

# 不同时间脾切除联用环孢素 对协调性异种心脏移植物存活的影响

王 博, 吕 毅, 张晓刚, 李 晖, 仵 正, 潘承恩  
(西安交通大学医学院第一附属医院肝胆外科, 陕西西安 710061)

**摘要:**目的 探讨脾切除联用环孢素对协调性异种移植心脏存活时间的影响及其机制。方法 建立协调性异种心脏移植模型。分别采用不同时间脾切除联用环孢素, 观察异种移植物的生存时间。用 CH50 法检测各组动物血清中总补体活性。应用流式细胞技术检测动物血清中异种反应性抗体 IgG、IgM 的滴度变化。移植标本 HE 染色观察病理学改变。免疫组化染色观察各实验组不同时间移植组织 IgG、IgM 抗体的沉积。结果 脾切除联用环孢素能够显著延长移植物的生存时间( $P < 0.05$ ), 降低受者体内异种反应性抗体的滴度。结论 脾切除联用环孢素可以减少移植术后早期受者体内异种反应性抗体的产生, 延长异种移植物的生存时间。

**关键词:** 异种移植; 环孢素; 心脏移植

中图分类号: R645.2

文献标识码: A

文章编号: 1674-8259(2007)02-0193-04

## The impact of splenectomy combined with cyclosporine A on the survival of the concordant cardiac xenotransplantation

Wang Bo, Lü Yi, Zhang Xiaogang, Li Hui, Wu Zheng, Pan Cheng'en  
(Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital,  
Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To investigate the impact of splenectomy combined with cyclosporine A on the survival time of the concordant cardiac xenotransplantation. **Methods** Concordant cardiac xenotransplantation models were constructed in Hamster and SD rats. The rats were divided into different groups according to different treatment. The survival time of the xenografts was observed. The complement activity was detected by CH50 method. The xenoreactive IgG and IgM were monitored by flow cytometry. The pathology and deposition of xenoreactive IgG and IgM on the xenograft were observed. **Results** The survival time of the xenografts was prolonged significantly by splenectomy combined with cyclosporine A, and the xenoreactive antibodies decreased remarkably. **Conclusion** The xenoreactive antibody could be decreased through splenectomy combined with cyclosporine A early after xenotransplantation, and the survival time of the xenografts was prolonged.

**KEY WORDS:** xenotransplantation; cyclosporine A; cardiac transplantation

同种异体器官移植成为终末期肾脏、心脏、肝脏等疾病的常规治疗手段, 已经为越来越多的患者所接受。但是, 人类供体器官缺乏一直困扰着器官移植的发展。用合适的动物作为器官供体, 可能成为解决器官缺乏的有效手段之一。自 20 世纪 60 年代起, 人们用非人类器官进行异种移植的尝试以来, 已经进行了肾、心、肝脏等器官异种移植。但是, 异种移植的免疫排斥反应较同种移植更为强烈。协调性异种移植(concordant xenotransplantation)中, 移植物虽不发

生超急性排斥反应, 但是在移植术后 3-4 d 内将会发生急性血管排斥反应(acute vascular rejection, AVR)。近年来研究发现, 诱生型异种反应性抗体(elicited xenoreactive antibody, EXA)在 AVR 中起到重要作用。EXA 结合于移植物血管内皮细胞上, 激活补体、活化血管内皮细胞, 产生一系列黏附分子和前炎症细胞因子, 最终导致移植物被排斥<sup>[1]</sup>。因此, 通过调节移植术后早期 EXA 的产生可能延缓或减轻排斥反应的发生。本试验中, 我们将通过不同时间脾切除联用环孢素对受者进行干预, 观察异种移植在受者体内的存活情况, 初步探讨异种反应性抗体在异种排斥反应中的作用。

# 1 材料与方法

1.1 动物与分组 供体为健康成年金黄地鼠 70 只, 80–100 g, 雌雄不拘。受体 SD 大鼠 70 只, 180–200 g, 均购自西安交通大学医学院实验动物中心。采用“双套入”法建立金黄地鼠对 SD 大鼠协调性异种心脏移植模型。将实验动物随机分为 6 组: 对照组( $n=10$ ), 不予任何治疗措施; 环孢素组( $n=10$ ), 移植当日起每日腹腔注射环孢素 10 mg/kg; 脾切除组( $n=10$ ), 移植心脏复跳后即予以脾切除; D0 脾切除+CsA 组( $n=15$ ), 移植心脏复跳后即予以脾切除, 每日腹腔注射环孢素 10 mg/kg; D1 脾切除+CsA 组( $n=15$ ), 移植术后 1 d 予以脾切除, 每日腹腔注射环孢素 10 mg/kg; D3 脾切除+CsA 组( $n=10$ ), 移植术后 3 d 予以脾切除, 每日腹腔注射环孢素 10 mg/kg。

1.2 术后处理与观察 每组随机选取 5 例实验动物观察移植心脏存活时间。移植心脏复跳至停跳的时间为异种移植植物存活时间<sup>[3]</sup>。移植心脏存活时间大于 30 d 认为长期存活。移植植物在 3 d 内停跳, 视为手术失败。

1.3 血清标本与组织标本的采集 分别于移植术后 1、2、3、7、14、30 d 剖杀动物取血清、移植心脏标本, 将血清标本保存在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中, 以备检测血清中补体活性和异种反应性抗体 IgG、IgM 的滴度。取供体心脏组织进行 HE 染色的组织病理学检测。

1.4 CH50 实验检测各实验组血清补体溶血活性 配制 2%(体积分数)绵羊红细胞悬液。各实验组血清、正常大鼠血清(对照)稀释 20 倍。用生理盐水将溶血素稀释为 2 u/mL。在各管中分别加入试剂和反应物, 放入  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴箱中温浴 30 min。选择溶血程度与标准管相近的两管在分光光度计上, 540 nm 波长条件下, 测量读取吸光度  $A$  值。每毫升血清总补体活性(单位)= $1/\text{血清用量}\times\text{稀释倍数}$ 。

1.5 异种反应性抗体 IgG、IgM 的测定 应用流式细胞技术测定对照组、D1 脾切除+CsA 组、D3 脾切除+CsA 组大鼠血清中异种反应性 IgG、IgM 抗体<sup>[3]</sup>。采用 CellQuest 软件分析系统进行数据处理。实验动物血清中所含异种反应性 IgG、IgM 抗体相对滴度应用下列公式表示:

异种反应性 IgG、IgM 抗体相对滴度=各实验组血清平均荧光强度/正常大鼠血清平均荧光强度。

1.6 免疫组化染色检测各实验组移植植物组织中异种反应性抗体 IgM、IgG 的沉积 石蜡切片脱蜡至水, 3%(体积分数)  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温下孵育 20 min。微波抗原修复, 10%(体积分数)山羊血清封闭。滴加一抗, 抗体稀释度为 1:50。置冰箱  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜。加聚合物增强

剂 50–100  $\mu\text{L}$ , 在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 20 min 后, 每张切片滴加 DAB 显色液。移植植物组织中 IgG、IgM 沉积时阳性表达的判定: 移植植物血管内皮细胞表面和组织中可见棕黄色颗粒样物质沉积。

1.7 统计学处理 实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, SPSS10.0 软件包进行数据分析,  $P<0.05$  为具有统计学意义。

# 2 结果

2.1 移植心脏存活时间 脾切除组、D0 脾切除+CsA 组、D1 脾切除+CsA 组、D3 脾切除+CsA 组移植植物存活时间明显较对照组延长。环孢素组移植植物生存时间与对照组无显著性差异。各实验组移植心脏存活时间见表 1。

表 1 不同组异种移植植物的存活时间

Table 1 Survival time of xenografts in different groups ( $\bar{x}\pm s$ )

Group	<i>n</i>	Survival time (d)
Control group	5	$3.4\pm0.55$
CsA group	5	$3.8\pm0.45$
Splenectomy group	5	$6.4\pm1.52^*$
D0 Splenectomy+CsA group	5	$>30^*$
D1 Splenectomy+CsA group	5	$>30^*$
D3 Splenectomy+CsA group	5	$7.4\pm1.14^*$

\* $P<0.05$  vs control group

2.2 移植物的病理学改变 对照组、环孢素组、脾切除组、D3 脾切除+CsA 组移植心脏发生排斥反应时, 光镜下可见广泛血管内血栓形成伴心肌组织间大量的出血。心肌组织中大量的单个核细胞、淋巴细胞浸润(图 1A)。D0 脾切除+CsA 组、D1 脾切除+CsA 组移植术后第 14 天时, 心脏组织中可见炎细胞浸润, 无明显出血、血栓形成。移植术后第 30 天时, 可见少量微血栓形成, 未见明显组织出血, 组织间有少量单个核细胞和淋巴细胞浸润(图 1B)。

2.3 各组不同时间 CH50 值的变化 正常 SD 大鼠血清总补体活性为( $86.6\pm11.5$ )u/mL(正常参考值范围为 50–100 u/mL)。本实验中, 对照组、环孢素组、脾切除组、D3 脾切除+CsA 组受体体内总补体活性在术后明显下降, 提示受者体内大量补体活化。D0 脾切除+CsA 组和 D1 脾切除+CsA 组受体血清 CH50 值在移植术后处于正常范围内。

2.4 异种反应性抗体 IgG、IgM 在移植心脏组织中的沉积 对照组、环孢素组、脾切除组、D3 脾切除+CsA 组, 移植心脏发生排斥反应时, 组织中可见大量 IgG、IgM 沉积于血管内皮细胞表面(图 1C–D)。D0 脾切除+CsA 组和 D1 脾切除+CsA 组长期存活(6

存时间大于 30 d)的移植心脏血管内皮细胞表面可见 异种反应性抗体的沉积(图 1E - F)。

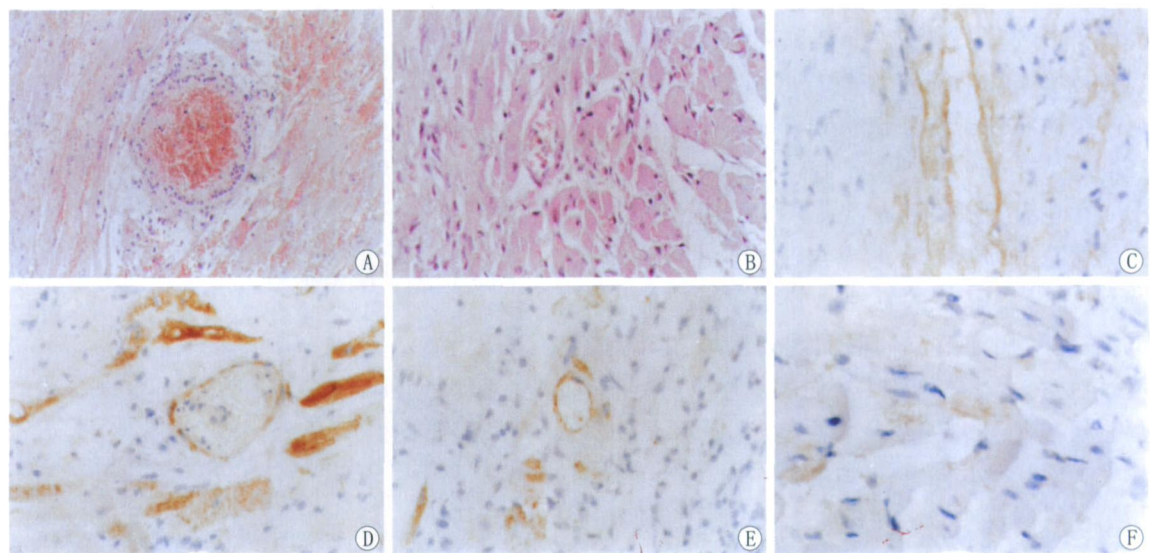


图 1 各实验组移植物的病理学改变及异种反应性抗体的沉积  
Fig. 1 Pathology and deposition of xenoreactive IgG and IgM on the xenografts  
A: xenografts harvested 3 days after xenotransplantation in the control group; B: xenografts harvested 30 days after xenotransplantation in the D1 splenectomy + CsA group; C: IgG deposition on the endothelial cell of the xenograft 3 days after the transplantation in the control group; D: IgM deposition on the endothelial cell of the xenograft 3 days after the transplantation in the control group; E: IgG deposition on the endothelial cell of the xenograft 30 days after the transplantation in the D0 splenectomy + CsA group; F: IgM deposition on the endothelial cell of the xenograft 30 days after the transplantation in the D0 splenectomy + CsA group

## 2.5 各实验组动物体内抗异种反应性抗体的变化

对照组、D1 脾切除 + CsA 组、D3 脾切除 + CsA 组大鼠血清中异种反应性 IgM、IgG 抗体的变化(图 2 - 4)。

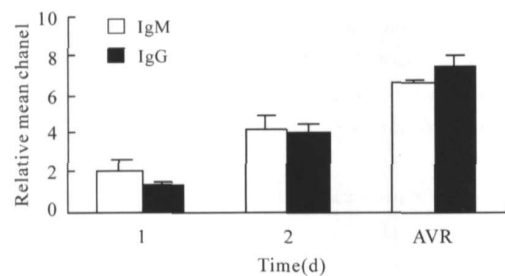


图 2 对照组大鼠血清中异种反应性 IgM、IgG 的变化  
Fig. 2 Changes of serum xenoreactive IgM and IgG in the control group

## 3 讨 论

在协调性异种移植时,异种抗原刺激受者免疫系统可以产生较高水平的诱导型异种反应性抗体(elicited xenoreactive antibody, EXA)<sup>[4-7]</sup>,抗体结合于异种移植植物血管内皮细胞表面,激活补体、活化内皮细胞<sup>[8]</sup>,继而导致排斥反应的发生。排斥反应的发生与 EXA IgM、EXA IgG 关系密切<sup>[9]</sup>。EXA IgG 的产生是 T 细胞依赖性的。这类抗体的产生可以被环孢素等免疫抑制剂所抑制。EXA IgM 的产生是

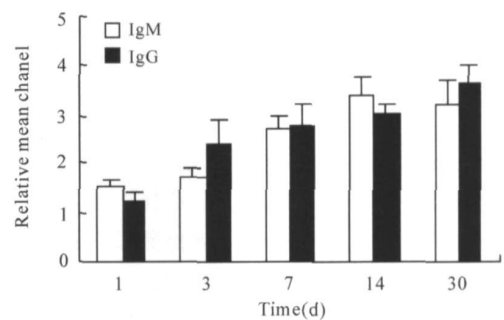


图 3 D1 脾切除 + CsA 组大鼠血清中异种反应性 IgM、IgG 的变化  
Fig. 3 Changes of serum xenoreactive IgM and IgG in the D1 splenectomy + CsA group

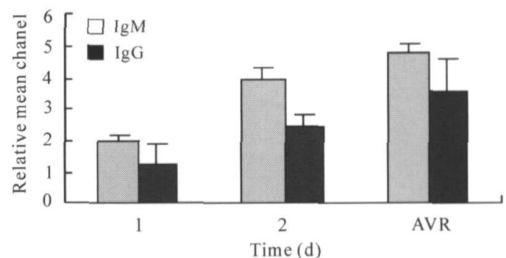


图 4 D3 脾切除 + CsA 组大鼠血清中异种反应性 IgM、IgG 的变化  
Fig. 3 Changes of serum xenoreactive IgM and IgG in the D3 splenectomy + CsA group

T 细胞非依赖性的, 其产生不受环孢素等 T 细胞免疫抑制剂的影响。

异种移植中, 脾脏是产生 T 细胞非依赖性抗体和 B 淋巴细胞介导的体液免疫反应的重要器官<sup>[10]</sup>。脾脏的超微结构有利于抗原识别和抗原特异性效应细胞的产生<sup>[11]</sup>。有研究表明, 产生异种抗体的 B 淋巴细胞主要存在于大鼠脾脏内<sup>[12-14]</sup>。因此, 我们推测可以通过脾切除来抑制受者体内异种反应性抗体的产生, 从而延缓异种移植的急性血管排斥反应的发生。本试验中, 我们通过不同时间脾切除联用环孢素, 观察移植物在受者体内的生存时间。环孢素组移植物生存时间与对照组间无显著性差异, 提示 EXA IgM 在急性血管排斥反应中起到重要作用。脾切除组移植物生存时间较对照组延长 2-3 d, 但不能使异种移植物长期存活。证实协调性异种移植时, EXA IgG 也参与了急性血管排斥反应。手术当天和术后第 1 天脾切除联用环孢素后, 异种移植物能够在受者体内长期存活。CH50 实验显示对照组、环孢素组、脾切除组、D3 脾切除+C<sub>s</sub>A 组受者体内的总补体活性逐渐升高, 直至发生排斥反应。然而, D0 脾切除+C<sub>s</sub>A 组和 D1 脾切除+C<sub>s</sub>A 组受者体内总补体活性始终处于正常范围内。通过检测受者体内异种反应性抗体滴度后发现: 尽管 D1 脾切除+C<sub>s</sub>A 组实验动物体内存在一定量的异种反应性抗体, 但其一直处于低水平。这与移植术后早期脾切除联用环孢素有关。其可能原因是: 低水平的异种反应性抗体不足以激活补体。随着移植时间的延长, 受者体内的异种反应性抗体虽然有升高趋势, 但移植物仍然没有被排斥。这可能与移植物本身发生的一系列改变有密切关系, 即低浓度的抗体对内皮细胞的持续性刺激导致内皮细胞对损伤的敏感性下降<sup>[15-16]</sup>。D3 脾切除+C<sub>s</sub>A 组由于在移植术后第 3 天进行脾切除, 不能在早期抑制 EXA IgM 的产生。因此, 移植物不能长期存活。

综上所述, 通过抑制移植术后早期受者体内异种反应性抗体的产生使其处于较低水平, 可以显著延长异种移植物的生存时间, 有利于减少排斥反应的发生。

参考文献:

[ 1 ] Saadi S, Platt JL. Humoral rejection and endothelial cell activation [ J ]. *Xenotransplantation*, 2002, 9( 4 ): 239-241.  
[ 2 ] Tabata T, de Perrot M, Keshavjee S, *et al.* Accommodation af-

ter lung xenografting from hamster to rat [ J ]. *Transplantation*, 2003, 75( 5 ): 607-612.  
[ 3 ] Wang N, Lee J. M, Tobiasch E, *et al.* Induction of xnoegrft accommodation by modulation of elicited antibody responses [ J ]. *Transplantation*, 2002, 74( 3 ): 334-345.  
[ 4 ] Brouard S, Bouhours D, Sebille F, *et al.* Induction of anti-forssman antibodies in the hamster to rat xenotransplantation models [ J ]. *Transplantation*, 2000, 69( 6 ): 1193-1201.  
[ 5 ] Lin Y, Soares MP, Sato K, *et al.* Long term survival of hamster hearts in presensitized rats [ J ]. *J Immunol*, 2000, 164( 9 ): 4883-4892.  
[ 6 ] Miyatake T, Sato K, Takigami K, *et al.* Complement fixing elicited antibodies are a major component in the pathogenesis of xenograft rejection [ J ]. *J Immunol*, 1998, 160( 8 ): 4114-4123.  
[ 7 ] Koyamada N, Miyatake T, Candinas D, *et al.* Transient complement inhibitin plus T cell immunosuppression induce long term survival of mouse to rat cardiac xenografts [ J ]. *Transplantation*, 1998, 65( 9 ): 1210-1215.  
[ 8 ] Saadi S, Takahashi T, Holzkecht RA, *et al.* Pathways to acute humoral rejection [ J ]. *Am J Pathol*, 2004, 164( 3 ): 1073-1080.  
[ 9 ] Sato K, Takigami K, Miyatake K, *et al.* Suppression of delayed rejection by specific depletion of elicited antibodies of the IgM isotype [ J ]. *Transplantation*, 1999, 68( 6 ): 844-854.  
[ 10 ] Carobbi A, Aranceda D, Thomas F, *et al.* Splenectomy is a potent immunosuppressive modality for cardiac xenografting [ J ]. *Transplant Proc*, 1993, 25( 1 ): 419-420.  
[ 11 ] Fu YX, Chaplin DD. Development and maturation of second lymphoid tissues [ J ]. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17( 2 ): 399-433.  
[ 12 ] Van den Eertwegh A, Boersma W, Claassen E, *et al.* Immunological functions and in vivo ceH cell interactions of T cells in the spleen [ J ]. *Crit Rev Immunol*, 1992, 11( 6 ): 337-342.  
[ 13 ] Miyazawa H, Murase N, Demetris A, *et al.* Hamster to rat kidney xeno transplantation [ J ]. *Transplantation*, 1995, 59( 8 ): 1183-1189.  
[ 14 ] Fujino Y, Kawamura T, Hullett D, *et al.* Evaluation of cyclosporine, mycophenolate mofetil, and brequinar sodium combination therapy on hamster to rat cardiac xenotransplantation [ J ]. *Transplantation*, 1994, 57( 1 ): 41-46.  
[ 15 ] Delikouras A, Fairbanks LD, Simmonds AH, *et al.* Endothelial cell cytoprotection induced in vitro by allo or xenoreactive antibodies is mediated by signaling through adenosine A2 receptors [ J ]. *Eur J Immunol*, 2003, 33( 11 ): 3127-3135.  
[ 16 ] Suhr BD, Guzman Paz M, Apasova EP, *et al.* Induction of accommodation in the hamster to rat model requires inhibition of the membrane attack complex of complement [ J ]. *Transplant Proc*, 2000, 32( 5 ): 976.

( 编辑 韩维栋 )