维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)02－0156－03

异种移植胎肠细胞介导排斥反应的免疫学机制

周洪伟[1]，姚榛祥[2]，杜成友[2]

(1.重庆医科大学第二临床学院普通外科，重庆 400010；2.重庆医科大学临床学院普通外科，重庆 400016)

【摘 要】目的：用大鼠游离胎肠移植于小鼠模型研究细胞介导排斥反应(CMXR)的免疫学机理。方法：观察同种和异种胎肠游离移植各组移植物的病理改变和浸润细胞的表型，并用原位杂交方法检测移植物内 Th 细胞因子 mRNA 表达。结果：(1)移植胎肠的存活率同种移植组高于异种移植组($P<0.01$)；(2)异种移植胎肠主要发生细胞介导的排斥反应；(3)异种移植物内浸润细胞主要为 $CD4^+$ T 细胞和 $ED2^+$ MΦ，其 IL－4、IL－5 和 IL－10mRNA 阳性细胞均明显高于 IFN－γmRNA 阳性细胞($P<0.01$)。结论：CMXR 与同种移植急性排斥反应存在本质差异，其特点是排斥程度强烈，异种移植胎肠内以 $CD4^+$ T 细胞和 $ED2^+$ MΦ 浸润为主，且 Th2 细胞功能增强。大鼠至小鼠游离胎肠移植模型是研究 CMXR 的较为理想的动物模型。

【关键词】异种移植；细胞介导排斥反应；细胞因子

【中国图书分类法分类号】R392.4；$R622^+.9$ 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－09－01

Immunological mechanism of the cellular mediated xenograft rejection in the rat free fetal bowel to mouse transplantation

ZHOU Hongwei, et al

(*Department of General Surgery, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe immunological mechanism of CMXR in the rat free fetal bowel transplant to mouse. *Methods*: Two groups were established including allogroup and xenogroup. Pathological changes of grafts in each group were examined. Expression of TH type cytokines mRNA and phenotypes of infiltrating cells intragraft were detected by in situ hybridization histochemistry and immunohistochemistry methods respectively. *Results*: (1)Survival rates of allogroup transplants were higher than those of xenogroup($P<0.01$). (2)Rejection of xenografts in this model is CMXR. (3)The main infiltrating cells were $CD4^+$ T cells and $ED2^+$ MΦ in xenografts. Expression of mRNA for Th2 type cytokines: IL－4, IL－5, and IL－10 was higher than that for Th1 type cytokine IFN－γ in xenografts. ($P<0.01$) *Conclusion*: These results suggest that: (1)CMXR is much stronger than allograft rejection, in which $CD4^+$ T cells and $ED2^+$ MΦ are the major infiltrating cells and the Th2 type cytokines are higher in xenografts that those of in allografts. (2)The model of rat free fetal bowel to mouse transplantation is able to study on CMXR and is easy to operate.

【Key words】Xenotransplantation; Cellular Mediated Rejection; Cytokine

异种移植面临的主要障碍包括体液免疫介导的超急性排斥反应(Hyperacute Rejection, HAR)、延迟性异种移物排斥反应(Delayed Xenograft Rejection, DXR)和细胞介导的异种移植物排斥反应(Cellular Mediated Xenograft Rejection, CMXR)等[1]。现有动物模型由于存在 HAR 和 DXR，导致移植物迅速排斥，因而无法进一步对 CMXR 进行研究，使人们对 CMXR 的了解甚少。

本研究将大鼠游离胎肠移植于小鼠皮下，由于不存在异种移植早期迅速发生的血管化，可避免发生 HAR 和 DXR。通过观察移植胎肠排斥反应的炎性细胞浸润和细胞因子谱的表达情况，以探讨 CMXR 的免疫学机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

供体动物分别为 Wistar 胎鼠($RT1^u$)和 NIH 胎鼠($H-2^{CK}$)，胎龄 18～21 天不等，雌雄不拘。受体动物为成年 Balb/c($H-2^d$)小鼠，体重 20～25g，均为雄性。所有动物均由重庆医科大学实验动物中心提供。分为异种移植(Wistar 胎鼠→Balb/c 小鼠)和同种移植(NIH 胎鼠→Balb/c 小鼠)两

作者介绍：周洪伟(1962－)，男，主任医师，主要研究方向：胃肠外科。

维普资讯 http://www.cqvip.com

组。

1.2 游离胎肠移植模型的建立

在无菌条件下,将临产孕鼠剖宫取胎,剪取一段小肠,长4cm,去除肠系膜。4℃林格氏液冲洗肠管后待用。受体动物用2.5%戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔注射麻醉后沿脊柱方向建立皮下隧道,然后将已制备好的胎肠置于皮下,缝闭皮肤切口。术后统一饲养。

1.3 移植物的常规组织病理检查

在实验设计各时相点定期取材,用甲醛固定,常规石蜡包埋、切片、HE染色,光镜下观察各时相点移植胎肠组织结构改变、炎性细胞浸润及血供情况。

1.4 浸润细胞的免疫组化染色(SABC法)

取术后第6天的异种和同种移植胎肠(各6例),置-196℃液氮罐保存。Anti-L3t4($CD4^+$)单抗、Anti-Lyt2($CD8^+$)单抗(购自北京中山公司),Anti-ED2单抗(购自英国Serotec公司),SABC组化检测盒和DAB显色试剂盒购自武汉博士德公司。用PBS代替一抗作阳性对照。在400×光镜下,连续选取5个视野用网格目镜作阳性细胞计数(细胞总数超过1000个),得出每个视野的阳性率,取其平均值。

1.5 原位杂交法检测移植物内细胞因子mRNA表达

地高辛标记IL-5寡核苷酸探针(3'-CACTCGGT-GTTCATTACACCAA-GAAACTCT-5')由上海细胞所合成。地高辛标记IFN-γcDNA、IL-4cDNA和IL-10cDNA探针(第三军医大学姜庆博士和胡川闽副教授惠赠)。同免疫组化来源标本作石蜡切片进行原位杂交检测。阳性染色位于胞浆,紫蓝色为+++、蓝色为++、淡蓝色为+。杂交前用RNase消化和不加探针切片作阴性对照。

1.6 统计学处理

用统计学程序软件对计数资料进行 χ^2 检验,计量资料用student t 检验,$P<0.05$ 为有统计学显著性差异。

2 结 果

2.1 移植物存活率和病理学改变

如表1所示同种组移植胎肠存活时间明显优于异种移植组。异种移植组与同种移植组的病理改变有许多相似之处:移植术后均可见单个核细胞浸润,第1天主要分布于移植物与周围组织交界区域,第3天时移植物内可见许多浸润细胞,其数量在术后第12天达高峰。但两组的浸润细胞类型以及移植物受排斥时间却截然不同:同种移植物内的浸润细胞以淋巴细胞为主;其存活率优于异种移植组,术后3周仍达33.33%。异种移植组各时相点的组织切片显示,移植物内的浸润细胞主要以单核/巨噬细胞(MΦ)为主,其次为淋巴细胞和少量中性粒细胞等;移植胎肠在术后第6天仅44.44%存活,发生排斥的移植物结构破坏,有些仅残留小肠粘膜或平滑肌组织,第12天后移植物完全被排斥,伴有纤维组织形成,说明此时CMXR的程度最为强烈。

表1 两组移植物存活率比较

组别	n	不同取材时间(天)的存活率(%)					
		1	3	6	12	21	30
异种	31	100(5/5)	80.00(4/5)	44.44(4/9)	0.00(0/6)	0.00(0/6)	—
同种	35	100(6/6)	100.00(6/6)	100.00(6/6)	40.00(2/5)	33.33(2/6)	0.00(0/6)

*第6天、12天和21天,同种:异种,$P<0.01$;第1天和3天同种:异种,$P>0.05$;两组相比 $P<0.05$;** $P<0.01$;△组内相比 $P<0.05$。

2.2 移植物内浸润细胞的免疫组化染色(见表2,图1)

表2 移植物内浸润细胞亚群($\bar{x}\pm s$)

组 别	$CD4^+$	$CD8^+$	$ED2^+$(MΦ)
异种移植组	52.5±10.6	35.0±7.1*△	53.8±1.8**
同种移植组	40.0±14.1	50.0±14.1	<0.5△

结果表明异种移植物内浸润细胞主要为$CD4^+$ T细胞和MΦ,同样移植物内以$CD8^+$ T细胞和$CD4^+$ T细胞浸润为主,而MΦ染色阳性率极低(图1)。

2.3 移植物内细胞因子mRNA表达(见表3,图2)

表3 两种移植物内细胞因子mRNA表达的阳性率

探针	n	异种移植组					同种移植组				
		−	+	++	+++	阳性率(%)	−	+	++	+++	阳性率(%)
IFN-γ	6	3	1	1	1	50.00	1	1	2	2	83.33
IL-4	6	2	0	1	3	66.67*	5	1	0	0	16.67△△
IL-5	6	0	1	2	3	100.00**	4	1	1	0	33.33△
IL-10	6	1	1	2	2	83.33**	5	0	1	0	16.67△△

组内相比* $P<0.05$、** $P<0.01$、△ $P<0.05$、△△ $P<0.01$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

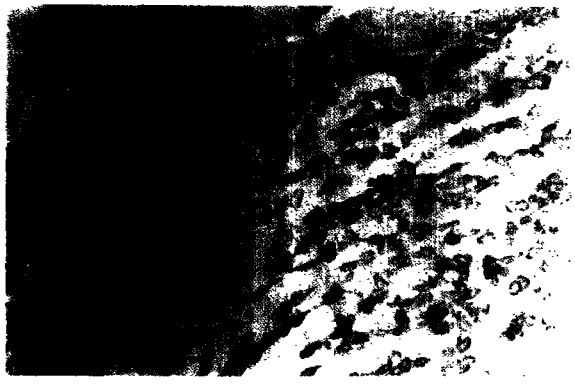


图 1 SP 法免疫组化染色异种移植胎肠内有大量的 $ED2^+$ Mφ 浸润。(×400)

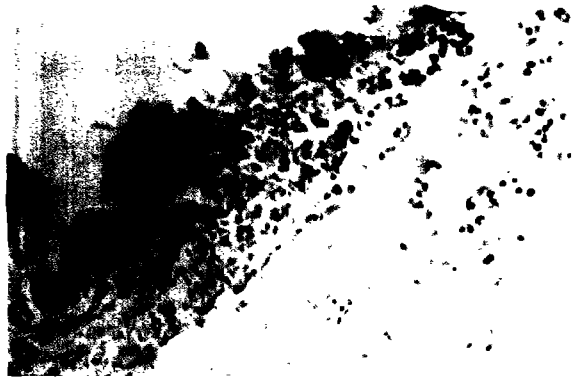


图 2 原位杂交检测,异种移植胎肠内 IL-4mRNA 表达阳性细胞。

从表 3 可见,异种移植物内的 IL-4、IL-5 和 IL-10 的 mRNA 的表达均明显高于 IFN-γmRNA 的表达;相反,同种移植物内的 IFN-γmRNA 的表达却明显高于 IL-4、IL-5 和 IL-10 的 mRNA 的表达(图 2)。

3 讨 论

Thulin 等[2]将兔的胎肠移植于裸鼠皮下后,移植物能正常存活,提示在无细胞免疫参与时,异种移植物可免遭排斥。我们在实验中发现异种移植组与同种移植组一样:移植胎肠主要受到浸润细胞攻击而遭到排斥,如果用 CsA 抑制受体动物的细胞免疫功能,可使异种移植胎肠存活延长至 21 天(另见报道)。说明在游离胎肠移植模型中移植物的失活主要失受到细胞介导的排斥反应所致。

在本移植模型中,异种移植物比同种移植物更快被完全排斥,其主要发生在移植后 6 天左右,与文献报告相同[3,4]。虽然异种和同种移植后发生排斥反应移植物的病理改变有相似之处,但也存在许多差异。首先是异种胎肠遭受的免疫攻击明显强于同种胎肠,异种胎肠术后第 3 天时微绒毛就有部分破坏;第 6 天 50% 以上移植物遭到完全排斥,存活的移植物结构亦严重破坏,而同种移植物于第 21 天时仍有 33% 存活。其次是异种和同种移植物内浸润的炎性细胞类型也不同,前者浸润细胞以 MΦ 和淋巴细胞为主;后者则主要是淋巴细胞浸润。提示二者之间的免疫学机制不同。

文献报道用抗 CD4 单抗去除受体动物的 $CD4^+$ T 细胞,可使异种移植物存活时间明显延长;用抗 CD8 单抗治疗,则无延长异种移植物存活的作用[5]。新近 Wecker 等[6]和 Gill 等[7]的研究均证实,用 $CD4^+$ T 细胞重建免疫缺陷受体动物的细胞免疫后,可使异种移植物迅速被排斥;而单用 $CD8^+$ T 细胞重建受体动物的免疫功能,异种移植物则可继续存活。本研究的免疫组化染色结果显示,异种移植胎肠内主要是 $CD4^+$ T 细胞和 $ED2^+$ MΦ;同种移植物内则以 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞浸润为主。上述结果进一步说明 CMXR 与问种移植排斥反应发生的免疫学机制存在本质差异。

$CD4^+$Th 细胞可分化为 Th1 和 Th2 两群功能不同的亚群。Th1 细胞分泌 IL-2、IFN-γ 和 TT-β;Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10 和 IL-13 等,检测相应的细胞因子谱可了解 Th1 和 Th2 的功能变化[8]。参与同种移植急性排斥反应的主要是 Th1 细胞,Th2 细胞可延长移植物存活时间[9]。本实验用原位杂交方法检测移植物内细胞因子 mRNA 表达,结果表明同种移植物内 IFN-γmRNA 阳性细胞明显高于 IL-4、IL-5 和 IL-10mRNA 阳性细胞,,Th1 细胞功能增强;相反异种胎肠内 IL-4、IL-5 和 IL-10mRNA 阳性细胞明显高于 IFN-γmRNA 阳性细胞,以 Th2 细胞功能为主。Morris 等[10]在猪-小鼠胎胰移植模型中亦观察到发生排斥反应的移植物内 IL-3、IL-4 和 IL-5mRNA 表达增高;用抗 CD4 单抗治疗受体动物后,移植物存活明显延长,此时移植物内 IL-3、IL-4 和 IL-5mRNA 表达缺失或无变化,说明在 CMXR 中 Th2 细胞功能增强,这也与同种移植排斥反应不同。

综上所述,认为大鼠→小鼠游离胎肠移植模型可有效避免 HAR 和 DXR,异种移植胎肠主要发生细胞介导的排斥反应,表明该模型是(下转第 172 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

LVEDP 升高、心功能下降，反映 CHF 的确与氧化过载现象高度有关。实验还发现，机体出现氧化—抗氧化失衡与心肌细胞发生凋亡呈一致性变化，提示心肌细胞凋亡与氧自由基过量聚集密切相关，故氧化应激介导心肌细胞凋亡是 CHF 发生、发展的重要发病环节。这也提示，应用外源性抗氧自由基药物打断氧化应激的恶性循环，恢复 OFR 代谢的平衡状态，为临床上治疗 CHF 提供了新的思路。

综上所述，通过腹主动脉缩窄术后 4 周，幼鼠发生心室重构、血流动力学紊乱及心功能恶化，说明 CHF 模型制备是成功的。心室重构、心肌细胞凋亡及氧化应激参与了 CHF 发生、发展的病理生理过程。

参 考 文 献

[1] Okabe M, Kawamura K, Terasaki F, et al. Remodeling of cardiomyocytes and their branches in juvenice, adult, and senescent spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats [J]. Heart Vessels, 1999; 14(1): 15 - 28.

[2] Collucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure [J]. Am J Cardiol; 1997, 80: 15L - 25L.

[3] 徐 峰，王景全，郭荣利，等. 高频超声显像评价慢性压力负荷大鼠心肌结构和功能的动态改变[J]. 中国超声医学杂志，2001; 17: 293 - 296.

[4] Cohn JN, Ferrari R, Shavpe N, et al. Cardiac remodeling concepts and clinical implications: a consensus paper fi - om an international forum on cardiac remodeling [J]. J Am Coll Cardiol, 2000; 35: 569 - 582.

[5] 刘 健，何作云，王培勇. 心肌细胞核兰尼受体在大鼠压力超负荷心肌肥厚发生中的作用[J]. 中华心血管病杂志，2002; 30(3): 168 - 171.

[6] Capomolla S, Febo O, Gnemmi, et al. fi - blockade therapy in chronic heart failure: diastolic function and mitral regurgitation improvement by carvedilol[J]. Am Heart J, 2000; 13 9: 596 - 608.

[7] Bing OH, Hypothesis: apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload[J]. J Mol Cell Cardiol, 1994; 26: 943 - 948.

[8] Olivetti G, Abbi R, Quaini F, et al. Apoptosis in the failing human heart [J]. N Eng J Med, 1996; 336: 1131 - 1141.

[9] Li Z, Bing OHL, Long X, et al. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition of heart failure in the spontaneously hypertensive rat[J]. Am J Physiol, 1997; 272: H2313.

[10] 邢洪涛，柏树令，张丽影. 慢性压力负荷性心衰大鼠心肌细胞凋亡的研究[J]. 中国微循环，1999; 3(2): 90 - 92.

[11] Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, et al. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myoeardium [J]. Circ Res, 2000; 86(2): 119 - 120.

(上接第 158 页)研究 CMXR 的较为理想的动物模型。CMXR 与同种移植急性排斥反应存在本质差异，其特点是排斥程度强烈，异种移植胎肠内以 $CD4^+$ T 细胞和 $ED2^+M\Phi$ 浸润为主，且 Th2 细胞功能增强。

参 考 文 献

[1] Auchincloss H Jr, Sachs DH. Xenogeneic transplantation [J]. Annu Rev Immunol, 1998; 16(2): 433 - 470.

[2] Thulin JD, Kuhlenschmidt MS, Gelberg HB. Development, characterization, and utilization of intestinal xenograft model for infectious disease research[J]. Lab Invest, 1991; 65 (1): 719 - 722.

[3] Wallgren AC, Karlsson - Parra A, Korsgren O. The main infiltrating cell in xenograft rejection is a CD4 macrophage and not a T lymphocyte[J]. Transplantation, 1995; 60(2): 594 - 598.

[4] Yamagami S, Isobe M, Yamagami H, et al. Mechanism of concordant corneal xenograft rejection in mice synergistic effects of anti - leukocyte function - associated antigen - 1 monoclonal antibody and FK506[J]. Transplantation, 1997; 64(1): 42 - 45.

[5] Yang L, Mottram PL, Han WR, et al. Effect of anti - CD4, anti - NC, and anti - NK monoclonal antibody on the survival of cardiac xenografts and allografts in mice[J]. Transplant Proc, 1995; 27: 2185 - 2189.

[6] Wecker H, Winn HJ, Auchincloss H Jr. $CD4^+$ T cells without $CD8^+$ or B lymphocytes, can reject xenogeneic skin grafts[J]. Xenotransplantation, 1994; 1(1): 86 - 89.

[7] Gill RG, Wolf L, Daniel D, et al. $CD4^+$ T cells are both necessary and sufficient for islet xenograft rejection[J]. Transplant Proc, 1994; 26: 1203 - 1208.

[8] 周洪伟，姚榛祥. 供体特异性 T 细胞疫苗诱导协调性异种移植延长存活的作用[J]. 中华器官移植杂志，2001; 22 (2): 230 - 232.

[9] Field EH, Gao QL, Chen NX, et al. Balancing the immune system for tolerance - A case for regulatory CD4 cell[J]. Transplantation, 1994; 64(1): 1 - 7.

[10] Morris CF, Simeonovic CJ, Fung MC, et al. Intragraft expression of cytokine transcripts during pig proislet xenograft rejection and tolerance in mice[J]. J Immunol, 1995; 154: 2470 - 2475.