

· 论著 ·

细胞因子对异种脱细胞真皮基质免疫调节作用的临床研究

姜笃银 陈璧

【摘要】 目的 探讨烧伤患者接受异种/异体脱细胞真皮基质 (xeno-/allo-ADM) 移植后全身和局部多种细胞因子与移植近期转归的关系。方法 在大面积烧伤患者的四肢切痂创面上, 移植 xeno-ADM (12 例, 19 块) 或 allo-ADM (15 例, 18 块), 其上覆盖自体超薄断层皮片, 并以 6 例单纯移植自体中厚断层皮片 (auto-TTS) 的烧伤患者为对照。移植成活后 4~8 周, 收集局部组织标本、血清和 xeno-ADM 排斥后的创面渗出液, 采用免疫组织化学染色与酶联免疫吸附法 (ELISA), 检测白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-4、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和 γ 型干扰素 (IFN- γ) 的含量。结果 免疫组织化学染色结果显示, 移植体内 IL-1 β 、IL-4、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 的阳性细胞密度或着色强度相比较, xeno-ADM > allo-ADM > auto-TTS ($P < 0.05$)。ELISA 检测结果显示, xeno-ADM 被排斥后创面渗出液中 IL-4、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 水平明显高于自体血清, 但其血清 IL-4 与 IFN- γ 水平分别低于和高于未排斥时。xeno-ADM 移植后血清中 IL-4、IFN- γ 水平明显高于 allo-ADM 和 auto-TTS ($P < 0.05 \sim 0.01$)。结论 xeno-ADM 移植后可在局部检测到高水平的 IL-1 β 、IL-4、IL-6、IFN- γ , 可能与细胞杀伤和细胞因子介导的免疫放大作用有关。这些细胞因子的动态变化, 将有助于解释 xeno-ADM 移植的不良转归。

【关键词】 烧伤; 细胞因子; 细胞外基质; 移植, 异种; 免疫调节; 移植排斥;

Clinical study on the immunoregulation effects of cytokines on the acellular xenogenic dermal matrix JIANG Du-yin, CHEN Bi. Department of Burns, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between some cytokines and early outcome of grafts in burn patients receiving xeno-/allo-ADM grafting. Methods Nineteen xeno-ADMs were grafted onto the wounds of 12 patients after escharectomy in extremities, and 18 allo-ADMs were grafted onto the escharectomy wounds of 15 patients in extremities. All the grafts were covered with thin split thickness skin autografts. Six patients grafted with split thickness skin autografts (auto-TTS) were employed as control. After the grafts survived for 4 to 8 weeks, immunohistochemistry and ELISA methods were employed to determine the contents of IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α and IFN- γ in the exudation fluid from wounds after the rejection of xeno-ADM, local skin and peripheral blood. Results It was exhibited by immunochemistry staining that the positive cellular density and staining intensity of the IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α and IFN- γ in the grafts were ranked as following: Xeno-ADM > allo-ADM > auto-TTS ($P < 0.05 \sim 0.01$). The levels of IL-4, IL-6, TNF- α and IFN- γ in the exudation fluid during the rejection of xeno-ADM were obviously higher than those in the blood of the patients as determined by ELISA, while the serum levels of IL-4 and IFN- γ in xeno-ADM group were lower and higher than those in xeno-ADM when without rejection respectively. The serum levels of IL-4, TNF- α and IFN- γ in xeno-ADM group were significantly higher than those in allo-ADM and auto-TTS groups ($P < 0.05 \sim 0.01$). Conclusion Local detection of high levels of IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α and IFN- γ might be related to the immune augmentation mediated by cytotoxic lymphocytes and cytokines. The dynamic changes of these cytokines might be helpful to the explanation of the bad outcome of xeno-ADMs.

【Key words】 Burn; Cytokine; Acellular dermal matrix; Grafting, xenogenic; Immunoregulation; Grafts rejection

细胞因子 (cytokine) 是由活化的免疫细胞和某些基质细胞分泌的、介导和调节免疫应答及炎症反应的小分子多肽, 参与机体多种免疫效应^[1]。异体脱细胞真皮基质 (allogenic acellular dermal matrix,

allo-ADM) 已应用于临床^[2], 但异种 (猪) 脱细胞真皮基质 (xenogenic acellular dermal matrix, xeno-ADM) 的临床应用才刚起步^[3,4]。为此, 笔者对大面积烧伤患者分别进行 xeno-ADM、allo-ADM、自体皮移植, 取其移植成活后的外周静脉血、局部活检组织标本和发生排斥反应后的创面渗出液, 采用免疫组织化学方法和酶联免疫吸附法 (ELISA), 检测白细胞介素

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39070822)

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学西京医院烧伤科 (姜笃银现在秦州市第四人民医院秦州市创伤整形研究所, 225300)

(IL)-1 β 、IL-4、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和 γ 型干扰素 (IFN- γ)，探讨 xeno-ADM、allo-ADM 移植后上述细胞因子对机体的免疫调节作用。

资料与方法

1. 脱细胞真皮基质 (ADM) 的制备:按文献 [3] 方法,将 25 ~ 30 kg 健康小猪 (本院实验动物中心) 的皮肤和自愿捐献的成人异体皮 (本院皮库) 用取皮鼓反取成中厚皮片 (厚约 0.2 mm),依次用戊二醛和胰蛋白酶-triton X 100 进行蛋白变性及脱细胞处理,均匀打孔,以 ⁶⁰Co 照射后备用。

2. 病例入选标准与分组:选择笔者单位 1996 ~ 2000 年收治的大面积烧伤患者,于四肢非功能部位的切痂创面上移植 xeno-ADM (xeno-ADM 组,12 例,19 块) 或 allo-ADM (allo-ADM 组,15 例,18 块),其上覆盖自体超薄断层皮片,一次完成复合皮 (composite skin, CS) 重组手术,每块 CS 的面积为 140 ~ 240 cm²。术后 2 周两组移植皮片均完全成活 (图 1)。xeno-ADM 组术后 6 ~ 27 周有 3 例 6 块 CS 皮肤表面破溃、ADM 外露^[2] (图 2)。另以 6 例病情相当、单纯覆盖自体断层中厚皮 (auto-TTS) 的烧伤患者作对照 (auto-TTS 组)。



图 1 术后 2 周, xeno-ADM 组 CS 完全成活
Fig 1 Composite skin in xeno-ADMs survived completely on 2 post-operation week (POW)



图 2 术后 123 d, xeno-ADM 组 CS 发生排斥反应,部分创面和 xeno-ADM 外露
Fig2 Rejection response occurred in the composite skin of xeno-ADM group and part of wounds and xeno-ADMs disclosed on 123 post-operation day (POD)

3. 标本采集:收集 xeno-ADM、allo-ADM 以及 auto-TTS 组的下述标本:(1) 术后 4 ~ 8 周时的外周静脉血清各 1 份;(2) 术后 4 ~ 52 周时的移植物局部活检组织标本各 12、10、6 块;(3) 发生排斥反应的患者的外周静脉血、创面渗出液和局部活检组织标本各 3 份。组织标本行 OCT 塑料包埋,各样本于 -76℃ 冻存储用。

4. 检测方法:(1) 组织学方法:用恒温冷冻切片机 (德国 Shan Don610E 公司) 连续切片 (厚度为 6 μ m),行 HE 和甲苯胺蓝染色。(2) 免疫组织化学染色:小鼠抗人 IL-1 β 、IL-4、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 的单克隆抗体 (mAb) 购自第四军医大学基础部免疫学教研室,EnVision™ system 试剂盒购自丹麦 DAKO 公司。设空白对照和替代试验对照,一抗以 1:20 ~ 1:100 稀释后,按链霉亲和素-生物素复合物 (SABC) 方法对组织切片进行免疫组织化学染色。棕黄色阳性结果定位于胞浆膜和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM),阴性对照不着色。参照 Walter 等^[5] 的方法进行半定量分析,以 xeno-ADM 组的免疫组化染色结果为参照,未着色者记为“-”,强着色者记为“+++”。(3) ELISA 检测法:IL-6 和 TNF- α ELISA 染色试剂盒购自第四军医大学基础部免疫学教研室;IL-4 和 IFN- γ ELISA 染色试剂盒购自比利时 Hedgenix 公司。按说明书方法检测各组血清和创面渗出液样本中的上述细胞因子。由于试剂不足,对未排斥的 xeno-ADM 组血清未行 IL-6 检测。(4) 其他检查:取 xeno-ADM 组中发生排斥反应的患者的创面渗出物,作细胞学检查,并对其活检组织标本进行细菌培养。

6. 统计学方法:计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行两样本均数 *t* 检验和方差分析,等级资料采用 Ridit 检验。

结果

1. HE 和甲苯胺蓝染色结果:术后 4 周可见 xeno-ADM 组有异物巨细胞反应和胶原结构被破坏,移植排斥前尤为显著,而 allo-ADM 组仅呈一过性炎症反应,胶原结构完整。术后 4 ~ 8 周见 xeno-ADM、allo-ADM 组周围及其组织中均有密集的淋巴细胞、单核-巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和嗜嗜性肥大细胞等。

2. 免疫组织化学染色结果:TNF- α 免疫组织化学染色的阳性细胞主要为单核-巨噬细胞;IL-4 和 IFN- γ 的免疫组织化学染色阳性细胞主要为活化的

淋巴细胞;IL-6 分布于单核-巨噬细胞、淋巴细胞以及成纤维细胞、内皮细胞和表皮细胞中。3 组细胞因子染色的阳性细胞密度或染色强度相比较: xeno-ADM 组 > allo-ADM 组 > auto-TTS 组 ($P < 0.05$), 在排斥前的 xeno-ADM 标本中, 异物巨细胞反应明显, IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 的阳性细胞数量和表达强度达到峰值 (图 3 ~ 5), 但 IL-4 表达水平较低; 排斥后各细胞因子水平均迅速下降。

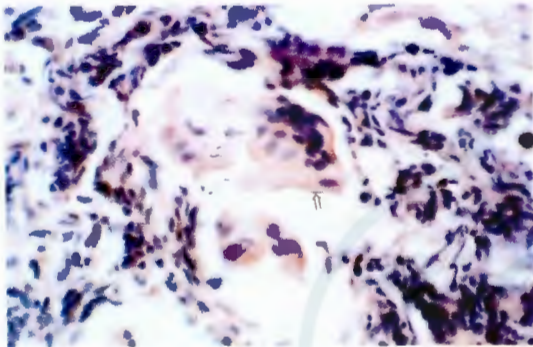


图 3 术后 8 周, xeno-ADM 组移植异物巨细胞 (↑) 表达 IL-1 β SABC $\times 400$

Fig 3 IL-1 β expression in graft foreign body giant cells of xeno-ADM group at 8 POW SABC $\times 400$

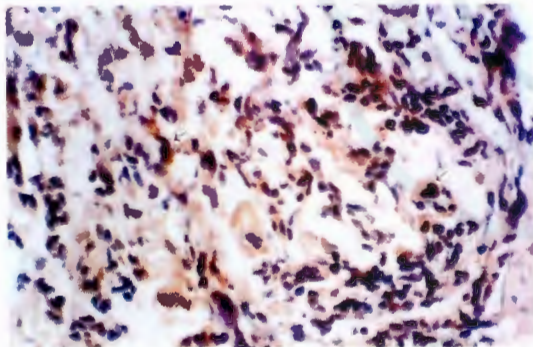


图 4 发生排斥反应前, xeno-ADM 组 ADM 内免疫细胞 (↑) 强表达 TNF- α SABC $\times 400$

Fig 4 Intensified expression of TNF- α in the immune cells of xeno-ADM group before rejection response SABC $\times 400$

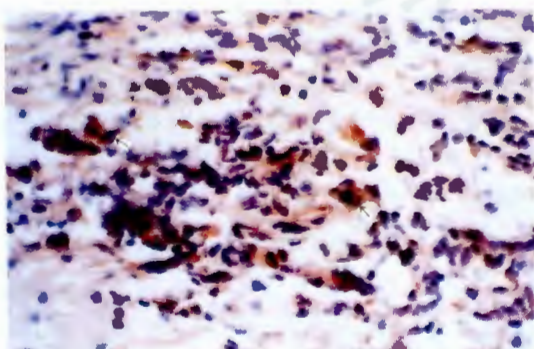
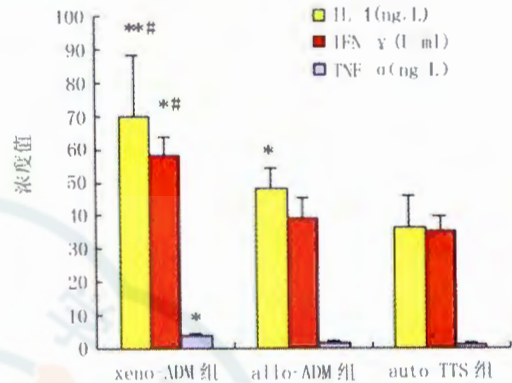


图 5 发生排斥反应前, xeno-ADM 组 ADM 内 IFN- γ 阳性细胞 (↑) 密集 SABC $\times 400$

Fig 5 IFN- γ positive cells densified in ADM of xeno-ADM group before rejection response SABC $\times 400$

3. ELISA 检测结果: xeno-ADM 组血清 IL-4 和 IFN- γ 含量明显高于 allo-ADM 组和 auto-TTS 组 (P

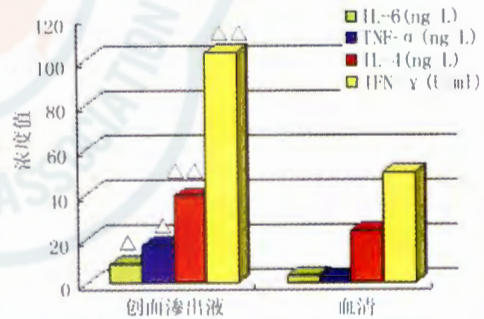
$< 0.05 \sim 0.01$), 见图 6。xeno-ADM 组中发生排斥反应的患者血清中 IL-4、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 含量显著低于创面渗出液 ($P < 0.05 \sim 0.01$), 见图 7; 其中 IL-4 水平低于发生排斥反应前, 而 IFN- γ 含量则较排斥前升高。



注: 与 auto-TTS 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 allo-ADM 组比较, # $P < 0.05$

图 6 术后 4 ~ 8 周各组血清 IL-4、TNF- α 和 IFN- γ 含量比较

Fig 6 Comparison of IL-4, TNF- α and IFN- γ content in each groups on 4 - 8 POW



注: 与血清标本比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 7 发生排斥反应的 xeno-ADM 组创面渗出液和血清中 IL-4、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 含量比较

Fig 7 Comparison of IL-4, IL-6, TNF- α and IFN- γ content between wound exudation fluid and sera of rejected xeno-ADMs

4. 其他检查: xeno-ADM 组发生排斥反应后活检组织中细菌和霉菌培养结果呈阴性; 在创面渗出液的细胞涂片上, 有大量组织碎片、变性或 (和) 死亡的细胞, 后者主要为淋巴细胞、单核-巨噬细胞、嗜酸性粒细胞等。

讨 论

以非特异性免疫为基础的特异性免疫反应是由单核-巨噬细胞和淋巴细胞系统协同完成的。IL-1 β 、IL-4、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 是一组主要由活化淋巴细胞和单核-巨噬细胞系统分泌的多肽物质^[1], 在同种移植发生急性排斥反应时, 既参与移植物的特异性免疫反应, 又直接介导非特异性炎

症损伤过程。IL-4 和 INF- γ 是分别诱导 Th2 和 Th1 型 T 细胞分化和增殖所特有的细胞因子。本研究结果显示, xeno-ADM 组患者发生排斥反应后的血清 IL-4 浓度显著低于发生排斥反应前, 而发生排斥反应者血清 INF- γ 浓度又明显高于未排斥者, 充分显示二者调控着移植物被接受或发生排斥反应的进程, 即组织中不同亚群 (Th2/Th1) 的 T 淋巴细胞参与了 ADM 移植物的免疫反应^[6]。在异种移植物局部, 密集浸润的 T/B 细胞、单核-巨噬细胞和肥大细胞等均强表达 IL-1 β 、IL-4、IL-6、TNF- α 和 INF- γ , 可能在诱导细胞免疫和组织降解吸收等非特异性损伤中起重要作用, 其中由 IL-4 主要介导的 Th2 免疫反应最终决定 xeno-ADM 移植物的接受情况。虽然 allo-ADM 组也产生 IL-4 介导的免疫反应, 但缺乏激烈的炎症-免疫反应及 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 INF- γ 表达, 因 ADM 内没有任何细胞, 推测两组明显不同的免疫反应可能与种属相关的组织蛋白抗原有关。

大鼠埋植猪-ADM 后追踪观察 1 年, 可见广泛的创面收缩、宿主抗猪-ADM 的体液免疫反应和细胞免疫反应^[4]。该结果与本研究较为一致。国内部分学者在猪-ADM 的临床应用中未观察到类似的排斥反应, 并不意味着人体对该移植物不排斥, 笔者分析可能与以下因素有关: (1) 上述结果大多基于肉眼或短期组织学观察, 缺乏深入的免疫学研究。(2) 缺乏对移植方法的可比性分析。CS 移植分两步法和一步法, 前者有助于宿主排除 ADM 内的强抗原成分 (如基底层的 IV 型胶原和层粘连蛋白^[4]), 并利于覆盖于其上的较厚自体移植皮片的成活等,

因此在评价 xeno-ADM 的真皮替代物作用时, 应遵循方法学一致的原则, 不能以牺牲供皮区和 (或) 增加患者痛苦为代价来保证 xeno-ADM 的成活。(3) 本研究中, 产生排斥反应的 3 例 6 块 xeno-ADM 移植物为同批制作的猪-ADM, 其脱细胞性虽经组织学证实, 但不能排除残留的少量异种细胞碎片诱导的排斥反应。(4) 正确认识移植排斥反应的概念, 即移植排斥反应除指大体观察到的严重排斥反应外, 还应包括应用 (分子) 组织病理学、免疫学方法检测到的体液/细胞免疫反应以及组织更替现象。

人体对于猪-ADM 的免疫反应受局部和全身 Th2 占优势的双通路限制, 其组织蛋白的生物相容性明显低于 allo-ADM。对猪-ADM 潜在的免疫活性的认识, 将有益于未来异种器官的临床应用以及应用生物治疗手段来干预和调控免疫反应过程。

参 考 文 献

- 1 龚少华. 细胞因子与粘附分子. 见: 陈实, 主编. 移植免疫学. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 13 - 33.
- 2 Jiang DY, Chen B, Jia CY, et al. Manufacture and clinical application of heterogeneous/ allogeneic acellular dermal matrix cross linked by lutaraldehyde. J Fourth Mil Med Univ, 1999, 20: 371 - 374.
- 3 姜笃银, 陈璧, 徐明达, 等. 异种脱细胞真皮基质的制作和临床应用观察. 中华烧伤杂志, 2002, 18: 15 - 18.
- 4 Desagun EZ, Botts JL, Srivastava A, et al. Long-term outcome of xenogenic dermal matrix implantation in immunocompetent rats. J Surg Res, 2001, 96: 96 - 106.
- 5 Walter RJ, Matsuda T, Reyes HM, et al. Characterization of acellular dermal matrices (ADMs) prepared by two different methods. Burns, 1998, 24: 104 - 113.
- 6 姜笃银, 陈璧, 贾赤宇, 等. 异种或同种异体脱细胞真皮基质移植后免疫细胞分型的研究. 中华烧伤杂志, 2003, 19: 104 - 108.

(收稿日期: 2002 - 02 - 25)

(本文编辑: 罗 勤 莫 愚)

· 消息 ·

《手足创伤感觉重建术》已出版

《手足创伤感觉重建术》已由人民军医出版社正式出版。该书是由第四军医大学唐都医院整形科陈绍宗教授结合大量的基础实验研究和多年的临床经验, 总结出的血管蒂岛状皮瓣、神经血管蒂皮瓣、感觉神经移位、神经吻合等 7 类用于重建和修复手足创伤性感觉缺失的方法, 并在书中对每种手术方法的应用解剖、适应证、手术过程及术中注意要点及其优缺点做了详尽论述。全书 9 万余字, 照片 55 帧, 线条图 117 帧, 是手足外科、整形外科、烧伤科等相关学科医师的理想参考书。

欲购者请与第四军医大学唐都医院整形科张灵芝联系。电话: 029 - 3377738; 地址: 陕西西安第四军医大学唐都医院整形科; 邮编: 710038。

《中华现代中西医杂志》《中华现代临床医学杂志》征稿通知

《中华现代中西医杂志》、《中华现代临床医学杂志》是综合性、国际性医学学术期刊。具有 ISSN/CN 标准刊号, 被收入国内多种学术期刊光盘版。面向医、药、护、管、卫等专业的科研、教学、临床工作者。本系列刊物发表周期短。在本系列杂志上刊登论文者可获得继续教育学分。栏目设有: 专家论坛、论著、综述、临床医学、中西医结合、中医中药、药物研究、特检、护理、预防医学、医院管理等。来稿免收审稿费。地址: 北京 100039 - 40 信箱杂志编辑部收, 电话: 010 - 88285910, 邮编: 100039, 电子信箱: YXZZ@sohu.com。