

大鼠喉移植术后移植喉组织 TNF-α 和 IL-10 表达的变化

陈 刚,郑宏良*,荆建军,陈东辉,张 贤,曹 婧
(第二军医大学长海医院耳鼻咽喉科,上海 200433)

[摘要] **目的:**观察大鼠喉移植术后移植喉组织不同部位 TNF-α 和 IL-10 表达的变化,探讨其与急性排斥反应的关系。**方**
法:进行 Wistar→SD 大鼠喉移植,术后依照注射环孢霉素 A(CsA)剂量不同随机分为 3 组:0 mg CsA 组、5 mg CsA 组及 10
mg CsA 组,以未进行喉移植手术的 SD 大鼠为对照组。术后第 3、7、11 天取各组移植喉组织进行病理学观察,免疫组化检测
TNF-α、IL-10 在不同部位的表达变化。**结果:**0、5 mg CsA 组在术后第 3、7、11 天分别符合轻、中、重度排斥,10 mg CsA 组无
明显排斥征象;免疫组化检测显示 0、5、10 mg CsA 组 TNF-α、IL-10 均阳性表达,对照组基本不表达。0、5、10 mg CsA 组喉组
织黏膜上皮及黏膜下层 TNF-α、IL-10 阳性区面积比值均明显高于肌肉及软骨组织($P<0.01$);0、5 mg CsA 组 TNF-α 表达始
终显著高于 10 mg CsA 组($P<0.01$),0、5 mg CsA 组 IL-10 表达在第 11 天低于 10 mg CsA 组($P<0.01$)。**结论:**供体喉的高
抗原性主要集中于喉的黏膜上皮及黏膜下层组织;喉移植术后 TNF-α 和 IL-10 在移植组织的表达变化与急性排斥反应的进程
相关,检测其表达变化可用于预测喉移植急性排斥反应。

[关键词] 肿瘤坏死因子 α;白细胞介素-10;喉移植;移植排斥

[中图分类号] R 762 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0817-05

Changes of TNF-α and IL-10 expression in transplanted laryngeal tissues during acute rejection after laryngeal transplantation in rats

CHEN Gang, ZHENG Hong-liang*, JING Jian-jun, CHEN Dong-hui, ZHANG Xian, CAO Jing (Department of Otorhinolaryngology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:**To explore the expression of TNF-α and IL-10 in different layers of laryngeal tissues after laryngeal transplantation and its relationship with acute rejection. **Methods:** Laryngeal heterotopic transplantation was performed in Wistar and SD rats (Wistar→SD rats). The SD rats were divided into 4 groups: Group I : Sham control (receive no transplantation); Group II (receive transplantation, without cyclosporine A treatment); Group III (receive transplantation, with 5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ cyclosporine A treatment); and Group IV (receive transplantation, with 10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ cyclosporine A treatment). The transplanted larynx was harvested on 3, 7 and 11 days after transplantation for pathological examination. The expression of TNF-α and IL-10 in different layers of grafts was detected immunohistochemically. **Results:** Pathological observation showed mild, moderate and severe acute rejection in Group II and III on 3, 7 and 11 days after transplantation, respectively; there was no obvious rejection in Group IV. Immunohistochemical staining showed expression of TNF-α and IL-10 in Group II, III, and IV, not in Group I. The ratios of the positive areas of TNF-α and IL-10 in the mucosal and submucosal layers were significantly higher than those in the muscle and cartilage layers of laryngeal tissues ($P<0.01$) in Group II, III, and IV. The expression levels of TNF-α in Group II, III were always significantly higher than that in Group IV ($P<0.01$);the expression levels of IL-10 in Group II, III were lower than that in Group IV on 11 days after transplantation ($P<0.01$). **Conclusion:** The high-antigenicity of laryngeal graft mainly locates in the mucosal and submucosal layers. Post-laryngeal transplantation expression of TNF-α and IL-10 is correlated with the course of acute rejection; detection of the expression may be used in predicting early acute rejection after laryngeal transplantation.

[KEY WORDS] tumor necrosis-alpha; interleukin-10; laryngeal transplantation; graft rejection

[Acad J Sec Mil Med Univ,2007,28(8):817-821]

晚期喉癌、严重喉外伤需全喉切除,术后常造成患者永久丧失发音功能,而喉移植是恢复喉功能最理想的方法。由于喉为复合组织器官,移植喉排斥反应较其他单一组织器官更为强烈。因此,探讨喉(复合)组织不同部位的组织抗原性差异利于改进喉移植术后的抗排斥治疗策略,对寻找和建立早期诊

断指标也具有重要的临床实用价值。本研究通过检测大鼠喉移植术后移植喉组织不同时间、不同部位

[基金项目] 国家自然科学基金(30672295). Supported by National Natural Science Foundation of China (30672295).
[作者简介] 陈 刚,博士生. E-mail: chengangxf@yahoo. com. cn
* Corresponding author. E-mail: zheng_hl2004@163. com

TNF- α 和 IL-10 的表达,评估不同部位喉组织抗原性差异,为喉移植术后急性排斥反应的诊断和预测奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 实验用健康雄性大鼠(第二军医大学实验动物中心提供),其中 Wistar 大鼠 63 只,体质量(230 $\pm$ 22) g,SD 大鼠 84 只,体质量(220 $\pm$ 30) g。手术以 Wistar 鼠为供体,SD 鼠为受体,参照 Strome 等^[1-2]大鼠喉颈部异位移植术建立实验动物模型(图 1)。参照 Strome 等^[3]的报道,移植大鼠术后根据注射环孢霉素 A(CsA,瑞士 Novartis 公司产品,50 mg/ml)剂量的不同随机分为 3 组($n=21$):0 mg CsA 组,术后未注射 CsA;5 mg CsA 组,术后肌注 CsA 5 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹;10 mg CsA 组,术后肌注 CsA 10 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹。以未进行喉移植手术的 21 只 SD 大鼠(仅切开皮肤,游离喉体周围组织后缝合关闭切口)为对照组。

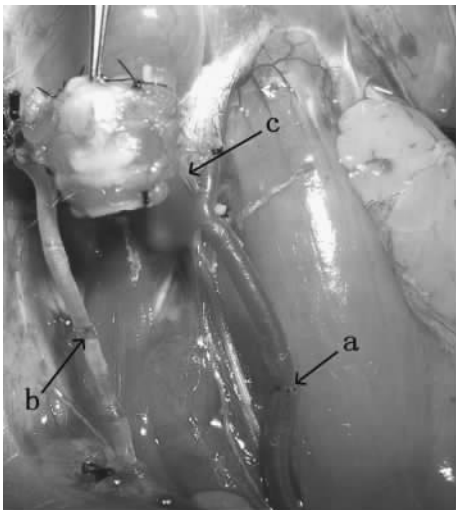


图 1 大鼠喉移植模型

Fig 1 Rats model of laryngeal heterotopic transplantation
a: Artery anastomosis; b: Vein anastomosis; c: Superior thyroid artery (artery pedicle)

1.2 方法

1.2.1 手术步骤 首先切取带有双侧甲状腺上动脉、部分颈外动脉和颈总动脉节段的供体喉,然后将其移植于受体的一侧颈部,受体喉保持原位完整。通过将供体喉的带有双侧甲状腺上动脉的颈总动脉和颈外静脉端端吻合而重建移植喉的血液供应。术后常规抗感染、抗凝处理。

1.2.2 获取标本 各移植组分别于移植术后第 3、

7、11 日在无菌条件下各取供体喉 7 例(共 63 例),另取对照组喉 7 例。将标本固定石蜡包埋。

1.2.3 组织学观察 将移植喉石蜡切片行 H-E 染色光镜检查。显微镜下免疫排斥反应发生的组织病理学变化和评判标准主要根据对黏膜上皮、黏膜下层、肌肉和软骨结构等组织的观察结果,参考国外报道的资料^[4],并结合本实验的研究。

轻度:喉基本结构正常;黏膜上皮增厚,部分上皮坏死脱落,形成浅表溃疡;黏膜下层腺泡黏液潴留,有淋巴细胞和浆细胞浸润;肌肉、血管及软骨无明显病理改变。中度:喉基本结构尚完整,各层均见充血、水肿,黏膜上皮肥厚,部分坏死、脱落形成灶状溃疡,覆有假膜。黏膜下层中有以淋巴细胞为主的炎性细胞和浆细胞浸润,腺泡扩张,黏液潴留,部分腺体萎缩,肌层也见炎性细胞浸润,软骨结构尚正常。重度:黏膜上皮鳞状上皮化生,部分脱落。黏膜下层以腺体萎缩为主,腺泡减少,纤维结缔组织增生,大量炎性细胞浸润。部分血管腔内血栓形成。肌肉大部分肿胀坏死,软骨结构破坏,可见纤维化。

1.2.4 免疫组织化学染色 石蜡标本利用 MaxvisionTM快捷免疫组化染色。试剂为兔抗大鼠 TNF- α 多克隆抗体(克隆号:BA0131)、兔抗大鼠 IL-10 多克隆抗体(克隆号:BA1201)及相应试剂盒,均为武汉博士德生物工程有限公司产品。操作步骤按说明书进行。以细胞质和核膜出现黄色颗粒为阳性细胞。采用 Biosens 高分辨病理彩色图文分析系统,在 400 倍视野下选取不相重叠的 4 个代表性部位,随机选 10 个相同大小视野,计算出阳性区面积与总面积的比值。

1.3 统计学处理 采用 SAS9.1.3 软件对数据进行统计学处理,用方差分析进行显著性分析,SNK 法两两比较, $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 病理学检查 病理学检查显示 0、5 mg CsA 组大鼠在术后第 3、7、11 日分别符合轻、中、重度排斥,10 mg CsA 组无明显排斥征象(图 2)。

2.2 免疫组化检测移植组织 TNF- α 和 IL-10 的表达 0、5、10 mg CsA 组大鼠各个时间段中黏膜上皮层、黏膜下层组织、肌肉及软骨组织中均有 TNF- α 及 IL-10 的阳性表达,而对照组标本无阳性表达。黏膜上皮及黏膜下层组织阳性区面积比值均显著高于肌肉及软骨组织($P<0.01$)。0、5 mg CsA 组移植组织 TNF- α 的表达明显高于 10 mg CsA 组($P<$

0.01), 表达逐渐增高, 在术后第 11 日达到峰值。IL-10 的表达在第 3、7 日 3 组均增高, 在第 11 日 0、5 mg CsA 组明显下降, 而 10 mg CsA 组仍持续高表达, 明显高于 0、5 mg CsA 组($P<0.01$)。详见图 3、图 4、表 1、表 2。

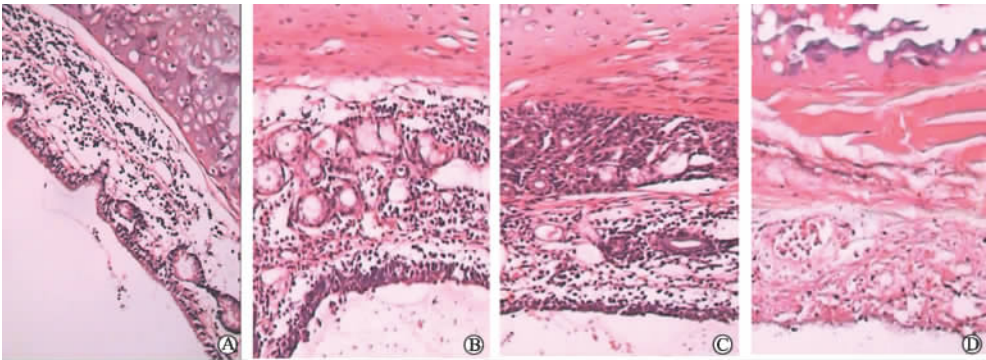


图 2 喉移植术后大鼠移植喉组织的排斥反应观察

Fig 2 Rejection after rat laryngeal heterotopic transplantation (H-E, $\times 10$)

A: 10 mg CsA group on 3 days after transplantation(no rejection); B: 5 mg CsA group on 3 days after transplantation(mild rejection); C: 0 mg CsA group on 7 days after transplantation(moderate rejection); D: 0 mg CsA group on 11 days after transplantation(severe rejection)

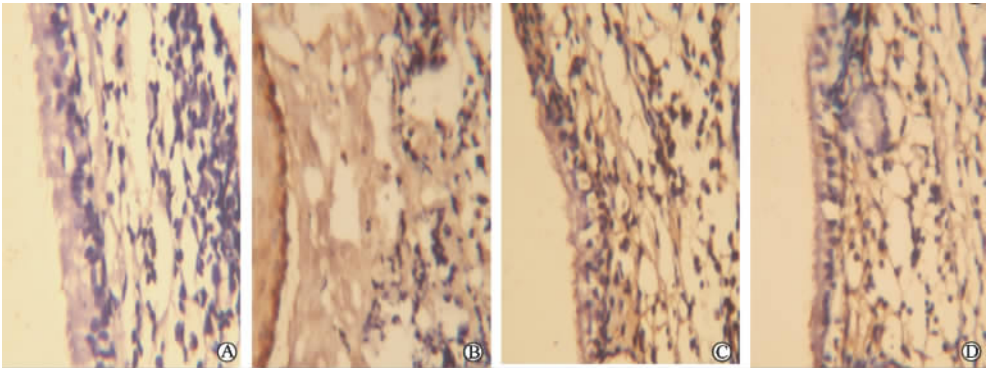


图 3 喉移植术后第 11 日各组大鼠 TNF- α 的表达

Fig 3 Expression of TNF- α in each group on 11 days after laryngeal transplantation (IHE, $\times 400$)

A: Sham control; B: 0 mg CsA group; C: 5 mg CsA group; D: 10 mg CsA group

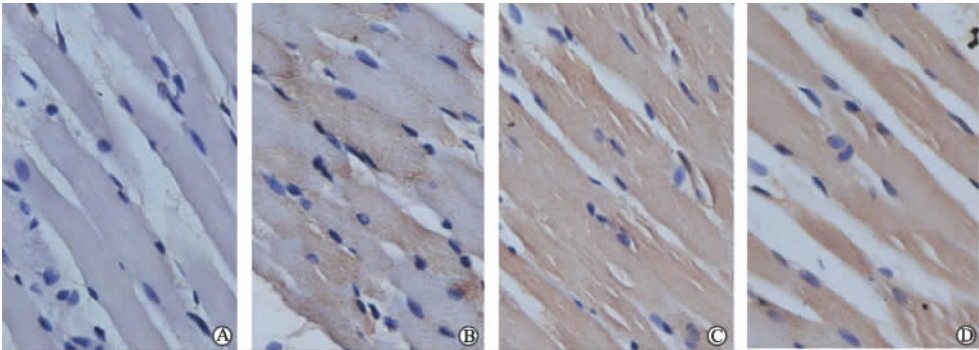


图 4 喉移植术后第 11 日各组大鼠 IL-10 的表达

Fig 4 Expression of IL-10 in each group on 11 days after laryngeal transplantation (IHE, $\times 400$)

A: Sham control; B: 0 mg CsA group; C: 5 mg CsA group; D: 10 mg CsA group

表 1 各组术后不同时间移植喉不同部位 TNF- α 阳性区面积比值

Tab 1 Ratios of positive area of TNF- α in different layers of laryngeal tissues after laryngeal transplantation

(%, $n=7,\bar{x}\pm s$)

Group	Tissue layers			
	Mucosal epithelium	Submucosa	Muscle	Cartilage
Sham control	0	0	0	0
0 mg CsA				
3 d	42.57 $\pm$ 2.85**	36.03 $\pm$ 2.88**	19.51 $\pm$ 3.26	5.17 $\pm$ 1.22
7 d	66.03 $\pm$ 3.73**	46.06 $\pm$ 3.76**	23.77 $\pm$ 3.22	7.67 $\pm$ 1.37
11 d	73.60 $\pm$ 3.31**	54.51 $\pm$ 2.79**	30.13 $\pm$ 2.49	10.66 $\pm$ 1.61
5 mg CsA				
3 d	37.89 $\pm$ 2.15**	29.47 $\pm$ 2.61**	19.19 $\pm$ 3.35	5.31 $\pm$ 1.06
7 d	55.74 $\pm$ 3.37**	46.19 $\pm$ 2.88**	22.86 $\pm$ 2.67	8.20 $\pm$ 1.34
11 d	61.73 $\pm$ 3.06**	49.21 $\pm$ 2.44**	25.80 $\pm$ 3.00	8.99 $\pm$ 1.91
10 mg CsA				
3 d	25.47 $\pm$ 2.50	20.81 $\pm$ 2.92	18.36 $\pm$ 3.23	5.43 $\pm$ 0.96
7 d	25.91 $\pm$ 2.84	21.17 $\pm$ 2.21	18.53 $\pm$ 1.81	5.63 $\pm$ 1.02
11 d	26.60 $\pm$ 3.17	21.43 $\pm$ 2.64	18.73 $\pm$ 2.47	5.71 $\pm$ 0.92

** $P<0.01$ vs 10 mg CsA in mucosal epithelium and submucosal layers at the same point

表 2 各组术后不同时间移植喉不同部位 IL-10 阳性区面积比值

Tab 2 Ratios of positive area of IL-10 in different layers of laryngeal tissues after laryngeal transplantation

(%, $n=7,\bar{x}\pm s$)

Group	Tissue layers			
	Mucosal epithelium	Submucosa	Muscle	Cartilage
Sham control	0	0	0	0
0 mg CsA				
3 d	25.86 $\pm$ 3.03	22.11 $\pm$ 3.03	17.41 $\pm$ 1.99	5.33 $\pm$ 1.07
7 d	28.03 $\pm$ 2.97	21.57 $\pm$ 2.93	16.36 $\pm$ 2.25	5.29 $\pm$ 0.99
11 d	19.70 $\pm$ 2.43**	11.97 $\pm$ 2.06**	8.53 $\pm$ 1.39	2.07 $\pm$ 0.79
5 mg CsA				
3 d	33.74 $\pm$ 3.39	29.51 $\pm$ 3.05	16.74 $\pm$ 2.10	5.56 $\pm$ 0.90
7 d	36.30 $\pm$ 3.29	30.39 $\pm$ 3.78	16.47 $\pm$ 2.85	5.11 $\pm$ 0.73
11 d	22.66 $\pm$ 3.31**	17.93 $\pm$ 2.11**	8.64 $\pm$ 1.64	2.27 $\pm$ 0.85
10 mg CsA				
3 d	54.94 $\pm$ 4.58	40.06 $\pm$ 3.18	18.79 $\pm$ 3.26	6.04 $\pm$ 1.33
7 d	55.87 $\pm$ 3.90	40.66 $\pm$ 3.37	18.07 $\pm$ 3.56	5.99 $\pm$ 0.92
11 d	54.34 $\pm$ 4.46	40.44 $\pm$ 2.53	18.40 $\pm$ 3.21	6.10 $\pm$ 1.07

** $P<0.01$ vs 10 mg CsA in mucosal epithelium and submucosal layers at 11 d after transplantation

3 讨 论

同种移植排斥反应由 T 细胞通过其特异的 T 细胞抗原受体识别移植物与组织相容性抗原的复合物而启动。CD4⁺T 细胞的直接识别途径对启动并导致急性排斥反应起着关键作用。CD4⁺T 细胞按其产生的细胞因子和相应的效应功能至少分为两类。Th1 分泌 TNF- α 、IL-2、IFN- γ 等细胞因子参与细胞免疫反应;Th2 分泌 IL-10、IL-4 和 IL-13 等细胞因子参与体液免疫反应并与免疫耐受有关。在排斥反应发生过程中常伴有 Th1 型细胞因子(TNF- α 、IL-2 等)的表达增高和 Th2 型细胞因子(IL-10、IL-4 等)的不表达或低表达,而在免疫耐受时,则呈

相反的情况。因而人们推测,这种 Th1 和 Th2 型细胞因子相对水平的变化可能是产生排斥反应或者免疫耐受的重要原因。已有文献^[5-6]报道,心、肝、肺、肾等器官移植术后,当受体发生急性排斥反应时,在局部组织或血清中可检测到 TNF- α 水平明显增高,并得到了组织病理学的证实。研究^[7-8]报道显示,在心、肺、肝、角膜移植后,体内 IL-10 的水平维持高水平的受者,急性排斥反应的发生率明显降低,用 IL-10 抑制器官移植后的免疫排斥反应后,可取得良好的结果。因此,TNF- α 被认为在移植急性排斥反应中起重要作用,而 IL-10 则被认为是免疫调节中主要的抑制性细胞因子之一。

本研究采用免疫组化定量分析大鼠喉移植术后

移植组织不同部位 TNF- α 和 IL-10 表达的变化,观察其在喉移植急性排斥反应组和非排斥组的变化以明确不同组织的抗原性。结果表明:喉黏膜及黏膜下结缔组织较肌肉软骨组织表现更强烈的移植排斥反应,供体喉的高抗原性主要集中于喉的黏膜及黏膜下结缔组织。Genden 等^[9]的大鼠气管移植模型也支持这一观点,在停止使用免疫抑制剂的情况下,受体的上皮替代移植物的上皮可以预防排斥反应。因此再上皮化对于呼吸道移植体是一个很有吸引力的方案。应用血管内皮生长因子可以将纤维蛋白矩阵运载至黏膜,将使再上皮化过程明显加速^[10]。以上内容说明组织(黏膜)特异性干涉可能在预防同种异体复合组织移植排斥反应中起到很大作用,从而去除了常规的免疫抑制。这一方案为复合组织(喉)移植的研究提供了新思路。

研究^[11]表明,Th1 和 Th2 型细胞因子表达的变化确实和免疫耐受的产生和维持以及排斥反应的发生具有非常密切的关系。本实验通过观察黏膜上皮组织细胞因子表达的变化,发现在喉移植术后出现急性排斥反应的大鼠,发生轻度排斥反应时 TNF- α 、IL-10 水平均有显著升高,而在发生重度排斥反应时 TNF- α 水平仍显著升高,IL-10 水平却明显下降,且免疫抑制剂的应用能够影响其表达;在未发生急性排斥反应的大鼠,TNF- α 表达虽较对照组升高,但升高的幅度较小,显著低于急性排斥反应组,且 TNF- α 表达水平无持续升高而 IL-10 表达水平亦无明显下降并维持在同一水平。因此,本实验证实免疫耐受的诱导依赖于 CD4⁺ T 细胞向 Th2 型细胞(IL-4、IL-10)倾斜和偏离 Th1 型细胞(TNF- α 、IL-2、IFN- γ)。TNF- α 在排斥反应初期可以正向调节移植体抗原的早期表达,这可能是其参与排斥反应的重要机制之一。IL-10 可抑制 Th1 细胞增殖及产生 IL-2、IFN- γ 等炎症细胞因子,从而抑制 Th1 细胞介导的细胞免疫应答。

因此,通过对比观察可以表明移植组织 TNF- α 及 IL-10 表达水平的变化与排斥反应的程度密切相关,能够反映出移植组织排斥反应进程的变化。移植组织 TNF- α 和 IL-10 表达在术后早期出现明显

改变,结合两者的表达变化可以预测喉移植术后急性排斥反应的发生,为临床喉移植的开展提供了实验依据。

[参考文献]

[1] Strome S, Sloman-Moll E, Samonte B R, et al. Rat model for a vascularized laryngeal allograft[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*,1992,101: 950-953.

[2] Nelson M, Fritz M, Dan O, et al. Tacrolimus and mycophenolate mofetil provide effective immunosuppression in rat laryngeal transplantation[J]. *Laryngoscope*,2003,113: 1308-1313.

[3] Strome M, Strome S, Darrell J, et al. The effects of cyclosporin A on transplanted rat allografts[J]. *Laryngoscope*,1993, 103(4 Pt 1): 394-398.

[4] Lorenz R R, Dan O, Fritz M A, et al. Rat laryngeal transplant model: technical advancements and a redefined rejection grading system[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*,2002,111(12 Pt 1): 1120-1127.

[5] Bathgate A J, Lee P, Hayes P C, et al. Pretransplantation tumor necrosis factor-alpha production predicts acute rejection after liver transplantation[J]. *Liver Transpl*,2000,6: 721-727.

[6] Warle M C, Farhan A, Metselaar H J, et al. *in vitro* cytokine production of TNF alpha and IL-13 correlates with acute liver transplant rejection[J]. *Hum Immunol*,2001,62: 1258-1265.

[7] Plaza D M, Fernandez D, Builes M, et al. Cytokine gene polymorphisms in heart transplantation: association of low IL-10 production genotype with Quilty effect [J]. *J Heart Lung Transplant*,2003,22: 851-856.

[8] Fernandes J R, Duvivier-Kali V F, Keegan M, et al. Transplantation of islets transduced with CTLA4-Ig and TGF beta using adenovirus and lentivirus vectors[J]. *Transpl Immunol*, 2004,13: 191-200.

[9] Genden E M, Iskander A, Bromberg J S, et al. The kinetics and pattern of tracheal allograft re-epithelialization[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*,2003,28: 673-681.

[10] Rees L E, Ayoub O, Haverson K, et al. Differential major histocompatibility complex class II locus expression on human laryngeal epithelium[J]. *Clin Exp Immunol*,2003, 134: 497-502.

[11] Hase T, Chargui J, Inori F, et al. Human interleukin-10 transduced fetal liver stem cells prolong survival of mouse skin and heart allografts[J]. *Transplant Proc*,2005,37: 287-288.

[收稿日期] 2007-04-25

[修回日期] 2007-06-06

[本文编辑] 贾泽军