

## 同期输注供者地塞米松诱导脾细胞对肝移植大鼠免疫影响

器官移植极为重要的问题是受体对供体器官的排斥反应。尽管肝移植有其特殊性[1][2][3][4][5][6][7]，但其排斥反应仍然是困惑临床医学家和免疫学家的问题。因此近年来免疫耐受成为器官移植免疫研究的热点之一，它有重要的临床意义。我们前面的实验用处理供者的细胞预输注受体能诱导大鼠肝移植免疫耐受[8]。为探索在肝移植同时输注经地塞米松处理的供者脾细胞对移植免疫的影响，进行了本实验。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 供、受体购自中山大学实验动物中心及第一军医大学实验动物中心，为清洁级封闭群雄性Wistar、SD，体质量220~280 g。供体体质量等于或略低于受体。术前禁食12 h，术前15~30 min皮下注射阿托品(0.04 mg/kg·b.w.)、禁水。

1.1.2 实验器材 显微器械手术包，中号哈巴狗钳，由上海手术医疗器械厂生产；7-0、8-0及9-0无损伤手术缝线，由上海医用缝合线厂生产；用中山市塑料制品厂生产的棉棒制成门静脉套管及肝下腔静脉套管。用浙江嘉兴市苏嘉医疗器械厂生产的一次性硬膜外麻醉导管制成胆管支架管。

1.1.3 麻醉剂 乙醚溶液由广东汕头西陇化工厂生产。

1.1.4 主要实验试剂 地塞米松磷酸钠注射液(地塞米松，Dex)由武汉滨湖鹤药业有限责任公司生产。

#### 1.2 方法

1.2.1 麻醉 将大鼠放入装有乙醚的干燥箱中，待麻醉完全后取出，用已将乙醚加入装有纱布的一次性离心管套在大鼠头部开放式吸入麻醉。

1.2.2 大鼠肝移植的方法 用改良 Kamada法进行大鼠肝移植，建立稳定的Wistar大鼠到SD大鼠肝移植模型后进行正式实验。

1.2.3 地塞米松处理方法 相应组的Wistar大鼠每只每天8时经腹腔注射地塞米松 $3 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{b.w.}$ ，共3 d，第4天取脾。

1.2.4 取脾、输脾细胞的时间 输脾细胞组，供体开腹后先切取脾脏，分离脾细胞制成脾细胞悬液，在肝上下腔静脉吻合完毕，使供肝开始恢复血流受体门静脉开放后30 min，经受体阴茎背静脉输脾细胞悬液。

1.2.5 脾细胞制备 常规方法分离脾细胞后，调整细胞浓度为 $5 \times 10^7/\text{ml}$ ，制成1 ml脾细胞悬液。台盼兰染色后确定细胞活力在95%以上。

1.2.6 实验分组 将大鼠随机分4组，每组Wistar供鼠、SD受鼠各10只。A组：对照组：供、受体鼠无特殊处理，行肝移植手术。B组：单纯供者地塞米松处理组(Dex)，供体鼠在肝移植手术前3 d地塞米松处理。C组：单纯脾细胞处理组(SPC)，受体鼠在肝移植手术同时经阴茎背静脉输注未经地塞米松处理的供体脾细胞悬液( $5 \times 10^7/\text{ml}$ )1 ml。D组：地塞米松体内处理的脾细胞组(Dex-SPC)：供体鼠在肝移植手术前3 d地塞米松处理，受体鼠在肝移植手术同时经阴茎背静脉输注供体地塞米松体内处理后的供体脾细胞( $5 \times 10^7$ 个)。

1.2.7 观察指标 肝功能测定：A、B、C、D组及未手术的SD组(Blank组)大鼠术后1周采静脉血测定血

清丙氨酸氨基转移酶(ALT)及血清总胆红素(TBil);组织病理学检查:A、B、C、D组鼠术后1周取肝脏据Williams等[9]分级,光镜下观察,急性排斥反应的程度;存活时间。

1.2.8 统计学处理方法 数据由SPSS10.0软件进行统计学处理。ALT值多组间比较采用完全随机方差分析,SNK法分析组间差异性;TBil 值的多组间比较用非参数检验的多组秩和检验(Kruskal-Willis H法);生存分析用乘积极限法(Kaplan-Meier法)作生存曲线,用log-rank 等进行显著性检验。

## 2 结果

Dex-SPC组中1例因门静脉左支有小孔致腹腔内出血肝移植术当天死亡,Dex组、SPC组、Dex-SPC组及Blank组各有1只大鼠的未能成功地取出尾静脉血。

### 2.1 肝功能测定

2.1.1 ALT 的结果 经软件分析发现ALT 的资料满足方差分析的条件,经方差分析, $P<0.001$ ,说明各组ALT 值差异有显著性意义,多重比较结果见表1。说明Dex-SPC 组比未手术组、对照组、Dex组、SPC组ALT 的高,以Dex-SPC组最高,未手术组最低,SPC组比未手术组、对照组、Dex组的ALT值高也有显著性意义。

2.1.2 TBil 的结果 经分析见TBil的资料方差不齐,也不服从正态分布,故用非参数分析,结果见表1。可以认为各组的TBil值的明显不同,差异有显著性意义。由表1可知Dex-SPC组明显高于其它组,SPC组明显高于未手术组、对照组、Dex组。

表1 各组大鼠肝移植术后1周血清肝功能

Tab.1 ALT and TBil in recipient rats in each group 1 week after liver transplantation

Group	n	ALT(IU/L)			TBil( $\mu$ mm/L)		
		Mean $\pm$ SD	95%Confidence interval		Mean $\pm$ SD	95% Confidence interval	
Control	10	259.0	138.1	161.1~358.7	17.4	13.7	7.6~27.2*
Dex	9	293.9	94.9	220.9~366.8	29.3	18.0	15.4~43.2*
SPC	9	433.8	123.2	339.1~528.5 <sup>△</sup>	51.7	23.4	33.7~69.7*
Dex-SPC	8	717.0	178.5	567.8~866.2*	90.2	25.3	69.1~111.4*
Blank	9	201.1	60.3	154.8~247.5	3.0	2.4	1.2~4.8*

\* $P<0.05$  vs control, Dex, SPC; <sup>△</sup> $P<0.05$  vs control, Dex; \* $P<0.01$  vs control, Dex, SPC, Dex-SPC, blank  
ALT: Alanine transaminase; TBil: Total bilirubin; Dex: The group treated with dexamethasone; SPC: The group treated with spleen cells; Dex-SPC: The group treated with dexamethasone and splee cells

### 2.2 存活时间

手术原因死亡的1例未纳入统计分析。各组大鼠肝移植术后的存活情况见表2,生存曲线见图1,整体比较差异有显著性意义( $P<0.05$ ),D组较A、B组存活时间明显缩短( $P<0.05$ )。

### 2.3 组织病理学检查

移植术后1周,Control组(图2)呈急性轻度排斥反应。Dex组(图3)呈急性中度排斥反应。SPC组(图4)和Dex-SPC组(图5)均呈急性重度排斥反应,SPC组(图4)的肝细胞的片状坏死较Dex-SPC组(图5)少、范围小。

表 2 各组大鼠肝移植术后存活情况

Tab.2 Survival period after liver transplantation in each group

Group	n	Survival period (d)	Mean (d)
Control	10	11,18,40,47,>70(x2),>71(x2),>96,>97	69.8
Dex	10	9,15,18,26,29,>38,>68,,>69,>87,>99	56.2
SPC	10	10,13,14,15,29,40,47,>37(x2),>38	29.9
	1	0.5 (death for surgical reasons),	15.3
Dex-SPC	+	10,11,12,13,15,16,17,>18,>22	
	9		

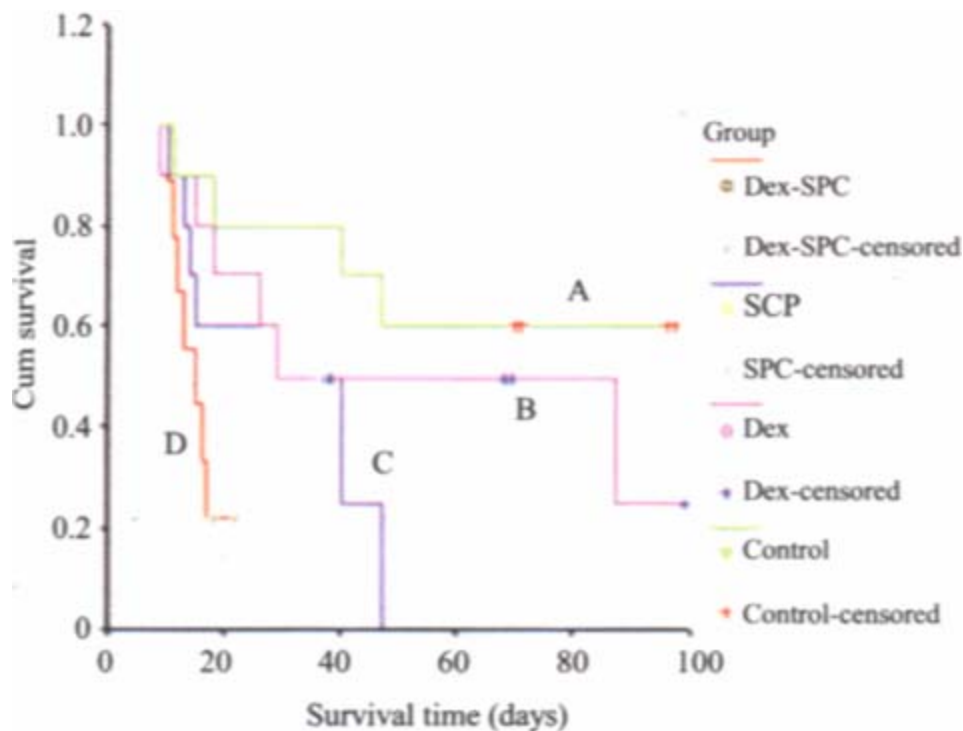


图1 各组大鼠肝移植术后生存曲线图

Fig.1 Curve of the recipient survival time after liver transplantation in each group  
Pooled over strata(P<0.05); Pairwise over strata, D vs A, B(P<0.05)

A: Control group; B:The group treated with dexamethasone; C: The group treated with spleen cells; D: The group treated with dexamethasone and spleen cells

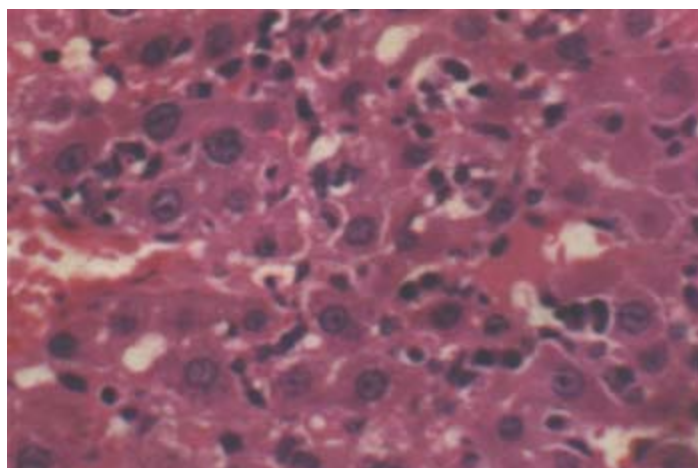


图2 肝移植术后1周，对照组呈急性轻度排斥反应(HE，原放大倍数：×132)

Fig.2 Histopathology in control group showing light acute rejection 1 week after orthotopic liver transplantation(OLT) (HE, original magnification:  $\times 132$ )

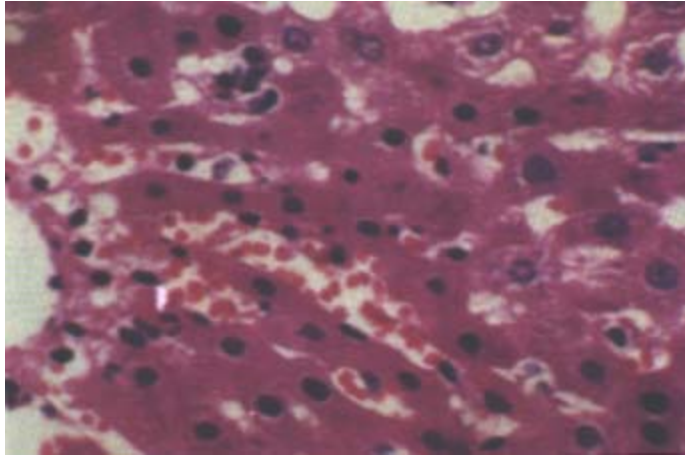


图3 肝移植术后1周, Dex组呈2级即急性中度排斥反应(HE, 原放大倍数:  $\times 132$ )

Fig.3 Histopathology in Dex group showing moderate acute rejection 1 week after OLT (HE, original magnification:  $\times 132$ )

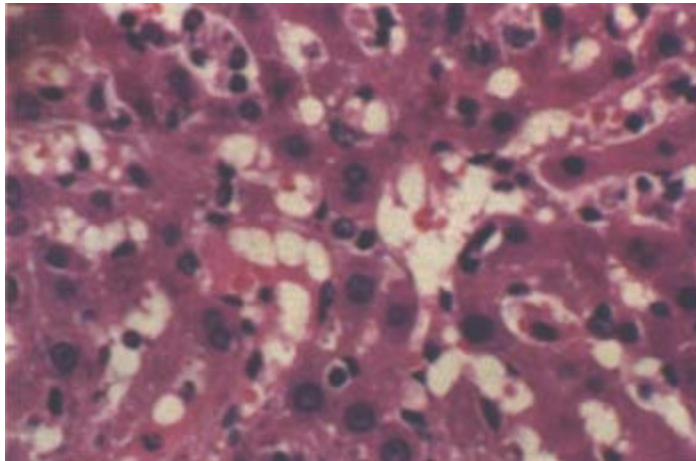


图4 肝移植术后1周, SPC组呈急性重度排斥反应, 肝细胞的片状坏死较少、范围小(HE, 原放大倍数:  $\times 132$ )

Fig.4 Histopathology in SPC group showing serious acute rejection 1 week after OLT, with less extensive hepatocyte necrosis (HE, original magnification:  $\times 132$ )

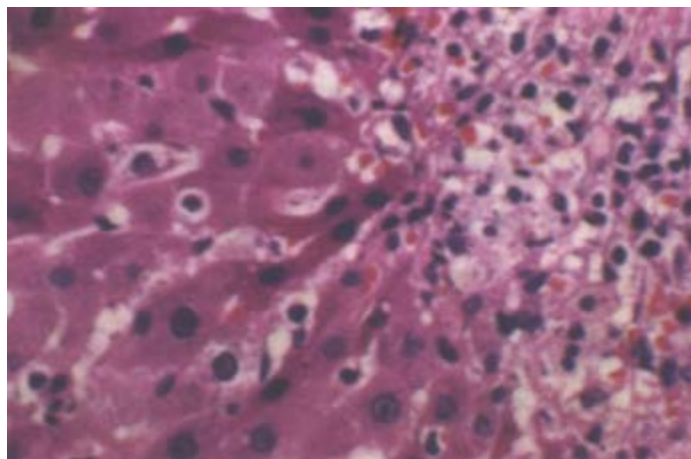


图5 肝移植术后1周, Dex-SPC组呈急性重度排斥反应, 肝细胞的片状坏死较多、范围大(HE, 原放大倍数:  $\times 132$ )

Fig.5 Histopathology in Dex-SPC group showing serious acute rejection 1 week after OLT, with less extensive hepatocyte necrosis (HE, original magnification:  $\times 132$ )

### 3 讨论

#### 3.1 大鼠肝移植同时输注地塞米松处理的供者脾细胞, 促进受者对供肝排斥反应发生

用供体抗原预处理受体, 可导致从免疫反应增强到无免疫反应等不同结果。供体肝源性树突状细胞(dendritic cell, DC)前体细胞体外扩增后注入受者体中可明显延长同种异系胰岛、心脏和皮肤移植物存活时间, 证明用供体抗原预处理受体可能诱导免疫耐受。预先特异性输注供体骨髓、脾细胞可以促进同种异体移植物的存活时间延长。Starzl[10]用微嵌合来解释这一现象, 认为供体抗原预处理受体可能诱导了嵌合状态, 使同种异体肝移植的存活时间明显延长。我们前面的实验显示用地塞米松体内处理后的供者脾细胞预输注诱导大鼠肝移植免疫耐受[8], 分析得出一观点: 肝脏是特异性地吞噬凋亡细胞的场所, 凋亡细胞有局部免疫抑制作用, 吞噬了凋亡细胞的肝脏抗原提呈细胞在局部免疫抑制的环境下提呈抗原给T细胞, 而诱导了对被吞噬抗原的免疫耐受[4]。

从ALT、TBil、病理切片、生存时间分析结果反映出肝移植同时输注供者脾细胞促进受体对移植肝排斥反应, 肝移植同时输注地塞米松处理的供者脾细胞明显促进受体对移植肝排斥反应。提示同期输注供者淋巴细胞诱导肝移植免疫耐受的可能性小。出现肝移植同时输注供者处理或未处理的脾细胞促进排斥反应的原因可能是: (1) 虽然肝脏的巨噬细胞数量占前身的80%[11], 但供肝经热缺血、冷缺血复流后, 产生缺血再灌注损伤后, 肝脏的巨噬细胞受损, 其功能不全或其数量不足, 不能及时清除凋亡细胞, 未被清除凋亡细胞产生继发性坏死而释放活化DC的信号, 使DC成熟而产生免疫应答反应[12][13][14]。(2) 据Matzinger[15]危险信号学说, 供肝经热缺血、冷缺血复流后, 产生缺血再灌注损伤, 对受体已产生一定程度的危险信号, 同时输注输注地塞米松处理的供者脾细胞悬液。尽管此悬液坏死细胞数小于5%, 但其有35%的细胞发生凋亡[8]。再次产生一个危险信号, 从而导致危险信号过强, 受体的DC等抗原提呈细胞会吞噬包括凋亡细胞在内的供体的脾细胞, 进行抗原提呈, 同时提供共刺激分子, 加剧了排斥反应。(3) 肝移植同时输注供者的处理或未处理的脾细胞悬液引起的免疫应答的程度, 可能远远超过单纯行肝移植引起免疫应答的程度。前者包含供者DC的脾细胞悬液很快通过血液循环分布受者全身, 激活全身的免疫器官引起免疫应答; 而后者需受者的免疫细胞循环至移植肝或移植肝中的可溶性抗原释放到血液中引起免疫应答。

#### 3.2 对照组Wistar到SD肝移植大鼠生存时间较文献[8][16]长对实验结果影响的分析

在上述四组肝移植实验完成后, 另外购买同一单位的清洁级封闭群Wistar、SD大鼠, 进行与对照组相同方法的肝移植, 共7次, 生存时间(平均: 11.1 d, 未发表的资料)与本实验对照组生存时间(平均: 69.8 d)比明显短( $P < 0.01$ ); 与汪爽[8]的Wistar到SD大鼠肝移植的对照组生存时间(均数10.8 d)相比无显著性差异( $P > 0.05$ )。据此推测可能是本实验的四组用的SD大鼠在繁殖过程中发生基因突变[17], 或引入了Wistar的基因或与Wistar相近的基因。虽然本实验对照组的生存时间较文献明显长, 但由于用于实验的各组Wistar大鼠、SD大鼠分别购自同一批动物, 并且对实验动物随机化分组, 同时A组病理也显示排斥反应。因此排除了因实验动物的差异对实验结果的影响。

致谢: 感谢珠江医院中心实验室车小燕教授和动物中心汤事能教授的大力协助

参考文献:

[1] Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, et al. Cell migration, chimerism, and acceptance[J]. Lancet, 1992, 339(27):1579-82.

[2] Bishop GA, Sun J, Sheil AG, et al. High dose /activation associated tolerance: a mechanism for allograft tolerance[J]. Transplantation, 1997, 64(10): 1377-82.

[3] Krams SM, Martinez OM. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in liver allograft rejection[J]. Semin Liver Dis, 1998, 18(2): 153-67.

[4] Sun EW, Shi YF. Apoptosis: the death silences the immune system[J]. Pharmacol Therapeutics, 2001, 92(2-3): 135-45.

[5] Qian S, Lu L, Fu F, et al. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction[J]. J Immunol, 1997, 158(10): 4654-61.

[6] Thomson AW, Drakes ML, Zahorchak AF, et al. Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation[J]. J Leukoc Biol, 1999, 66(2): 322-30.

[7] Thomson AW, Lu L. Are dendritic cells the key to the liver trans-plant tolerance[J]? Immunol Today, 1999, 20(1): 27-32.

[8] 汪 爽. 地塞米松体内处理后的供者脾细胞预输注诱导大鼠肝移植免疫耐受的实验研究[D]. 第一军医大学硕士学位论文: 第一军医大学, 2001. 21-32.

Wang SH. Experimental study on tolerance induction of rat liver transplantation by transfusion of spleen cells from in vivo dexamethasone-treated donor rats[D]. Master academic degree papers of First Military Medical University: First Mil Med Univ, 2001. 21-32.

[9] Williams JN, Peters TG, Vera SR, et al. Biopsy-directed immunosuppression following hepatic transplantation[J]. Transplantation, 1985, 39(6): 389-96.

[10] Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, et al. The lost chord: microchimerism and allograft survival[J]. Immunol Today, 1996, 17(12): 577.

[11] Phillips MJ, Poucell S, Patterson J, et al. The normal liver[A]. In: Phillip S, Patterson J, Valencia P, eds. The liver: an atlas and text of ultrastructural pathology [M]. New York: Raven Press, 1987. 1-32.

[12] Rovere P, Sabbadini MG, Vallinoto C, et al. Delayed clearance of apoptotic lymphoma cells allows cross-presentation of intracellular antigens by mature dendritic cells[J]. J Leukoc Biol, 1999, 66(2): 345-9.

[13] Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells[J]. Nat Med, 1999, 5(11): 1249-55.

[14] Sturat L M, Lucas M, Simpson C, et al. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation[J]. J Immunol, 2002, 168(4): 1627-35.

[15] Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family[J]. Annu Rev Immunol, 1994, 12: 991-1045.

[16] 杜 智, 宋继昌, 张志尧, 等. 大鼠胸腺内移植供体脾细胞使移植肝长期存活的实验研究[J]. 中华器官移植杂志, 1996, 17(2): 80-2.

Du Z, Song JC, Zhang ZX, et al. Hepatic allograft survival in rats without immunosuppressants after intrathymic splenocyte transplantation[J]. Chin J Transplant, 1996, 17(2): 80-2.

[17] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000. 30-4.

#### 参考文献:

[1] Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, et al. Cell migration, chimerism, and acceptance[J]. Lancet, 1992, 339(27):1579-82.

[2] Bishop GA, Sun J, Sheil AG, et al. High dose /activation associated tolerance: a mechanism for allograft tolerance[J]. Transplantation, 1997, 64(10): 1377-82.

[3] Krams SM, Martinez OM. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in liver allograft rejection[J]. Semin Liver Dis, 1998, 18(2): 153-67.

[4] Sun EW, Shi YF. Apoptosis: the death silences the immune system[J]. Pharmacol

Therapeutics, 2001, 92(2-3): 135-45.

[5] Qian S, Lu L, Fu F, et al. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction[J]. J Immunol, 1997, 158(10): 4654-61.

[6] Thomson AW, Drakes ML, Zahorchak AF, et al. Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation[J]. J Leukoc Biol, 1999, 66(2): 322-30.

[7] Thomson AW, Lu L. Are dendritic cells the key to the liver trans-plant tolerance[J]? Immunol Today, 1999, 20(1): 27-32.

[8] 汪 爽. 地塞米松体内处理后的供者脾细胞预输注诱导大鼠肝移植免疫耐受的实验研究[D]. 第一军医大学硕士学位论文: 第一军医大学, 2001. 21-32.

Wang SH. Experimental study on tolerance induction of rat liver transplantation by transfusion of spleen cells from in vivo dexamethasone-treated donor rats[D]. Master academic degree papers of First Military Medical University: First Mil Med Univ, 2001. 21-32.

[9] Williams JN, Peters TG, Vera SR, et al. Biopsy-directed immunosuppression following hepatic transplantation[J]. Transplantation, 1985, 39(6): 389-96.

[10] Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, et al. The lost chord: microchimerism and allograft survival[J]. Immunol Today, 1996, 17(12): 577.

[11] Phillips MJ, Poucell S, Patterson J, et al. The normal liver[A]. In: Phillip S, Patterson J, Valencia P, eds. The liver: an atlas and text of ultrastructural pathology [M]. New York: Raven Press, 1987. 1-32.

[12] Rovere P, Sabbadini MG, Vallinoto C, et al. Delayed clearance of apoptotic lymphoma cells allows cross-presentation of intracellular antigens by mature dendritic cells[J]. J Leukoc Biol, 1999, 66(2): 345-9.

[13] Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells[J]. Nat Med, 1999, 5(11): 1249-55.

[14] Sturat L M, Lucas M, Simpson C, et al. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation[J]. J Immunol, 2002, 168(4): 1627-35.

[15] Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family[J]. Annu Rev Immunol, 1994, 12: 991-1045.

[16] 杜 智, 宋继昌, 张志尧, 等. 大鼠胸腺内移植供体脾细胞使移植肝长期存活的实验研究[J]. 中华器官移植杂志, 1996, 17(2): 80-2.

Du Z, Song JC, Zhang ZX, et al. Hepatic allograft survival in rats without immunosuppressants after intrathymic splenocyte transplantation[J]. Chin J Transplant, 1996, 17(2): 80-2.

[17] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000. 30-4.