维普资讯 http://www.cqvip.com

250-252

(10)

第24卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol 24 No.3
1999 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1999

巨噬细胞、自然杀伤细胞在异种心脏移植细胞性排斥反应中的作用*

R654.2
R392.4

临床学院普外科 杜成友** 姚榛祥 周洪伟

提 要 选用豚鼠移植于大鼠心脏移植模型，设单纯豚鼠移植于大鼠心脏组（A）；CCV治疗组(B)；CCV、MΦmAb治疗组(C)；CCV、NKmAb治疗组(D)及CCV、MΦmAb及NKmAb治疗组(E)。在心脏移植术前3日以术日腹腔注射CCV0.2mg/kg/d；MΦmAb 250ug/kg/d；NKmAb 250μg/kg/d；观察各组移植心脏存活时间，并对排斥心脏进行组织病理学及免疫组化分析。结果发现MΦmAb+NKmAb治疗能显著延长移植心脏存活时间，并减少移植物内单核细胞浸润的数量。说明MΦ、NK细胞是异种心脏移植细胞性排斥反应的重要效应细胞。

关键词 异种心脏移植；细胞性排斥反应；巨噬细胞；自然杀伤细胞；单克隆抗体治疗
中图分类号 R392.4

本实验选用豚鼠移植于大鼠异种心脏移植模型，在中华眼镜蛇毒(chinese cobra venon,CCV)治疗同时，使用抗巨噬细胞(macrophage,MΦ)、抗自然杀伤细胞(natural killer cell,NK)单克隆抗体治疗对移植心脏存活的影响，以探讨MΦ、NK细胞在异种移植细胞性排斥反应中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康豚鼠，体重150～200g共28只为供体；Wistar大鼠，雄性，体重200～300g共28只为受体。

1.1.2 器械 5倍手术放大镜；显微外科器械包，均系上海医疗器械厂产品。

1.1.3 药物 CCV购自广州蛇毒研究所，参照文献所述方法[1]进行蛇毒配制，CCV静脉注射给小鼠半数致死剂量为0.5mg/kg用双蒸水稀释，滤过除菌后调整浓度为1mg/ml。

1.1.4 单克隆抗体 大鼠MΦmAb、NKmAb购自Serotec公司，配制浓度为250μg/ml。

1.1.5 试剂来源 抗C_3抗体为即用型工作液，第二抗体和S-P试剂盒均购自迈新公司。

1.2 方法

1.2.1 心脏移植模型的建立 参照文献所述方法[2]。3%戊巴比妥钠30mg/kg腹腔注射麻醉后，供心采用先灌后切技术，避免热缺血对心脏的损伤。供心右肺动脉，无名动脉分别与受体颈外静脉，颈总动脉行端端吻合，完毕后先后开放受体颈外静脉、颈总动脉，观察供心复跳情况。供心冷缺血时间平均约45分钟。

1.2.2 实验分组 共分五个实验组(表1)。CCV、MΦmAb、NKmAb均为腹腔注射给药，术前3日及术日每天各一次，给予剂量分别为0.2mg/kg/d，250μg/kg/d，250μg/kg/d。

1.3 结果检测

1.3.1 移植心脏存活时间

表1 实验分组(表内n为鼠数)

分组	n	移植类型	治疗方案
A	4	豚鼠心脏移植于大鼠	无
B	6	同B组	CCV
C	6	同B组	CCV+MΦmAb
D	6	同B组	CCV+NKmAb
E	6	同B组	CCV+MΦmAb+NKmAb

从血运恢复供心复跳至其停跳这段时间，定为移植心脏存活时间。观察并记录供心颜色变化、跳动及停跳情况。

1.3.2 移植心脏组织病理学检查及免疫组化分析 移植心脏停跳后，分取其右心房，放入10%甲醛液中固定保存。

1.3.2.1 组织病理学检查 取甲醛液固定心脏，常规石腊包埋，切片，HE染色，观察移植心脏被排斥后的情况。

结果采用半定量计录，即以－，+，++，+++表示，主要观察心脏的心肌细胞，间质出血，血栓形成，炎性细胞浸润情况。－：示无间质出血，无血栓形成，无炎性细胞浸润，心肌细胞结构完整；+：示少量间质出血，少量血栓形成，少量炎性细胞浸润，大量的存活心肌细胞；++：示一定数量的间质出血，血栓形成，炎性细胞浸润，少量存活的心肌细胞；+++：示广泛间质出血及血栓形成，大量的炎性细胞

* 本课题由重庆医科大学博士后基金资助

** 男，1964－07出生，副教授

维普资讯 http://www.cqvip.com

浸润,未见存活心肌细胞。

1.3.2.2 免疫组化分析 C3染色:用石腊标本4μm连续切片,免疫组化SP法染色,C3高压抗原修复,DAB显色。阳性标准分为:-,未见;+,少量;++,适量;+++,大量表达。

1.4 统计学处理 移植心脏存活时间比较采用Student t 检验,实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 移植心脏存活时间(见表2)。

表2 各组移植心脏存活时间($\bar{x}\pm s$)

分组	存活时间(小时)
A	0.25±0.12
B	18±10.2△
C	16±8.6△
D	20.2±12.4△
E	38±12.5△ △△

注:△与A组比较,$P<0.01$;△△与B、C、D组比较$P<0.05$

2.2 各组排斥心脏组织病理学检查及免疫组化分析(见表3)。

表3 各实验组排斥心脏病理学检查及免疫组化分析

分组	病理分析				免疫组化分析
	心肌细胞	间质出血	血栓形成	炎性细胞	C_3
A	+++	+++	+++	-	+++
B	+++	+++	++	+++	-
C	+++	+++	+++	++	-
D	+++	+++	++	+++	-
E	+++	+++	+++	+	-

单纯豚鼠心脏移植于大鼠(A组),不可避免地出现超急性排斥反应,表现为心肌细胞溶解坏死,间质出血,广泛微小血栓形成,未见炎性细胞浸润,免疫组化分析示大量的补体C_3沉积(图1),移植心脏在0.25h左右被排斥;CCV治疗下(B组),移植心脏存活时间显著延长为18±10.2h,与A组比较差异显著($P<0.01$),移植心脏内有大量的炎性细胞浸润;CCV联合MΦmAb或NKmAb治疗,未能延长移植心脏存活时间(图2);而CCV同时联合MΦ、NKmAb治疗,显著延长移植心脏存活时间达38±12.5h(与单纯CCV治疗比较,$P<0.05$)(图3)。一方面表明MΦ、NK细胞在CCV治疗下的异种移植排斥中起了重要的作用;另一方面也提示除补体C_3,MΦ、NK细胞外,尚有其它机制介导这种移植排斥。

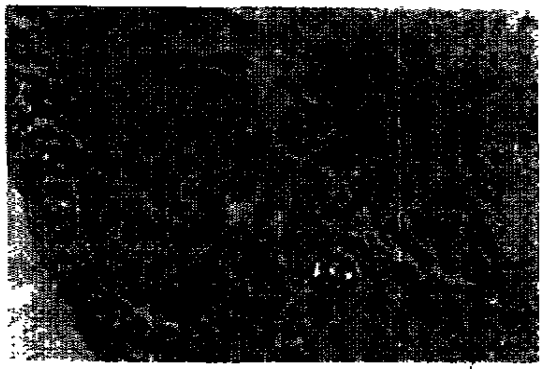


图1 示大量补体C3沉积(A组)

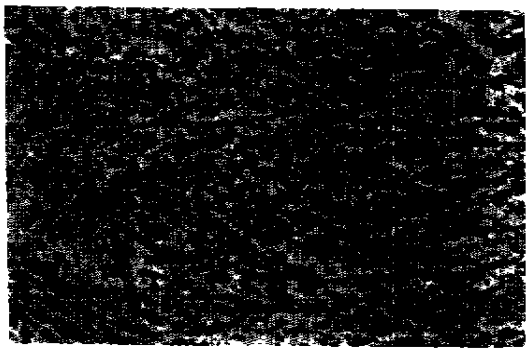


图2 示心肌细胞溶解坏死、间质广泛出血,大量单核细胞浸润(B组)



图3 示心肌细胞溶解坏死,间质出血、单核细胞浸润(E组)

3 讨论

3.1 CCV治疗能建立异种移植细胞性排斥反应模型 CCV是眼镜蛇毒的粗提液,内含CVF及神经毒素等[3],在异种心脏移植术前及术日给予CCV 0.2mg·kg^{-1}·d^{-1}治疗,能清除补体C_3,使移植心脏存活时间由0.25±0.12h延长到

维普资讯 http://www.cqvip.com

18±10.2h($P<0.01$)。这可能是由于它的CVF代替内源性的C3b,导致C3、C5、B因子被消耗，使补体替代途径失活所致。

组织病理发现CCV治疗的排斥心脏有大量单核细胞浸润。Fryer报道,浸润细胞以MΦ、NK细胞为主,未发现CD_4、CD_8T淋巴细胞[4]。Hancock[5]等认为单核细胞浸润和激活是延迟性异种移植排斥反应(delayed xenograft rejection, DXR)中细胞性排斥的特征,因此,CCV治疗能延长移植心脏存活时间,可以建立研究异种细胞性免疫应答的模型。

3.2 MΦ、NK细胞mAb对异种移植细胞性排斥反应的作用 在同种移植中,抗CD_4、CD_8T淋巴细胞单克隆抗体清除外周血的CD_4、CD_8细胞,能显著延长移植物的存活时间。基于这种认识,我们将MΦmAb、NKmAb与CCV作不同的组合,对豚鼠→大鼠移植进行围手术期治疗。结果发现:CCV与MΦmAb、NKmAb合用,能有效延长移植豚鼠心脏存活达38±12.5小时,与CCV治疗组比较,差异显著($P<0.05$);而CCV+MΦmAb,或CCV+NKmAb,未能延长移植豚鼠心脏存活时间。这说明MΦ、NK细胞确实参与并部分介导了这种排斥反应,MΦmAb及NKmAb治疗能一定程度上抑制这种排斥反应;而仅针对MΦ或NK细胞的治疗不足以抑制这种排斥,提示MΦ或NK 细胞均具有介导这种排斥反应的能力。由于MΦ细胞广泛分布于组织及血液中,MΦmAb很难完全清除MΦ细胞。因此,对MΦ、NK细胞在异种移植细胞性排斥中作用机制需进行深入的研究,以寻找更为有效的治疗手段。

参 考 文 献

1. 舒雨雁,等. 生物化学与生物物理学报 1991:23:32
2. Chen ZH. Transplantation, 1991:52:1099
3. 梁仲培,等. 广州医学院学报 1991;19:36
4. Fryer JP, et al. Transplantation, 1995;59:171
5. Hancock WW, Xeno, 1994;2:68

(收稿日期 1998－09－11)

Roles of macrophage and natural killer cells in cellular rejection of guinea pig cardiac xenografts in rats

Du Chenyou, et al
Deparment of general surgery,college of clinical medcine

To demonstrate the roles of MΦ and NK cells in cellular rejection of guinea pig cardiac xenografts.the rats were randomly divided into 5 experimental groups: no treatment(A); CCV treatment (B); CCV, anti－MΦtreatment (C);CCV,anti－NK treatment(D) ,and CCV, anti－MΦ and anti－NK treatment (E). Rats were given i. p. of 0.2 mgCCV; 250μg anti－MΦmAb and 250μg anti－NKmAb on day －3,－2,－1 and day 0 relative to heart grafting. The graft survival time in each group was measured and the rejected hearts were studied microscopically and immunohistochemically.The results showed rats receiving combination therapy using CCV, anti－ MΦmAb and anti—NKmAb have significantly prolonged graft survival(38±12.5h in group E vs 0.25±0.12h in group A,$P<0.01$,vs 18±10.2 h,16±8.6h,and 20.2±12.4h in groups B、C and D respectively,$P<0.05$).Histopathology and immunohistochemistry of the rejected hearts revealed typical lesions of hyperacute rejection with massive C_3 deposition in groupA; interstitial heamorrhage, myocytolysis, and no C_3 deposition in groups B、C、D、E.Compared with a large degree of monocyte infiltration in groups B、C、D,the monocyte infilatration in group E was reduced significantly. It is concluded that both CCV therapy and combination therapy using CCV,anti －MΦmAb, anti－NKmAb can enable transplanted guinea pig hearts to survive longer, therefore indicating that macrophage and natural killer cells play important mediating roles in xenograft cellular rejection.

KEY WORDS Xenograft cellular rejection; Macrophage; Natural killer cell;Monoclonal therapy