

· 论 著 ·

组织工程血管脱细胞支架主要组织相容性复合体 I 抗原性的免疫组化观察

刘太华¹, 张炎^{1*}, 姜宗来², 李玉泉¹, 刘波¹, 张秀花¹

(1. 第二军医大学基础医学部人体解剖学教研室, 上海 200433; 2. 上海交通大学医学院, 上海 200030)

[摘要] **目的:**探讨组织工程血管全生物支架的免疫原性的检测方法。**方法:**取猪颈总动脉, 剥离外膜, 剪成 2 cm 长的血管段, 随机分为 3 组: 对照组、脱细胞组和脱细胞加碱处理组, 每组 5 段。以免疫组化方法检测血管脱细胞处理前后主要组织相容性复合体 I (MHC I) 的变化情况, 并将检测结果作图像分析。**结果:**对照组血管壁 MHC I 高表达, 脱细胞处理后 MHC I 明显减少。图像分析得出阳性颗粒面积与视场面积比: 对照组为 (24.09±6.09)%, 脱细胞组为 (6.71±2.18)%, 脱细胞加碱处理组为 (1.62±0.76)%, 组间比较差别均有显著意义 ($P<0.01$)。**结论:**MHC I 免疫组化方法可检测血管生物支架抗原。

[关键词] 血管脱细胞生物支架; 组织工程; 主要组织相容性复合体 I; 免疫组织化学

[中图分类号] R 318.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0072-03

Immunohistochemical observation of major histocompatibility complex class I antigenicity in decellularized scaffolds of tissue engineered blood vessels

LIU Tai-Hua¹, ZHANG Yan^{1*}, JIANG Zong-Lai², LI Yu-Quan¹, LIU Bo¹, ZHANG Xiu-Hua¹ (1. Department of Human Anatomy, College, Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030)

[ABSTRACT] **Objective:** To detect the immunogenicity of the bioscaffold used in building tissue engineered blood vessels. **Methods:** The carotid arteries of pigs were cut into 2 cm long segments and were randomly divided into 3 groups: the control group, the decellularized group, and the decellularized/base-treated group. Major histocompatibility complex class I (MHC I), which was highly expressed in vascular mural cells, was chosen to evaluate the antigenic changes of the vessels before and after decellularized treatment. The staining results were analyzed with image analysis system. **Results:** MHC I was highly expressed in the control group, while after treatments its detectable rate dropped significantly. The ratio of positive granular area to the visual area was (24.09±6.09)% in the control group, (6.71±2.18)% in the decellularized group and (1.62±0.76)% in the decellularized/base-treated group. The differences among groups were significant ($P<0.01$). **Conclusion:** MHC I immunohistochemical staining can serve as a valuable method to detect the antigenicity of the vascular bioscaffold.

[KEY WORDS] decellularized vascular bioscaffold; tissue engineering; major histocompatibility complex class I; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 72-74]

探讨采用异种血管制作脱细胞组织工程血管支架, 是血管组织工程的研究热点之一^[1,2], 但血管生物支架存在强烈的免疫排斥反应是需要解决的一个难题。长期以来, 血管组织工程研究者们致力于组织工程血管的免疫原性处理, 如采用宿主内皮细胞内皮化组织工程血管及免疫抑制剂的使用等, 而这些措施是否有效, 一般要等到移植动物发生了移植排斥反应才会被检测到, 所需时间长, 检测手段明显滞后^[3,4]。与异种血管移植排斥反应直接有关的是异种血管壁结构细胞和内皮细胞及胶原成分, 其中起主要作用的是由血管壁结构细胞和内皮细胞表达的主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 抗原。其中 MHC I 类分子在所有有核细胞及血小板表面表达, 所有血管壁结构细胞和

内皮细胞都能表达 MHC I 类分子。本研究拟在制作血管生物支架时, 采用酶消化法去除血管壁结构细胞和内皮细胞^[5], 从而去除血管壁结构细胞和内皮细胞表达的 MHC, 并用免疫组化方法检测脱细胞血管支架 MHC I, 探索一种血管移植前检测异种动物血管脱细胞支架免疫原性的实验方法。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 成年雄性金华猪颈总动脉(取自上海食品公司)。胰酶(华美生物工程公司); DNA 酶和 RNA 酶(上海实生细胞生物技术有限公司); 抗

[基金项目] 国家自然科学基金(10272110, 10132020)。

[作者简介] 刘太华 (1966-), 男, (汉族), 硕士, 讲师。

*Corresponding author. E-mail: zhangyan@smmu.edu.cn

MHC I 抗体(美国 Biomeda 公司);二抗(华美生物工程公司)。

1.2 标本分组和处理 取成年雄性金华猪颈总动脉,剥离外膜,用 Tris 缓冲生理盐水(Tris buffer saline, TBS)冲洗,剪成 2 cm 长的血管段,随机分为 3 组(每组 5 段):对照组、脱细胞组及脱细胞加碱处理组。对照组 TBS 冲洗后直接用 Bouin 液固定 12 h,石蜡包埋。脱细胞组:TBS 4℃浸 2 h,1% Triton X-100 4℃浸 12 h,0.125%胰酶 37℃消化 12 h,按 1:1 比例用 0.5 mg/ml DNA 酶和 0.5 mg/ml RNA 酶 37℃消化 12 h,TBS 洗 3 次。Bouin 液固定 12 h,石蜡包埋。脱细胞加碱组在脱细胞组处理基础上用 0.05 mol/L NaOH 浸泡 10 min,TBS 洗 3 次,再用 TBS 浸泡 12 h,Bouin 液固定 12 h,石蜡包埋。

1.3 免疫组化染色 常规石蜡切片,片厚 5 μm,脱蜡至水,0.3% H₂O₂ 室温浸 30 min,TBS 洗 5 min×3 次,0.3% Triton X-100 37℃浸 30 min,TBS 洗 5 min×3 次。加正常羊血清,置切片于湿盒内 37℃孵育 30 min,加(1:100)鼠抗人 MHC I 抗体(阴性对照组不加一抗,加 TBS),湿盒内 4℃孵育 72 h。TBS 洗 5 min×3 次,加生物素标记的马抗鼠抗体(1:100),湿盒内 37℃孵育 1 h。TBS 洗 5 min×3 次,加 ABC 复合物湿盒内 37℃孵育 1 h。TBS 洗 5 min×3 次,DAB 显色 5 min,蒸馏水终止显色,用明矾苏木精复染。脱水透明,中性树胶封片。

1.4 图像分析 采用中国科学院自动化研究所研制的图像分析系统,测量阳性颗粒面积与视场面积比。每组随机取 5 个血管环标本,每个标本在光镜下分 4 个象限,取横坐标和纵坐标与血管环相交的 4 个点作采样窗。采样窗包含内膜及中膜。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s_x$ 表示,采用方差分析。

2 结果

2.1 免疫组化实验 对照组血管内皮细胞及平滑肌细胞高度表达 MHC I,阳性反应见于血管内膜和中膜,呈细胞形态分布。经脱细胞处理后,内皮细胞层已无细胞,未见免疫组化阳性反应。中膜虽已无平滑肌细胞,但仍有浅淡免疫组化染色,不呈细胞形态,呈小碎片散在分布,且阳性染色面积较对照组明显减少。脱细胞加碱处理组的阳性反应更少,只在中膜胶原纤维间有很少量免疫组化染色。免疫组化染色结果见图 1。

2.2 图像分析 阳性对照组血管壁 MHC I 高表达,脱细胞处理后 MHC I 明显减少。去除小颗粒面积阈值为 23。图像分析得出阳性颗粒面积与视场面积比:对照组为(24.09±6.09)%,脱细胞组为(6.71±2.18)%,脱细胞加碱处理组为(1.62±0.76)%,经方差分析组间比较有极显著意义($P < 0.01$)。

3 讨论

MHC 是一种分布在细胞表面并具有种系特异性的抗原蛋白,此抗原近来在异种移植中越来越受到重视^[6,7]。MHC 分 3 个基因区:MHC I、MHC II 和 MHC III,其中 MHC I 类分子在所有有核细胞及血小板表面都能表达。血管壁所有细胞都能表达 MHC I 类分子。与体液免疫排斥相比,细胞介导的异种排斥虽然是次要的,但要使异种植物长期存活,控制细胞免疫是必不可少的。因为异种植物即使能避免超急性排斥反应的摧毁,也会遭受细胞免疫的攻击性损害。与同种移植不同,异种识别是 MHC 自身限制性的,依赖于 MHC I 类分子异基因片段提呈。在异种移植中,因供-受者 MHC I 分子不同,受者自然杀伤细胞将对供者细胞发起攻击。体外实验证明,自然杀伤细胞可与猪内皮细胞结合并激活、溶解内皮细胞^[8]。所以采用猪血管制作组织工程血管支架必须尽可能去除支架上 MHC 抗原。

采用动物血管制作天然生物降解材料的组织工程血管支架,即用酶去除血管壁结构细胞和内皮细胞,保留其支架成分,这是近来研制组织工程血管的重要进展之一,但脱细胞不完全或残留细胞成分都将导致组织工程血管移植后产生强烈的免疫排斥反应,或激活凝血系统导致血栓形成致血管移植失败。因为多数移植抗原都是细胞表达的,如血型抗原和 MHC,以前多采用将实验材料埋于动物组织内,观察动物免疫细胞的变化来判断移植免疫原性的强弱^[9],这种方法既费时又昂贵,且在程序上滞后。如能在制作血管生物支架后、在种植宿主细胞前检测其免疫原性强弱,将大大有利于采用针对性强的方法,尽可能减少免疫排斥反应,从而有利于成功构建组织工程血管。

血管壁内皮细胞和平滑肌细胞都高度表达 MHC I 抗原。本研究选择了免疫组化方法直接在血管壁上检测 MHC I,通过观察血管脱细胞处理前后 MHC I 免疫组化染色强弱变化来判断支架免疫

原性强弱。实验结果表明,MHC I 免疫组化染色能很好地反应血管脱细胞处理前后免疫原性强弱变化,且方法简单易行,费用低,耗时少。可作为检测血管移植前检测异种动物血管脱细胞支架免疫原性的实验方法之一。

[参考文献]

[1] Teebken OE,Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*,2000,23(6):475-485.

[2] Nerem RM, Seliktar D. Vascular tissue engineering[J]. *Annu Rev Biomed Eng*,2001,3:225-243.

[3] Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded *ex vivo*[J]. *Nat Med*,2001,7(9):1035-1040.

[4] Teebken OE,Pichlmaier AM,Haverich A. Cell seeded decellularised allogeneic matrix grafts and biodegradable polydioxanone-prostheses compared with arterial autografts in a porcine model[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*,2001,22(2):139-145.

[5] Teebken OE,Bader A,Steinhoff G. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*,2000,19(4):381-386.

[6] Taylor CJ, Tang KG, Smith SI. HLA-specific antibodies in highly sensitized patients can cause a positive crossmatch against pig lymphocytes[J]. *Transplantation*,1998,65(12):1634-1641.

[7] Czech KA,Ryan JW,Sagen J. The influence of xenotransplant immunogenicity and immunosuppression on host MHC expression in the rat[J]. *CNS Exp Neurol*,1997,17(1):66-68.

[8] David J, Albertini MV, Willson A. Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells[J]. *Transplantation*,1996,61(5):763-771.

[9] 柳子星,张惠珍,王建,等. MHC II类抗原的诱导性表达和同种异体软骨细胞移植的免疫排斥[J]. *上海免疫学杂志*,2002,22(3):178-181.

Liu ZX,Zhang HZ,Wang J, et al. Inducible expression of MHC class II antigens on chondrocytes and their rejection in allogeneic grafting[J]. *Shanghai Mianyixue Zazhi(Shanghai J Immunol)*,2002,22(3):178-181.

[收稿日期] 2003-05-30 [修回日期] 2003-12-04
[本文编辑] 曹静,尹茶

• 短篇报道 •

院校学员乙肝疫苗接种效果的评价

Effectiveness evaluation of hepatitis B vaccine injection in university students

卞金陵,李俊,董娜(第二军医大学长海医院预防保健科,上海 200433)

[关键词] 乙肝疫苗;全程接种;抗体检出;疫苗保存

[中图分类号] R 512.62 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2004)01-0074-01

乙型肝炎的危害性越来越为人们所重视,控制和预防乙型肝炎的最有效措施是普及乙肝疫苗接种。目前,每所学校都常规为集体生活的学生进行乙肝疫苗普种,由于种种原因每次都有一部分学生不能完成全程接种,为了明确这部分人员的乙肝抗体产生情况,以及在校学员的免疫效果,作好学员队的卫生防病工作,我们对1999~2002年入校的788名新生进行了乙肝疫苗接种并随访观察,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 观察对象 新入校学员788名,平均年龄17~19岁,既往无肝炎病史,丙氨酸转氨酶(ALT)正常,乙肝病毒血清标志物检测全部阴性,其中第1组512人,第2组276人。

1.2 疫苗与接种方法 采用0、1、6免疫程序,于上臂外侧三角肌处皮内接种10 μg/ml疫苗0.5 ml。疫苗系深圳康泰生物制品有限公司生产的酵母重组疫苗,第1组使用批号:2990103-1;第2组使用批号:2000310-1。

1.3 检测方法 第1组对象在全程免疫结束后12个月、第2组在第3针疫苗接种前和免疫程序结束后12个月各采取观察对象肘静脉血1份,常规分离血清,用赖氏法测定

ALT;在同一实验条件下使用上海科华公司生产的ELISA试剂盒,检测HBsAg和抗HBs。

2 结果和讨论

所有观察对象都未发现HBsAg阳性和ALT升高。第1组512人抗HBs阳性率为67.2%(344/512);第2组276名观察对象非全程免疫时抗HBs阳性者193人,转阳率69.9%,全程免疫结束12个月后抗HBs阳性者233人,阳性率为84.4%,阳性率上升14.5%。

使用乙肝疫苗对高危人群进行大规模的免疫接种,可以有效地预防乙型肝炎的传播。事实也证明基因工程乙肝疫苗是一种安全、有效的疫苗,用于医学生入学和实习前的免疫接种,也可以作为医务人员的预防接种以达到最大限度控制和减少乙肝病毒感染的机会。

(下转第79页)

[作者简介] 卞金陵(1953-),女(汉族),硕士,教授、主任医师,硕士生导师。