基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0190-04

含川芎嗪的玻璃化液对异体神经移植免疫反应的影响

袁 新,蒋电明,陈增刚,刘建文,黄英如,欧方生
(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察含不同浓度川芎嗪(Tetramethylpyrazine,TMP)的玻璃化保存液对异体神经移植的免疫学变化,以探索含川芎嗪的玻璃化液保存同种异系(体)神经后对其抗原性的影响。方法:在 Wistar 大鼠的背部和腹部皮下植入经过含川芎嗪的玻璃化液保存的 SD 大鼠的坐骨神经,对照组植入新鲜自体神经。用免疫组化染色检测异体神经中 T 淋巴细胞的侵润程度。结果:含 320 mg/L 川芎嗪的玻璃化液在-20℃保存异体神经 3 周后,$CD4^+$ 和 $CD8^+$淋巴细胞的侵润程度明显轻于含其他浓度川芎嗪的玻璃化液保存的异体神经移植组,神经组织较好保持原形态,周围仅见极少量淋巴细胞侵润,与自体神经植入组无明显差别。结论:含 320 mg/L 川芎嗪的玻璃化液在-20℃保存同种异体神经 3 周后的抗原性明显降低,植入体内后免疫排斥反应不明显。

【关键词】移植,同种;移植免疫学;T 淋巴细胞
【中国图书分类法分类号】R681.5.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-13

Early effects of vitreous cryopreservation with tetramethylpyrazine on immunological response of nerve allograft

YUAN Xin, et al
(*Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the change of immunity in vivo after Vitreous cryopreservation with tetramethylpyrazine nerve allograft was implanted into the recipient so as to judge its immunogenicity. *Methods*: Sciatic nerves of Sprague-Dawley rats were resected and made by Vitreous cryopreservation with tetramethylpyrazin.The nerves from Sprague-Dawley rats were implanted into the dorsal and ventral subcutis of Wistar rats in experimental group。 Fresh nerves from Sprague-Dawley rats were implanted into the dorsal and ventral subcutis of Sprague-Dawley rats in control group respectively.T lymphoeytes infiltraion in isograft nerve was investigated by immunohistochemical *Methods*: staining CD4 and CD8 positive T lymphocytes with anti-CD4 and CD8 monoclonal antibodies(MoAb). *Results*:320 mg/L tetramethylpyrazine combined vitreous cryopreservation stainings at-20℃ for 3 weeks showed that the number of CD4 and CD8 positive T lymphocytes infiltrated into the nerve implants of the experimental group was much lower than that of other tetramethylpyrazine combined vitreous cryopreservation in the control group.there was no marked difference of the 320mg/L tetramethylpyrazine combined vitreous cryopreservation stainings at -20℃ for 3 weeks nerves group compared with autografting group. *Conclusion*:The nerve treated by 320 mg/L tetramethylpyrazine combined vitreous cryopreservation at -20℃ for 3 weeks shoued lower immunogenicity after implantation, and there was no significant rejection response after transplantation in rats.

【Key words】 Transplantation; Homologous; Transplantation immunology; T-lymphoeytes

新鲜异体神经移植时会发生强烈的免疫排斥反应[1],学者们采用物理、化学等处理异体神经能较为有效的降低免疫排斥反应。而含川芎嗪的玻璃化液在-20℃保存异体神经能否降低其免疫反应?本实验在-20℃时,不同浓度川芎嗪的玻璃化液保存同种异体神经 1、2、3、4 周,然后异体皮下包埋 2 周,观察 T 淋巴细胞的细胞免疫反应,检测局部组织中 $CD4^+$ 和 $CD8^+$淋巴细胞的侵润情况,以探索能否提供一种降低异体神经免疫原性的保存方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

1.1.1 实验用的动物 成年健康 SD 大鼠 38 只、雌雄不限,体重为(230±20)g; Wistar 大白鼠 32 只,体重为(230±20)g;实验动物均由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 动物分组 供体组:SD 大鼠 32 只;受体组:Wistar 大白鼠 32 只,分为 A、B、C、D 4 组,每组 8 只;对照组:SD 大白鼠 6 只新鲜自体神经皮下包埋。

1.2 保存液的制备

作者介绍:袁 新(1974-),男,主治医师,硕士,研究方向:周围神经损伤。
通讯作者:蒋电明,男,教授,E-mail:jdm571026@vip.163.com。

A 组：10%DMSO（二甲亚砜）10 ml，20%小牛血清 20 ml，HC-A（高渗枸橼酸盐嘌呤溶液，非改良型）70 ml，川芎嗪 40 mg，川芎嗪浓度为 400 mg/L；B 组：10%DMSO 10 ml，20%小牛血清 20 ml，HC-A 液 70 ml，川芎嗪 32 mg，川芎嗪浓度为 320 mg/L；C 组：10%DMSO 10 ml，20%小牛血清 20 ml，HC-A 液 70 ml，川芎嗪 24 mg，川芎嗪浓度为 240 mg/L；D 组：10%DMSO 10 ml，20%小牛血清 20 ml，HC-A 液 70 ml。

1.3 实验方法

1.3.1 手术方法 供体组：3.5%水合氯醛行大鼠腹腔麻醉，剂量为 0.1 ml/100 g 体重。将 SD 大鼠俯卧，沿左大腿后外侧作皮肤纵形切口，上起骨盆后缘，长约 30 mm。沿肌间隙将股外侧肌、外展短肌与股二头肌分开，显露坐骨神经，悬吊法维持伤口敞开。近端在坐骨神经骨盆出口以远 5 mm 处切断，向远处取长约 15 mm 坐骨神经段；同样方法在右下肢取长约 15 mm 坐骨神经段，共 64 条神经。受体组：3.5%水合氯醛行大鼠腹腔麻醉，剂量为 0.1 ml/100 g 体重。于 Wistar 大白鼠背部和腹部各切长 20 mm 切口，分离皮下组织，各包埋 1 条经含川芎嗪的玻璃化液处理的神经段。对照组（E 组）：按上述方法于 SD 大白鼠左下肢取长 20 mm 神经段，然后将神经段均分成两段分别在自体的背部、腹部各皮下包埋一段。

1.3.2 神经处理 将 64 条 SD 大鼠坐骨神经随机分成 16 份，每份 4 条，每根冻存管放入 4 条神经，共 16 根冻存管；16 根冻存管又平分成 4 份，分别加入 A 组、B 组、C 组、D 组保存液，在 -20℃保存 1 周、2 周、3 周、4 周。A 组中保存 1 周为 A1，A 组中保存 2 周为 A2，A 组中保存 3 周为 A3，A 组中保存 4 周为 A4；依次类推 B、C、D 组保存 1、2、3、4 周分别为 B1、B2、B3、B4；C1、C2、C3、C4；D1、D2、D3、D4。将保存后的神经用生理盐水冲洗 3 次然后皮下包埋于 Wistar 大鼠的背部和腹部，每处 1 条神经。受体组和对照组均于术后 2 周取出皮下包埋的神经段行组织学和免疫学检测。

1.3.3 大体观察 一般情况观察 实验动物的活动和饮食饮水情况，判断可能存在的毒性反应和其它不良反应。局部切口愈合情况，取材时进一步观察移植物的粗细、质地、颜色、与周围组织粘连情况。

1.3.4 HE 染色 取移植体中央的标本用 10%福尔马林（甲醛）固定，常规石蜡包埋，均做横切和纵切片，常规 HE 染色，观察淋巴细胞侵润情况及移植神经的结构情况。

1.3.5 $CD4^+$、$CD8^+$ 淋巴细胞免疫组化 取移植体中央的标本用 10%福尔马林（甲醛）固定 12~24 h 后，常规石蜡包埋，切片厚度 5 μm。一抗为单抗大鼠 CD4、CD8 单克隆抗体，二抗为生物素化羊抗兔 IgG，采用热修复，DAB 染色，苏木素轻度复染，光镜下观察 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 淋巴细胞侵润。

1.3.6 统计学方法 用 MIAS-300 型自动图像分析仪，计算 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 淋巴细胞数目。所采集数据采用：$\bar{x} \pm s$，析因设计资料的方差分析，结果应用 F 检验法，采用统计软件 SPSS11.5 进行统计分析，$P<0.05$ 为有统计学差异，$P<0.01$ 有显著统计学差异。

2 结 果

2.1 大体观察

实验组和自体神经组 Wistar 大鼠，在分别植入预处理神经段和新鲜自体神经段后无明显不良反应，植入部位无红肿现象发生，切口愈合良好，全部实验动物活动无异常，无死亡，饮食饮水正常。

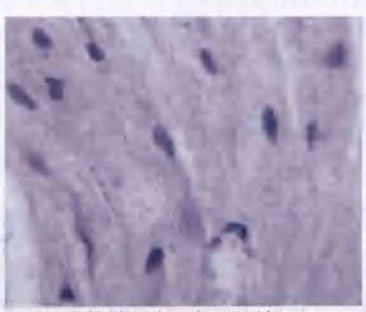
自体神经皮下包埋组：皮下包埋的神经与周围组织粘连非常轻，很容易将其从周围组织中分离出来，神经段外观平展，长度略有收缩，粗细无明显变化，光泽稍变暗。见图 1。

B3、B4 组：在背部、腹部皮下包埋的神经与周围组织粘连较轻，容易将其从周围组织中分离出来，神经段外观较平展，长度略有收缩，粗细无明显变化，光泽稍变暗。见图 2。

A、B1、B2、C 组、D 组：皮下包埋的神经与周围组织粘连非常重，很难将其从周围组织中分离出来，神经段已软化萎缩，可见较多纤维组织形成 外观不平展，长度明显收缩，明显变细，光泽明显变暗。见图 3。

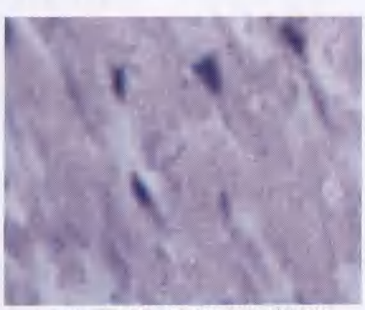
2.2 HE 染色

E 组：自体背部、腹部皮下包埋的神经结构较清楚，术后有很少量的淋巴细胞侵润，见图 1；B3、B4 组：背部、腹部皮下包埋的神经结构较清楚，术后有少量的淋巴细胞侵润，见图 2；A、B1、B2、C、D 组：术后背部、腹部皮下包埋的神经结构难以分辨，组织中有大量细胞碎片，大量的以淋巴细胞为主的免疫细胞侵润，见图 3。



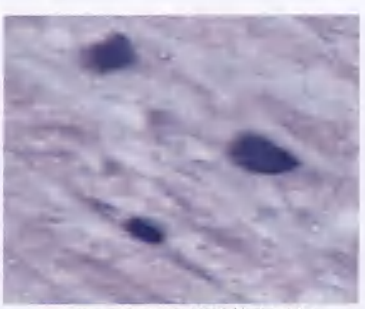
E 组：自体神经皮下包埋的神经组

图 1 HE 染色纵切片×40



B3、B4 组异体皮下包埋的神经组

图 2 HE 染色纵切片×40



A、B1、B2、C、D 组异体皮下包

图 3 HE 染色纵切片×40

2.3 $CD4^+$、$CD8^+$淋巴细胞免疫组化

自体背部、腹部皮下包埋的神经 E 组(见图 4、图 7)与 B3、B4 在背部、腹部皮下包埋的神经组(见图 5、图 8):仅有极少量的 $CD4^+$和 $CD8^+$淋巴细胞的侵润。

A、B1、B2、C、D 组:移植神经及其周围组织中均有大量的 $CD4^+$和 $CD8^+$淋巴细胞的侵润,细胞数量明显多于自体背部、腹部皮下包埋的神经与 B3、B4 组。在侵润的淋巴细胞中间可以观察到崩解的轴突、细胞和髓鞘碎片。见图 6、图 9。

图像分析结果:各组动物移植神经内侵润的 $CD4^+$和 $CD8^+$淋巴细胞的数量图像分析结果为:A 组、B1、B2、C 组、D 组 $CD4^+$和 $CD8^+$淋巴细胞的数量远远多于 B3、B4 组和自体神经背部、腹部皮下包埋的 E 组($P<0.01$),B3、B4 与自体神经皮下包埋无显著统计学差异($P>0.01$)。B3 与 B4 组间的差异无统计学意义($P>0.05$)。具体见表 1、表 2。

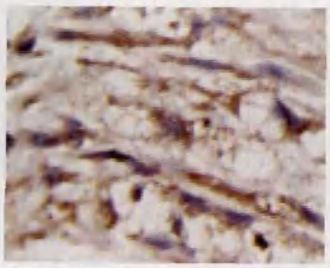


图 4 E 组:自体神经皮下包埋的神经组 $CD8^+$淋巴细胞免疫组化染色纵切片(×400)

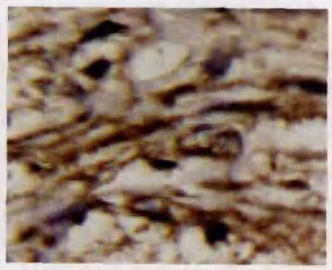


图 5 B3、B4 异体皮下包埋的神经组 $CD8^+$淋巴细胞免疫组化染色纵切片(×400)



图 6 A、B1、B2、C、D 组异体皮下包埋的神经组 $CD8^+$淋巴细胞免疫组化染色纵切片(×400)

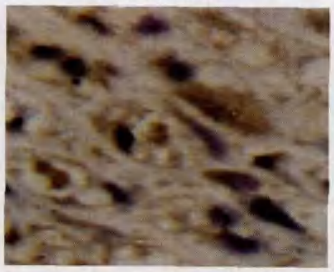


图 7 自体神经皮下包埋的神经组 $CD4^+$淋巴细胞免疫组化染色纵切片(×400)

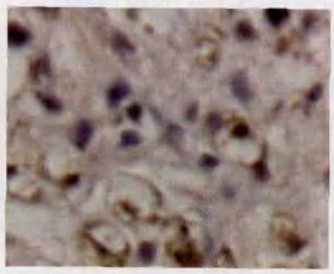


图 8 B3、B4 异体皮下包埋的神经组 $CD4^+$淋巴细胞免疫组化染色纵切片(×400)

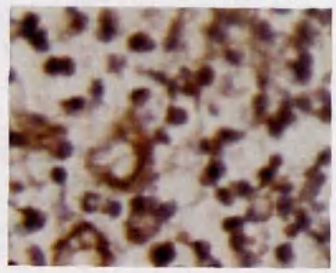


图 9 A、B1、B2、C、D 组异体皮下包埋的神经组 $CD4^+$淋巴细胞免疫组化染色纵切片(×400)

表 1 各组移植体神经内侵润的 $CD4^+$淋巴细胞侵润数量的比较($\bar{x}\pm s$)

	A	B	C	D	E
1 周	623.5 ± 120.0	356.5 ± 51.6	668.1 ± 129.0	789.2 ± 130.2	
2 周	633.0 ± 130.5	349.0 ± 45.3	672.2 ± 138.3	776.0 ± 136.5	
3 周	640.8 ± 127.4	155.3 ± 19.6*	681.4 ± 143.2	765.8 ± 128.3	148.0 ± 15.1**
4 周	642.3 ± 135.2	160.7 ± 16.8*	659.5 ± 131.1	780.4 ± 137.1	

注:B3、B4 与 A 组、B1、B2、C 组、D 组对照组相比,*$P<0.05$;B3、B4 与 E(自体神经)组相比,**$P>0.05$;B3、B4 的差异无统计学意义($P>0.05$)

表 2 各组移植体神经内侵润的 $CD8^+$淋巴细胞侵润数量的比较($\bar{x}\pm s$)

	A	B	C	D	E
1 周	374.2 ± 68.4	142.8 ± 28.7	390.1 ± 77.5	410.1 ± 82.0	
2 周	384.1 ± 73.5	152.6 ± 35.0	381.2 ± 74.5	402.9 ± 79.6	
3 周	369.7 ± 64.9	18.3 ± 5.6*	386.8 ± 69.6	414.5 ± 76.3	19.3 ± 5.6**
4 周	365.7 ± 79.8	17.3 ± 4.9*	392.4 ± 79.8	399.8 ± 71.8	

注:B3、B4 与 A 组、B1、B2、C 组、D 组对照组相比,*$P<0.05$;B3、B4 与 E(自体神经)组相比,**$P>0.05$;B3、B4 组间的差异无统计学意义($P>0.05$)

3 讨 论

组织器官移植后的反应可以分为体液免疫反应和细胞免疫反应,而细胞免疫反应在移植排斥中起重要作用。目前认为细胞免疫应答是移植排斥的主要机制,$CD4^+$淋巴细胞和 $CD8^+$淋巴细胞是主要的效应细胞。在周围神经中主要的抗原成分是雪旺细胞(SC)、髓鞘、神经束膜细胞及巨噬细胞表达供体的抗原,而 SC 是排斥反应的主要目标,这是产生移

植免疫的主要原因[2]。实验中,我们观察到 A、B1、B2、C、D 组:移植神经及其周围组织中均有大量的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 淋巴细胞的侵润,细胞数量明显多于自体背部、腹部皮下包埋的神经与 B3、B4 组。在侵润的淋巴细胞中间可以观察到崩解的轴突、血旺细胞和髓鞘碎片。这种情况说明异体神经组织中的轴突、髓鞘和许旺细胞是机体免疫系统的主要攻击对象。

目前许多异体神经处理方法如超低温冷冻、甘油保存、冻干、化学脱细胞等侧重于如何降低免疫原性,但对异体神经保存方法研究较少。理想的神经保存应能满足下列要求:①保存时间超过 1 年以上;②容易灭菌,不会发生细菌污染;③保存方便,便于携带,可远程运输;④神经移植物保持一定弹性,可供缝合;⑤在保存的同时,降低异体神经的抗原性。作者拟在目前国内外异体神经处理方法的基础上进行综合、改进,以期寻找一种、或几种方便、简单而有效的保存方法。因此,探索异体神经的保存方法具有重大的生物学意义, 而且对异体神经的临床应用前景至关重要。

资料表明川芎嗪具有阻止免疫复合物形成,具有一定的免疫抑制作用。川芎嗪可以抑制巴细胞 DNA 合成、抑制 TXA 生成及活性。吴余升等发现川芎嗪对淋巴细胞 DNA 合成有明显的抑制效应。王建杰等[3]研究发现川芎嗪抑制 RA 活动期 IgG、IgM 的合成,可能是直接抑制过度活化的 CD4TLC,从而抑制免疫功能。谭洪华等[4]通过实验显示川芎嗪可以明显改善免疫性肾损伤大鼠肾脏病理形态和功能, 减少尿蛋白,对抗自由基引起的脂质过氧化损伤,从而抑制免疫性肾损伤。林洪生等[5]研究表明川芎嗪对肿瘤细胞与内皮细胞的黏附有明显抑制作用 ,并可明显抑制 CD44、CD49 粘附因子表达,还可降低内皮细胞通透性,保护内皮细胞的完整,阻断肿瘤细胞与基质的粘附,从而减少了肿瘤转移形成。李志坚等[6]研究证实川芎嗪通过下调狼疮肾炎 IL-12 表达及的合成,减轻狼疮肾炎的发生和发展,川芎嗪可通过下调 IL-12 表达而抑制自身抗体合成,从而改善 IL-12 对狼疮肾炎发病的不利影响。

玻璃化保存(Vitreous cryopreservation)法是一种超速冷冻方法,它是以极快的速度降温冷冻细胞,使细胞游离的水和胶体迅速玻璃化,而不形成冰晶。这种保存方法既避免了由于盐浓度的升高 (慢速降温时)对细胞造成的化学性损伤,又防止了由于冰晶形成(快速降温时)造成的物理性损伤,可获得高存活率[7]。玻璃化保存液能够降低降温和复温过程对细胞造成的损伤。“玻璃化溶液”根据其组成成分不同分为 4 类:①只用透过剂;②透过剂加大分子物质;③透过剂加小分子糖类;④透过剂加大分子物质再加小分子糖类。一般认为第④种配方更为合理[8]。

目前,含川芎嗪的玻璃化液保存周围神经的研究尚未见报道。刘胜雄等[9,10]保存大鼠移植肝时所用川芎嗪浓度为 320 g/L。目前对于周围神经组织保存液中所添加川芎嗪浓度尚无定论。我们将川芎嗪和玻璃化保存液二者结合起来,在玻璃化液中加入不同浓度的川芎嗪,在-20℃温度下保存大鼠坐骨神经 1 周、2 周、3 周、4 周。实验结果显示:玻璃化液和 320 mg/L 川芎嗪结合在-20℃保存异体神经 3 周后 $CD4^+$、$CD8^+$ 淋巴细胞侵润的数量明显少于玻璃化液和 400 mg/L 川芎嗪、240 mg/L 川芎嗪、0 mg/L 川芎嗪在-20℃保存异体神经的数量,有统计学差异($P<0.05$),玻璃化液和 320 mg/L 川芎嗪结合在-20℃保存异体神经 3 周后 $CD4^+$、$CD8^+$ 淋巴细胞侵润的数量与与自体神经皮下包埋后 $CD4^+$、$CD8^+$ 淋巴细胞侵润的数量无明显差异,$P>0.05$。因此,玻璃化液和 320 mg/L 川芎嗪结合在-20℃保存异体神经 3 周后可以明显地降低异体神经的抗原性,没有明显的免疫排斥反应。我们推测该保存方法结合了玻璃化保存液和川芎嗪的优点,玻璃化保存液能够降低降温和复温过程对细胞造成的损伤,而川芎嗪在保存过程起到免疫抑制作用,从而降低异体神经其免疫原性,降低排斥反应。

参 考 文 献

[1] 衷鸿宾,卢世璧,赵 庆,等.去细胞神经同种异体移植的运动功能恢复[J]. 中华创伤杂志,2002,18(9):533-535.

[2] Trumble T E,Shon F G.The physiology of nerve transplantation[J]. Hand Chn,2001,16(1):105-122.

[3] 王建杰,罗文哲,张 涛,等.川芎嗪对类风湿性关节炎患者 PBMC 免疫球蛋白合成的影响[J]. Heilongjiang Medicine And Pharmacy,2004,27(4):15.

[4] 谭洪华,李 霞,薄爱华,等.川芎嗪对免疫性肾损伤大鼠肾脏形态及功能的影[J]. Lishizhen Medicine And Materia Medica Research,2007,18(8):1936-1937.

[5] 林洪生,李树奇,裴迎霞,等.川芎嗪、苦参碱对癌细胞与内皮细胞黏附及黏附因子表达的影响[J]. 中国新药杂志,1999,8(6):384.

[6] 李志坚,李清刚,李幼姬,等.川芎嗪和地塞米松对狼疮肾炎患者 PBMC IL-12 表达及合成 Ig 的影响[J]. 上海免疫学杂志,2001,21(3):184-186.

[7] Karlsson JOM,Cravalho EG,Toner M. A model of diffusionlimited ice growth inside biological cells during freezing[J]. J Appl Physiol,1994,75:4442.

[8] Nagashima H,Kashiwazaki N,Ashhman RJ,et al. Cryopreservation of porcine embryos[J]. Nature,1995,374:416.

[9] 刘胜雄,欧阳永忠,汤 明.川芎嗪对大鼠移植肝的保护作用[J]. 中华现代外科学杂志,2006,3(8): 662-665.

[10] 范连慧,吴雄飞,余荣杰.川芳嗪预处理对大鼠移植肾保护作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2004,26(15):1364-1367.

(责任编辑:关蕴良)