论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1072-04

# 大鼠肝移植术后腹腔细菌感染对移植肝免疫排斥的影响

丁 隆[1],杨 宇[2],董家鸿[1] ([1]第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038;[2]佳木斯大学基础医学院人体解剖学教研室,佳木斯 154007)

**提 要:目的** 探讨大鼠肝移植后腹腔细菌感染机体免疫状态的变化及对移植肝免疫排斥的作用。**方法** 采用改良的Kamada双袖套法建立DA→LEW的肝移植模型,术后将大鼠分为3组:免疫排斥组(G1),术后3 d腹腔生理盐水注射;移植后感染组(G2),术后3 d给予腹腔大肠杆菌注射;免疫抑制组(G3),术后常规给予免疫抑制药物(CsA,3 mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$)。感染后7 d处死动物,每组6个样本,通过流式细胞术测定外周淋巴细胞亚群,单向混合淋巴细胞培养检测淋巴细胞功能,RT-PCR检测肝内IL-4和IFN-γ mRNA的表达来评估机体的免疫状态的变化,肝病理切片观察对免疫排斥的影响。**结果** 感染后7 d,G1、G2、G3组淋巴细胞数、CD4/CD8值下降[分别为(1.753±0.181)、(1.384±0.073)、(0.997±0.025)],淋巴细胞功能降低[SI分别为(67.59±3.40)、(37.14±0.90)、(15.87±0.51)],IL-4 mRNA表达增高,与G1组比较,G2组上述指标差异有统计学意义($P<0.05$)。与G3组相比,G2组虽然也有差异($P<0.01$),但从病理学切片观察,在一定程度上减轻了免疫排斥反应。**结论** 肝移植术后腹腔细菌感染促进了Th2细胞的分化,下调CD4/CD8值并降低了淋巴细胞功能,部分减轻了肝移植术后急性排斥反应。

**关键词**:肝移植;腹腔感染;急性排斥反应

**中图法分类号**:R392.4;R656;R657.3 **文献标识码**:A

# Impact of abdominal cavity bacterial infection on immunological rejection following rat liver transplantation

DING Long[1], YANG Yu[2], DONG Jia-hong[1] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Anatomy, Preclinical Medical College, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

**Abstract: Objective** To investigate the changes of immune state and the impact on immunological rejection elicited by abdominal cavity bacterial infection after DA-Lewis rat liver transplantation. **Methods** Orthotopic liver transplant model was established by modified Kamada two-cuff technique. The animals were divided randomly into Group 1, isotonic Na chloride injected into abdominal cavity 3 days after operation; Group 2, mixed *Bacillus coli* liquid injected instead of saline; Group 3, immunosuppressive drug CsA administered routinely after operation (3 mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$). All the animals were sacrificed 7 days after infection. The blood and graft samples were collected for cell-subpopulation, mixed lymphocyte culture, IL-4, IFN-γ mRNA detection and histological evaluation. **Results** Seven days after infection, the lympholeukocyte population, CD4/CD8 (G1=1.753±0.181, G2=1.384±0.073, G3=0.997±0.025) and lympholeukocyte function (SI: G1=67.59±3.40, G2=37.14±0.90, G3=15.87±0.51) declined in Group 2 as compared with other groups and cellular differentiation drifted to Th2. There was significant difference between Group 2 and Group 1 or 3. **Conclusion** Abdominal cavity bacterial infection after rat liver transplantation will promote the differentiation of T cells into Th2, down-regulate CD4/CD8 ratio and immune function of lymphocytes and accordingly alleviate partly the acute rejection following liver transplantation.

**Key words**: liver transplantation; abdominal cavity bacterial infection; acute rejection

作者简介:丁 隆(1978-),女,回族,黑龙江省佳木斯市人,博士研究生,医师,主要从事肝移植方面的研究,现在佳木斯大学第一附属医院普通外科。电话:(023)68754583,E-mail:yangyujms@126.com

通讯作者:董家鸿,E-mail:dongjh@301.hospital.com.cn

收稿日期:2007-01-09;修回日期:2007-03-05

肝移植已成为终末期肝病及急性肝功能衰竭的有效治疗方法，然而术后创伤及大量激素和免疫抑制药物的应用又会增加细菌、病毒、真菌的感染（发生率为53% ~80%），其中又以细菌感染的发生率最高（为36% ~68%），最常见部位为肺脏及腹腔，又以表皮葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单孢菌为主要致病菌，这也是肝移植术后引起死亡的常见原因之一[1-3]。然而临床上发生细菌感染的患者免疫抑制药物的应用则成为治疗的关键与矛盾所在。在大手术、创伤及免疫抑制药物应用后，机体本身处于一种免疫紊乱状态，如此时并发感染对免疫系统的影响又如何呢？以往的研究表明，病毒感染能加重免疫排斥反应，但有关细菌感染时机体免疫状态的改变尚鲜见报道，本研究意在探讨二者的关系，探明细菌感染对移植肝免疫排斥的影响。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

成年雄性近交系 DA 大鼠 18 只[体质量(200 ±20)g]为供体，购于哈尔滨医科大学实验动物中心。以成年雄性近交系 Lewis 大鼠（体质量 200 ~220 g，18 只）为受体，购于北京维通利华实验动物有限公司，适应性饲养于西南医院肝胆科实验中心动物室。供受体术前 12 h 禁食，不禁水，术后自主食水。主要试剂有流式单克隆抗体（购于 Biolegend），包括 PE anti-rat CD4（W3/25，IgG1），FITC anti-rat CD3（1F4，IgM），PE anti-rat CD8（OX8，IgG1），红细胞裂解液（北京鼎国生物技术有限责任公司），$H^3$-TdR（西南医院放射科），EZ-Sep™ Mouse 1X 淋巴细胞分离液（达科为生物技术有限公司），细胞培养基为含牛血清 RPMI1640，丝裂霉素 C（MMC，购自 Sigma），TaKaRa RNA PCR Kit（AMV）Ver. 3.0 试剂盒（购于宝生物工程有限公司）。

### 1.2　方法

1.2.1　动物模型的建立　　本实验采用改良的 Kamada 双袖套法[4]，无需静脉分流，建立大鼠肝移植模型。分为免疫排斥组 G1：大鼠肝移植术后 3 d 腹腔内生理盐水注射；移植术后感染组 G2：于移植术后 3 d 腹腔内大肠杆菌注射，注射量为 $1 \times 10^6$ cfu/ml；免疫抑制组 G3：移植术后肌注 CsA，注射量 3 mg · $kg^{-1}$ · $d^{-1}$。每组 6 只。感染后 7 d 每组处死动物 6 只，取血及肝脏，备相应指标及病理学检测。

1.2.2　检测指标及实验方法

1.2.2.1　外周血淋巴细胞亚群检测　　取 1 000 U/ml 肝素 100 μl 抗凝静脉全血，置于 FCM 测量管中；加入带荧光标记的单克隆抗体试剂 20 μl（每个抗体 10 μl），充分混匀，37 ℃水浴中避光反应 30 min；在加入 300 μl 溶红细胞液，充分混匀，在 37 ℃冰箱中反应 5 ~10 min；以 1 500 r/min 离心 5 min，去上清；D-Hanks 液洗 1 遍，收集细胞，上机检测。

1.2.2.2　单向混合淋巴细胞培养检测淋巴细胞功能　　供体刺激细胞的制备：为保证取肝过程中大鼠处于良好的生存状态，提高供肝质量，我们未从外周取血，而是在取肝的同时取出脾脏，从脾脏中分离淋巴细胞来做为刺激细胞。用 EZ-Sep™ Mouse 1X 淋巴细胞分离液分离出供体脾脏淋巴细胞，加入 400 μg/L的丝裂霉素 C，使之终浓度为 40 μg/L 细胞悬液，置 37 ℃水浴 30 min，1 000 r/min 离心 10 min，弃上清，沉淀细胞用培养液洗涤 1 次，调整细胞浓度至 $1 \times 10^6$/ml；受体反应细胞的制备：受体取外周血 2.0 ml，用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞，调整细胞浓度至 $1 \times 10^6$/ml。各取 0.1 ml 反应细胞和刺激细胞于 96 孔细胞培养板孔中，培养基使用 RPMI1640 加小牛血清，置湿度 100%，37 ℃，5% $CO_2$ 培养箱内培养 5 d。在培养终止前 15 ~16 h，每孔加 $^3$H-TdR 20 μl，使用玻璃纤维滤纸收集细胞，干燥后用液闪仪（Beckman LS 600）测定 cpm 值，采用刺激细胞加 RPMI1640 为对照，每份标本设 3 复孔，结果取其平均值. 各组的阴性对照组同样设 3 个复孔。按下列计算刺激指数：刺激指数（SI）= 实验孔 cpm/对照孔 cpm × 100%。

1.2.2.3　肝内 IL-4 及 IFN-γ 的表达　　用 Trizol 液提取 100 mg 脾组织 mRNA，分光光度法测定 RNA 的纯度，采用 RT-PCR 技术，以 G3PDH 为内参，引物序列参照文献[5]：IL-4：正义：5′-TCTCACGTCACTGACTGTA-3，反义：5′-CTTTCAGTGTTGTGAGCGT-3′；IFN-γ：正义：5′-AGAGCCTCCTCTTGGATATCTGG-3′，反义：5′-GCTTCCTTAGGCTAGATTCTGGTG-3′，G3PDH：正义：5′- GCATGGCCTTCCGTGTTCCTAC-3′，反义：5′-ACTCCTTGGAGGCCATGTAGGC-3′。PCR 反应参数：预变性 94 ℃ 5 min，PCR 反应 94 ℃ 30 s、55 ℃（IL-4）/60 ℃（IFN-γ）30 s、72 ℃ 45 s，35 个循环，延伸 72 ℃ 10 min。用凝胶成像系统照像，Bandscan 软件进行图像分析，结果以目的区带的光密度值积分/内参区带的光密度值积分表示，作为目的 mRNA 的相对含量，进行半定量分析。

### 1.3　统计学处理

采用 SAS 6.0 统计软件计算，组间比较采用 $t$ 检验，各组病理学急性排斥反应 Banff 评分的比较采用秩和检验。

## 2　结果

### 2.1　外周血淋巴细胞亚群的比例变化

移植术后及感染后各组的淋巴细胞总数均下降，各组间 CD4/CD8 值均有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。见表 1。

**表 1　感染后 7d 各组淋巴细胞亚群的变化（$\bar{x} \pm s$）**

| 组别 | CD4 | CD8 | CD4/CD8 |
|---|---|---|---|
| G1 | 34.15 ±1.12 | 19.62 ±1.82 | 1.753 ±0.181[a] |
| G2 | 16.75 ±1.35[b] | 12.12 ±1.02 | 1.384 ±0.073 |
| G3 | 14.31 ±1.33 | 14.36 ±1.29[a] | 0.997 ±0.025[a] |

a：$P<0.01$，与 G2 组比较；b：$P<0.05$，与 G3 组比较

### 2.2　淋巴细胞功能的改变

通过计算刺激指数评估受体外周血淋巴细胞功能的改变，结果显示：G2 与 G3 组的淋巴细胞功能明显受到抑制[SI 分别为 G1（67.59 ±3.40），G2（37.14 ±0.90），G3（15.87 ±0.51）]，各组间相比差异有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。

### 2.3　肝内 IL-4 及 IFN-γ 的表达

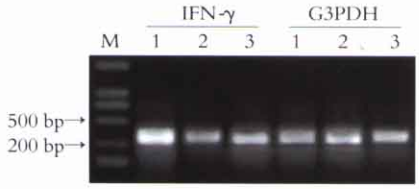
各组 IL-4 和 IFN-γ mRNA 水平均有不同程度的表达。IL-4

的水平变化各组间均有统计学意义[IL-4 mRNA 表达水平分别为 G1(0.887 ±0.06),G2(1.741 ±0.12),G3(2.039 ±0.13)],而 IFN-γ mRNA 的水平在 G2 与 G3 组无明显差异[分别为(0.705 ±0.08)、(0.630 ±0.11),$P>0.05$],G2、G3 组与 G1 组(1.490 ±0.016)相比,有显著性差异($P<0.05$),见图 1、2。




M: DNA 标准(DL 2000); 1: G1 组; 2: G2 组; 3: G3 组

**图 1 肝内 IL-4 mRNA 的表达水平**

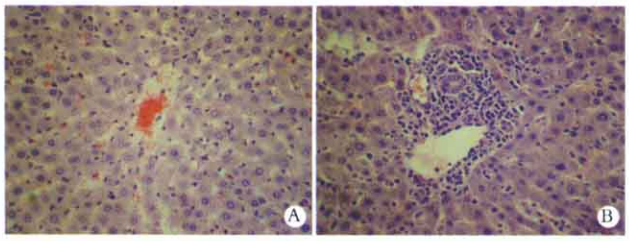



M: DNA 标准(DL 2000); 1: G1 组; 2: G2 组; 3: G3 组

**图 2 肝内 IFN-γ mRNA 的表达水平**

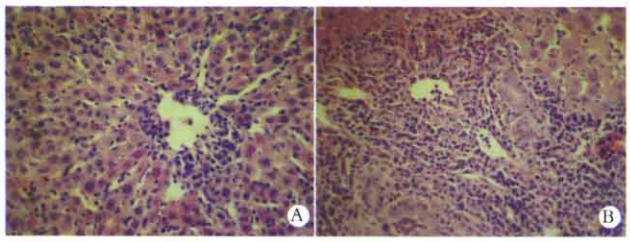
## 2.4 肝脏病理改变

移植感染后可见汇管区有较多淋巴细胞浸润,肝小叶结构不清,中央静脉扩张,充血,仅有少量淋巴细胞浸润,与免疫抑制组表现相似,但肝细胞破坏更明显(图 3);而 G1 组汇管区和中央静脉的淋巴细胞浸润均较明显,胆管炎症明显,胆管细胞模糊、极性消失(图 4)。




A: 中央静脉; B: 汇管区

**图 3 移植感染组肝中央静脉及汇管区的光镜观察 (HE ×200)**




A: 中央静脉; B: 汇管区

**图 4 免疫排斥组肝中央静脉及汇管区的光镜观察 (HE ×200)**

各组病理学 Banff 评分[6]见表 2。G3 与 G1 比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

**表 2 各组移植后 7 d 的移植物病理切片的排斥反应 Banff 评分的比较**

| 组别 | 例数 | Ⅰ级 | Ⅱ级 | Ⅲ级 |
|---|---|---|---|---|
| G1 | 6 | 0 | 1 | 5 |
| G2 | 6 | 3[b] | 2 | 1[a] |
| G3 | 6 | 5[a] | 1 | 0 |

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与 G1 组比较

## 2.5 肝功能变化

G3 组大鼠肝移植术后肝功有轻度异常[ALT 为(67.63 ±8.94)U/L,TB 为(14.99 ±1.47)mg/ml]; G1、G2 组 2 种指标显著升高[G1: ALT 为(761.33 ±87.64)U/L,TB 为(189.54 ±36.88)mg/ml; G2: ALT 为(877.25 ±96.46)U/L,TB 为(203.18 ±22.97)mg/ml],两组相比差异无统计学意义($P>0.05$),与 G3 组相比差异均显著($P<0.01$)。

## 3 讨论

目前国际上通用的用于大鼠肝移植急性排斥研究的动物是近交系的 DA→LEW 大鼠,本研究即在此基础上给予腹腔大肠杆菌注射作为研究最终模型,观察感染与免疫排斥的关系。据现有的文献报道,腹腔感染的方法有多种,所致的感染严重程度也不一样。目前常用的方法主要有盲肠结扎(CL)、盲肠结扎加穿孔(CLP)、腹腔内自身粪便注射或活菌注射等。前 2 种方法建立的动物模型感染较重,72 h 死亡率较高,感染严重程度不易控制,而且很难行二次干预。我们研究的感染模型是建立在免疫排斥反应的基础上,为尽可能的接近临床感染,并使感染的严重程度便于控制,提高模型制作的可重复性,减少创伤,降低死亡率,我们采用腹腔活细菌注射的方法建立感染模型,并选取临床上相对比较常见的大肠杆菌作为诱导感染菌,通过我们的前期实验已建立了相对较为稳定的模型,并符合本研究的实验要求。

从研究结果中我们观察到,感染后 7 d,各组的淋巴细胞总数均有不同程度的下降,$CD4^+$ 的下降幅度明显高于 $CD8^+$,使得移植后感染组大鼠 $CD4^+/CD8^+$ 值降低。外周血 T 细胞表型变化是反映机体免疫功能状态的指标之一,$CD4^+/CD8^+$ 的正常值为 1.7 ~ 2.0,当比值下降时常提示机体的免疫功能受损或缺陷[7],而就移植免疫而言,$CD4^+/CD8^+$ 值上升预示可能将要发生排斥反应。已有研究表明,在自发性免疫耐受模型中,$CD4^+/CD8^+$ 值降低[8]。本研究中感染组 $CD4^+/CD8^+$ 值虽与免疫抑制组比较有差异,但与免疫

排斥组相比仍有统计学意义，提示感染后机体的免疫功能有所下降，而这个结论在单向混合淋巴细胞培养检测淋巴细胞功能的结果中也得到进一步证实。

活化的 $CD4^+$ T 淋巴细胞根据所分泌的细胞因子不同可分为两个功能不同的亚群，即 Th1 和 Th2。Th1 以分泌 IFN-γ、TNF-α 及 TNF-β 为特征，与细胞免疫及迟发型超敏性炎症形成有关，故亦称为炎症性 T 细胞；Th2 主要分泌 IL-4、IL-10、IL-5，可辅助 B 细胞增殖分化为抗体分泌细胞，与体液免疫及细胞免疫抑制有关。这二类细胞是互相制约的，移植排斥反应认为主要与 Th1 效应有关，而 Th2 效应却诱导移植免疫耐受。宿主对移植物的耐受可以通过将 $CD4^+$ T 细胞 Th1 向 Th2 细胞的漂移，改变 Th 型细胞因子的表达水平而达到。在本研究中我们基于上述的实验结果进一步检测了肝组织内的 IL-4 和 IFN-γ mRNA 的表达水平，结果显示，感染发生后 IL-4 mRNA 的表达水平有了明显增加，相反，IFN-γ mRNA 的水平有所下降。分析原因：在大手术、免疫排斥反应的基础上，感染的发生使得细胞因子的微环境发生了改变，而 T 细胞的分化又极易受到该环境的影响[9]；另外，细菌病原成分影响了树突状细胞的分化方向（DC1s 主要促进 Th1 型细胞分化，DC2s 则促进 Th2 细胞群的分化）[10-12]，从而导致了 T 细胞分化异常。

从上述的研究结果中我们可以看到，感染后机体的免疫功能低下，但对移植肝免疫排斥反应如何还需进一步明确。肝病理检查被认为是诊断免疫排斥的金标准。我们从肝病理切片中观察到，感染发生后，虽然肝实质的损害程度并没有明显的改善，但以 Banff 评分标准判定，免疫排斥反应减轻，与排斥组相比有明显的统计学意义。分析原因：病原体成分造成的肝损害，另外免疫排斥反应虽然有所减轻，但尚不能被完全抑制，移植肝脏受到双重免疫损伤。

肝移植患者由于原有的基础肝脏疾病，全身营养状况差，往往存在严重贫血、长期低蛋白血症、血清补体与免疫球蛋白缺乏、白细胞减少等，加之手术的创伤，术后免疫抑制剂的应用，免疫功能十分低下，因此感染更具有了临床表现特殊性：感染发生率高、病原体种类多、表现不典型、易播散、病情凶险、病情进展快，病死率高等特点。机体免疫系统为防止这种复杂的变化对组织器官产生过度的病理损伤，通过各种方式启动免疫抑制机制，除了与上述的 T 细胞功能分化异常有关，还可能与免疫抑制细胞如 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞的表达、IL-10 分泌增多、T 细胞凋亡增加等多种因素有关[9,13-15]。进一步探明这种免疫抑制的变化机制和变化趋势将为我们的临床治疗提供良好的借鉴与指导，对感染期间和感染后免疫抑制剂的使用调整有一定的理论指导意义，从而使其有更合理的临床应用，提高患者在感染期间的存活率与移植物的生存期。

## 参考文献：


[1] 张　栋，张忠涛，刘　建，等. 肝移植术后的细菌感染[J]. 中华肝胆外科杂志，2004，10(5)：297－300.

[2] 蔡常洁，陈规划，管向东，等. 肝移植术后细菌感染的流行病学分析[J]. 中国实用外科杂志，2003，23(3)：163－164.

[3] 易述红，陆敏强，杨　扬，等. 肝移植术后侵袭性曲菌病的防治[J]. 消化外科，2006，5(1)：35－38.

[4] Kamada N，Calne R Y. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage[J]. Transplantation，1979，28(1)：47－50.

[5] Fujimura T，Yang X F，Soriano R，*et al*. Cellular surface molecular and cytokine gene expression in rat heart allografts under optimal doses of cyclosporine and FK 506[J]. Transplant Proc，1998，30(4)：1023－1026.

[6] An International Panel. Banff schema for grading liver allograft rejection：an international consensus document[J]. Hepatology，1997，25(3)：658－663.

[7] 金伯泉. 白细胞分化抗原的应用[M]//金伯泉. 细胞和分子免疫学. 第 2 版. 北京：科学出版社，2001：29－31.

[8] 尤　鹏，刘玉兰，陈国栋. 大鼠肝移植自发免疫耐受模型 T 淋巴细胞亚群的变化[J]. 中华肝脏病杂志，2005，13(9)：698－699.

[9] Spolarics Z，Siddiqi M，Siegel J H，*et al*. Depressed interleukin-12-producing activity by monocytes correlates with adverse clinical course and a shift toward Th2-type lymphocyte pattern in severely injured male trauma patients[J]. Crit Care Med，2003，31(6)：1722－1729.

[10] Vieira P L，de-Jong E C，Wierenga E A，*et al*. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction[J]. J Immunol，2000，164(9)：4507－4512.

[11] Langenkamp A，Messi M，Lanzavecchia A，*et al*. Kinetics of dendritic cell activation：impact on priming of Th1，Th2 and nonpolarized T cells[J]. Nat Immunol，2000，1(4)：311－316.

[12] Reis-e-Sousa G，Yap G，Schulz O，*et al*. Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology[J]. Immunity，1999，11(5)：637－647.

[13] Hotchkiss R S，Swanson P E，Freeman B D，*et al*. Apoptotic cell death in patients with sepsis，shock，and multiple organ dysfunction[J]. Crit Care Med，1999，27(7)：1230－1251.

[14] 朱晓东，朱建幸，李玉峰，等. 新生儿细菌感染时 $CD4^+$ T 细胞表面 IL-2R 的表达[J]. 临床儿科杂志，2003，21(2)：79－82.

[15] Wisnoski N，Chung C，Cioffi W，*et al*. The contribution of $CD4^+$ $CD25^+$ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis[J]. J Surg Res，2006，130(2)：229－230.


（编辑　王小寒）