

环孢素联合转化生长因子 β 1质粒对肝移植大鼠免疫反应的影响**

张岩, 陈曦海, 纪艳超, 翟哲, 吴波

Effects of cyclosporine combined with transforming growth factor beta 1 plasmid on rat immunological reaction following liver transplantation

Zhang Yan, Chen Xi-hai, Ji Yan-chao, Zhai Zhe, Wu Bo

Department of
General Surgery,
Fourth Affiliated
Hospital of Harbin
Medical University,
Harbin 150001,
Heilongjiang
Province, China

Zhan Yan★, Master,
Department of
General Surgery,
Fourth Affiliated
Hospital of Harbin
Medical University,
Harbin 150001,
Heilongjiang
Province, China
jbsbr@126.com

Correspondence to:
Wu Bo, Professor,
Master's supervisor,
Department of
General Surgery,
Fourth Affiliated
Hospital of Harbin
Medical University,
Harbin 150001,
Heilongjiang
Province, China
xinxin9129@126.com

Supported by: the
Tackle Key Program
of Heilongjiang
Province, No.
2010G0252-00*;
Program of
Heilongjiang
Educational
Committee, No.
11541147*

Received:2009-10-17
Accepted:2009-12-17

Abstract

BACKGROUND: Most patients who underwent liver transplantation would suffer acute rejection or transplanted liver failure resulted by chronic rejection, therefore, inducing specific immune tolerance via varied pathways is the ideal method to solve this problem.

OBJECTIVE: To treat rat transplanted liver by injecting transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) plasmid, and to analyze the relationship between TGF- β 1 and allograft rejection from gene level.

METHODS: A total of 30 male, Wistar rats were served as allogenic liver donors, and 10 male, SD rats served as syngeneic donors. Totally 40 male SD rats were served as liver recipients, and divided into 4 groups by order number table: allogenic transplantation, syngeneic transplantation, cyclosporin, and cyclosporin plus TGF- β 1 groups. In each group, rat orthotopic liver transplantation model was established by modified Kamada and improved two-cuff technique. After modeling, rats were received cyclosporine 1-5 days in the cyclosporine group, or intraperitoneal injected cyclosporin for 1-5 days, combined with TGF- β 1 plasmid 0-2 days in the cyclosporine plus TGF- β 1 group. No intervention was performed in the other groups. The survival time of rats were recorded, and the pathological changes was detected at days 3, 7, 14, 21, and 28 after transplantation, then the mixed lymphocyte culture was performed.

RESULTS AND CONCLUSION: The survival time of rats in syngeneic transplantation group and cyclosporine plus TGF- β 1 group was more than 60 days, which was obviously greater than that of allogenic transplantation and cyclosporine groups ($P < 0.05$). The histopathologic slide showed that there was moderate and severe acute rejection, with evident intrahepatic inflammatory cell infiltration in the allogenic transplantation and cyclosporine groups. Few rejections were observed in the syngeneic transplantation group, which was close to the normal liver tissues. Mixed lymphocyte culture of the cyclosporine plus TGF- β 1 group was superior to the syngeneic transplantation group or cyclosporine group ($P < 0.05$). The results demonstrated that cyclosporine combined with local injection of TGF- β 1 plasmid can relieve post-transplant immune rejection.

Zhang Y, Chen XH, Ji YC, Zhai Z, Wu B. Effects of cyclosporine combined with transforming growth factor beta 1 plasmid on rat immunological reaction following liver transplantation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(5):824-827. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 大多数肝移植患者会发生急性排斥或慢性排斥反应导致移植肝失功能, 通过不同途径诱导特异性免疫耐受是解决肝移植排斥问题最理想的方法。

目的: 以注射转化生长因子 β 1 质粒的方法对大鼠肝移植进行处理, 从基因方面分析转化生长因子 β 1 与移植免疫排斥反应的关系。

方法: 选用雄性 Wistar 大鼠 30 只为异基因肝移植供体, 雄性 SD 大鼠 10 只为同基因肝移植供体。雄性 SD 大鼠 40 只为肝移植受体, 以数字表法随机分为 4 组: 同种基因移植组、同种异基因移植组、环孢素组、环孢素联合转化生长因子组。各组均采用改良 Kamada 二袖套法并加以改进建立稳定的大鼠原位肝移植模型。造模后, 环孢素组给予环孢素 1~5 d, 环孢素联合转化生长因子组腹腔注射环孢素 A 1~5 d, 同时腹腔注射转化生长因子质粒 0~2 d, 其他两组不给予任何干预措施, 记录大鼠生存时间。于移植后 3, 7, 14, 21, 28 d 进行病理学、混合淋巴细胞培养。

结果与结论: 同种基因移植组、环孢素联合转化生长因子组大鼠生存时间均达 60 d 以上, 明显高于同种异基因移植组、环孢素组 ($P < 0.05$)。同种异基因移植组、环孢素组病理组织切片可见中-重度急性排斥反应, 肝内炎细胞浸润较为明显, 主要集中在汇管区; 环孢素联合转化生长因子组移植肝内组织损伤程度明显减轻; 同种基因移植组基本无排斥反应, 接近正常肝组织。环孢素联合转化生长因子组混合淋巴细胞培养优于同种异基因移植组、环孢素组 ($P < 0.05$)。结果提示环孢素联合局部注射转化生长因子 β 1 质粒可明显减轻大鼠肝移植移植后得免疫排斥反应。

关键词: 转化生长因子 β 1 质粒; 免疫排斥; 肝移植; 孢素素; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.05.016

张岩, 陈曦海, 纪艳超, 翟哲, 吴波. 环孢素联合转化生长因子 β 1 质粒对肝移植大鼠免疫反应的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(5):824-827. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

目前肝移植对医学界来说一直是比较棘手的问题。在临床上由于患者的年龄及全身情况等可影响移植效果, 且移植物长期存活的最大障碍是移植排斥反应, 而主要组织相容性抗原不配对是移植排斥的主要原因^[1-5]。如何有效地抑制或减弱移植排斥反应是提高组织器官移植成功率, 延长存活时间的根本问题。转化生长因子β1是一种强效细胞生长增殖调节蛋白, 在移植免疫的抗排斥反应, 移植物血管病发展中扮演重要角色, 已成为近年细胞, 组织, 器官移植的研究热点^[6]。

研究发现转化生长因子β1具有促进细胞增殖及抑制细胞增殖的双向功能, 对于不同的靶细胞以及同一靶细胞在不同功能状态下显示不同的作用, 这与其基因多态性有关。当前, 转化生长因子β1在心脏移植中有广泛的报道, 而在肝移植中得报道很少。本实验以注射转化生长因子β1质粒的方法对大鼠肝移植进行处理, 从基因方面分析转化生长因子β1与移植免疫排斥反应的关系。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验, 基因分析。

时间及地点: 于2007-08/2008-08在哈尔滨医科大学动物实验中心完成。

材料: 雄性Wistar大鼠30只为异基因肝移植供体, 体质量230~250 g; 雄性SD大鼠10只为同基因肝移植供体, 体质量250~270 g。雄性SD大鼠40只为肝移植受体, 体质量250~270 g。大鼠均由哈尔滨医科大学动物实验中心提供。供体术前不禁食和水, 受体术前禁食12 h, 但不禁水。饲养环境温度保持在22℃左右, 湿度保持在60%~70%。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

主要试剂:

试剂	来源
环孢素针剂50 g/L	瑞士Novartis公司
抗CD40L (CD-154) 单抗: 克隆编号3H1902, 浓度1 g/L (含0.1%叠氮钠)	美国Biological公司
酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒	晶美生物工程(北京)有限公司
转化生长因子质粒1 000 μg/L	武汉博士德有限公司

实验方法:

动物分组及干预方式: 将受体大鼠以数字表法随机分为4组: 同基因移植组为SD→SD大鼠移植; 同种异基因移植组为Wistar→SD大鼠肝移植。同基因移植组、同种异基因移植组术后均不用任何治疗措施; 环孢素组为Wistar→SD大鼠肝移植, 移植后用腹腔注射5 mg环孢素A 1~5 d; 环孢素联合转化生长因子组为Wistar→SD大鼠肝移植, 移植后用腹腔注射环孢素A 1~5 d, 同时腹腔注射40 μg/L转化生长因子β1质粒0~2 d, 每组10对大鼠。采用改良Kamada二袖套法并加以改进建立稳定的大鼠原位肝移植模型^[1]。每组5只受体作为观察生存期之用, 观察期以受体大鼠死亡为终点; 另5只受体在移植后7 d处死, 观察移植肝病理改变和外周血细胞因子的变化。各组因术中、术后并发症如血栓形成、感染、胆道梗阻等死亡大鼠不列入统计之内。大鼠肝移植手术当天为0 d, 术后24 h为1 d; 以此类推^[7]。

观察指标: 移植后3, 7, 14, 21, 28 d进行病理学、混合淋巴细胞培养。记录受体大鼠移植后生存时间、移植肝病理改变。

病理学观察: 各组大鼠在移植后7 d, 开腹仔细观察移植肝大小、色泽、质地及与周围组织的粘连情况, 通过腹主动脉取血处死后完整取出移植肝, 剪切成大小合适的组织块。组织标本置于体积分数10%中性缓甲醛溶液中固定, 两三天后石蜡包埋制成石蜡块行常规切片, 苏木精-伊红染色, 光镜下观察。急性排斥反应病理学特征主要表现在汇管区, 根据Banff系统分级诊断标准评定排斥反应程度^[2]。

诊断标准:

反应程度	诊断标准
I级(轻度)	汇管区淋巴细胞浸润, 少数单个核细胞浸润于胆管上皮细胞但未见明显的胆管上皮损伤, 可见血管内皮炎。
II级(中度)	更为明显的汇管区淋巴细胞及其他细胞浸润, 50%以上的胆管上皮受损, 并可见血管内皮炎。
III级(重度)	明显的汇管区炎性浸润并扩展至汇管区周围, 50%以上的胆管上皮受损(包括上皮细胞脱落), 伴有中~重度血管内皮炎, 甚至可见静脉周围肝细胞脱出坏死。

混合淋巴细胞反应: 分别取SD和Wistar大鼠脾脏制备细胞悬液, SD大鼠脾细胞悬液($2 \times 10^{10} L^{-1}$)加丝裂霉素C(50 mg/L)处理, 37℃,

哈尔滨医科大学附属第四医院普外科, 黑龙江省哈尔滨市 150001

张岩★, 男, 1975年生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 哈尔滨医科大学毕业, 硕士, 主要从事器官移植研究。
jbsbr@126.com

通讯作者: 吴波, 教授, 硕士生导师, 哈尔滨医科大学附属第四医院普外科, 黑龙江省哈尔滨市 150001
xinxin9129@126.com

黑龙江省攻关项目(2010G0252-00)*, 黑龙江省教育厅资助项目(项目编号 11541147)*

中图分类号: R617
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)05-00824-04

收稿日期: 2009-10-17
修回日期: 2009-12-17
(2009112005/GW·Z)

30 min, 培养液洗涤3次后用体积分数5%NBS培养液配制细胞悬液($5 \times 10^9 L^{-1}$), 作为刺激细胞, 用供体鼠制备效应细胞和分别3, 7, 14 d后用受体鼠制备刺激细胞, 用15%Fcs1640作对照, 振荡, 用CO₂培养箱培养3~5 d, 然后每孔加5 g/L 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)20 μL, 继续培养4 h, 用1 000 r/min, 5 min, 弃上清, 加二甲基亚砷150 μL, 再振荡10 s, 最后用490 nm酶标仪检测。

主要观察指标: 移植后3, 7, 14, 21, 28 d移植肝病理学检查, 混合淋巴细胞培养结果。

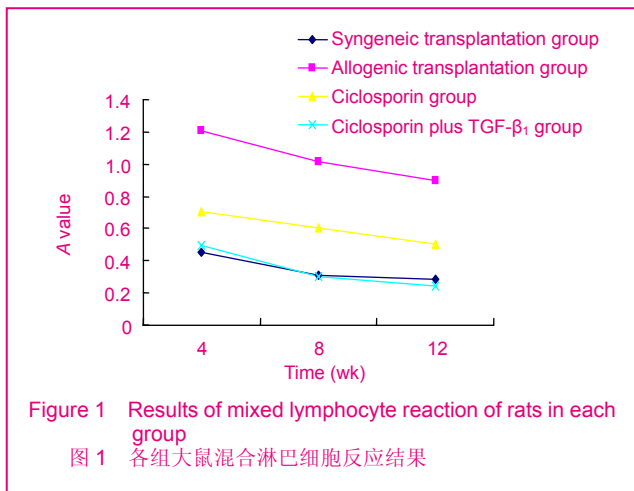
设计、实施、评估者: 设计由第一作者完成, 实施由第一、二、三、四、五作者完成, 评估由第一作者完成。

统计学分析: 由第五作者采用SPSS 13.0统计分析软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用单因素方差分析比较各组间差异的显著性。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组受体大鼠生存期比较 同基因移植组可长期存活(> 60 d)而不发生排斥反应(63.8 ± 9.7) d; 同种异基因移植组生存时间为(13.1 ± 2.3) d; 环孢素组生存时间为(29.1 ± 4.3) d; 环孢素联合转化生长因子组生存时间为(61.9 ± 6.4) d, 生存时间则显著延长, 与同种异基因移植组、环孢素组比较差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

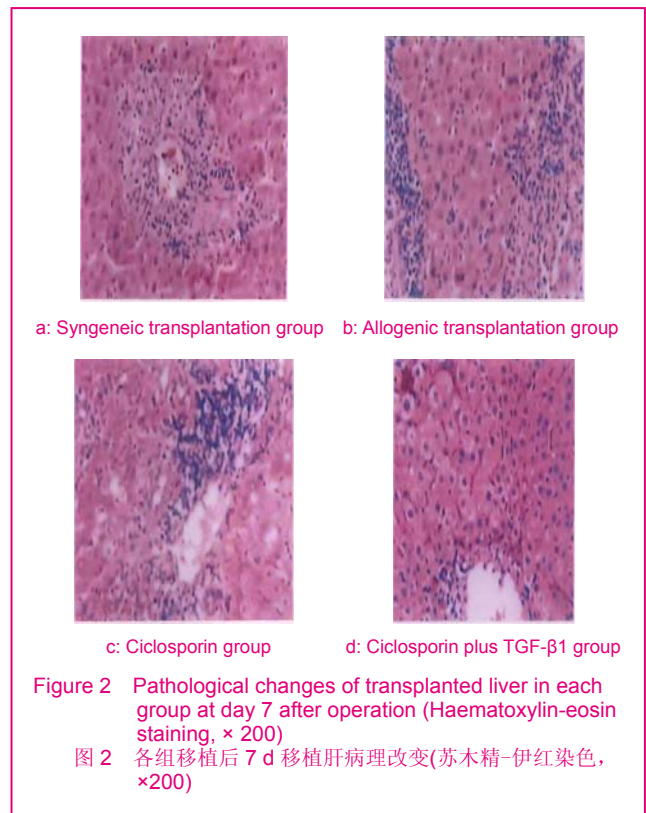
2.2 混合淋巴细胞反应免疫学检查结果 同基因移植组、环孢素联合转化生长因子组与同种异基因移植组差异有显著性意义(0.312 ± 0.009 , 0.213 ± 0.006 , 0.928 ± 0.032 , $P < 0.05$); 环孢素联合转化生长因子组与同基因移植组差异无显著性意义($P > 0.05$); 环孢素联合转化生长因子组优于环孢素组(0.521 ± 0.018) ($P < 0.05$), 表明局部注射转化生长因子β1质粒能减少局部免疫排斥反应, 减少淋巴细胞。见图1。



2.3 肝移植后病理改变

大体改变: 各组移植后7 d处死取肝, 可见腹腔内有不等量的淡红色腹水, 尤其以同种异基因移植组、环孢素组腹水量为著。肝脏多与胃、大网膜、肠管等周围组织粘连。受体鼠移植肝脏不同程度肿大, 其中同种异基因移植组移植肝肿胀尤为明显, 肝叶多处可见斑片状坏死灶, 切开时肝包膜多由于明显水肿而外翻。同基因移植组移植肝颜色鲜红, 质地较为柔软。

镜下所见: 同种异基因移植组、环孢素组病理组织切片可见中-重度急性排斥反应, 肝内炎细胞浸润较为明显, 主要集中在汇管区。汇管区较正常肝组织增宽, 大量淋巴细胞浸润, 小叶间静脉内皮细胞表面和内皮下有较多淋巴细胞浸润, 呈明显的血管内皮炎; 小胆管上皮内亦可见淋巴细胞浸润, 部分胆管上皮甚至缺失, 有的中央静脉周围肝细胞坏死脱落; 同种异基因移植组、环孢素组间无明显差异。环孢素联合转化生长因子组移植肝内组织损伤程度显著减轻。同种异基因移植组基本无排斥反应, 接近正常肝组织。见图2。



3 讨论

同种异体肝脏移植MHC不同, 可诱发以小淋巴细胞浸润为主的免疫排斥反应, 应用免疫抑制剂有利于神经再生, 但对机体有不可避免的不良反[7-9], 目前通过移植前对供受体进行预处理(胸腺内注射异基因抗原诱导鼠肝脏移植免疫耐受^[10-12])、基因修饰等策略, 有效的诱

导同种或异种受体产生供体特异性的免疫耐受或适应, 在移植免疫中具有广阔的应用前景^[13]。目前大多数接受肝移植的患者会发生急性排斥反应或由于慢性排斥导致移植肝失功能^[14]。通过不同途径诱导特异性免疫耐受是解决肝移植排斥问题最理想的方法。

转化生长因子 $\beta 1$ 是诱导免疫耐受的一个重要的微环境因素, 对机体的免疫系统产生广泛的影响; Wallick首先报道了在同种异体心脏移植实验中, 腹腔内每天注射重组人转化生长因子 $\beta 1$ 可明显延长移植存活时间, 表明转化生长因子 $\beta 1$ 在器官移植中的抗排斥反应作用。用转化生长因子 $\beta 1$ 培养的树突状细胞, 其细胞表面的MHC类抗原性减弱, 将此类树突状细胞注入受体体内能显著延长小鼠移植心脏的存活时间。器官移植中对免疫排斥反应的机制主要有诱导供体特异性免疫耐受或非特异性免疫抑制。转化生长因子 $\beta 1$ 在特异性免疫耐受中的作用主要通过抑制白细胞介素2诱导的T细胞增殖活化发挥有效的负调节作用, 影响T细胞生长因子受体、转铁蛋白受体的表达, 抑制Rb蛋白磷酸化, 诱导T细胞凋亡; 转化生长因子 $\beta 1$ 可通过抑制 $CD4^+$ T细胞分泌细胞因子从而抑制NK细胞增殖和分泌细胞因子, 下调NK细胞的穿孔素和颗粒酶A基因的表达; 促进巨噬细胞分泌白细胞介素10而介导免疫抑制。最近有人证明在产生协同刺激信号的同时, 加用白细胞介素10和转化生长因子 $\beta 1$ 可致免疫耐受的产生, 这主要是因为加入了白细胞介素10和转化生长因子 $\beta 1$ 使 $CD4^+$ T细胞的T细胞受体和CD28分子信号传递方式发生了改变。结果发现: 同种异基因移植组生存时间为(13.1 \pm 2.3) d, 环孢素组生存时间为(29.1 \pm 4.3) d; 环孢素联合转化生长因子两组生存时间则显著延长, 均大于60 d, 与同种异基因移植组、环孢素两组比较差异均有显著性。即环孢素A可以延长同种异体肝移植受体大鼠的生存, 但单独应用不能达到长期存活的目标, 只有联合转化生长因子 $\beta 1$ 等措施才能实现同种异体肝移植受体和移植肝的长期存活。

转化生长因子 $\beta 1$ 是一种很有潜力的强效免疫抑制因子, 通过基因工程技术用转化生长因子 $\beta 1$ 基因修饰供体器官, 营造诱导免疫耐受的微环境, 突破同种间或异

种间的免疫屏障, 使同种或异种神经移植植物有功能地长期存活。进一步深入研究转化生长因子 $\beta 1$ 的作用机制, 发展完善转基因技术, 转化生长因子 $\beta 1$ 作为一种新型的免疫抑制生物制剂在器官移植中的临床应用将指日可待。本实验采用的联合免疫治疗, 有效抑制了急性排斥反应、诱导了免疫耐受的初步形成, 有望能建立一种新的大鼠肝移植免疫耐受诱导方案, 为临床实践提供部分理论依据和重要参考。

4 参考文献

- [1] Lemmer ER, Shepard EG, Blakolmer K, et al. Isolation from human fetal liver of cells co-expressing CD34 haematopoietic stem cell and CAM 5.2 pancytokeratin markers. *J Hepatol.* 1998; 29(3): 450-454.
- [2] Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 2000; 6(11): 1229-1234.
- [3] Gao Z, McAlister VC, Williams GM. Repopulation of liver endothelium by bone-marrow-derived cells. *Lancet.* 2001; 357(9260):932-933.
- [4] Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, et al. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 288(1): 156-164.
- [5] Daly AK, Day CP, Donaldson PT. Polymorphisms in immunoregulatory genes: towards individualized immunosuppressive therapy? *Am J Pharmacogenomics.* 2002; 2(1): 13-23.
- [6] Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature.* 1998; 396(6712): 699-703.
- [7] Arnold B. Levels of peripheral T cell tolerance. *Transplant Immunol.* 2002; 10(2-3):109-114.
- [8] Goddard S, Adams DH. New approaches to immunosuppression in liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 17(2): 116-126.
- [9] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 1999; 284(5417): 1168-1170.
- [10] Mitaka T. Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 281(1): 1-5.
- [11] Farber E. Similarities in the sequences of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3-methyl-4-dimethyl aminoazobenzene. *Cancer Res.* 1955; 16: 142-148.
- [12] Fujio K, Evans RP, Hu Z, et al. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab Invest.* 1994; 70(4): 511-516.
- [13] Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, et al. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology.* 1998; 27(2): 433-445.
- [14] Baumann U, Crosby HA, Ramani P, et al. Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell? *Hepatology.* 1999; 30(1): 112-117.