

- 8 周永健, 陈岳祥, 李石, 曾民德. 基质金属蛋白酶及其抑制因子与肝纤维化. 国外医学消化系疾病分册 1996;16:67-70
- 9 Preaux AM, Mallat A, Nhieu JT, D'Ortho MP, Hembry RM, Mavrier P. Matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic fibrosis regulation by cell-matrix interactions. *Hepatology* 1999;30:944-950
- 10 Benyon RC, Hovell CJ, Da Gaca M, Jones EH, Iredale JP, Arthur MJ. Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology* 1999; 30:977-986
- 11 Takahara T, Furui K, Yata Y, Jin B, Zhang LP, Nambu S, Sato H, Seiki M, Watanabe A. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type-1 matrix metalloproteinase in fibrotic human liver. *Hepatology* 1997;26: 1521-1529
- 12 Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda K. In Vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology* 1999;29:1760-1767
- 13 Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Aarsen DM, Bissell DM. Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. *J Biol Chem* 1989; 264:10756-10762
- 14 Takahara T, Furui K, Funaki J, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, Sato H, Seiki M, Ooshima A, Watanabe A. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1995;21:787-795
- 15 刘海林, 李宣海, 王丹艺, 杨少平. 基质金属蛋白酶-2在肝纤维化时的表达. 中华消化杂志 1999;19:417-418
- 16 Pasco S, Han J, Gillery P, Bellon G, Maquart FX, Borel JP, Kefalides NA, Monboisse JC. A specific sequence of the noncollagenous domain of the alpha3(IV)chain of type IV collagen inhibits expression and activation of matrix metalloproteinases by tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:467-473
- 17 Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996;110: 821-831
- 18 Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996;24: 176-184
- 19 徐列明, 朱剑亮, 刘成, 刘平, 吕刚, 薛惠明, 胡义杨, 洪嘉禾. 桃仁提取物虫草菌丝对肝炎后肝硬化肝窦毛细血管化的逆转作用观察. 中国中西医结合杂志 1994;14:362-363
- 20 徐列明, 刘平, 吕刚, 刘成, 薛惠明, 朱剑亮. I、IV型胶原及板层素在肝纤维化大鼠肝窦周围的变化. 中华消化杂志 1995;15:146-148
- 21 Friedman SL. Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. *Semin Liver Dis* 1990;10:20
- 22 Xu GF, Wang XY, Ge GL, Li PT, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes of capillarization and peri-sinusoid fibrosis in alcoholic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2004; 10:238-243
- 23 Xu GF, Li PT, Wang XY, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes in the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMPs, during hepatic fibrosis induced by alcohol in rats. *World J Gastroenterol* 2004;10:3621-3627

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

FK506对大鼠小肠移植排斥反应 *bcl-2/bax* 表达及预后的影响

宋维亮, 李纪鹏, 施海, 王为忠, 李孟彬

宋维亮, 李纪鹏, 施海, 王为忠, 李孟彬, 中国人民解放军第四军医大学西京医院胃肠外科 陕西省西安市 710032

通讯作者: 宋维亮, 710032, 陕西省西安市长乐西路15号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院。

收稿日期: 2004-12-22 接受日期: 2005-01-13

摘要

目的: 观察FK506对大鼠小肠移植排斥反应 *bcl-2/bax* 表达及预后的影响

方法: 选用近交系 F344/N(RT I⁺)和 Wistar 大鼠进行全小肠异位移植, 随机分为对照组、同基因移植组(F344/N-F344/N)、异基因移植组(F344/N-Wistar)、FK506 治疗组(F344/N-Wistar+FK506)。观察大鼠的一般状况及存活时间, 并于术后第3、5、7 d取移植, 应用免疫组化检测术后移植肠组织中 *bcl-2* 及 *bax* 的表达。

结果: 异基因移植组术后第3 d, *bcl-2* 的表达显著低于

对照组($P<0.05$), 并随着移植天数的增加, 差异更加显著($P<0.01$); *bax* 的表达与对照组比较差异无显著性($P>0.05$), 但 *bcl-2/bax* 呈下降趋势, 大鼠在术后第3、5、7 d病理学检查移植肠出现排斥反应, 大鼠存活时间与其他3组有显著差异; FK506 治疗组 *bcl-2* 及 *bax* 表达与对照组比较, 差异均无显著性($P>0.05$)。同基因移植组、FK506 治疗组无明显排斥, 可长期存活。

结论: FK506 能明显抑制小肠移植急性排斥反应的产生, 显著地延长移植肠存活时间。 *bcl-2* 表达水平可作为早期诊断急性排斥反应的一个有意义参考指标。

宋维亮, 李纪鹏, 施海, 王为忠, 李孟彬. FK506对大鼠小肠移植排斥反应 *bcl-2/bax* 表达及预后的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(7):905-908
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/905.asp>

0 引言

小肠属于高免疫原性器官, 含有丰富的淋巴组织, 与其

他器官移植相比, 小肠移植排斥反应尤为严重, 这也是小肠移植失败的主要原因^[1], 但其发生机制至今尚不明确. 细胞凋亡是移植器官组织损伤的重要机制之一^[2-3], 但应用其诊断急性排斥反应的文献报道尚不多见, FK506是一种新型的免疫抑制药物, 其免疫抑制作用较环孢霉素A强10-100倍^[4], 我们采用大鼠小肠移植动物模型, 检测移植肠组织中*bcl-2/bax*这对凋亡基因的表达, 探讨其与急性排斥反应的关系, 并研究FK506对*bcl-2/bax*表达及预后的影响, 为临床早期诊断治疗排斥反应开辟新途径.

1 材料和方法

1.1 材料 选用质量在280-320 g之间雄性近交系FK344/N(RT I⁺)及Wistar大鼠(均由北京医科大学实验动物中心提供)随机分为4组, 第1组为对照组, 9只大鼠, 仅做开腹手术; 第2组为同基因移植组(F344/N-F344/N); 第3组为异基因移植组F344/N-Wistar; 第4组为FK506治疗组, F344/N-Wistar+FK506[2 mg/(kg·d), 0-14 d, 肌肉注射], 后3组每组24只大鼠. 主要试剂来源: 小鼠抗大鼠*bcl-2*、*bax*试剂盒购自武汉博士德生物制品公司. 其中小鼠抗大鼠*bcl-2*多克隆抗体、小鼠抗大鼠*bax*多克隆抗体为美国Santa Cruz Biotechnology公司产品; SABC试剂盒、DAB显色剂为武汉博士德生物制品公司产品, 依据试剂盒说明进行染色.

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作 小肠移植方法采用异位全小肠移植术^[5]并做以下改良: (1)原位灌洗和切取; (2)移植长度以15-20 cm为宜, 理想的移植长度要既能减少排斥反应或/和移植植物抗宿主反应(GVHD), 又能满足受体的营养需求; (3)血管重建方式: 移植肠的肠系膜上动脉和肠系膜上静脉分别与受体的腹主动脉和左肾静脉吻合; (4)移植肠段采取一端外置“造口”, 分期恢复肠道连续性的方法. 移植小肠热缺血时间为0 h, 冷缺血时间控制在2.5-4 h. 术后第1 d喂以5%葡萄糖盐水, 第2 d开始自由进食. 治疗组以2 mg/(kg·d)剂量肌注FK506.

1.2.2 观察指标 大鼠手术当天经静脉给予50 mL/L葡萄糖盐液, 术后第1 d开始自由进饮食及水, 观察大鼠精神状况、进食情况、肠造口排出液性质等, 分别于术后3、5、7 d, 每组各处死6只, 取出移植肠, 行多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 厚约3 μ m, 各组其余大鼠作移植小肠生存时间观察, 存活至30 d处死, 结束实验. 术后72 h内死亡者为技术失败, 不包括在统计范围之内.

1.2.3 组织病理学检查 各例切片作常规HE染色, 显微镜观察, 按排斥反应标准诊断排斥程度^[6]. (1)轻度: 肠黏膜绒毛数目减少, 轻度增粗, 变短, 少量淋巴细胞和粒细胞浸润, 少量凋亡上皮细胞; (2)中度: 肠黏膜绒毛明显变矮增宽, 黏膜上皮开始脱落, 细胞浸润加重, 上皮细胞凋亡数目明显增多; (3)重度: 肠绒毛结构消失, 上皮脱落, 间质大量炎细胞浸润, 肌层结构破坏, 血管炎.

1.2.4 *bcl-2*、*bax*检测及结果的判定 依据试剂盒说明进

行染色. 实验设定PBS替代一抗的阴性对照, 省略一抗的空白对照和正常羊血清替代对照, 已知阳性反应片作为阳性对照. *bcl-2*与*bax*阳性表达为细胞浆中可见出现棕黄色颗粒沉着. 切片在放大400倍光学显微镜下连续观察20个隐窝, 计数阳性着色细胞.

统计学处理 所有结果均以mean \pm SD表示, 并用SPSS统计软件做样本分析.

2 结果

2.1 大体观察 第1、2组大鼠术后苏醒较快, 苏醒后即正常活动, 精神好、进食正常、活动自如, 腹壁造口精膜红润, 分泌物稠. 定期剖腹探查, 移植肠红润, 肠系膜血管搏动明显, 移植肠粘连少. 第3组异基因移植组大鼠术后第2 d即开始出现不同程度的嗜睡、厌食、毛发零乱, 对外界反应下降, 体重减轻, 直至死亡. 剖腹探查观察移植肠颜色灰白, 肠腔扩大并广泛粘连, 并逐渐加重, 伴腹腔大量脓性渗出, 严重的有移植肠穿孔. 第4组大鼠精神好, 对刺激反应灵敏, 定期剖腹探查大鼠移植肠肉眼观察与第1、2组相似.

2.2 大鼠存活时间 第1组大鼠存活均超过30 d; 第2组大鼠存活时间为(18.7 \pm 1.7)d, 4只大鼠死于急性排斥反应所引起的腹膜炎, 2只大鼠死于肠梗阻. 与第1组相比存活时间显著缩短($P<0.01$). 第3组大鼠小肠移植后平均存活时间为(7.3 \pm 1.1)d, 所有大鼠都死于急性排斥反应及其所引起的腹膜炎. 第4组大鼠平均存活时间为(28.3 \pm 2.3)d, 与第2、3组差异显著($P<0.01$), 1只大鼠死于腹膜炎, 1只大鼠死于肠梗阻, 4只大鼠存活超过30 d, 与第1组无明显差异.

2.3 移植肠组织连续病理组织学检查结果 第2组大鼠术后无排斥反应病理现象, 仅见间质有少量淋巴细胞浸润. 第3组大鼠术后3 d病理学检查示肠黏膜下层间质中有少量淋巴细胞浸润, 肠绒毛增粗、变短, 术后5 d大鼠移植肠黏膜淋巴细胞浸润增多, 并累及固有层; 肠黏膜上皮水肿、黏液细胞减少、肠绒毛顶端倒覆, 符合轻度排斥反应标准; 术后7 d出现黏膜全层大量淋巴细胞浸润, 肠绒毛少而低平, 散在肠黏膜上皮脱落, 表现中度排斥反应, 尸检示终末期移植小肠黏膜受破坏而消失, 肠壁变薄伴坏死, 大量淋巴细胞浆细胞浸润肠壁全层, 表现为重度排斥反应. 第4组FK506治疗组3、5、7 d大鼠病理改变未见排斥反应迹象, 黏膜层亦可见少量淋巴细胞和浆细胞浸润.

2.4 *bcl-2*、*bax*的表达 第3组术后3 d时*bcl-2*表达明显减少, 与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$), 术后5 d、7 d *bcl-2*表达进一步减少, 差异更为显著($P<0.01$). *bax*在正常小肠组织中有较广泛的表达, 术后*bax*的表达与正常小肠比较, 差异无显著性($P>0.05$), 但*bcl-2/bax*的比值呈下降趋势. 第4组各时间段*bcl-2*、*bax*的表达与对照组比较, 差异均无显著性($P>0.05$) (表1).

表1 各组内 *bcl-2*、*bax*阳性表达计数

组别	时间(d)	<i>n</i>	<i>bcl-2</i> 表达	<i>P</i> 值	<i>bax</i> 表达	<i>P</i> 值
对照组		9	19.63±2.33		4.12±0.23	
同基移植组	3	6	18.37±4.21	0.076	3.67±1.12	0.089
	5	6	21.09±6.76	0.117	4.54±0.87	0.752
	7	6	17.76±4.54	0.063	4.32±0.32	0.697
异基因移植组	3	6	15.85±3.67	0.032	5.01±0.89	0.817
	5	6	14.21±2.42	0.001	4.54±1.54	0.749
	7	6	8.25±3.25	0.001	3.32±0.33	0.107
FK506 治疗组	3	6	18.03±2.34	0.064	3.96±1.03	0.214
	5	6	18.63±1.35	0.081	4.63±1.84	0.439
	7	6	21.14±0.56	0.121	2.87±1.49	0.065

3 讨论

小肠移植因其同时将属于免疫组织的肠系膜淋巴结和淋巴集结 (peyer's) 进行移植, 排斥反应和移植抗宿主反应 (GVHD) 更为强烈, 因此小肠移植常因严重的排斥反应而导致移植失败^[7-8]. FK506是从日本筑波地区的链霉菌中分离出来的大环内酯类抗生素, 具有广泛的免疫抑制效应, 是迄今发现的最强有效的免疫抑制剂^[9]. 他已被广泛应用于肝脏、肾脏、心脏、肺和小肠移植中, 并取得了良好的效果, 但FK506对小肠移植过程中细胞凋亡及 *bcl-2/bax* 基因表达的影响尚未见报道.

我们的实验结果进一步表明, 应用FK506治疗异基因移植组中大鼠排斥反应不明显, 仅术后7 d部分出现轻度排斥反应; 平均存活25 d, 存活时间比无FK506治疗组明显延长 ($P<0.01$). 说明FK506能明显抑制大鼠小肠移植急性排斥反应发生, 延长受体存活时间. 对于FK506的免疫抑制机制, 有研究表明, 他是通过与T细胞胞质的FK506结合蛋白 (FKBP) 结合, 形成FK506/FKBP复合物, 抑制T细胞活化的细胞内靶点 (即 Calcineurin), 他是一种 Ca^{2+} 与钙调节素依赖性蛋白磷酸酯酶, 当FK506-FKBP复合物与 Calcineurin 结合后, 再抑制 Calcineurin 的磷酸酯酶的活性, 使T淋巴细胞活化核因子的胞质亚基 (NF-ATc) 的核内转移受阻, 抑制了 IL-2 有关功能性转录因子的形成, 从而抑制T淋巴细胞早期基因的活化; 同时FK506可通过抑制 NF-ATc 的脱磷酸化而抑制 IL-2、IL-3、X 干扰素等细胞因子的产生和 IL-2 受体等细胞表面分子的表达, 从而抑制T细胞的活化和免疫反应的产生^[10-11].

细胞凋亡的调控机制是小肠移植中的排斥反应的机制之一^[12-13]. *bcl-2* 为滤泡状B淋巴细胞瘤内分离出来的原癌基因, 而 *bax* 基因是 *bcl-2* 基因家族内的同源基因. *bcl-2* 及 *bax* 参与调控小肠移植术后排斥反应细胞凋亡的机制如下: *Bcl-2* 蛋白通过其 BH4 结构域与 APAF-1 中的 caspase 活化聚集结构域 (CARD) 结合阻断其与 caspase-9 前体结合, 从而阻断 caspase-9 所启动的细胞凋亡过程. *bax* 在细胞的超表达可以诱导细胞凋亡, 可能是由于其细胞成员在某些细胞器上, 特别是线粒体上形成多聚体, 影响了线粒体的完整性, 从而促进了细胞凋亡. *bcl-2*

与 *bax* 形成的二聚体, *bcl-2/bcl-2* 和 *bcl-2/bax* 是抑制凋亡的构型, 而 *bax/bax* 是诱导凋亡的构型. 实验表明, 随着组织排斥反应的加重, *bcl-2* 表达较其他各组显著减少, 虽然 *bax* 的表达无明显变化, 但其比例却呈下降趋势. 说明在 *bcl-2* 和 *bax* 这对基因中, *bcl-2* 表达占优势, 排斥反应轻; 相反 *bax* 占优势则排斥反应严重. 因而 *bcl-2* 和 *bax* 的表达程度及其比例在一定程度上决定了移植小肠的命运. 应用FK506治疗异基因移植组中 *bcl-2*、*bax* 异基因移植组中与对照组比较均无显著性差异, 表明FK506能明显抑制大鼠小肠移植过程中的细胞凋亡及急性排斥反应的发生. 本实验中正常小肠绒毛顶端衰老的细胞存在生理性的细胞凋亡, 为减少这一因素的干扰, 我们观察小肠底部腺窝. 实验2、4组存在细胞凋亡现象可能与移植肠缺血再灌注损伤有关, 而术后第5、7 d的凋亡现象则与移植肠缺少食物刺激而发生肠黏膜萎缩和细菌易位有关.

小肠移植术后的移植免疫反应具有双向性, 既可表现为移植排斥反应, 又可表现为移植抗宿主反应, 早期诊断移植免疫反应并予以治疗是保证小肠移植成功的重要因素. 移植病理学检查仍被认为是诊断排斥反应的“金标准”. 但因其病理变化本身已是排斥反应的结果, 所以单一病理检查无法对排斥反应做出早期诊断. 我们发现在排斥反应早期, 组织病理学未对排斥反应作出明确诊断时, 免疫组织化学 *bcl-2* 阳性着色细胞即大量减少, 且差异具有显著性的. 虽此单一诊断尚不足说明问题, 但若结合组织病理学无疑会增加我们对早期排斥反应判断的准确性. 早期诊断排斥反应并给予相应补救措施, 避免不可逆的组织损伤的发生, 对于小肠移植患者的预后有着非常重要的意义, 也将提高临床小肠移植的成功率.

4 参考文献

- 1 Wang WZ, Song WL, Wu GS, Ling R, Ji G, Chen DL, Li MB, Liu XN, Zhao JX. The clinical living-related small bowel transplantation: a report of 1 case. *Chin J Organ Transplant* 2001; 22:30-32
- 2 Meyer D, Baumgardt S, Loeffeler S, Czub S, Otto C, Gassel HJ, Timmermann W, Thiede A, Ulrichs K. Apoptosis of T lymphocytes in liver and/or small bowel allografts during