

学校编码：10384

密级_____

学号：24520141153537

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

来氟米特延长大鼠--小鼠异种异位
心脏移植物生存期的研究

Leflunomide prolongs the survival time of xenograft in
a rat-to-mouse heterotopic heart transplantation model

李亚光

指导教师姓名： 齐忠权 教授

专 业 名 称： 外科学

论文提交日期： 2017 年 4 月

论文答辩日期： 2017 年 5 月

2017 年 4 月

来氟米特延长大鼠—小鼠异种异位心脏移植物生存期的研究

李亚光

指导教师

齐忠权
教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要	6
Abstract	8
第一章 前言	10
1.1 器官移植概述	10
1.1.1 器官移植简史	10
1.1.2 器官供体短缺及可能的解决方案	11
1.2 异种移植	12
1.2.1 异种移植发展简史	12
1.2.2 异种移植供体的选择	12
1.2.3 异种移植的基础研究及使用模型	13
1.2.4 啮齿动物异种心脏移植模型及免疫排斥反应	16
1.2.5 小鼠为受体的异种心脏移植模型优势及制作方法概述	17
1.3 异种移植免疫排斥反应及常用免疫抑制剂	18
1.3.1 异种移植排斥反应及可能机制	18
1.3.2 异种移植免疫调节策略	22
1.3.3 异种移植常见免疫抑制剂及作用机制	23
1.4 本实验的研究目的、内容、意义	24
第二章 材料与方法	25
2.1 实验材料	25
2.1.1 实验动物	25
2.1.2 实验仪器及手术器械	25
2.1.3 实验试剂	26
2.2 研究方法	27
2.2.1 大鼠—小鼠异种心脏移植模型的制作	27
2.2.2 组织学实验	29
2.2.3 细胞免疫学实验	31
2.3 统计学分析	32
第三章 结果与讨论	33
3.1 大鼠—小鼠颈部异位心脏移植套管法模型制作高重复率的关键	33

3.1.1	模型制作的关键点	33
3.1.2	模型高重复率与供受体鼠体重差的关系	34
3.2	大鼠—小鼠颈部异位心脏移植套管法模型的免疫排斥机制探究	35
3.2.1	大鼠—小鼠异种心脏移植生存期分析	35
3.2.2	大鼠—小鼠异种心脏移植病理学分析	36
3.2.3	大鼠—小鼠异种心脏移植受体 T 细胞总群及 B 细胞总群变化情况	37
3.2.4	大鼠—小鼠异种心脏移植受体 Tfh 细胞的变化情况	39
3.2.5	大鼠—小鼠异种心脏移植受体血清抗体的变化情况	40
3.3	本部分结果小结	41
	第四章 结果与讨论	42
4.1	来氟米特对小鼠为受体的异种心脏移植作用研究	42
4.1.1	来氟米特对小鼠为受体的异种心脏移植生存期的影响	42
4.1.2	来氟米特对小鼠为受体的异种心脏移植病理学特征影响	43
4.1.3	来氟米特对小鼠受体的 T 细胞总群及 B 细胞总群的影响	44
4.1.4	来氟米特对小鼠受体血清抗体的影响	46
4.1.5	来氟米特减轻移植体内特异性抗体的浸润程度	47
4.2	本部分结果小结	49
	第五章 结论与展望	50
	参 考 文 献	53
	攻 读 硕 士 期 间 待 发 表 论 文	61
	致 谢	62

Table of Contents

Abstract in Chinese	6
Abstract in English	8
Chapter 1 Introduction	10
1.1 Overview of Organtransplantation	10
1.1.1 Brief history of organ transplantation	10
1.1.2 The shortage of organ donors and possible solutions	11
1.2 Xenotransplantation	12
1.2.1 Brief history of xenotransplantation	12
1.2.2 Choice of the donor for xenotransplantation	13
1.2.3 Suitable animal models for the basic research of xenotransplantation	13
1.2.4 Rodent research models for heart xenotransplantation and corresponding immunological rejection	16
1.2.5 Advantages& Production of a rat-to-mouse heterotopic heart transplantation model.....	17
1.3 Processes of the xenotransplantation immunological rejection and the common immune inhibitors	18
1.3.1 Processes and possible mechanisms of the xenotransplantation immunological rejection	18
1.3.2 The immunoregulatory strategies for xenotransplantation immunological rejection.....	22
1.3.3 possible mechanisms of common immune inhibitors for xenotransplantation immunological rejection	23
1.4 Purpose,contents and significance of this research	24
Chapter 2 Material and Methods	25
2.1 Material	25
2.1.1 Experimental Animal	25
2.1.2 Equipment and operating instrument	25
2.1.3 Reagents	26
2.2 Method	27

2.2.1 Animal model.....	27
2.2.2 Experimental method of histology.....	29
2.2.3 Experimental method of cellular immunology	31
2.3 Statistical Analysis.....	32

Part 1 Establishment of a rat-to-mouse heterotopic heart transplantation model using the cuff-technique and exploration of the immunological rejection mechanisms

Chapter 3 Result and Discussion.....	33
3.1 Key points for the cervical cuff technique of rat-to-mouse heterotopic heart xenotransplantation	33
3.1.1 key points for the establishment of the model.....	33
3.1.2 Relationship between reproducibility and donor:recipient weight difference	34
3.2 Exploration of the immunological rejection mechanisms	35
3.2.1 Analysis of survival rate of the xenografts in this model	35
3.2.2 Pathological analysis of the xenografts in this model.....	36
3.2.3 Analysis of T cells and B cells of the recipients in this model	37
3.2.4 Analysis of Tfh cells of the recipients in this model.....	39
3.2.5 Analysis of antibody titers of the recipients in this model.....	40
3.3 Summary of Part 1.....	41

Part 2 Effects of leflunomide on the rat-to-mouse heterotopic heart transplantation model

Chapter 4 Result and Discussion.....	42
4.1 Effects of leflunomide on the rat-to-mouse heterotopic heart transplantation model	42
4.1.1 Effects of leflunomide on the survival rate of the xenografts in this model...	42
4.1.2 Effects of leflunomide on Pathological features of the xenografts in this model.....	43
4.1.3 Effects of leflunomide on T cells and B cells of the recipients in this model.	44
4.1.4 Effects of leflunomide on antibody titers of the recipients in this model.....	46

4.1.5 Effects of leflunomide on infiltration of immune cells.....	47
4.2 Summary of Part 2.....	49
Chapter 5 Conclusion and Prospect.....	50
Reference.....	53
Articles to be published	61
Acknowledgement.....	62

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

目的: 异种移植是解决器官移植供体短缺问题的有效手段。在解决了超急性排斥反应之后,目前急性血管性排斥反应(AVR)及细胞性排斥反应(CMR)的发生成为了异种移植应用于临床的最大免疫学障碍。因此,建立具有典型AVR及CMR表现的小动物异种移植模型,并在该模型基础上研究新型免疫抑制剂来氟米特(LEF)的作用机制十分重要。本实验的主要目的如下:1.首次运用套管法建立小鼠为受体的异种心脏移植模型2.比较以BALB/c及以C57BL/6小鼠为受体的两种模型的典型免疫排斥机制3.探究来氟米特对以上两种模型中典型免疫排斥的影响及作用机制。

方法: 首先运用套管法建立Lewis大鼠——小鼠为受体的异种心脏移植模型,并进行初步评估,要点如下:(1)供体大鼠最佳体重范围18—25g,个例不可超过30g。(2)供心在升主动脉根部,常见有一上行并汇入左上腔静脉的细小分支,在分离时需将其电凝或结扎,以免术后难止性出血。(3)供心大鼠升主动脉内膜脆弱,且与血管其它层结合疏松易损伤,故全身肝素化时选择从供体胸主动脉以免损伤动脉内膜。稳定建模后,将BALB/c及C57BL/6两种受体的小鼠各分成三组:其中,阳性对照组单纯移植而不用药物处理,来氟米特处理组用LEF 30mg/kg/d腹腔注射干预。两受体分别在阳性组供心完全排斥当天取样,做移植物病理分析,并使用流式细胞术对受体血清抗体,T细胞、B细胞及Tfh细胞进行分析。

结果: 稳定期建模发现,Lewis——BALB/c移植组平均生存期为 4.3 ± 0.8 天($n=6$),LEF给药组生存期最长可达15天,而Lewis——C57BL/6移植组平均生存期为 11.7 ± 2.4 天($n=6$),LEF给药组生存期最长可达25天。HE分析发现,Lewis——BALB/c阳性对照组供心表现为典型AVR表现,Lewis——C57BL/6阳性对照组供心表现为AVR+CMR混合型表现。两组相应的用药处理组AVR表现大大减

轻。BALB/c 为受体移植组移植后第 4 天，B6 为受体移植组移植后第 9 天取样 FCS 分析发现，BALB/c 组阳性组血清 IgG1、IgG2a、IgM 水平相比于空白组及给药组明显上升，给药组及空白组之间无明显差异。

结论：1. 使用套管法可以成功建立小鼠为受体的异种异位心脏移植模型，BALB/c 受体中移植物表现出典型 AVR 排斥反应，而 C57BL/6 受体中移植物表现为 AVR+CMR 混合型排斥反应。2. 来氟米特主要通过抑制 AVR 显著延长异种移植物生存期，该作用主要与抑制模型受体血清中 IgG1、IgG2a 和 IgM 的水平有关。

关键词：心脏移植 来氟米特 急性血管性排斥 细胞性排斥

Abstract

Backgrounds: Xenotransplantation is an effective way to circumvent donor shortage in clinical transplantation. However, there come AVR and CMR to be the greatest barrier for clinical use of xenotransplantation. Moreover, the immunosuppressant regime used clinically is inadequate to help surpass the immunological barrier. Our aim is to establish a rat-to-mouse heterotopic heart transplantation model using the cuff technique. Then based on the model, we try to figure out whether leflunomide can inhibit the process of AVR or CMR.

Methods: The heterotopic heart xenotransplantation model was successfully established using both BALB/c and C57BL/6 mice as recipient. Then the LEF-treated group was treated with LEF 30mg/kg/day ip. For a fixed day after transplantation, the donor hearts of the mouse in each group were HE stained, serum and T cell subsets, Bcells and Tfh cells were analysed by FCS.

Results: 1. The MST of xenografts in Lewis—BALB/c group is 4.3 ± 0.8 days ($n=6$), and in LEF-treated group, the survival time can be maximumly prolonged to 15 days. The MST of xTx in Lewis—C57BL/6 group is 11.7 ± 2.4 days ($n=6$), and the survival time can be maximumly prolonged to 25 days. 2. The HE staining of xenografts in BALB/c recipients showed a typical AVR, whereas that of xenografts in C57BL/6 recipients showed a mixed AVR and CMR. 3. By FCS analysis, we find that, the IgG1, IgG2a level in the serum of BALB/c recipients in positive control group harvested 4 days post-transplantation are obviously higher than that in naïve group and LEF-treated group. However, the IgG1, IgG2a level in the serum of C57BL/6 recipients are of no significant difference among all three groups. 4. For FCS analysis, we find that, the percentage of $CD4^+CD185^+$ T cells of BALB/c recipients in positive control group are obviously higher than that in naïve group. However, the percentage of $CD4^+CD185^+$ T cells of C57BL/6 recipients are of no significant difference between naïve group and positive group.

Conclusions: 1. A rat-to-mouse heterotopic heart transplantation model can be successfully established using the cuff technique. The HE staining of xenografts in BALB/c recipients showed a typical AVR, whereas that of xenografts in C57BL/6

recipients showed a mixed AVR and CMR. 2.Leflunomide can significantly prolong the MST of xenografts in both strains of recipients. The possible mechanism can be the down-regulation of donor-specific IgG1,IgG2a by inhibiting the T-B response in BALB/c recipients.

Keywords: heart transplantation; leflunomide; AVR;CMR.

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

随着科学技术的发展进步，医疗水平不断提高，人类的整体寿命不断延长，终末期器官衰竭正越来越严重威胁着人类的生命健康。器官移植是公认最有效的解决终末期器官衰竭的医疗手段。然而，据粗略统计，我国每年约有 30 万人亟待器官移植，而真正顺利进行的常规移植手术不足 1 万例。由此可见，器官移植供体的短缺是制约移植术临床应用的最大瓶颈。异种移植是未来能够有效解决该难题的有效手段之一，然而，相比同种移植更为复杂激烈的免疫排斥反应则严重制约了异种移植的研究突破及最终走向临床。因此，在基础层面深入研究异种移植的典型排斥机制及可能的治疗方案尤为重要。该论文以下将从异种移植基础研究的模型基础、免疫抑制剂等方面进行针对性总结回顾，并在此基础上研究新的可行的小动物异种移植模型的建模方法及其可能的排斥机制。以期有所贡献。

1.1 器官移植概述

1.1.1 器官移植简史

历史上关于器官移植的记录源于公元 4 世纪，Saints Cosmas 和 Damian of Aleppo 在“天使”的帮助下，利用死者为供体，为严重坏疽病人进行换肢，此为最早的同种移植案例^[1]。几个世纪后，经过不断探索，外科医生们发现，使用自体器官进行器官移植比使用同源器官术后成功率更高。而通过几年的研究，Medawar 和 Gibson 在其著作《The fate of skin homografts in man》中首次提出免疫排斥机制是导致器官移植排斥的一个最重要因素^[2]。在此之后的一千年里，器官移植技术得到了长足的发展。1933 年，Voronoy 实施了首例人体同种肾移植¹。手术很成功，但术后患者存活时间极短。而 1954 年，Joseph Murray 及其团队实施了第一例双胞胎间肾脏移植，手术大获成功^[3]。1963 年，美国外科医师 Thomas Starzl 开展了世界第一例肝移植手术，但手术并不成功。1965 年，法国人 Gaston Cordier 首次在实践中发现“自发耐受”，并得以公认^[4]。而在此基础上，肝移植在此后也不断成熟。除此之外，1956 年，美国的 Thomas 教授完成了全世界第一例成功的骨髓移植。1960 年，著名外科医师 P. Medawar 首次发

现了受体免疫系统在移植排斥中的作用，开抑制免疫研究之先河^[5]。1963年，美国的 Hardy 医生成功开展世界第一例人体肺移植手术^[6]。1964年，美国成功开展第一例小肠移植手术^[7]。1966年，世界上第一例胰腺移植手术宣告成功^[8]。1967年，南非的 Barnard 医生完成世界首例心脏移植手术^[9]。1981年，世界首例心肺联合移植诞生^[10]。自 1983 年起，肺移植也从问世逐渐走向成功^[11]。截至目前为止，全世界接受各种器官移植而得以重获新生的人数已远超 100 万人次，而近年来，以 CsA，他克莫司等强效免疫抑制剂为代表的系列新型免疫抑制剂的问世，也有力地推动了多器官移植的发展，有效保障了患者的术后生存质量。相信在不久的将来，经过持续深入的实践探索，器官移植术将更加完善和成熟，挽救更多的生命。

1.1.2 器官供体短缺及可能的解决方案

器官的匮乏严重制约了器官移植的发展和应用。根据 WHO 的数据显示，截至目前，全世界范围内每年可供选用的捐献人体器官数量仅是需要进行器官移植手术患者数量的二十分之一。就美国 UNOS 网站的统计数据显示，截至 2016 年，有 12 万人在等待移植，而每年的捐献总数却少于 1.5 万。而在我国，每 100 万等待器官移植救命的病人中，只有不足 1.1 万人接受合适供体而获得新生。因此，器官移植供体的短缺问题的解决迫在眉睫。然而，器官捐献的伦理学矛盾，传统的思想观念在人们心中根深蒂固之后对器官捐献的普及所形成的阻碍，以及非同基因个体器官移植所带来的严重的免疫排斥反应都将使得供体器官短缺问题的解决步履维艰^[12]。为解决这个问题，截至目前，全世界的科学工作者尝试了各种各样的方法，而总结起来，一共有这么几个方面可行的解决方案：其一，大力宣传普及并鼓励可能的活体器官捐献，如亲属间供肾捐献，部分供肝捐献等^[13]。其二，充分利用尸体器官供者（DCD），经过动员的脑死亡器官供者（DBD）及边缘器官供者（ECD）来扩充供源器官库。其三，不断精进器官移植技术及供体器官保存技术，大大减低供体器官失功率^[14]。这些措施在整体上有效缓解了器官短缺，但是它们都不同程度面临着难以解决的难题：活体捐献及脑死亡受体患者器官捐献（DBD）受到人们传统观念的影响及伦理学障碍的影响而难以大力发展；边缘供者器官（ECD）在移植后本身功能回复缓慢，器官部分失功而严重影响受体的术后存活质量，甚至不得不直接弃用。近年来，随着异种移植技术的不断完善成

熟,使得异种移植成为最有可能缓解供体器官短缺的有效方法之一。合适的异种供源不仅不受伦理学问题的束缚,并且可使得器官的取用来源更广泛,更有计划性,更不受供体状态的限制。而目前异种移植所面临的障碍是较之同种移植更为复杂,更为猛烈的免疫排斥反应。如能妥善解决该问题,则未来异种移植的临床应用很有可能彻底解决器官移植供体短缺的历史性难题。

1.2 异种移植

1.2.1 异种移植发展简史

异种移植,即是使用除人类外其它合适物种的组织或器官,替代人源供体器官进行移植的技术。随着科学技术的不断发展进步,临床同种移植的移植技术难题及免疫排斥难关已被逐渐克服,然而,同源供体短缺的问题却越来越制约着临床移植的发展,当此之时,异种移植应运而生,对于异种移植的研究探索也成为了热点焦点。其实,自1902年,法国医师 Alexis 首先发明了外科的血管缝合技术后,临床异种移植研究就开始了它的百年发展历程^[15]。从20世纪60年代起至今,无数的医学工作者进行了尝试并做出了一项项里程碑式的突破:1905年,法国医师 Princeteau 进行了首例兔一人肾移植,是世界上的第一例异种移植,然而并没有什么治疗效果^[16]。此后,德国及美国的外科医师均进行了异种肾移植的尝试,然而均以快速失败告终,异种移植的探索一度沉寂。直到1964年,美国新奥尔良图兰大学的外科团队首次以黑猩猩为供体,进行了又一例的临床肾移植尝试,并在术后给予探索性的免疫剂联合治疗,使得该例患者生存期达到史无前例的9个月。这次突破性的成功使得异种移植工作者们充分意识到供体选择及对免疫排斥反应控制的重要性^[17]。同年,美国 Starzl 教授以狒狒为供体进行临床异种肾移植的尝试,也取得显著成功^[18]。自此,临床移植移植的探索又进入了一个高潮期。此后的数十年间,全世界的异种移植工作者主要以猪和非人灵长类的供体器官进行了大量的,包括心脏、肝脏、肾脏、胰腺等多器官在内的临床异种移植尝试,人们对异种移植的实践也在起起伏伏中不断成熟,对异种移植免疫排斥及供—受体适配重要性的认识也在不断加深。

1.2.2 异种移植供体的选择

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库