

[文章编号] 1000-4718(2006)11-2173-04

供体骨髓输注减轻同种肝移植排斥反应*

谢海洋, 贾长库, 郑树森

(浙江大学医学院附属第一医院外科研究所, 卫生部多器官联合移植研究重点实验室, 浙江 杭州 310003)

[摘要] 目的: 研究非清髓性骨髓移植在同种肝移植免疫反应中的作用及其意义。方法: 动物实验为同种大鼠肝移植: I组为 Wistar→Wistar 同基因对照组; II组为 SD→Wistar 急性排斥组; III组为 SD→Wistar 环孢素 A (cyclosporine A, CsA) 肌肉注射处理组; IV组为 SD→Wistar 术前 1 周大剂量供体骨髓细胞输注处理组。用术后一般状态、生存时间、病理学排斥分级、肝标本中 IL-2、IFN- γ 的表达以及胸腺内嵌合体的检测等手段, 确定不同处理组移植后的排斥反应情况及机体的免疫状态。结果: I 组大鼠术后无排斥反应发生; II 组大鼠术后 9-13 d 内全部死亡, 中位存活时间 (10.7 \pm 0.5) d, 排斥反应明显; III 组大鼠仅见轻度排斥; IV 组自然存活亚组 6 只大鼠 4 只长期存活 (>100 d), 排斥分级明显低于 II 组 ($P < 0.05$), 与 II 组相比, IV 组 IL-2、IFN- γ 蛋白的表达均明显下调。在骨髓输注 15 d 后, 用 PCR 法在雌性 Wistar 大鼠受体胸腺内可检测到雄性 SD 大鼠供体特异性的 Y 染色体 (Y-chromosome-specific sequence, Sry) 基因片段。结论: 供体骨髓输注可形成供受体细胞的嵌合状态, 可降低同种异体肝移植的排斥反应, 延长受体生存时间。

[关键词] 肝移植; 移植物排斥; 骨髓细胞; 移植嵌合体

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Infusion of donor specific bone marrow alleviates acute rejection reaction in liver allotransplantation

XIE Hai-yang, JIA Chang-ku, ZHENG Shu-sen

(Key Laboratory of Combined Multi-Organ Transplantation, Ministry of Public Health, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China. E-mail: xiehaiyang@yeah.net)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effect of nonmyeloablative donor specific bone marrow infusion on the immunoreaction of liver allotransplantation and its implication. **METHODS:** Orthotopic liver transplantation model was used in this study. Groups were set up as follows: Group I, syngeneic control (Wistar-to-Wistar); Group II, acute rejection (SD-to-Wistar); Group III, acute rejection treated with cyclosporine A by intramuscular injection (SD-to-Wistar + CsA). Group IV, bone marrow infusion 7 d before transplantation. General characteristics and survival time were observed. Histological grades of rejection were determined by pathological examination. IL-2 and IFN- γ expression in grafted liver were detected by Western blotting. Chimerism of donor cells was also measured by PCR for a male-specific marker (Y-chromosome-specific sequence, Sry). **RESULTS:** No signs of rejection were found in Group I. Acute rejection occurred in group II, and all the recipients died 9-13 d posttransplantation with median survival time being (10.7 \pm 0.5) d. Only mild rejection was seen in group III. As for group IV, 4 out of 6 recipients had long-term survival (>100 d), and the histological grade of rejection was significantly lower than that in group II ($P < 0.05$). Compared with group II, the transcription level of IFN- α and IL-2 markedly decreased in group IV. Y-chromosome-specific sequence (Sry) of male SD rats was detected in the bone marrow of female recipients at 15 d after bone marrow infusion. **CONCLUSION:** Donor specific bone marrow infusion enhances chimerism formation in bone marrow, alleviates the rejection of liver allotransplantation and improve survival of liver allotransplantation.

[KEY WORDS] Liver transplantation; Graft rejection; Bone marrow cells; Transplantation chimera

联合骨髓输注是诱导实体器官移植耐受的可行手段之一, 而此类研究往往需对受者进行亚致死量射线照射来对受者部分免疫清除后再植入供体骨髓, 但该方法因其对病人潜在危险性而难以在临床实体脏器移植中应用。肝脏为特殊的免疫特惠器官, 与其它器官相比, 肝脏具有独特的免疫特性, 肝

脏中含有丰富的免疫细胞, 包括枯否细胞、未成熟树突状细胞 (dendritic cells, DC) 等, 且肝脏中有肝动脉和门静脉的双重血液供应以及肝窦内皮细胞间隙较大独特的解剖结构, 可阻止白细胞粘附于肝窦内皮细胞, 从而预防移植排斥反应, 免受宿主免疫系统的攻击, 临床研究也发现部分肝移植病人可完全撤

[收稿日期] 2005-03-04 [修回日期] 2005-05-16

* [基金项目] 国家重点基础研究项目资助 (973 项目, No. 2003CB515501)

Tel: 0571-87236570; E-mail: xiehaiyang@yeah.net

除免疫抑制剂而肝脏功能仍可维持正常^[1,2]。因此,本研究使用大鼠的肝移植模型,尝试在不接受 γ 射线照射破坏受者免疫系统的前提下,术前 CsA 短暂应用的缓和预处理方式和大剂量的供体特异性骨髓(donor specific bone marrow, DSBM)输注,以探讨其建立肝移植耐受或减低免疫排斥反应的可能性。

材 料 和 方 法

1 实验动物

成年近交 Wistar 和封闭群 SD 大鼠,体重 200 - 250 g,购于上海实验动物中心。

2 骨髓细胞的分离

离断供体 SD 大鼠股骨,去肌肉,剪去两端骨髓;插入 7#针头,用 RPMI - 1640 培养液反复冲洗骨髓腔;经 4#针头抽吸为单个核细胞悬液;用 RPMI - 1640 培养液清洗、Tris·NH₃Cl 破红细胞,离心细胞(1 500 r/min, 5 min)3 遍;细胞计数后制成骨髓细胞悬液,台盼蓝拒染试验表明,上述悬液活细胞率均在 98% 以上。

3 肝移植术、动物分组及样品采集

以乙醚持续吸入麻醉,原位肝移植术按 Kamada 的二套袖法进行^[3]。实验为同种移植, Wistar 大鼠随机分为 4 组作为受体; I 组为 Wistar→Wistar 同基因对照组; II 组为 SD→Wistar 急性排斥组; III 组为 SD→Wistar CsA 3.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 肌肉注射处理组; IV 组为 SD→Wistar 供体骨髓细胞输注组; 2×10⁸ 数量的 SD 骨髓细胞于术前 1 周输注 Wistar 大鼠尾静脉(骨髓细胞输注前 1 d 开始连续 3 d 环孢霉素肌注, 3.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。每组分移植后 1、3、5、7、12 d 时段各 3 只 5 个亚组,用以实验指标的检测,自然存活 6 只 1 个亚组,用以一般状态和生存时间的观察,其中 III 组 CsA 肌注从术后开始到 12 d 为止。分别在相应时段取新鲜肝组织 1 份尽快放入液氮中,另取新鲜肝组织备病理学检查。

4 病理学检查

肝组织以 10% 的甲醛固定, HE 染色, 光镜下检查。急性排斥反应程度以 Kemnitz 推荐的 5 级法为准^[4]。

5 Western blotting 检测 IL - 2、IFN - γ

取 100 mg 组织,加入 1 000 μ L 裂解液匀浆(50 mmol/L Tris - HCl, 150 mmol/L NaCl, 1% NP40, 0.25% deoxycholate, 2 mmol/L EDTA, 1 mg/L leupeptin, 1 mg/L aprotinin, 1 mg/L pepstatin, 1 mmol/L PMSF)。离心后,取上清用 Bio - Rad 蛋白测定试剂盒(BCA)测定蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白样品加 2×上样缓冲液煮沸变性后,行 8% SDS - PAGE, 并转移至硝酸纤维素膜,用含 5% 脱脂牛奶的 TBS 封闭,小鼠抗大鼠 IL - 2、IFN - γ 单抗(RnD, 1:1 000),摇床上反应 2 h 后 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜, TBST 液洗膜 10 min×3, 加 HRP 标记的抗小鼠 II 抗

(Chemicon, 1:2 000), 反应 2 h, TBST 洗膜后作 ECL 化学发光, X 片(Kodak)曝光显影。

6 嵌合体的检测

分离雄性 SD 大鼠骨髓, 2×10⁸ 数量的骨髓细胞于术前 1 周输注雌性 Wistar 受体大鼠尾静脉(骨髓细胞输注前 1 d 开始连续 3 d 环孢霉素肌注, 3.0 mg/kg)。在 15 d 后取 6 只受体 Wistar 大鼠胸腺提取 Genomic DNA^[5], 同时提取雄性 SD 大鼠骨髓 Genomic DNA 为阳性对照, 以雌性 Wistar 受体大鼠胸腺 Genomic DNA 为阴性对照, PCR 检测供体特异性骨髓的 Y 染色体 Sry(Y - chromosome - specific sequence) 基因片段, PCR 引物序列及反应条件: 上游序列, 5' - GCCTCCTGGAAAAAGGCC - 3', 下游序列, 5' - GAGAGAGGCACAAGTTGGC - 3'; 反应体系: 10×buffer 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, MgCl₂ 2 μ L, DNA 2 μ L, 上下游引物各 1 μ L 加水至 25 μ L 体系。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 循环 40 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。电泳分析: 取 8 μ L 扩增产物用质量浓度为 20 g/L 的琼脂糖凝胶(内含 0.5 mg/L 的溴化乙锭)电泳, 时间 30 - 40 min, 电压 100 V, 采用 Kodak science 成像系统扫描电泳条带。

7 统计学处理

实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.0 软件作方差分析及 *q* 检验。

结 果

1 术后一般状态及生存时间

移植大鼠的存活情况如图 1 所示(以 100 d 为观察期限), CSA 短期处理的大剂量供体骨髓输注能有效延长移植物的存活时间, 该亚组 6 只大鼠中的 4 只长期存活(>100 d), 另两只分别死于移植后 9 d、27 d。IV 组生存期与 II 组相比有显著差异(*P* < 0.01), 与 III 组无显著差异(*P* > 0.05)。

2 病理学分级

I 组大鼠各个时间段病理学检查均未发现排斥, 部分汇管区有少量炎性细胞浸润; II 组大鼠术后第 1 d 开始出现汇管区少量淋巴细胞浸润, 可见门静脉和中央静脉内皮肿胀, 未见排斥发生, 术后第 3 d 汇管区淋巴细胞浸润明显, 可见肝实质变性, 平均排斥分级为 1.83 级, 术后第 5 d 中度排斥表现, 平均排斥分级为 2.67 级, 术后第 7 d 和 12 d 出现严重急性排斥表现, 静脉内皮炎明显, 大量炎性细胞浸润, 可见肝实质桥接坏死, 分别为 2.87 和 3 级; III 组大鼠术后 1、3 和 5 d 未见排斥, 7 和 12 d 出现混合性细胞浸润和静脉内皮炎, 排斥分级为 1 级; IV 组术后 1 d 未见排斥, 3、5 d 平均排斥分级为 1.25 级, 7 d 和 12 d 平均为 1.5 级, 明显低于 II 组(*P* < 0.05), 且 7 d 和 12 d 排斥分级与 III 组无明显差异(*P* > 0.05), 见图 2。

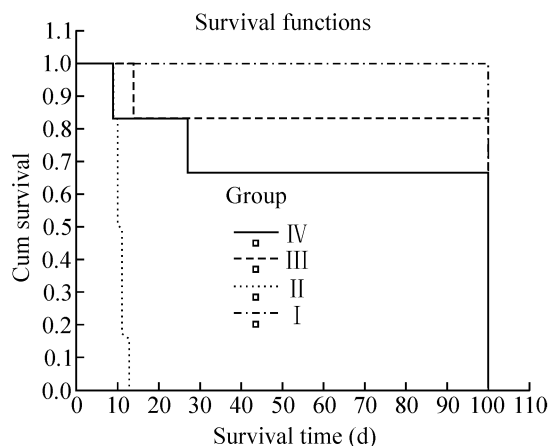


Fig 1 Survival time post transplantation of different groups. I : syngeneic control group (Wistar - to - Wistar); II : acute rejection group (SD - to - Wistar); III : CsA treated group (SD - to - Wistar + CsA); IV : bone marrow infusion group (SD - to - Wistar + DSBM). * $P < 0.01$ compared with group II.

图1 肝移植后各组大鼠生存曲线

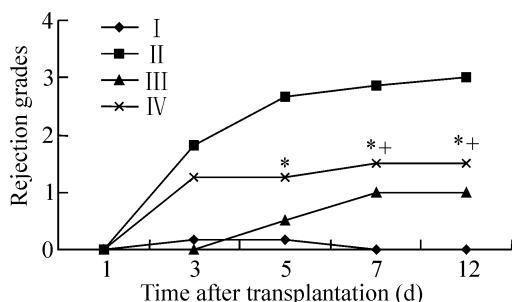


Fig 2 Rejection grades of grafted liver in different groups. I : Syngeneic control group (Wistar - to - Wistar); II : acute rejection group (SD - to - Wistar); III : CsA treated group (SD - to - Wistar + CsA); IV : bone marrow infusion group (SD - to - Wistar + DSBM); rejection grades of group IV are significantly lower than that of group II at all but day 1 time point. * $P < 0.05$ vs group II; * $P > 0.05$ vs group III.

图2 移植后各组排斥分级

3 移植肝内 IL - 2、IFN - γ 蛋白的表达情况

I 组、III、IV 组各时段肝样品 IL - 2 不表达或低表达, II 组从 5 d 开始 IL - 2 持续高表达; II 组除 1 d 外各时段肝组织的 IFN - γ 均处于高表达状态, IV 组 IFN - γ 蛋白表达虽然随着存活时间的延长略有升高, 但总体表达水平仍低于 II 组 ($P < 0.05$), 见图 3、图 4。

4 嵌合体的检测

在骨髓移植 15 d 后, 分别有 3 只雌性受体 Wistar 大鼠的 (3/6) 胸腺中可检测到供体特异性的 Y 染色体基因片段。同时, 对样品雄性 SD 大鼠骨髓细胞 Genomic DNA PCR 检测到阳性条带, 而雌性 Wistar 受体大鼠胸腺 Genomic DNA PCR 结果为阴性, 见图 5。

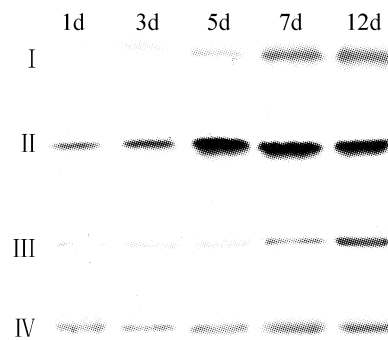


Fig 3 Expression of IL - 2 in grafted livers at different time points posttransplantation. I : syngeneic control group (Wistar - to - Wistar); II : acute rejection group (SD - to - Wistar); III : CsA treated group (SD - to - Wistar + CsA); IV : bone marrow infusion group (SD - to - Wistar + DSBM).

图3 移植后各组肝组织 IL - 2 蛋白的表达

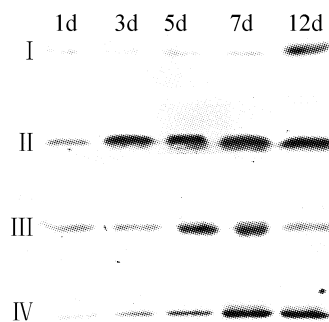


Fig 4 Expression of IFN - γ in grafted livers at different time points posttransplantation. I : syngeneic control group (Wistar - to - Wistar); II : acute rejection group (SD - to - Wistar); III : CsA treated group (SD - to - Wistar + CsA); IV : bone marrow infusion group (SD - to - Wistar + DSBM).

图4 移植后各组肝组织 IFN - γ 蛋白的表达

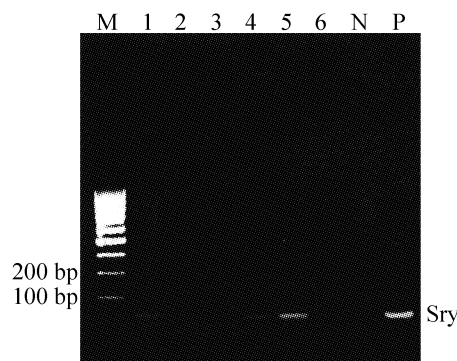


Fig 5 Detection of chimerism 15 d after donor specific bone infusion. M : GeneRuler™ 100 bp DNA ladder 1, 2, 3, 4, 5, 6; different individuals; N : negative control; P : positive control.

图5 移植后 15 d 小鼠供受体嵌合检测结果

讨 论

以非放射线预处理的联合骨髓输注诱导嵌合体

和免疫耐受研究通常在经典的心脏、皮肤及肾移植模型基础上实施的,常需同时阻断共刺激通路(CTLA4Ig)或选择性剔除受体 T 细胞亚群(抗 CD3、抗 CD4、CD8 及 CD154)等预处理方式^[6,7],而在免疫特惠器官肝脏移植中的应用鲜有相关报道,尤其是短期免疫抑制剂预处理的骨髓输注在肝移植中应用未见有报道。CsA 是临床上常用免疫抑制剂之一,它能抑制 T 细胞的活化,抑制 IL-2 等细胞因子的释放,预防移植物抗宿主病(GVHD)的发生,而骨髓中除丰富造血干细胞外,含有大量不成熟 DC,在 CsA 免疫抑制状态下可下调髓系 DC Th1 类细胞因子的释放^[8]。Hale 等^[9]认为大剂量($> 1.5 \times 10^8$)的 DSBM 输注可有效提高嵌合水平和耐受深度。本研究结果证实短暂应用 CsA 联合大剂量骨髓输注(2×10^8)确可延长肝移植受体鼠的存活时间,并致局部免疫低反应性,骨髓输注组各时间段的移植物 Th1 类细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 蛋白表达水平明显低于排斥对照组,且与生存率及排斥分级病理变化较为一致,表明供体骨髓输注可减轻 Th1 细胞因子介导的肝移植排斥反应效应,这可能与供体骨髓输注引起的 Th1 与 Th2 偏移有关^[10],其具体机制值得进一步深入研究。

供体骨髓输注诱导免疫耐受的机制尚不明确,其中中枢克隆清除学说占有较大优势,认为供体骨髓来源的 DC 或造血干细胞迁移至受体胸腺,可通过类似于免疫系统发育过程中胸腺内对自身反应性 T 细胞的阴性选择过程,使对其起反应的受体 T 细胞克隆在分化过程中被清除,从而导致免疫耐受^[11]。Beschoner 等^[12]报道 CsA 停药后能促进来源于供体骨髓的 DC 向受体胸腺迁移,在本研究中在骨髓移植 15 d 后,用 PCR 法间接证实:胸腺确有供体来源的细胞,6 例骨髓移植受体中有 3 例检出供体特异性的 Y 染色体片段。但中枢克隆清除学说尚不能完全解释该现象,除用免疫学的假说解释供体骨髓输注诱导免疫耐受减少失功的可能机制外,有许多研究已证实体内骨髓干细胞具有向肝细胞分化的潜能,骨髓中干细胞向肝细胞分化亦可能有利于移植后受体生存期延长。Petersen^[13]通过 3 种大鼠模型的骨髓移植,用原位杂交方法在受体的肝脏中检测到供体骨髓来源的肝细胞。Theise 等^[14]将雄性小鼠移植到同系雌性体内,通过 FISH 证明小鼠体内存在既表达白蛋白亦表达 Sry 基因的供体来源细胞。据此推测在排斥反应造成肝脏损伤时,部分存活的供体来源骨髓细胞可向肝细胞分化以及在体内向肝脏内迁徙,替代或补充受损的肝组织,从而延迟“排斥危机”出现,减轻急性排斥反应,保护移植肝脏功能。这可能也是 DSBM 输注可诱导移植大鼠长期存活的原因之一。

[参 考 文 献]

- [1] Raimondo ML, Burroughs AK. Single-agent immunosuppression after liver transplantation: what is possible? [J]. *Drugs*, 2002, 62(11): 1587-1597.
- [2] Alberto SF, Terry BS. Immunological tolerance and liver transplantation[J]. *J Hepatol*, 2004, 41(5): 698-705.
- [3] Kobayashi E, Kamada N, Goto S, et al. Protocol for the technique of orthotopic liver transplantation in the rat[J]. *Microsurgery*, 1993, 14(8): 541-546.
- [4] Kemnitz J, Ringe B, Cohnert TR, et al. Bile duct injury as a part of diagnostic criteria for liver allograft rejection [J]. *Hum Pathol*, 1989, 20(2): 132-143.
- [5] Joseph S, David WR. eds. *Molecular cloning: a laboratory manual on the web*[M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL) Press, 2000. 127-128.
- [6] Li S, Thanikachalam M, Pang M, et al. A clinically relevant CTLA4-Ig-based regimen induces chimerism and tolerance to heart grafts[J]. *Ann Thorac Surg*, 2001, 72(4): 1306-1310.
- [7] Shirasugi N, Adams AB, Durham MM, et al. Prevention of chronic rejection in murine cardiac allografts: a comparison of chimerism- and nonchimerism-inducing costimulation blockade-based tolerance induction regimens [J]. *J Immunol*, 2002, 169(5): 2677-2684.
- [8] Szabo G, Gavala C, Mandrekar P. Tacrolimus and cyclosporine A inhibit allostimulatory capacity and cytokine production of human myeloid dendritic cells [J]. *J Investig Med*, 2001, 49(5): 442-449.
- [9] Hale DA, Gottschalk R, Umemura A, et al. Establishment of stable multilineage hematopoietic chimerism and donor-specific tolerance without irradiation [J]. *Transplantation*, 2000, 69(7): 1242.
- [10] Lee WC, Jeng LB, Chiang YJ, et al. Dendritic cell progenitors prolong allograft survival through T-helper 2 deviation of the Th1/Th2 paradigm [J]. *Transplant Proc*, 2000, 32(7): 2076-2077.
- [11] Manilay JO, Pearson DA, Sergio JJ, et al. Intrathymic deletion of alloreactive T cells in mixed bone marrow chimeras prepared with a nonmyeloablative conditioning regimen [J]. *Transplantation*, 1998, 66(1): 96-102.
- [12] Beschoner WE, Yao X, Divic J. Recruitment of semiallogeneic dendritic cells to the thymus during post-cyclosporine thymic regeneration [J]. *Transplantation*, 1995, 60(11): 1326-1330.
- [13] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells [J]. *Science*, 1999, 284(5417): 1168-1170.
- [14] Theise ND, Badve S, Saxena R, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation [J]. *Hepatology*, 2000, 31(1): 235-240.