

• 基础研究 •

大鼠小肠移植中细胞凋亡发生的阶段性及其意义

刘骥, 王为忠, 李纪鹏

[摘要] 目的 研究同种异体大鼠小肠移植后移植肠缺血再灌注、排斥反应与细胞凋亡的关系以及相关肠系膜淋巴结 (GALT) 中出现凋亡细胞的意义。方法 选用近交系 F344/N 和封闭群 Wistar/A 大鼠建立异位小肠移植模型, 同时根据移植肠是否缺血预处理分为 4 组: 同基因移植组 (A 组)、同基因缺血预处理组 (A⁺ 组)、异基因移植组 (B 组)、异基因缺血预处理组 (B⁺ 组), 未行移植 F344/N 大鼠为空白对照。每组术后 2 h、1 d、3 d、5 d、7 d 分别处死 4 只大鼠, 获取移植肠及相关肠系膜淋巴结分别行组织病理学检查、TUNEL 法检测细胞凋亡以及电镜观察。结果 术后 2 h: A⁺、B⁺ 组移植肠细胞凋亡数量显著增加; 术后 1 d: A⁺、B⁺ 组移植肠细胞凋亡数量均明显减少, 而 B、B⁺ 组相关肠系膜淋巴结细胞凋亡数量明显增加; 术后 3 d、5 d、7 d: B、B⁺ 组移植肠细胞凋亡数量呈渐进性增加, 而相关肠系膜淋巴结细胞凋亡数量呈渐进性减少。结论 排斥反应和缺血再灌注损伤均可引起细胞凋亡, 早期移植肠第 1 次出现凋亡细胞系缺血再灌注损伤所致, 移植肠第 2 次细胞凋亡数量增加则是排斥反应的标志。早期移植肠相关肠系膜淋巴结细胞凋亡数量增加与排斥反应有关并发生于排斥反应出现前。

[关键词] 小肠移植; 细胞凋亡; 相关肠系膜淋巴结; 排斥反应; 缺血再灌注

Development of apoptosis after small bowel transplantation in rats LIU Ji, WANG Wei-zhong, LI Ji-peng. Department of Gastrointestinal Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shanxi, China

[Abstract] Objective To investigate the development of apoptosis during ischemia/reperfusion (IR) injury and acute rejection, and to explore the significance of apoptosis in the Graft Mesenteric Lymph Node (GALT) in a rat heterotopic small bowel transplant (SBT) model. Methods SBT was performed in F344/N rats with either freshly harvested or preserved (4 h, in ringer lactate solution at 4 °C) syngeneic and allogeneic (Wistar/A-F344/N) grafts. Bowel and GALT samples were collected 2 h after reperfusion and on small bowel transplant postoperative days (POD) 1, 4, and 7. Histopathology assessment of the graft and GALT were prepared for hematoxylin-eosin (H & E) staining. Apoptosis was detected by the TUNEL and the electron microscope. Results The number of apoptotic cells 2 h after reperfusion increased profoundly in association with preservation. After a significant decrease on POD 1, the apoptotic cells rose again between POD 3 and 7 only in allogeneic grafts. On the other hand, the apoptotic cells in allogeneic GALT markedly increased from POD 1 to day 3; at that time point, neither histological findings of rejection nor increase in apoptotic crypt cells were present in the graft jejunum. Conclusion IR injury and acute rejection may both induce extensive apoptosis. The graft jejunum distinct second increase in apoptosis may be an early and specific sign of acute rejection. Apoptosis of GALT cells was well correlated with and ahead of progression of acute rejection.

[Key words] small bowel transplant (SBT); apoptosis; Graft Mesenteric Lymph Node (GALT); rejection; ischemia/reperfusion (IR)

中图分类号: R656.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2006)01-0043-03

[本文著录格式] 刘骥, 王为忠, 李纪鹏. 大鼠小肠移植中细胞凋亡发生的阶段性及其意义[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(1): 43-45.

同种器官移植后, 移植实质细胞凋亡, 产生移植排斥; 间质浸润细胞凋亡, 产生免疫耐受。排斥反应和缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, IR) 损伤均可引起细胞凋亡^[1-3]。小肠是对 IR 损伤最敏感的器官之一; 小肠移植后, 宿主淋巴细胞很快侵入相关肠系膜淋巴结, 早期排斥反应可能在其中启动^[4]。本文拟通过 TUNEL 法及电镜检测大鼠小肠移植后细胞凋亡特殊现象, 阐述缺血再灌注和排斥反应这两个不同过程, 初步探讨相关肠系膜淋巴结在小肠移植中的免疫反应性。

1 材料和方法

1.1 实验分组 受体采用健康清洁级近交系 F344/N 成年雄性大鼠, 体重 250 ~ 300 g; 供体采用封闭群

Wistar/A 成年雄性大鼠, 体重 200 ~ 250 g。行小肠异位移植, 共分 4 组, 每组均为 24 只: 同基因移植组 (A 组)、同基因处理组 (A⁺ 组)、异基因移植组 (B 组)、异基因处理组 (B⁺ 组), A⁺、B⁺ 组移植肠原位灌洗后放于 4 °C 肝素乳酸林格液内低温保存 4 h, 再行移植。A、B 组移植肠原位灌洗后即行移植。未行移植 F344/N 大鼠为空白对照。

1.2 动物模型 参照董光龙等方法^[5]建立的双 Cuff 双造口大鼠异位小肠移植模型: 供体大鼠用 Hypnorm 1 ml/kg 腹腔注射麻醉。选取距回盲部 10 cm 回肠为主小肠 15 cm。原位灌洗拟移植肠段。距肠系膜上动脉腹主动脉入口 0.5 cm 结扎, 切断腹主动脉, 将移植肠入冰冷的乳酸林格液中。灌洗的同时, 将 5F 内径 Cuff 套入门静脉。受体与供体同样麻醉开腹, 显露左肾动脉下腹主动脉约 1 cm 以备移植肠血管的吻合, 9-0 尼龙线行供体肠系膜上动脉的腹主动脉袖套与受体左肾动脉下腹主动脉端侧吻合, 将受体左肾静脉套入

作者单位: 中国人民解放军第四军医大学西京医院胃肠外科, 陕西西安市 710032。作者简介: 刘骥 (1978-), 男, 江苏泗阳县人, 硕士生, 医师, 主要从事小肠移植的基础研究工作。通讯作者: 王为忠。

供体门静脉 5F 套管。移植肠两端侧腹壁造口。每组于术后 2 h、1 d、3 d、5 d、7 d 分别处死 4 只大鼠,获取移植肠及相关肠系膜淋巴结。

各组及各时间点组织(小肠和肠系膜淋巴结)常规 100 ml/L 福尔马林固定,做 5 μ m 连续切片,挂 APES 胶,备做 HE 染色和 TUNEL 法检测细胞凋亡。

1.3 组织病理学判定标准 ①轻度:肠粘膜绒毛数目减少,轻度增粗、变矮,间质有少量炎症细胞浸润上皮细胞凋亡数目增加。②中度:肠绒毛变的更矮、更宽,粘膜上皮开始有脱落,杯状细胞和潘氏细胞数目下降,上皮细胞凋亡数目显著增加,固有腺体减少,细胞浸润加重,以淋巴、单核细胞为主。③重度:肠绒毛结构消失,上皮脱落,肠壁变薄并坏死,固有腺体消失,间质大量炎性细胞浸润,肌层结构破坏,血管炎症显著。

1.4 细胞凋亡检测 采用德国宝灵曼公司生产的原位末端标记试剂盒(cat, nol 684795)。步骤:组织切片常规脱蜡至水;加 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH = 6.0),至微波中加热到 92 $^{\circ}$ C ~ 98 $^{\circ}$ C,微波功率为 800 W;DEPC 水冲洗,室温放置 30 min;加用荧光素(FITC)标记的核苷酸和脱氧核苷酸末端转移酶混和液,37 $^{\circ}$ C,60 min;荧光显微镜下观察。阴性对照为省去 TUNEL 的反应液;阳性对照用 DNA 酶 1(美国 Sigma 公司产品),分别以 50 mg/L、0.1 g/L、0.5 g/L、1.0 g/L 预处理组织。以核阳性作为结果判定标准。采用双盲观察,每张切片随机选取 10 个高倍视野读取细胞凋亡数量并计算平均值。

1.5 透射电镜观察 各组分别于不同时间点取 2 \times 1 \times 1 mm 的小肠及肠系膜淋巴组织,以 2.5%戊二醛预固定,再经 1%锇酸双重固定,乙醇脱水,环氧树脂浸润,包埋后,超薄切片,双重重金属染色。于透射电镜下观察,拍片。

1.6 统计学处理 数据均用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。每组内不同时点数据应用方差分析,均数间比较采用 SNK- q 法,两组间均数比较应用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学变化

2.1.1 移植肠 术后 2 h、1 d 各组移植肠均未见排斥反应的病理迹象,与正常小肠结构无差异。B、B⁺ 组移植肠术后第 3、5、7 天病理学检查分别符合轻、中、重度排斥诊断。A、A⁺ 组移植肠第 3、5、7 天均未见排斥反应病理迹象,仅粘膜层可见少量淋巴细胞和浆细胞浸润。

2.1.2 淋巴结 肉眼观察,各组移植肠相关肠系膜淋巴结从术后 1 d 开始增大,术后 7 d 较前缩小。光镜下,B、B⁺ 组术后 1 d 即可观察到淋巴结中淋巴小结和副皮质区较多淋巴细胞,术后 3 d 集合淋巴小结及淋巴小结数增多、增大,出现凋亡细胞,术后 5 d 凋亡细

胞数量减少,7 d 淋巴结失去正常结构。A、A⁺ 组无上述现象。

2.2 细胞凋亡变化

2.2.1 移植肠 术后 2 h, A⁺、B⁺ 两组移植肠细胞凋亡数量显著增加,分别与 A、B 两组相比有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$);术后 1 d, A⁺、B⁺ 两组移植肠细胞凋亡数量均较术后 2 h 明显减少,分别与 A、B 两组相比无显著性差异($P > 0.05$);术后 3 d, B、B⁺ 组移植肠凋亡细胞数再次升高,并与术后 5 d 达到高峰,持续到术后 7 d,且在 3、5、7 d 点相比显著高于 A、A⁺ 两组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 术后移植肠细胞凋亡数目变化

组别	2 h	1 d	3 d	5 d	7 d
A	8.0 \pm 1.2	7.8 \pm 1.9	7.5 \pm 1.5	8.2 \pm 2.1	6.9 \pm 2.0
A ⁺	21.0 \pm 5.8 ^a	8.1 \pm 3.2	7.9 \pm 4.5	8.3 \pm 3.1	7.0 \pm 2.6
B	14.0 \pm 3.7	9.0 \pm 2.8	32.1 \pm 5.1 ^c	47.3 \pm 5.3	29.7 \pm 4.8
B ⁺	24.0 \pm 5.5 ^b	8.8 \pm 2.1	29.2 \pm 5.0 ^c	45.2 \pm 4.9	35.7 \pm 3.3

注:与 A 相比,a: $P < 0.01$,c: $P < 0.01$;与 B 相比,b: $P < 0.05$ 。

2.2.2 肠系膜淋巴结 术后 1 d, B、B⁺ 组相关肠系膜淋巴结细胞凋亡数量明显增加,与 A、A⁺ 两组相比有非常显著性差异($P < 0.01$),术后 3 d 达到高峰,术后 5、7 d 呈渐进性减少。在 1、3 d 点相比显著高于 A、A⁺ 两组($P < 0.01$)。见表 2 彩图 2。

表 2 移植术后 GALT 细胞凋亡数目变化

组别	2 h	1 d	3 d	5 d	7 d
A	1.1 \pm 0.6	3.1 \pm 0.9	2.9 \pm 0.5	1.3 \pm 0.7	1.0 \pm 0.4
A ⁺	1.2 \pm 0.8	2.9 \pm 0.8	3.0 \pm 0.7	1.4 \pm 0.6	1.4 \pm 0.5
B	1.9 \pm 0.7	14.3 \pm 1.9 ^a	19.3 \pm 1.9	5.0 \pm 1.3	2.5 \pm 1.6
B ⁺	2.1 \pm 1.0	15.2 \pm 1.5 ^a	18.1 \pm 2.0	4.7 \pm 1.1	2.2 \pm 1.1

注:与 A 相比,a: $P < 0.01$ 。

2.3 透射电镜观察结果

2.3.1 A 组 大鼠术后 1、3、5 d 电镜显示,小肠上皮细胞表面微绒毛正常,血管周围有少量嗜酸性粒细胞,巨噬细胞及中性粒细胞聚集,细胞结构清晰,细胞连接良好,杯状细胞内充满粘液颗粒,线粒体轻度肿大,基质颗粒增多。随着创伤逐渐修复,至第 7 天肠腺上皮细胞结构已基本正常,周围间质炎性细胞浸润明显减少,线粒体结构正常无肿胀。

2.3.2 B 组 大鼠术后 1 d 血管扩张明显,可见有少量细胞分裂,肠腺上皮细胞正常,间质可见较多肥大细胞及中性粒细胞浸润。术后 3、5 d 可见小肠绒毛结构紊乱,部分淋巴细胞侵入肠腺,间质及血管内浸润大量淋巴细胞。残存少量肠腺上皮细胞结构不规则,部分上皮细胞出现明显空泡,自噬体出现,间质内可见到巨噬细胞浸润,数个散在分布凋亡细胞及大量凋亡小体形成(图 1),明显可见凋亡肠上皮细胞脱落入肠腔。术后 7 d 细胞坏死严重,细胞崩解明显(图 2),有明显细菌感染,未看到细胞结构及肠粘膜轮廓。间质浸润大量淋巴细胞,巨噬细胞吞噬凋亡小体,可见少量凋亡细胞。残留少量肌层细胞,有平滑肌细胞坏死。

2.3.3 A⁺、B⁺ 组 术后 2 h 即可见数个散在凋亡细

胞及凋亡小体形成。于术后 1 d 可见巨噬细胞吞噬凋亡小体。

图 1 凋亡小体(1500×)

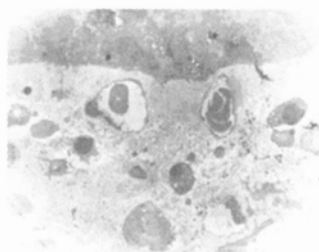
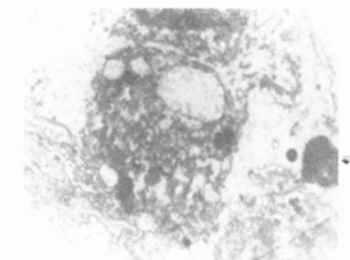


图 2 细胞坏死崩解(7500×)



3 讨论

导致细胞凋亡的原因很多,移植物中出现凋亡细胞不是排斥反应的本质现象,也不是排斥反应的惟一结果,但细胞凋亡数量变化可预报小肠移植排斥反应的发生及其程度^[6-8]。

小肠是对 I/R 损失最敏感的器官之一,正常或冷藏保存的小肠中不会出现细胞凋亡现象,但小肠移植再灌注 1 h 即可引起肠绒毛及隐窝的损失,TUNEL 法可检测到细胞凋亡而非缺血性坏死^[9-10]。本实验中,同基因或异基因移植肠缺血预处理再移植后 2 h 均可以在移植肠中检测到细胞凋亡数量的增加,术后 1 d 在同基因或异基因移植肠中细胞凋亡均明显下降。可能是凋亡细胞在体内迅速被邻近的巨噬细胞清除的缘故。然而术后 3 d 在异基因移植肠中第 2 次可以检测到细胞凋亡数目增加,术后 5 d 到达高峰,直至术后 7 d,结合病理,体现了轻、中、重度排斥反应。可见,小肠移植后,I/R 与排斥反应属于两个不同的过程,与 I/R 损失有关的细胞凋亡的发生和发展是短暂的,只出现在移植后 24 h 内,而且缺血预处理移植肠不会增加与排斥反应相关的细胞凋亡数量;术后 3 d 异基因移植肠第 2 次出现细胞凋亡数量增加则提示排斥反应的发生。

小肠移植后 24 h 内,受体淋巴细胞迅速侵入移植肠相关淋巴结(GALT)中,而在移植肠段内出现则相对较晚^[11-12]。本实验中,术后 1 d 在同种异基因组 GALT 中出现细胞凋亡数目增加现象,并于术后 3 d 达到高峰,随后衰减。而同时点各组移植肠无细胞凋亡现象,病理组织学检查也未显示排斥反应征象。小

肠的 Peyer's patch 粘膜(PPs)及系膜(MLNs)富有淋巴结是小肠移植后发生剧烈免疫排斥反应的重要原因。移植肠相关淋巴结不仅含有大量供者来源的专职抗原提呈细胞,它还是供者和受者之间免疫排斥反应的重要场所^[7,13]。可见,GALT 在小肠移植中有重要的免疫反应性,其中出现的细胞凋亡,始于小肠移植排斥反应前,并启动随后在移植肠发生的排斥反应。

另外,电镜观察提示,GALT 中出现的细胞凋亡大部分是间质浸润细胞,可能与供体淋巴细胞浸润有关;随后移植肠出现的细胞凋亡大部分是移植肠绒毛和隐窝上皮细胞,应是排斥反应中肠屏障功能下降的主要组织学基础。

小肠移植后,I/R 损失和排斥反应均可引起细胞凋亡,本实验从时间上区分 I/R 损伤和排斥反应这两个过程,同时发现 GALT 在移植早期即出现细胞凋亡现象。今后有待进一步研究 I/R 损失和排斥反应引发细胞凋亡机制,以及研究 GALT 在小肠移植后的免疫反应性。

[参考文献]

- [1] Kabelitz D. Apoptosis, graft rejection, and transplantation tolerance [J]. Transplantation, 1998, 65: 869 - 875.
- [2] Rosemurgy AS, Schraut WH. Small bowel allografts. Sequence of histologic changes in acute and chronic rejection [J]. Am J Surg, 1986, 151: 470 - 475.
- [3] Zavazava N, Kabelitz D. Alloreactivity and apoptosis in graft rejection and transplantation tolerance [J]. J Leukoc Biol, 2000, 68: 167 - 174.
- [4] Ingham-Clark CL, Cunningham AJ, Crane PW, et al. Lymphocyte infiltration patterns in rat small-bowel transplantations [J]. Transplant Proc, 1990, 22: 2460.
- [5] 董光龙, 李开宗, 王为忠, 等. 双 Cuff 双造口大鼠异位小肠移植模型的建立 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(2): 189.
- [6] Lee RG, Nakamura K, Tsamandas AC, et al. Pathology of human intestinal transplantation [J]. Gastroenterology, 1996, 110(6): 1820 - 1834.
- [7] Fayyazi A, Schlemminger R, Gieseler R, et al. Apoptosis in the small intestinal allograft of the rat [J]. Transplantation, 1997, 63: 947 - 951.
- [8] Hayashi M, Martinez OM, Krams SM, et al. Characterization of allograft rejection in an experimental model of small intestinal transplantation [J]. J Gastrointest Surg, 1998, 2: 325 - 332.
- [9] Shah KA, Shurey S, Green CJ. Apoptosis after intestinal ischemia-reperfusion injury: A morphological study [J]. Transplantation, 1997, 64: 1393 - 1397.
- [10] Kokudo Y, Itoh M, Mori S, et al. Effect of luminal flush on mucosal injury during cold ischemia in the rat small bowel [J]. Transplant Proc, 1996, 28: 1841 - 1842.
- [11] Kim PC, Levy GA, Craig M, et al. Characterization of immune responses in different lymphoid compartments during small intestinal allograft rejection [J]. Am J Surg, 1990, 159(1): 161 - 166.
- [12] Rubocki RJ, Langnas AN, Shepherd S, et al. The origin of lymphocytes in donor-derived lymph nodes following combined liver and small bowel transplantation [J]. Transplantation, 1994, 57(2): 303 - 306.
- [13] Toogood GJ, Rankin AM, Tam PK, et al. The immune response following small bowel transplantation. II. A very early cytokine response in the gut associated lymphoid tissue [J]. Transplantation, 1997, 63(8): 1118 - 1123.

(收稿日期:2005-10-19 修回日期:2005-12-31)