

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)08-0694-03

异基因大鼠小肠移植选择素的表达与急性排斥反应的相关性

李纪鹏, 王为忠, 李开宗, 施海, 李孟彬 (第四军医大学西京医院胃肠外科 陕西 西安 710033)

Correlation between expression of selectin and acute rejection in small bowel transplantation in rats

LI Ji-Peng, WANG Wei-Zhong, LI Kai-Zong, SHI Hai, LI Meng-Bin
Department of Gastrointestinal Surgery, Xijing Hospital, Fourth
Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To establish the models of acute rejection in small bowel transplantation in rats, to analyze the changes of selectin expression on protein and gene level during small bowel allograft rejection in rats and to explore their significance in small bowel allograft rejection in rats. **METHODS:** Heterotopic small bowel transplantation was performed with inbred rat F344/N and Wistar. All recipients were divided into four groups: group I of Wistar, group II of F344/N→F344/N, group III of F344/N→Wistar/A, and group IV of F344/N→Wistar/A + FK506. Six rats were put to death on post-operation day (POD) 3, 5 and 7 and the intestine was cut under sterile condition. All the samples were examined histologically and the expression of selectin was detected with immunohistochemistry technique. The intra-graft mRNA expression of selectin was determined. **RESULTS:** Histological examination showed that mild acute rejection occurred on POD 3 in group III, moderate acute rejection on POD 5 and severe acute rejection on POD 7, while in group II, no acute rejection was found. The histological evidence of group IV indicated that FK506 could effectively control acute rejection. P-selectin, E-selectin and L-selectin were highly elevated in group III on POD 3, significantly higher than those of other groups ($P < 0.01$). E-selectin and L-selectin were elevated with the aggravation of the acute rejection while P-selectin was not significantly elevated. But the expression of the selectin was a bit elevated in group II and group IV after the operation though the expression in group IV was lower than that in group II. **CONCLUSION:** Early expression of P-selectin in small bowel transplantation rejection can predict the occurrence of acute rejection at an early stage.

收稿日期 2004-10-25; 修回日期 2004-12-28

作者简介: 李纪鹏(1974-)男(汉族),河南省焦作市人,主治医师,博士(导师:李开宗)。Tel. (029)83375265 Email. Jipengli1974@yahoo.com.cn

【Keywords】 intestine, small/transplantation, graft rejection; FK506, selectins, rats

【摘要】目的:建立大鼠异位全小肠移植的急性排斥反应动物模型,分析急性排斥反应过程中选择素的表达变化及其在排斥反应中的意义。方法:选用近交系 Wistar/A 和 F₃₄₄/N 大鼠建立全小肠移植模型。实验共分 4 组,每组供受体各 18 只。第 1 组 非手术对照组(F₃₄₄/N);第 2 组 同基因移植组(F₃₄₄/N→F₃₄₄/N);第 3 组 异基因移植组(F₃₄₄/N→Wistar/A);第 4 组 异基因移植治疗组(F₃₄₄/N→Wistar/A + FK506)。每组分别于术后第 3、5、7 日处死,在无菌条件下取移植肠行常规 HE 染色,观察组织学变化;免疫组织化学染色测组织中选择素的表达,同时检测移植肠中选择素 mRNA 表达的变化。结果:异基因大鼠异位全小肠移植术后 3、5、7 d 可出现典型的轻、中、重度排斥反应,而同基因组及异基因移植治疗组中未出现排斥反应。P-选择素在异基因移植术后早期显著升高,但随着排斥反应的加重持续升高不明显,而 E、L-选择素随着排斥反应的加重而持续升高,而同基因移植及治疗组选择素的升高不明显,且治疗组略低于同基因移植组。结论:早期肠黏膜中 P-选择素的表达对急性排斥反应的早期诊断及治疗有一定意义。

【关键词】 小肠/移植 移植排斥 FK506 选择素类 大鼠

【中图分类号】 Q344.13 **【文献标识码】** A

0 引言

小肠移植被视为治疗终末期肠功能衰竭患者的最理想的方法,但排斥反应仍困扰着小肠移植的发展。我们建立异基因大鼠小肠移植模型,测定移植肠局部选择素在蛋白及 mRNA 水平的表达,分析小肠移植急性排斥反应过程中选择素表达的变化在小肠移植排斥反应的早期诊断中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 体质量 280 ~ 320 g 雄性近交系 F344/N (RT I 1) 及 Wistar 大鼠由北京医科大学实验动物中心提供,随机分为 4 组,每组供受体各 18 只。I:空白对照组,不实施手术;II:同基因移植组(F344/N-F344/N);III:大鼠异基因移植组(F344/N-Wistar);IV:异基因移植 + FK506 (F344/N-Wistar + FK506 0.5 mg/(kg·d))即治疗组。

1.2 方法 小肠移植采用董光龙等^[1]方法。大鼠手术当天给予 50 mL/L 葡萄糖盐液,术后 1 d 开始自由

进食水, 每组术后 3, 5, 7 d 各处死 6 只, 取出移植肠, 行多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 厚 3 μm, HE 染色观察组织学变化, 免疫组织化学染色测组织中选择素的表达, 同时用液氮冻存小肠标本检测新鲜组织中选择素 mRNA 表达的变化. 组织病理学按标准^[2]诊断排斥程度.

1.2.1 免疫组织化学染色 严格按照说明书进行 SP 免疫组化染色. 已知含有待检抗原的切片为阳性对照, 用 PBS 缓冲液代替一抗为阴性对照. 采用同济大学 HPIAS-100 高清晰度彩色病理图文分析系统对免疫组织化学染色切片进行图像分析, 测定灰度值, 选择素表达越强, 其灰度值越小, 空白区背景灰度值为 255, 每张切片取阳性细胞总数为 10 个, 整个小肠组织阳性细胞的平均灰度值的总和除以阳性单位, 得出每组的平均灰度值.

1.2.2 反转录 PCR 方法 根据 GenBank 登陆的大鼠的 P-selectin, E-selectin, L-selectin, 及 β-actin 的 mRNA 序列中的特定区域, 分别设计如下引物 P1 5'-CGACGTGGACCTATAACTACAGC-3'; P2: 5'-CGATGTCGAATTTCCACACACT-3' 用此引物扩增 P-selectin; P3: 5'-CGGTTCTCCTCATTGGAGAGAGCATA-3'; P4 5'-CGTGTGTAACACAGAGCCAGTTT-3' 用此引物扩增 E-selectin; P5 5'-CGCAAGCCATGGTGTTCATGGAGA-3'; P6: 5'-CGGCAGAGAGCTGCCTTTCGTTT-3' 用此引物扩增 L-selectin; P7: 5'-GATTCCGGTG-CACGATGGAG-3'; P8 5'-GCCATCCTGCGTCTGGAC-CTG-3' 用此引物扩增内参照 β-actin. 移植小肠总 RNA 的提取及反转录参照试剂盒的说明书进行. 以反转录产物为模板, 用各自的引物来扩增我们所要研究的产物. 在 50 μL 的反应体系中, 主要扩增循环参数分别为 P-selectin 94℃ 30 s, 58℃ 60 s, 72℃ 60 s, 32 个循环, 扩增长度 500 bp. E-selectin: 94℃ 30 s, 56℃ 60 s, 72℃ 60 s, 30 个循环, 扩增长度 340 bp. L-selectin 94℃ 30 s, 60℃ 60 s, 72℃ 60 s, 35 个循环, 扩增长度 405 bp. β-actin 94℃ 30 s, 55℃ 60 s, 72℃ 60 s, 30 个循环, 扩增长度 531 bp. PCR 产物行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 结果用生物学软件进行灰度扫描, 以目的条带的灰度与 β-actin 灰度的比值作为该基因的 mRNA 的相对丰度.

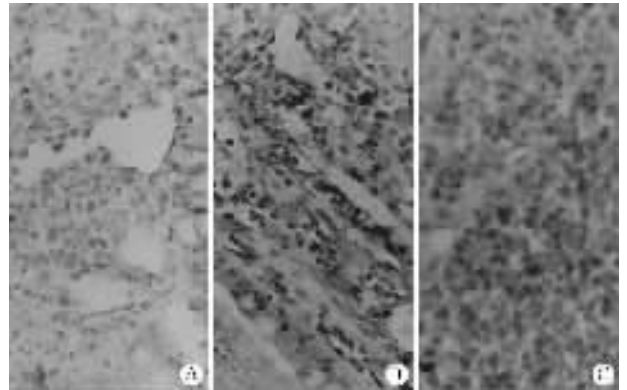
统计学处理: 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析, 均数两两比较采用 LSD-t 检验.

2 结果

异基因移植组大鼠术后 3 d 出现轻度排斥反应;

术后 5 d 出现中度排斥反应, 术后 7 d 出现重度排斥反应. 尸检示重度排斥反应, 小肠黏膜破坏消失; IV 组 3, 5, 7 d 未见排斥反应; II 组无排斥反应, 仅间质有少量淋巴细胞浸润.

2.1 各组选择素表达 I 组选择素基本不表达; II 组术后 3 d P-选择素有少量表达, 而 5, 7 d 无明显增高, 且呈轻度下降趋势. IV 组术后 P-选择素的表达与 II 组相似, 且略低于 II 组, 而 III 组术后 3 d P-选择素表达明显高于其他组 ($P < 0.05$), 阳性细胞主要为移植肠黏膜血管内皮细胞及上皮细胞, 5 d 阳性表达至峰值, 7 d 无明显改变; II 组术后 3 d E-选择素仅有少量表达, 5, 7 d 表达呈轻度下降趋势; II 组及 IV 组术后 L-选择素表达与 P, E-选择素表达趋势相同. 而 III 组术后 3 d E-选择素表达显著升高, 明显高于其他组 ($P < 0.05$), 阳性细胞主要为间质中淋巴细胞和巨噬细胞, 5, 7 d 其阳性表达持续升高 (Fig 1, Tab 1).



A: P-selectin; B: E-selectin; C: L-selectin.

Fig 1 P-selectin expression in allografts on DOP 7 SP ×400
图 1 异基因移植组术后 7 d 空肠膜 P-selectin 表达

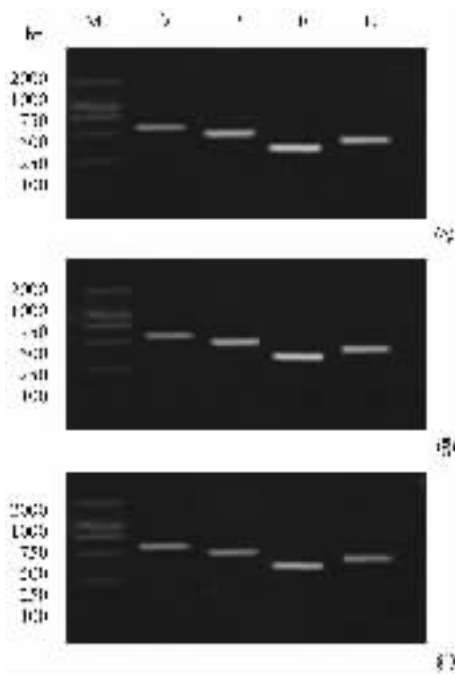
表 1 大鼠小肠移植术后选择素阳性细胞的灰度值
Tab 1 Degree of selectin expression in grafts after SBT by SPA
($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Group		P-selectin	E-selectin	L-selectin
3 d	Homogenic	203.3 ± 3.5 ^a	209.1 ± 3.6 ^a	199.6 ± 4.7 ^a
	Allogenic	188.8 ± 5.3	194.9 ± 6.6	178.7 ± 6.0
	Treated	209.4 ± 2.3 ^o	213.8 ± 2.7 ^o	204.9 ± 5.4 ^o
5 d	Homogenic	206.9 ± 2.1 ^a	211.2 ± 6.2 ^a	207.7 ± 4.1 ^a
	Allogenic	175.4 ± 2.2	171.9 ± 5.1	164.8 ± 3.9
	Treated	210.2 ± 3.2 ^o	212.1 ± 3.5 ^o	211.3 ± 3.8 ^o
7 d	Homogenic	211.7 ± 3.4 ^a	210.9 ± 5.4 ^a	212.7 ± 5.2 ^a
	Allogenic	181.6 ± 3.6	165.6 ± 2.3	157.6 ± 2.3
	Treated	214.3 ± 2.7 ^o	215.6 ± 8.5 ^o	215.1 ± 3.1 ^o

^a $P < 0.05$; ^o $P < 0.05$ vs allogenic group.

2.2 移植肠 selectin mRNA 表达 I 组基本不表达. III 组术后 3, 5 d P-selectin 高于 II, IV 组 ($P < 0.05$),

7 d 较 5 d 稍有降低。Ⅲ组 E-selectin 术后 3 d 比Ⅱ组明显升高,且 5 d 和 7 d 始终高 ($P < 0.05$)。Ⅲ组 L-selectin 在术后始终高于Ⅱ、Ⅳ组 ($P < 0.05$) (Fig 2, Tab 2)。



M: DL 2000; β : β -actin; P: P-selectin; E: E-selectin; L: L-selectin.
A: Group 2: Result of these selectin mRNA by RT-PCR; B: Group 3: Result of these selectin mRNA by RT-PCR; C: Group 4: Result of these selectin mRNA by RT-PCR.

Fig 2 Selectin mRNA by RT-PCR

图2 术后7 d 选择素 RT-PCR 产物电泳

3 讨论

小肠是人体最大的免疫器官,小肠移植的同时大量供者的淋巴细胞进入受体,导致小肠移植排斥反应比其他器官移植更为强烈,常因严重的排斥反应而导致移植失败^[3]。本结果表明,异基因移植组在术后 3, 5, 7 d 分别发生轻、中、重度排斥反应,同基因移植组和异基因移植治疗组在术后 3 d 的移植肠病理变化,可能与移植手术过程小肠移植缺血再灌注损伤有关,异基因移植所致的急性排斥反应中,最早出现的浸润细胞主要是淋巴细胞,空白对照组 P-选择素的表达处于较低水平,甚至不表达,而在同基因大鼠小肠移植后和异基因大鼠小肠移植治疗组,由于缺血再灌注损伤引起 P-选择素轻度表达,但随着缺血再灌注损伤的修复, P-选择素的表达又逐渐降低,在异基因大鼠小肠移植组排斥反应时 P-选择素早期表达水平显

表2 大鼠小肠移植术后选择素 mRNA 表达

Tab 2 Selectin mRNA expression in graft after SBT by RT-PCR ($n = 6 \bar{x} \pm s$)

	Group	P-selectin	E-selectin	L-selectin
3 d	Homogenic	0.92 \pm 0.12 ^a	1.01 \pm 0.13 ^a	1.40 \pm 0.10 ^a
	Allogenic	1.18 \pm 0.19	1.21 \pm 0.16	1.68 \pm 0.18
	Treated	0.88 \pm 0.14 ^c	0.95 \pm 0.18 ^c	1.36 \pm 0.11 ^c
5 d	Homogenic	1.08 \pm 0.15 ^a	1.08 \pm 0.15 ^a	1.45 \pm 0.21 ^a
	Allogenic	1.35 \pm 0.21	1.40 \pm 0.19	1.81 \pm 0.17
	Treated	0.91 \pm 0.17 ^c	0.97 \pm 0.14 ^c	1.42 \pm 0.19 ^c
7 d	Homogenic	1.02 \pm 0.14 ^a	1.04 \pm 0.09 ^a	1.46 \pm 0.17 ^a
	Allogenic	1.31 \pm 0.16	1.48 \pm 0.22	1.88 \pm 0.20
	Treated	0.95 \pm 0.17 ^c	0.94 \pm 0.16 ^c	1.41 \pm 0.21 ^c

^a $P < 0.05$; ^c $P < 0.05$ vs allogenic group.

著增高与排斥反应的发生一致,提示可将 P-选择素的表达水平作为小肠移植排斥反应的诊断指标。L-选择素和 E-选择素均属于选择素家族的功能性细胞膜表面粘附分子。本结果表明异基因移植组中 E-选择素表达略晚于 P-选择素表达,但其随着排斥反应的进行,表达也明显增高。而 L-选择素术后早期即表现出强烈的高表达,并持续升高,提示抑制选择素表达可防止排斥反应发生。而且选择素蛋白水平和 mRNA 水平可成为临床移植过程中实用的检测手段。

【参考文献】

- [1] 董光龙, 刘小玲, 王为忠, 等. 大鼠小肠移植后淋巴管重建对他克莫司药代动力学的影响 [J]. 中华器官移植杂志, 2003, 24(4): 233-235.
Dong GL, Liu XL, Wang WZ, et al. Effect of lymphatic reconstruction on pharmacokinetics of FK506 after small bowel transplantation in rats [J]. *Chin J Organ Transplant* 2003 24(4) 233-235.
- [2] Toogood GJ, Rankin AM, Tam PKH. The immune response following small bowel transplantation II: Very early cytoline expression in the gut-associated lymphoid tissue [J]. *Transplantation*, 1997; 63: 1118-1123.
- [3] 王为忠, 凌瑞, 宋维亮, 等. 活体部分小肠移植术移植肠处理 [J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(6): 773-775.
Wang WZ, Ling R, Song WL, et al. Management of intestinal graft in living-related small bowel transplantation [J]. *J Fourth Mil Med Univ* 2000 21(6) 773-775.

编辑 黄良田