

注射供者的肝匀浆提取液延长大鼠 异位心脏移植存活时间

刘小村 张百萌 罗琪 颜江华 丘劲华 卢毅卓

【摘要】 目的 探讨注射供者的肝匀浆提取液对大鼠淋巴细胞功能及大鼠异位移植心的影响。方法 以 Wistar 大鼠为供者, SD 大鼠为受者。制作 Wistar 大鼠的肝匀浆提取液; 建立大鼠同种异体异位心脏移植模型。(1) 经受者阴茎静脉注射肝匀浆提取液 0.3 ml, 14 d 后取供、受者的血液, 用四甲基偶氮唑盐(MTT)法分别测定受者对同一供者和无关供者的单向混合淋巴细胞反应(MLR)。(2) 心脏移植术前 2 h 经受者阴茎静脉注射肝匀浆提取液 0.3 ml, 心脏移植术后分别观察受者注射同一供者和无关供者的肝匀浆提取液后移植心脏的存活时间; 心脏停跳后取移植心做病理检查及免疫组织化学检测。结果 受者对同一供者和无关供者的单向 MLR 比较, 前者明显减轻, 吸光度 A 值分别为: 0.434 ± 0.034 和 0.522 ± 0.015 , 两组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。心脏移植术前, 受者接受同一供者和无关供者的肝匀浆提取液后, 前者移植心脏存活时间延长, 分别为 (38.05 ± 17.07) d 和 (9.86 ± 2.67) d, 两组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 且前者心肌出血、坏死程度更轻, 心肌组织内 IgM 和 IgG 沉积更少。结论 注射同一供者的肝匀浆提取液能特异性抑制相应个体抗原引起的淋巴细胞增殖反应, 减轻大鼠移植心脏的排斥反应, 明显延长其存活时间。

【关键词】 肝提取物; 心脏移植; 淋巴细胞; 免疫耐受

Injecting the donor's liver homogenate filtrate prolonged survival time of heterotopic heart allograft in rats LIU Xiao-cun*, ZHANG Bai-meng, LUO Qi, et al. Xiamen University Hospital, Xiamen 361005, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of injecting the donor's liver homogenate filtrate on lymphocyte function and heterotopic heart allograft in the rats. **Methods** (1) Liver homogenate filtrate of Wistar rats was made. One-way mixed lymphocyte reaction (MLR) of the SD rats, which had been injected with the donors' liver homogenate filtrate to the donors and the third party Wistar rats was determined by means of methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric assay. (2) Wistar→SD rats' heterotopic heart transplantation model was established. The transplanted heart beating was recorded. When heart-beating stopped, the heart allografts were resected for pathological examination and immunohistochemistry. **Results** One-way MLR of the SD rats to the donors was the least, and their A value was 0.434 ± 0.034 , which was remarkably different from that in the other groups ($P < 0.01$). The survival time (38.05 ± 17.07) d of the transplanted hearts whose donors were identical with the liver homogenate filtrate was the longest, and their hemorrhage and necroses were lessened, with less deposition of IgM and IgG. **Conclusion** Injecting the donor's liver homogenate filtrate suppressed specially the reaction of lymphocytes proliferation to the identical donor's antigens, lessened rejection reaction of heart allografts, and prolonged the transplanted hearts' beating in rats.

【Key words】 Liver extracts; Heart transplantation; Lymphocyte; Immune tolerance

排斥反应是目前导致移植物功能丧失的主要原因, 抑制移植物排斥反应的最佳方法是诱导受者建立针对移植物的免疫耐受。有些学者发现了肝脏的天然耐受性并进行了研究, 但目前其机制尚不明确。本研究在同种大鼠异位心脏移植中, 探讨注射供者

的肝匀浆提取液对受者移植心脏的影响。

对象和方法

一、实验动物

健康的清洁级 Wistar 和 SD 大鼠分别作为供、受者, 均为雄性, 体重 250~300 g, 均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

二、实验试剂

基金项目: 厦门大学科技创新项目基金资助(XDKJCX20041017)

作者单位: 361005 厦门大学医院普外科(刘小村、卢毅卓); 中山大学附属第五医院(张百萌); 厦门中山医院(罗琪); 厦门大学医学院(颜江华、丘劲华)

山羊抗大鼠 IgM、IgG(一抗)购自美国晶美(深圳)生物技术有限公司,兔抗山羊 IgG(二抗)购自上海华美生物技术有限公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)购自北京 Sigma 公司。

三、肝匀浆提取液的制作

取供者 Wistar 大鼠,采用乙醚开放式吸入麻醉,作上腹部正中切口,切取部分肝组织,关腹后回笼自由饲养。称取 4 g 肝组织,适当剪碎后放入玻璃匀浆器中,加入 10 ml 生理盐水,研磨制成匀浆,再用 16 层生理盐水浸湿的纱布过滤,得到肝匀浆提取液。

四、心脏移植方法

以 SD 大鼠为受者,Wistar 大鼠为供者。采用乙醚开放式吸入麻醉。在 Ono 等^[1]术式基础上稍作改进,建立大鼠同种异体异位心脏移植模型。将供心升主动脉与受者腹主动脉行端侧吻合,供心肺动脉主干与受者下腔静脉行端侧吻合。

五、观察指标

1. 单向混合淋巴细胞反应(MLR):单向 MLR 共分 3 组,每组各 5 只大鼠。MLR-1 组:用刚制成的 Wistar 大鼠肝匀浆提取液 0.3 ml,经阴茎静脉注射到 SD 大鼠的体内,14 d 后测定 SD 大鼠对同一供者的单向 MLR;MLR-2 组:经 SD 大鼠阴茎静脉注射 Wistar 大鼠的肝匀浆提取液 0.3 ml,14 d 后测定受者对无关供者的单向 MLR;MLR 对照组:经 SD 大鼠阴茎静脉注射生理盐水 0.3 ml,14 d 后测定 SD 大鼠对 Wistar 大鼠的单向 MLR。各组均取供、受者的血液样本,采用 MTT 法测定单向 MLR,观察波长为 570 nm 处的吸光度 A 值。

2. 心脏移植后存活时间:将供、受者随机分为 3 组,每组 10 对大鼠。A 组:先经受者阴茎静脉注射刚制成的肝匀浆提取液 0.3 ml,1 h 后再用同一个供者的心脏进行异位心脏移植;B 组:先经受者阴茎静脉注射刚制成的肝匀浆提取液 0.3 ml,1 h 后再用另一个供者的心脏进行异位心脏移植。对照组:术前不注射肝匀浆,仅行心脏移植。供心缺血时间均小于 45 min,在吻合结束后,放开血管阻断夹,供心在 1 min 内复跳。各组均不用抗生素等任何药物。术后每日 2 次腹部触诊检查移植心的心率、心律及心肌收缩力。术后 72 h 内移植心停跳或动物死亡判为手术失败,其后的移植心停跳为排斥反应终点,移植心脏存活时间为移植心复跳至停跳时间。

3. 病理检查及免疫组织化学检测:取停跳后的

移植心,观察其病理改变,免疫组织化学检测采用山羊抗大鼠 IgM、IgG(一抗)和兔抗山羊 IgG(二抗),通过免疫组织化学染色,显示 IgM、IgG 在移植心脏组织中的沉积状况。

六、统计学处理

应用 SPSS 10.0 统计软件,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组移植心脏存活时间比较采用两独立样本的 *t* 检验,MLR 多组间比较采用单向方差分析(ANOVA),组间比较采用 LSD 法检验,以 *P* = 0.01 做为检验水准。

结 果

一、单向 MLR 结果

MLR-1 组在波长为 570 nm 处的吸光度 A 值与 MLR-2 组和 MLR 对照组比较,差异均有统计学意义(*P* = 0.000),而 MLR-2 组与 MLR 对照组比较,差异无统计学意义。见表 1。

表 1 各组单向 MLR 的结果

分组	<i>n</i>	吸光度 A 值
MLR-1 组	5	0.434 ± 0.034
MLR-2 组	5	0.522 ± 0.015
MLR 对照组	5	0.518 ± 0.020

二、移植心存活时间

对照组移植心跳动时间为(9.45 ± 2.01) d; A 组为(38.05 ± 17.07) d; B 组为(9.86 ± 2.67) d, A 组与对照组和 B 组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.001),对照组与 B 组比较,差异无统计学意义。

三、移植心病理检查及免疫组织化学法检测

移植心组织表现为血管内血栓形成,伴有出血,炎症细胞浸润,部分心肌凝固性坏死。对照组和 B 组的病理改变相类似, A 组则明显较轻。对照组移植心组织中 IgG 和 IgM 的沉积较严重, A 组则明显减少。

讨 论

Demetris 等^[2]观察了大鼠同种异体肝移植排斥反应的物质基础和特点,术后第 2 d 汇管区出现明显的白细胞浸润,并于第 7 d 达到高峰,其中包括了 T 细胞(占绝大多数)、B 细胞、巨噬细胞、噬酸细胞和中性粒细胞,术后 14 d 浸润逐渐减弱,但仍有少量浸润细胞保留,这表明同种异体肝移植的耐受是一个主动过程。所有的移植肝在早期都经历了一个短暂的组织排斥,此时很容易在移植肝内的浸润

细胞中检出供者特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 活性, 这一原位的免疫反应迅速下降可能是由于清除, 即移植物内供者特异性 CTL 发生了凋亡。Klugewitz 等^[3] 的实验表明肝窦内皮细胞选择性地抑制产干扰素 γ (IFN- γ) 细胞的扩增, 而促进表达 IL-4 Th2 细胞的生长, 从而使肝脏具有致耐受性。

肝脏微环境的许多特性可能决定其免疫特性及天然的耐受性。1992 年 Starzl 等^[4] 证实在同种器官移植长期存活患者的组织以及外周血中, 有一较长的时间段幸存一些过客白细胞, 称之为“微嵌合”现象。在因 IV 型糖原积聚或 I 型 Gaucher 疾病而接受肝移植并存活 2 年以上的患者肝外组织中检测出了供者单核细胞系细胞。肝脏中包括干细胞在内的过客白细胞有极独特的性质^[5,6]。在啮齿类动物的同种异体肝移植天然耐受模型中, 这些供者来源的白细胞及其产生的细胞因子, 或许还包括供者产生的“耐受原性”或“清除性”的活化蛋白 C (APC)^[7], 是移植物存活所必须的。同种异体肝移植耐受的诱导与肝脏的实质细胞和非实质细胞 (NPC) 群相关^[8]。在对大鼠的实验中, 带有受者过客白细胞和供者肝实质细胞的嵌合肝, 不能诱导对随后植入的供者源皮肤的耐受^[8]。若在术前 1 周采用放射线照射可减少供肝中供者白细胞数量, 则以前耐受的异体移植肝会被排斥^[9]。若给受鼠注射供者的肝细胞或脾细胞重建肝脏的白细胞群, 则可恢复肝脏的耐受原性^[9]。肝移植的全身效应包括肝脏白细胞能广泛迁徙到受者的淋巴组织, 并在那里长期存活。这些嵌合细胞可能不仅提供了持续的同种异体抗原性刺激, 而且还具有在受者淋巴系统中诱导同种异体抗原激活的 T 细胞凋亡的能力。在大鼠实验中, 供者细胞迁徙到受者淋巴组织与同种异体肝移植耐受的关系似乎更大, 可观察到这些组织的早期 IL-2 和 IFN- γ 上调表达和耐受诱导。

肝移植术后供肝组成性的释放可溶性主要组织相容性复合物 I (MHC-I) 类抗原, 使循环中的 MHC 抗原迅速转变成成为供者 MHC 类型, 提示供者可溶性 MHC-I 类抗原在诱导肝脏同种异体移植耐受中具有作用, 可溶性 MHC-I 类抗原可能通过中和供者特异性抗体或阻止细胞毒性 T 细胞而起免疫抑制作用^[10]。肝匀浆提取液中含有的抗原

量较大, 并且是可溶的, 经静脉注射后易诱导受者耐受。有研究指出, 小剂量抗原引起 T 细胞耐受, 大剂量抗原则引起 T 细胞和 B 细胞都耐受。同种异体反应性 T 细胞可因为接触高剂量的同种异体抗原而被清除或导致无能, 从而产生免疫耐受。Shinomiya 等^[11] 提出免疫反应可能被一种肝内因子控制, 并证明大鼠肝匀浆中提取的精氨酸酶能抑制 MLR。本实验中受者注射同一供者的肝匀浆提取液可抑制 MLR, 并使移植心肌组织内 IgM 和 IgG 沉积减少, 与国外研究结果一致, 这可能是大鼠移植心存活时间明显延长的重要机理。

参 考 文 献

- 1 Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1969, 57: 225-229.
- 2 Demetris AJ, Qian S, Sun H, et al. Liver allograft rejection. An overview of morphologic findings. *Am J Surg Pathol*, 1990, 14 (Suppl 1): 49-53.
- 3 Klugewitz K, Blumenthal BF, Schrage A, et al. Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4⁺ effector cells and suppression of IFN-gamma-producing cells after intravenous protein immunization. *J Immunol*, 2002, 169: 2407-2413.
- 4 Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, et al. Chimerism after liver transplantation for type IV glycogen storage disease and type I Gaucher's disease. *N Engl J Med*, 1993, 328: 745-749.
- 5 Taniguchi H, Toyoshima T, Fukao K, et al. Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Nature Medicine*, 1996, 2: 198-202.
- 6 Murase N, Starzl TE, Ye Q, et al. Multilineage hematopoietic reconstitution of supralethally irradiated rats by syngeneic whole organ transplantation: with particular reference to the liver. *Transplantation*, 1996, 61: 1-5.
- 7 Starzl TE, Thomson AW, Murase N, et al. Liver transplants contribute to their own success. *Nature Medicine*, 1996, 2: 163-168.
- 8 Sriwatanawongsa V, Davies H, Calne RY. The essential roles of parenchymal tissues and passenger leukocytes in the tolerance induced by liver grafting in rats. *Nature Medicine*, 1995, 1: 428-432.
- 9 Sun J, McCaughan GW, Gallagher ND, et al. Deletion of spontaneous rat liver allograft acceptance by donor irradiation. *Transplantation*, 1995, 60: 233-237.
- 10 Davies H, Pollard SG, Calne RY. Soluble HLA antigens in the circulation of liver graft recipients. *Transplantation*, 1989, 47: 524-528.
- 11 Shinomiya T, Ohara T, Wada N, et al. Rat liver arginase suppresses mixed lymphocyte reaction. *J Biochem*, 1990, 107: 435-439.

(收稿日期: 2005-05-10)