维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0017-03

输入供体血对大鼠移植胰腺白介素-2和TNF-α的影响

孙治君，姚榛祥

（重庆医科大学临床学院器官移植研究室 重庆 400016）

【摘 要】目的：了解输入供体血延长大鼠移植胰腺功能存活的机制。方法：取封闭群健康wistar大鼠作为供受体。制成糖尿病模型的受体大鼠分为对照和输入供体血二组。采用胰管开放全胰腺腹腔内移植。术后7天处死动物，取移植胰腺作HE染色和胰岛gomori改良醛复红染色，碱性磷酸酶桥联酶标法检测淋巴细胞和细胞因子。结果：输入供体血组的移植胰腺腺泡和胰岛结构正常，CD^+_4T细胞显著增高。对照组胰腺腺泡和胰岛结构破坏，CD^+_8T细胞，IL-2，TNF-α显著增高。对照组CD^+_3T细胞、NK细胞均比输入供体血组高，但无显著差异。结论：输入供体血延长大鼠移植胰腺功能存活与IL-2，TNF-α降低有关。

【关键词】大鼠；供体血；胰腺移植；IL-2；TNF-α

【中国图书分类法分类号】R617 【文献标识码】A 【收稿日期】200-06-20

Influences of donor blood transfusion decreasing expressions of IL-2, TNF-α for pancreas allograft in rats

SUN Zhi-jun, et al

（Research Laboratory of Organ Transplantation, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016）

【Abstract】 *Objective*: To study potential mechanisms of DST(donor-specific transfusion) prolonging pancreas allograft survival in the rat model. *Methods:* Outbred wistar male rats were used as blood and pancreas donor and diabetic recipients. Diabetic recipients were divided into two groups: control and DST group. Whole pancreas transplantation in abdomen were performed with pancreatic ductopen. Two groups of rats were killed for 7 days after transplantation. Grafted pancreas were stained with Hematoxylin and eosin stain method. Islets were stained with Gomori modified aldehyde fuchsin stain method. Alkaline phosphatase enzyme immunoassay method was used to detect lymphocyte and cytokines in allografts. *Results:* Analysis of grafts showed that both control and DST rats had lymphocytes infiltrates, higher percentage of CD^+_4 T cells in DST group and higher percentage of CD^+_8 T cells in control group. There was no evidence of pancreas and islet injury in DST rats. Grafts in control rats were characterized by pancreas and islet injury and expression of IL-2, TNF-α. *Conclusion:* These results indicated that DST prolonging pancreas allograft survival was associated with decreasing expression of IL-2, TNF-α in grafts.

【Key words】 Rats; DST; Pancreas transplant; IL-2; TNF-α

动物实验表明大鼠胸腺内注入供体骨髓诱导的对肝脏移植免疫耐受与自发肝脏移植免疫耐受，其受体的免疫状态并无差异，但诱导耐受的移植肝表达IL-10显著增高，临床上接受肾脏移植，移植肾已存活8～10年的患者，外周血淋巴细胞抗供体CTL活性显著降低。我们已观察到移植时输入供体血能延长大鼠移植胰腺功能存活，为此进一步比较输入供体血致功能存活延长的移植胰与未作处理而排斥的移植胰间淋巴细胞和细胞因子的差异，以了解输入供体血延长大鼠移植胰功能存活的机制。

作者介绍：孙治君（1962- ），男，副教授，博士

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

选用同月龄雄性封闭群健康Wistar大鼠20只，体重220～300g，10只大鼠用10%四氧嘧啶按220mg/kg一次性腹腔注射，制成糖尿病模型，分为①对照组：5只大鼠，移植前和移植时不做处理；②输入供体血组：5只大鼠，移植前2天、给硫唑嘌呤5mg/kg，加于10ml水中口服。胰腺移植前4h腹腔内注射供体大鼠全血1ml，移植术后不再口服硫唑嘌呤。用于二组的供体大鼠均于切取胰腺前，穿刺心脏抽取全血。

1.2 胰腺移植

采用胰管开放全胰腺腹腔内移植。切取供体胰腺时，游离整个胰腺及所连的脾脏，经腹主动脉插管，用4℃含肝素

维普资讯 http://www.cqvip.com

的林格氏液进行胰腺重力性低压灌洗。直至胰腺苍白，将带有腹腔动脉、门静脉供胰连同脾脏一并切下，保存在灌洗液中备用。受体胰腺移植时，暴露左侧肾脏，仔细分离左肾动静脉，切除左肾。将供胰的门静脉与受体的左肾静脉，供胰的腹腔动脉与受体的左肾动脉行端端吻合，开放血流后，切除供胰所连脾脏。

1.3 血糖测定

各组移植术后第1天剪尾取1滴血用血糖仪测非空腹血糖，血糖低于11.2mmol/L作为移植胰功能正常的标准。血糖连续2次高于11.2mmol/L作为移植胰排斥的标准。移植术后2周内每天定时测定非空腹血糖。

1.4 病理检查

胰腺移植术后第7天处死二组动物，切取移植胰腺。部分用10%福尔马林固定，石腊包埋，做5μm厚切片。①HE染色：观察胰腺腺泡结构和胰岛结构；②胰岛gomori改良醛复红染色：观察β细胞，β细胞呈紫蓝色，核呈黑蓝色，腺泡呈褐色。

1.5 免疫组化测定

各大鼠的部分移植胰腺组织放-80℃低温冰箱冻存。检查前在-40℃衡冷箱内，做4μm厚冰冻切片，粘于载玻片上，纯丙酮固定5min，碱性磷酸酶桥联酶标法染色，用于检测淋巴细胞和细胞因子。抗CD_3抗体(总T淋巴细胞)，抗CD_4抗体(辅助/诱导T淋巴细胞)，抗CD_8抗体（抑制/杀伤T淋巴细胞），抗CD16抗体（自然杀伤细胞），抗IL-2抗体，抗TNF-α抗体和试剂盒由北京福定生物医学公司购买，染色步骤：依次加一抗、二抗、碱性磷酸酶复合物，分别在37℃放湿盒孵育60min。加底物显色10min，予苏木素复染，乙醇脱水，封片观察。Tris/HCl代替一抗做空白对照，大鼠脾脏切片阳性淋巴细胞做阳性对照。反应结果显示细胞核蓝色，细胞膜及胞浆着红色为阳性细胞。仅胞核蓝色，细胞膜无红色计为阴性细胞。细胞计数：高倍镜下，取5个连续高倍视野，各计100个核细胞计算阳性细胞百分率，取其平均值[1]。

1.6 统计分析

t检验比较二组移植胰淋巴细胞和细胞因子半定量值。

2 结　果

胰腺移植术后第1天，测定非空腹血糖，二组糖尿病大鼠均恢复正常。

2.1 移植胰结构

输入供体血组腺泡和胰岛结构正常，有淋巴细胞浸润。胰岛内成团的β细胞。对照组腺泡和胰岛结构破坏，大量淋巴细胞浸润，纤维细胞形成（见图1，2）。

2.2 移植胰淋巴细胞和细胞因子

见表1及图3，4。

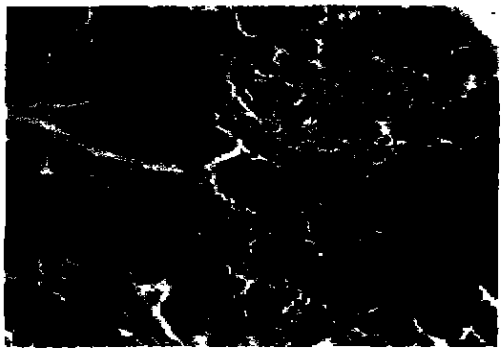


图1　输入供体血组移植胰，示胰腺腺泡和胰岛结构正常，有淋巴细胞浸润。HE染色（×400）



图2　对照组移植胰腺泡和胰岛结构破坏，大量淋巴细胞浸润。HE染色（×200）

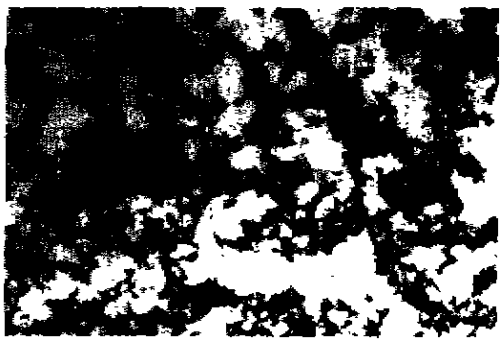


图3　对照组移植胰，碱性磷酸酶桥联酶标染色，示IL-2阳性染色（×400）

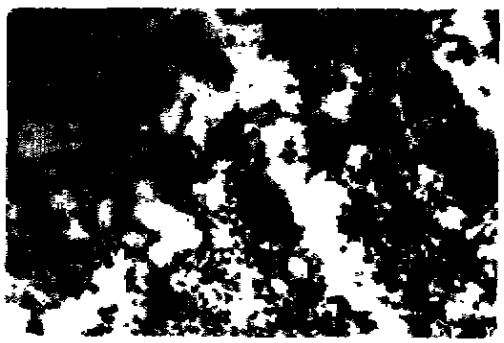


图4　输入供体血组移植胰，碱性磷酸酶桥联酶标染色示IL-2极少（×400）

3 讨　论

我们已观察到移植前短期硫唑嘌呤加移植时输入供体血使大鼠移植胰腺有功能存活28～112天，

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 输入供体血组、对照组大鼠移植胰腺淋巴细胞和细胞因子比较

分组	输入供体血组	对照组	P
CD^+_3T	37±14	48±18	>0.05
CD^+_4T	49±10	21±8	<0.05
CD^+_8T	18±8	56±16	<0.05
NK	18±12	31±16	>0.05
IL-2	1±0.5	12±4	<0.05
TNF-α	6±2	46±15	<0.05

注：IL-2:白介素；TNF-α：肿瘤坏死因子；NK:自然杀伤细胞

平均64.2天，对照组移植胰平均存活8.8天(另文报道)。故本实验取二组移植术后7天的胰腺加以比较。结果进一步证实输入供体血能抑制排斥反应对移植胰的损伤。

Bugeon[2]检查移植前7天和14天输入供体血诱导的LEW大鼠心脏移植，耐受和排斥的移植心脏都有淋巴细胞浸润。本实验对照组移植胰总T细胞和自然杀伤细胞均较输入供体血组高，但差异无显著性。表明两组移植胰腺都有淋巴细胞浸润，这与供体血输入诱导的心脏移植耐受的结果一致。Cuturi[3]报道输入供体血诱导的LEW 1W鼠给LEW 1A鼠的心脏移植耐受，耐受鼠血清抗供体MHC I类抗体反应较排斥鼠显著降低。结合本实验对照组CD^+_8T细胞较输入供体血组显著增高，输入供体血组移植胰腺泡及胰岛结构正常，因此CD^-_8T细胞参与了移植胰的排斥反应。Wasowska[4]报道供体特异输血使ACI鼠移植到PVG鼠的肾脏由未输入供体血组存活6～8天延长至>100天，检查移植肾浸润细胞中NK细胞活性及NK细胞量，发现移植后第3天输入供体血组较未输入组高，但无显著差异；第6天，NK细胞活性无增高，NK细胞量第6天较第3天高，但无显著差异。本实验对照组NK细胞较输入供体血组高，虽无显著差异，但移植胰腺泡及胰岛结构的破坏较输入供体血组早，尚不能排除NK细胞的杀伤效应在介导移植胰腺排斥反应中的作用。

CD^+_4T细胞分为Th1和Th2细胞。Th1细胞分泌IL-2、IFN-γ、TNF等细胞因子；Th2分泌IL-4，IL-6，IL-10等。INF-γ抑制Th2细胞功能，IL-10抑制Th1细胞功能[5]。IL-2的分泌以自分泌效应刺激Th1强烈增殖，增殖的Th1又分泌IL-2、IFN-γ引发迟发型变态反应破坏移植物；同时IL-2的分泌也使CD^+_8T细胞强烈增殖，并分化为细胞毒效应细胞，攻击移植物[6]。本实验对照组IL-2，CD^-_8T细胞显著增高($P<0.05$)；说明输入供体血抑制排斥反应可能是使Th2细胞分泌的细胞因子抑制了IL-2的分泌，阻止Th1细胞增殖；并使CD^-_8T细胞增殖分化抑制所致。尽管我们未对CD^+_4T细胞分类，但结合对照组IL-2显著增高的结果，输入供体血组CD^+_4T细胞显著增高，可能主要是Th2细胞的增殖。

IL-2、IFN-γ可致TNF分泌。TNF可直接激活CD^-_8T细胞、单核细胞、NK细胞[7]。通过转基因方法使胰岛细胞表达TNF-α，可引起大量淋巴细胞和单核细胞浸润胰岛，胰岛细胞坏死[8]。本实验对照组TNF-α显著高于输入供体血组($P<0.05$)，胰腺腺泡和胰岛结构破坏，大量淋巴细胞浸润，说明输入供体血抑制排斥反应与降低TNF-α分泌有关。

总之，本实验表明输入供体血延长大鼠移植胰腺功能存活与降低IL-2、TNF-α分泌有关。

参 考 文 献

[1] Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin Basic protein and natural recovery from experimental autoinmune Encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokine and differential upregulation of transforming Growth factor B interlenkin 4 and prostaglandin E expression in the Brain[J]. J Exp Med, 1992;176:1355-1359.

[2] Bugeon L, Cuturi MC, Hallet MM, et al. Peripheral tolerance of an allograft in adult rate-characteriaztion by low interlaukin-2 and interferon-γ mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft[J]. Transplantation, 1992;54:219-223.

[3] Cuturi MC, Josien R, Bugeon L, et al. Decreased anti-donor major histocompatibility complex class and increased class II alloantibody response in allograft tolerance in adult rats[J]. Eur J Immunol, 1994;162:724-727.

[4] Wasowaka B, Baldwin WM, Howell DN, et al. The effects of donor-specific blood transfusion enhancementof rat renal allografts on cytotoxic activity and phenotypes of peripheral blood lymphocytes, splenocytes, and graft-infiltrating cells[J]. Transplantation, 1991;51:451-456.

[5] Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype By CD4T-cell[J]. Annu rev Immunol, 1994;12:635-638.

[6] Chandler C and Passaro EJ. Transplant rejection[J]. Arch Surg, 1993;128:279-285.

[7] Halloran PF, Cockfield SM, Madrenas I. The mediators of inflammation (interleukin I, interferon-gamma, and tumor necrosis factor) and their relevance to rejection[J].Transplant Proc, 1989;21:26-30.

[8] Picarella DE, Kratz A, Li C-B,et al. Transgenic tumor necrosis factor (TNF)-a production in pancreatic islets leads to insulitis, not diabetes[J]. J Immunol, 1993;150:4136-4140.