

文章编号:1005-6947(2007)08-0754-04

· 基础研究 ·

联合免疫治疗对肝移植大鼠移植肝组织学和 外周血 Th1/Th2 细胞因子的影响

刘骅, 吴志勇, 曹晖

(上海交通大学医学院附属仁济医院 普通外科, 上海 200127)

摘要:目的 用抗 CD-40L 单抗加小剂量 CsA 联合免疫治疗肝移植大鼠受体, 观察其生存时间、移植肝组织学和 Th1/Th2 细胞因子谱的变化。方法 建立大鼠肝移植模型后, 将动物随机分为 4 组。A 组为同基因移植组, SD→SD; B 组为同种异体移植组, SD→Wistar, 不用任何免疫抑制治疗措施; C 组, SD→Wistar, 采用 CsA 处理; D 组, SD→Wistar, 采用 CsA 加抗 CD-40L (CD-154) 单抗处理。观察各组肝移植受体生存期和移植肝病理变化; 用 ELISA 法检测外周血细胞因子水平。结果 A, D 组均可长期存活, B, C 组生存时间分别为 (13.8 ± 2.4) d, (29.8 ± 4.1) d; B, C 组病理组织切片见中/重度急性排斥反应, D 组移植肝组织损伤程度显著减轻, A 组基本无排斥反应。B 组血清 IL-2 和 IFN-γ 高于其余各组 ($P < 0.05$), C, D 组 IL-4, IL-10 水平较 B 组有所升高 (但 $P > 0.05$), 尤其 D 组 IL-10 表达水平显著高于 B 组 ($P < 0.05$)。结论 联合免疫治疗可有效抑制其急性排斥反应, 延长大鼠肝移植受体的生存时间。Th2 类细胞因子 IL-4 和 IL-10 的高水平表达与诱导移植耐受、抑制排斥反应有重要关系, 它有助于大鼠肝移植受体和移植肝的长期存活。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(8): 754-757]

关键词: 肝移植/免疫学; 肝/病理生理学; 抗 CD-40L 单抗; 环孢素 A (CsA); Th1/Th2 细胞因子; 大鼠
中图分类号: R 617; R 657.3 **文献标识码:** A

Effect of combined immune therapy on histology of allograft and Th1/Th2 cytokine profile in rat orthotopic liver transplantation

LIU Hua, WU Zhi-yong, CAO Hui

(Department of General Surgery, Affiliated Renji Hospital, Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China)

Abstract: Objective To study the effect of combined immune therapy with anti-CD40L mAb and low-dose cyclosporine (CsA) on the liver graft survival in rats, and Th1/Th2 cytokine profile. **Methods** Recipients were divided into the following groups. Group A: SD→SD rats, Group B: SD→Wistar rats without any treatment, Group C: SD→Wistar rats with CsA monotherapy from d1 to d5, Group D: SD→Wistar rats with CsA from d1 to d5 and anti-CD40L mAb in d0 and d2. The recipient survival and liver graft pathology observed. On post-transplant d7 ELISA technique was used to detect the level of cytokines in peripheral blood. **Results** The survival period of recipients in Group A and D was significantly longer than that in Group B and C. Mild to severe acute rejection reactions were observed in liver specimens from Group B and C while the degree of tissue injury in specimens from Group D was decreased significantly. The serum levels of IL-2 and IFN-γ in Group B were significantly higher than those in other groups. On the contrary, the serum level of IL-4 and IL-10 in Group D was elevated much more than that in Group B ($P < 0.05$). **Conclusions** The combined immune therapy can prolong graft survival and effectively suppress acute rejection in ROLT. High expression of Th2 cytokines is beneficial to long-term survival of recipients and graft.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(8): 754-757]

收稿日期: 2007-07-17; 修订日期: 2007-08-14。

作者简介: 刘骅, 男, 上海人, 上海交通大学医学院附属仁济医院主治医师, 主要从事肝胆及胃肠外科的基础与临床方面的研究。

通讯作者: 刘骅 E-mail: housman111@yahoo.com.cn

Key words: Liver Transplantation/immunol; Liver /physiopathol; Anti-CD40L mAb; Cyclosporine A (CsA); Th1/Th2 Cytokines; Rats

CLC number: R 617; R 657.3 **Document code:** A

通过阻断 T 细胞共刺激通路诱导移植免疫耐受性、控制移植物排斥反应,是肝移植研究中的热点。单独使用抗 CD-40L 单抗或与其他免疫抑制方案联用时,已证实能在啮齿类动物肾、心脏移植中诱导免疫耐受。本研究观察抗 CD-40L 单抗加小剂量短程环孢素 A (CsA) 对肝移植大鼠受体生存期的影响以及移植肝组织学的变化,并检测术后外周血中细胞因子的表达水平,旨在分析其与耐受诱导和急性排斥反应的关系。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与仪器设备

1.1.1 实验动物 供体为 SD 大鼠,雄性,230 ~ 250g,购自上海西普尔/必凯实验动物有限公司。受体为 SD 大鼠或 Wistar 大鼠,雄性,250 ~ 270g,分别购自上海西普尔/必凯实验动物有限公司和中科院上海实验动物中心。供体术前不禁食不禁水,受体术前禁食 12h,但不禁水。饲养环境温度保持在 22℃ 左右,湿度保持在 60% ~ 70%。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640 细胞培养液、红细胞裂解液、小牛血清、³H-TdR 等。(购自美国 Sigma 公司。)

CsA 针剂(50mg/mL),瑞士 Novartis 公司生产。抗 CD-40L (CD-154) 单抗:编号 C2548-84X,克隆编号 3H1902,1mg/mL (含 0.1% 叠氮钠),美国 Biological 公司生产。酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒:用于检测外周血白细胞介素 2 (IL-2)、 γ -干扰素 (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 4 (IL-4) 及白细胞介素 10 (IL-10) 水平,购自北京晶美生物工程有限公司。

1.1.3 主要设备 显微外科手术器械、层流洁净工作台、高速离心机、倒置显微镜、细胞培养箱、酶联检测仪等。

1.2 实验步骤

1.2.1 动物模型的建立和分组 采用改良 Kamada 二袖套法建立大鼠原位肝移植模型^[1]。成模后将大鼠分为 4 组。A 组(对照组):为同基因大鼠间移植,即 SD→SD。B 组(同种异体移植对照组):SD→Wistar,围手术期不用任何免疫抑制治疗措施。C 组:SD→Wistar,围手术期应用 CsA 第 1 天 ~ 第 5 天。D 组:SD→Wistar,围手术期应用

CsA 第 1 天 ~ 第 5 天加抗 CD-40L (CD-154) 单抗当天,第 2 天。

抗 CD-40L 单抗的应用在手术当天开始前和术后第 2 天,0.3mg 予受体大鼠以腹腔注射。CsA 的应用在术后第 1 天开始,剂量 1.5mg/(kg·d),予受体大鼠以皮下注射,每天 1 次,共计 5d。

1.2.2 生存期观察 记录受体大鼠术后生存时间;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分析之内。

1.2.3 移植肝组织学变化 各组大鼠在移植后第 7 天处死。开腹后首先观察移植肝的大小、色泽、质地及与周围组织的粘连情况,然后完整取出移植肝,剪切成适当大小组织块并制成石蜡块后常规切片,HE 染色,光镜下观察。

1.2.4 外周血 Th1/Th2 细胞因子测定 各组大鼠在移植后第 7 天通过断尾法取血获得血清约 200 μ L,用 ELISA 技术检测外周血细胞因子 IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 和 IL-10 水平。

2 结 果

2.1 肝移植术后生存时间

A, D 组均长期存活 (>60d), B 组为 (13.8 \pm 2.4) d, C 组为 (29.8 \pm 4.1) d (表 1)。

表 1 各组大鼠术后生存期比较

分组	免疫处理方案	例数	生存时间(d)	平均生存时间(d)
A	无	6	>60	>60
B	无	6	10,12,14,15,16,16	13.8 \pm 2.4 ^{1),2)}
C	CsA	6	24,28,31,31,33,35	29.8 \pm 4.1 ^{1),2)}
D	CsA + 抗 CD-40L	6	>60	>60

注: A, D 组大鼠在人处死前仍生存;1)与 A 组比, $P < 0.05$; 2)与 D 组比, $P < 0.05$

2.2 移植肝组织学变化

各组腹腔内均有不等量的淡红色腹水,尤其以 B, C 组腹水量较多。肝脏多与胃、大网膜、肠管等周围组织粘连。受体鼠肝脏有不同程度的肿大,其中 B 组肿胀尤为明显,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。A 组移植肝颜色鲜红、质地较为柔软。

B, C 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;小叶间静脉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。D组移植肝内组织损伤程度显著减轻。A组基本

无排斥反应,胆管、血管均保存完好,接近正常肝组织(图1-4)。

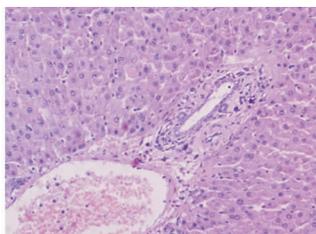


图1 A组(同基因对照组)术后移植肝组织学改变($\times 200$) 汇管区少量炎细胞浸润,胆管、血管均保存完好

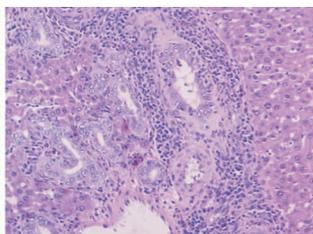


图2 B组(免疫排斥组)术后移植肝组织学改变($\times 200$) 汇管区广泛炎细胞浸润,小动脉壁明显炎细胞浸润,小动脉壁增厚、内皮细胞及泡沫状巨噬细胞增生

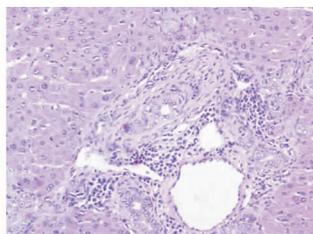


图3 C组(单用CsA组)术后移植肝组织学改变($\times 400$) 汇管区较多炎细胞浸润,小胆管增生、胆管上皮核空泡变,小静脉内皮细胞增生、炎细胞浸润

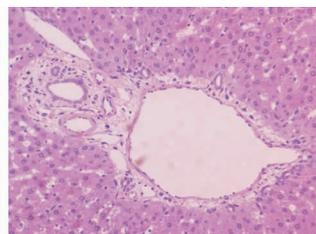


图4 D组(CsA加单抗组)术后移植肝组织学改变($\times 200$) 轻度汇管区炎症,淋巴细胞浸润减少,血管上皮或胆管上皮损伤也相对较轻

2.3 外周血 Th1/Th2 细胞因子水平的变化

B组血清IL-2及IFN- γ 水平显著高于其余各组($P < 0.05$),B组TNF- α 的表达水平高于C组和D组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。C、D组IL-4和IL-10的表达较B组均有所增加但无统计学意义($P > 0.05$);D组IL-10水平较B组显著增高($P < 0.05$)(表2)。

表2 ELISA法检测外周血细胞因子的水平(pg/mL , $\bar{x} \pm s$)

分组	A组	B组	C组	D组
IL-2	28.36 \pm 3.87 ¹⁾	82.47 \pm 11.23	69.24 \pm 8.25 ¹⁾	49.65 \pm 5.13 ¹⁾
IFN- γ	30.12 \pm 4.29 ¹⁾	91.63 \pm 10.24	75.28 \pm 8.14 ¹⁾	71.03 \pm 3.82 ¹⁾
TNF- α	45.62 \pm 5.17	71.72 \pm 8.35	67.63 \pm 6.42	68.52 \pm 4.29
IL-4	21.67 \pm 2.87	26.47 \pm 3.23	30.24 \pm 4.86 ²⁾	31.16 \pm 5.64 ²⁾
IL-10	19.86 \pm 2.13	31.24 \pm 4.36	35.61 \pm 3.47 ²⁾	42.98 \pm 5.81 ³⁾

注:1)与B组比较, $P < 0.05$; 2)与B组比较, $P > 0.05$; 3)与B组比较 $P < 0.05$

3 讨论

肝移植免疫抑制剂的应用,可有效地控制急性排斥反应,但不能有效控制慢性排斥反应,且长期应用时由于其免疫抑制的非特异性可发生机遇性感染、肿瘤和心血管疾病等并发症^[2-3]。通过不同途径诱导特异性免疫耐受成为肝移植研究中十分重要的课题。器官移植排斥的发病机制主要是T细胞介导的免疫应答,故阻断T细胞共刺激通路可能是促进抗原特异性耐受的有效方法^[4-5]。

本研究在建立大鼠肝移植稳定模型的基础上,采用抗CD-40L单抗加小剂量CsA的联合免疫治疗方案,获得了受体大鼠长期存活的结果。

移植免疫耐受诱导的基本原则是,在使用免疫抑制剂改变受体免疫功能状态的前提下,控制同种抗原递呈的途径和形式,以促使T细胞走向耐受^[6]。目前常用的免疫抑制剂,如CsA和FK-506等可阻断活化诱导的细胞死亡(activation induced cell death, AICD)。这是一重要的生理稳定机制。而其非特异性不能区分反应性T细胞及调节性T细胞的免疫抑制剂有可能阻断移植耐受的形成^[7-8]。文献报道,短程CsA在大鼠肝移植中抑制排斥而不影响耐受,小剂量、短程CsA结合单克隆抗体可能诱导移植耐受。但也有报道^[9]认为,CsA可对抗CD-40L或CTLA4Ig等所致的免疫耐受有抑制作用,但观点尚无定论。本研究采用抗CD-40L单抗加小剂量CsA的联合免疫治疗,结果显示:B组生存时间为(13.8 \pm 2.4)d,C组生存时间为(29.8 \pm 4.1)d,D组生存时间则显著延长,大于60d($P < 0.05$)。另外B、C组病理组织切片可见中-重度急性排斥反应,而D组移植肝内组织损伤程度显著减轻。提示CsA作为一种临床常用的免疫抑制药物,可以延长受体大鼠的生存时间,抑制急性排斥反应,而联用抗CD-40L单抗治疗后,同种异体移植鼠则能实现受体和移植肝的长期存活^[10]。

CD40-CD40L共刺激通路在T细胞介导的免疫应答反应中参与了T细胞的活化、增殖和分化。阻断CD40-CD40L共刺激通路可抑制Th1的分化,有利于Th1/Th2细胞因子谱向Th2类细胞因子平衡的偏移,有助于诱导移植耐受形成。因此对Th1/Th2细胞因子平衡偏移的研究具有重要的实验和临床意义^[11-12]。本研究采用ELISA技术测定肝移植受体大鼠外周血细胞因子的表

达水平,在细胞生物学水平上探讨不同免疫治疗方案对受体和移植肝的影响和作用机制。Th1 类细胞因子(IL-2, IFN- γ)的血清水平在 B 组显著高于其余各组($P < 0.05$), TNF- α 在 B 组高于不同免疫治疗组(但 $P > 0.05$)。Th2 类细胞因子(IL-4, IL-10)较 B 组均有所增加,尤其 D 组的 IL-10 的表达水平较 B 组显著增高($P < 0.05$)。结合前述的受体大鼠生存时间比较,笔者认为, Th2 类细胞因子的升高和 Th1 类细胞因子的抑制有利于移植免疫耐受的诱导和最终形成。

有学者认为, Th2 细胞因子并不能诱导免疫耐受,甚至可能与排斥反应有关,而 Th1 类细胞因子也可能在免疫耐受诱导中起一定作用^[13-14]。从临床实践角度看,虽然通过免疫调节抑制 Th1 细胞及其细胞因子可以减少急性排斥导致的移植物丧失,但也可能同时因促进 Th2 偏移而有利于慢性排斥的发展^[15]。此外,如能进一步证实 IFN- γ 等 Th1 类细胞因子早期产生对免疫耐受诱导具有重要意义,那么术后早期对其的阻断反而可能对移植物保持功能稳定和长期存活产生不利影响。Reding 等^[16]提出的肝移植“双重途径”模式认为,移植物可以通过某些免疫调节措施进入免疫耐受原性途径,但发生免疫激活是一个重要的前提条件。这一假说有助于进一步理解移植肝如何产生自发耐受或在高排斥组合中诱导耐受,任何免疫治疗措施都不应干扰甚至应强化这一特征。

本研究采用的联合免疫治疗,有效地抑制了急性排斥反应、延长了受体大鼠生存时间,诱导了免疫耐受的初步形成。今后本课题组将重点研究联合免疫治疗方案中各组分的最佳剂量、最佳实施途径和术后免疫状态的监测等问题。

参考文献:

- [1] 刘骅,曹晖,吴志勇,等. 改良二袖套法大鼠原位肝移植 180 例[J]. 消化外科, 2006, 5(1): 52-56.
- [2] Starzl TE, Murase N, AbuElmagd K, et al. Tolerance for immunosuppression in organ transplantation [J]. Lancet, 2003, 361(9368): 1502-1510.
- [3] 叶启发. 21 世纪肝移植现状及相关进展[J]. 中国普

- 通外科杂志, 2006, 15(7): 481-483.
- [4] Gassel HJ, Kauczok J, Martens N, et al. Tolerance induction following orthotopic rat liver transplantation: cytokine production by CD4+ T cells determines the immunological response [J]. Transplant-Proc, 2002, 34(5): 1429-1430.
- [5] Nakano T, Goto S, Lai CY, et al. Experimental and clinical significance of antinuclear antibodies in liver transplantation [J]. Transplantation, 2007, 83(8): 1122-1125.
- [6] Yang ZF, Ngai P, Lau CK, et al. Induction of long-term liver allograft survival by delayed immunosuppression is dependent on interleukin-10 [J]. Liver Transpl, 2007, 13(4): 571-578.
- [7] Bolton EM. Regulatory T cells in transplantation: natural or induced? [J]. Transplantation, 2005, 79(6): 643-645.
- [8] 谈景旺,江艺,杨甲梅,等. 细胞毒 T 淋巴细胞在异种肝移植急性排斥中的作用[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(9): 545-547.
- [9] Wiesner RH, Rakela J, Ishitani MB, et al. Recent advances in liver transplantation [J]. Mayo Clin Proc, 2003, 78(2): 197-210.
- [10] Monaco AP. Prospects and strategies for clinical tolerance [J]. Transplant Proc, 2004, 36(1): 227-231.
- [11] Nakano T, Kawamoto S, Lai CY, et al. Characterization of immunosuppressive factors expressed in serum by rat tolerogenic liver transplantation [J]. Transplant Proc, 2005, 37(1): 80-81.
- [12] Cobbold SP, Graca L, Lin CY, et al. Regulatory T cells in the induction and maintenance of peripheral transplantation tolerance [J]. Transpl Int, 2003, 16(2): 66-75.
- [13] Koshiba T, Kitade H, Van Damme B, et al. Regulatory cell-mediated operational tolerance does not protect against chronic rejection [J]. Transplantation, 2003, 76(3): 588-596.
- [14] Degauque N, Lair D, Braudeau C, et al. Differentiation of CD25-regulatory T cells in long term survivors rats following donor-specific transfusion (DST) in rats [J]. Am J Transplant, 2004, 4(Suppl 8): 262-271.
- [15] 赵刚,王芳,王春友,等. 免疫缺陷树突状细胞诱导异种胰岛细胞移植耐受[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(5): 347-350.
- [16] Reding R, Davies H. Revisiting liver transplant immunology: from the concept of immune engagement to the dualistic pathway paradigm [J]. Liver Transpl, 2004, 10(9): 1081-1086.