



环孢霉素和供体脾细胞门静脉接种延长小鼠心脏移植存活

已有研究证实,同种异系抗原预先经门静脉接种可诱导受体产生对该抗原的特异性免疫抑制,使随后接受的器官移植存活时间延长[1]。新一代免疫抑制剂如环孢霉素A(CsA)可有效抑制同种异系动物间器官移植后引起的排斥反应,延长移植存活时间[2]。本研究旨在探讨小剂量CsA对同种异系抗原门静脉接种延长心脏移植存活时间的协同作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂

雌性BALB/C、NIH/q、C57BL/6小鼠,8~10周龄,体质量20~25 g;出生24 h内的NIH/q小鼠,普通级。上述动物购自第二军医大学实验动物中心。CsA口服液为杭州华东制药厂产品。

1.2 脾细胞的分离

无菌条件下取出NIH/q、C57BL/6小鼠脾脏,剪碎后经不锈钢网过滤, NH_4Cl 溶液处理去除红细胞, Hanks液中洗涤后离心,调整细胞浓度为 $2 \times 10^{10}/\text{L}$ 。

1.3 脾细胞门静脉接种和腔静脉接种方法

BALB/C小鼠用0.7%(质量分数)的戊巴比妥钠按0.05 mg/kg·b.w.腹腔注射麻醉,腹壁消毒后切开。向左侧翻开小肠,暴露肠系膜上静脉或下腔静脉,用5号针头穿刺注入0.5 ml分离的小鼠脾细胞($2 \times 10^7/\text{ml}$),然后迅速拔出针头,盐水纱球压迫1~2 min,止血后,关闭腹腔。

1.4 耳后心脏移植术[1]

BALB/C小鼠麻醉后,耳廓消毒,于耳廓背侧中线之下1/3处作一3~4 mm的横切口,勿损伤耳廓静脉。持眼科剪向耳尖方向钝性分离皮下组织,使成一3~4 mm的囊腔。新生供鼠经皮肤消毒后,剖胸摘取心脏,离体心脏置于无菌Hanks液内搏动1~2次,以排空心腔内余血。持眼科镊将移植体轻柔地填入受鼠耳后移植床内,切口缝合一针。用手指轻按局部,使移植体与移植床之周围组织贴紧。

1.5 结果判断

自术后第6天起,每天记录移植心脏的心电图。凡术后第8天尚不能测出心电图的,以后也不会有心电活动,定为移植手术失败。在手术成功者中,将心电图上心电活动消失时定为排斥反应的终点。

1.6 实验分组

A组(n=7):单纯心脏移植作为对照组;B组(n=9):心脏移植前1周,预先用与供体小鼠同品系的NIH/q小鼠脾细胞 $10^7/0.5\text{ml}$ 行受体鼠门静脉接种;C组(n=6):门静脉接种方法同B组,门静脉接种后当天至心脏移植后5 d喂CsA(4 mg/kg·b.w.);D组(n=6):单纯以CsA(4 mg/kg·b.w.)于心脏移植后当天至心脏移植后5 d喂服;E组(n=5):心脏移植前1周,预先用与供体鼠同系的NIH/q小鼠脾细胞 $10^7/0.5\text{ml}$ 行受体鼠腔静脉接种;F组(n=6):腔静脉接种方法同E组,腔静脉接种后当天至心脏移植后5 d喂CsA(4 mg/kg·b.w.);G组(n=7):C57BL/6小鼠脾细胞($2 \times 10^7/\text{ml}$) 0.5 ml行受体小鼠门静脉接种,1周后行心脏移植。

2 结果

结果见表1。同种异系小鼠脾细胞预先经门静脉接种，显著延长受体接受的与脾细胞供体同品系的小鼠心脏移植的存活时间；而同种异系小鼠脾细胞经腔静脉接种对结果无显著影响；与心脏移植供体无关的第三品系小鼠脾细胞经门静脉接种对移植存活时间也无显著影响；应用CsA可显著延长同种异系间心脏移植的存活时间；同种异系小鼠脾细胞门静脉接种加小剂量CsA治疗具有协同作用。

表 1 环孢霉素 A 和供体脾细胞门静脉接种延长小鼠心脏移植存活

Tab.1 Portal venous inoculation of donor-specific splenocytes combined with CsA prolongs murine cardiac allograft survival

Group	n	Allograft survival time (d)	Mean±SD
A	7	10,10,11,12,12,13,14	11.71±1.50
B	9	14,14,15,15,15,17,17,19,19	16.11±1.97*
C	6	28,28,30,30,35,35	31.00±3.23*
D	6	16,17,17,18,20,23	18.50±2.589*
E	7	10,10,10,12,12,13,13	11.43±1.40
F	6	17,17,18,18,19,19	18.00±0.89*
G	7	9,10,10,10,11,11,11	10.29±0.76

* $P < 0.05$ vs A, E and G group; * $P < 0.05$ vs the other groups. CsA: Cyclosporin. A: Cardiac transplantation between NIH/q and BALB/C strain mice; B: Donor splenocytes injected preoperatively via the recipient portal vein; C: Donor splenocytes injected preoperatively via the recipient portal vein, the recipients being treated with a short course of the CsA; D: CsA administration, no donor splenocytes inoculation; E: Donor splenocytes injected preoperatively via the recipient systemic vein; F: Donor splenocytes injected preoperatively via the recipient systemic vein, the recipients being treated with a short course of the CsA; G: Third-party C57BL/6 splenocytes injected preoperatively via the recipient portal vein

3 讨论

1963年Fulmer首先报道了小鼠同系新生及胚胎心脏耳后移植模型。1981年国内首次报道,并就新生鼠心脏移植的方法、影响移植物存活的因素、异系移植确定心脏排斥反应移植物死亡的客观标准等方面作了详细探讨[3]。我们选用出生后24 h内的新生鼠作为心脏移植的供体,全部用全心移植,移植手术成功率为100%。本方法技术操作简便、重复性好、结果可靠,移植手术不需要行血管吻合,尤其适用于小鼠心脏异位移植的实验研究,是同种异系移植研究的理想实验模型。

在进行移植手术时,我们有如下体会:手术过程一定要严格遵守无菌操作;耳后皮下腔隙大小要合适,以免腔隙过大血肿形成影响移植物的存活,过小则易对移植物造成挤压,使移植受到机械损害;在心脏摘取和填入耳后腔隙时,动作一定要轻柔,特别是在填入移植物时,为防止钳子过分挤压心脏,应当将耳后腔隙边缘皮肤提起,将心脏轻轻放入,然后在皮肤的外面轻轻地将其挤入腔隙内。

多个作者通过对小动物如小鼠、大鼠的实验研究,确定同种异系抗原预先经门静脉接种可诱导受体产生对该抗原的特异性免疫耐受,包括随后接触该抗原引起的迟发性超敏反应受到抑制[4][5]和供受体之间混合淋巴细胞培养的增生反应受到抑制[6][7],随后同系供体的皮肤或心脏移植的存活期延长[8][9][10]。尽管导致门静脉耐受这一现象的确切机制仍不清楚,但是有实验表明肝脏内细胞对同种异系抗原的处理和递呈起主要作用,其中肝脏内Kupffer细胞对抗原的吞噬和处理起关键作用。由于门静脉和肝脏独特的解剖关系,经门静脉接种的同种异系抗原首先全部进入肝脏,被肝脏内的Kupffer细胞吞噬和处理。有作者认为Kupffer细胞作为抗原递呈细胞与T辅助细胞(Th)相互作用,主要刺激Th1细胞的产生;而肝脏以外的抗原递呈细胞处理异系抗原后,同时刺激Th1和Th2细胞的产生,其中Th1细胞对异系抗原引起的迟发性超敏反应有抑制作用[11][12]。另外,由于肝脏内独特的生化环境,激活的Kupffer细胞释放具有免疫抑制活性的前列腺素E₂,从而抑制效应性T淋巴细胞的反应[13][14]。同种异系抗原在肝脏内的处理和递呈,可能诱导抑制性效应因子或抑制性效应细胞的产生[11]。

本实验结果表明,同种异系抗原预先经门静脉接种,可使受体接受的与接种抗原同一品系的异系心脏移植存活时间显著延长;而同种异系抗原经腔静脉接种对移植物存活时间无显著影响;与移植物供体无关的第三者抗原经门静脉接种对移植物存活时间也无显著影响。这些说明同种异系抗原门静脉接种诱导的免疫耐受具有抗原特异性。CsA是新一代的免疫抑制剂,其作用机制为可逆性地抑制白细胞介素2基因的转录、抑制T细胞的激活过程,从而抑制同种异系间组织和器官移植所引起的排斥反应,其免疫抑制作用在实验和临床研究及应用中均得到了证实。心脏移植前及术后应用CsA可使移植物存活时间显著延长。本实验结果表明,单纯CsA治疗组较单纯门静脉接种组更具有免疫抑制作用,说明单纯门静脉接种不能完全有效地抑制同种异系间器官移植引起的排斥反应,而两者结合使用,可显著延长移植物存活。

(责任编辑:黄开颜)

参考文献:

[1] Kamei T, Callery MP, Flye MW. Pretransplant portal venous administration of donor antigen and portal venous allograft drainage synergistically prolong rat cardiac allograft survival[J]. *Surgery*, 1990, 108(2): 415-22.

[2] Valentine H. Neoral use in the cardiac transplant recipient[J]. *Transplant Proc*, 2000, 32(s): s27-44.

[3] 史美浩, 马宝骊, 余贺. 小鼠耳后心脏/心肌组织移植模型之探讨[J]. *上海免疫学杂志*, 1981, 1(3): 41-5.

[4] Qian JH, Hashimoto T, Fujiwara H, et al. Studies on the induction of tolerance to alloantigens[J]. *J Immunol*, 1985, 134(6): 3656-61.

[5] Fukada J, Kurimoto Y, Phillip R, et al. Long-term survival of rat cardiac allografts by intrathymic plus portal venous injections of donor bone marrow cells and short-term tacrolimus immunosuppression[J]. *Transpl Int*, 2001, 14(5): 311-9.

[6] 张永法, 张楠伟, 杉浦喜久弥. 门脉注射转基因脾细胞诱导免疫耐受机制的研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1995, 15(1): 27-31.

[7] Magilavy DB, Fitch FW, Gajewski TF. Murine hepatic accessory cells support the

proliferation of Th1 but not Th2 helper T lymphocyte clones[J]. J Exp Med, 1989, 170(3): 985-90.

[8] Ruessner RW, Kristine YZ, Michele D, et al. Bone marrow augmentation in kidney transplantation: a large animal study[J]. Transpl Int, 2001, 14(3): 159-69.

[9] Shirahama M, Ishibashi H, Tsuchiya Y, et al. Kupffer cells may autoregulate interleukin 1 production by producing interleukin 1 inhibitor and prostaglandin E2[J]. Scand J Immunol, 1988, 28(6): 719-25.

[10] Meyer D, Otto C, Rummel C, et al. Tolerogenic effect of liver for a small bowel allograft[J]. Transpl Int, 2000, 13(s1): s123-6.

[11] Meyer D, Loeffler S, Otto C, et al. Donor-derived alloantigen-presenting cells persist in the liver allograft during tolerance induction[J]. Transpl Int, 2000, 13(1): 12-20.

[12] Sano S, Suda T, Qian JH, et al. Abrogation of the capacity of delayed-type hypersensitivity responses to alloantigens by intravenous injection of neuraminidase-treated allogeneic cells[J]. J Immunol, 1987, 139(11): 3652-9.

[13] Gassel HJ, Otto C, Klein I, et al. Analysis of cellular events in hepatic allografts: Donor progenitors induce intragraft chimerism[J]. Transpl Int, 2000, 13(7): 616-29.

[14] Niaudet P, Dudley J, Charbit M, et al. Pretransplant blood transfusions with cyclosporine in pediatric renal transplantation[J]. Pediatr Nephrol, 2000, 14(6): 451-6.

参考文献:

[1] Kamei T, Callery MP, Flye MW. Pretransplant portal venous administration of donor antigen and portal venous allograft drainage synergistically prolong rat cardiac allograft survival[J]. Surgery, 1990, 108(2): 415-22.

[2] Valentine H. Neoral use in the cardiac transplant recipient[J]. Transplant Proc, 2000, 32(s): s27-44.

[3] 史美浩, 马宝骊, 余贺. 小鼠耳后心脏/心肌组织移植模型之探讨[J]. 上海免疫学杂志, 1981, 1(3): 41-5.

[4] Qian JH, Hashimoto T, Fujiwara H, et al. Studies on the induction of tolerance to alloantigens[J]. J Immunol, 1985, 134(6): 3656-61.

[5] Fukada J, Kurimoto Y, Phillip R, et al. Long-term survival of rat cardiac allografts by intrathymic plus portal venous injections of donor bone marrow cells and short-term tacrolimus immunosuppression[J]. Transpl Int, 2001, 14(5): 311-9.

[6] 张永法, 张楠伟, 杉浦喜久弥. 门脉注射转基因脾细胞诱导免疫耐受机制的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1995, 15(1): 27-31.

[7] Magilavy DB, Fitch FW, Gajewski TF. Murine hepatic accessory cells support the proliferation of Th1 but not Th2 helper T lymphocyte clones[J]. J Exp Med, 1989, 170(3): 985-90.

[8] Ruessner RW, Kristine YZ, Michele D, et al. Bone marrow augmentation in kidney transplantation: a large animal study[J]. Transpl Int, 2001, 14(3): 159-69.

[9] Shirahama M, Ishibashi H, Tsuchiya Y, et al. Kupffer cells may autoregulate interleukin 1 production by producing interleukin 1 inhibitor and prostaglandin E2[J]. Scand J Immunol, 1988, 28(6): 719-25.

[10] Meyer D, Otto C, Rummel C, et al. Tolerogenic effect of liver for a small bowel allograft[J]. *Transpl Int*, 2000, 13(s1): s123-6.

[11] Meyer D, Loeffler S, Otto C, et al. Donor-derived alloantigen-presenting cells persist in the liver allograft during tolerance induction[J]. *Transpl Int*, 2000, 13(1): 12-20.

[12] Sano S, Suda T, Qian JH, et al. Abrogation of the capacity of delayed-type hypersensitivity responses to alloantigens by intravenous injection of neuraminidase-treated allogeneic cells[J]. *J Immunol*, 1987, 139(11): 3652-9.

[13] Gassel HJ, Otto C, Klein I, et al. Analysis of cellular events in hepatic allografts: Donor progenitors induce intragraft chimerism[J]. *Transpl Int*, 2000, 13(7): 616-29.

[14] Niaudet P, Dudley J, Charbit M, et al. Pretransplant blood transfusions with cyclosporine in pediatric renal transplantation[J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 14(6): 451-6.

[回结果列表](#)