维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)04－0432－04

建立肝细胞皮下移植模型用以研究异种移植免疫反应

邓小康[1],姚振祥[2]

(1.广州市肿瘤医院腹外科 广州 510095; 2.重庆医科大学临床学院普外科 重庆 400016)

【摘 要】目的:建立异种肝细胞皮下移植模型,并探讨用以研究异种移植细胞性排斥反应的可能性。方法:用原位肝脏胶原酶循环灌注法分离大鼠肝细胞,分离出的肝细胞存活率达 95%以上,分别注射于皮下及脾脏,于移植后不同时间点取材进行组织形态及功能观察,HE 染色为主,结合 G－6P、SDH 等组织化学方法观察移植肝细胞的存活状态。结果:在术后 3～28 天期间,脾脏组与皮下组存活率无显著性差异($P>0.05$),仅在 60 天时相点脾脏组存活率(75%)大于皮下组(37.5%);且术后 4～7 天开始发生细胞性排斥反应。结论:认为肝细胞皮下移植可作为研究异种移植细胞性排斥反应的模型。

【关键词】异种移植;细胞移植;肝细胞;免疫排斥

【中国图书分类法分类号】R392.4 【文献标识码】B 【收稿日期】2001－01－08

Research on xenogeneic hepatocyte transplantation

DENG Xiao－kang, et al

(Department of Abdomen Oncology, Guangzhou Tumor Hospital)

【Abstract】 ***Objective***: This study is to transplant hepatocyte subcutaneosly and to see the possibility of eliminating CMXR by using this new model. ***Methods***: Preparation of isolated hepatocytes was performed fundamentally according to the collagenase digestive method of Berry and Friend using a recirculating perfusion apparatus. Hepatocellular transplantation was carried out by direct injection of the hepatocyte suspension into the splenic parenchyma or injecting subcutaneously. Recipients were killed, and their spleen and skin specimens were fixed in 10% formalin and stained with hematoxylin and eosin and for PAS. For $G－6－P$ and SDH stain, fresh thin frozen sections were used. ***Results***: The results revealed that no significant difference of the xenograft survival was found between splenic hepatocyte and subcutaneous hepatocyte within one month. It is always believed that the CMXR happen from four to seven days after transplantation. ***Conclusion***: So the subcutaneous hepatocellular transplantation can be used as the model to appreciate CMXR.

【Key words】 Xenotransplantation; Cell transplantation; Hepatocyte; Immune rejection

异种移植因可能解决同种异体供器官短缺的问题而成为全球研究热点。但迄今临床异种移植数量少,效果不理想,主要的原因是异种移植后将出现超急性排斥(hyperacute rejection, HAR)和急性血管性排斥(acute vascular xenograft rejction, AVR),以及急性细胞性排斥和慢性排斥。前二者属于体液性反应范畴,其机理已研究得较清楚,随着生物基因工程的发展,此类排斥反应可望最终得到解决。较体液性排斥而言,异种移植细胞性排斥反应的机理研究相对较少,故在异种体液性排斥反应有渴望得到解决的前提下,越来越多的人把眼光投向研究异种细胞性排斥反应。研究该反应的前提是避免移植物血管化,从而避开早期血供带来的 HAR 及 AVR。目前异种皮肤移植和异种胰岛移植为二个非血管吻合性移植,是经典的研究异种细胞性排斥反应的模型,但随着该领域不断的深入研究,产生动物模型多样化的要求,而且具体到某一器官,其排斥反应也有特殊性。肝细胞移植常作为肝脏先天性酶缺乏症和血液系统疾病及急、慢性肝衰竭的治疗方法,本实验拟将肝细胞移植作为研究异种移植细胞性排斥反应的模型。1979 年 Mito 等证明脾是肝细胞移植的最适部位,有利于其长期存活。但因为脾内注射肝细胞

作者介绍:邓小康(1971－),男,住院医师,博士。主要研究方向:器官移植。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本身就具有较强的诱导免疫耐受的功能，为排除此干扰，故不选择脾脏作为移植部位。本文拟通过比较皮下、脾的不同移植部位对肝细胞存活的影响，探讨选择皮下移植作为研究异种移植细胞性排斥反应模型的可行性。

1 材料和方法

1.1 动物雄性 Wistar 大白鼠，体重 180～250g，雄性纯 Babl/c 小鼠，体重 18～20g，均购自重庆医科大学实验动物中心，实验前 12h 禁食，自由饮水。

1.2 胶原酶原位灌注法分离纯化大鼠肝细胞

1.2.1 药品及试剂

牛血清蛋白(BSA)、HEPES 购自上海生化所；IV 型胶原酶、胰蛋白酶抑制剂购自 Sigma 公司，其余均为国产分析纯品。

无 Ca^{2+} 灌流液：NaCl 40g，KCl 2g，$NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 0.39g，$Na_2HPO4 \cdot 12H_2O$ 0.76g、HEPES 11.9g，EDTA 0.95g，$NaHCO_3$ 17.5g，Glucose 4.5g 溶于 1000ml 三蒸水中作为贮存液，临用前稀释 5 倍，用 1mol/L NaOH 调至 pH 为 7.4。

清洗缓冲液：NaCl 4.0g，KCl 0.2g，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.3g，Glucose 0.9g，HEPES 0.3g，$CaCl_2$ 0.02g 溶于 500ml 三蒸水，用 1mol/L NaOH 调至 pH 为 7.4。

胶原酶灌流缓冲液：NaCl 4g，KCl 0.2g，$NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 0.039g，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.0755g，HEPES 11.9g，$NaHCO_3$ 0.175g 溶解于三蒸水中，加 $CaCl_2$ 0.28g 和 BSA0.1%(w/v)，加三蒸水至 500ml，以 1mol/L NaOH 调至 pH 为 7.2～7.4，直径 0.22μm 滤器过滤灭菌，4℃贮存。临用前配成含 0.005% 胰蛋白酶抑制剂和 0.05% IV 型胶原酶的缓冲液 50ml。

1.2.2 主要仪器 大鼠肝脏灌流装置(自制)，包括蠕动泵，恒温水浴箱及硅胶导管等。

1.2.3 胶原酶原位灌注法分离纯化大鼠肝细胞 (参照 Segln 法并加以改进)

1.2.3.1 大鼠肝脏原位灌流

肝门静脉插管，用 37℃ 无 Ca^{2+} 灌注液，以 20～30ml/min 流速灌注肝脏，迅速剪断下腔静脉；原位灌注 2～4min 后，分离肝脏移至盘中，勿扭转门静脉保持灌流通畅，继续灌流约 10min 至肝脏变为灰白色；即用 37℃ 酶灌流缓冲液，以 30～40ml/min 流速灌注，继续 10～15min，见肝脏肿大变软，表面出现裂纹时，终止灌流。将肝脏放于盛有清洗缓冲液的平皿中，撕去包膜，小心梳理，使肝细胞散落。

1.2.3.2 肝细胞纯化

获得的肝细胞悬液用 250μm 滤网或单层纱布过滤，37℃孵育 30min 并轻轻摇动；取出放冰浴 5min 使悬液冷至 0℃，用 100μm 滤网或三层纱布过滤后，冷至 0℃，200g 离心 5min，重复上述操作三次，末次离心前用台盼蓝排斥试验检测细胞活率(100 个细胞中不被染色的细胞数)，并计数细胞数。

1.3 肝细胞移植

1.3.1 皮下移植 受体小鼠乙醚麻醉，剪去骶尾部体毛约 1cm×1cm 范围，碘酒、酒精消毒，用 4.5 号针头向皮入注入 0.2ml 肝细胞悬液(约含 4×10^7 个肝细胞)，边注入边退针。注射完毕后进针点快速用 ZT 胶封闭止血。

1.3.2 脾脏移植 受体鼠在乙醚麻醉下开腹，暴露脾脏，取 0.2ml(约含 4×10^7 个肝细胞)肝细胞悬液，用 4.5 号针头直接注入脾实质内，注射时用无齿镊暂时夹住脾门及注射部位，注射毕后用 ZT 胶快速封闭止血。

1.4 肝细胞移植后组织形态学与功能观察

1.4.1 组织病理学检查 取甲醛固定移植物，常规石腊包埋，切片，HE 染色，观察移植肝细胞的组织形态及炎性细胞浸润。

1.4.2 组织化学染色 移植物取材后置入恒冷切片机，约 1h 后恒冷箱切片机切成厚 6μm 冰冻连续切片，常规方法 G-6-P、SDH、PAS 染色，光镜观察。

1.5 实验设计

1.5.1 实验分为两组 (1)同系移植组(Isotransplantation，简称 ISO)：wistar 大鼠→wistar 大鼠的肝细胞移植；(2)异种移植组(Xenotransplantation，简称 Xeno)：wistar 大鼠→Balb/c 小鼠的肝细胞移植。

表 1 实验分组

分组	移植配对	术后取材时间(d)
Xeon	Wistar 大鼠→balb/c 小鼠	3、7、14、21、28
ISO	Wistar 大鼠→Wistar 大鼠	3、7、14、21、28、60

于移植术后 3 天、7 天、14 天、21 天、28 天、2 月各时间点分别活杀 8 只受体鼠，取各个部位移植物，甲醛固定或 -190℃液氮保存，进行肝组织形态和功能观察，计算各时间点肝细胞生存率。

1.5.2 移植物存活判定 参照 Kato 法结果采用半定量形式记录，以一：肝细胞团的结构大致正常，浸润细胞极少。+：肝细胞团部份破坏，浸润细胞约占移植灶面积的 40%。++：肝细胞团大部份破坏，浸润细胞约占 40%～80%；+++：肝细胞团完全丧失，以纤维组织替代、浸润细胞占 80% 以上。－、+、++ 时判为移植物存活，+++ 时判为移植物失活。

1.5.3 统计学处理 采用上海医用统计学程序软件，对计数资料进行 χ^2 检验，计量资料进行方差分析。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结 果

2.1 分离肝细胞的细胞数及其活率

按前述方法分离一只大鼠的肝脏,可分离出 10^9 以上数量级的肝细胞,其活率可达 95% 以上,可满足移植实验的要求。

2.2 各移植物的存活率

表 2 各种不同移植物存活率(%)的比较

移植部位	不同取材时间(d)的存活率(%)											
	3		7		14		21		28		60	
	ISO	Xeno	ISO	Xeno	ISO	Xeno	ISO	Xeno	ISO	Xeno	ISO	Xeno
脾 脏	100	87.5	100	37.5	100	12.5	87.5	12.5	87.5	--	75.0	--
皮 下	100	87.5	100	37.5	87.5	12.5	75.0	--	75.0	--	37.5	--

①第 3、7、14、21、28 天 ISO 组: 脾脏: 皮下 $P>0.05$

②第 3、7、14、21、28 天 Xeno 组: 脾脏: 皮下 $P>0.05$

③第 60 天 ISO 组: 脾脏: 皮下 $P<0.01$

④第 3 天 脾脏组: ISO: Xeno $P>0.05$

皮下组: ISO: Xeno $P>0.05$

⑤第 7、14、21、28、60 天 脾脏组: ISO: Xeno $P<0.01$

皮下组: ISO: Xeno $P<0.01$

2.3 肝细胞移植后组织形态与功能观察

移植术后不同时期(3～60 天)标本切片观察,均可发现存活肝细胞。移植术后早期,存活肝细胞呈椭圆形,散在不规则排列,数量较少,随着时间延长,移植存活肝细胞开始增殖,形态趋向规则,多边形。其排列也呈索状、团块状、构成类似正常肝再生结节组织样结构。肝细胞向四周呈"浸润"状生长。PAS 染色显示肝细胞浆内丰富的糖元颗粒。同系移植术后期或异种移植 1 周后,移植灶内发生炎性细胞浸润逐渐增强,且逐渐取代正常肝细胞,肝细胞团正常结构逐渐破坏,丧失"铺砖"样排列,细胞核逐渐发生变性坏死,细胞浆嗜伊红性坏死,最终被炎性细胞完全替代。

移植术后,2 月内存活肝细胞 G－6－P,SDH 等酶染色呈阳性,与正常肝组织比较其活性有所减弱,而且在同一切片上,移植肝细胞酶活性强度也不完全均匀一致,经连续随访观察,其活性强度变化不大,丢失现象未加重。

3 讨 论

肝细胞移植是将游离的,有活性的大量肝细胞移植到受体内,分离肝细胞的方法包括(1)机械分离法;(2)EDTA 螯合法;(3)TPB 螯合法;(4)酶解法。较为常用的是 Berry[1,2] 等改进的联合 EDTA 的胶原酶酶解法,其后许多学者在其基础上加以改进,减少肝细胞在分离过程中的损害,目前成年动物多选用原位肝脏胶原酶循环灌流法。分离后的肝细胞可移植于门静脉、腹腔、脾、肠系膜、小肠壁、肾被膜、肺间质、腹膜后、胰腺被膜和皮下等处。成活的肝细胞可分泌白蛋白、多种酶类、代谢胆色素等。组织学检查是证实移植肝细胞在受体内是否存活的常用方法,苏木精－伊红染色就能清楚地观察到移植肝细胞;PAS 染色可显示其参与糖代谢的功能。肝细胞的代谢功能极为复杂,要全面的了解移植肝细胞的功能几乎是不可能的。本文应用酶组织化学的方法,定性研究了移植肝细胞 G－6－P、SDH 等酶的活性。G－6－P 是调节糖代谢的关键酶,而 SDH 是三羧酸循环的代表酶,反映了移植肝细胞具有有氧能量代谢的功能。这些酶组织化学的阳性结果,从一个侧面反映了移植肝细胞具有代谢功能。

本实验将肝细胞移植作为研究异种移植细胞性排斥反应的动物模型,避免了血管化实体器官移植后发生超急性排斥反应的风险。只要肝细胞能够存活足够长的时间,进入细胞性排斥反应阶段,就可以作为研究该排斥反应的模型。肝细胞移植可有多个部位的选择,脾脏是肝细胞移植最常选用的部位,1979 年 Mito[3～5] 等证明脾是肝细胞移植,并使其长期存活的最适部位,同基因异体肝细胞在脾内存活达 21 个月之久。但近年研究显示,对自体肝细胞移植来说,腹腔内的肠系膜、小肠壁内移植操作简单,成活率高,较脾内优越。况且肝细胞脾内移植本身就有较强的诱导免疫耐受的作用;进行细胞组织化学染色时,脾细胞可表达与肝细胞同样的酶类,不利于观测肝细胞活性。为排除此干扰,本组选择皮下移植,移植方法简单、便于取材。近年来皮下移植模型研究较多,心肌细胞皮下移植、小肠细胞皮下移植等模型均能有效研究移植排斥反应[6,7]。肝细胞皮下移植后,肉眼可大致观察皮下肝细胞再生结节的生长。本实验对 Wistar 大鼠行原位肝脏胶原酶循环灌注,分离出的肝细胞移植于皮下,于移植后各时间分别活杀 8 只大鼠,取材进行组织形态及功能的观察,以 HE 染色为主,结合 G－6－P、SDH 等组织化学的染色方法观察移植肝细胞的存活状态,通过与传统的肝细胞脾脏移植作对比研究,证实其作为

维普资讯 http://www.cqvip.com

异种移植细胞性排斥反应模型的可行性。对各移植组存活率比较分析(表 2),说明在一定的时期内,皮下对肝细胞存活的作用不亚于脾脏,结合术后 4～7 天开始发生的细胞性排斥反应,故可认为肝细胞皮下移植可作为研究异种移植细胞性排斥反应的模型。ISO 组肝细胞存活率明显高于 Xeno 组,术后第 3 天,二者存活率相同,至术后第 7 天,Xeno 组存活率明显降低,脾脏组与皮下组均为 37.5%,而 ISO 脾脏及皮下组仍为100%,差异具显著性($P<0.01$),体现出受体免疫系统开始发挥效应。术后 14、21、28 天各时间点,Xeno 无论脾脏及皮下组,存活率均明显低于 ISO 移植,说明种属差异对移植物存活具有巨大的影响。进一步对移植肝细胞组织形态及功能的观察,发现移植术后不同时期均出现存活肝细胞,早期细胞呈椭圆形,随着时间延长,形态趋向规则,细胞数量显著增加,排列也类似正常的肝组织,PAS 染色可见肝细胞内染成红色的阳性颗粒。组织化学染色发现多数移植肝细胞 G－6－P、SDH 表达阳性,与正常肝组织比较其活性有所减弱,经连续随访观察,其活性强度变化不大,丢失现象未加重,反映出移植肝细胞具有代谢功能。本文通过对皮下移植肝细胞存活率的分析,结合细胞组织化学的方法,全面分析了移植肝细胞的功能,认为肝细胞皮下移植可作为研究异种移植细胞性排斥反应的模型。

参 考 文 献

[1] Berry MD. High－yeild preparation of isolated rat liver parenchymal cells[J]. J cell Bio, 1969; 43: 506－509.

[2] 徐家善,张东兴,纪玉宝,等. 肝细胞移植实验研究中大白鼠肝细胞悬液的制备[J]. 中华器官移植杂志, 1983; 2: 73－75.

[3] Makowka L, Rotstein L, Falk R, et al. Reveral of toxic and anoxic indnced hepatic failure by syngeneic allogeneic and xenogeneic hepatocyte transplantation[J]. Surgery, 1980; 88: 244－248.

[4] O'Neill PL. Cell free supernatant from hepatocyte Cultures improves survival of rats with chemically induced acute liver failure[J]. J surg Res, 1982; 32: 347－349.

[5] Mito M, Ebata H, Kusano M, et al. Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen[J]. Transplantation, 1979; 28: 499－504.

[6] 陈丽君,张玉兰,刘京芳. 小鼠游离心肌耳廓移植模型用于药物筛选的探讨[J]. 中国药理通讯, 1984; 1(3－4): 210－215.

[7] Thulin JD, Kuhlenschmidt Ms, Gelberg HB. Development Characterization of intestinol xeno graft modle for infection disease research[J]. Lab Invest, 1991; 65: 719－722.