

学校编码: 10384
学号: 24520071152572

类号 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

大鼠原位肝脏移植模型的建立和改良以及
不同品系组合的大鼠肝移植
排斥反应的比较

Establishment and Improvement of Rat Liver
Transplantation Model and Comparison on Transplantation
Rejection in Various Strain Combinations of Rats

叶志坚

指导教师姓名: 王效民 教授

专业名称: 外 科 学

论文提交日期: 2009 年 月 日

论文答辩时间: 2009 年 6 月 9 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: 尹震宇 _____

评 阅 人: _____

2009 年 6 月

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(外周血干细胞诱导肝脏移植免疫耐受)课题(组)的研究成果,获得(王效民教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学附属中山医院肝胆外科)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): 叶志坚

2009年6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）：叶志坚

2009年6月 日

目 录

中文摘要	6
英文摘要	7
前言.....	9
第一部分 大鼠原位肝脏移植模型的建立和改良	
材料与方法.....	12
结果.....	22
讨论.....	27
小结.....	31
第二部分 不同品系组合的大鼠肝脏移植排斥模型的建立和比较	
材料与方法.....	32
结果.....	34
讨论.....	45
小结.....	47
第三部分 T 细胞亚群在大鼠肝脏移植急性排斥反应中的检测	
材料与方法.....	48
结果.....	50
讨论.....	60
小结.....	63
全文总结.....	64
展望	65
参考文献	66
附件 1 综述: NKT 细胞在移植免疫中的作用.....	70
致谢.....	77

Table of Contents

Chinese abstract	6
English abstract	7
Introduction	9
Part I	Construction and modification of liver
	transplantation model in rats
Materials and methods	12
Results	22
Discussion	27
Conclusion of part I	31
Part II	Comparison on liver transplantation rejection models
	in various strain combinations of rats
Materials and methods	32
Results	34
Discussion	45
Conclusion of part II	47
Part III	Detection of T-cell subsets in recipients of
	acute transplantation rejection
Materials and methods	48
Results	53
Discussion	60
Conclusion of part III	63
Conclusion of the whole study	64
Prospect	65
References	66

Appendix 1	Review: Significance of NKT cell in	
	transplantation immunology70
Acknowledgments	77

厦门大学博硕士论文摘要库

大鼠原位肝脏移植模型的建立和改良以及不同品系组合的大鼠肝移植排斥反应的比较

摘 要

背景和目的 构建一个稳定而具有典型移植排斥反应的动物模型是肝脏移植研究的基础。大鼠原位肝脏移植模型是最常用的模型之一。本实验研究的目的是建立改良的大鼠原位肝脏移植模型，并通过对不同品系大鼠肝脏移植模型比较，探索理想的急性排斥模型，同时检测 T 细胞亚群在急性排斥反应中的表达。

研究方法 采用 Kamada^[1] “双袖套法”建立大鼠原位肝脏移植模型，对术中供肝的分离、切取、灌注、植入以及术后的护理观察等方面进行改良；以大鼠 SD（供体）→SD（受体）为对照组，建立 Wistar→SD、Lewis→BN、DA→Lewis 三种不同品系组合的大鼠肝脏原位移植排斥模型，在术后恢复情况、生存时间、肝功能、组织病理学等方面进行比较，探索最理想的急性排斥模型；流式检测 T 细胞亚群（CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺CD25⁺、NKT）在急性排斥反应中的表达。

研究结果 建立了改良的大鼠原位肝脏移植模型，手术简单易行，稳定可靠，可重复性高，大鼠术后恢复好；大鼠 SD→SD 属于同源耐受组合，Wistar→SD 属于轻度或不明确性排斥反应组合，虽然 Lewis→BN、DA→Lewis 组合都发生了明显的急性排斥反应，但 DA→Lewis 组合是最理想的急性排斥反应模型；与耐受组比较，急性排斥反应受体外周血 CD3⁺及 CD3⁺CD4⁺表达较多，CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺比值较高，脾脏和淋巴结中 NKT 细胞表达较多，而 CD4⁺CD25⁺的表达无统计学差异。

研究结论 改良后的大鼠原位肝脏移植模型简单易行、稳定可靠；大鼠 DA→Lewis 组合是理想的急性排斥模型；大鼠急性排斥反应的发生可能与受体效应性 T 细胞亚群 CD4/CD8 比例的上调以及 NKT 调节性 T 细胞亚群的下调有关。本研究为进一步研究大鼠移植排斥反应的机制和移植免疫耐受的诱导打下了一定的基础。

关键词：肝脏移植模型；急性排斥反应；T 细胞亚群；

Establishment and Improvement of Rat Liver Transplantation Model and Comparison on Transplantation Rejection in Various Strain Combinations of Rats

Abstract

Background and Objective Construction of stable and typical animal model is foundational for research on liver transplantation. Orthotopic liver transplantation in rat is one of the most widely used models in this field. The objective of this study is to construct a modified rat liver transplantation model and explore the optimum acute rejection models of various strains combination of rats, meanwhile detect the expression of T-cell subsets during acute rejection.

Methods Orthotopic liver transplantation model in rat was constructed by using Kamada's two cuff technique without arterial reconstruction. Operation was modified during the separation, harvest, perfusion, implantation of donor liver and nursing was improved after operation. Subsequently, four transplantation models of various strain combinations were established including the control group SD(donor) to SD(recipient) and the experimental groups Wistar to SD, Lewis to BN and DA to Lewis. And then a typical and optimum model of acute transplantation rejection was chosen by comparing the recovery state, survival time, liver function test and pathology examination. Finally, the expression of T-cell subsets were detected and evaluated by Flow cytometry, including $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD4^+CD25^+$, NKT in the recipient undergoing the severe acute rejection.

Results The modified rat liver transplantation model was established which was easier and more stable than our preliminary experiment. And rats recovered from operation better than before. Control group syngeneic rat SD to SD liver transplantation was tolerant and the immunological rejection in experimental group Wistar to SD was mild and indeterminate. In contrast, both experimental groups allogeneic rats Lewis to BN and DA to Lewis could induce obvious acute

transplantation rejection, however the rat strain combination DA to Lewis is most typical and optimum acute rejection model. Compared with the transplantation tolerance group, in acute rejection group T-cell subsets CD3, CD4 and CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ of the peripheral blood is higher, meanwhile natural killer T cells in the mononuclear cells of spleen and lymph node is lower, however there was no significance of T-cell subsets CD4⁺CD25⁺.

Conclusion The experimental model we modified is easy and feasible. According to our results, the rat strain combination DA(donor) to Lewis(recipient) is a typical acute transplantation rejection model. The up-regulation of effector T-cell subsets CD3⁺CD4⁺ and the CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ ratio and the down-regulation of NKT regulatory T cells may be associated with acute liver transplantation rejection in rats. This study started an effective beginning to explore the mechanism of rat transplantation rejection and the induction of transplantation tolerance.

Key Words Liver transplantation model ; Acute rejection ; T-cell subsets

大鼠原位肝脏移植模型的建立和改良以及不同品系组合的大鼠肝移植排斥反应的比较

前言

对于大多数肝脏终末期疾病来说,唯一的挽救治疗就是器官移植。但由于目前科学水平的限制,移植后不可避免地出现排斥反应,特别是急性重度排斥反应,如果不进行干预,将会导致移植物功能的丧失,这对供者和受者来说都是严重的打击。因而必须长期、大量使用非特异性的免疫抑制剂,这些免疫抑制剂虽然可以明显减少排斥反应、提高移植物的短期存活时间^[2],但是长期使用增加了机会性感染和恶性肿瘤的发生率,同时也增加了心血管疾病和糖尿病等代谢性疾病的风险性,而且目前常用的神经钙调素抑制剂存在着明显的肾毒性^[3],事实上这些药物也不能阻止慢性排斥反应的发生,而这正是一年后移植物功能衰竭的主要原因^[4]。因此面对这些严峻的挑战,人们迫切需要对肝脏移植进行进一步研究和探索。由于人类伦理法则的限制以及供肝来源的稀缺,因而建立一个稳定可靠的动物模型成了人们研究肝脏移植的基础和平台。大鼠由于体积小、繁殖快、经济实用、遗传背景清晰、抗感染能力强等优点,逐渐成了人们研究肝脏移植动物模型的首选。大鼠原位肝脏移植术最早是由 LEE 等^[5]于 1973 年开创的,后来先后经过 Kamada^[1,6]的“双袖套法”和 Miyata^[7]的“三袖套法”等方法改良后逐渐发展成形成。

由于特殊的解剖、免疫学因素,肝脏被称为“免疫特惠”(immune-privileged)器官,相对其他脏器的移植来说,肝脏排斥反应的发生率较低,停用免疫抑制剂后有些受体仍能够长期存活。就大鼠肝脏移植模型而言,大部分品系组合可以形成自发性免疫耐受。因而为了更好地研究肝脏移植免疫排斥及耐受的机制,我们必须建立更贴近人类肝脏移植免疫特点、更稳定可靠的大鼠移植排斥模型。国外学者应用较多的是近交系大鼠 DA → Lewis、ACI → Lewis、DA → AUG、Lewis → BN、Lewis → AUG 等不同品系的组合^[8]。而国内由于动物来源有限,常用的有封闭群大鼠 Wistar→SD 组合以及近交系 Lewis→BN、DA→Lewis 组合,但至于哪些大鼠组合可以产生明确的排斥反应以及排斥反应程度如何,各家报道结果不甚一致^[9-11]。因而本试验将通过建立不同品系组合的大鼠肝脏移植模型,并对其进

行比较, 试图寻找典型的稳定的急性排斥反应模型, 为进一步研究移植免疫微环境奠定基础。

肝脏移植免疫排斥反应分为超急性(体液性)排斥、急性(细胞性)排斥、不明确的慢性(不明确的胆管消失)排斥和慢性(胆管缺乏性)排斥反应。其中急性排斥反应最为常见, 约 70% 的肝移植病人有不同程度的急性排斥反应, 是肝移植术后早期肝功能障碍的主要原因。急性排斥反应的免疫细胞学基础就是受体 T 细胞识别外来的供体抗原。不同的 T 细胞亚群, 其识别的 MHC 分子各异, 其中 CD8⁺T 细胞识别同种异型 MHC I 类分子, 而 CD4⁺T 细胞识别同种异型 MHC II 类分子。受体 T 细胞识别抗原有两种非相互独立的途径, 即直接途径(direct pathway)和间接途径(indirect pathway)。直接识别途径即 T 细胞通过表面的 T 细胞受体(TCR)识别供体抗原呈递细胞表面的异源性 MHC 分子, 此时被激活的 T 细胞主要为 CD4⁺T、CD8⁺CTL; 间接识别途径即 T 细胞识别自身抗原呈递细胞处理好的异源性抗原, 被激活的细胞以 CD4⁺T 为主。其中 CD4⁺T 细胞活化后分化为 Th1 细胞, 可以辅助 CD8⁺CTL 前体激活, 使之增殖为效应性 CD8⁺CTL。急性排斥反应损伤组织的效应机制主要是通过 CD8⁺CTL 对同种异型抗原的杀伤作用以及 CD4⁺Th1 的致炎作用。因而 T 细胞亚群及 CD4⁺/CD8⁺比值的动态变化与移植排斥反应密切相关, 运用流式细胞仪监测外周血 T 淋巴细胞亚群水平的变化, 对于排斥反应的防治以及免疫耐受的诱导来说显得很有意义。

如前所述, 由于器官移植后发生的移植排斥反应以及术后非特异性使用大量免疫抑制药物所造成的严重毒副作用严重阻碍了移植的发展, 因而如何诱导对供体抗原的特异性耐受成了研究的焦点。而 T 细胞亚群中的调节性 T 细胞因为具有免疫调节、免疫抑制的作用引起了人们的广泛重视。其中 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)和 NKT 细胞就是两个热门的 T 细胞群体。CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞大部分由未成熟 T 淋巴细胞在胸腺发育过程中产生, 也可在外周由 CD4⁺CD25⁻ T 细胞转化而来。CD4⁺CD25⁺Treg 基本特征是组成性表达 IL-2 受体链(CD25), FoxP3 被认为是特异性的标志之一。CD4⁺CD25⁺细胞具有免疫无能和免疫抑制两大功能特征。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞免疫抑制性表现在体内和体外对 CD4⁺/CD8⁺T 细胞活化和增殖的抑制^[12]。CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞被激活后以抗原非特异的方式抑制 T 细胞功能, 而且这种抑制不受 MHC 限制。研究^[13-14]显示过继转移 CD4⁺CD25⁺ Treg

细胞可以诱导移植免疫耐受，而去除 $CD4^+CD25^+T$ 细胞后则发生排斥反应。NKT 细胞作为一类具有独特生物学活性的 T 细胞功能亚群，典型的特征是识别与 CD1d 结合在一起的糖酯类抗原（如 α -GalCer 等）、表达一个半恒定的 TCR $\alpha\beta$ 链。NKT 细胞在接受刺激后可以瞬间产生大量细胞因子和趋化因子，杀伤靶细胞，同时也可以影响其他免疫细胞的活化，兼具固有性和适应性免疫功能，被称为免疫系统的“瑞士军刀”^[15]。研究^[16-18]显示活化的 NKT 细胞在免疫耐受的诱导中扮演了关键角色，NKT 细胞对 T 细胞具有免疫抑制作用，同时又有助于 $CD4^+CD25^+CTLA-4$ T 细胞的产生，且其作用的发挥与数量和活化状态密切相关。因此，在作为免疫耐受对立面的移植排斥反应中，监测调节性 T 细胞群 $CD4^+CD25^+$ 细胞和 NKT 细胞的表达，对我们防治移植排斥反应、诱导移植耐受具有重要的意义。

总之，不同品系组合的大鼠肝脏原位移植模型排斥的研究结果不太一致，同时对于 NKT 等调节性 T 细胞群在移植排斥反应中表达的水平如何，目前研究较少，因而本实验围绕着“如何建立更简便、稳定的大鼠肝脏移植模型”、“什么品系组合是最典型、理想的排斥模型”、“T 细胞亚群在排斥反应中发生了什么样的变化”等问题展开研究，实验分为以下三个部分：

一、选用 SD 大鼠作为供、受体，采用经典的 Kamada “双袖套法”建立大鼠原位肝脏移植模型，并对术中麻醉、供肝的切取和灌注、供脏植入以及术后观察护理等方面进行改良；正式实验手术 80 对，术后对其无肝期、平均生存时间、肝功能、组织病理学等指标评估。

二、选用大鼠同源耐受组合 SD→SD 组作为对照组，采用改良后的手术方案分别对不同品系组合 Wistar→SD、Lewis→BN 和 DA→Lewis 进行肝脏移植，以手术时间、术后恢复情况、肝功能、组织病理学等指标评估、比较排斥反应，寻找最典型的急性大鼠肝脏移植排斥模型。

三、选用大鼠同源耐受组合 Lewis→Lewis 为对照组，DA → Lewis 作为急性重度排斥模型实验组，流式检测术后 10 天受体外周血 $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ 的比值以及淋巴结和脾脏中单个核细胞中 $CD4^+CD25^+$ 、NKT 细胞的比例，研究 T 细胞亚群在大鼠肝脏移植免疫反应中表达的情况。

第一部分

大鼠原位肝脏移植模型的建立和改良

材料与方法:

一、实验材料

1. 实验动物

8 周龄健康、雄性 SD 大鼠，体重 $230 \pm 20\text{g}$ ，清洁级，购于上海实验动物中心（实验动物生产许可证：SCXK（沪）2007-0005）。大鼠购回后饲养于厦门大学实验动物中心，自由进食、饮水，饲养环境符合清洁级标准。手术后大鼠均单笼喂养。所有动物实验的研究均严格接受学校动物管理委员会的审查和批准（下同）。

2. 实验仪器

显微手术器械一套、5/0、7/0 显微手术缝线（宁波成和显微器械厂）；普通医用手术器械、4/0 缝线（上海浦东金环医疗用品有限公司）；全自动模块式生化分析仪（瑞士罗氏公司 Modular PP）；全自动脱水机（英国. 珊顿）；包埋机（德国. 莱卡）。

自制部分：双层供肝保存器，由直径为 6cm 和 10cm 的玻璃平皿组成；简易麻醉、复苏装置，由 20ml 注射器和 100ml 塑料瓶组成；固定用橡皮泥；门静脉袖套管、肝下腔静脉袖套管，取材于聚乙烯导管；胆道支架管，取材于一次性硬膜外麻醉管；

3. 实验试剂

血管灌注液、器官保存液：均由乳酸钠林格氏注射液中加入肝素钠 10U/ml 制成，保存于 4°C 。乙醚、碘伏、阿托品、肝素、4% 多聚甲醛。

二、实验方法

1. 术前准备

1.1 动物选择与准备

动物选择：本部分实验供、受体均为 SD 大鼠，自主进食、饮水。实验大鼠购入 1 周后，选择精神状态佳、毛发光泽好、活动自如、无呼吸道感染的健康

大鼠纳入实验对象，供体体重 $220 \pm 20\text{g}$ ，受体略大于供体，体重 $230 \pm 20\text{g}$ 。供受体各 160 对，其中 80 对用于预实验，80 对用于正式实验。

术前准备：术前供体禁食 6~8 小时，受体禁食 12 小时，皆自由饮水，这样可以保证肝脏处于最佳的生理状态，又不至于腹腔过于饱满而影响手术操作。

1.2 实验室准备

手术前 1 天将动物手术室彻底打扫干净，2% 的来苏尔进行地面擦洗和喷洒消毒，手术台面、无影灯、输液架使用健之素消毒剂进行表面消毒，之后紫外线灯距地面 2.5m 进行空气消毒 1~2 小时；普通手术器械、供肝保存器高压消毒，显微手术器械、套管用 2% 戊二醛浸泡灭菌。

1.3 术者的准备

术者术前对实验的复杂性以及术中可能出现的困难要有充分的认识，尤其对关键环节如供肝的灌注、套管、受体肝上下腔静脉的缝合、胆管套管等的处理要有思想准备；必须熟悉大鼠的解剖结构和生理特点；牢固树立无菌观念。

2. 大鼠原位肝脏移植模型的建立和改良

该部分实验采用 Kamada “双袖套法”，不重建肝动脉。双人裸眼手术，包括供肝获取、供肝套管、受体肝脏的切除、供肝的植入四个部分，每个部分包括手术步骤及改良内容。

2.1 供体手术

2.1.1 手术步骤

2.1.1.1 供肝暴露：

大鼠乙醚麻醉满意后，平置于自制手术台上，依次碘伏、酒精消毒，大“十”字剖开腹皮肤、肌肉、腹膜，纱布保护切口，将小肠和大肠推向左下方，在膈肌所对应的背部位置垫一个 2ml 针筒，同时轻柔地将肝脏推向头部方向，尽可能地暴露肝门区域。

2.1.1.2 供体灌注：

剪开后腹膜，分离肝下腔静脉周围的脂肪组织，向下至左肾静脉开口处，并在下腔静脉后方放置一条 5/0 丝线，备结扎用。随后沿着腹腔干斜向右上方在大鼠脊柱左侧找到腹主动脉(图 1-1)，分离周围组织，同样在其后方放置一条 5/0 丝线，备结扎用。紧接着向下分离腹主动脉至左、右髂总动脉分叉处。穿刺阴茎

背静脉（雄性大鼠）或肠系膜下静脉（雌性大鼠），进行全身肝素化（500u）。取出4℃灌注液，排气满意后，依次结扎左肾静脉开口处的下腔静脉、腹腔干开口上方的腹主动脉，在髂总动脉上方穿刺腹主动脉进行逆行灌注（图1-2），滴速为50~100滴/分钟，剪开肝下下腔静脉及胸腔内下腔静脉作为血流出口。同时，一边灌注一边往肝脏表面淋洒0~4℃灌注液，使肝脏迅速进入冷缺血状态，灌注数秒后可见肝脏立刻变软，转为均匀土黄色，之后调慢滴速至30~50滴/分钟，使肝脏持续灌注，保持冷缺血状态。

2.1.1.3 供肝获取：

结扎左膈下静脉，将肝脏推向上方，分离暴露出2片乳突叶。在胆管分叉下方5mm处斜行剪开胆总管，将直径1~1.5mm的套管斜向上插入2~3mm，注意勿堵塞胆管分叉开口，同时尽量少剥离胆管周围组织。分离右肾静脉开口上方的下腔静脉周围组织，用弯钳夹一条5/0丝线在肝脏后方、腰大肌前方绕过右肾上腺静脉并将其结扎。待流出液变为均匀透亮，未见血迹后，依次剪断门静脉、肝固有动脉、胆管、下腔静脉，随后用棉签轻柔的将肝脏向上翻，剪断右肾上腺静脉，迅速分离肝脏周围结缔组织，紧贴膈肌先后剪下肝上下腔静脉的前、后壁，迅速取下整个肝脏，并将其置于0~4℃乳酸钠林格液中。

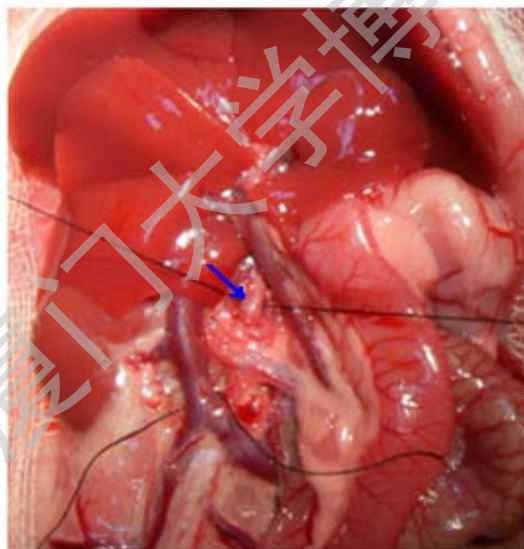


图1-1 腹腔干上方的腹主动脉（↘表示）

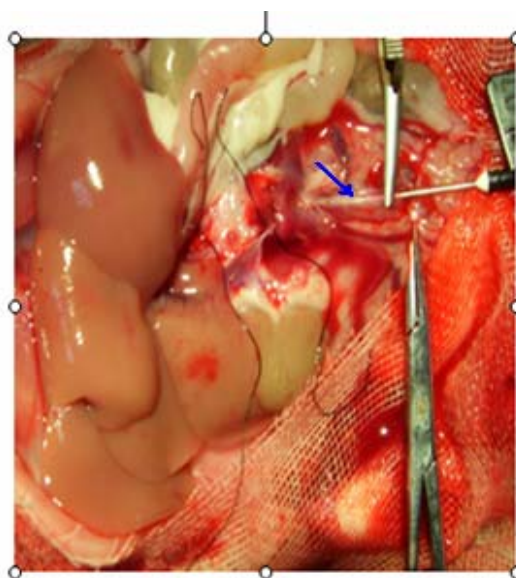


图1-2 腹主动脉逆行灌注（↘表示）

2.1.2 手术改良

2.1.2.1 麻醉

采用简易麻醉、复苏装置（图 1-3、1-4）控制麻醉深度，大鼠可以长时间保持良好的手术状态，术中安静，鲜有心肺骤停、躁动、震颤、抽搐等麻醉意外发生。



图 1-3 简易的麻醉装置



图 1-4 简易的气囊复苏装置

2.1.2.2 供体分离

肝脏质地柔嫩，分离时尽量减少频繁翻动，尽量少压迫肝脏，以免影响灌注

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.

厦门大学博硕士论文摘要库