

供体特异性输注对心脏移植急性排斥反应中细胞因子表达的影响

夏家红 黄毅 刘成硅 肖诗亮 杨辰垣

我们采用全血输注的方法, 观察同种大鼠心脏移植术后移植心局部细胞因子网络在基因水平的变化, 探讨细胞因子网络参与供体特异性输注(DST)的机制。

一、材料与方法

1. 材料: 健康雄性 Wistar 及 SD 大白鼠, 近交系, 受体为 Wistar 大白鼠, 体重 80~100 g, 供体为 SD 大白鼠, 体重 250~300 g。分为 A 组: 对照组; B 组: DST 组。每组 12 例, 其中 7 例用于动态取标本, 其余 5 例用于观察移植存活时间, 共计 24 例。药品: 0.3% 戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司), DST 组所用全血按无菌原则在移植 7 d 前从供体舌下静脉抽取置于 4℃ 冰箱中备有。PCR-Marker E0080 (1 543, 994, 695, 515, 377, 237 Sabc 公司), 引物由上海生工公司合成, 全保真金 Taq 酶、MMLV 逆转录酶(德国宝灵曼公司), Oligo DT 12-18 随机引物(Sabc 公司), MgCl₂ (15 mmol/L, Promega 公司), MixdNTP (10 mmol/L, Promega 公司), RNA 酶抑制剂(Rnasin, Sabc)。

2. 方法: 用药方法: A 组于移植术后应用 0.9% 的生理盐水; B 组于取血当天将全血通过尾静脉注入受体体内。动物心脏移植: 切取供心移植于受体颈部^[1]。以触诊及心电图监测移植心的搏动状况及存活时间。分别于移植术后第 1、3、5、7、9、11、14 天在无菌条件下取移植心置于液氮中待测。逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR): 采用 TRIZOL 试剂盒抽提总 RNA。引物系列参照文献^[2]。以白细胞介素(IL)-10 为例, 反应条件为: 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 45 s, 68℃ 延伸 90 s, 30 个循环后, 94℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存待测。PCR 产物分析: 取 PCR 产物 8 μl 加 6× 上样缓冲液 2 μl, 在 1.5% 的琼脂糖上电泳, EB 染色, Polai 一次性成像系统快速拍照, GDS8000 DNA 定量测定系统中扫描, 读取像素值(Pixel Volume)。

目的基因与参照基因的像素值之比即为分析所用数值。

3. 统计学方法: 资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间行 *t* 检验。

二、结果

1. 移植心存活时间: 对照组移植心存活时间分别为 7、7、8、9、10 d, 平均为 (8.3±1.7) d。结果表明 DST 组移植存活时间较对照组延长, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

2. 目的基因的表达水平: 目的基因表达水平以凝胶电泳条带像素值之比来评价。

三、讨论

通过供体特异输注诱导移植耐受的方法很多。我们选择了移植术前 7 min 输注供体全血的方法诱导 DST 的产生。实践证明这种方法较为有效地诱导耐受的产生(38 d 比 11 d, $P < 0.05$)。病理检查及血象检查均与文献^[3]报道相一致。

在成功地诱导了 DST 的情况下, 我们发现, 细胞因子的表达亦出现了相应的变化。其中, IL-1β 在所有时间点都呈现较强的表达, IL-2 表达在第 3~5 天达到高峰, 随后即迅速下降, CD25(IL-2R) 在第 1 天即达到高峰, IL-4 的表达在整个过程中都较强, 在第 3~5 天出现一个高峰时间, IL-5 的表达几乎抑制不到。IL-6 在第 1 天达到高峰, 并维持在一个较长时间的高水平表达, 直到第 11 天才慢慢下降。IL-10 在术后开始逐渐增强, 到第 7 天达到高峰, 并在较高水平上维持到第 11 天。而 TNF-α 一直表达较低, 高峰不明显, 同对照组相比变化明显。IFN-γ 的表达则一直较强, 变化较不明显。

IL-1β 的基本免疫作用主要在于激活整个细胞免疫过程, 具有广泛的生物活性, 并且其作用无种属特异性, 所以, 检测 IL-1β 的意义在于受体的免疫系统

判断是免疫促进还是抑制。所以, DST 组 IL-1β 表达的增加及较高的水平提示 DST 处理后, 只是抑制了受体对移植物的反应, 而并不抑制受体本身正常的免疫功能。

IL-4、IL-6 和 IL-10 在 DST 诱导耐受中具有明显作用。同对照组相比, 其表达显著增加, 并且具有明显的高峰时期, 与病理检查及移植存活时间的延长密切相关。这表明应用某些细胞因子可选择性控制免疫应答的方向。已知 T_H1 细胞主要参与细胞免疫应答, 而通过诱导 T_H2 细胞的分化与功能, 可干扰 T_H1 细胞的促排斥效应, 这也提示 DST 形成耐受的可能机制之一在于 T_H 细胞因子调节 T_H 细胞之间的平衡, 从而通过“免疫偏离”选择性控制免疫应答的方向, 达到形成移植耐受的目的^[4-6]。

有学者应用一种供体特异性的抗 CD45 的单克隆抗体来动态清除过路的白细胞, 发现由 DST 诱导的移植耐受, 被逆转。这证明了嵌合耐受的可能性。当然还需要进一步的实验和临床工作来验证这一点。

参 考 文 献

- 1 夏家红, 杨辰垣. 同种大白鼠颈部心脏原位移植模型的建立和观察. 中华实验外科杂志, 2000, 17: 565-567.
- 2 Siegling A, Lehmann M, Platzer C, et al. A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. J Immunol Meth, 1994, 177: 23-28.
- 3 Starzl T, Demetris AJ, Trucco M, et al. Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. Hepatology, 1993, 17: 1127.
- 4 Quigley R, Woold K, Morris P, et al. Transfusion induces blood donor-specific suppressor cells. J Immunol, 1989, 142: 463-470.
- 5 Steiger J, Nickerson P, Stewer W, et al. IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. J Immunol, 1995, 155: 489-498.
- 6 Konieczny B, Dai Z, Eluood E, et al. IFN-γ is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD₂₈ and CD₄₀ ligand T cell costimulation pathways. J Immunol, 1998, 160: 2059-2064.