

外周血淋巴细胞 LFA-1 水平与肝移植急性排斥的关系

傅宇阳, 何晓顺, 陈剑琳, 陈规划, 黄洁夫

(中山医科大学附属第一医院器官移植中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨大鼠原位肝脏移植(OLT_x)后外周血淋巴细胞表面淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)与急性排斥的关系。【方法】实验动物分为两组, 非排斥对照组供体、受体均为 SD 大鼠, 各 20 只, 排斥组供体为 Wistar 大鼠, 受体为 SD 大鼠, 各 20 只。受体大鼠分别于原位肝移植术前 1 天及术后第 1、3、5、7 天从尾静脉采血, 经免疫荧光抗体-流式细胞术检测淋巴细胞表面 LFA-1 的表达。【结果】原位肝移植术后, 受体大鼠外周血淋巴细胞 LFA-1 呈低水平表达, 与术前相比差异具显著性意义($P < 0.01$); 受体大鼠发生急性排斥反应时, 外周血淋巴细胞 LFA-1 水平显著增高, 与对照组相比差异具显著性意义($P < 0.01$)。【结论】检测外周血淋巴细胞 LFA-1 表达水平有助于移植肝脏急性排斥的诊断。

关键词: 大鼠; 肝移植; 移植排斥; 淋巴细胞功能相关抗原-1

中图分类号: R657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)03-0192-03

Relationship Between the Expression of Lymphocyte Function-associated Antigen-1 on Peripheral Lymphocytes and Acute Rejection After Liver Transplantation

FU Yu-yang, HE Xiao-shun, CHEN Jian-lin, CHEN Gui-hua, HUANG Jie-fu

(Organ Transplantation Center, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the relationship between the expression of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) on peripheral lymphocytes and acute rejection after orthotopic liver transplantation (OLT_x) in rat. 【Methods】 Adult male rats were divided into 2 groups. In the non-rejection group, 40 SD rats were used as both donors and recipients. In the rejection group, 20 Wistar rats were used as donors and 20 SD rats as recipients. Blood samples were collected through the tail vein 1 day before transplantation and on days 1, 3, 5, 7 after OLT_x. The expression of LFA-1 (CD11a) on peripheral lymphocytes was analyzed by using indirect immunofluorescent marker-flow cytometry. 【Results】 The expression level of LFA-1 on peripheral lymphocytes in recipient rats after orthotopic liver transplantation was markedly lower than that before operation ($P < 0.01$); The expression level of LFA-1 on peripheral lymphocytes in rats with acute liver rejection was significantly higher than that in the non-rejection group ($P < 0.01$). 【Conclusion】 Monitoring the expression level of LFA-1 on peripheral lymphocytes may be helpful to the diagnosis of acute graft rejection.

Key words: rat; liver transplantation; graft rejection; lymphocyte function-associated antigen-1

肝移植后急性排斥反应目前仍是困扰移植界的难题之一, 如何早期、准确判断排斥反应是解决这一难题的关键^[1]。近年来很多研究表明, 细胞粘

附分子在肝急性排斥反应的发生、发展过程中起到非常重要的作用。本实验以大鼠原位肝脏移植模型为基础, 应用流式细胞术检测受体鼠外周血淋巴

收稿日期: 2000-10-25

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(950337)

作者简介: 傅宇阳(1973-), 男, 山东德州人, 博士生, 何晓顺, 课题负责人, 教授

© 1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

细胞表面淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1) 的表达, 试图找出其表达水平与肝脏急性排斥反应的关系。

1 材料和方法

1.1 主要材料

成年健康雄性 Wistar 大鼠 20 只, Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只, 体质量 200~250 g, 由中山大学动物实验中心提供。小鼠抗大鼠 LFA-1 单克隆抗体 (CD11a) 购自 Pharmingen 公司, 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的羊抗小鼠 IgG 购自 DAKO 公司。流式细胞仪为美国 Coulter 公司生产。

1.2 动物分组及模型制备

实验动物分为两组: ①非排斥对照组: 供体及受体均为 SD 大鼠, 各 20 只。②排斥组: 供体为 Wistar 大鼠, 受体为 SD 大鼠, 各 20 只。采用改进的 Kamada 二袖套法大鼠原位肝脏移植模型, 术前禁食 12 h, 供肝热缺血时间为 0 min, 冷缺血时间 (56 ± 3) min, 无肝期 (17 ± 3) min, 排除因手术失败、感染、胆道并发症死亡者。排斥组大鼠术后从第 3 天起急性排斥反应加重, 表现为: 明显尿黄, 耳廓黄染, 精神萎靡, 反应迟钝, 体质量持续下降。

1.3 组织病理学检查

分别取正常肝组织及移植后第 1、3、5、7 天肝组织, 固定于甲醛中, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜下观察急性排斥反应并按 Kemnitz 标准分级。

1.4 大鼠外周血淋巴细胞表面 LFA-1 的检测

分别于移植术前 1 天、移植后第 1、3、5、7 天从大鼠尾静脉无菌取血, 常规肝素抗凝。抗凝血用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞, PBS 液调整浓度, 1 400 g 离心 10 min, 弃上清液, PBS 液洗两次, 细胞计数为 10^6 个/mL 加入适当稀释的一抗 LFA-1, 轻轻吹打混匀, 4 °C 孵育 30 min, 离心, 弃上清液, PBS 液洗两次, 加入适当稀释的 FITC 标记的二抗, 轻轻吹打混匀, 4 °C 孵育 30 min, PBS 液洗两次, 将细胞重悬于 PBS 液, 上机检测, 检测细胞数为 5 000~15 000 个。

1.5 统计分析 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 组织学检查病理

病理示移植术前及对照组大鼠无明显排斥反应, 排斥组移植术后第 1、3、5、7 天分别无排斥反应及轻、中、重度排斥反应 (图 1、图 2)。

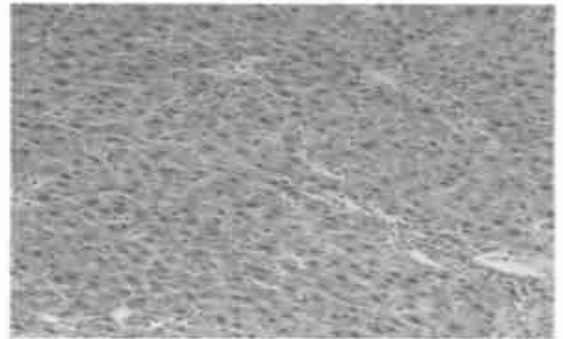


图 1 肝脏轻度急性排斥反应病理形态改变

Fig. 1 The pathological morphology of delicate acute liver rejection (HEX 40)

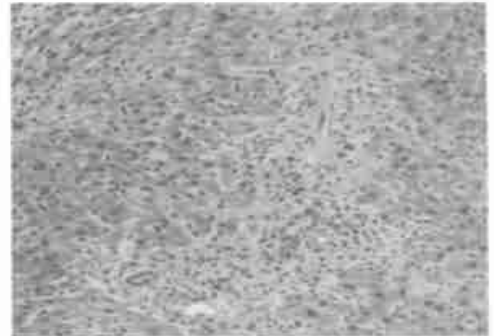


图 2 肝脏重度急性排斥反应病理形态改变

Fig. 2 The pathological morphology of severe acute liver rejection (HEX 40)

2.2 外周血淋巴细胞表面 LFA-1 水平

大鼠原位肝脏移植后, 外周血淋巴细胞表面 LFA-1 水平显著下降, 与术前相比差异具显著性意义。排斥组外周血淋巴细胞表面 LFA-1 水平明显高于对照组, 差异具显著性意义, 排斥组大鼠从第 5 天起 LFA-1 水平骤然升高, 但是与术前相比差异无显著性意义 (表 1)。

3 讨论

淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1) 属于细胞粘附分子中的整合素家族, 其主要功能是介导白细胞和内皮细胞之间的粘附, 它通过与其配体细胞间粘附分子-1 (ICAM-1) 结合而发挥效应。此外, LFA-1 还是一种信号传导分子, 为静止 T 淋巴细胞的活化提供协同刺激信号^[2]。免疫组化显示^[1], 在正常肝

表 1 外周血 LFA-1 阳性淋巴细胞百分数

Table 2 The percentage of LFA-1 positive rat peripheral blood lymphocytes

%

Group	Pre-operation	Post-operation			
		1 d	3 d	5 d	7 d
Non-rejection group	93.0 ± 3.2	70.3 ± 4.7 ¹⁾	45.7 ± 4.5 ¹⁾	55.2 ± 3.2 ¹⁾	57.2 ± 4.1 ¹⁾
Rejection group		83.1 ± 5.6 ^{1), 2)}	60.6 ± 5.2 ²⁾	93.1 ± 2.5 ²⁾	93.6 ± 2.8 ²⁾

1) Pre-operation vs Post-operation, $P < 0.01$; 2) Non-rejection group vs Rejection group, $P < 0.01$

组织内, LFA-1 仅表达于 Kuffer 细胞。当肝脏发生急性排斥反应时, 门管区及窦区 LFA-1 阳性浸润炎症细胞明显增多, 尤以门管区显著, 浸润的细胞主要是淋巴细胞(记忆性 T 淋巴细胞和少量 B 淋巴细胞)。本研究在大鼠原位肝移植模型基础上, 用流式细胞术检测了移植前、移植后非排斥及排斥情况下外周血淋巴细胞表面 LFA-1 的表达水平。本实验观察到, 正常外周血淋巴细胞表面即有 LFA-1 表达, 肝脏移植后外周血 LFA-1 呈低水平表达, 与术前相比差异具显著性意义, 其机理有待于进一步探讨。排斥组大鼠从术后 3 天开始出现较明显急性排斥反应症状(如精神不振、耳廓黄染、胆汁减少等), 病理检查显示有轻至中度排斥反应, 且随着移植后时间的增加而加重, 从移植后第 5 天开始出现严重的急性排斥, 非排斥组大鼠未表现排斥症状。流式细胞术检测结果亦显示排斥组外周血淋巴细胞表面 LFA-1 表达水平显著升高, 统计学分析表明, 与非排斥组相比其水平差异具显著性意义, 且随术后时间增长其差异愈加显著。结合急性排斥情况, 可认为血中 LFA-1 表达变化在一定程度上反映了移植术后排斥反应的严重程度。研究表明^[3~6], 肝脏同种移植排斥反应由 T 淋巴细胞介导, 在排斥反应过程中, 门管区可见 CD4 和 CD8 亚群。参与内皮粘附作用的主要细胞因子是 LFA-1 和 ICAM-1。急性排斥时, 淋巴细胞通过其表面的 LFA-1 与 ICAM-1 结合, 粘附到内皮细胞上, 造成血管广泛性内皮炎; 淋巴细胞进而穿过内皮攻击肝细胞, 造成肝细胞变性坏死, 肝功能损伤。本研究证明肝移植动物外周血淋巴细胞 LFA-1 表达水平增高, 与上述观点相符。

作者首次在肝移植领域, 采用流式细胞术动态监测外周血淋巴细胞 LFA-1 的表达水平, 此方法简便易行、迅速、可定量分析, 且为无创性的检测手段, 可在一定程度上反映急性排斥反应的发生及程度。

参考文献:

- [1] Lautenschlager I, Hocerstedt K, Taskinen E, *et al.* Expression of adhesion molecules and their ligands in liver allografts during cytomegalovirus infection and acute rejection [J]. *Transpl Int*, 1996, 9(Suppl 1): S213.
- [2] Tibbetts S A, Chirathaworn C, Nakashima M, *et al.* Peptides derived from ICAM-1 and LFA-1 modulate T cell adhesion and immune function in a mixed lymphocyte culture [J]. *Transplantation*, 1999, 68(5): 685.
- [3] Hardy C L, Morahan G, Bhathal P S. A study of graft versus host disease using bile duct implants under kidney capsule [J]. *Liver*, 2000, 20(1): 16.
- [4] Fujisaki S, Miyake H, Amano S *et al.* Expression of CD44 in rat liver allografts during rejection [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 1998, 5(2): 196.
- [5] Horimoto H, Nozawa H, Kokuo N, *et al.* Immunoregulation via adhesion molecules in allogenic and xenogenic hepatocyte transplantation to Nagase's analbuminemic rats [J]. *Cell Transplant*, 1997, 6(5): 535.
- [6] Iabrega E, Castro B, Crespo J, *et al.* Different time course of circulating adhesion molecules and hyaluran during hepatic allograft [J]. *Transplantation*, 2000, 69(4): 569.

(编辑 张敏瑞)