression of selectin E and P in skin allograft in rats

WANG Jun-lin, JIN Yan, LIU Xiao-liang (Department of Pathology, Stomatological College, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To study the histocompatibility of tissue engineered skin with the observation of the effects of selectins E and P on the immunological rejection after skin allograft in rats. **Methods** Tissue engineered skin was prepared as follows: The materials obtained from the neonatal SD rats were cultured and then grafted onto the adult Wistar rats. The expression of selectins E and P in the grafted skin was determined with immunohistochemical staining. **Results** The expression of selectins E and P was significantly higher in the rats with allograft than in the rats with the grafts of tissue-engineered material. **Conclusion** Selectins E and P play an important role in the immunological rejection after allograft of skin but the tissue-engineered skin graft possesses favorable histocompatibility and shows no obvious immunological rejection.

Key words: tissue engineering; selectin E; selectin P; immunologic rejection

皮肤是覆盖与保护体表及内脏器官的重要组织,由于炎症、外伤等原因常造成皮肤缺损和异常。对于皮肤缺损目前多采用自体移植或同种异种、异种皮肤移植,以及新兴的组织工程皮肤移植。但同种异体和异种皮肤移植常因组织相容性不理想,诱发免疫排异反应而告失败,而组织工程皮肤具有相对较低的免疫原性。选择素(selectin)是血管粘附分子大家族中的一大类成员,根据表达部分可分为 3 类:① E-selectin (ELAM-1,CD62E)表达于活化的内皮细胞 (endothelial cell, EC)表面;② L-selectin(LAM-1, Leu8, TQ1, CD62L)表达于白细胞表面;③ P-selectin (CD62P, GMP140, PADGEM protein)则表达于活化的血小板和 EC 表面[1]。选择素在组织移植后免疫排斥反应中起重要作用,在炎性反应过程中,通过与相应配体结合介导白细胞与管壁接触,使白细胞在血管壁上缓慢滚动,从而启动一系列反应,最终导致白细胞在炎性反应区域集中[2]。本研究对这两种因子在同种异体皮肤移植中发挥的作用加以研究,同时探讨组织工程皮肤的免疫原性。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级雄性 SD 大鼠 15 只(第四军医大学实验动物中心提供)体质量(200 ± 20) g。清洁级雄性 Wistar 大鼠 30 只(北京大学医学院动物中心提供)体质量(200 ± 20)g。兔抗鼠选择素 P、选择素 E 多克隆抗体购自博士德公司。免疫组化用 Dako 公司的 LSAB 即用型试剂盒。图像分析用同济大学 HPIAS-1000 高清晰度彩色图像分析系统。

1.2 方法

1.2.1 组织工程皮肤的构建 无菌条件下取 SD 新生仔鼠背部皮肤,去除皮下组织,用含抗生素的 PBS 冲洗,将标本切成规则的细条状,置于 2.5 mol/L 的胰酶中,4 ℃过夜,仔细将表皮与真皮分离,分别放置不同的平皿中。将真皮成纤维细胞以 1.5×10^8/L 的密度与提取自小牛皮的Ⅰ型胶原混合,37 ℃孵育

作者简介:王军琳(1970-),女,重庆市人,主治医师,讲师,主要从事组织工程方面的研究,发表论文 23 篇。电话:(029)83376026

收稿日期:2005-01-30;修回日期:2005-04-10

凝固后，加入培养液培养过夜；次日在其表面以 1×10^9/L 密度接种角朊细胞，继续培养至细胞汇集成片，将此细胞-胶原复合体升至气液面进行器官培养，培养 1 周即获得组织工程皮肤，冻存备用。

1.2.2 手术方法与分组 20 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射 30～50 g/L 麻醉，在大鼠背部切取全层皮作圆形创面，直径 3 cm，以供皮肤移植。实验共分为 3 组：①自体移植组：SD 大鼠 15 只，做自体皮片回植，取全层皮片，仔细去除皮下组织并回植于创面，7-0 线缝合，加压包扎，作为阴性对照，以排除手术操作技术、术后皮片感染和移植皮片移动等人为因素致皮片坏死的可能性；②异体移植组：以 SD 大鼠为供皮鼠，Wistar 大鼠作为受皮鼠（$n=15$），手术方法同前；③组织工程皮肤组：Wistar 大鼠作为受皮鼠（$n=15$），手术同前。各组均于术后 7 d 拆除加压缝合包，10 d 拆线，逐日观察皮片情况。第 7、10、14、20、30 天取标本。

1.2.3 免疫组织化学方法检测选择素 P、E 组织切片脱蜡至水后，3 g/L H_2O_2 封闭 10 min，入 PBS 缓冲液 5 min 3 次，37 ℃ 马血清封闭 30 min，分别加选择素 P、E 抗体 4 ℃过夜，入 PBS 缓冲液 5 min 3 次，羊抗兔 IgG 37 ℃ 30 min，入 PBS 缓冲液 5 min 3 次，链霉亲和素 37 ℃ 30 min，DAB 显色液显色 5 min，染色同时用 PBS 代替多抗作为阴性对照。

1.2.4 图像分析定量 利用同济大学 HPIAS-1000 高清晰度彩色图像分析系统，每次测量前均用同一切片的空白区矫正并重新调节光源，以达到不同标本测量方法相同，空白区平均灰度值定为 255，着色愈深，灰度值愈小。每张切片随机选取移植皮肤阳性区域测量，以减少人为误差。通过自动测量，得出每个阳性单位的平均灰度值。

1.3 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 愈合创面组织学观察

自体移植组：术后 7 d 拆包时皮面光滑，有光泽，组织结构完整，无浮动现象，打包固定期间，皮片无收缩，10 d 时皮片已愈合牢固，柔韧性好，拆线后，皮片开始收缩，并开始长出毛发。

异体移植组：10 d 以前皮片成活过程同自体移植组，平均 14 d 以后开始出现排斥反应，皮片局部变色、变硬，边缘翘起，至 20 d 时全部皮片均被完全排斥，表皮呈干性坏死，黑痂状，痂皮脱落后创面暴露，30 d 时，剩余真皮也逐渐坏死，形成肉芽组织创面。

组织工程皮肤组：拆包时皮面光滑，色泽红润，无浮动现象，皮片愈合良好，至 60 d 时仍未有排斥反应发生，且无色素沉着（图 1）。

2.2 免疫组化结果

免疫组织化学结果显示，选择素 E 主要表达于表皮层下和移植床面，选择素 P 主要表达于移植床（图 2）。异体移植组移植后第 3 天，选择素 E 表达显著升高，明显高于其它 2 组（$P<0.01$），第 7 天其阳性表达持续升高；异体移植组的选择素 P 在第 7 天阳性表达至峰值，第 14 天无明显改变，不同时间点的表达明显高于其它 2 组（$P<0.01$）。对 3 组数据进行方差分析，可得出不同组间的 P 值，组织工程组与异体移植组间选择素 P 的 $P<0.01$，而与自体移植组间的 $P<0.05$，选择素 E 的 P 值与之情况类似（图 3，4）。说明在前两组之间的比较中，不同时间点所测数值均有明显差异，而使之分别与自体移植组比较所得统计学差异较小。实验中可见异体皮肤移植组 7～14 d 时选择素 E 阳性细胞数明显高于组织工程皮肤组。两组中选择素 P 阳性细胞数均在移植后 7 d 时达到最高峰，但异体皮肤移植组明显高于组织工程皮肤组。

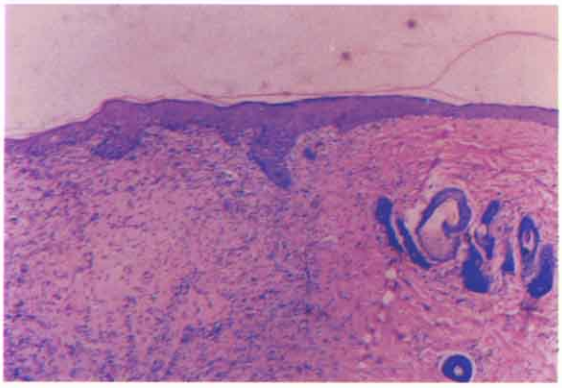


图 1 组织工程皮肤移植后 30 d（HE×40）

Fig 1 Tissue engineered skin after grafting at day 30 in rats（HE×40）

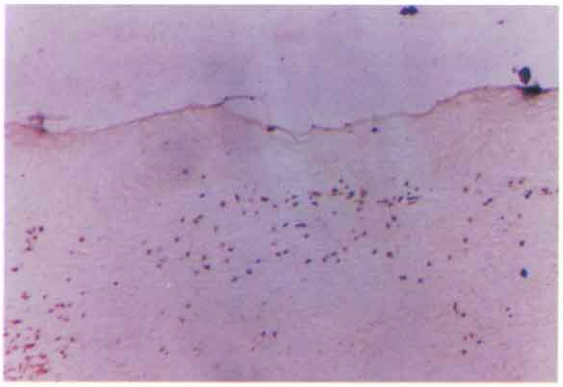
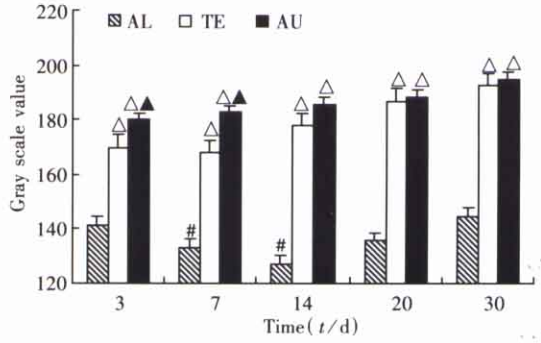


图 2 组织工程皮肤移植后 14 d，选择素 P 免疫组织化学染色（LSABC×40）

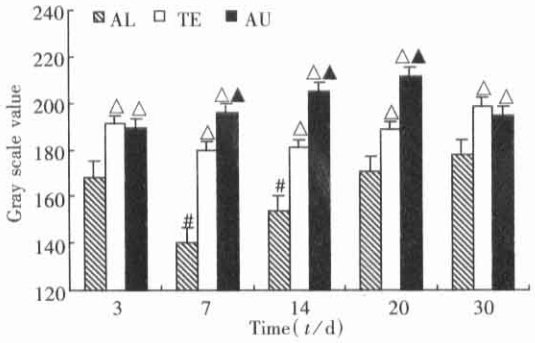
Fig 2 Tissue engineered skin after grafting at day 14 in rats, immunohistological staining of P-selectin（LSABC×40）



△：$P<0.01$，*vs* AL；▲：$P<0.05$，*vs* TE；#：$P<0.05$，vs 3 d

图 3 3 组间选择素 E 比较（$n=3$）

Fig 3 E-selectin in 3 groups（$n=3$）



△：$P<0.01$，*vs* AL；▲：$P<0.05$，*vs* TE；#：$P<0.05$，vs 3 d

图 4　3 组间选择素 P 比较（$n=3$）

Fig 4　P-selectin in 3 groups（$n=3$）

3　讨论

在感染及其它炎性反应发生过程中，选择素通过与其相应配体结合介导白细胞与血管壁接触，并使白细胞在血管壁上缓慢滚动，启动一系列反应，在整合素(integrin)辅佐下最终导致白细胞在炎性反应区域集中[3]。选择素 E 表达于受刺激的内皮细胞(endothelial cell，EC)表面，它在 EC 中无预存，当受刺激 4～6 h 后通过转录产生[4]。其功能为介导中性粒细胞和记忆 T 细胞与感染的 EC 之间的粘附；选择素 P 除表达于受刺激的 EC 外还表达于活化的血小板。其功能为介导 EC 和炎性细胞的粘附以及激活的血小板与单核细胞和中性粒细胞的粘附[5]。因此，选择素在感染性疾病、移植免疫排斥、缺血再灌注损伤及自身免疫性疾病中起重要作用。

器官移植是挽救脏器功能衰竭病人的有效手段，而移植免疫排斥反应是当今制约器官移植发展的主要原因。在免疫排斥过程中：宿主抗体对移植物抗原识别和结合后，靶器官的内皮细胞被激活，选择素等粘附分子大量表达，在选择素的介导下白细胞向供器官血管壁趋化、滚动、粘着，继之，在整合素的作用下，白细胞与内皮细胞紧密粘着并向内皮外游出，向移植物浸润。由于杀伤细胞的细胞毒作用及吞噬细胞和补体系统的激活，使移植物内皮细胞死亡并导致移植物毁损和移植受者的全身反应，其中，内皮细胞直接与血液接触且表面有多种抗原表达又是白细胞向移植物趋化和浸润的桥梁，因此它是移植免疫反应发生的主战场；而内皮细胞选择素的表达及其介导的白细胞趋化成为免疫排斥反应的重要环节。在同种器官移植时由于抗原抗体反应及缺血再灌注损伤等因素使供器官内皮细胞激活，大量表达选择素 P 和 E，从而介导了白细胞对供体器官的攻击。Allen 等[6]研究表明，在同种心脏移植后选择素 E 的表达增高与排斥反应的程度密切相关；Shreeniwas 等[7]证实在同种肺移植时选择素 E 的表达与急性排斥反应密切相关，其相关程度超过人类白细胞抗原Ⅱ（HLAⅡ）。Naka 等[8]将同种肺原位移植入敲除选择素 P 基因的小鼠后，移植排斥明显减轻，白细胞在移植物中的浸润较对照组明显减少。

本实验显示在同种异体皮肤移植中，选择素 P、E 的表达和免疫排斥反应的发生及强弱呈正相关，说明选择素在同种异体皮肤移植后的免疫排斥中也发挥了重要作用，而组织工程皮肤中选择素表达较弱，说明组织工程皮肤的免疫原性很弱，具有良好的组织相容性。如能通过基因工程方法对 EC 进行改造，阻断 EC 与白细胞的相互作用，防止移植免疫反应的发生发展，则可为组织工程再造人工器官及防止器官移植免疫排斥开拓新的方向。

参考文献：

[1] Lowe J B. Glycosyltransferases and glycan structures contributing to the adhesive activities of L-, E- and P-selectin counter-receptors [J]. Biochem Soc Symp, 2002, 69: 33－45.

[2] Ley K. The role of selectins in inflammation and disease[J]. Trends Mol Med, 2003, 9(6): 263－268.

[3] Reiss I, Kuntz S, Schmidt R, *et al*. Effect of pulmonary surfactant on TNF-α-activated endothelial cells and neutrophil adhesion *in vitro*[J]. Immunobiology, 2004, 209(3): 235－244.

[4] Kluger M S. Vascular endothelial cell adhesion and signaling during leukocyte recruitment[J]. Adv Dermatol, 2004, 20: 163－201.

[5] Praditpornsilpa K, Avihingsanon Y. New concepts in organ transplantation [J]. Transplant Proc, 2004, 36(5): 1228－1231.

[6] Allen M D, King C, McaDonald T O, *et al*. VCAM-1 and E-selectin expression during cytomegalovirus infection in posttransplant myocardial biopsies[J]. Clin Transplant, 1996, 10(6 Pt 1): 528－537.

[7] Shreeniwas R, Schulman L L, Narasimhan M, *et al*. Adhesion molecules (E-selectin and ICAM-1) in pulmonary allograft rejection [J]. Chest, 1996, 110(5): 1143－1149.

[8] Naka Y, Toda K, Kayano K, *et al*. Failure to express the P-selectin gene-or P-selectin blockade confers early pulmonary protection after lung ischemia or transplantation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(2): 757－761.

（编辑　张大春）