

SD大鼠喉移植自然免疫排斥的病理学观察

彭汉伟¹, 李浩², 曾宗渊²

(1. 汕头大学医学院附属肿瘤医院头颈科, 广东 汕头 515031; 2. 中山大学肿瘤防治中心头颈科, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】对SD大鼠喉移植的自然免疫排斥过程进行病理学观察,定义移植喉急性免疫排斥反应的病理评价标准。【方法】实验采用作者已建立的改良模型进行鼠喉移植。实验组12例,受体和供体均为封闭群级雄性SD大鼠,移植术后第1、3、5、7、14、21天(各2例)解剖移植喉,常规病理观察移植喉的组织结构变化;对照组12例,受体和供体均为F344近交系大鼠,方法同实验组。【结果】实验组术后第1天移植喉表现为周围组织、黏膜固有层水肿;术后第3天时固有层增厚,炎症细胞浸润,小涎腺腺泡结构部分破坏,扭曲,呼吸道上皮部分坏死脱落,白细胞浸润,气管腔有浆液渗出;术后第5天小涎腺严重破坏、萎缩,气管上皮呈大部分坏死脱落,肌肉和甲状腺开始坏死、萎缩、炎症细胞浸润;术后第7天则软骨膜开始破坏,软骨周围有大量炎症细胞浸润,甲状腺、小涎腺、肌肉大量破坏,仅剩少量变性组织残留。术后第14天移植喉正常结构消失,大量炎症细胞浸润,软骨结构仅剩部分;术后第21天移植喉完全被疤痕组织替代。对照组术后第1、3、5天变化与实验组相近稍轻,术后第14天、第21天移植喉外周纤维包裹形成,喉结构存在,气管黏膜鳞状化,涎腺、甲状腺、肌肉部分萎缩,甲状软骨结构基本正常。【结论】同种异体SD大鼠异位喉移植的免疫排斥过程呈渐进性过程。黏膜上皮、涎腺、甲状腺、肌肉、软骨被机体免疫排斥破坏时间不一,黏膜上皮最早,软骨最迟。喉移植免疫排斥的时序性与免疫排斥程度分级相关。

关键词:器官移植;喉移植/病理学;SD大鼠;移植免疫学

中图分类号:R392.4

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2007)04-0443-04

Histology Observation of Natural Immunorejection in SD Rats with Laryngeal Transplantation

PENG Han-wei¹, LI Hao², ZENG Zong-yuan²

(1. Department of Head and Neck Surgery of Tumor Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou 515031; 2. Department of Head and Neck Surgery, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 This study was designed to observe the pathological process of natural immunorejection in SD rats with laryngeal transplantation, to define a pathological acute rejection grading system for laryngeal transplantation. 【Methods】 The formerly established modified rat model for laryngeal transplantation by the authors was used in this study. Twelve transplantations were performed in the experimental group, in which both of the donor and recipient were male closed grade colony SD rats. The allografts were harvested 1, 3, 5, 7, 14, and 21 d (2 cases in each time point) after transplantation and microscopic structure of the allografts were evaluated. Twelve transplantations were performed in the control group in the same way as the experimental group, except that F344 inbred rats were chosen as the experimental subjects. 【Results】 In the experimental group, edema of the surrounding tissues and the properia lamina of the allograft could be found 1 d after operation. Properia lamina dilation, inflammatory cell infiltration, minosalivary gland breakage and distortion, focal epithelia necrosis and shed, and tracheal lumen secretion characterized the histological presentation 3 d after operation. Five days after operation, severe destroy and atrophy of the minosalivary glands, necrosis and shed of the tracheal epithelium, and necrosis and neutrophil infiltration of the musculature and thyroid could be found. Destroy of the cartilage began at

收稿日期 2006-12-22

基金项目 广州市科技攻关项目[2003-Z2-E4101]

作者简介 彭汉伟(1971-),男,广东汕头人,博士,副主任医师,从事头颈肿瘤外科临床和基础研究工作, E-mail: penghanwei@126.com; 李浩, 通讯作者

7 d after operation, which was characterized by perichondrium necrosis and neutrophil infiltration, with only a little residual degenerated tissue of thyroid, minosalivary, and musculature. Fourteen days after operation, no normal structure could be found except for severe inflammatory infiltration and crashed cartilage remained. The transplanted larynges were replaced by fibrosed tissue entirely 21 d postoperatively. Histological findings of the control allografts were similar to but a little milder than that of the experimental group 1, 3, and 5 d after operation. Encapsulation of the allografts, multilayer epithelia atrophy of the minosalivary, thyroid, and musculature with eligible normal structure of the larynges characterized the microstructure of the allografts 14 d and 21 d after operation.

【Conclusions】Immunorejection in laryngeal transplantation with SD rats from same species but different body is a gradual advancing process, in which mucosal epithelium, salivary, thyroid, musculature, and cartilage are destroyed by the host in different period: mucosa destroyed first while cartilage destroyed last. The scheduling immunorejection is related to a rejection grading system.

Key words: organ transplantation; laryngeal transplantation/pathology; SD rats, transplantation immunology

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(4):443-446]

合适的抗免疫排斥是非生命必需器官——喉移植走向临床前必需解决的问题,大鼠异位喉移植模型的建立为喉移植的免疫学研究提供了良好的动物模型。Strome 研究组^[1-3]曾就该课题进行了较为深入的研究,阐明了 Lewis 大鼠同种异体喉移植自然免疫排斥过程的病理变化特点,并建立了鼠喉移植免疫排斥分级评价系统。本课题组已经采用近交系 F344 大鼠建立了鼠喉移植改良模型^[4],并采用透射电镜对供体喉体外保存进行研究,阐述了不同体外保存方法离体喉不同时间段的超微结构改变^[5,6]。本研究采用中山大学实验动物中心可获取的 级封闭群 SD 大鼠为实验对象进行喉移植,观察其自然免疫排斥过程的病理学变化,为本课题组后续的喉移植免疫学研究奠定基础,同时为移植喉急性排斥反应的病理活检评价标准提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验组喉移植 12 例,供体和受体动物均为 级封闭群非近交系雄性 SD 大白鼠,鼠龄 4~6 个月,质量 300~450 g,均购自中山大学北校区实验动物中心,全部动物均经广东省实验动物中心检测合格,择质量相近者进行配对移植。对照组喉移植 12 例,供体和受体均为 F344 近交系雄性大白鼠,质量 300~450 g,择质量相近者进行配对移植。

1.2 实验器械和场地

实验器械 动物手术操作台;10 倍显微手术放大镜(34X 型,上海光学仪器厂);显微手术器械,血管缝线用 11-0 尼龙线(上海医用器械厂生产)。

全部实验在中山大学北校区肿瘤防治中心 级以上动物实验室进行。

1.3 移植方法

按照本课题组已建立的鼠喉移植改良模型^[4]进行。切取包含喉、喉咽、颈段食管、舌根、舌骨、甲状腺、颈段气管在内的移植喉复合体,保留双侧颈总动脉及其分支——甲状腺上动脉和咽升动脉。移植喉以 4 的肝素液冲洗直至双侧颈总动脉流出液清澈,喉体变白后置于 4 的 UWS 液待移植。切除受体鼠的左侧颌下腺,暴露同侧颈外静脉和颈总动脉,将移植喉双侧颈总动脉分别与受体鼠的左侧颈外静脉和颈总动脉行端-端吻合,从而将移植喉植入于受体鼠左侧颈部,解剖受体鼠对侧颈外静脉,每 100 g 体质量注射青霉素 20 万 U+5%GNS 5 mL,切口放置胶片引流 1 条,关闭切口。术后实验动物置于普通锯末垫料的饲养笼里,术后连续 3 d 每 100 g 体质量皮下注射补液青霉素 20 万 U+5%GNS 2 mL。引流胶片术后 36 h 拔除。

1.4 免疫排斥过程的观察方法

实验组分别于术后第 1,3,5,7,14,21 天再次手术,仔细解剖移植床,注意观察移植喉存活情况,大体观察内容包括:动、静脉通畅与否、喉的血流灌注、喉腔内有否分泌物、喉结构(包括甲状软骨、气管、肌肉、甲状腺、气管黏膜)是否存在。作记录后切取包括双侧血管蒂的移植喉标本,40 ml/L 甲醛固定,分别沿喉上缘、第二气管环横断面或者沿着喉正中行矢状位切片 4 μm ,常规 HE 染色,行镜检。对照组为前述近交系 F344 大白鼠喉移植,实验方法同实验组。

1.5 重复实验

在评价时确认为梗死和/或感染的移植重做,直到术后第1,3,5,7,14,21天均有2个移植喉可供免疫排斥病理学评价。梗死的评价标准:肉眼动脉和静脉血管蒂均可见栓塞,镜下表现为黏膜结构几乎完全为凝固性坏死,仅残留少量软骨组织存活,除了外周有大量多形核白细胞浸润和肉芽组织增生外没有其它病理学改变(图1A)。感染则表现为移植喉组织化脓,脓肿形成,整个移植喉组织被脓肿包裹,喉组织可以存在或消失,仅见大量多形核白细胞浸润者多为早期感染,如果没有梗死发生则也作为可评价移植喉。

2 结果

2.1 实验动物存活及移植喉可评价状况

实验组共行喉移植19例,其中围手术期死亡2例,评价为梗死5例,感染2例,其余12例可评价,移植喉可评价率为63.2%(12/19),术后第1,3,5,7,14,21天可评价移植喉各2例。对照组共行移植15例,1例围手术期死亡,2例评价为梗死,术后各观察时间点可评价移植喉各2例。

2.2 对照组移植喉的组织学表现

对照组术后第1天表现为移植植物外周组织轻度到中度水肿,黏膜轻度肿胀,黏膜下组织水肿明显,部分区域黏膜与黏膜下组织脱离,部分黏膜脱落,有少量散在中性粒细胞浸润,喉腔内有黏液样分泌物,肌肉轻度水肿,甲状腺及软骨组织未见明显变化,唾液腺腺泡上皮胞浆丰富,腺上皮细胞排列正常(图1B)。

术后第3天上述变化加重;术后第5天白细胞浸润增多,部分区域有小灶性脓肿形成,黏膜上皮角化过度,部分气管黏膜可转化为复层鳞状上皮,甲状腺、唾液腺开始出现水肿和少量滤泡细胞坏死(图1C)。

术后第7,14天移植植物周围组织形成纤维包裹,该包裹逐渐增厚纤维化,黏膜上皮部分呈复层鳞状上皮;固有层和黏膜下层唾液腺腺泡轻度萎缩,腺体扩张伴粘液化及潴留囊肿,各层中度充血、水肿,甲状腺、肌肉逐渐出现坏死、萎缩,软骨无明显变化。

术后第21天时移植植物周围组织增厚纤维化明显,部分形成肉芽组织,唾液腺充血、水肿减轻,萎缩明显;肌肉、甲状腺萎缩较明显;血管壁轻度

增厚,部分软骨可呈现轻度纤维化和骨化,喉移植物的组织结构存在,淋巴细胞浸润不明显(图1D)。

2.3 实验组移植喉的组织学变化

实验组移植喉的组织学变化呈现时序性,术后第1,3天移植喉组织学变化与对照组相似,最明显的为组织水肿,包括周围组织,黏膜固有层;水肿的组织内有少量的炎症细胞浸润,主要为多形核白细胞,喉腔内有粘液样分泌物,肌肉轻度水肿;甲状腺、唾液腺可见少量腺泡细胞水肿变性;软骨组织无明显变化。

术后第5天组织反应较对照组加重:黏膜上皮固有层增厚明显,部分固有层被炎症细胞取代,黏膜上皮基本坏死脱落;小涎腺破坏,腺上皮细胞坏死;肌肉变性坏死,大量炎症细胞浸润,但轮廓尚且存在;甲状腺滤泡上皮坏死,结构破坏,中性粒细胞浸润,部分区域开始萎缩(图1E)。

术后第7天则上述改变更加明显,小涎腺大量破坏丢失,取而代之的是炎症细胞浸润,黏膜上皮破坏完全脱落消失,肌肉和甲状腺坏死,炎症细胞浸润,小灶性脓肿形成,或者可见少许残留变性组织,部分区域软骨可见破坏,破坏的软骨周围有炎症细胞浸润(图1F)。

术后第14天移植喉正常结构消失,大量炎症细胞浸润,软骨大量破坏,部分区域可见软骨中央中性粒细胞浸润,其余均为增生的肉芽组织所替代,镜下几乎无可分辨的甲状腺组织、黏膜上皮、肌肉存在,血管均为肉芽组织内新生血管,有再通现象(图1G)。

术后第21天移植喉完全被肉芽或疤痕组织替代,偶尔可见少量软骨组织残留,有时可见灶性脓肿形成(图1H)。

3 讨论

3.1 宿主对移植植物免疫应答病理生理过程

一般来讲,宿主对移植组织的免疫应答过程包括3个阶段^[7-9]:首先是移植植物抗原被宿主的抗原呈递细胞捕捉;接下来抗原-呈递细胞复合物诱导免疫细胞增殖,类、类MHC抗原的产生,最后阶段宿主产生的大量细胞毒性细胞、补体等等可以导致移植植物细胞融解、吞噬、实质破坏。近交系大鼠之间的移植由于其基因结构高度同源,移

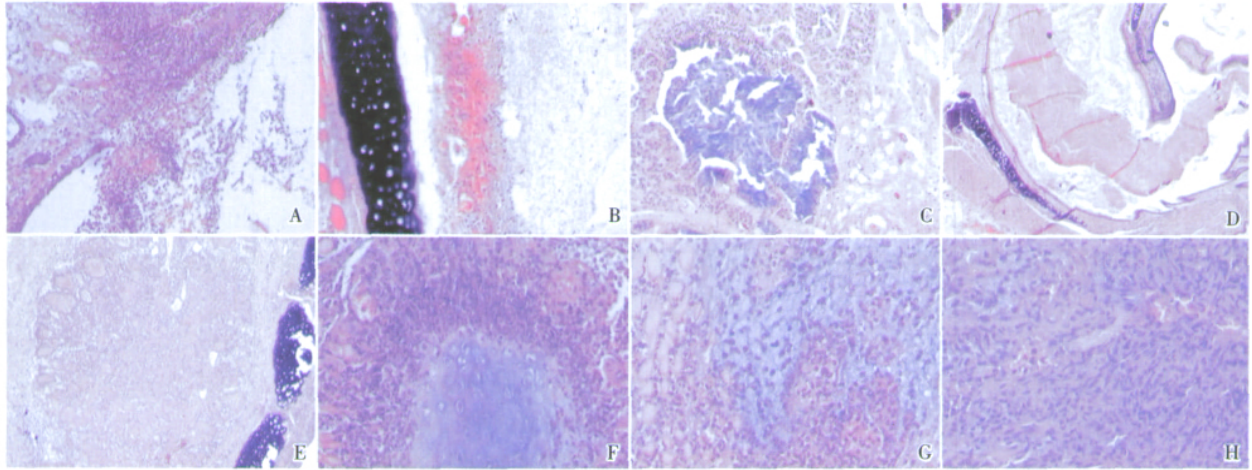


图 1 鼠喉移植自然免疫排斥病理表现

Fig.1 Pathologic presentation of natural immunorejection in the rats with laryngeal transplantation

A: Infarction of the allograft (HE $\times 100$); B: 1 d after transplantation in the control group, shed of the mucosal epithelia, infiltration of the lymphocyte and great deal of secretion in the lumen of the larynx can be seen (HE $\times 100$); C: 5 d after transplantation in the control group, destroy of the sublingual gland and distortion of the gland, with edema and inflammatory infiltration of the surrounding tissues are showed (HE $\times 100$); D: 21 d after transplantation in the control group, multilayer squamous epithelium with hyperkeratosis in some region of the mucus, dyskeratosis in the lumen of the larynx can be found, but the structure of the larynx remained (HE $\times 20$); E: 5 d after transplantation in the experimental group, degeneration and necrosis of the thyroid gland, partial atrophy and destroy of the gland structure, with inflammatory infiltration in the center are showed; F: 7 d after transplantation in the experimental group, necrosis of the cartilage, destroy of the perichondrium, without inflammatory infiltration in the center of the cartilage can be found (HE $\times 200$); G: 14 d after transplantation in the experimental group, severe destroy of the cartilage, with neutrophil infiltration in the center of the cartilage, as well as necrosis of the musculature (HE $\times 200$); H: 21 d after transplantation in the experimental group, the allograft were totally replaced by fibrosed tissue, no laryngeal structure can be distinguished (HE $\times 200$).

植物的抗原性低,因而免疫反应也不明显。本实验采用 F344 近交系大白鼠作为对照组的目的在于排除免疫因素对移植器官的排异反映。但是,本实验对照组的移植喉术后第 14、21 天也出现较为明显的组织病理学变化,主要以呼吸道上皮、唾液腺、甲状腺、肌肉轻到中度破坏、萎缩为主,软骨变化不明显,与 Strome 研究组报道的近交系鼠喉移植后组织完全正常有所不同,我们推论可能是由于:本品系大鼠个体之间尚存在少量基因差异;术后喉组织失神经支配;唾液腺分泌物滞留;移植喉尚有灶性血管栓塞;移植床可能存在继发感染。

3.2 鼠喉移植免疫排斥的病理学特点

作为复合组织器官,喉包括软骨、呼吸道上皮、小涎腺、甲状腺、肌肉等组织结构,各种组织对宿主的免疫排斥反应有所不同。本实验结果表明,呼吸道上皮和小涎腺组织最先被宿主攻击,术后第 1 天对照组和实验组移植喉的镜下改变相近,主要为组织水肿。该变化可能主要是由于移植喉再灌注损伤造成,与免疫应答无关。实验组术后第 3 天开始,喉、气管黏膜便发生炎症细胞的浸润,

小涎腺腺泡结构轻到中度破坏,腺上皮结构扭曲;部分黏膜上皮坏死脱落,气管腔内可见浆液渗出。而软骨则由于对血液供应需求不高,组织营养主要靠组织液的渗出,而且抗原性不强,抗原与宿主免疫系统接触少,因而免疫排斥反应程度低,发生迟。本实验结果表明,实验组移植后第 7 天,移植喉的软骨结构才开始发生镜下改变,术后第 14 天,则观察到软骨的大部分破坏,而术后第 21 天则软骨结构几乎完全破坏消失。

甲状腺、肌肉、涎腺组织的免疫排斥反应时间则介于上皮组织和软骨之间,术后第 5 天开始出现明显的镜下破坏,术后第 7 天则坏死加重,结构破坏更明显。可能与上述组织血流丰富,但是其淋巴组织并不丰富而且组织抗原性不强有关。

3.3 本研究的意义和存在问题

自 Strome 研究组^[10]成功地完成了人类医学史上第一例喉移植,至今尚未见第二例报道。阻碍人喉移植发展的主要因素在于复合组织器官移植免疫学的复杂性^[11]。喉移植小动物模型的引入的目的就是为了深入研究喉移植免疫学问题。本课题组已

(下转第 465 页 to page 465)

- Anaesth, 1996, 43(8):778- 782.
- [6] KINDLER C H, SCHUMACHER P G, SCHNEIDER MC, et al. Effects of intravenous lidocaine and/or esmolol on hemodynamic responses to laryngoscopy and intubation: a double- blind, controlled clinical trial [J]. J Clin Anesth, 1996, 8(6):491- 496.
- [7] 于爱兰,傅志俭,张宗旺,等.舒芬太尼、瑞芬太尼、芬太尼对全麻诱导期机体应激反应的影响[J].山东大学学报:医学版,2006,44(10):1032- 1035.
- [8] GEPTS E, SHAFER S L, CAMU F, et al. Linearity of pharmacokinetics and model estimation of Sufentanil [J]. Anesthesiology, 1995, 83(6):1194- 1204.
- [9] BROCKMANN C, RAASCH W, BASTIAN C. Endocrine stress parameters during TIVA with remifentanil or sufentanil [J]. Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2000,35(11):685- 691.
- [10] SUTTNER S, LANG K, PIPER S N, et al. Continuous intra- and postoperative thoracic epidural analgesia attenuates brain natriuretic peptide release after major abdominal surgery [J]. Anesth Analg, 2005, 101(3): 896- 903.
- [11] THOMSON I R, HARDING G, HUDSON R J. A comparison of fentanyl and sufentanil in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery [J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2000,14(6):652- 656.
- [12] MILLER D R, WELLWOOD M, TEASDALE S J, et al. Effects of anesthetic induction on myocardial function and metabolism: a comparison of fentanyl, sufentanil and alfentanil [J]. Can J Anaesth, 1988,35(3(pt1)):219- 233.
- [13] 黄焕森,郑志远,高崇荣,等.丙泊酚闭环靶控输注全凭静脉麻醉在颅脑手术的应用[J].中华神经医学杂志,2006,5(6):623- 625.
- [14] ELLMAUER S. Sufentanil, an alternative to fentanyl/alfentanil? [J]. Anaesthetist, 1994,43(3):143- 158.
- [15] MEAUDRE E, BORET H, SUPPINI A, et al. Sufentanil supplementation of sevoflurane during induction of anaesthesia: a randomized study [J]. Eur J Anaesthesiol, 2004, 21(10):793- 796.

(编辑 刘清海)

(上接第 446 页 from page 446)

经成功地建立了鼠喉移植的改良模型,移植喉的存活率达到 70%以上,本研究采用该模型进行喉移植自然免疫排斥病理学观察,为后续的抗免疫排斥和免疫耐受的诱导奠定实验基础。

(汕头市中心医院病理科王少洪主任医师对本研究中移植喉病理学评价部分提供了的帮助和指导,并对阅片结果进行审查和校正,特此致谢)

参考文献:

- [1] STROME S, SLOMAN- MOLL E, WU J, et al. Rat model for a vascularized laryngeal allograft [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1992, 101(11): 950- 953.
- [2] STROME S, BRODSKY G, DARRELL J, et al. Histopathologic correlates of acute laryngeal allograft rejection in a rat model [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1992, 101(21): 156- 160.
- [3] LORENZ RR, DAN O, NELSON M, et al. Rat laryngeal transplantation model: Technical advancements and a redefined rejection grading system [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2002, 111(12): 1120- 1127.
- [4] 彭汉伟,李浩,曾宗渊,等.近交系 F344 鼠喉移植改良模型的建立 [J]. 癌症,2005,24(11):1412- 1415.
- [5] 李浩,彭汉伟,曾宗渊,等.大鼠供体喉保存的研究 [J]. 中山大学学报:医学科学版,2006,27(3):322- 325.
- [6] 李浩,彭汉伟,曾宗渊.透射电镜用于供体喉保存的评价 [J]. 中华肿瘤防治杂志,2006,13(13):981- 983.
- [7] 李光,赵峰.树突细胞与移植免疫 [J]. 中国现代普通外科进展,2003,6(4):193- 196.
- [8] GAME D S, WARRENS A N, LECHLER R I. Rejection mechanisms in transplantation [J]. Wien Klin Wochenschr, 2001, 113(20): 832- 838.
- [9] MCCURRY K R, COLVIN B L, et al. Regulatory dendritic cell therapy in organ transplantation [J]. Transpl Int, 2006, 19(7): 525- 538.
- [10] STROME M, STEIN J, ESCLAMADO R, et al. Laryngeal transplantation and 40- month follow- up [J]. N Engl J Med, 2001, 344(22): 1676- 1679.
- [11] BIRCHALL M A, LORENZ R R, BERKE G S, et al. Laryngeal transplantation in 2005: a review [J]. Am J Transplant, 2006, 6(1):20- 26.

(编辑 刘清海)