

白细胞介素-2 和 10 mRNA 表达差异在 CD4⁺CD25⁺ T 细胞诱导大鼠肝移植免疫耐受中的意义

史留斌 张弘炜 崔一尧

【摘要】 目的 探讨白细胞介素-2(IL-2)mRNA 及 IL-10 mRNA 表达水平对大鼠肝移植耐受的影响。方法 将实验大鼠随机分 3 组: I 组为急性排斥组; II 组为 CD4⁺CD25⁺T 细胞处理组, 供体 Wistar 大鼠, 受体 SD 大鼠; III 组为移植对照组, 供体、受体均为 SD 大鼠。每组 12 对。肝移植前 7 d, I 组受体大鼠经阴茎背静脉注射含供体脾淋巴细胞的培养液, I 组、III 组注射等量生理盐水; 术后 7 d 随机取 6 只大鼠用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定肝组织中细胞因子 IL-2 mRNA 及 IL-10 mRNA 的表达, 用流式细胞仪检测各组移植肝内分离出的淋巴细胞含量, 同时检测肝脏病理学的变化; 另 6 只观察移植大鼠的生存期。结果 IL-2 mRNA 在 I 组大鼠移植体内出现高表达, II 组仅有微弱表达, III 组则未见表达; IL-10 mRNA 仅在 II 组中表达, 且表达程度较强。I 组和 II 组大鼠存活期均超过 30 d, 与 I 组(8~11 d)比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。I 组大鼠移植后肝脏有大量淋巴细胞浸润, 数量明显高于 II 组和 III 组[(14.31±3.41)×10⁶/g 比 (5.04±1.13)×10⁶/g 和 (1.55±0.40)×10⁶/g, $P < 0.01$], 且显示中度排斥反应。I 组大鼠有中等量淋巴细胞浸润, 病理为无排斥或不确定性排斥, 且淋巴细胞中 CD4⁺百分比[(43.31±8.07)%]和 CD4⁺CD25⁺百分比[(11.39±1.92)%]均显著高于 I 组[(33.65±7.25)%, (3.05±0.62)%]和 III 组[(31.18±6.52)%, (3.37±0.72)%], 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。III 组未见明显淋巴细胞浸润, 病理为无排斥反应。结论 IL-2 参与了移植排斥的发生, 而 IL-10 在 CD4⁺CD25⁺T 细胞诱导免疫耐受中具有非常重要的作用。

【关键词】 肝移植; 大鼠; 免疫耐受; 白细胞介素; T 细胞亚群

Implication of different expression of IL-2 mRNA and IL-10 mRNA in CD4⁺CD25⁺T cell induced immune tolerance of liver transplantation in rat SHI Liu-bin, ZHANG Hong-wei, CUI Yi-yao. Department of Hepatic Surgery, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of tolerance-associated interleukin (IL)-2 mRNA and IL-10 mRNA in rats after allogeneic liver transplantation. Methods The experimental rats were randomly divided into 3 groups: acute rejection model group (group I), CD4⁺CD25⁺T cell treatment group (group II), donors of the two groups were Wistar while recipients were Sprague-Dawley (SD) rats, and group III as control group, both donors and recipients of this group were SD rats, with 12 rats in each group. Splenic lymphocyte of donor in group I were injected through vena dorsalis penis 7 days before liver transplantation; equal volume normal saline (NS) were injected in rats of group I and III. The contents of IL-2 mRNA and IL-10 mRNA in the liver tissue were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the number of lymphocytes in the donor liver was quantified with flow cytometry 7 days after transplantation. Meanwhile the pathologic change in the donor tissue were observed, and the recipients' life span was recorded. Results IL-2 mRNA was expressed strongly in the liver of group I, but it was expressed weakly in group II, and no expression was detected in the liver of group III. IL-10 mRNA was expressed only in group II, and the level was high. The rats in group II and III survived over 30 days, but rats in I group had a shorter life (8-11 days, both $P < 0.01$). There was heavy lymphocytic infiltration in the liver of group I, and was much higher than that of the other groups [group I: (14.31±3.41)×10⁶/g, group II: (5.04±1.13)×10⁶/g, group III: (1.55±0.40)×10⁶/g, all $P < 0.01$], and pathology showed moderate rejection. Rats in group II had milder lymphocytic infiltration, and pathology showed no signs of rejection or uncertain rejection, and the ratio of CD4⁺T cell and CD4⁺CD25⁺ were higher than those of group I [(43.31±8.07)% vs. (33.65±7.25)% and (11.39±1.92)% vs. (3.05±0.62)%] and group III [(43.31±8.07)% vs. (31.18±6.52)% and (11.39±1.92)% vs. (3.37±0.72)%, $P < 0.05$ or $P < 0.01$]. In group III no lymphocytic infiltration was found, and pathology showed no sign of rejection. Conclusion IL-2 may participate in the immune rejection in allogeneic liver transplantation, but IL-10 plays an important role in CD4⁺CD25⁺T cell inducing immune tolerance of allogeneic liver transplantation in the rats.

【Key words】 liver transplantation; rat; immune tolerance; interleukin; T lymphocyte subtype

基金项目:上海市医药卫生科研基金资助项目(2006010)

作者单位:200040 上海复旦大学附属华山医院肝脏外科

作者简介:史留斌(1968-),男(汉族),河南省人,医学博士,博士后,副教授,副主任医师,近年主要从事肝脏移植的临床和基础研究,先后承担多项国家、省级和上海市科研基金资助课题,发表论文 28 篇。

CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在人类和啮齿类动物的胸腺、淋巴组织及外周血中约占 CD4⁺T 细胞的 5%~15%，其数量虽少，但在免疫调节方面却发挥着极其重要的作用^[1-2]。在本研究中，我们预先给受体大鼠输注供体大鼠的脾淋巴细胞，在检测受体大鼠肝内 CD4⁺CD25⁺T 细胞数量的同时，利用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测移植体内白细胞介素-2(IL-2)mRNA 及 IL-10 mRNA 表达，旨在探讨其对 CD4⁺CD25⁺T 细胞诱导大鼠肝移植免疫耐受的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: Taq 酶以及逆转录试剂盒(美国 Promega 公司);引物用 Primer 5.0 程序设计,由上海生工生物工程技术有限公司合成、纯化与鉴定,引物序列:IL-2 上游序列为 5'-GCAGGCCACA GAATTGAAAC-3',下游为 5'-CACAGTTGCTG GCTCATCAT-3',预计扩增长度 202 bp;IL-10 上游序列为 5'-GGGAAGCAACTGAACTTCG-3',下游为 5'-CAGAGTGATGGCAGGGACTAT-3',预计扩增长度 212 bp;β-肌动蛋白(β-actin)的上游序列为 5'-ACATCTGCTGGAAGGTCCAC-3',下游为 5'-GGTACCACCATGTACCCAGG-3',预计扩增长度 182 bp。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物: 清洁级雄性 SD 大鼠和 Wistar 大鼠,体重分别为 230~250 g 和 250~270 g,均购自中科院上海实验动物中心。

1.2.2 实验分组: 正常 Wistar 大鼠(供体)脾脏淋巴细胞经丝裂霉素 C(终浓度 25 mg/L)处理,37 °C 孵育 30 min,用 Hank 液洗涤 1 次,再用 RPMI 1640 培养液悬浮并计数细胞,调成 5×10⁹/L 细胞浓度,作为刺激细胞备用。采用双套管法原位肝移植术制备动物模型。用随机数字表法将大鼠分为 3 组,每组 12 对。I 组为急性排斥组,II 组为 CD4⁺CD25⁺T 细胞处理组,III 组为移植对照组;I 组、II 组供体为 Wistar 大鼠,受体为 SD 大鼠;III 组供体和受体均为 SD 大鼠。肝移植术前 7 d, I 组、III 组受体大鼠经阴茎背静脉注射 2 ml 生理盐水;II 组受体大鼠经阴茎背静脉注射 2 ml 含供体脾淋巴细胞 1.5×10⁸ 的培养液。各组于术后 7 d 随机处死 6 只受体大鼠,观察移植病理变化,分离肝内淋巴细胞,流式细胞仪检测移植体内 CD4⁺CD25⁺T 细胞数量;另外 6 只受体大鼠自然存活,观察其生存期。

1.2.3 RT-PCR 检测移植体内细胞因子表达: 将

大鼠移植肝组织匀浆后,按照试剂盒所提供的方法及步骤操作,提取细胞总 RNA 并逆转录成 cDNA,加入总容积 50 μl 的 PCR 反应体系中。PCR 条件:①IL-2:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共进行 35 个循环,然后 72 °C 延伸 5 min,扩增产物于 4 °C 保存;②IL-10 和 β-actin:PCR 反应体系及 PCR 条件同 IL-2,退火温度分别为 55 °C 和 54 °C,循环次数分别为 32 次和 29 次。最后对扩增的 PCR 产物进行电泳分析。

1.3 统计学方法:应用 SPSS 11.0 统计软件分析,所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,生存率的比较采用 χ^2 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 移植体内细胞因子表达(图 1):移植术后 7 d, RT-PCR 检测各移植组移植体内细胞因子的结果显示,各扩增组的内参照物(β-actin)都有稳定的扩增条带出现;IL-2 mRNA 在 I 组大鼠移植体内出现高表达,II 组仅有微弱表达,III 组则未见表达;IL-10 mRNA 仅在 II 组中表达,且表达程度较强,而其他两组中未见表达。

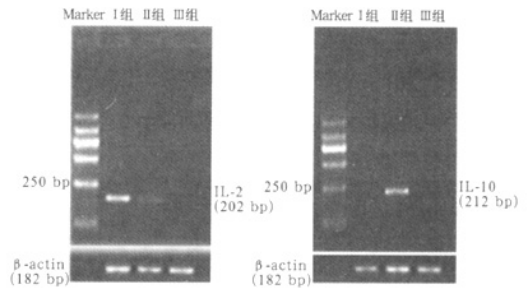


图 1 各组大鼠移植体内 IL-2 mRNA、IL-10 mRNA 的表达

2.2 生存期: I 组大鼠多于术后 5 d 开始出现排斥反应,存活期为 8~11 d,死亡原因均为急性排斥反应(经病理证实);II 组和 III 组大鼠存活均超过 30 d,与 I 组比较差异有统计学意义(*P*均<0.01)。

2.3 各组大鼠移植肝病理改变:肉眼观察, I 组大鼠移植肝体积增大,质地较硬且不均匀,肝脏颜色变浅;光镜下观察,汇管区见大量炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主,中央静脉及小叶间静脉内皮破坏,内皮下见大量淋巴细胞浸润;病理为中度排斥[排斥活动指数(RAI)6~7分]。肉眼观察, II 组大鼠移植肝体积、颜色及质地基本正常;光镜下观察,汇管区中等量淋巴细胞浸润,肝小叶结构未见破坏,汇管区静脉内皮结构完整;胆管上皮细胞结构完整;病理为无排

斥或不确定性排斥(RAI 2~3分)。肉眼观察,Ⅲ组大鼠移植肝体积、颜色及质地正常;光镜下观察,汇管区未见明显淋巴细胞浸润,小叶间静脉及中央静脉内皮下未见淋巴细胞浸润;病理为无排斥反应。

2.4 各组大鼠移植肝内淋巴细胞数量及亚群(表1):移植后7d,通过流式细胞仪检测各组移植肝内分离出的淋巴细胞含量,结果显示,I组移植肝内淋巴细胞平均数量远远高于其他组(P 均 <0.01)。Ⅱ组移植肝内为中少量淋巴细胞浸润,与Ⅲ组移植肝内淋巴细胞数量比较则无明显差异($P>0.05$)。Ⅱ组移植植物淋巴细胞中 $CD4^+$ 和 $CD4^+CD25^+$ 百分比均高于I组和Ⅲ组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表1 各组大鼠移植后7d肝内淋巴细胞数量及亚群结果($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	淋巴细胞 ($\times 10^6/g$)	$CD4^+$ (%)	$CD4^+CD25^+$ (%)
I组	6	14.31±3.41	33.65±7.25	3.05±0.62
Ⅱ组	6	5.04±1.13 ^b	43.31±8.07 ^a	11.39±1.92 ^b
Ⅲ组	6	1.55±0.40 ^b	31.18±6.52 ^c	3.37±0.72 ^d

注:与I组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与Ⅲ组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$

3 讨论

本研究用供体脾细胞经静脉输注给受体,7d后行原位肝移植术,术后受体的生存时间明显延长,通过病理检查发现移植植物无明显排斥反应,达到了诱导免疫耐受的目的。对移植植物内浸润的淋巴细胞亚群通过流式细胞仪分析显示:在获得免疫耐受的受体移植植物内的淋巴细胞中, $CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞的比例明显高于急性排斥组和对照组,而急性排斥组与对照组则无明显差异,表明免疫耐受的实现与 $CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞有着密切的关系, $CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞参与诱导了免疫耐受。

有研究表明,在供体特异性的抗原输入(DST)诱导的免疫耐受模型中,IL-2可使 $CD4^+CD25^+$ T细胞所处的内环境稳定,是其存活和增殖的重要因素^[3]。然而, $CD4^+CD25^+$ T细胞抑制急性排斥反应的机制之一就是抑制受体IL-2,这看起来似乎有些矛盾。我们推测,既然IL-2刺激了 $CD4^+CD25^+$ T细胞增殖,反过来 $CD4^+CD25^+$ T细胞又能抑制IL-2水平的增高,那么两者很可能是在低水平IL-2的情况下达到了一种平衡。有研究证实,低水平的IL-2的确能使 $CD4^+CD25^+$ T细胞增殖^[2],而高水平的IL-2可阻断 $CD4^+CD25^+$ T细胞的免疫调节作用^[4-5]。在我们的研究中,产生耐受的受体移植植物内

有IL-2 mRNA的微弱表达,与上述推测相互吻合。在出现急性排斥反应大鼠的移植植物中,IL-2 mRNA表达量明显高于耐受大鼠,提示IL-2的确参与了移植排斥的发生,而 $CD4^+CD25^+$ T细胞诱导移植耐受与其抑制IL-2的产生有关。

IL-10是 $CD4^+CD25^+$ T细胞分泌的具有特征性的细胞因子。尽管 $CD4^+CD25^+$ T细胞诱导免疫耐受的细胞-细胞接触机制和细胞因子机制两种理论目前仍存在争议,但大量的体内实验研究表明,IL-10等细胞因子对 $CD4^+CD25^+$ T细胞的免疫调节功能有不可忽视的作用^[6-9]。更为重要的是, $CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞通过细胞间的接触诱导 $CD4^+CD25^-$ 辅助性T细胞失活,并使其分泌IL-10,然后由IL-10抑制同基因的 $CD4^+$ T细胞^[10]。本研究中IL-10 mRNA在耐受大鼠移植植物内的表达明显高于急性排斥组,这充分说明了IL-10在 $CD4^+CD25^+$ T细胞诱导免疫耐受中具有非常重要的作用,同时也说明细胞因子在诱导耐受的过程中是不可缺少的。另外,IL-10是一个具有多效性的细胞因子,IL-10局部浓度过高时甚至可以促进排斥反应的发生^[11]。因此,IL-10的多效性及其在免疫应答反应中的浓度变化可能是其在移植免疫耐受调节中出现不同作用的主要原因之一。因此,我们认为细胞接触机制与IL-10在免疫耐受中的调节作用并不矛盾。在 $CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞的参与下,IL-10在免疫调节方面所起的作用及机制是非常复杂的,细胞接触机制和细胞因子可能都参与了 $CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞诱导免疫耐受的过程,有效延长了转基因肝移植大鼠的生存期。

参考文献

- [1] Stephens L A, Mottet C, Mason D, et al. Human $CD4^+CD25^+$ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro[J]. Eur J Immunol, 2001, 31(4): 1247-1254.
- [2] 黄增峰, 陈德昌, 陈如康, 等. 人參皂甙对烫伤脓毒症大鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13(4): 225-227.
- [3] Papiernik M, de Moraes M L, Pontoux C, et al. Regulatory $CD4^+$ T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency[J]. Int Immunol, 1998, 10(4): 371-378.
- [4] Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by $CD25^+$ $CD4^+$ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state [J]. Int Immunol, 1998, 10(12): 1969-1980.
- [5] Brinster C, Shevach E M. Bone marrow-derived dendritic cells reverse the anergic state of $CD4^+CD25^+$ T cells without reversing their suppressive function [J]. J Immunol, 2005, 175

(11);7332-7340.

[6] Kingsley C I, Karim M, Bushell A R, et al. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevent graft rejection; CTLA-4 and IL-10 dependent immunoregulation of alloresponses [J]. J Immunol, 2002, 168(3):1080-1086.

[7] Zhang X, Izikson L, Liu L, et al. Activation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by oral antigen administration [J]. J Immunol, 2001, 167(8):4245-4253.

[8] Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, et al. CD25⁺CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10[J]. J Immunol, 2001, 166(5):3008-3018.

[9] Pontoux C, Banz A, Papiernik M. Natural CD4⁺CD25⁺

regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production; the role of IL-10[J]. Int Immunol, 2002, 14(2):233-239.

[10] Dieckmann D, Bruett C H, Ploettner H, et al. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells[corrected][J]. J Exp Med, 2002, 196(2):247-253.

[11] 沈中阳, 刘懿禾, 王峪, 等. 成人肝移植围手术期多器官功能障碍综合征患者血清细胞因子的变化[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(1):28-30.

(收稿日期:2007-11-24)
(本文编辑:李银平)

• 经验交流 •

缺血性肠病的四联疗法——附 13 例病例分析

李志军 王今达

【关键词】 缺血性肠病； 中西医结合治疗； 疗效

2006 年 7 月—2007 年 7 月,我科共收治 13 例缺血性肠病患者,用中西医结合四联疗法治疗,疗效满意,报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料:13 例患者均经临床、结肠镜、病理组织学检查后诊断为缺血性肠病,其中男 8 例,女 5 例;平均年龄(68.9±12.3)岁。查体:发病初期均为腹部局限性压痛,逐渐发展至全腹膜炎及肠梗阻。白细胞计数均有升高,中性粒细胞比例为 0.80~0.93;血、尿淀粉酶以 D-二聚体有不同程度的升高,血小板计数减少;腹部 X 线平片可见液平面,肠道积气明显。13 例患者于入院后 24 h 内行结肠镜检查,显示结肠病变节段性分布,与正常肠管界限清楚。13 例患者于病后 48 h 内行腹部 B 超检查均有异常发现,其中 10 例有腹水,9 例有局限性肠壁水肿增厚呈低回声双圈征,6 例局限性肠蠕动消失,8 例局限性肠管扩张。腹部 CT 检查显示:5 例肠壁局限性增厚、水肿,7 例肠梗阻,9 例伴腹水。

1.2 治疗方法:采用以中西医结合四联防治疗法为主进行治疗,同时给予禁食、胃肠减压、纠正电解质和酸碱平衡失调、促进肠黏膜功能恢复、纠正心力衰竭和心律失常、补充血容量等治疗,同时积极

治疗伴发疾病,并密切观察病情变化。

1.2.1 抗炎、抗凝:采用血必净注射液 60~100 ml/d,其有拮抗全身炎症反应、改善组织微循环、防止毛细血管内微血栓形成、防止脓毒症发生发展等疗效^[1]。

1.2.2 改善缺血:用前列地尔(凯时) 10~20 μg/d,其具有扩张血管、抑制血小板聚集等作用,能改善缺血,增加侧支循环,拮抗炎症反应^[2]。

1.2.3 通里攻下:每次用大承气汤或凉膈散 150 ml 口服或鼻饲与灌肠同时进行,每日 4~6 次。两药具有泻下攻积、清热泻火、解毒、活血祛瘀的作用,能促进肠蠕动,增加肠系膜血流量,降低黏膜通透性,抑制肠道细菌移位等,对肠源性感染及内毒素血症有显著疗效^[3]。

1.2.4 针灸治疗:取天枢、气海、上巨虚、下巨虚、足三里、太冲等穴针灸,每日 2 次,以增加肠动力。

1.3 临床疗效判定标准:①有效:临床症状、体征消失,腹部 B 超异常变化消失,粪恢复正常。②好转:症状明显减轻,粪检查基本正常或肠镜下病变尚未完全恢复。③无效:临床症状、体征无减轻或加重,腹部 B 超异常变化无明显改善或加重,转外科手术;患者死亡。

1.4 结果:11 例有效,占 84.6%;2 例好转,占 15.4%;无死亡病例。

2 讨论

缺血性肠病是由于肠道血液供应不足或回流受阻致肠壁缺氧损伤所引起的

急性和慢性炎症病变。最初表现为肠壁水肿、出血及坏死等循环障碍性变化,炎症常为继发于坏死的反应,故炎症常常较轻,甚至开始时无炎症改变。由于本病早期症状、体征不典型,误诊率很高。除有相应的临床症状和体征外,及时进行腹部 X 线平片、B 超和早期结肠镜检查基本可满足绝大多数病例的诊断和疗效判断需要,必要时可做腹部 CT 及血管造影检查。由于缺血性肠病易启动脓毒症,进展到重症脓毒症或多器官功能障碍综合征(MODS)的速度快,病死率高,应引起高度重视。

缺血性肠病早期诊断、综合治疗是决定预后的关键,我们按照王今达教授菌、毒、炎并治的治疗思路^[4],采用以中西医结合四联疗法为主的内科综合治疗,疗效非常满意,希望能给大家提供一个可借鉴的防治手段。

参考文献

[1] 雪琳. SIRS 和 MODS 防治新对策的实验研究:血必净的药效学观察[J]. 中国危重病急救医学, 1997, 9(12):720-722.

[2] 张扬, 佟淑芬. 凯时注射液[J]. 中国新药杂志, 1998, 7(4):289-290.

[3] 袁正强, 陈微微, 曹建林. 大黄对危重症患者胃肠功能衰竭的防治研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(1):53.

[4] 王今达, 雪琳. 细菌、内毒素、炎性介质并治:治疗重症脓毒症的新对策[J]. 中国危重病急救医学, 1998, 10(6):323-325.

(收稿日期:2007-12-28)
(本文编辑:李银平)

作者单位:300192 天津市第一中心医院急救医学研究所(李志军,王今达)

作者简介:李志军(1957-),男(汉族),天津市人,教授,硕士生导师,主任医师。