

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

刘静¹ 高毅¹ 孙尔维¹ 张 志¹ 王 爽¹ 钟世镇² 第一军医大学珠江医院器官移植科, 广东广州 510282
² 第一军医大学临床解剖学研究所, 广东广州 510515

摘要 目的 探讨肝移植同时输注地塞米松体内诱导凋亡的供体脾细胞对受体肝移植免疫的影响。方法 实验分为对照组、单纯供体地塞米松处理组、单纯输注供者脾细胞组和地塞米松诱导供者凋亡脾细胞输注组。每组 Wistar 和 SD 大鼠各 10 只。用 3 mg/kg b.w. 地塞米松处理 Wistar 大鼠 3 d 后, 第 4 天行大鼠肝移植。观察术后第 7 天肝功能 (ALT)、血清总胆红素 (TBil) 的变化、病理改变和受体生存期。结果 肝移植同时输注凋亡细胞组和单纯输注脾细胞组的谷氨酸转氨酶 (ALT)、血清总胆红素 (TBil) 较对照组和单纯地塞米松处理组显著升高 ($P < 0.05$)。生存期明显缩短 ($P < 0.05$)。病理改变呈急性重度排斥反应。而对照组仅呈急性轻度排斥反应。结论 肝移植同时输注地塞米松体内诱导供体凋亡的脾细胞促进受体对移植肝的排斥反应。凋亡细胞未被及时吞噬可能是引起排斥反应的重要原因。

关键词 地塞米松; 凋亡细胞; 肝移植; 谷氨酸转氨酶; 胆红素; 排斥反应

中图分类号 R979.5 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2003)12-1249-04

Immunological effects of simultaneous injection of dexamethasone-induced apoptotic donor spleen cells in rats with liver transplantation

LIU Jing¹, GAO Yi¹, SUN Er-wei¹, ZHANG Zhi¹, WANG Shuang¹, ZHONG Shi-zhen²

¹Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Institute of Clinical Anatomy, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the immunological effects of simultaneous injection of apoptotic donor spleen cells induced by dexamethasone in rats with liver allotransplantation. Methods Four groups of rats were used in this study, each consisting of 10 SD rats and 10 Wistar rats with the former as the recipients and the latter as the donors for liver transplantation. In one of the groups, the recipient rats also received infusion of apoptotic spleen cells (5×10^7) of the donors induced by an intraperitoneal injection of dexamethasone (at a daily dose of 3 mg/kg) for 3 days before liver transplantation, while in another, the recipient received untreated donor spleen cells. In the third group, the donor was treated with dexamethasone leaving the last group serving as the control group. The blood alanine transaminase (ALT), total bilirubin (TBil), pathological changes of the graft and survival time of the recipients were observed. Results The recipients with apoptotic donor spleen cell infusion had much higher ALT and TBil levels than those of the other 3 groups ($P < 0.05$), exhibiting significantly shortened survival time and severer acute allograft rejection, as compared with the mild acute rejection in the control group ($P < 0.01$). Conclusion Simultaneous injection of apoptotic donor spleen cells induced by dexamethasone in rats with liver transplantation aggravates acute allograft rejection, one of the possible mechanisms of which may lie in the failure of timely removal of the apoptotic cells that release inflammatory factors.

Key words: dexamethasone; cell apoptosis; liver transplantation; alanine transaminase; total bilirubin

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]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^[2]。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。均为清洁级封闭群雄性 Wistar 大鼠。体重 220~280 g。供体体重等于或略低于受体。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 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

收稿日期 2003-06-19

基金项目 国家自然科学基金 9970705

Supported by National Natural Science Foundation of China 9970705

作者简介 刘静 1967- 男 湖北大悟人 1990 年毕业于第三军医大学 主任医师 在读博士 主要从事肝胆外科的临床和基础研究 电话 20-61365712 电邮: ljdoctor@hotmail.com

通讯作者: 高毅 教授 博士生导师 第一军医大学珠江医院器官移植科 电话 20-61643402 电邮: gaoyi6146@163.com

移植术后 1 周袁Control 组渊图 2冤呈急性轻度排斥反应遥Dex 组渊图 3冤呈急性中度排斥反应遥SPC 组渊图 4冤和 Dex-SPC 组渊图 5冤均呈急性重度排斥反应袁SPC 组渊图 4冤的肝细胞的片状坏死较 Dex-SPC 组渊图 5冤少 尧范围小遥

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(伊),>71(伊),>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(伊),>38	29.9
	1	0.5 (death for surgical reasons),	15.3
Dex-SPC	+	10,11,12,13,15,16,17,>18,>22	
	9		

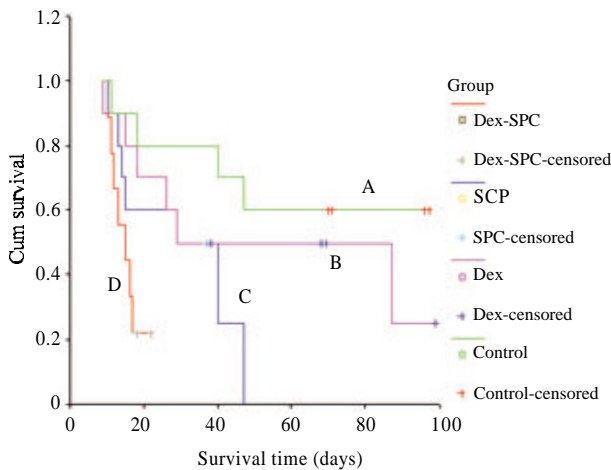


图 1 各组大鼠肝移植术后生存曲线图

Fig.1 Curve of the recipient survival time after liver transplantation in each group

Pooled over strata渊<0.05冤Pairwise over strata, D vs A, B渊<0.05冤

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

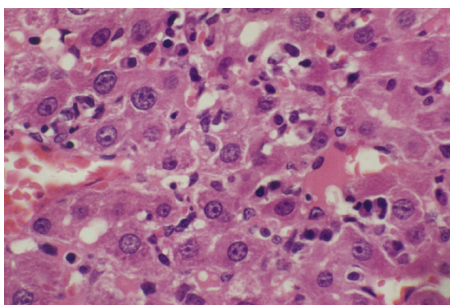


图 2 肝移植术后 1 周袁对照组呈急性轻度排斥反应渊E,原放大倍数渊伊冤32冤

Fig.2 Histopathology in control group showing light acute rejection 1 week after orthotopic liver transplantation(OLT) (HE, original magnification: 伊32)

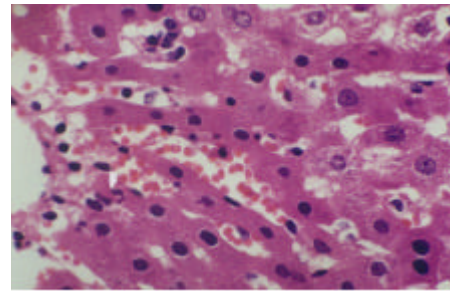


图 3 肝移植术后 1 周袁Dex 组呈 2 级即急性中度排斥反应渊E,原放大倍数渊伊冤32冤

Fig.3 Histopathology in Dex group showing moderate acute rejection 1 week after OLT (HE,original magnification: 伊32)

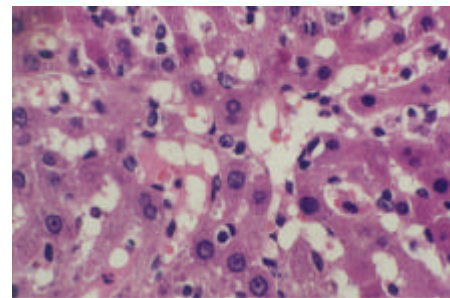


图 4 肝移植术后 1 周袁SPC 组呈急性重度排斥反应渊肝细胞的片状坏死较少 尧范围小渊E,原放大倍数渊伊冤32冤

Fig.4 Histopathology in SPC group showing serious acute rejection 1 week after OLT, with less extensive hepatocyte necrosis (HE,original magnification: 伊32)

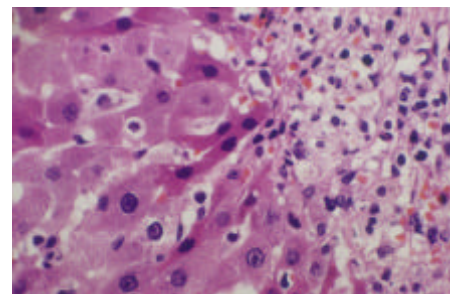


图 5 肝移植术后 1 周袁Dex-SPC 组呈急性重度排斥反应袁肝细胞的片状坏死较多 尧范围大渊E,原放大倍数渊伊冤32冤

Fig.5 Histopathology in Dex-SPC group showing serious acute rejection 1 week after OLT, with less extensive hepatocyte necrosis (HE, original magnification: 伊32)

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袁促进受者对供肝排斥反应发生

用供体抗原预处理受体袁可导致从免疫反应增强到无免疫反应等不同结果遥供体肝源性树突状细胞渊dendritic cell冤和C前体细胞体外扩增后注入受体体中可明显延长同种异系胰岛尧心脏和皮肤移植存活时间袁证明用供体抗原预处理受体可能诱导免疫耐受遥预先特异性输注供体骨髓尧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。^[11]分析得出观点：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。诱导了对被吞噬抗原的免疫耐受。^[12]

从 ALT 尧 Bil 尧病理切片尧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。虽然肝脏的巨噬细胞数量占前身的 80%。但供肝经热缺血尧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。^[13-14]据 Matzinger^[15]危险信号学说。肝经热缺血尧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。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。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。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^[16]增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 尧 SD 大鼠。进行与对照组相同方法的肝移植。共 7 次。生存时间。均院 1.1 d。发表的资料。与本实验对照组生存时间。均院 9.8 d。明显短。渊 < 0.01。冤与汪爽^[16]的 Wistar 到 SD 大鼠肝移植的对照组生存时间。渊均数 10.8 d。冤相比无显著性差异。渊 > 0.05。冤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。或引入了 Wistar 的基因或 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 大鼠尧 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。

致谢院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

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

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

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

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

咱暂 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. 咱暂 J Immunol, 1997, 158(10): 4654-61.

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

咱暂 Thomson AW, Lu L. Are dendritic cells the key to the liver transplant tolerance. 咱暂 Immunol Today, 1999, 20(1): 27-32.

咱暂 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. 咱暂 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. 咱暂 Master academic degree papers of First Military Medical University: First Mil Med Univ, 2001. 21-32.

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

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

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

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

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

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

咱暂 Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. 咱暂 Annu Rev Immunol, 1994, 12: 991-1045.

咱暂 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. 咱暂 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. 咱暂 Chin J Transplant, 1996, 17(2): 80-2.

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