

· 论 著 ·

小剂量 FK506 作用下同种脾组织移植诱导大鼠原位肝移植术后免疫耐受的机制

史永照, 李先兴*, 施晓敏, 丁国善, 傅志仁

(第二军医大学长征医院器官移植研究所, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 观察小剂量 FK506 作用下同种脾组织移植对大鼠肝移植术后免疫耐受的影响, 探讨其可能的机制。 **方法:** 实验分 5 组 (每组大鼠 8 只), 同种肝移植组 (A 组) 以纯系雄性 Lewis 大鼠为供体、雌性 BN 大鼠为受体进行同种原位肝移植; 同种肝移植+小剂量 FK506 治疗组 (B 组) 于肝移植术后口服途径给予小剂量 FK506 (0.25 mg/kg); 同种肝脾联合移植组 (C 组) 于肝移植同时移植供体脾脏; 同种肝脾联合移植+小剂量 FK506 治疗组 (D 组) 于肝脾联合移植后口服途径给予小剂量 FK506; 异体脾组织移植组 (E 组) 于同种原位肝移植同时移植第三品系大鼠脾脏组织, 术后进行小剂量 FK506 治疗。观察各组的存活期, 并分析受体脾脏 T 淋巴细胞对同种抗原的反应性、嵌合体的形成情况以及肝脏病理变化。 **结果:** 与其他各组相比, C 组大鼠的存活期明显延长; 其受体 T 细胞同种抗原反应性明显降低; 受体脾脏中供体阳性细胞明显升高 ($P < 0.01$), 且在 60 d 后受体脾脏中供体阳性细胞仍然较高; 肝脏病理分析也未见明显排斥反应。 **结论:** 小剂量 FK506 作用下同种脾脏移植能明显诱导受体大鼠原位肝移植术后嵌合体的形成, 降低受体 T 细胞对同种抗原的反应性, 促进免疫耐受。

[关键词] 脾; 嵌合体; 免疫耐受; 肝移植**[中图分类号]** R 657.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-0946-04

Allogeneic spleen tissue transplantation combined with low-dose FK506 in induction of allograft tolerance in orthotopic liver transplant rats

SHI Yong-zhao, LI Xian-xing*, SHI Xiao-min, DING Guo-shan, FU Zhi-ren (Institute of Organ Transplantation, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the influence of allogeneic spleen tissue transplantation with low-dose FK506 on allograft tolerance in rats receiving orthotopic liver transplant and the related mechanism. **Methods:** Female Brown Norway (BN) rats were divided into 5 groups (eight rats in each group). Rats in Group 1 received orthotopic allogeneic liver transplantation using inbred Lewis rats as donors. Rats in Group 2 received Lewis liver transplantation+low-dose FK-506 (0.25 mg/kg FK-506 was orally given after transplantation). Rats in Group 3 received Lewis liver transplantation+Lewis spleen transplantation. Rats in Group 4 received Lewis liver transplantation+Lewis spleen transplantation+low-dose FK-506. Rats in Group 5 received Lewis liver+SD spleen transplantation+low-dose FK-506 group. The survival periods were recorded in each group. The forming of chimerism, the responsiveness of T cells to alloantigen and the pathological changes of transplanted liver were analyzed after treatment. **Results:** Compared with rats in other groups, rats in Group 4 had an obviously longer survival time, an obviously reduced T cell responsiveness to alloantigen, and an obviously increased donor-positive cells (remained for 60 days after transplantation) ($P < 0.05$). There was no significant pathological rejection in Group 4. **Conclusion:** Allogeneic spleen transplantation combined with low-dose FK506 treatment can obviously induce graft immune tolerance in orthotopic allogeneic liver transplant recipients through promoting formation of chimerism and T cells hyporesponsiveness to alloantigen.

[KEY WORDS] spleen; chimerism; immune tolerance; liver transplantation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(9): 946-949]

诱导机体抗原特异性的免疫耐受是防治移植排斥、维持机体免疫稳定的关键, 也一直是临床医师探索的课题。人们认识到, 机体对同种抗原的耐受也需要抗原的激活, 正是这种激活的、对特异抗原的无应答状态, 维持了受者对移植物的免疫耐受。研究^[1-3]表明, 通过输注同种未成熟的树突状细胞 (imDC) 或经 CTLA4-Ig、IL-10 等免疫抑制基因修饰的 imDC 后, 可以有效诱导机体耐受的形成, 取得

了一定的效果, 但由于 DC 的来源等问题使其与解决临床肝移植的实际问题相距较远。已有报道^[4-6]在免疫抑制剂的作用下, 同种脾脏细胞移植可以有

[基金项目] 国家自然科学基金 (30471643)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30471643)。**[作者简介]** 史永照, 博士生, 教授、主任医师。

E-mail: s3c2s3@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: lixianxing@medmail.com.cn

效诱导耐受,使移植长期存活。在本研究中,我们从临床实际的角度,观察了小剂量 FK506+同种脾组织移植诱导大鼠肝移植免疫耐受的效果,并探讨其可能的作用机制,试图寻找一种作用肯定、操作简便易行、具有临床应用前景的诱导肝移植免疫耐受的方法。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 纯系雄鼠 Lewis(Rt1^l)、雌性 BN(Rt1ⁿ)购自北京维通利华生物技术有限公司,体质量为 180~200 g,分别作为同种肝、脾移植的供体和受体(受体略大于供体);第三品系 SD 大鼠购自上海毕凯实验动物有限公司,作为异体脾脏移植的供体。实验动物均在清洁级条件下喂养,受体鼠术前禁食 8 h,并在术前 15~30 min 皮下注射阿托品 0.04 mg/kg 体质量。

1.2 大鼠同种原位肝移植 用改良 Kamada 法^[7]进行大鼠原位肝移植,建立稳定的大鼠肝移植模型后进行正式实验;术后不用抗生素,当日内喂 5%葡萄糖水,3 d 后喂食;大鼠术后 5 d 内死亡的认为发生手术并发症,不进入实验观察。

1.3 供体大鼠脾脏组织的处理 在供体鼠取肝前,取出脾脏,用手术刀片切成 1 mm×1 mm×1 mm 大小的脾脏组织,置于含 5%FK506 的乳酸林格液中 2 h,待肝移植结束后,按文献^[8]的脾脏组织移植方法置于受者的腹腔中。

1.4 实验分组 大鼠随机分 5 组,每组 8 只,同种肝移植组(A组):供、受体鼠无特殊处理,行同种原位肝移植手术;同种肝移植+小剂量 FK506 治疗组(B组):肝移植手术后当天肌肉注射及术后隔天口服途径给予小剂量 FK506(0.25 mg/kg)共 2 周;同种肝脾联合移植组(C组):受体鼠在肝移植手术的同时移植同种供体脾脏组织;同种肝脾联合移植+小剂量 FK506 治疗组(D组):受体鼠在肝移植手术的同时移植同种供体脾脏组织,并进行小剂量 FK506 治疗;第三品系(SD 大鼠)脾脏移植组(E组):受体鼠在肝移植手术的同时移植 SD 大鼠脾脏组织,并进行小剂量 FK506 治疗。手术后第 25 天分析受体脾脏 T 淋巴细胞对同种抗原的反应性;第 25、60 天进行嵌合体的检测,并观察各组的存活期(统计生存天数超过 7 d 的大鼠的生存时间)和肝移植后的肝脏病理。

1.5 同种肝移植术后受体脾脏淋巴细胞对同种抗原的反应性 以受体大鼠脾脏作反应细胞(BN, Rt1ⁿ)、供体大鼠脾脏淋巴细胞(LEW, Rt1^l)作为同

种抗原刺激细胞。取移植后第 25 天受体大鼠脾脏组织,经滤网研磨获得脾脏细胞悬液,经 Tris-NH₄Cl 去红细胞后,过尼龙毛柱,获得脾脏 T 淋巴细胞(细胞密度为 5×10⁶/ml),以 5 μmol/L 的 CFSE 标记后取 5×10⁵ 细胞以 5:1 的比例与 γ 射线(30 Gy)灭活的供体刺激细胞混合,置于 5%CO₂、37℃ 中培养 3 d,进行 FACS 检测。

1.6 同种肝移植术后受体大鼠嵌合体的测定 在大鼠肝移植后的第 25、60 天,取受体的脾脏,低渗处理溶解红细胞后,制备脾脏单细胞悬液,检测其混合嵌合体水平。调整细胞密度至 1×10⁶/ml,分别取 50 μl 细胞悬液加入 FITC 标记的抗 RT-1^a 单抗 50 μl (含抗体 1 μg),4℃ 孵育 40 min 后用冷 FACS 洗液洗 3 次,经尼龙纱网过滤的单个细胞悬液用流式细胞仪(FACSCalibur^R, Becton Dickinson)进行分析。

1.7 同种肝移植术后受体大鼠肝脏病理观察 处死大鼠取肝脏 10%甲醛固定常规 H-E 染色,光镜下观察。急性排斥反应诊断标准按 Williams 推荐的方法^[9],将排斥反应的程度分为 3 级。

1.8 统计学处理 数据用统计软件 SPSS 10.0 进行统计学处理。采用完全随机方差分析,SNK 法分析组间差异性;生存分析用乘积极限法(Kaplan-Meier 法)作生存曲线,并用 Log-rank 法进行显著性检验。

2 结果

2.1 各组大鼠肝移植术后存活期比较 A 组大鼠存活期为 21~31 d,中位存活时间为 26 d;B 组大鼠的存活期为 24~35 d,中位存活时间为 27.5 d,二者无显著差异,表明该剂量的治疗对移植排斥没有明显的作用。C 组大鼠的存活期为 23~35 d,中位存活时间为 28 d,与 A 组相比也无显著差异,表明同种脾组织联合大鼠肝移植后在没有免疫抑制剂的状态下并不能明显延长移植存活。而 D 组大鼠在小剂量 FK506 作用下,存活期明显延长,为 36~100 d 以上,中位存活时间为 80 d,与其他各组相比差异显著($P < 0.01$),表明同种脾组织联合大鼠肝移植后在免疫抑制剂的状态下可显著延长移植存活。

2.2 肝移植术后大鼠 T 细胞对同种抗原的反应性

结果如图 1 所示,A 组大鼠 T 细胞显示强烈的同种抗原刺激增殖反应;B 组受体大鼠 T 细胞受同种抗原刺激也有明显的反应;C 组大鼠脾脏 T 细胞对同种抗原的反应性也明显;而 D 组受体大鼠 T 细胞同种抗原反应性明显降低,与其他各组相比,相差显著($P < 0.01$)。结果提示,在免疫抑制剂的作用后,同种脾组织联合大鼠肝移植后受体 T 细胞同种抗原反应性明

显降低,能诱导 T 细胞对同种抗原的反应性。

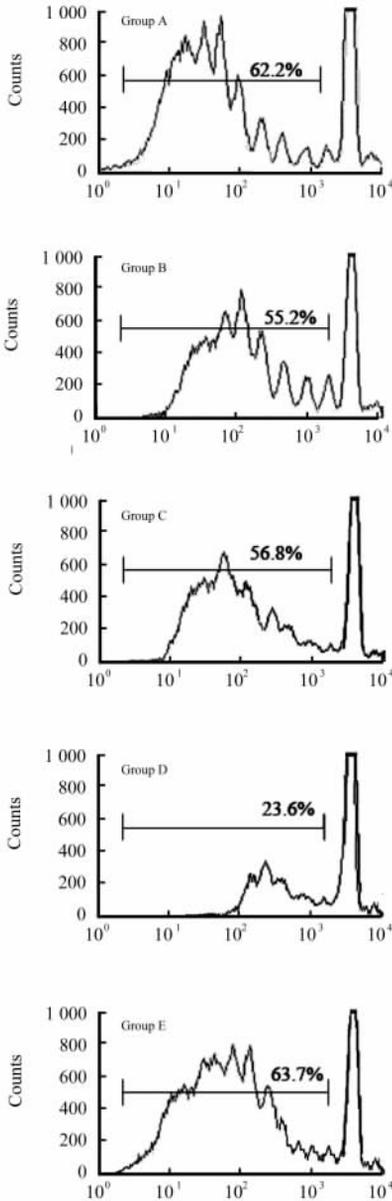


图 1 同种脾组织移植后肝移植大鼠 T 细胞对同种抗原的反应性

Fig 1 Responsiveness to alloantigen of T cells from recipients receiving liver and spleen transplantation

2.3 肝移植术后大鼠嵌合体的形成情况 手术后第 25 天, A 组受体脾脏中供体阳性细胞为(4.6 ± 1.5)%;B 组受体脾脏中供体阳性细胞为(5.8 ± 1.2)%;C 组大鼠脾脏中供体阳性细胞为(6.2 ± 1.3)%;后两组受体脾脏中供体阳性细胞虽然较 A 组高,但无显著差异。这表明该剂量的 FK506 或同种脾移植后在没有免疫抑制剂的状态下不能明显诱导嵌合体的形成。而 D 组受体脾脏中供体阳性细胞为(18.3 ± 2.3)% ,明显高于其他各组($P < 0.01$),且在

60 d 后受体脾脏中供体阳性细胞仍然为(11.2 ± 2.4)% ,表明同种脾组织联合大鼠肝移植后在免疫抑制剂的状态下能明显诱导嵌合体的形成。

2.4 肝移植术后大鼠肝脏病理分析 移植术后 2 周, A 组和 E 组均呈急性重度排斥反应(图 2A),可见明显的中央静脉内皮炎,肝细胞脱落;B 组(图 2B)呈急性中度排斥反应,可见小静脉内皮炎;C 组也呈急性中度排斥反应(图 2C),可见中央静脉内皮炎;D 组未见明显排斥反应(图 2D)。

3 讨论

诱导机体对同种抗原免疫耐受的机制十分复杂,涉及机体免疫系统中的抗原递呈细胞对同种抗原的作用、T 细胞的活化、调节细胞的互相调节以及细胞因子环境和免疫抑制药物的作用。文献^[10,11]提出的嵌合体理论和双向移植排斥理论认为器官移植后供者器官和受者中的细胞相互迁移,在免疫抑制条件下可长期存活,形成微嵌合体,并对移植物的长期存活起重要作用。这一理论的提出是移植免疫学的一大进展,对器官移植的基础研究和临床实践都有重要意义。本研究从临床实际的角度,研究了同种脾脏组织移植是否可以促进大鼠肝移植免疫耐受的产生,并探讨免疫抑制条件下脾脏组织移植诱导耐受的机制。结果发现同种脾组织联合大鼠肝移植后,在小剂量 FK506 组作用下,可明显促进移植后不同时间受体中嵌合体细胞的产生,诱导受体 T 细胞对同种抗原的低反应性,从而明显延长肝脏移植物的存活期,表明同种脾组织联合大鼠肝移植后在免疫抑制剂的状态下能通过诱导嵌合体的形成,促进肝移植免疫耐受的产生。

实验发现小剂量 FK506 治疗在同种脾组织联合大鼠肝移植后诱导嵌合体形成具有重要的作用,虽然该剂量治疗后不能有效抑制同种肝移植排斥反应的产生。在实验中,同种脾组织联合大鼠肝移植后,如果没有给予小剂量的 FK506 治疗,就不能有效诱导受体脾脏中供体阳性细胞的嵌合体的产生,也不能有效地诱导受体 T 细胞对同种抗原的低反应性,也不能明显延长同种肝脏移植物的存活期。表明免疫抑制状态下更易于耐受的诱导,这与 CsA、FK506 等免疫抑制药物诱导的 T 细胞克隆的丢失、细胞凋亡等因素有关,也与低剂量的免疫抑制剂对调节性 T 细胞没有明显的抑制作用而使其发挥作用有关,研究表明,高剂量的免疫抑制剂可以抑制 T 细胞的免疫反应的同时,也抑制了调节性 T 细胞的活性,不利于耐受的形成。

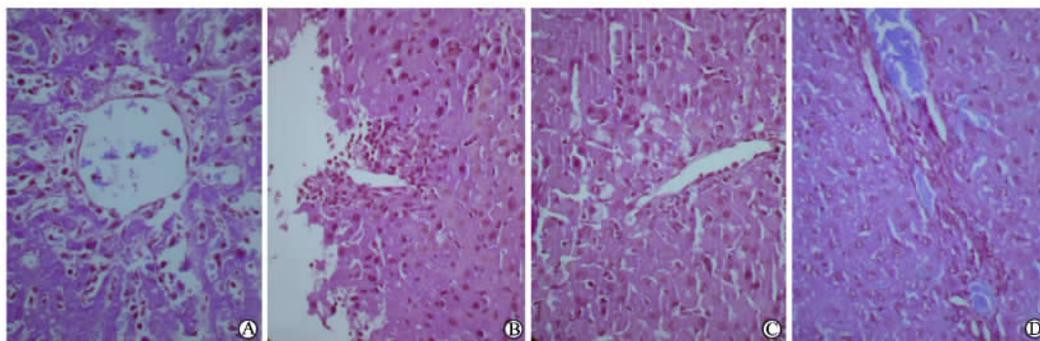


图 2 大鼠原位肝脏移植后各组受体肝脏病理分析

Fig 2 Pathological analysis of liver in recipients receiving allogeneic orthotopic liver transplantation

A; Heavy acute rejection in allogeneic liver transplant recipients and in thirty-party spleen tissue transplant (derived from SD rat); B; Mild acute rejection in allogeneic liver transplant recipients followed by low-dose FK506 therapy; C; Mild acute rejection in allogeneic liver transplant recipients combined with spleen tissue transplant; D; No rejection in allogeneic liver transplant recipients combined with spleen tissue transplant followed by low-dose FK506 therapy

许多文献^[12,13]报道了地塞米松等免疫抑制剂可以诱导淋巴细胞的凋亡,而凋亡细胞体外能够主动抑制对 T 细胞的活化,使 APC 调节细胞因子由 Th1 型(IL-2、TNF- α)向 Th2 型(IL-10)转化,造成局部的免疫抑制环境,使受体 APC 共刺激信号表达被抑制,从而诱导 T 细胞克隆失能,诱发供体特异性的免疫耐受的产生。这一机制在诱导抗原特异性的免疫耐受中越来越受到重视。我们在供体脾脏的处理过程中考虑到这一因素,也对脾脏组织进行了预处理,在预实验中也发现 FK506 预处理的脾脏移植诱导嵌合体形成的效果较未作预处理的效果好,可能诱导脾脏细胞的凋亡等因素有关,更详细的机制以及诱导凋亡的药物选择仍在进一步研究中。

本实验通过移植同种脾组织,在小剂量 FK506 作用下能明显诱导嵌合体的形成,降低受体 T 细胞对同种抗原的反应性,从而促进同种肝脏移植物的免疫耐受。从临床实际的角度,这一方法操作简便易行,具有临床应用前景。

[参考文献]

[1] Lu L, Gambotto A, Lee WC, et al. Adenoviral delivery of CTLA4Ig into myeloid dendritic cells promotes their *in vitro* tolerogenicity and survival in allogeneic recipients[J]. Gene Ther, 1999, 6:554-563.

[2] Eto M, Hackstein H, Kaneko K, et al. Promotion of skin graft tolerance across MHC barriers by mobilization of dendritic cells in donor hemopoietic cell infusions[J]. J Immunol, 2002, 169:2390-2396.

[3] Wang Q, Zhang M, Ding G, et al. Anti-ICAM-1 antibody and CTLA-4Ig synergistically enhance immature dendritic cells to induce donor-specific immune tolerance *in vivo* [J]. Immunol

Lett, 2003, 90: 33-42.

[4] Adkins B, Jones M, Bu Y, et al. Neonatal tolerance revisited again: specific CTL priming in mouse neonates exposed to small numbers of semi- or fully allogeneic spleen cells[J]. Eur J Immunol, 2004, 34:1901-1909.

[5] Tomita Y, Yoshikawa M, Zhang QW, et al. Induction of permanent mixed chimerism and skin allograft tolerance across fully MHC-mismatched barriers by the additional myelosuppressive treatments in mice primed with allogeneic spleen cells followed by cyclophosphamide[J]. J Immunol, 2000, 165: 34-41.

[6] Donckier V, Flamand V, Abramowicz D, et al. Dissociation between chimerism and skin graft tolerance after neonatal injection of allogeneic spleen cells[J]. Transplant Proc, 1998, 30: 4018-4019.

[7] Goto S, Kamada N, Delriviere L, et al. Orthotopic liver retransplantation in rats[J]. Microsurgery, 1995, 16:167-170.

[8] 郭光金, 王林, 蒋登金, 等. 大鼠自体移植脾组织 GAP-43⁺ 神经再生的实验研究[J]. 局解手术学杂志, 2004, 13: 289-291.

[9] Wong T, Nouri-Aria KT, Devlin J, et al. Tolerance and latent cellular rejection in long-term liver transplant recipients[J]. Hepatology, 1998, 28:443-449.

[10] Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, et al. Cell migration, chimerism, and graft acceptance [J]. Lancet, 1992, 339: 1579-1582.

[11] Bertolini F, Pruneri G. Chimerism of the transplanted heart[J]. N Engl J Med, 2002, 346:1410-1412.

[12] Chiffolleau E, Walsh PT, Turka L. Apoptosis and transplantation tolerance[J]. Immunol Rev, 2003, 193:124-145.

[13] Chen M, Wang YH, Wang Y, et al. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance[J]. Science, 2006, 311: 1160-1164.

[收稿日期] 2006-04-10 [修回日期] 2006-08-28
[本文编辑] 贾泽军