

恒河猴移植肝组织内细胞间黏附分子1与急性排斥反应的关系[☆]

冉江华, 张升宁, 刘 静, 李 铸, 吴淑媛, 李来邦, 张熙冰, 张鸿青, 李 立

Interrelations between acute rejection and intercellular adhesion molecule-1 in liver tissue after liver transplantation in Rhesus monkey

Ran Jiang-hua, Zhang Sheng-ning, Liu Jing, Li Zhu, Wu Shu-yuan, Li Lai-bang, Zhang Xi-bing, Zhang Hong-qing, Li Li

Abstract

BACKGROUND: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) level in transplanted tissue would increase when acute rejection occurs.

OBJECTIVE: To investigate the relationship between ICAM-1 and acute rejection of liver transplantation in Rhesus Monkey.

METHODS: Allogenic liver transplantation models were established in Rhesus monkey and then randomly divided into an experimental group (without anti-rejection management after liver transplantation) and a control group (with anti-rejection management during and after liver transplantation).

RESULTS AND CONCLUSION: At 24 and 72 hours after liver transplantation, serum alanine aminotransferase and serum total bilirubin levels were significantly higher in the experimental group than in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.001$). At 12 hours after liver transplantation, transplanted liver in the experimental group showed mild acute rejection, indicating that during acute rejection, liver function changes occur after pathological examination of liver tissue. At 24 and 72 hours after liver transplantation, moderate and severe acute rejection occurred. At 6 hours after liver transplantation, ICAM-1 expression in the vascular endothelial cells, liver cell membrane, and biliary epithelial cells was significantly increased in the experimental group than in the control group ($P < 0.05$). In the experimental group, with ICAM-1 expression increasing, rejection was aggravated, indicating that at the early stage of acute rejection, slight changes in liver function and pathological manifestation were observed, and ICAM-1 level was greatly increased. These findings suggest that detection of ICAM-1 level in the cells of transplanted liver tissue would be of significance for early diagnosis of acute rejection after liver transplantation.

First Department of Hepato-pancreatobiliary Surgery, Affiliated Ganmei Hospital of Kunming Medical College and First Hospital of Kunming City, Research Center of Liver Transplantation, Yunnan Province Institute of Organ Transplantation, Kunming 650011, Yunnan Province, China

Ran JH, Zhang SN, Liu J, Li Z, Wu SY, Li LB, Zhang XB, Zhang HQ, Li L. Interrelations between acute rejection and intercellular adhesion molecule-1 in liver tissue after liver transplantation in Rhesus monkey. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(44): 8171-8174. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Ran Jiang-hua[☆], Doctor, Professor, Master's supervisor, First Department of Hepato-pancreatobiliary Surgery, Affiliated Ganmei Hospital of Kunming Medical College and First Hospital of Kunming City, Research Center of Liver Transplantation, Yunnan Province Institute of Organ Transplantation, Kunming 650011, Yunnan Province, China

Correspondence to: Ran Jiang-hua, First Department of Hepato-pancreatobiliary Surgery, Affiliated Ganmei Hospital of Kunming Medical College and First Hospital of Kunming City, Research Center of Liver Transplantation, Yunnan Province Institute of Organ Transplantation, Kunming 650011, Yunnan Province, China
rjh2u@163.com

Supported by: the Major Program of Bureau of Science and Technology of Kunming City, No. 08S100304*

Received: 2011-07-23
Accepted: 2011-08-31

摘要

背景: 在急性排斥反应发生时会有移植组织中细胞间黏附分子1表达水平的增高。

目的: 探讨恒河猴移植肝组织内细胞间黏附分子1与急性排斥反应的关系。

方法: 建立恒河猴同种异体肝移植模型, 随机分为实验组(移植后不给予抗排斥处理)和对照组(移植中及移植后均给予抗排斥处理)。

结果与结论: 实验组移植后 24、72 h 血清丙氨酸氨基转移酶及血清总胆红素水平明显高于对照组($P < 0.05$ 或 < 0.001)。移植后 12 h 实验组移植肝即表现为轻度急性排斥反应, 说明急性排斥反应时肝功能变化滞后于肝组织病理学检查, 移植后 24、72 h 表现为中重度急性排斥反应。移植后 6 h 实验组肝组织中血管内皮细胞、肝细胞膜、胆管上皮细胞上细胞间黏附分子1的表达呈持续增强, 并显著高于对照组($P < 0.05$), 随细胞间黏附分子1的表达增强, 排斥反应加剧, 说明在急性排斥反应早期, 肝功能、病理学仅有轻微改变时, 细胞间黏附分子1水平即显著升高。提示移植肝组织中细胞间黏附分子1表达的检测对肝移植后急性排斥反应的早期诊断具有重要意义。

关键词: 细胞间黏附分子1; 肝移植; 急性排斥反应; 细胞间黏附分子1; 灵长类动物; 恒河猴
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.44.001

冉江华, 张升宁, 刘静, 李铸, 吴淑媛, 李来邦, 张熙冰, 张鸿青, 李立. 恒河猴移植肝组织内细胞间黏附分子1与急性排斥反应的关系[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(44):8171-8174.
[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

急性排斥反应是肝移植后最常见的并发症之一, 目前, 肝脏穿刺活组织检查是判断急性排斥反应的有效手段之一, 但穿刺活检受易诸多干扰因素影响, 因此寻求一种有效、及时的方法, 对诊断急性排斥反应具有重要意义。有研究表明在急性排斥反应发生时伴有移植组织中细胞间黏附分子1表达水平的增高, 但这些均局限于大鼠等动物的研究, 与临床相差甚远^[1-3]。本实验使用非人灵长类动物-恒河猴,

检测急性排斥反应时细胞间黏附分子1变化, 为细胞间黏附分子1作为临床肝移植排斥反应诊断指标提供理论基础。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2009-09/2010-01在昆明医学院动物实验中心完成。

材料:

实验动物与分组: 5~8岁健康恒河猴28只, 供体雌雄不限, 受体为雄性, 体质量3.8~11 kg;

昆明市第一人民医院暨昆明医学院附属甘美医院肝胆胰一科、云南省器官移植研究所肝移植研究中心、云南省昆明市650011

冉江华☆, 男, 1965年生, 重庆市人, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事器官移植、免疫耐受、肝胆胰外科等方面的研究。

通讯作者: 冉江华, 博士, 教授, 硕士生导师, 昆明市第一人民医院暨昆明医学院附属甘美医院肝胆胰一科、云南省器官移植研究所肝移植研究中心、云南省昆明市650011
rjh2u@163.com

中图分类号: R617
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)44-08171-04

收稿日期: 2011-07-23
修回日期: 2011-08-31
(20110804007/GW-S)

均由昆明医学院动物实验中心提供, 许可证号: SCXK (滇) 2009-0004。建立恒河猴同种异体肝移植模型14对, 随机分为2组: 实验组(急性排斥反应组), 肝移植成功后, 受体不行抗排斥处理。对照组, 移植中给予甲强龙250 mg静脉注射, 移植后给予他克莫司免疫排斥药物, 剂量为0.1 mg/(kg·d)。分别在移植后6, 12, 24, 72 h 4个时间点麻醉下取标本。

药品: 实验中使用的甲强龙来源于辉瑞制药有限公司, 他克莫司来源于安斯泰来制药有限公司。

实验方法:

肝移植动物模型的制备: 采用作者改进的方法, 建立恒河猴同种异体原位肝移植模型^[4]。

标本收集: 分别在移植后6, 12, 24, 72 h 4个时间点各取4个样本。造模过程中实验组死亡4只, 对照组死亡2只, 均予以补齐。麻醉下取标本, 抽取静脉血3~5 mL, 血样离心(4 °C, 3 000 r/min 10 min), 取上清液, 入-80 °C超低温冰箱保存待测, 待标本齐备后, 行肝功能等检测。腹壁切开一小切口, 取肝脏边缘约0.5 cm×0.5 cm×1.0 cm大小肝组织(遇在各时间点前后30 min内死亡的受体动物, 亦取同样大小的肝组织及等量下腔静脉血列入该时点样本), 体积分数10%中性甲醛固定, 分别做成石蜡切片, 苏木精-伊红染色和免疫组织化学检测细胞间黏附分子1水平。

肝功能检测: 取-80 °C保存待测血清标本行肝功能检测。全自动生化分析仪, 用直接活力测定法测定血清丙氨酸氨基转移酶及血清总胆红素的表达变化情况。

肝组织病理学检查: 将固定于甲醛中的肝组织制成石蜡切片, 用苏木精染色, 光镜下观察急性排斥反应, 根据目前国际公认的Banff系统评估标准, 将急性免疫排斥反应的病理改变分为4级^[5]: 不明确(0级), 汇管区三体(肝动脉、门静脉和胆管)炎细胞浸润程度未达到急性排斥的诊断标准; 轻度(I级), 排斥性炎细胞浸润少数汇管区的胆管和血管, 炎细胞数量较少, 仅局限在汇管区间隙中; 中度(II级), 排斥性炎细胞浸及多数或全部汇管区的胆管和血管; 重度(III级), 在中度的基础上, 炎细胞浸润汇管区周围, 伴有中重度静脉炎并扩展到肝实质, 引起静脉周围肝细胞坏死。

肝组织细胞间黏附分子1表达免疫组织化学检测: 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接, 观察各组移植肝脏细胞间黏附分子1的表达, 实

验操作步骤按说明书进行, 细胞间黏附分子1(H-108)试剂盒(由昆明泽浩科技有限公司提供)。

免疫组织化学定量: 通过光镜放大400倍摄取图像, 每张切片各于取两个视野, 输入计算机图像分析系统内分析细胞间黏附分子1表达阳性面积, 并将之与视野测试面积相比求出阳性面积百分率。

主要观察指标: 移植后恒河猴肝脏功能的变化、肝组织炎症反应的程度及细胞间黏附分子1表达情况。

统计学分析: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, 用SPSS 13.0软件在微机上将资料进行统计分析。

2 结果

2.1 移植后肝功能的变化

丙氨酸氨基转移酶: 实验组移植后24, 72 h明显丙氨酸氨基转移酶活性高于对照组($P < 0.05$); 实验组由于未使用免疫排斥药物, 移植后未使用激素等原因导致肝细胞受到机体炎性细胞的攻击损伤较对照组严重。两组移植后6, 12 h的丙氨酸氨基转移酶活性比较接近, 组间比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。移植后6, 12, 24, 72 h的丙氨酸氨基转移酶活性呈逐渐上升趋势, 因而两组组内比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 并且实验组较对照组变化大, 肝移植后24, 72 h的变化趋势最明显, 见表1。

表1 各组恒河猴肝移植后血清丙氨酸氨基转移酶活性的变化
Table 1 Change of serum alanine aminotransferase activity after liver transplantation ($\bar{x} \pm s$, $n=4$, $\mu\text{kat/L}$)

Group	6 h	12 h	24 h	72 h
Experimental	7.67±1.40	10.64±1.46	14.17±1.46	31.08±2.00
Control	7.55±1.36	8.93±1.41	9.84±1.13	12.99±1.00
P	0.906	0.143	0.002	< 0.001

血清总胆红素: 实验组移植后24, 72 h血清总胆红素水平明显高于对照组($P < 0.05$); 实验组由于没有使用免疫排斥药物, 移植后未使用激素等原因导致肝细胞受到机体炎性细胞的攻击损伤较对照组严重。两组随着移植后时间延长, 血清总胆红素呈逐渐上升趋势, 两组移植后6, 12 h的血清总胆红素水平比较接近, 组间比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。肝移植后

6, 12, 24, 和72 h的肝功能血清总胆红素逐渐上升趋势,因而两组组内比较,差异有显著性意义 ($P < 0.05$);并且实验组较对照组变化大,肝移植后24, 72 h的变化趋势最明显,见表2。

表2 各组恒河猴肝移植后血清总胆红素水平的变化
Table 2 Change of serum total bilirubin levels after liver transplantation ($\bar{x} \pm s$, $n=4$, $\mu\text{mol/L}$)

Group	6 h	12 h	24 h	72 h
Experimental	19.85 $\pm$ 4.17	30.45 $\pm$ 4.00	54.98 $\pm$ 6.52	154.20 $\pm$ 20.89
Control	19.28 $\pm$ 3.04	25.00 $\pm$ 3.47	37.25 $\pm$ 7.74	52.08 $\pm$ 9.63
P	0.831	0.085	0.013	< 0.001

2.2 恒河猴肝移植后肝组织病理学变化 见图1。

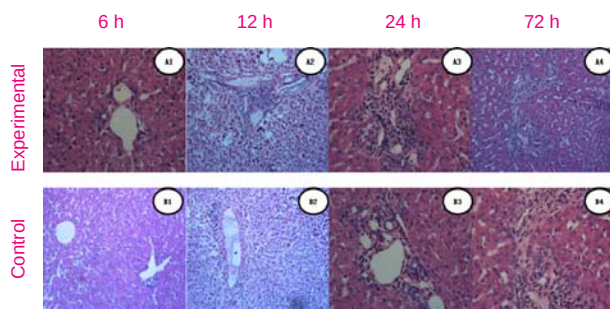


Figure 1 Histopathological change of liver after transplantation (Hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)
图1 移植后肝脏病理组织学变化(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

移植后6 h: 两组肝脏组织基本上正常,没有排斥反应的镜下特点,可见肝小叶结构正常,汇管区有少量以中性粒细胞为主的炎性细胞浸润,未见淋巴细胞浸润或者仅有极少量的淋巴细胞,小叶间静脉内膜基本正常,但小叶间静脉内膜水肿,内膜下可见少量中性粒细胞浸润,汇管区可见有少量的混合炎症细胞浸润,胆管、血管均存在,但胆管上皮未受损伤。

移植后12 h: 实验组肝脏苏木精-伊红染色显示肝小叶结构基本正常,汇管区有中等量以中性粒细胞为主的炎性细胞浸润,其中可以看到较多的淋巴细胞浸润,小叶间静脉内膜水肿明显增厚,内膜下可见中等量中性粒细胞浸润(淋巴细胞占的比例增多),胆管、血管均存在,但胆管上皮未见明显损伤, Banff评分 I ~ II 级;对照组可见肝脏实质内有中等量的中性粒细胞浸润,汇管区仅见有少量中性粒细胞浸润(其中的淋巴细胞极少),排斥反应分级不明确, Banff评分 0 ~ I 级。

移植后24 h: 实验组肝脏苏木精-伊红染色显示中到重度排斥反应,汇管区大量单个核细胞浸润,并累及胆管、血管,肝小叶结构消失,伴有局灶性出血、坏死。 Banff评分 II ~ III 级;对照组汇管区出现少量的单核细胞浸润,但侵及肝实质、胆管和血管的炎细胞浸润程度达到轻度急性排斥的诊断标准, Banff评分 0 ~ I 级。

移植后72 h: 实验组肝脏苏木精-伊红染色显示重度排斥反应,汇管区大量单个核细胞浸润,并累及胆管、血管,肝小叶结构消失明显,且伴有明显的局灶性出血、坏死, Banff评分 III 级;对照组汇管区出现少到中等量的单核细胞浸润,侵及肝实质程度较实验组轻, Banff评分 0 ~ I 级。

2.3 移植后肝组织细胞间黏附分子1的免疫组织化学变化 实验组细胞间黏附分子1在肝细胞膜、胆管上皮细胞及炎性浸润细胞上明显表达,移植后6 h肝组织细胞间黏附分子1的免疫组织化学染色阳性面积百分率高于对照组($P < 0.05$),随时间实验组细胞间黏附分子1的免疫组织化学染色阳性面积百分率不断增高,对照组波动后略有增高。两组间同一时点比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。见表3、图2。

表3 移植后肝组织细胞间黏附分子1的免疫组织化学染色阳性面积百分率

Table 3 Percentage of positive area of intercellular adhesion molecule-1 in liver tissue after transplantation ($\bar{x} \pm s$, $n=4$, %)

Group	6 h	12 h	24 h	72 h
Experimental	23.21 $\pm$ 5.26	30.55 $\pm$ 4.91	55.20 $\pm$ 7.35	56.70 $\pm$ 10.22
Control	15.28 $\pm$ 3.05	14.20 $\pm$ 5.30	20.15 $\pm$ 7.04	25.00 $\pm$ 6.25
P	0.043	0.028	0.011	0.013

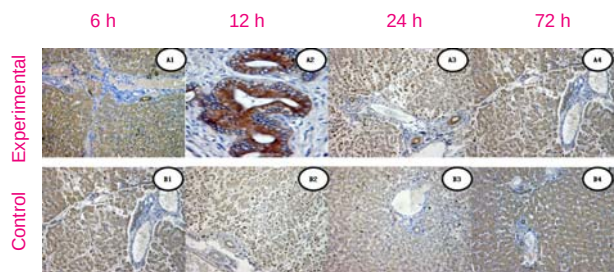


Figure 2 Expression of intercellular adhesion molecule-1 in liver tissue (SP, $\times 400$)

图2 移植后肝组织细胞间黏附分子1的表达变化(SP, $\times 400$)

3 讨论

细胞间黏附分子1在排斥反应中具有重要作用,急性排斥反应发生时,循环中的淋巴细胞向移植部位移动。在移植部位释放并刺激细胞间黏附分子1的表达,细胞间黏附分子1通过提高了T细胞和MHC抗原结合,介导淋巴细胞与血管内皮细胞黏附,从而参与移植排斥反应^[6]。有研究证实细胞间黏附分子1参与排斥反应中炎症细胞浸润作用的诸多过程,发生急性排斥的受体无论是移植组织局部还是血液中都含有细胞间黏附分子1的表达增高^[7-9]。本实验旨在研究非人类灵长类动物恒河猴

肝移植急性排斥反应发生时, 细胞间黏附分子1在肝组织中表达与肝功能、组织病理学改变之间的关系, 为临床急性排斥反应的早期诊断提供理论依据。

肝移植后检测肝功能是非常重要的。由于肝脏内转氨酶水平为血中的100倍, 只要1%的肝细胞坏死, 便足以使血清中酶活性增加1倍同时出现总胆红素升高。因此血清中丙氨酸氨基转移酶活性、血清总胆红素的水平是肝细胞损伤的敏感指标。本实验检测了实验组和对照组移植后6, 12, 24, 72 h血清丙氨酸氨基转移酶和血清总胆红素两个指标, 以评价肝移植后早期移植肝的功能状况。实验组24 h后丙氨酸氨基转移酶和血清总胆红素才明显高于对照组, 但此时组织病理学已显示出中度排斥变化。肝组织病理学苏木精-伊红染色在移植后12 h表现为 I ~ II 级急性排斥反应, 因此急性排斥反应时肝功能变化滞后于肝组织病理学检查。

本实验证实, 实验组细胞间黏附分子1的表达在移植后6 h即出现增高, 与对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 早于肝组织病理学及肝功能的改变。在小动物实验中, 也有类似的研究报道^[10]。实验还显示, 细胞间黏附分子1在肝细胞膜、胆管上皮细胞及炎症浸润细胞上明显表达, 对照组细胞间黏附分子1的表达波动后略有升高, 这可能和再灌注损伤有关, 但同一时点对照组与实验组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。实验组随细胞间黏附分子1在肝组织中血管内皮细胞、肝细胞膜、胆管上皮细胞上的表达呈持续增强, 则排斥反应加剧, 提示细胞间黏附分子1在移植肝组织中肝细胞及胆管上皮细胞的表达上调促使了炎症细胞与之识别、黏附并造成这些靶细胞的免疫损伤, 导致急性排斥反应的发生, 表明细胞间黏附分子1与急性排斥反应相关, 并具有一定的早期诊断价值^[11-13]。

总之, 当肝移植发生急性排斥反应时, 移植肝组织中细胞间黏附分子1表达水平增强, 急性排斥反应程度也随之加剧, 并且在急性排斥反应早期, 肝功能、病理学仅有轻微改变时, 细胞间黏附分子1水平即显著升高。因此肝组织中细胞间黏附分子1水平的检测对移植后急性排斥反应的早期诊断, 指导免疫抑制用药具有重要意义。

4 参考文献

- [1] Lautenschlager I, Höckerstedt K, Taskinen E. Expression of adhesion molecules in liver allografts during acute and chronic rejection. *Transplant Proc.* 1997;29(7):3114-3115.
- [2] Adams DH, Hubscher SG, Shaw J, et al. Intercellular adhesion molecule 1 on liver allografts during rejection. *Lancet.* 1989, 11; 2(8672):1122-1125.

- [3] Fu YY, He XS, Chen JL, et al. Zhongguo Putong Wwaike Zazhi. 2002;11(1):37-40.
傅宇阳, 何晓顺, 陈剑琳, 等. 肝组织 ICAM-1及LFA-1表达对急性排斥反应的诊断价值[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(1):37-40.
- [4] Ran JH, Zhang SN, Liu J, et al. Zhongguo Puwai Jichu yu Linchuang Zazhi. 2010, 17(7): 694-698.
冉江华, 张升宁, 刘静, 等. 恒河猴同种异体原位肝移植模型的改进[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2010, 17(7): 694-698.
- [5] Demetris A, Adams D, Bellamy C, et al. Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. An International Panel. *Hepatology.* 2000;31(3): 792-799.
- [6] Heemann UW, Tullius SG, Azuma H, et al. Adhesion Molecules and transplantation. *Ann Surg.* 1994;219(1):4-12.
- [7] Wildhain SM, Weiss M, Schulez CJ, et al. Systemic but not cardiac expression of P-selectin and ICAM-1 mediate coronary microcirculatory changes in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2001;20(2):197.
- [8] Wong J, Kubes P, Zhang Y, et al. Role of ICAM-1 in chronic hepatic allograft rejection in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283(1):G196-203.
- [9] Yu Y, Chen Z, Ye Q. The role of sICAM-1 detection in the diagnosis of acute rejection following liver transplantation. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2006;26(5):580-582.
- [10] Nakai K, Traynor FF, Isobe M. Time course and localization of intercellular adhesion molecule-1 induction in kidney allografts in mice. *Transplant Proc.* 1994;26(1):349-353.
- [11] Liu YL, Liu F, Sun JH. Zhonghua Gandan Waike Zazhi. 2004;10(5): 316-319.
刘玉兰, 刘峰, 孙君泓. 黏附分子在大鼠同种异体肝脏移植免疫反应中的作用[J]. 中华肝胆外科杂志, 2004, 10(5): 316-319.
- [12] Lautenschlager IT, Höckerstedt KA. ICAM-1 induction on hepatocytes as a marker for immune activation of acute liver allograft rejection. *Transplantation.* 1993;56(6):1495-1499.
- [13] Zhou J, Shao XJ, Shao CK. Zhongguo Ganzangbing Zazhi. 2009; 17(7):557-558.
周静, 邵雄杰, 邵春奎. 细胞黏附分子表达对人肝移植急性排斥反应的诊断价值[J]. 中国肝病杂志, 2009, 17(7):557-558.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 昆明市科技局重大项目(08S100304)。

作者贡献: 实验设计由冉江华、张升宁、刘静和李铸完成; 动物模型制作由冉江华、张升宁、刘静、李铸、吴淑媛、梁宇和张熙冰完成; 实验评估由冉江华、张升宁、刘静和李铸完成, 资料收集由张升宁、刘静和张熙冰完成, 冉江华、张升宁、刘静成文, 李立审核, 冉江华对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

本文创新性: 以“肝移植, 恒河猴; 细胞间黏附分子1, 急性排斥反; liver transplantation, Rhesus Monkey; Monkey, ICAM-1, Acute rejection”为关键词检索 CNKI 数据库、西文生物医学期刊文献数据库 2001/2011 文献, 未检索到恒河猴肝移植后细胞间黏附分子1与急性排斥反应的关系的相关文献。实验探讨恒河猴肝移植后急性排斥反应时细胞间黏附分子1与急性排斥反应的关系, 结果显示恒河猴肝移植后, 移植肝组织中细胞间黏附分子1与急性排斥反应有着一定的关系。