

胰岛培养后胸腺内移植的实验研究

王国栋, 陈规划

(中山医科大学附属第一医院器官移植科, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】观察胰岛培养后胸腺内移植对移植物存活时间的影响。【方法】以 C₅₇BL/6 小鼠为受体, BALB/c 小鼠为供体。胸腺内胰岛未培养组分为单纯移植和移植的同时加腹腔内 1 次性注射兔抗小鼠胸腺细胞血清(ATS)两组。胸腺内胰岛培养组分为 24 °C 培养后单纯移植和移植时加用 ATS 两组。【结果】未培养胰岛单纯胸腺内移植后平均存活期为(19.5 ± 10.1) d, 加用 ATS 后, 可延长至 100 d 以上, 其中 6 只受体(6/8)胸腺内移植物长期存活, 并且诱导了受体对供体的特异性无反应性。胰岛经 24 °C 培养后单纯胸腺内移植或移植后应用 ATS, 均可获长期存活(分别为 > 92 d, > 100 d), 但未能诱导受体对供体的特异性无反应性。【结论】胸腺可能为胰岛移植的免疫特许部位, 新鲜分离胰岛中的抗原在维持免疫耐受中具有重要的作用。

关键词: 胸腺/外科学; 胰岛移植; 免疫耐受; 移植物存活

中图分类号: R619 文章标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)06-0438-04

Experimental Study on Intrathymic Islet Transplantation After *in vitro* Culture

WANG Guo-dong, CHEN Gui-hua

(Department of Organ Transplantation, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To observe the effects of pretransplant *in vitro* culture on the possibility of islet allografts to induce unresponsiveness after intrathymic(IT) implantation. 【Methods】C₅₇BL/6 mice were used as recipients and BALB/c as donors. Intrathymic freshly isolated allogeneic islets were implanted into the simple transplantation group and the group intraperitoneally receiving rabbit antithymocyte serum(ATS) at the time of islet transplantation. Intrathymic islets of pretreatment with *in vitro* culture were implanted into the 24 °C culture group and the group intraperitoneally receiving ATS at the time of implantation. 【Results】The median survival time(MST) of simple intrathymic allografts were (19.5 ± 10.1) d. Administration of ATS at the time of transplantation promoted survival of implanted allografts. Six of eight intrathymic grafts survived permanently, especially, a state of donor-specific unresponsiveness developed. Islet allografts pretreatment with *in vitro* 24 °C culture survived indefinitely in simple intrathymic transplantation recipients (MST > 92 d) and recipients receiving rabbit ATS after intrathymic implantation (MST > 100 d). However, islets allografts transplanted into the thymus failed to induce specific unresponsiveness. 【Conclusion】The thymus may be an immunoprivileged site for islet transplantation and antigens within the freshly isolated islet may play an important role during the maintenance of immune tolerance.

Key words: thymus gland surgery; islets of langerhans transplantation; immune tolerance; graft survival

近年来, 胸腺因为诱导免疫耐受的作用而受到关注。我们以前研究证实胸腺内胰岛移植效果

收稿日期: 2000-03-16

基金项目: 广东省科委重点攻关项目(962205001)

作者简介: 王国栋(1970-), 男, 河南南阳人, 硕士, 主治医师

优于肾被膜下^[1]。本研究旨在探讨胰岛经低温(24℃)培养后胸腺内移植对移植物存活时间的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

供体用 BALB/c(H-2k^d)小鼠(5~6周);受体 C₅₇BL/6(H-2k^b)小鼠(7~8周),雄性。二者主要组织相容性复合体(major histocompatibility, MHC)强不相容。链脲霉素(streptozotocin, STZ)溶于 pH 为 4.5 的新鲜配制的枸橼酸缓冲液中,质量浓度为 20 g/L,抽滤除菌后按 220 mg/kg 给小鼠腹腔 1 次性注射。2~4 d 后测血糖连续 2 次血糖均高于 16.7 mmol/L 者作为糖尿病模型。血糖测定用葡萄糖氧化酶法,Glucometer II 血糖仪(美国产),Glucostix 血糖试纸(澳大利亚产)。

1.2 抗小鼠胸腺淋巴细胞血清的制备

用 C₅₇BL/6 小鼠的胸腺细胞免疫新西兰白兔共 3 次。胸腺细胞的制备方法是将胸腺剪碎后过 100 目钢丝网。把胸腺细胞收集到乳酸林格液中,1 500 r/min 离心 10 min(离心机半径 15 cm,型号 IK_{DC}),弃上清液,用 Tris-NH₄Cl 缓冲液除去红细胞后,计数细胞。每次免疫用 1×10⁹ 个胸腺细胞。第 1 次、第 2 次免疫方法采用皮下多部位注射,第 3 次为静脉注射。间隔时间为 2 周。第 3 次免疫后 7 d 分离血清。56℃ 30 min 灭活补体后分装成 1 mL, -20℃ 保存备用。

1.3 实验分组

分为 4 组:①单纯胸腺内胰岛移植组(6只);②单纯胸腺内移植加腹腔内 1 次性注射 ATS 0.5 mL 组(8只);③24℃ 培养后胸腺内移植组(6只);④24℃ 培养后胸腺内移植+ATS 组(6只)。

1.4 胰岛分离

供体小鼠颈椎脱臼处死,取出胰腺,放在冷 Hanks 液中,每个胰腺剪成 2~3 个小块,放在含胶原酶 2 mL(collagenase type XI, Sigma, ρ=0.5 g/L)的小瓶内,37℃ 恒温水浴箱中振荡消化 5~6 min,将消化不完全的组织吸出,再置入稀释 1 倍的胶原酶溶液中消化,每次 3 min,连续 4~5 次,至消化完全。在 40 倍解剖显微镜下挑取胰岛,放在 ρ=1% 牛血清白蛋白的 Hanks 液中,反复多次挑拾胰岛 500~700 个。

1.5 胰岛培养

胰岛分离后 37℃ 培养过夜,24℃ 培养 10 d^[2]。

培养液为 RPMI 1640(美国 Sigma 公司),培养液加入胎牛血清,青霉素(100×10³ U/L),链霉素 0.1 g/L。培养液每 2~3 d 更换 1 次,培养箱内 ϕCO₂=5%。

1.6 胰岛移植

将纯净的胰岛吸在连有塑料管的 1 mL 的注射器内,使胰岛沉在近针头处。①胸腺内移植:麻醉下采用胸骨正中切口,劈开胸骨上 1/3,暴露胸腺,镊子轻轻牵拉下每侧注入 250~350 个胰岛。看到胸腺均匀膨胀即证实已注入。②被膜下移植:乙醚麻醉下开腹,固定肾脏,将针头刺入肾被膜下,缓缓注入胰岛 500~700 个,腹膜肌层皮肤全层连续缝合。

1.7 移植物功能检测

移植后依移植功能存活时间长短隔天或隔周定期测定血糖,并辅以尿糖检测。血糖连续低于 11.2 mmol/L 作为移植物功能正常的指标,受体鼠血糖维持正常一段时间后血糖再次升高,达到 11.2 mmol/L 以上者为移植排斥标准。

1.8 病理检查

所有移植物均取标本作病理检查。组织(含胰岛组织)用 Bouin 液过夜固定,包埋在石蜡中做成 4 μm 切片,HE 染色观察胰岛一般形态,醛-复红染色观察 β 细胞(图 3)。

1.9 统计方法

移植物存活时间比较用秩和检验。

2 结 果

2.1 兔抗小鼠胸腺细胞血清的效价

微量淋巴细胞毒试验测定兔抗 C₅₇BL/6 小鼠胸腺细胞血清(ATs)的效价为 1:2 048(图 1)。

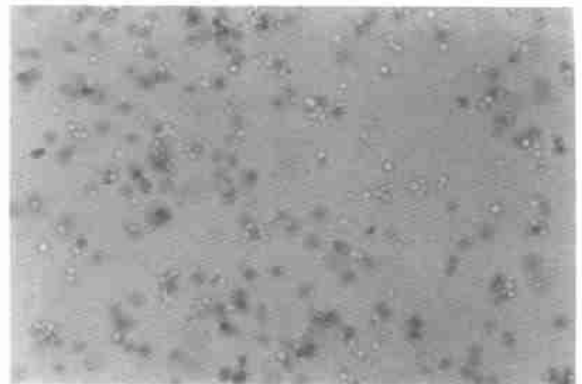


图 1 抗血清的淋巴细胞毒实验(×100)

Fig. 1 Complement-mediated microcytotoxicity assay of antiserum

The assay showed that the titre of antiserum was 1:2 048 (×100)

2.2 分离的胰岛

经胶原酶消化胰腺后分离的胰岛(图 2), 胰岛的纯度可达 90% 以上, 台盼蓝染色显示胰岛存活率在 90% 以上, 一般一只供体小鼠可分离 60~70 个胰岛。

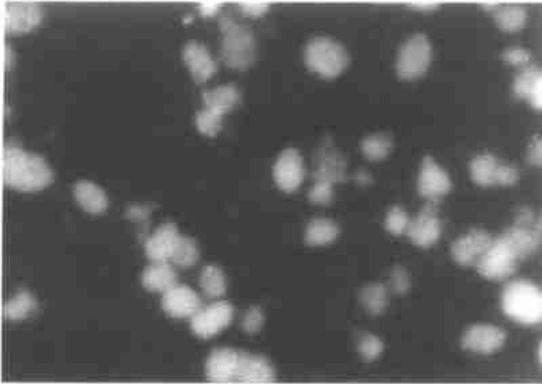


图 2 分离的小鼠胰岛($\times 15$)

Fig. 2 Isolated mice islets

Contaminating nonislet tissue was removed under a dissecting microscope ($\times 15$)

2.3 同种胰岛移植物存活时间

新鲜分离的胰岛胸腺内移植成功后, 受体小鼠体质量增加, 血糖在 2~4 d 内下降, 胰岛移植物存活时间为(19.5 ± 10.1) d, 加用 ATS 后, 存活时间明显延长, 超过 100 d, 8 只受体中有 6 只移植物存活时间 > 100 d, 与不加 ATS 相比差异有统计学意义; 胰岛经 24°C 低温培养后移植到胸腺, 其移植物存活时间为 > 92 d, 加用 ATS 后, 胰岛移植物亦获长期功能存活 (> 100 d), 两者比较, 差异无统计学意义。新鲜分离的胰岛胸腺内移植后, 应用 ATS 可明显延长移植物存活时间, 而培养后的胰岛胸腺内移植, 应用 ATS 对移植物存活时间影响不大(表 1)。

2.4 组织学检查

胸腺内移植胰岛的受体均取标本做组织学观察, 发现胸腺内胰岛移植物长期存活的受体小鼠, 其胸腺内胰岛移植物结构完整, 功能良好, 未见淋巴细胞浸润(图 3)。

表 1 胰岛移植后存活时间

Table 1 Survival time of islet allografts

Group	<i>n</i>	Site	ATS	<i>t</i> (Survival time)/d	<i>t</i> (Mean survival time)/d
1	6	IT	-	12, 13, 15, 17, 21, 39	19.5 ± 10.1
2	8	IT	+	53, 57, $> 100 \times 4$, $> 120 \times 2$	> 100
3	6	IT	-	34, 57, $> 92 \times 2$, $> 100 \times 2$	> 92
4	6	IT	+	> 61 , $> 100 \times 5$	> 100



图 3 胸腺内存活的胰岛醛-复红染色($\times 250$)

Fig. 3 Aldehyde-Fuchsin stained slide of intrathymic islet allograft

Islet cells stained abundantly for insulin ($\times 250$)

植到胸腺内胰岛长期存活受体左肾被膜下, 不应用任何免疫抑制剂。3 周后取左侧肾脏做组织学观察。结果发现未经培养的胰岛胸腺内移植的受体左肾被膜下的胰岛未见被排斥, 而培养后胰岛胸腺内移植的受体不仅左肾被膜下的胰岛则可见淋巴细胞浸润, 胸腺内的胰岛也被排斥, 表现为受体小鼠血糖增高, 表明再次胸腺外移植诱发了对首次胸腺内胰岛移植物的排斥反应。

3 讨论

以前我们的研究证实, 胸腺作为一个移植部位, 可能是一个免疫特许区, 新鲜分离的胰岛胸腺内移植后, 其存活时间比肾被膜下稍稍延长^[1], 但应用 ATS 后, 胸腺内移植物存活时间不仅明显延长, 而且诱导了受体对供体的特异性无反应性。本实验证明, 经低温 24°C 培养后的小鼠胰岛免疫原

为证实是否诱导了受体对供体特异性无反应性, 分别将原 BALB/c 供体小鼠新鲜分离的胰岛移

性明显降低,即使不应用免疫抑制剂,胸腺内移植后亦可长期存活。

为了证实经低温 24 °C 后的胰岛是否诱导了受体对供体的特异性无反应性,我们对胸腺内移植长期存活的受体进行再次胸腺外移植。结果发现未经培养的胰岛胸腺内移植的受体左肾被膜下的胰岛未见排斥,而培养后胰岛胸腺内移植的受体不仅左肾被膜下的胰岛则可见淋巴细胞浸润胸腺内的胰岛也被排斥,表现为受体小鼠血糖增高,表明再次胸腺外移植诱发了对首次胸腺内胰岛移植物的排斥反应。

小鼠胰岛细胞中含 I 类抗原,又有含 II 类抗原的树突状细胞和内皮细胞,并且具有抗原递呈功能,胰岛的免疫原性主要源于 II 类抗原。研究证实,低温 24 °C 培养、抗 MHC-II 类抗原单抗和抗树突状细胞的单抗均可清除胰岛的 II 类抗原,降低胰岛的免疫原性^{3,4}。辅以免疫抑制剂,经上述处理的胰岛移植到同种异体的肾被膜下,肝内及腹腔,功能存活时间延长。本试验中,培养后胰岛免疫原性明显降低,即便不应用 ATS 胸腺内移植后获长期存活,但免疫原性减低后的胰岛胸腺内移植诱导免疫耐受没有成功,其可解释可能是,低温 24 °C 培养的胰岛清除了 II 类抗原, I 类抗原亦明显减少,未能刺激受体诱发排斥反应。受体应用 ATS 后,外周大部分 T 淋巴细胞被除去,促使骨髓内前胸腺细胞进入胸腺,在表达外源性 MHC 抗原的环境中发育,但由于胸腺内供体特异性 I 类抗原的数量不足以诱导受体对供体移植 I 类抗原的耐受,同时

由于供体移植物经 24 °C 培养后 II 类抗原明显减少或消失,受体亦未形成对供体 II 类抗原的免疫耐受,再次移植供体新鲜分离的胰岛到受体肾被膜下激发了受体对胸腺内及胸腺外移植物的排斥反应,表明供体移植物激活的淋巴细胞可达胸腺实质,这一点同本实验分组中的第①组试验结果是一致的。而胸腺内移植新鲜分离的胰岛,应用 ATS 后,移植物存活时间延长,经过胸腺内免疫耐受诱导,形成了受体对供体胰岛的特异性无反应性。因此,胰岛中含 II 类抗原的抗原递呈细胞在胸腺诱导免疫耐受中起主要作用,而且 I 类、II 类抗原在诱导免疫耐受中起协同作用。这一现象的机理还值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] 王国栋,陈规划. 胸腺内胰岛移植的实验研究 [J]. 中华器官移植杂志, 1999, 20(1): 22.
- [2] Stein E, Mullen Y, Benhamou, P Y, *et al.* Reduction in immunogenicity of human islets by 24 °C culture [J]. *Transplant Proc*, 1994, 26 (2): 755.
- [3] Woehrl M, Markmann J F, Silvers W K, *et al.* Transplantation of cultured pancreatic islets to BB rats [J]. *Surgery*. 1986, 100(2): 334.
- [4] Faustman D L, Steinman R M, Gebel H M, *et al.* Provention of rejection of murine islets allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1984, 81(12): 3864.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 437 页)

参考文献:

- [1] Beno D W, Kimura R E. Nonstressed rat model of acute endotoxemia that unmasks the endotoxin-induced TNF- α response [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(2 pt 2): H671.
- [2] Frost L, Mahoney J, Field J, *et al.* Impaired bile flow and disordered hepatic calcium homeostasis are early features of halothane-induced liver injury in guinea pigs [J].

Hepatology, 1996, 23(1): 80.

- [3] Imberti R, Vairetti M, Gualera M R, *et al.* The effects of thyroid hormone modulation on rat liver injury associated with ischemia-reperfusion and cold storage [J]. *Anesth Analg*, 1998, 86(6): 1187.
- [4] 王 斌. 谷胱甘肽代谢及其在肝脏疾病中的作用 [J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 1997, 18(2): 82.

(编辑 关淡庄)