

# 同种异基因肝脏非实质细胞对小鼠移植皮片存活的影响

李宁 袁育康 丁小明

**【摘要】** 目的 探讨输注同种异基因肝脏非实质细胞(NPC)对小鼠移植皮片存活的影响及其机制。方法 选用123只近交系小鼠,其中C<sub>3</sub>H小鼠65只,C<sub>57</sub>BL/6小鼠58只。20只C<sub>3</sub>H小鼠作移植供体;40只C<sub>3</sub>H小鼠肝脏为NPC来源;余下5只C<sub>3</sub>H小鼠作混合淋巴细胞培养(MLC)的刺激物,由每分钟放射性荧光闪烁计数(cpm)值表示。58只C<sub>57</sub>BL/6小鼠分为实验组50只,对照组8只。对照组小鼠仅作皮肤移植,未行NPC输注。实验组50只小鼠尾静脉输入由40只C<sub>3</sub>H小鼠肝脏制备的2×10<sup>7</sup>个NPC,48h后腹腔注射环磷酰胺200mg/kg,并接受C<sub>3</sub>H小鼠皮片移植。于NPC输注前及输注后各时相点处死实验组小鼠,每时相点5只。检测血清白细胞介素(IL)-4水平、脾淋巴细胞嵌合体水平及cpm值,并观察2组小鼠的存活时间。结果 实验组小鼠皮片存活时间为(70.0±17.2)d明显长于对照组;NPC输注后IL-4、嵌合体水平逐渐上升,而cpm值逐渐降低。NPC输注后60d实验组小鼠IL-4为(251.5±11.0)ng/L,脾脏嵌合体水平达到(26.30±1.04)%。结论 IL-4、嵌合体水平的升高对诱导和保持免疫耐受起着重要的作用。

**【关键词】** 白细胞介素4; 嵌合体; 免疫耐受; 皮肤移植; 肝脏非实质细胞

Effects of allogeneic hepatic nonparenchymal cell on the survival of grafted skin in mice LI Ning\*, YUAN Yu-kang, DING Xiao-ming. \*Department of Immunology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, P. R. China

**【Abstract】** Objective To investigate the effect of allogeneic hepatic nonparenchymal cell (NPC) on the survival of grafted skin in mice and its underlying mechanism. Methods Sixty-five C<sub>3</sub>H and fifty-eight C<sub>57</sub>BL/6 mice were employed in the study. Twenty C<sub>3</sub>H mice were used as skin donor and forty as the source of hepatic NPC. The rest five served as the stimulators of mixed lymphocyte culture (MLC) before and on the 7th, 18th, 30th, and 60th day after NPC infusion with 1 at each time point. MLC was determined and expressed as count per minute (CPM). Fifty-eight C<sub>57</sub>BL/6 mice were further divided into experimental (E, n = 50) and control groups (C, n = 8). The mice in C group only underwent skin grafting without NPC infusion. The mice in E group received with 2 × 10<sup>7</sup> NPC via caudal vein, followed by peritoneal injection of cyclophosphamide (200 mg/kg) 48 hours later; They were grafted with skin donated from C<sub>3</sub>H mice 18 days after injections. The survival time of the mice in the two groups was observed. The serum levels of interleukin-4, chimera and MLC in the two groups were determined before and on 7th, 18th, 30th, 60th days after NPC infusion, and micro-chimera were also assessed on the 1st and 3rd day after NPC infusion. Five mice were sacrificed at each time point. Results The survival time of skin graft in E group (70.0 ± 17.2 day) was obviously longer than that in C group. The serum levels of IL-4, chimera in E group were increased gradually, while MLC response decreased gradually. The serum IL-4 level reached 251.5 ± 11.0 ng/L and splenic chimera level to 26.30 ± 1.04% on the 60th day after NPC infusion. Conclusion The high levels of IL-4 and chimera might play important roles in inducing and maintaining immune tolerance.

**【Key words】** Interleukin-4; Chimera; Immune tolerance; Skin transplantation; Hepatic nonparenchymal cell

异种(体)皮移植是烧伤创面良好的覆盖物,它为创面残存的自体皮肤及移植微粒皮的生长、扩展提供较佳的微环境。因此,如何减轻异基因皮肤移植后免疫排斥反应的发生,延长皮肤存活期是烧伤研究的重要方向之一。笔者以近交系小鼠皮肤移植为模型,通过输注供者肝脏非实质细胞(nonparenchymal cell, NPC),动态监测受者体内嵌合体、血清

白细胞介素(IL)4水平的变化及作混合淋巴细胞培养(MLC),进一步探讨NPC诱导免疫耐受的机制。

## 材 料 与 方 法

1. 动物来源及分组:123只近交系小鼠,年龄4—6周,体重(20±2)g,雌雄各半,包括65只C<sub>3</sub>H小鼠(H-2K、I-EK)和58只C<sub>57</sub>BL/6小鼠(H-2b、I-Ab)。C<sub>3</sub>H小鼠购自上海实验动物中心和第四军医大学实验动物中心,其中20只小鼠作为皮片移植供体,40只小鼠用于制备NPC,余下5只小鼠作为

作者单位:710061 西安交通大学免疫学教研室(李宁、袁育康);西安交通大学附属第一医院移植中心(丁小明)

MLC 的刺激物。C<sub>57</sub>BL/6 小鼠。购自第四军医大学实验动物中心,作为皮肤移植受体,分为实验组 50 只,对照组小鼠 8 只。

2. 免疫耐受的诱导及皮肤移植:取 40 只 C<sub>3</sub>H 小鼠的肝脏,参照文献[1]制备含  $2 \times 10^7$  个 NPC 的 200  $\mu$ l 悬液,注入 50 只实验组小鼠尾静脉内。48 h 后向其腹腔内注射环磷酰胺(200 mg/kg)。NPC 输注后立即对实验组小鼠进行皮肤移植,方法参照文献[2];对照组小鼠仅行皮肤移植。两组皮源均为 20 只 C<sub>3</sub>H 小鼠。

3. 检测项目:于 NPC 输注前及输注后 1、3、7、18、30、60 d 7 个时相点处死实验组小鼠,每时相点 5 只(输注前及输注后 7、18、30、60 d 处死实验组小鼠前,先取其尾静脉血,用酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(法国 Golden Bridge 公司)测定血清 IL-4 水平的变化)。取小鼠脾脏,通过尼龙棉柱分离获得 T 淋巴细胞,进行如下检测。(1)MLC 的检测:在输注前及输注后 7—60 d 共 5 个时相点的实验组小鼠脾淋巴细胞中,加入经丝裂霉素处理的 5 只 C<sub>3</sub>H 小鼠的脾淋巴细胞进行刺激。采用氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷(<sup>3</sup>H-TdR)掺入法检测反应产物,结果以每分钟放射性荧光闪烁计数值(cpm)表示。(2)嵌合体分析:取输注后 1—60 d 共 6 个时相点下实验组小鼠的脾淋巴细胞,加入异硫氰酸荧光素(FITC)-anti I-EK(美国 Pharmingen 公司)进行荧光标记,用流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)分析。(3)观察两组小鼠术后移植皮片存活时间。

4. 统计学处理:数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,对所得结果采用配对计量资料比较,行 *t* 检验。

## 结 果

1. IL-4 水平及 MLC 反应的动态监测:随着 NPC 输注后时间的延长,实验组小鼠体内 IL-4 水平逐步升高( $P < 0.01$ ),但 MLC 反应的 cpm 值明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 NPC 输注前及输注后不同时间血清 IL-4 的变化及 MLC 反应( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Changes in the serum levels of IL-4 and cpm before and after NPC infusion ( $\bar{x} \pm s$ )

检测时间	鼠数(只)	IL-4 (ng/L)	MLC 反应( $\text{min}^{-1}$ )
NPC 输注前	5	69.7 $\pm$ 5.8	23 422 $\pm$ 1 420
NPC 输注后 7 d	5	100.9 $\pm$ 8.8*	12 153 $\pm$ 1 080*
NPC 输注后 18 d	5	133.6 $\pm$ 5.3*	9 428 $\pm$ 851*
NPC 输注后 30 d	5	209.3 $\pm$ 12.4*	6 927 $\pm$ 268*
NPC 输注后 60 d	5	251.5 $\pm$ 11.0*	6 735 $\pm$ 287*

注:与 NPC 输注前比较,\*  $P < 0.01$

2. 嵌合体水平分析:输注后第 1 天实验组小鼠的脾脏内含少量 C<sub>3</sub>H 来源的细胞,脾脏嵌合体水平为(4.40  $\pm$  0.50)%;输注后第 3 天小鼠脾脏嵌合体水平为(5.80  $\pm$  0.80)%;输注后第 7 天为(7.20  $\pm$  0.50)%;输注后第 18 天为(17.90  $\pm$  0.50)%;输注后第 30 天增加至(20.30  $\pm$  0.90)%;输注后第 60 天小鼠嵌合体水平达到(26.30  $\pm$  1.04)%。

3. 皮片存活时间:NPC 输注后 53、58 d,实验组 2 只小鼠死亡。NPC 输注后 > 60 d,实验组余下 13 只小鼠,其中皮片存活时间超过 70 d 有 12 只,皮片存活时间为(70.0  $\pm$  17.2)d。对照组皮片存活时间为(10.0  $\pm$  0.4)d。

## 讨 论

影响异种(体)皮移植存活的主要原因是移植后的免疫排斥反应,应用免疫抑制剂能有效地减弱排斥反应的发生,延长移植物的存活时间,但也造成了机体的感染或肿瘤的发生,对烧伤患者极为不利<sup>[3]</sup>,因此,在体外动物移植模型中诱导受体针对供体移植皮肤特异性的免疫耐受,是目前烧伤移植的热点问题。

同种移植排斥时,IL-2 和肿瘤坏死因子(TNF) $\alpha$  的蛋白及其 mRNA 水平均明显升高,而 IL-4 不升高<sup>[4]</sup>。现代移植免疫学的理论认为,急性同种排斥是 T 淋巴细胞依赖的免疫反应,CD4<sup>+</sup> 在其中起关键作用。排斥的两个主要效应机制即迟发型超敏反应和细胞溶解性 T 淋巴细胞均需要 CD4<sup>+</sup>、辅助性 T 淋巴细胞(Th)1 分泌的 IL-2 和干扰素(INF)的支持,Th2 产生的 IL-4 倾向于诱导免疫耐受<sup>[5-8]</sup>。

本研究中观察到实验组小鼠嵌合现象持续存在,且随着免疫耐受时间延长(NPC 输注后 18、30、60 d),嵌合体的水平进一步提高;NPC 输注后实验组小鼠血清 IL-4 水平逐渐升高,尤其是处于耐受维持期的小鼠 IL-4 水平进一步升高( $P < 0.01$ );NPC 输注后实验组小鼠 cpm 值明显低于输注前( $P < 0.01$ ),尤其是处于耐受维持期小鼠的 cpm 值,表明其对 C<sub>3</sub>H 小鼠免疫反应明显降低。供者淋巴细胞在受者体内发生嵌合后,可能导致与供者抗原起特异性反应的细胞克隆被清除。目前认为嵌合是供者的免疫活性细胞与受者的免疫系统之间存在双向作用过程,最终建立稳定的嵌合体<sup>[9]</sup>。嵌合体的存在诱导体内残存的、未被特异性输注消除的 T 淋巴细胞大量分泌 IL-4,造成受者体内细胞因子谱系发生改变(Th1  $\rightarrow$  Th2),更有利于嵌合体形成并使其稳定

存在。这两方面相互作用、相互支持,则产生了较持久的免疫耐受状态,并表现为异基因移植皮肤长期存活。

参 考 文 献

- 1 Woo J, Lu L, Rao AS, et al. Isolation, phenotype, and allostimulatory activity of mouse liver dendritic cells. *Transplantation*, 1994, 58: 484 - 491.
- 2 Davies JD, Cobbold SP, Waldmann H. Strain variation in susceptibility to monoclonal antibody-induced transplantation tolerance. *Transplantation*, 1997, 63: 1570 - 1573.
- 3 黎鏊, 主编. 烧伤治疗学. 北京: 人民卫生出版社, 1977.
- 4 Chen Y, Mc-Kenna GJ, Ong C, et al. Liver nonparenchymal cells involved in hyporesponsiveness induced by portal vein injection of alloantigen. *Immunol Lett*, 2002, 81: 1 - 11.
- 5 姜笃银, 陈璧. 细胞因子对异种脱细胞真皮免疫调节作用的临床研究. *中华烧伤杂志*, 2003, 19: 351 - 354.

- 6 于世筠, 许伟石, 曹启栋, 等. 抑制应激对烧伤血浆中 LPS、前炎症细胞因子和 Th1/Th2 细胞因子的影响. *中华烧伤杂志*, 2001, 17: 177 - 180.
- 7 Otto C, Kauczok J, Martens N, et al. Tolerance induction after rat liver transplantation; intrahepatic CD4(+) T cells produce different cytokines. *J Gastrointest Surg*, 2002, 6: 455 - 463.
- 8 Young KJ, Liming Y, Philips MJ, et al. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood*, 2002, 100: 3408 - 3414.
- 9 Starzl TE. Cell migration and chimerism—a unifying concept in transplantation—with particular reference to HLA matching and tolerance induction. *Transplant Proc*, 1993, 25: 8 - 12.

(收稿日期: 2004 - 09 - 03)

(本文编辑: 莫 愚)

· 经验交流 ·

治疗外敷中草药致皮肤烧伤七例

徐刚 周荣芳 张厚宝

外敷新鲜中草药治疗风湿性关节痛所致的皮肤烧伤, 临床少见。笔者单位 1999 年 1 月—2003 年 5 月共收治此类患者 7 例, 现报告如下。

临床资料: 本组均为中老年患者, 其中男 1 例, 女 6 例。农村患者 6 例, 城镇患者 1 例。致伤药物: 石龙芮致伤 4 例, 毛茛致伤 3 例。均为伤后 24 h 内入院。致伤部位: 双侧膝关节 4 例, 单侧膝关节 1 例, 单侧肩关节 1 例, 右前臂 1 例。烧伤面积: 8% TBSA 1 例, < 5% TBSA 6 例。创面特点: 局部可见大片水疱, 壁薄, 渗出液清亮; 表皮破损处基底呈淡红色, 有渗出液; 创面边缘皮肤红肿明显 (图 1)。



图 1 毛茛外敷致皮肤烧伤治疗前, 见大片水疱, 创周红肿

治疗: 去除局部湿敷的中草药。以 1 g/L 的洗必泰溶液清洗创面, 清除残留的中草药与污染的水疱皮, 外敷无菌敷料, 包扎 2—3 d。待创面无渗出后, 改用 10 g/L 磺胺嘧啶银

外敷包扎, 换药 1 次/d; 同时口服或静脉滴注广谱抗生素, 并行注射破伤风抗毒素 (TAT) 等治疗。

结果: 伤后 2 周左右, 本组患者创面完全愈合, 局部有轻度色素沉着, 无瘢痕遗留 (图 2)。



图 2 创面愈合后有轻度色素沉着, 未见瘢痕

讨论 毛茛、石龙芮两种植物常见于水边或阴湿草丛中, 植株有毒, 含有强烈挥发性刺激成分, 主治风湿性关节痛、痈疽肿痛、牙痛等。民间有传统秘方为: 将新鲜毛茛或石龙芮植株捣烂后, 局部外敷治疗风湿性关节痛等。但其与皮肤或黏膜长时间接触会引起烧伤与炎症, 对此人们尚缺乏足够的认识。笔者认为, 本组患者受伤的原因为中草药外敷时间较长, 应在皮肤有明显灼热痛或痛感逐渐加重时及时去除外敷药物。特此建议广大患者对于民间秘方应持科学、谨慎的态度, 最好在中医科医师的指导下正确合理地使用, 以杜绝类似情况的发生。

(收稿日期: 2003 - 09 - 10)

(本文编辑: 罗 勤)

作者单位: 225001 扬州, 苏北人民医院烧伤整形科 (徐刚、周荣芳); 扬州市药品检验所 (张厚宝)