DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.011

论著

文章编号:1000-5404(2001)08-0900-04

移植动脉慢性排斥反应的实验研究

李黔生,靳风烁,乔着意,江 军,徐序广,朱方强,聂志林,靳文生,罗 军,颜加强 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所泌尿外科洗肾移植中心,重庆 400042)

提 要:目的 建立慢性排斥反应的简化动物模型,观察移植体动脉硬化发展规律。**方法** 采用病理图像分析及电镜观察移植后3、7、14、20、30、60 d移植动脉硬化情况,结合PCNA及C-myc免疫组化了解细胞增殖与原癌基因表达的关系。**结果** ①术后14 d内膜层明显增生,术后60 d持续增厚,细胞数术后30 d达高峰,术后20 d内膜层出现大量合成型平滑肌细胞;②术后14 d中层细胞变性坏死,向内层迁移,α-actin阳性细胞数下降,而内膜层α-actin阳性细胞数却迅速升高,两者呈显著负相关;③术后3 d外膜大量炎性细胞浸润。**结论** ①移植动脉硬化具有内膜增生,中层细胞坏死、迁移、炎细胞浸润三大特点;②内膜增生在术后早期以细胞增生为主,后期则为细胞外基质增生,且伴随平滑肌形态改变;③PCNA表达反映出细胞增殖进程,而C-myc还可能与非增殖因素有关。

关键词:动物模型;动脉硬化;移植;PCNA;C-myc

中图法分类号:R322.121;R622.4 **文献标识码**:A

Experimental study on the chronic rejection in artery transplantation

LI Qian-sheng, JIN Feng-shuo, QIAO Zhuo-yi, JIANG Jun, XU Xu-gang, ZHU Fang-qiang, NIE Zhi-lin, JIN Wen-sheng, LUO Jun, YAN Jia-qiang (Renal Transplantation Center, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To establish the experimental animal model of chronic rejection and observe the development of arteriosclerosis in the transplant. **Methods** The pathological changes of transplanted aorta at 3, 7, 14, 20, 30 and 60 days after transplantation were observed by electron microscopy and computer image analysis. PCNA and C-myc were detected by immunohistochemical method. **Results** ①The intima thickening appeared at 14 day after operation, the intima hyperplasia developed persistently until 60 day and the cell numbers showed a peak at 30th day after operation. A great many synthetic smooth muscle cell in the intima membrane appeared at 20 day after operation. ②The cell necrosis in the media and the cell migrated from the media to initma were observed, the number of α-actin positive cell decreased in the media, while increased in the intima at 14 day after operation. A significant negative correlation existed between them. ③The expression of PCNA showed a peak at 20 day after operation. The expression of C-myc and PCNA showed a negative correlation. ④Inflammatory cells infitrated in the adventitia at 3 day after operation. **Conclusion** ①Three characteristics including intima hyperplasia, media necrosis and cell migration and inflammatory cell infiltation are demonstrated in this model. ②In early phase the intima appears mainly in cell proliferation but extracellular matrix production deposition in later phase and the smooth muscle cell may undergo a phenotypic change during their proliferation process. ③The expression of PCNA shows significant correlation with cell proliferation, the expression of C-myc may be associated with some non-proliferative factors.

Key words: animal model; arteriosclerosis; transplantation; PCNA; C-myc

慢性排斥反应是影响器官移植远期疗效的主要原因。移植体动脉硬化是大器官移植后三大病理改变之一。为了解移植动脉硬化发展规律,我们采用不同种系间大鼠腹主动脉移植,建立简化的慢性排斥反应模型,采用病理图像定量分析及PCNA、C-myc免疫组化检测,观察了移植动脉硬化,细胞增殖进程与原癌基因表达的关系。

1 材料与方法

1.1 主要设备、材料及试剂

立体手术显微镜,肾保存液,鼠抗人α-平滑肌动蛋白单克隆抗体,鼠抗人增殖细胞核心抗原单克隆抗体,抗大鼠C-myc单克隆抗体,以上产品均由丹麦DAKO公司提供,国产图像分析仪,透射电镜。

1.2 实验分组

采用Wistar和SD系健康雄性大鼠164只,体重180~250 g,实验分两组:异系移植组(SD-Wistar)66只,同系移植组(Wistar-Wistar)98只,其中模型失败45只(异系移植组6只,同系移植组38只),以术中出血致死及吻合口动脉瘤为主。每组分6个时相点,各时相点10只。所有动物购买时均证实健康未带病毒,术前一周单笼饲养,饲料不含脂质及胆固醇。

1.3 模型建立

取SD系大鼠(供体)腹主动脉1.0~1.5 cm,肝素盐水冲洗后置保存液中4 ℃冰箱保存。于Wistar系大鼠(受体)肾动脉分支下至髂动脉分支上解剖断离腹主动脉,将供鼠动脉原位对端吻合于腹主动脉。术后3、7、14、20、30、60 d处死大鼠,取出移植动脉,处理固定以备检测。

作者简介:李黔生(1953-),男,山东省肥城县人,主任医师,教授,主要从事器官移植基础方面的研究。电话:(023)68757777

收稿日期:2001-04-10;修回日期:2001-06-12

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

1.4　免疫组化及病理观察

用 S-P 法对各时相点血管标本的 α-actin、PCNA 及 C-myc 进行免疫组化检测，并计算其阳性率，即阳性率 = 阳性细胞数/细胞总数 100%。取各时相点病理切片，用图像分析系统测定内膜、中层的面积及细胞数。取 20、60 d 实验组及对照组两组标本进行电镜观察，重点观察内膜平滑肌细胞情况。

1.5　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，t 检验，方差分析及相关分析采用 Microexcel 数据软件分析。

2　结果

2.1　动物模型建立

本实验进行 164 只动脉移植手术，其中 60 只在未用免疫抑制剂的情况下，健康存活至时相点，取材时证实动脉大体结构及功能保持完好。本组模型建立失败原因主要是术中出血及术后动脉瘤形成。

2.2　病理组织学变化

2.2.1　对照组　　除供体冷缺血时间超过 1 h 的两组术后有轻微的内膜增生外，其余各组内膜、中层厚度及细胞数均正常，外膜早期有少量炎细胞浸润，1 周后恢复正常。

2.2.2　实验组　　术后 3 d，外膜大量的炎细胞浸润，术后 7 d，内皮剥脱，内膜层细胞开始增多，见表 1。术后 14 d，内膜出现明显的增生层，中层细胞通过膜裂隙向内膜迁移。外膜炎细胞浸润减轻。术后 20 d 内膜全层或局部“半月形”增生，术后 30 d，内膜细胞数达峰值，细胞外基质层分占多数，细胞数明显下降，内皮基本恢复，中层厚度变化不大，细胞数持续明显下降，见表 2。

表 1　同系移植组与异系移植组动脉内膜变化的情况（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Changes of the arterial intima in the isograft group and allograft group（$\bar{x} \pm s$）

Phase point(d)	Isograft		Allograft	
	Cells/HP	Area(μm^2)	Cells/HP	Area(μm^2)
3	3 ± 4	187 ± 154	5 ± 6	167 ± 74
7	5 ± 3	155 ± 129	26 ± 19	212 ± 217
14	13 ± 7	215 ± 29	126 ± 36	5 414 ± 2 988★※
20	8 ± 13	163 ± 87	288 ± 172	25 682 ± 12 807★※
30	10 ± 8	183 ± 46	303 ± 134	28 313 ± 7 845★※
60	7 ± 6	128 ± 43	131 ± 93	32 876 ± 10 764★※

★：$P < 0.01$ *vs* isograft group；※：$P < 0.05$ *vs* prophase point

表 2　同系移植组与异系移植组动脉中层变化的情况（$\bar{x} \pm s$）

Tab 2　Changes of the arterial media in the isograft group and allograft group（$\bar{x} \pm s$）

Phase point(d)	Isograft		Allograft	
	Cells/HP	Area(μm^2)	Cells/HP	Area(μm^2)
3	110 ± 67	14 001 ± 1 543	215 ± 99★	14 765 ± 7 456
7	115 ± 83	17 234 ± 8 293	297 ± 139★※	16 437 ± 2 176
14	167 ± 77	18 118 ± 3 955	318 ± 227★	19 728 ± 4 988※
20	152 ± 113	18 930 ± 7 253	143 ± 172※	18 530 ± 9 071
30	136 ± 98	20 156 ± 11 546	84 ± 104★※	17 241 ± 11 823★
60	144 ± 106	19 179 ± 12 336	68 ± 73★※	17 997 ± 12 441

★：$P < 0.01$ *vs* isograft group；※：$P < 0.05$ *vs* prophase point

2.3　电镜观察

在对照组血管中层可见到肌丝丰富而细胞器较少的成熟的收缩型平滑肌细胞。而在实验组 20 d 的标本中内膜多见到合成型平滑肌细胞，其胞浆中有丰富的细胞器和粗面内质网，见图 1，缺乏肌丝，胞核染色质丰富，并可见到双核现象，此时中层可见弹力膜肿胀短裂，间质粘液变性，个别细胞胞浆变性，其中可见自噬溶酶体。60 d 时，内膜增生层“收缩型”细胞增多，且有不典型合成型细胞。此时，内膜也有少数细胞胞浆变性，且含有自噬溶酶体。实验组血管中层未见“合成型”细胞。

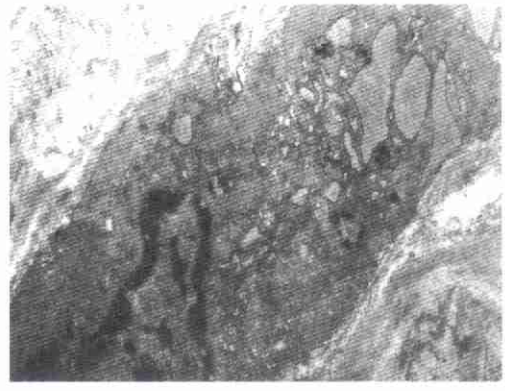


图 1　异系移植组 20 d 内膜可见大量合成型平滑肌细胞，细胞器丰富，内质网扩张（TEM × 12 000）

Fig 1　Arterial intima of the allograft group 20 days after operation
large amount of synthetic smooth muscle cells were found with abundant organelle and expanded endoplasmic reticulum（TEM × 12 000）

2.4　免疫组化

2.4.1　因对照组无明显内膜增生，α-actin 仅见于中层，且各时相点无统计学差异，PCNA、C-myc 表达为阴性。

2.4.2　实验组平滑肌 α-actin　　实验组血管中层 α-actin 阳性表达从 3 d 时 85% 下降至 60 d 时 24%，其中术后 14、20 d 下降幅度最大，内膜术后 14 d α-actin 阳性表达，60 d 时阳性率由 21% 上升到 78%，两者呈明显负相关，见图 2。PCNA：内膜术后 14 d 明显表达，术后 20 d 达峰值 73%，见图 3，此后逐渐下降，60 d 仅有少量阳性表达。中层术后 3 d 即有明显表达，术后 7 d 达峰值 53%，此后逐渐下降，60 d 时 PCNA 在中层基本为阴性表达。C-myc：内膜表达类似于 PCNA，其峰值在术后 20 d 为 31%，总体阳性率较 PCNA 低，下降趋势缓慢，持续表达时间较长。术后 60 d 阳性率为 16%。中层在 3 d 也有阳性表达，此后呈波动状态，总体呈下降趋势，见图 4。



图 2　异系移植组 20 d，增生的内膜层可见 α-actin 阳性细胞数增多（S-P × 200）

Fig 2　Allorgraft group，number of α-actin positive cells in hyperplatic intima increased at 20 days after operation（S-P × 200）

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

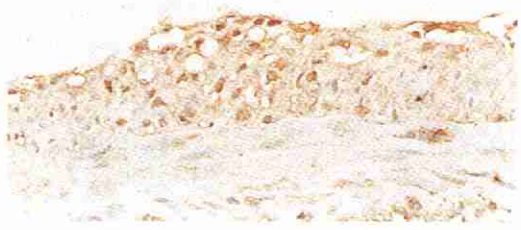


图3 异系移植组20 d，增生的内膜层可见PCNA阳性细胞数增多(S-P×400)

Fig 3 Allograft group, number of PCNA positive cells in hyperplatic intima increased at 20 days after operation(S-P×400)

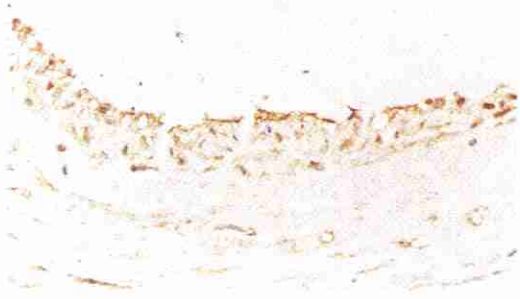


图4 异系移植组20 d，增生的内膜层中可见C-myc阳性细胞(S-P×400)

Fig 4 Allograft goup, C-myc positive cells were found in hyperplatic intima 20 days after operation(S-P×400)

3 讨论

3.1 模型的建立与评价

以往用于研究血管壁动脉硬化平滑肌细胞复制的体内实验模型主要有颈动脉剥脱型模型；颈动脉气囊损伤模型；血管内皮轻微损伤模型等。但这些模型都不适于器官移植排斥反应的研究。因为它们都是以机械损伤为起动因素，无免疫因素参与[1]，即没有炎细胞对中层、内膜的浸润，而免疫炎性细胞浸润正是动脉移植模型的一大特点，中层坏死，内膜增生都可能是其介导产生[2]。本实验在病理学有三大特点：①血管内膜进行性增生；②中层细胞坏死、迁移；③炎细胞浸润。上述特征与人类器官移植慢排时动脉硬化改变基本相似[3]。因此，我们认为该模型是研究人类慢性动脉硬化较理想的简便模型。在该模型建立中，主要失败因素为术中出血及术后动脉瘤形成。这两点与手术操作有关。故熟练的手术技巧及良好的术后护理，是建立模型成功之关键。本实验在后期阶段成功率达80%以上。

3.2 移植动脉硬化的病理改变

内膜增生程度是衡量动脉硬化的关键指标[4]。本实验对照组未见明显内膜增生，而实验组在术后14 d出现明显内膜增生，20 d后增生明显，其增生厚度直至术后2月仍呈上升趋势。在内膜增生层中，有很大部分细胞为平滑肌α-actin阳性细胞，该平滑肌细胞主要为合成型平滑肌细胞及炎细胞。前者被本实验电镜观察所证实。Dilley等[5]的研究结果认为，该类细胞α-actin表达较弱，而β-actin表达较强，它有强烈的增殖分泌功能，其分泌活性不但促使周围平滑肌细胞发生形态转变，而且还促使细胞外基质分泌增多，沉积。因此，在移植后期，内膜增生不是以细胞增殖为主，而是以细胞外基质纤维增生为主。

文献[6,7]发现在本组异系移植动脉中层最明显改变在于术后14 d后细胞数迅速减少，即所谓中层坏死，其原因为中层平滑肌向内膜迁移，巨噬细胞的吞噬作用以及外膜淋巴细胞的毒性作用。以上现象与本实验结果一致。

3.3 PCNA表达及意义

PCNA是一个3×10^3的非组织核酸蛋白，可作为检测细胞增殖的指标[8]。本组资料表明，PCNA表达与内膜细胞增殖呈显著正相关，表达峰值在术后20 d。内膜PCNA阳性细胞除了平滑肌细胞外，还可能有免疫细胞，如T淋巴细胞、单核、巨噬细胞，它们分别表达PDGF、TGF-β等生长因子及其受体。这些生长因子对刺激PCNA高表达及内膜增生起着相当重要的作用[6]。

3.4 C-myc表达及意义

C-myc是一种原癌基因，当生长因子与其受体结合，产生第二信使，该基因即被激活。它具有特殊序列转录活性，通过对不同目标基因的调节发挥其生物学活性[9]。本组资料表明，C-myc在内膜表达从14 d开始，20 d达高峰，表明在内膜增殖过程中，PCNA和C-myc可能起着协同作用。在C-myc表达高峰期，其总体阳性率较低，可能因为C-myc主要表达于"合成型"细胞。20 d后C-myc下降趋势较慢，持续表达时间长，这可能与C-myc在早期表达高峰后，在整个细胞周期中仍有持续波动状态表达，甚至有再次被刺激介导升高的可能性。因此，C-myc表达增高及持续时间较长。此外，C-myc基因具有调节细胞增殖与凋亡的双重作用[10]。本组资料表明，随着30 d后内皮修复的开始，内膜细胞数也开始下降，平滑肌细胞内出现自噬溶酶体，这些均提示移植动脉硬化过程中存在着细胞凋亡现象，而这种现象与C-myc表达有关。

本研究通过建立大鼠动脉移植模型证实，移植动脉硬化具有中层细胞"坏死"迁移，内膜增生，炎细胞浸润三大特点。

移植动脉硬化内膜增生术后早期以细胞增殖为主，后期以细胞外基质增生为主，在增殖过程中，伴随平滑肌细胞形态的改变。

PCNA的表达较好地体现说明了细胞增殖进程，

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

而C-myc可能还与非增殖因素有关。

参考文献：

[1] Clowes A W, Reidg M A, Clowes M M, *et al*. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: smooth muscle growth in the absence of endothelium [J]. Lab Invest, 1983, 49(2): 327 - 333.
[2] Rosenfeld M E, Ross R. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in arteriosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits[J]. Arteriosclerosis, 1990, 10(5): 680 - 687.
[3] Foegh M L. Chronic rejection: graft arteriosclerosis[J]. Transplant Proc, 1990, 22(2): 119 - 125.
[4] Wander M L, Akyurek J, Waltenberger Z P, *et al*. ischemia-induced transplant arteriosclerosis in the rat[J]. Thromb Vasc Biol, 1995, 15(2): 145 - 155.
[5] Dilley R J, Mcgeachie J K, Prendergast R J, *et al*. A review of the proliferative behaviour, morpholgy and phenotypes of vascular smooth muscle cell [J]. Arteriosclerosis, 1987, 63(1): 99 - 106.
[6] Isik F F, McDonald T O, Ferguson M, *et al*. Transplant arterioasclerosis in a rat aortic model[J]. Am J Pathol, 1992, 141(11): 1 139 - 1 149.
[7] Akyurek M L, Paul L C, Funa K, *et al*. Smooth muscle cell migration into intima and adventia during development of transplant vaculopathy [J]. Transplantation, 1996, 62(10): 1 526 - 1 529.
[8] Alprs C E, Davis C L, Barr D, *et al*. Identification of platelet-derived growth factor: a and b chains in human renal vascular rejection[J]. Am J Pathol, 1996, 148(3): 439 - 445.
[9] 杨和平，张 敏，刘革修，等. 动脉硬化斑块旁中膜C-sis, C-myc基因检测和细胞表达的比较[J]. 中华病理学杂志, 1992, 21(6): 349 - 350.
[10] Bennett M R, Evan G I, Newby A C. Deregulated expression of the C-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, interferon-gamma, heparin, and cyclic nucleotide analogues and induces apoptosis[J]. Circ Res, 1994, 74(3): 525 - 536.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2001)08-0903-01

个案与短篇

血清CA19-9免疫放射测定在消化系统肿瘤中的应用

Application of radio immunoassay of serum CA19-9 in carcinoma of digestive system

范兰芳[1]，蔺小爱[2]　（[1] 解放军第325医院检验科，西宁 810008；[2] 山西省盂县人民医院，盂县 045100）

CA19-9(Carbohydrate antigen 19-9)是由胃、肠、胰及肝等脏器分泌的一种粘蛋白，是最基本最重要的糖蛋白型肿瘤标记物，属肿瘤相关抗原，当以上组织发生病变尤其是患恶性肿瘤时，其血清CA19-9处于高水平，比较体内CA19-9含量变化有利于及早发现上述有关脏器发生恶性肿瘤[1,2]。本研究采用IRMA法对145例患者血清CA19-9含量进行检测，比较胰腺癌、原发性肝癌、胃癌、黄疸及慢性胰腺炎等疾病中血清CA19-9水平差异，并探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 标本来源

正常对照组30例(均为健康献血员)，胰腺癌组45例，原发性肝癌组24例，胃癌组12例，慢性胰腺炎组12例，所有标本均为清晨空腹静脉血，离心分出血清，-30 ℃低温冰箱保存，统一检测。

1.2 实验器材

γ计数仪：中国科学院上海原子能核研究所日环仪器厂生产的SN-682放射免疫γ计数仪。

1.3 实验方法

采用免疫放射测定法(IRMA)，试剂盒由天津德普生物技术和医学产品有限公司提供，严格按说明操作。

1.4 统计学处理

采用 t 检验，数据以 $x \pm 2s$ 表示。

2 结果见表1

表1 血清CA19-9在不同疾病中的分布水平

研究对象	例数	血清CA19-9 (U/ml)	升高例数(%)
正常人对照组	30	19.4±9.0	0(0)
胰腺癌	45	328.8±208.3※※	38(84.4)
原发性肝癌	24	185.7±190.5※※	18(75.0)
黄疸	12	35.8±33.9※	4(33.3)
慢性胰腺炎	22	24.8±11.8	3(13.6)
胃癌	12	22.1±15.6	1(8.3)

※：$P<0.05$，※※：$P<0.01$ 与正常人对照组比较

3 讨论

本研究采用IRMA法检测血清蛋白类物质与其它方法比，灵敏度高，非特异性结合低，操作简便，结果稳定可靠。CA19-9是由一些消化道肿瘤细胞株所分泌的，进一步分析已证明：CA19-9的分子结构为一类含唾液酸的神经节苷脂，在正常人血清中水平很低。本实验结果表明，血清CA19-9含量在胰腺癌，原发性肝癌病人中升高显著($P<0.01$)，因此血清CA19-9含量测定对于胰腺癌和原发性肝癌患者的诊断有诊断价值，但整个人群中约有3%～4%的个体无论健康与否，均不表现CA19-9

（下转906页）

作者简介：范兰芳(1965-)，女，青海市人，主管技师。电话：(0971)6306137
收稿日期：2000-07-10；修回日期：2001-03-24

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