文章编号:1000-5404(2007)08-0721-04

论著

协调性异种心脏移植排斥反应病理变化的动态研究

唐 华,姚榛祥,刘盛春 (重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

提 要: 目的 建立小鼠→大鼠异种心脏移植延迟性异种移植排斥反应(delayed xenograft rejection, DXR)动物模型,动态观察移植心脏组织病理和免疫病理变化,探讨DXR发生机制。**方法** 袖套法建立小鼠→大鼠颈部异位异种心脏移植模型,设立未移植小鼠心脏为对照组($n=4$),余组分别在移植术后3、8、16、24 h(每时相点$n=4$)供心仍跳动时取心,另一组($n=16$)在供心停跳时取心并以此决定移植心脏存活时间。各组标本作HE染色和SABC法检测补体C_3、IgM、IgG、E-selectin和巨噬细胞标记物CD68表达,结果行半定量评价。**结果** 移植心脏HE染色表现为血管内皮损伤、血栓形成、心肌实质损伤、间质出血、炎症细胞浸润等排斥反应随移植术后时间逐渐加重趋势,完全排斥时部分心肌凝固性坏死及溶解、广泛间质出血、血管结构崩解及血管内血栓形成、严重炎症细胞浸润。移植术后供心平均存活时间(49.3±16.2) h。移植心脏免疫组化检测示:移植后任何时段均无C_3沉积;从移植后3 h开始即有显著IgM沉积,且IgG沉积也逐渐增加;移植后3 h即有E-selectin表达,且表达逐渐增强,排斥时达高峰;从移植后3 h开始在浸润的炎症细胞中有逐渐增加的CD68阳性细胞。**结论** 小鼠→大鼠异种心脏移植可作为DXR研究动物模型。内皮细胞激活、IgM和IgG抗体、巨噬细胞浸润参与DXR发生,但其发生不依赖于补体参与。

关键词: 异种移植;心脏;动物模型;DXR
中图法分类号: R364;R392.4;R654.2 **文献标识码**: A

Dynamic pathological changes in concordant cardiac xenograft rejection

TANG Hua, YAO Zhen-xiang, LIU Sheng-chun (Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of delayed xenograft rejection (DXR) by dynamic observation of histological and immunohistologic changes in mouse-to-rat cardiac xenografts. **Methods** A model of mouse-to-rat cardiac heterotopic xenotransplantation in neck was established by cuff technique. NIH mouse hearts not transplanted served as controls ($n=4$). Some xenograft recipients were killed and cardiac xenografts harvested at end of 3, 8, 16, 24 h ($n=4$ for each time point) after transplantation. The cardiac hearts ($n=16$) of some xenograft recipients were not harvested until rejection time to determine their survival time. All heart samples were examined by HE and immunohistochemistry for semi-quantitative determination of antibodies including C_3, IgM, IgG, E-selectin and macrophage marker -- CD68. **Results** During the period after transplantation, the degree of rejection of xenografts became more and more serious till ultimate rejection. The mean survival time of the xenografts was (49.3±16.2) h. Immunohistochemical examination showed C_3 were not detected in the xenografts at any time during the course of rejection; From 3 h after transplantation, obvious deposition of IgM was found in the grafts and IgG deposition got abundant; E-selectin expression was found as early as 3 h after transplantation and increased gradually; There was progressive infiltration by macrophages in the grafts. **Conclusion** Mouse-to-rat cardiac xenotransplantation can serve as an animal model of DXR. Endothelial cells activation, IgM and IgG, macrophage infiltration involve in DXR development except C_3.

Key words: xenotransplantation; heart; animal model; DXR

异种移植排斥反应按发生的时间顺序可分为超急性排斥反应(hyperacute rejection, HAR)、延迟性异种移植排斥反应(delayed xenograft rejection, DXR)和细胞性异种移植排斥反应(cellular xenogrft rejection)3

作者简介:唐 华(1969-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事普通外科和器官移植方面的研究,发表论文14篇。电话:13650569092,E-mail:tanglihua6969@sina.com.cn

收稿日期:2006-11-06;修回日期:2007-01-19

个时期。在HAR被成功控制后，DXR由于发生机制不明，亦无有效防治措施而成为主要障碍[1]。本实验采用袖套法建立小鼠→大鼠异种心脏移植模型，以探讨其作为研究DXR动物模型的可行性，为DXR研究提供依据；同时对移植心脏组织病理和免疫病理变化进行动态观察以探讨DXR发生机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

供体采用健康雄性NIH小鼠36只（重庆医科大学实验动物中心），体质量23～35 g；受体采用健康雄性Wistar大鼠36只（第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心），体质量200～220 g。

1.2 心脏移植模型建立和移植心脏存活时间判断

参照Hasan等[2-4]方法，用聚乙烯硬膜外麻醉导管和静脉留置针管制作带短臂动、静脉套管，采用袖套式血管连接法（Cuff技术）将小鼠升主动脉与大鼠右颈总动脉、小鼠肺动脉与大鼠右颈外静脉连接，在大鼠颈部建立小鼠→大鼠异位心脏移植模型。移植后每日在大鼠颈部触摸移植心脏跳动，以心跳停止作为供心被完全排斥的发生时间。从移植心脏复跳至停跳的时间为移植心脏存活时间。

1.3 实验动物分组

共分6组：A组为对照组（$n=4$），心脏直接取自NIH小鼠；B、C、D、E组为移植组（各组$n=4$），分别于移植后3、8、16、24 h供心仍跳动时取心；F组为移植组（$n=16$），供心被完全排斥时取心，并以此决定移植心脏存活时间。

1.4 移植心脏组织病理学检查与免疫组化检测

切取对照组和各时段移植心脏右心室，10%多聚甲醛固定，石蜡包埋，作5 μm厚组织切片。常规HE染色，光镜观察组织病理改变。采用SABC法检测细胞和组织中的抗原。抗补体C_3购自北方同正公司，抗IgM、抗IgG、抗CD68、抗E-selectin及SABC试剂盒购自武汉博士德公司。PBS液代替一抗作阴性对照，已知阳性切片作阳性对照。染色结果判断：C_3、IgM、IgG阳性均呈棕黄染色，主要沉积于血管壁与间质；CD68阳性细胞为细胞质/膜呈棕黄染色，即巨噬细胞（Mφ）；E-selectin表达于内皮细胞，细胞膜呈棕黄染色为阳性；按文献[5-7]的方法观察20个高倍视野，根据阳性细胞百分数、染色强度与染色范围行阳性结果半定量评价。阳性表达分级为0（<5%阳性细胞和无阳性染色信号），+（5%～25%阳性细胞、弱到中等强度阳性染色信号、间质或血管壁弱沉积），++（26%～50%阳性细胞、中等到强阳性染色信号、局部间质或部分血管壁明显沉积），+++（>50%阳性细胞、强阳性染色信号、间质较弥漫沉积或/和较多血管壁明显沉积）。

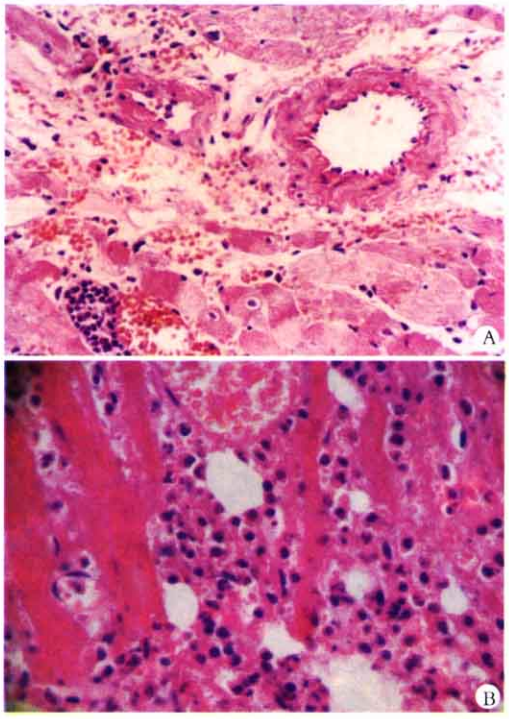
2 结果

2.1 移植心脏存活时间

F组于供心被完全排斥时取心，以此决定移植心脏存活时间。16只移植心脏存活时间分别为：28、33、35、36、36、39、40、42、46、50、52、61、65、70、75 h和80 h，平均存活时间为（49.3±16.2）h。

2.2 移植心脏组织病理学检查

未移植小鼠心脏示正常组织结构；移植后3 h心肌结构基本正常，但血管内皮不规则肿胀、突入血管腔、且有少量嗜中性细胞黏附；移植后8 h心肌细胞水肿，血管内皮细胞呈纺锤状或细长形改变，轻度单核细胞浸润；移植后16 h心肌细胞肿胀变性更加明显，血管内皮肿胀和突出更趋显著，可见红细胞外渗、单核细胞浸润和血栓形成；移植后24 h心肌细胞开始出现溶解、坏死，血管周围广泛水肿伴内皮细胞肿胀，有较多包括单核细胞与嗜中性细胞的炎症细胞浸润；被完全排斥时，大体可见移植心脏体积增大、心腔内充满血凝块，镜下见部分心肌凝固性坏死及溶解、广泛间质出血、血管结构崩解、血管内血栓形成和纤维蛋白渗出、弥漫性炎症细胞浸润。见图1。



A：移植后24 h；B：移植心脏被排斥时

图1 移植心脏组织病理学观察（HE×400）

2.3 移植心脏免疫组化检测

对照组和各时段移植心脏均未见C_3沉积。对照组未见IgM沉积，移植心脏从移植后3 h开始各时段均见有显著IgM沉积（图2）。对照组未见IgG沉积，移植心脏从移植后3 h开始有较明显且逐渐增加的IgG沉积（图3）。对照组未见有浸润的CD68阳性细胞，移植心脏从移植后3 h开始在浸润的炎症细胞中可见有逐渐增加的CD68阳性细胞（图4）。对照组内皮细胞无E-selectin表达，移植心脏在移植后3 h即有血管内皮细胞明显表达E-selectin，且表达逐渐增强（图5）。上述检测指标在移植心脏各时段的表达情况见表1。

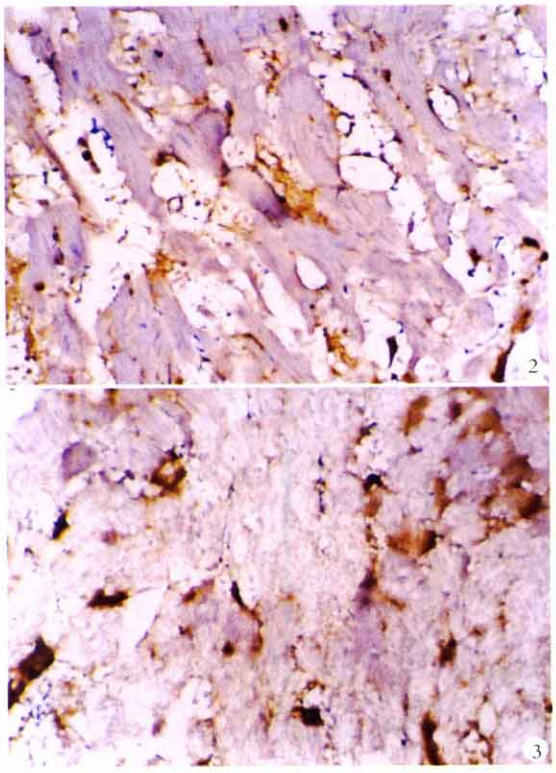


图 2　术后 8 h 移植心脏 IgM 染色部分阳性　（SABC ×400）
图 3　移植心脏被排斥时 IgG 染色部分阳性　（SABC ×400）

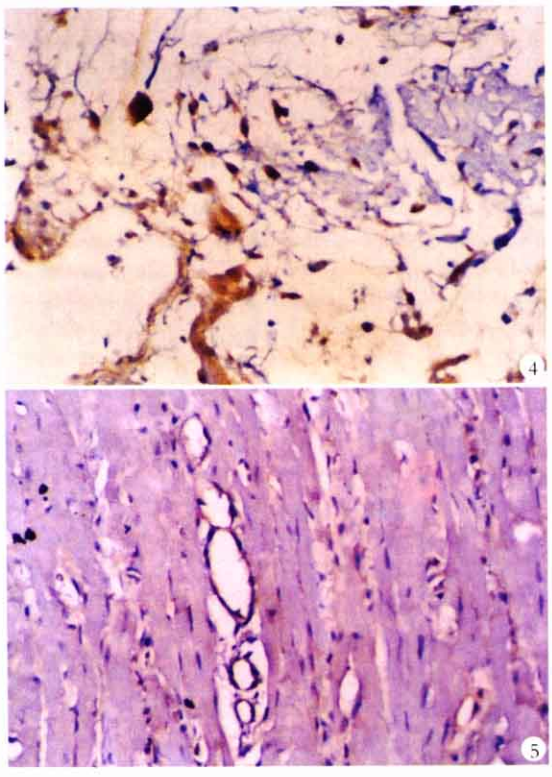


图 4　术后 8 h 移植心脏巨噬细胞浸润（CD68 阳性）　（SABC ×400）
图 5　术后 3 h 移植心脏血管内皮 E-selectin 染色阳性　（SABC ×400）

表 1　小鼠→大鼠异种移植心脏各时段免疫组化特征

指标	对照组	移植组				排斥反应时
		3 h	8 h	16 h	24 h	
补体 C_3	0	0	0	0	0	0
IgM	0	+++	+++	+++	+++	+++
IgG	0	++	++	++ ~ +++	+++	+++
巨噬细胞	0	0 ~ +	+	+ ~ ++	+++	+++
E-selectin	0	++	++	++ ~ +++	+++	+++

3　讨论

异种移植研究中心脏移植模型约占文献报道的 90%。依照移植解剖部位，心脏移植分原位移植和异位移植。而供、受体血管连接方法包括始于 Ono 的直接血管吻合法和 Heron 的袖套式血管连接法（Cuff 技术）。本模型主要参照 Hasan 等[2-4]的方法，采用 Cuff 技术建立小鼠→大鼠颈部异位心脏移植模型。与 Ono 法比较，Cuff 技术操作简便，无需进行血管吻合，心肌缺血时间短，受体出血量少，手术时间缩短，因此对于供心和受体动物的损伤均较小，利于术后恢复，并且术者易于掌握、勿需进行专门的显微血管吻合技术训练。此外，套管无需特殊制备，只需选用适合血管外径的套管，将其制成一带短壁套管即可，术中用无创显微血管钳钳夹短臂固定于手术台，行动、静脉外翻时用显微镊直接外翻固定，而不需传统袖套法所需之特殊套管和内支撑管，从而减少寻找特殊套管的难度和内支撑管损伤血管内膜的机会。颈部异位移植最大的优点在于移植心位于颈部皮下，十分有利于对移植心排斥情况进行观察，并且由于手术操作不进腹，故受体创伤小、遭受干扰少、有利于术后恢复，亦不会发生如腹腔内移植所造成的截瘫、尿潴留等并发症。本实验中共手术 40 次，成功 32 次，成功率 80.0%。因此，袖套法建立小鼠→大鼠颈部异位心脏移植模型操作简便、易于观察、稳定可靠，是研究异种移植排斥反应发生机制及其防治措施、筛选免疫抑制药物、诱导适应和免疫耐受等较好的动物模型。

依照 Calne 分类法，小鼠→大鼠异种心脏移植属于进化关系较近种属间的协调性异种移植，不发生 HAR，但移植后 2 ~ 3 d 发生排斥反应，移植物功能丧失，可作为 DXR 研究动物模型。本实验动态观察移植心脏组织病理改变为血管内皮损伤、血栓形成、心肌实质损伤、间质出血、炎症细胞浸润等排斥反应随移植术后时间逐渐加重的趋势，到完全排斥时部分心肌凝固性坏死及溶解、广泛间质出血、血管结构崩解及广泛血管内血栓形成、严重炎症细胞浸润，而移植心脏存活时间为（49.3 ± 16.2）h，与文献[8]报道相符。因此本实验证实小鼠→大鼠异种心脏移植可作为 DXR 研究

动物模型并可为 DXR 的组织病理学诊断提供依据。

补体激活被认为是 HAR 发生的关键，补体系统通过经典途径和/或替代途径激活、形成膜攻击复合物导致 HAR 最终发生，抑制或阻断补体激活能够延迟或阻止 HAR[9]。然而 DXR 发生是否必须有补体参与目前尚存争议。1993 年 Leventhal 等首次描述了用 CVF 阻止 HAR 的豚鼠→大鼠心脏移植模型发生 DXR，但无补体沉积和系统性补体激活的证据，相同结果在猪→灵长类异种移植模型中也曾报道[10]。而 Loss[11] 和 Mollnes 等[12]研究提出补体在 DXR 中发挥重要作用。Dorling[13]则研究认为 DXR 发生存在补体依赖型和补体非依赖型两条途径。本实验结果显示移植术后任何时段移植心脏均无补体 C_3 沉积，因而提示 DXR 发生可能不依赖于补体参与。

近来研究提出在 DXR 中涉及的抗体包括异种反应性天然抗体(xeno-reactive natural antibodies, XNA)和诱生抗体(elicited xenoreactive antibodies, EXA)，其中 EXA 形成是 DXR 的中枢环节。Shimizu 等[14]发现 IgG 型和 IgM 型 EXA 均参与发动 DXR。本研究结果显示移植心脏从移植术后 3 h 开始即有显著 IgM 沉积，并且 IgG 沉积也逐渐增加，表明 IgM 和 IgG 均参与 DXR 发生。尽管 IgM 和 IgG 均能沉积于移植物血管内皮细胞表面造成 DXR 损伤[15]，由于 IgM 形成更快，故 IgM 被认为是造成 DXR 一系列病理生理损伤的触发点[16]。

本实验结果显示早在移植后 3 h 移植心脏即有内皮细胞(endothelial cell, EC)激活标志物 E-selectin 表达，且表达逐渐增强，排斥时达到高峰；并移植后 3 h HE 染色也发现在心肌结构基本正常情况下有血管内皮损伤，故提示 EC 激活与 DXR 发生密切相关。DXR 的 EC 激活被称为Ⅱ型 EC 激活，不同于 HAR 的Ⅰ型 EC 激活。Ⅰ型 EC 激活发生在补体膜攻击复合物溶解血管 EC 之前，在移植物再灌注后数分钟内发生，无基因激活与蛋白质合成，而Ⅱ型 EC 在激活数分钟内就引起一系列基因表达上调，转录并翻译产生蛋白质，且持续若干天，促进炎症和凝血过程，导致 DXR[17,18]。此外本实验还结果显示移植心脏从移植后 3 h 开始在浸润的炎症细胞中即有逐渐增加的 CD68 阳性细胞，CD68 是 Mφ 的特异性标记物，说明 Mφ 浸润亦是引起 DXR 的重要机制之一。

总之，本实验提示小鼠→大鼠异种心脏移植可作为 DXR 研究动物模型，EC 激活是 DXR 发生的中心环节，体液免疫、Mφ 浸润介导了 DXR 发生。因此，降低 IgM 和 IgG 水平、减轻 Mφ 浸润以及抑制内皮细胞激活，可能有助于防止 DXR，延长异种移植物存活时间。

参考文献：

[1] McGregor C G, Teotia S S, Byrne G W, *et al*. Cardiac xenotransplantation: progress toward the clinic[J]. Transplantation, 2004, 78(11): 1569-1575.

[2] Hasan R I, White D J. Modification of Heron's technique for heterotopic cardiac transplantation in rats[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1994, 107(4): 1168-1169.

[3] 兰 平, 王吉甫. 袖套法异种心脏移植模型[J]. 中华显微外科杂志, 1997, 20(2): 134-135.

[4] 戚 峰, 邱宇杰, 王鹏志, 等. 小鼠-大鼠异种异位心脏移植模型的建立[J]. 天津医科大学学报, 2001, 7(2): 281-283.

[5] Blakely M L, Van-der-Werf W J, Berndt M C, *et al*. Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection[J]. Transplantation, 1994, 58(10): 1059-1066.

[6] Nagayasu T, Saadi S, Holzknecht R A, *et al*. Expression of tissue factor mRNA in cardiac xenografts: clues to the pathogenesis of acute vascular rejection[J]. Transplantation, 2000, 69(4): 475-482.

[7] 陈 刚, 王西墨, 郭 晖, 等. 猪到猕猴异种心脏移植超急性排斥反应的免疫学及病理学变化[J]. 中华器官移植杂志, 2005, 26(1): 47-49.

[8] Saadi S, Takahashi T, Holzknecht R A, *et al*. Pathways to acute humoral rejection[J]. Am J Pathol, 2004, 164(3): 1073-1080.

[9] 李 军,杨 康,白 云, 等. 草麻黄中补体抑制成分抑制大鼠异种心脏移植超急性排斥反应的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(17): 1773-1775.

[10] Buhler L, Yamada K, Kitamura H, *et al*. Pig kidney transplantation in baboons: anti-Galαl-3Gal IgM alone is associated with acute humoral xenograft rejection and disseminated intravascular coagulation [J]. Transplantation, 2001, 72(11): 1743-1752.

[11] Loss M, Vangerow B, Schmidtko J, *et al*. Acute vascular rejection is associated with systemic complement activation in a pig-to-primate kidney xenograft model[J]. Xenotransplantation, 2000, 7(3): 186-196.

[12] Mollnes T E, Fiane A E. Perspectives on complement in xenotransplantation[J]. Mol Immunol, 2003, 40(2-4): 135-143.

[13] Dorling A. Are anti-endothelial cell antibodies a pre-requisite for the acute vascular rejection of xenografts? [J]. Xenotransplantation, 2003, 10(1): 16-23.

[14] Shimizu A, Meehan S M, Kozlowski T, *et al*. Acute humoral xenograft rejection: destruction of the microvascular capillary endothelium in pig-to-nonhuman primate renal grafts[J]. Lab Invest, 2000, 80(6): 815-830.

[15] Miyatake T, Sato K, Takigami K, *et al*. Complement-fixing elicited antibodies are a major component in the pathogenesis of xenograft rejection[J]. J Immunol, 1998, 160(8): 4114-4123.

[16] Lin Y, Goebels J, Xia G, *et al*. Induction of specific transplantation tolerance across xenogeneic barriers in the T-independent immune compartment[J]. Nat Med, 1998, 4(2): 173-180.

[17] Cozzi E, Masroor S, Soin B, *et al*. Progress in xenotransplantation [J]. Clin Nephrol, 2000, 53(4): 13-18.

[18] Soin B, Vial C M, Friend P J. Xenotransplantation[J]. Br J Surg, 2000, 87(2): 138-148.

(编辑 张大春)