DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.007
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
258 2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)03-0258-03

中国版纳近交系小型猪心脏异种抗原表位 α1,3-Gal 的分布

张 伟[1],应大君[1],朱楚洪[1],曾养志[2],宋 林[1] ([1]第三军医大学基础医学部解剖学教研室,国家教育部生物力学与组织工程重点实验室生物力学研究室,重庆 400038;[2]云南农业大学,昆明 650000)

提 要:目的 研究中国版纳小型猪心脏的异种抗原α1,3-Gal的分布和半定量分析,为小型猪心脏的转基因和异种移植提供资料。方法 通过亲和免疫组织化学法和图像分析对10头版纳小型猪心脏进行α1,3-Gal的分布和半定量研究。结果 α1,3-Gal主要分布于细胞膜,细胞浆也有少量表达,胞核无表达。在小型猪心内膜、心肌间质、心外膜、神经束膜等处有α1,3-Gal分布,心肌细胞未发现α1,3-Gal分布。半定量分析发现α1,3-Gal表达量心房内膜最多,心肌间质最少。结论 异种抗原α1,3-Gal在心脏中的表达存在较大差异,提示可以通过转基因猪来克服超急性异种排斥反应。

关键词:异种抗原;近交系猪;心脏;免疫组织化学
中图法分类号:R322.11;R392.1 文献标识码:A

Expression of xenoantigen α1,3-Gal in heart of inbred-lined Chinese Banna mini-pig

ZHANG Wei, YING Da-jun, ZHU Chu-hong, ZHENG Yang-zhi, SHONG Ling (Department of Anatomy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the distributions and make a semiquantitative analysis of the expression of xenoantigen α1,3-Gal in the heart of inbred-lined Chinese Banna mini-pig so as to provide information for xenotransplantation and breeding transgenic pigs. Methods The α1,3-Gal expressions in the hearts of 10 Banna pigs (12~18 months) were determined with immuno-histochemistry and image analysis. Results The α1,3-Gal positive stainings appeared in the cardium, epicardium, connective tissue between cardiac muscles, membrane of nerve bundle, and other places in heart, but not in the cardiac muscles and nerve fibres. The expression of α1,3-Gal was highest in endocardium of atrium and lowest in connective tissue between cardiac muscles. Conclusion There exist different expressions of α1,3-Gal in the heart of the inbred-lined Chinese Banna mini-pig, suggesting that we can reduce hyperacute reaction by breeding transgenic pigs.

Key words: xenoantigen; inbred-lined pig; heart; immuno-histochemistry

异种抗原α1,3-Gal是细胞表面或分泌型糖蛋白的聚乳糖胺核心的一个末端残基,广泛存在于猪和其它低等动物体内,其代谢受α-1,3半乳糖基转移酶(α1,3-galactosyltransferase, α-GT)调控[1]。正常人不具有这种抗原,但人血清中存在高滴度的抗α1,3-Gal抗体,因此在异种移植中会导致超急性排斥反应(Hyperacute reaction, HAR)。Strokan等[2]通过光镜和胶体金免疫电镜的方法对猪肾脏α1,3-Gal的分布进行了全面深入的研究,对于心脏异种移植整体研究尚处于起步阶段。Lan等[3]1998年使用a-Gal基因敲除的小鼠(Gal o/o鼠)在异种移植实验中发现HAR能够得到缓解,提示有可能通过对猪进行基因改造来缓解或克服这一排斥反应。中国版纳小型猪近交系近交已达18代,近交系数高达97.9%,对其心脏α1,3-Gal分布和半定量分析将为今后对版纳小型猪进行基因改造提供前瞻性资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

中国版纳小型猪近交系10头(12~18月龄),体重40~60 kg,由云南农业大学提供。

1.2 试剂

生物素标记BSI-B4(美国Sigma公司,L 2 895);SABC试剂盒(武汉博士德公司,SA 1 024);DAB显色试剂盒(武汉博士德公司,ED 1 022)

1.3 方法

1.3.1 冰冻切片亲和免疫组织化学法 麻醉动物后,10%福尔马林灌注固定,取版纳小型猪心脏各腔室组织(同时取正常人心脏组织),4%多聚甲醛后固定,30%蔗糖浸泡24 h后制作冰冻切片,片厚10 μm,每个样本选取15~20张切片,利用生物素标记植物凝集素BSI-B4与α1,3-Gal的特异亲和特性[4],分别进行免疫组化反应。植物凝集素BSI-B4的工作浓度为8 μg/ml。对照实验:使用0.01 mol/L PBS代替BSI-B4作为空白对照。

1.3.2 图像分析 使用MAS图像分析系统对130张切片组化阳性结果进行图象分析,结果用面积密度比(Aa)表示,每张切片随机选取3个视野检测。

1.3.3 统计学处理 采用Microsoft Excel 8.0计算标准差,进行 t 检验分析。

2 结果

2.1 心脏各组织α1,3-Gal的分布

本实验除观察小型猪心脏各组织中α1,3-Gal的分布外,还观察了人心脏组织中α1,3-Gal的分布情况,都使用0.01 mol/L

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870393)
作者简介:张 伟(1973-),男,黑龙江省齐齐哈尔市人,硕士,助教,主要从事异种移植方面的研究。电话:(023)68752225
收稿日期:2001-07-04;修回日期:2001-10-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PBS 代替 BSI-B4 作为阴性对照。发现: 阳性反应主要位于细胞膜, 细胞浆也有少量表达, 胞核无表达, 阳性呈棕黄色, 见图 1、图 2。

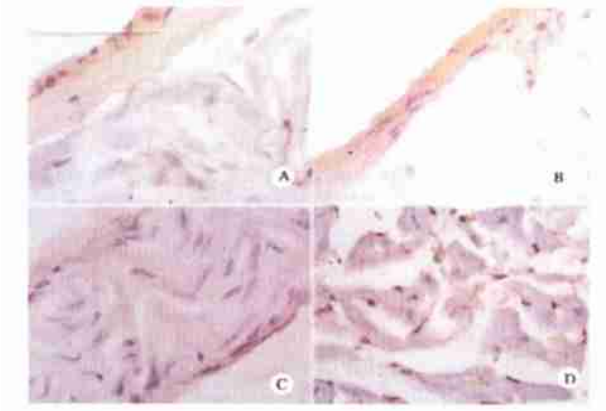


图 1　中国版纳小型猪近交系心脏组织中 α1, 3-Gal 的表达

A: 心室内膜 α-Gal 的表达(ABC× 400); B: 心房内膜 α-Gal 的表达(ABC× 400); C: 神经束膜 α-Gal 的表达(ABC× 400); D: 心肌间质 α-Gal 的表达(ABC× 400)

Fig 1　The expression of α1, 3-Gal in the heart of the inbred-lined Chinese Banna mini-pig

A: The expression of α1, 3-Gal on ventricle endocardium (ABC× 400); B: The expression of α1, 3-Gal on atrium endocardium (ABC× 400); C: The expression of α1, 3-Gal on membrane of nerve bundle (ABC× 400); D: The expression of α1, 3-Gal on connective tissue between cardiac muscles (ABC× 400)

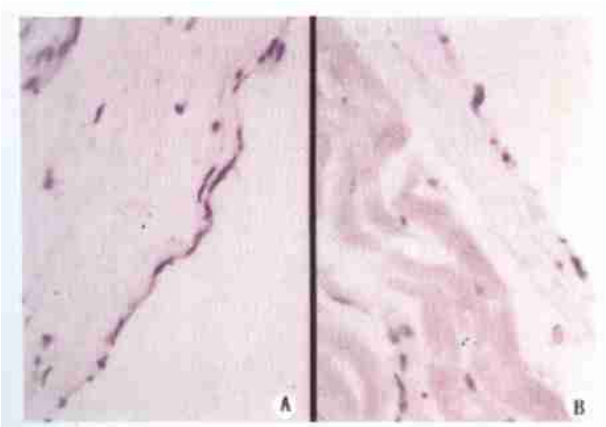


图 2　人和版纳猪心脏组织中 α1, 3-Gal 的对比表达

A: 人右心房内膜无 α1, 3-Gal 表达　(SABC× 400); B: 小型猪心脏 α1, 3-Gal 表达的正常对照　(SABC× 400)

Fig 2　The comparative expression of α1, 3-Gal in the heart of the human and the banna minipig

A: The negative staining of endocardium in the right human atrium (SABC× 400); B: The expression of α1, 3-Gal in the heart of the inbred-lined Chinese Banna mini-pig　(SABC× 400)

小型猪心脏内各腔室内膜着色较多, 多位于内皮细胞表达, 内膜下结缔组织也有表达; 心肌细胞未发现有与 BSI-B4 亲和, 但是我们发现在心肌间的结缔组织等间质成分有弥散的表达, 肌间隔着色明显; 心外膜着色较强, 主要位于间皮细胞上, 外膜下也有弱表达; 瓣膜由于是双层均覆盖内皮细胞, 表达较强, 瓣膜中央的胶原等结缔组织也有表达, 但是染色较内皮细胞淡; 位于外膜下的神经膜有染色, 神经纤维无染色, 另外位于心壁内的小血管中内皮细胞表达, 在血管平滑肌细胞未发现与 BSI-B4 亲和; 与心脏相连的大血管如主动脉内皮细胞有表达但是较心肌中小血管表达弱, 弹性纤维和平滑肌细胞等未见与 BSI-B4 结合。对照实验均未发现阳性表达。正常人的心脏各组织中均未发现有与 BSI-B4 结合。具体 α1, 3-Gal 分布情况, 见表 1。心脏组织与 BSI-B4 亲和情况通过光镜下阳性染色强弱判断。

表 1　中国版纳小型猪近交系心脏各组织 α1, 3-Gal 的分布情况

Tab 1　The distribution of α1, 3-Gal in the heart of the inbred-lined Chinese Banna mini-pig

Tissue	BSI-B4 reaction
Atria (left, right):	
Endocardium	++
Cardiac muscle cell	−
Epicardium	+
Connective tissue between cardiac muscles	+
Ventricle (left, right):	
Endocardium	++
Cardiac muscle cell	−
Epicardium	+
Connective tissue between cardiac muscles	+
Cardiac valve (mitral valve, tricuspid valve):	
Endocardium	++
Connective tissue	+
Blood vessel:	
Endothelial cell	++
Elasticity fibre	−
Smooth muscle cell	−
Nerve in cardiac muscle:	
Ectoblast	+
Nerve cell	−
Bundle membrane	+

2.2　图像分析测定心脏各部分与 BSI-B4 结合的面积密度比 (Aa)

由表 2 中可见, 小型猪心房间内膜的 α1, 3-Gal 表达的面积密度比无显著差异($P>$ 005), α1, 3-Gal 的表达较心室内膜 α1, 3-Gal 表达的面积密度比大, 差异非常显著($P<$ 0. 01)。心脏各腔室外膜和心肌间质间 α1, 3-Gal 表达的面积密度比无显著差异($P>$0. 05)。心脏各腔室内膜 α1, 3-Gal 的表达较外膜和心肌间质 α1, 3-Gal 表达的面积密度比大, 差异非常显著($P<$ 0. 01)。心瓣膜(二尖瓣)上 α1, 3-Gal 的表达较心脏各腔室 α1, 3-Gal 表达的面积密度比大, 差异非常显著($P<$0. 01)。

表 2　心脏各部分阳性反应物表达的面积密度比 **Aa**($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The Area/ area of the α1, 3-Gal positive staining in the mini-pig heart($\bar{x}\pm s$)

	Right atium	Left atrium	Right ventricle	Left ventricle
Endocardium	0. 327223 ±0. 012884	0. 322057±0. 009975	0. 269209±0. 015748	0. 272535±0. 014177
Connective tissue	0. 016880 ±0. 001798	0. 016624±0. 001249	0. 029862±0. 050259	0. 016087±0. 002482
Epicardium	0. 223151 ±0. 019975	0. 230261±0. 018358	0. 230088±0. 017972	0. 231479±0. 032619
Mitral valve	0. 336476 ±0. 137113			

3　讨论

在器官移植领域中, 通常认为可以用转基因动物、克隆技术和组织工程 3 种途径解决供器官不足, 猪-人

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

异种移植极具吸引力和挑战性[5]。猪-人异种移植目前最大的障碍就是由体液免疫造成的，发生于移植后数分钟至数小时的HAR，其与同种移植中的ABO血型不合所致的HAR类似。HAR是由于人血清中的天然抗体与猪组织中的异种抗原结合所引起的，这种排斥反应的主要靶抗原是α1，3-Gal。目前认为在猪的循环系统α1，3-Gal主要分布于血管内皮细胞[6]，我们使用与α1，3-Gal有特异亲和性的植物凝集素BSI-B4，通过亲和免疫组织化学技术观察到猪心脏的各部分α1，3-Gal的分布主要集中在心内膜的内皮细胞，同时在猪的心外膜、营养心肌的血管内皮细胞、神经束膜也有表达。我们推测小型猪α1，3-Gal抗原在心脏组织中有一定分布规律：①α1，3-Gal在猪心脏中的分布存在差异，即有的组织有，有的没有；②α1，3-Gal在小型猪心脏主要分布于内皮细胞上。结合国内外对其它猪种的研究中可以看出猪全身包括心脏并不是所有组织都表达α1，3-Gal[7,8]，可能与细胞微环境不同以及细胞分化差异有关系，例如在猪表皮中α1，3-Gal表达，由内向外越来越少，至颗粒层和角化层就无α1，3-Gal分布，可能与细胞角化过程中α-GT逐渐减少有关[7]。在小型猪心脏组织α1，3-Gal的分布上我们的研究与国内外研究的其他猪种心脏组织α1，3-Gal分布存在一些差异[7,8]，我们的结果在心肌间质和神经纤维束膜等处也有α1，3-Gal的弱表达，究竟是国内外猪种间的差异，还是研究所采用的方法不一和观察的误差所致，尚需进一步探讨。

通过图像分析的方法分析了猪心各部分的α1，3-Gal表达的面积密度比，发现心脏各腔室组织中α1，3-Gal表达存在较大差异，其中心内膜表达量最大，心外膜其次，心肌间质最少，提示在小型猪各组织中除有分布差异外，还有表达量的差异。目前异种移植前可以使用α-半乳糖基酶等预处理供器官或组织消除α1，3-Gal，应用此方法时，应注意处理的时间和部位，防止在有些α1，3-Gal表达较多的部位没有清除干净。

为了克服HAR，培育转基因猪是一个较好的方法，虽然到目前为止已经获得了人类血红蛋白转基因猪、表达人DAF(衰变加速因子)的转基因猪，但是所用猪种的基因纯合度不高。基因改造目标动物的遗传背景应该清楚、稳定，才能使转入的目的基因既能高效表达，又能稳定遗传。近交系动物具有同基因性和反应均一性[9]，可使基因改造前后的供器官动物与人类组织的生物相容性的研究具有很高的可靠性和可比性，并有利于对所转基因的表达进行研究。中国版纳小型猪近交系到2000年已经近交18代，近交系数高达97.9%，是世界上首例大型近交系哺乳类动物，符合基因改造目标动物的基本条件，我们的实验结果将为培育转基因版纳小型猪近交系和小型猪心脏异种移植提供关于心脏α1，3-Gal分布的资料。

参考文献：

[1] Galili U. The natural anti-Gal antibody: Evolution and autoimmunity in man[J]. Immunology Ser, 1991, 55: 355—373.

[2] Strokan V, M lne J, Svalander C T, *et al*. Heterogeneous expression of Gal alpha1-3Gal xenoantigen in pig kidney: a lectin and immunogold electron microscopic study[J]. Transplantation, 1998, 66(11): 1 495—1 503.

[3] McKenzie L F, Yu Q L, Patton K, *et al*. A murine model of antibody—mediated hyperacute rejection by galactose-a(1, 3)galactose antibodies in Gal 0/0 Mice[J]. Transplantation, 1998, 66(6): 754—763.

[4] Irwin J G, Diane A B, Shigeguki E, *et al*. Carbohydrate binding studies on the bandeiraea simplicifolia I isolectins[J]. J Bio Chemistry, 1981, 256(8): 3 890—3 893.

[5] Butler D. Last chance to stop and think on risks of xenotransplants[J]. Nature, 1998, 391(6 665): 320—324.

[6] Oriol R, Ye Y, Koren E, *et al*. Carbohydrate antigen of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ transplantation[J]. Transplantation, 1994, 56(6): 1 433—1 442.

[7] Galili U. Interaction of the natural anti-Gal antibody with α1, 3-Galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans[J]. Immunol Today, 1993, 14(10): 480—482.

[8] 步 宏，陈蕴颖，李幼平，等. 中国内江猪各脏器组织中人类ABO血型抗原的分布[J]. 中国修复重建外科杂志，1999，13(2)：109—113.

[9] 朱清华，祝庆藩 主编. 实验动物学[M]. 广州：广州高等教育出版社，1991. 12—13，208—209.

（编辑 郭建秀）

（上接257页）

3 讨论

MNS血型系统中有许多卫星抗原和变异型，其中Miltenberger亚系统的抗原抗体反应在亚洲人群中的比率较其他人群高[1]，Miltenberger系统的抗原与抗体在临床输血中的特殊性已被许多亚洲血液中心与医院所证实。在该系统中MiⅢ是最常见的血型抗原之一，其频率我国的台湾人为7.3%、香港人6.28%，泰国人10%。用MiⅢ细胞筛选病人血清，抗-Mi^{a}的频率为0.28%[2]，在病人和孕妇中它是较重要的同种抗体之一。人们普遍认为Rh血型系统中的抗-E是最易被检出的血型抗体，辐抗-Mi^{a}很少被发现，主要是因为MiⅢ表现型没有常规地包括在我们的抗体筛选细胞中。而抗-Mi^{a}可引起新生儿溶血病和溶血性输血反应[3]。因此，在做常规抗体筛选时，抗体筛选细胞应含有MiⅢ的O型红细胞，以便能检出抗-Mi抗体，为输血病人提供该抗原阴性的血液输注。

关键词：抗-Mi^a；配血不合；Miltenberger血型
中图法分类号：R457.11 文献标识码：B

参考文献：

[1] 刘达庄，朱自严，Byme P，等. 低频率抗体抗-Mur引起的溶血性输血反应[J]. 中国输血杂志，2000，13(1)：8—10.

[2] Broadberry R E, Lin M. The incidence and significance of anti-Mi^a in Taiwan[J]. Transfusion, 1994, 34(4): 349—352.

[3] Lin C K, Mak K h, Cheng G. Serologic characteristics and clinical significance of Miltenberge antibodies among Chinese patients in Hong Kong[J]. Vox Sang, 1998, 74(1): 59—60.

（编辑 郭建秀）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net