

体外及裸鼠体内培养对甲状腺 HLA II 类抗原阳性细胞数的影响^①

刘仁斌¹ 陈国锐¹ 欧阳彬¹ 梁惠珍²

(中山医科大学 1 附属第一医院外科 2 病理教研室; 广州, 510080)

摘要 目的: 探讨空气、高氧、⁶⁰钴照射后体外培养及裸鼠体内培养对甲状腺 HLA II 类抗原阳性细胞数的影响。方法: 采用免疫组织化学方法测定 HLA II 类抗原阳性细胞数, 并进行相互比较。结果: HLA II 类抗原阳性细胞数减少以⁶⁰钴照射后裸鼠体内培养组最明显, 空气、高氧、单纯⁶⁰钴照射后短时间体外培养对 HLA II 类抗原阳性细胞数无显著影响。结论: 经⁶⁰钴照射后裸鼠体内培养对甲状腺 HLA II 类抗原阳性细胞数的减少作用较其它方法为佳, 且具有操作简单、不易被污染等优点, 值得推广应用。

关键词 甲状腺; HLAD 抗原; 组织培养; 小鼠, 裸; 辐射效应

中图分类号 R653.03

Influence of Culture in Atmosphere of Air, High—Oxygen, Balb/c Nude Mouse and Irradiation of Cobalt on the Number of HLA II Positive Cells of Thyroid

Liu Renbin¹ Chen Guorui¹ Ouyang Bin¹ Liang Huizhen²

(1 Department of General Surgery, First Affiliated Hospital 2 Department of Pathology, Sun Yat—sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510080)

Abstract Objective: To study the influence of culture in atmosphere of air, high—oxygen, Balb/c nude mouse and irradiation of cobalt on the number of HLA II positive cells of thyroid. **Methods** It was calculating HLA II positive cells of thyroid by immunohistochemistry and contrasting the results of the influence. **Results** There as no significant influence on HLA II of thyroid of culture in atmosphere of air, high—oxygen, and only after irradiation of cobalt, but culturing in Balb/c nude mouse after irradiation of cobalt decreases the HLA II positive cells in thyroid markedly. **Conclusion** Culturing in Balb/c nude mouse after irradiation of cobalt is best method of decreasing the HLA II of thyroid. It is simple and uneasy to be contaminated.

Subject headings thyroid gland; HLA—D antigens; tissue culture; mice, nude; radiation effects

受体对移植物的排斥反应是影响器官移植术的成功及移植物存活时间的最大障碍, HLA II 抗原阳性细胞是引起排斥反应最重要的因素之一。本文取人甲状腺组织, 分别采用体外培养、放射线照射、裸鼠体内培养等方法处理, 通过免疫组织化学对 HLA II 抗原阳性细胞计数, 探讨这些处理方法对甲状腺组织 HLA II 抗原阳性细胞的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

Balb/c 裸小鼠, 雌性, 4~6 周龄, 质量 18~22 g, 由中山医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂及器材

培养液的配制: 体积分数(φ)为 80% RPMI 1640 + 体积分数(φ)为 20% 小牛血清 + 青霉素(100 × 10³ U/L) + 链霉素(100 × 10³ U/L); 鼠抗人 HLA II (DR、DP、DQ) 单克隆抗体: 丹麦 DAKO 公司生产; LSAB 免疫组织化学染色试剂盒: 丹麦 DAKO 公司生产。

^① 国家自然科学基金资助课题(38770747)

1.3 组织标本取材

随机采集我院临床甲状腺手术中正常甲状腺组织 15 例, 每例采集标本大小为 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$, 采集后立即放入无菌 Hanks' 溶液中漂洗, 无菌操作, 将其剪成 $1 \sim 1.5\text{ mm}^3$ 大小组织片备用, 每例剪碎后分为 7 组, 每组 8 ~ 10 片组织, 分别采用 7 种不同方法处理。

1.4 实验分组

本实验分为 7 组: 第 1 组: 新鲜甲状腺组织, 未经培养或照射; 第 2 组: 经 $\varphi = 95\%$ 空气和 $\varphi = 5\%$ CO_2 培养 7 d; 第 3 组: 经 $\varphi = 95\%$ 空气和 $\varphi = 5\%$ CO_2 培养 14 d; 第 4 组: 经 $\varphi = 95\%$ O_2 和 $\varphi = 5\%$ CO_2 培养 7 d; 第 5 组: 经 $\varphi = 95\%$ O_2 和 $\varphi = 5\%$ CO_2 培养 14 d; 第 6 组: 经 ^{60}Co 6 Gy 照射后在 RPMI 1640 中培养 14 d; 第 7 组: 经 ^{60}Co 6 Gy 照射后移植于 Balb/c 裸小鼠肾包膜下过渡 14 d。

1.5 免疫组织化学染色 HLA II 抗原阳性细胞计数

将以上 7 组处理后的每例标本采用免疫组织化学染色法进行切片染色, 于高倍镜 (40×10 倍) 下利用网格目镜进行观察, 每例取 3 个视野, 分别计数其四角及中央方格 (每方格面积为 $0.05\text{ mm} \times 0.05\text{ mm}$) 共 5 个方格中的阳性细胞数, 计算得出平均每方格即单位面积 ($2.5 \times 10^{-3}\text{ mm}^2$) 中的 HLA II 抗原阳性细胞数。

1.6 统计学处理

将以上免疫组织化学检查所得的单位面积内 HLA II 抗原阳性细胞数结果采用 SPSS 统计软件包 (7.5 版) 行多个配伍样本方差分析比较。

2 结果

2.1 培养后甲状腺组织形态学观察

空气、高氧培养、经 ^{60}Co 照射后体外培养及裸小鼠

表 1 各组 HLA II 类抗原阳性细胞数多个配伍方差分析 P 值结果

Table 1 The results (P) of multivariate ANOVA on the number of HLA II positive cells of each group

| | Group 1 | Group 2 | Group 3 | Group 4 | Group 5 | Group 6 |
|---------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Group 2 | 0.091 | | | | | |
| Group 3 | 0.003 ¹⁾ | 0.181 | | | | |
| Group 4 | 0.054 | 0.804 | 0.274 | | | |
| Group 5 | 0.013 ¹⁾ | 0.399 | 0.617 | 0.551 | | |
| Group 6 | 0.01 ¹⁾ | 0.358 | 0.672 | 0.501 | 0.939 | |
| Group 7 | < 0.001 ¹⁾ | < 0.001 ¹⁾ | 0.002 ¹⁾ | < 0.001 ¹⁾ | < 0.001 ¹⁾ | < 0.001 ¹⁾ |

1) Means significant different between the two groups, the other s present no significant different between the two groups

体内培养 14 d 的甲状腺组织结构完整, 其滤泡内见正常胶质存在, 滤泡上皮细胞无变性坏死。

2.2 免疫组织化学检测结果

将 7 组处理后的甲状腺组织标本分别行免疫组织化学检查, 单位面积 HLA II 类抗体染色阳性细胞计数结果 ($\bar{x} \pm s$) 由第 1 组至第 7 组依次为 n (HLA II, positive cells, $2.5 \times 10^{-3}\text{ mm}^2$) = 3.1 ± 0.9 , 2.4 ± 0.7 , 1.9 ± 0.7 , 2.2 ± 0.8 , 1.9 ± 0.6 , 1.9 ± 0.8 , 0.6 ± 0.3 (图 1)。

通过统计学分析表明, 7 组间总差异 $P < 0.01$, 说明 7 组间差异有显著性意义; 再行各组两两比较 (表 1), 空气 (第 2 组) 及高氧培养 7 d (第 4 组) 的 HLA II 类抗原阳性细胞数较新鲜组织无明显减少 ($P > 0.05$); 但其培养 14 d 组 (第 3、5 组) 较新鲜组有明显减少 ($P < 0.05$), 然而其减少程度与 7 d 培养组 (第 2、3、4、5 组之间) 差异无显著性意义 ($P > 0.18$); 裸小鼠体内培养是所有实验组 HLA II 类抗原阳性细胞数减少最明显的, 与其它 6 组比较差异均有显著性意义 ($P \leq 0.002$)。

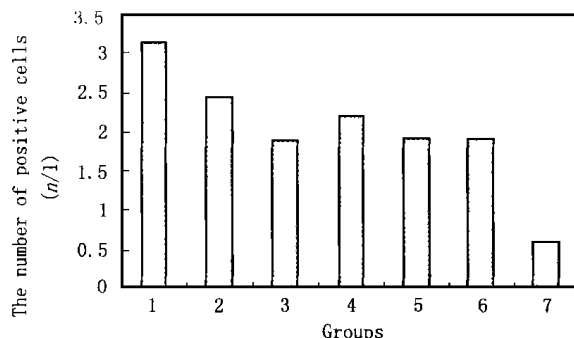


图 1 各组的单位面积 HLA II 抗原阳性细胞数

Fig. 1 The numbers of HLA II positive cells on each fixed area

n (HLA II positive cells, $2.5 \times 10^{-3}\text{ mm}^2$)/1

3 讨论

3.1 空气及高氧培养对 HLA II 类抗原阳性细胞数的影响

体外培养是甲状腺、甲状旁腺移植物存活时间延长的一种有效措施,但培养条件不同,对移植物存活时间的影响不同^[1,2],对其机理较为普遍接受的过客淋巴细胞学说,认为引起排斥反应的主要是含有 HLA II 类抗原的过客淋巴细胞,后者的减少将使移植物的存活时间延长^[3,4]。

过客淋巴细胞对其周围环境较甲状腺实质细胞敏感,而且其自然寿命也明显短于实质细胞,当周围环境(如含氧量、氧压及酸碱度等)发生变化时,此类细胞容易发生变性坏死。许多研究显示在高压氧环境下过客淋巴细胞减少更为明显^[4],主要是由于氧自由基对此类细胞的毒性作用。我们认为尽管作为体外培养环境的空气中无高压氧环境的氧自由基的作用,但因过客淋巴细胞对空气培养的耐受性不如甲状腺实质细胞,随着培养时间的延长,过客淋巴细胞的数量逐渐减少,只是减少的速度没有高压氧环境下的速度迅速,本实验空气培养 7 d 的甲状腺组织中 HLA II 类抗原阳性细胞数与新鲜组织比较无明显变化,但培养 14 d 后其 HLA II 类抗原阳性细胞数则明显少于新鲜组织,不过与培养 7 d 组比较尚无显著差异,由于本实验中高氧的压力为一个大气压,尚不能充分显示氧自由基的作用,因此,其结果与空气培养组无显著差异。

3.2 ⁶⁰钴照射对移植物的作用

过客淋巴细胞对放射线照射较甲状腺实质细胞更为敏感,1955 年 Hardin 等^[5]发现放射线照射皮肤移植物,可选择性消除其过客淋巴细胞,使移植物存活时间延长,Sollinger^[6]及 Talmage 等^[7]实验研究均通过移植后的甲状腺存活时间延长,间接推测放射线照射可减少移植物过客淋巴细胞及抗原性,但进一步实验表明照射的效果较培养的差,认为其理由是移植物的巨噬细胞对射线有一定抵抗力,不能较满意地被消除。我们实验显示⁶⁰钴照射后培养 14 d 后 HLA II 类抗原阳性细胞数较新鲜组减少,但与空气、高氧培养 14 d 组无显著差别。

3.3 裸鼠中间过渡的作用

许多研究表明 Balb/c 裸小鼠无 T 淋巴细胞,但体内有 NK 细胞及 B 淋巴细胞,它可溶解异种移植物如甲状腺、甲状旁腺组织内的过客淋巴细胞,而其组织实质细胞的形态与功能仍保存完好。用以作为对照

研究的 SCID 鼠无 T、B 淋巴细胞及 NK 细胞^[8],甲状腺组织及其过客淋巴细胞都可在 SCID 鼠体内存活^[9],甲状腺在 SCID 鼠内过渡时,由于过客淋巴细胞不能在 Balb/c 裸小鼠体内那样可以去除,因此将在 SCID 鼠内过渡过的移植物进行同种移植,移植物的存活时间未能延长,说明了 Balb/c 裸小鼠体内培养可选择性消除过客淋巴细胞。

我们的实验中,甲状腺经⁶⁰钴 6 Gy 照射后在 Balb/c 裸小鼠肾包膜下过渡 14 d,其 HLA II 类抗原阳性细胞数较新鲜组、空气和高氧培养及单纯钴照射组明显降低,进一步说明 Balb/c 裸小鼠过渡对过客淋巴细胞清除作用比空气及高氧培养的效果更好。

裸小鼠体内培养具有不易受体外培养环境的污染等优点,我们曾采用胎儿甲状旁腺经 6 Gy ⁶⁰钴体外照射、裸小鼠体内培养 14 d 后行同种移植治疗甲状旁腺功能低下症 4 例^[10],仅于手术前后 4 d 服用环孢素 A,以后不接受任何免疫抑制剂,效果良好,无副作用,值得推广。

参 考 文 献

- 1 Todd I, Pujol-Borrell R, Hammond L J, *et al.* Interferon γ induced HLA-DR expression by thyroid epithelium. *Clin Exp Immunol*, 1985, 61(2): 265
- 2 Moreland A F, Mullbacher A. Enhancement of murine thyroid allograft survival after 16 to 20 hours' organ culture. *Transplantation*, 1987, 43(3): 417
- 3 温哲盛, 陈国锐, 黄雪玲, 等. 空气和高氧培养对大鼠甲状旁腺移植物存活期的影响及比较. *中华器官移植杂志*, 1997, 18(1): 19
- 4 Hullett D A, Landry A S, Leonard D K, *et al.* Enhancement of thyroid allograft survival following organ culture. *Transplantation*, 1989, 47(1): 24
- 5 Hardin C A, Werder A A. One year study of surviving homografted mouse skin. *Plast Reconstr Surg*, 1955, 15(2): 107
- 6 Sollinger H W, Mack E, Cook K, *et al.* Allo-transplantation of human parathyroid tissue without immunosuppression. *Transplantation*, 1983, 36(6): 599
- 7 Talmage D W, Dart G, Radovich J, *et al.* Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection. *Science*, 1976, 191(4225): 385
- 8 Schuler W, Bosma M J. Nature of the SCID defect: a defective VDJ recombinase system. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1989, 152(1): 55
- 9 Mosier D E, Gulizia R J, Baird S, *et al.* Transfer of a functional human immune system. *Nature*, 1988, 335(6187): 256
- 10 刘仁斌, 陈国锐. 经裸鼠中间过渡胎儿甲状旁腺同种移植四例. *中华器官移植杂志*, 1998, 19(1): 42