

· 论 著 ·

mdr-1 基因骨髓造血干细胞移植诱导大鼠肝移植免疫耐受*

范 伟, 张 莹, 郭江富, 王金龙, 柳 杨

(贵州省人民医院肝胆外科, 贵州贵阳 550002)

摘要:目的 探讨 mdr-1 基因骨髓造血干细胞移植诱导肝移植术后免疫耐受的可行性及其可能机制。方法 选用雄性 Wistar 大鼠 30 只为肝移植供体,另选雌性 SD 大鼠 20 只为异基因肝移植受体,随机分为 mdr-1 基因骨髓造血干细胞移植联合肝移植组(A组)和单纯肝移植组(B组)。雌性 Wistar 大鼠 10 只为同基因肝移植受体(C组)。比较 A、B 两组大鼠肝移植术后 1 周生存率、生存状况、生存时间,以及移植肝脏的病理变化。结果 C 组大鼠生存时间均达 60 d 以上,A 组为(31.2±4.9)d,明显高于 B 组[(12.1±4.7)d],差异有统计学意义($P<0.05$)。B 组病理组织切片可见中、重度急性排斥反应,肝内单核细胞浸润较为明显,主要集中在汇管区;A 组移植肝内组织损伤程度明显减轻;C 组基本无排斥反应,接近正常肝组织。结论 mdr-1 基因骨髓造血干细胞可明显减轻大鼠肝移植后免疫排斥反应。

关键词:肝移植;免疫耐受;mdr-1 基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.11.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)11-1046-03

Induction of immune tolerance of rat liver transplantation via transplantation of mdr-1 gene bone marrow stem cells*

Fan Wei, Zhang Ying, Guo Jiangfu, Wang Jinlong, Liu Yang

(Department of Surgery, People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550002 China)

Abstract: **Objective** To discuss the feasibility and possible mechanism of mdr-1 gene bone marrow stem cell transplantation inducing immune tolerance after liver transplantation. **Methods** Thirty male Wistar rats were used as the liver transplantation donors and 20 female SD rats as allogeneic liver transplantation recipients. The rats were randomly divided into two groups, ie, Group A (treated with mdr-1 gene Hematopoietic stem cell transplantation plus liver transplantation) and Group B (sole liver transplantation). Ten female Wistar rats were use as syngeneic liver transplantation recipients(Group C). The survival rate, survival status, survival time and the pathological changes of the transplanted liver at one week after transplantation were compared between groups. **Results** The rats in Group C survived for over 60 days. The rats in Group A survived for(31.2±4.9) days, which was significantly higher than (12.1±4.7) days in Group B($P<0.05$). Histologic results showed moderate to severe acute rejection, obvious intrahepatic inflammatory cell infiltration mainly in the portal area in Group B. Tissue injury of the transplanted liver was significantly alleviated in Group A. There was little rejection in Group C, which was close to the normal liver tissue. **Conclusion** The results of the study indicate that transplantation of mdr-1 gene bone marrow stem cells can markedly alleviate the immunological rejection after rat liver transplantation.

Key words: liver transplantation; immune tolerance; mdr-1 gene

目前,肝脏移植(liver transplantation, LT)已成为治疗终末期肝病最有效的方法。然而,同种异体排斥反应仍然是器官移植的主要障碍,肝移植术后急性排斥反应发生率仍可高达 12%~34%^[1-5]。目前的研究表明在给予适当处理后,联合供者造血干细胞移植甚至能诱导出非免疫特惠器官——同种异基因的大鼠皮肤或者心脏的移植耐受^[6-8]。因而,建立微嵌合状态这一观点,对移植免疫耐受的诱导确有一定的理论指导意义和实际应用价值。本研究的目的在于探讨联合携 mdr-1 基因的骨髓造血干细胞移植是否可通过建立微嵌合状态而诱导免疫耐受。

1 材料与方 法

1.1 材料 选用雄性 Wistar 大鼠 30 只为肝移植供体,另选雌性 SD 大鼠 20 只为异基因肝移植受体,随机分为 mdr-1 基因骨髓造血干细胞移植联合肝移植组(A组)和单纯肝移植组(B组)。雌性 Wistar 大鼠 10 只为同基因肝移植受体(C组)。

1.2 携 mdr-1 骨髓造血干细胞的构建 质粒(pHamdr1/A)由美国国立癌症研究所 Gottesman 教授惠赠;本院已构建并冻存含全长 mdr-1 基因 cDNA 的产病毒包装细胞 PA317-Hamdr1/A。浓缩病毒上清液的制备:用含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养细胞,收集上清液。经 40 000 r/min 低温离心 2 h,沉淀用含 10% 胎牛血清的 IMDM 重悬(按 6.5 倍浓缩)后灭菌待用;获取供肝后,无菌取出雄性 Wistar 大鼠(RT11)股骨和胫骨,用冰 DMEM 液冲洗骨髓腔,Tris/NH₄CL 裂解红细胞,加入肝素抗凝后进行密度梯度离心,收集界面的有核细胞层制成单细胞悬液。将骨髓细胞悬液加入 24 孔板,(2.0~5.0)×10⁵/孔,同时按比例加入鼠 IL-3 20 ng/mL、人 IL-6 50 ng/mL 以及鼠 SCF 50 ng/mL,聚凝胺 2 μg/mL 及浓缩病毒上清液,隔日半量换液以补充新鲜病毒上清液及营养成分;24~48 h 后收集细胞即为携 mdr-1 基因骨髓造血干细胞。

1.3 大鼠肝移植后急性排斥反应动物模型的建立 采用 ka-

* 基金项目:贵州省省长基金资助项目[黔省专合字(2008)103];贵州省特助基金资助项目(TZJF-2007-46);贵州省科技厅级基金资助项目(2007-2230)。

mada 两袖套法^[9-10]建立雄性 Wistar (供体)→雌性 SD(受体)大鼠肝移植后的急性排斥反应(AcR)动物模型。因构建携 mdr-1 基因骨髓造血干细胞需要 48 h,因此,移植术后 48 h 内,所有动物均给予 CsA 15 mg/d 抗排斥反应。参照文献,48 h 后受体鼠接受 Co-60Y 射线 1.5 Gy 亚致死性照射(抑制细胞免疫,并腾空受体骨髓的“龛位”以利于转基因骨髓)。同时及 24 h 后,分 2 次经中央尾静脉注入 10⁶~10⁷ 个携 mdr-1 基因的骨髓造血干细胞,建立携 mdr-1 基因联合移植的动物模型,分别以携空载及骨髓造血干细胞回输为对照组,继续给予 CsA 15 mg/d 抗 AcR 处理 3 d(利于植入细胞定植)。

1.4 观察指标

1.4.1 获取光、电镜标本 观察病理形态变化,并根据 Williams 标准,将 AcR 分为 4 级:0 级无排斥证据;I 级(轻度排斥)汇管区轻度单核细胞浸润,轻度血管内皮炎与胆管损伤;II 级(中度排斥)汇管区较重的单核细胞浸润,伴肝细胞局灶坏死但无桥接坏死;III 级(重度排斥)汇管区显著单核细胞浸润,肝实质桥接坏死。

1.4.2 微嵌合及免疫耐受状态的检测 微嵌合状态检测:参照文献,采用聚合酶链反应(PCR)检测雌性受体大鼠外周血细胞中雄性供体 Wistar 大鼠特有的性别决定基因 SRY(Y 染色体的特异性片段)作为微嵌合的指标;术后 1、2、3 个月分别取外周血抽提 DNA,引物序列来自大鼠 SRY 基因库(No. AJ222688),上游引物:5'-cat ctc tga ctt cct ggt tgc aa-γ,下游引物:5'-atg ctg gga ttc tgt tga gcc-3'。PCR 产物为 241 bp,对应于 SRY 基因 273~514 位点之间。同时以雌性 SD 大鼠(♀)和雄性 Wistar 大鼠(♂)作为阴性和阳性对照。

1.4.3 迟发型超敏反应(DTH)检查 于 SD 大鼠腹股沟皮下注射 1×10⁷ (50 μL) Wistar 大鼠脾细胞预致敏,7 d 后于右后脚掌注射 1×10⁷ 相同的脾细胞,左后脚掌注射 50 μL Hanks 液作对照。24 h 后测量两脚掌的厚度,取其差值作为 DTH 指标。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计分析软件(SPSSInc, Chicago, IL, USA)。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用单因素方差分析比较各组间差异的显著性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。用 Kaplan-Meier 模式绘制各组动物的生存曲线,并计算生存率。

2 结 果

受体大鼠 30 只均计入最终统计。C 组大鼠生存时间均达 60 d 以上,A 组为(31.2±4.9)d,明显高于 B 组[(12.1±4.7)d],差异有统计学意义($P < 0.05$)。B 组病理组织切片可见中、重度急性排斥反应,肝内单核细胞浸润较为明显,主要集中在汇管区(封 2 图 1);A 组移植肝内组织损伤程度明显减轻;C 组基本无排斥反应,接近正常肝组织(封 2 图 2)。DTH 2 BMT 20 d 后,见表 1。C、A 组对 SD 大鼠脾细胞 DTH 反应均在较低水平,差异无统计学意义,但两组与 B 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 迟发性超敏结果($\bar{x} \pm s$)

组别	DTH 差值(mm)
A 组	0.26±0.024
B 组	0.82±0.029*

*: $P < 0.05$,与 A 组比较。

3 讨 论

肝移植之父 Starzl 在移植后存活 30 年以上的多种器官移植受体体内发现广泛存在低水平供者白细胞嵌合,一组存活 10 年以上的肝移植受体全身多种组织都存在微嵌合,进而提出了移植免疫反应的双向模式。即无论在血管化的器官移植或骨髓移植时,宿主抗移植反应(HVGR)与移植抗宿主反应(GVHR)都可同时存在。移植中的过客细胞进入受体体内并分布于全身组织,受者的白细胞也进入移植,宿主免疫系统被激活发生 HVGR,同样供者的过客细胞也会被受体抗原激活而发生 GVHR,在持久的免疫抑制剂干预之下,通过诱发各种免疫调节机制,如否决机制、抑制细胞、细胞因子类别偏移等,最终达无反应状态^[11];即 HVGR 和 GVHR 同时发生的后果并非加速了对移植物的排斥,相反,两者因相互制约而可能建立稳定的嵌合状态,诱导免疫耐受。尽管微嵌合可能只是一种表面现象,但以此理论为基础,确有多项实验表明在给予适当处理后,联合供者造血干细胞移植甚至能诱导出非免疫特惠器官——同种转基因的大鼠皮肤或者心脏的移植耐受^[12]。因而,建立微嵌合状态这一观点,对移植免疫耐受的诱导确有一定的理论指导意义和实际应用价值。

显然,转基因抗原的持续存在对于耐受的维持起到重要作用,抗原浓度降低到一定阈值,免疫系统对抗原的反应性就会恢复。因此,要想微嵌合持续存在,输注的转基因细胞最好具有自我更新能力。目前,实验所广泛采用的骨髓造血干细胞就具备自我更新能力。但是,骨髓移植前免疫抑制处理(亚致死剂量的化疗/放射照射)以腾空受体骨髓“龛位”的细胞毒性,以及骨髓移植后短期内采用的大剂量细胞毒性药物,在破坏受者骨髓细胞的同时,也必然破坏植入的骨髓细胞而不能维持微嵌合等问题,目前尚不能有效解决^[13-14]。如何保护植入的异体造血干细胞以维持微嵌合成为问题的关键。最近,作者多项实验结果显示,转染 mdr-1 基因的骨髓造血干细胞移植使得机体对移植前的放射照射及随后的大剂量化疗药物的耐受均成为可能^[15-18]。

本实验中,肝移植后 7 d,大鼠腹腔内有不等量的淡红色腹水,肝脏与胃、大网膜、肠管等周围组织粘连,移植肝脏不同程度肿大,其中 A、B 组移植肝肿胀尤为明显,肝内炎细胞浸润较为明显,主要集中在汇管区,肝叶多处可见斑片状坏死灶,切开时肝包膜多由于明显水肿而外翻。而使用环孢素后大鼠移植肝汇管区较多炎细胞浸润,小胆管增生、管壁内及胆管周围炎细胞浸润,胆管上皮核广泛空泡变。使用 mdr-1 修饰诱导的大鼠移植肝内组织损伤程度显著减轻,轻度汇管区炎症,淋巴细胞浸润减少;血管上皮或胆管上皮损伤也相对较轻。

本研究结果显示,转基因移植大鼠肝脏移植后生存时间仅为(12.1±4.7)d,而转染 mdr-1 基因的骨髓造血干细胞移植干预后生存时间可延长至 31.2 d,C 组大鼠生存时间则显著延长,提示转染 mdr-1 基因的骨髓造血干细胞移植诱导供体器官,营造诱导免疫耐受的微环境,突破同种间或异种间的免疫屏障,使同种或异种植物有功能地长期存活。

参考文献:

[1] Kwekkeboom J, Tha-In T, Tra WM, et al. Hepatitis B immunoglobulins inhibit dendritic cells and T cells and protect against acute rejection after liver transplantation

- [J]. *Am J Transplant*, 2005, 21(5): 2393-2402.
- [2] Daly AK, Day CP, Donaldson PT. Polymorphisms immunoregulatory genes; towards individualized immunosuppressive therapy? [J]. *Am Pharmacogenomics*, 2002; 2(1): 1-3.
- [3] Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, et al. Genomic amplification of a decoy receptor for fas ligand in lung and colon cancer[J]. *Nature*, 1998, 396(6): 699-703.
- [4] Arnold B. Levels of peripheral tcell tolerance[J]. *Transpl Immunol*, 2002, 10(2): 109-114.
- [5] Goddard S, Adams DH. New approaches to immunosuppression in liver transplantation[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17(2): 116-126.
- [6] Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplantation in the rat[J]. *Surgery*, 1983, 93(1): 64-69.
- [7] Sayegh MH, Fine NA, Smith JL, et al. Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the same donors[J]. *Ann Intern Med*, 1991, 114(8): 954-955.
- [8] Helg C, Chapuis B, Bolle JF, et al. Renal transplantation without immunosuppression in a host with tolerance induced by allogeneic bone marrow transplantation [J]. *Transplantation*, 1994, 58(11): 1420-1422.
- [9] Delriviere L, Gibbs P, Kobayashi E, et al. Detailed modified technique for safer harvesting and preparation of liver graft in the rat[J]. *Microsurgery*, 1996, 17(6): 690-699.
- [10] Metzler B, Gfeller P, Bigand M, et al. Combinations of anti-LFA-1, everolimus, anti-CD40 ligand, and allogeneic bone marrow induce central transplantation tolerance through hemopoietic chimerism, including protection from Chronic heart allograft rejection [J]. *J Immunol*, 2004, 173(10): 702-703.
- [11] 李坚, 王洪林. 肝癌肝移植术后肝癌复发的研究进展[J]. *中华外科杂志*, 2005, 43(11): 753-756.
- [12] Sutcliffe R, Maguire D, Murphy P, et al. Detection and clinical significance of bone marrow micrometastases in patients undergoing liver transplantation for hepatocellular carcinoma[J]. *Transplantation*, 2005, 80(1): 88-94.
- [13] Vivarelli M, Cucchetti A, Piscaglia F, et al. Analysis of risk factors for tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma; key role of immunosuppression[J]. *Liver Transpl*, 2005, 11(5): 497-503.
- [14] Guo CB, Li YC, Jin XY. Chemoprotection effect of retroviral vector encoding multidrug resistance 1 gene to allow intensified chemotherapy in vivo [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 12(1): 7-10.
- [15] Starzl TE. Chimerism and tolerance in transplantation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(12): 1460-1461.
- [16] Monaco AP. The beginning of clinical tolerance in solid organ allografts[J]. *Exp Clin Transplant*, 2004, 2(1): 153-161.
- [17] Laylor R, Dewchand H, Simpson E, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells requires both inhibition of host-versus-graft responses and space for homeostatic expansion[J]. *Transplantation*, 2005, 79(11): 1484-1491.
- [18] 王佚, 金先庆, 王莽, 等. mdt-1 基因转染骨髓造血细胞移植联合超剂量化疗治疗兔 VX2 肝癌的实验研究[J]. *中华小儿外科杂志*, 2004, 25(3): 274-278.

(收稿日期: 2010-12-06 修回日期: 2011-01-10)

(上接第 1045 页)

- [6] Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, et al. Meeting highlights; International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005[J]. *Annals of Oncology*, 2005, 16(10): 1569-1583.
- [7] Lee SH, Chung MA, Quddus MR. The effect of neoadjuvant chemotherapy on estrogen and progesterone receptor expression and hormonal receptor status in breast cancer [J]. *Am J Surg*, 2003, 186(3): 348-350.
- [8] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials[J]. *Lancet*, 2005, 365(13): 1687-1717.
- [9] Schneider J, Lucas R, Sanchez J, et al. Modulation of molecular marker expression by induction chemotherapy in locally advanced breast cancer: correlation with the response to therapy and the expression of MDR1 and LRP [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(1): 73-77.
- [10] 包刚, 杨德启, 周波, 等. 新辅助化疗对乳腺癌组织中雌激素、孕激素及 P53 和 CerB-2 表达的影响[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(40): 2843-2845.
- [11] 杨昆宪, 唐晓丹, 迟昆萍. 同一乳腺癌患者新辅助化疗前后 ER/PR、MVD、Neu、DCNA 及 MDR 表达及其相关性研究[J]. *中国医学创新*, 2009, 6(1): 7-9.
- [12] 王坤, 廖宁, 郑登云, 等. 乳腺癌新辅助化疗对激素受体影响的实验研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13(14): 1104-1105.
- [13] 张柏林, 徐晓洲, 张保宁, 等. 核心针活检在乳腺病变诊断和乳腺癌新辅助化疗中的应用价值[J]. *中华普通外科杂志*, 2009, 24(5): 631-633.

(收稿日期: 2010-11-09 修回日期: 2011-01-22)