

# 肿瘤坏死因子 和 白细胞介素 2 在大鼠皮肤移植中的作用

王军琳 金 岩 刘晓亮

**【摘要】** 目的 探讨肿瘤坏死因子 (TNF) 和白细胞介素 2 (IL-2) 在同种异体大鼠皮肤移植后免疫排斥反应中的作用, 研究组织工程皮肤的组织相容性。方法 取 SD 大鼠皮肤和实验室培养的组织工程 SD 大鼠皮肤移植于成年 Wistar 大鼠, 移植成功后取不同时间点标本用免疫组织化学方法和 Western blot 方法检测 TNF 和 IL-2 在组织中的表达。结果 同种异体皮肤移植组, TNF 和 IL-2 有显著表达; 组织工程皮肤移植后, 局部组织中 TNF 和 IL-2 水平显著低于同种异体皮肤移植组。结论 TNF 和 IL-2 水平的改变与同种异体皮肤移植后免疫排斥反应的发生密切相关, 组织工程皮肤只具有很弱的免疫原性, 不引起显著的排斥反应。

**【关键词】** 肿瘤坏死因子; 白细胞介素 2; 组织工程; 同种异体移植

## Study on Tumor Necrosis Factor- and Interleukin 2 in Rat Skin Allograft

WANG Junlin, JIN Yan, LIU Xiaoliang. (Department of Oral Histology and Pathology, College of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**【Abstract】 Objective** To elucidate the histocompatibility of tissue engineered rat skin through studying the effect of TNF and IL-2 in immunological rejection after rat skin allograft. **Methods** Tissue engineered skin that the basic materials were taken from neonatal SD rats was cultured in lab, grafted to adult Wistar rats. The expressions of TNF and IL-2 in grafted tissue were detected with immunohistochemical staining and Western blot. **Results** The expressions of TNF and IL-2 were remarkable in skin allograft group, but low in tissue engineered skin group. **Conclusion** The expressions of TNF and IL-2 and the immunological rejection were closely related after skin allograft, but the tissue engineered skin has favorable histocompatibility and doesn't arise obvious immunological rejections.

**【Key words】** tumor necrosis factor-; interleukin-2; tissue engineering; allograft

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 是活化单核细胞和淋巴细胞来源的细胞因子, 是免疫炎症反应的重要介质, 它可以促进白细胞/淋巴细胞粘附和迁移, 影响巨噬细胞激活, 增强细胞溶解和细胞瘀滞作用。研究表明, 异体器官移植体内产生和释放的 TNF 可能具有广泛的生物学效应, 可以作用于血管内皮细胞, 引起内皮细胞损伤。白细胞介素 2 (interleukin 2, IL-2) 水平的高低是移植排斥的重要指标之一。IL-2 的检测对排斥反应的预测有重要价值, 与移植排斥反应有密切关系。关于这两种因子在同种异体皮肤移植中作用的研究还较少, 本实验对此进行研究, 同时探讨本实验室研制的组织工程 (tissue engineering, TE) 皮肤的免疫原性。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及实验材料

清洁级雄性 SD 大鼠 (第四军医大学实验动物中心提供) 15 只, 体重  $200\text{ g} \pm 20\text{ g}$ , 清洁级雄性 Wistar 大鼠 (北京大学医学院动物中心提供) 30 只, 体重  $200\text{ g} \pm 20\text{ g}$ 。兔抗大鼠 TNF 多克隆抗体 (博士德公司), 兔抗大鼠 IL-2 多克隆抗体 (第四军医大学免疫教研室提供), 免疫组化用的 LsAB 即用型试剂盒 (Dako 公司, 美国), HPIAS-1000 高清晰度彩色图像分析系统 (同济大学生产)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 组织工程皮肤的构建 无菌条件下取 SD 新生仔鼠背部皮肤, 去除皮下组织, 用含抗生素的 PBS 冲洗, 将标本切成规则的细条状, 置于 0.25% 的胰酶中, 4 过夜, 仔细将表皮与真皮分离, 分别放置不同的平皿中。将真皮成纤维细胞以  $1.5 \times 10^8$  个/L 的密度与提取自小牛皮的型胶原混合, 37 孵育凝固, 加入培养液培养过夜; 次日在表面以  $1 \times 10^9$  个/L 密度接种角朊细胞, 继续培养至细胞汇集成片, 将复合了细胞的胶原升至气液面进行器官培养, 培养 1 周即获得组织工程

本课题为国家科技部“863”重大专项课题资助项目 (编号 002AA205041)

作者单位: 710032 第四军医大学口腔医学院组织病理教研室

皮肤,冻存备用。

1.2.2 手术方法与分组 20 g/L 戊巴比妥钠以 30 ~ 50 g/kg 腹腔注射麻醉大鼠,在大鼠背部切取全层皮作圆形创面,直径 3 cm,以供皮肤移植。实验共分为 3 组。自体移植组:SD 大鼠 15 只,做自体皮片回植,取全层皮片,仔细去除皮下组织并回植于创面,缝合,加压包扎,作为阴性对照,以排除手术操作技术、术后皮片感染和移植皮片移动等人为因素致皮片坏死的可能性;异体移植组:以 SD 大鼠为供皮鼠,Wistar 大鼠作为受皮鼠( $n=15$ ),手术方法同前;组织工程皮肤组:Wistar 大鼠作为受皮鼠( $n=15$ ),手术同前。各组均于术后 7 d 拆除加压缝合包,10 d 拆线,逐日观察皮片情况。第 3、7、10、14、20、30 天取标本检测。

1.2.3 免疫组织化学方法检测 TNF- $\alpha$ 、IL-2 组织切片脱蜡至水后,0.3%  $H_2O_2$  封闭 10 min,PBS 缓冲液冲洗 5 min 3 次;37 °C 马血清封闭 30 min,分别加 TNF- $\alpha$ 、IL-2 抗体 4 °C 过夜,加入 PBS 缓冲液冲洗 5 min 3 次;羊抗兔 IgG37 °C 孵育 30 min,加入 PBS 缓冲液冲洗 5 min 3 次;链霉亲和素 37 °C 孵育 30 min,DAB 显色液显色 5 min。染色同时用 PBS 代替多抗作为阴性对照。

1.2.4 图像分析定量 每次测量前均用同一切片的空白区校正并重新调节光源,以达到不同标本测量方法相同,空白区平均灰度值定为 255。每张切片随机选取移植皮肤阳性区域测量,以减少人为误差。通过自动测量,得出每个阳性单位的平均灰度值(灰度值大小与阳性表达强弱呈负相关)。所得的数据采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

1.2.5 Western blot 方法检测 TNF- $\alpha$ 、IL-2 取冷冻皮肤组织 100 mg,加入 2 ml 上样缓冲液,玻璃匀浆器研磨后,置于 100 °C 水浴变性 10 min,4 ~ 3 500 r/min 转速离心 20 min,取上清,准备电泳;蛋白分离采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)系统。电泳结束后,将电泳槽转印蛋白质至 NC 膜,凝胶用考马斯亮蓝染色以确定转移效率;将 NC 膜放入另一塑料盒,加入含 0.1% Tween 20 的 TBS (NaCl 138 mmol/L, KCl 5 mmol/L,  $Na_2HPO_4$  1.4 mmol/L, Tris 25 mmol/L, pH 7.5) 即封闭液 20 ml,于室温封闭 NC 膜 60 min;用封闭液稀释 TNF- $\alpha$ 、IL-2 抗体(第一抗体,1:2 000 稀释),倾去封闭液,以稀释的第一抗体工作液代替之,在 37 °C 下持续摇动 60 min;倾去第一抗体,加入 20 ml 封闭液,摇动洗膜 3 次,每次 10 min;用封闭液稀释偶合生物素的第二抗体(1:2 000),加入稀释的第二抗体,在室温下持续摇动 40 min;倾去第二抗体,洗膜,将 NC 膜转置于 1:2 000 稀释的亲合素-生物素-过氧化物复合液中,室温下摇动 45 min,最后用 DAB 显色系统显现各蛋白表达水平。

## 2 结 果

### 2.1 愈合过程肉眼观察

自体移植组:术后 7 d 拆包时皮面光滑,有光泽,组织结构完整,无浮动现象,打包固定期间,皮片无收缩;10 d 时皮片已愈合牢固,柔韧性好,拆线后,皮片开始收缩,并开始长出毛发。

异体移植组:10 d 以前皮片存活过程同自体移植组,平均 14 d 以后开始出现排斥反应,皮片局部变色、变硬,边缘翘起;20 d 时全部皮片均被完全排斥,表皮呈干性坏死,黑痂状,痂皮脱落后创面暴露;30 d 时,剩余真皮也逐渐坏死,形成肉芽组织创面。

组织工程皮肤组:拆包时皮面光滑,色泽红润,无浮动现象,皮片愈合良好,至 60 d 时仍无排斥反应发生,且无色素沉着。

### 2.2 免疫组织化学检测

TNF- $\alpha$  阳性细胞在组织工程皮肤移植 3 d 后即开始在表皮层下,主要位于移植床面处聚集,在 7 ~ 14 d 时随植皮天数延长阳性表达增强(图 1),14 ~ 30 d 时随天数延长而逐渐减弱。组织工程皮肤移植 7 d 后,IL-2 阳性细胞主要聚集于真皮层内,异体表皮下(图 2)。



图 1 组织工程皮肤移植 7 d 后,表皮层下有 TNF- $\alpha$  阳性细胞浸润 DAB  $\times 40$

Fig 1 7 days after TE skin allograft, TNF- $\alpha$  positive cells under epidermis showed DAB  $\times 40$

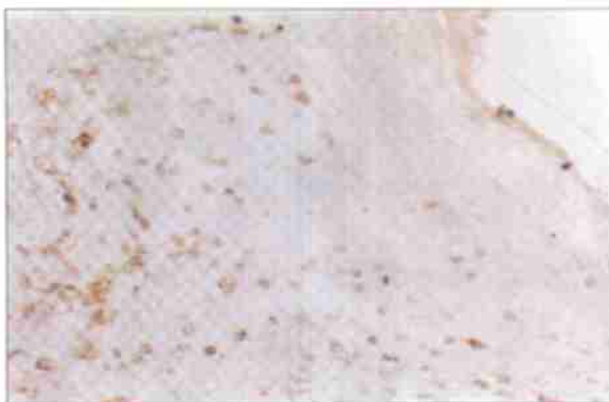


图 2 组织工程皮肤移植 7 d 后,与受体皮肤结合部真皮层内有 IL-2 阳性细胞浸润 DAB  $\times 100$

Fig 2 7 days after TE skin allograft, IL-2 positive cells in the dermis near the recipient skin showed DAB  $\times 100$

3 组 TNF- 和 IL-2 免疫组化图像分析定量结果见表 1, 经方差分析, 异体移植组 TNF- 表达明显高于组织工程组, 且差异具有显著性 ( $P < 0.01$ )。而组织工程组与自体移植组间差异无显著性 ( $P > 0.05$ ); 组织工程组与异体移植组间 IL-2 差异具有显著性

( $P < 0.05$ ), 组织工程组与自体移植组间差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。两组中 IL-2 表达均在移植后 7 d 达到最高峰, 但异体移植组明显高于组织工程组, 且差异具有显著性 ( $P < 0.01$ )。

表 1 3 组 TNF- 和 IL-2 免疫组化图像分析结果 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Comparison of immunohistochemistry results of TNF- and IL-2 among three groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

植皮天数	异体移植组		组织工程组		自体移植组	
	TNF-	IL-2	TNF-	IL-2	TNF-	IL-2
3 d	168.24 $\pm$ 15.72	178.23 $\pm$ 5.38	172.09 $\pm$ 12.78	185.38 $\pm$ 5.51	171.30 $\pm$ 17.66	179.60 $\pm$ 11.03
7 d	146.88 $\pm$ 11.11	155.76 $\pm$ 14.45	154.71 $\pm$ 14.79	183.07 $\pm$ 8.83	186.40 $\pm$ 12.63	190.50 $\pm$ 13.71
14 d	120.02 $\pm$ 13.80	166.74 $\pm$ 18.56	172.34 $\pm$ 13.11	189.09 $\pm$ 9.65	194.80 $\pm$ 19.90	196.10 $\pm$ 13.71
20 d	167.87 $\pm$ 11.39	185.79 $\pm$ 17.27	189.26 $\pm$ 8.92	199.63 $\pm$ 6.61	199.40 $\pm$ 14.48	202.70 $\pm$ 15.47
30 d	170.52 $\pm$ 12.26	200.36 $\pm$ 20.87	197.60 $\pm$ 13.02	201.98 $\pm$ 14.92	200.70 $\pm$ 8.65	209.80 $\pm$ 5.448

### 2.3 Western blot 分析

3 组各取 3、7、14、20 d 等 4 个样本作 Western blot 分析, TNF- 在各组中均有表达, 同种异体移植组在不同时相有明显变化; 组织工程移植组也有变化, 量较前一组为少; 自体移植组变化很小。IL-2 结果的变化趋势与 TNF- 结果类似。证明同种异体皮肤移植后, 移植部位局部组织内这两种细胞因子都有显著表达, 而且高于组织工程皮肤移植组。

### 3 讨 论

TNF- 在急性移植抗宿主反应的病理生理中起重要作用, 一些研究发现, 患有急性移植抗宿主反应 (graft versus host disease, GVHD) 和其他如静脉阻塞病等血管内皮性并发症的患者血清中 TNF- 升高<sup>1</sup>。在炎症反应中, TNF- 主要由单核巨噬细胞合成、分泌<sup>2,3</sup>, 反过来又以自分泌和旁分泌的方式激活单核巨噬细胞, 使其产生释放大量 IL-1、IL-6、IL-8、前列腺素 E<sub>2</sub> 等炎性介质, 激发炎症的连锁反应<sup>4</sup>, 导致所谓“瀑布效应”, 加重机体损伤。TNF- 损伤内皮细胞、增加血管通透性, 高浓度的 TNF- 能抑制内皮细胞增殖, 甚至杀伤细胞, 使血管通透性增加; TNF- 也可通过刺激内皮细胞合成释放一些炎性介质损害血管内皮, 能刺激血管内皮细胞产生 IL-1、IL-8、内皮素、血小板激活因子等介质, 对机体产生影响<sup>5</sup>, 内皮素是目前发现的最强的内皮源性缩血管多肽, 在炎症中引起各器官血管收缩, 血流量下降, 导致器官病理改变; 能通过诱导内皮细胞合成细胞间粘附分子和内皮细胞—白细胞粘附分子两种内皮细胞表面的粘附分子来促进血管内皮细胞对中性粒细胞的粘附作用<sup>6</sup>;

激活中性多形核白细胞、增强其对血管内皮细胞的粘附性外, 还能通过直接刺激中性粒细胞脱颗粒和“呼吸爆发”, 释放超氧阴离子、过氧化物等活性物质<sup>7</sup>。

IL-2 是促使 T 细胞从 G<sub>0</sub> 期转至 S 期的关键性因子, 主要是由被抗原或丝裂原激活的 CD4<sup>+</sup> T 细胞产生, CD8<sup>+</sup> T 细胞产生较少。IL-2 的主要作用在于诱导其他细胞因子的产生和动员效应细胞, IL-2 的分泌可刺激 T 细胞增殖分化和激活细胞毒 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 毒性作用。IL-2 还可以刺激已经耐受的移植物重新发生排斥反应<sup>8</sup>, 在启动急性 GVHD 中有着重要作用, 实验表明在急性 GVHD 发作的前两天, 供者 CD4<sup>+</sup> T 细胞产生的 IL-2 达到峰值。IL-2 可作用于产生 IL-2 的细胞本身, 也可作用于邻近的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞及其他免疫细胞, 辅助性 T 淋巴细胞、CTL 和抑制性 T 淋巴细胞都是 IL-2 的反应细胞。IL-2 可刺激 T 细胞 II 类主要组织相容性抗原 (major histocompatibility complex II, MHC-II) 表达, 并产生多种淋巴因子如 干扰素 (interferon, IFN-)、IL-4、IL-5、IL-6、TNF- 和集落刺激因子等, 刺激自然杀伤细胞生长, 增强其溶细胞活性, 诱导 CTL、淋巴因子激活的杀伤细胞等多种杀伤细胞的分化和效应功能, 并诱导产生 IFN-、TNF- 等细胞因子, 增强 CTL 细胞穿孔素基因的表达; 还可直接作用于 B 细胞, 促进其增殖、分化和抗体分泌, 活化巨噬细胞。

由此可见 TNF- 和 IL-2 在器官移植中具有重要作用, 是观察移植器官能否存活的关键指标。通过本实验发现, 在同种异体皮肤移植后的免疫排斥反应中, 这两种因子在局部组织都有高水平的表达, 显著

(下转第 480 页)

或受体交联后常导致其特异性下降;同时,交联物在重复使用时机体会针对抗体产生抗-抗体,抗-抗体与抗体接合产生封闭作用,从而导致靶向制剂对靶器官失去特异性的靶向作用;另外,肿瘤细胞群体存在抗原异质性和肿瘤细胞表面抗原本身还存在调变现象。这些因素都将干扰主动靶向制剂在体内的靶向作用,从而也限制了目前主动靶向制剂的广泛应用。被动靶向系统主要指通过利用载体的疏水性(或亲水性)、静电作用、磁力作用、载体的大小、质量等物理因素增加载药载体与靶器官接触,减少与非靶器官接触,从而增加靶部位与非靶部位药物的比率,常用的被动靶向载体有脂质体、纳米微粒(球)、乳剂、高分子物质等。由于被动靶向制剂的载药量高,且易于工业生产与推广等优点而目前得以迅速发展,在被动靶向制剂中,纳米微粒由于具有良好的稳定性、生物相容性、缓释性、靶向性和表面易修饰性<sup>5</sup>而日益倍受关注。本实验根据口腔癌周毛细淋巴管的解剖生理特点,制备的葫芦素 BE 聚乳酸纳米微粒属于被动靶向制剂,它是通过控制粒径大小使其在行癌周黏膜下注射后能通过淋巴引流至靶向颈淋巴结转移灶的。

本研究选用 5 个靶向性评价指标评价 CuBE-PLA-NP 对口腔癌颈淋巴结转移灶的靶向性,即 TI、SI、 $r_e$ 、TE 和 Ce。TI 和 SI 全面反映了各时间点 CuBE-PLA-NP 对颈淋巴结转移灶的靶向性,但并未代表

CuBE-PLA-NP 在整个观察时间段内对颈淋巴结的靶向性,即没有反映药物在体内作用的全过程。 $r_e$  和 TE 以 AUC 作为比较单位,可以反映药物在整个观察时间段内的靶向性,能充分反映药物在体内的吸收、分布、消除等全过程。以上指标综合考察,全面客观地反映了 CuBE-PLA-NP 行口腔癌周黏膜下注射后对颈淋巴结转移灶的靶向性情况,结果表明,CuBE-PLA-NP 通过口腔癌周黏膜下注射后对颈淋巴结转移灶具有良好的靶向性作用,其结果客观可靠。

## 参考文献

- 1 杨凯,温玉明,李龙江,等. 颈淋巴结靶向葫芦素 BE 聚乳酸纳米微粒冻干针剂的研制. 华西口腔医学杂志, 2001, 19 (6): 347-350
- 2 Weber E, Sacchi G, Comparini L. Plasticity of intercellular junctions of rat liver lymph capillaries in relation to functional conditions. *Angiology*, 1991, 42 (11): 929-934
- 3 杨凯,温玉明,王昌美. 淋巴化疗的药物运载系统及其应用现状. 国外医学口腔医学分册, 1999, 26 (5): 288-291
- 4 杨凯,王昌美,温玉明,等. 人口腔鳞癌细胞系对淋巴靶向葫芦素 BE 聚乳酸纳米微粒的敏感性研究. 华西口腔医学杂志, 2002, 20 (4): 293-295
- 5 Kawashima Y. Nanoparticulate systems for improved drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47 (1): 1-2

(2003-08-29 收稿)

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第 473 页)

高于另两组。且随着这两种因子表达水平的增高,免疫排斥反应也进入了高峰期。因此,如果能够及时阻断或者降低这两种因子的表达,就可以避免同种异体组织移植后的免疫排斥反应发生,提高移植存活率。通过本实验也发现,组织工程皮肤移植后不激起受者机体高表达 TNF- $\alpha$  和 IL-2,机理可能在于本课题组所培养的组织工程皮肤的细胞来源于新生大鼠。新生大鼠本身抗原性很弱,在原代培养过程中笔者采用胰酶消化法,可去除携带 MHC 类抗原的皮肤附件,因此在最大程度上降低了组织工程皮肤的抗原性,而且已证实成纤维细胞不含有 MHC 类抗原,不激发免疫排斥反应,不能刺激静止性 T 淋巴细胞产生 IL-2,所以一般不发生排斥反应。实验结果也说明了组织工程皮肤具有良好的组织相容性。

## 参考文献

- 1 Nadeau KC, Azuma H, Tibney NL. Cytokines in the pathophysiology of acute and chronic allograft rejection. *Transplantation*, 1996,

10 (2): 99-107

- 2 夏穗生. 器官移植学. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 143-147
- 3 李幼平. 移植免疫生物学. 北京: 科学技术出版社, 2000: 15-51
- 4 Wittmann DH, Schein M, Condon R. Management of secondary peritonitis. *Ann Surg*, 1996, 224 (1): 10-18
- 5 Rampart M, Fiers W, de Smet W, et al. Different pro-inflammatory profiles of interleukin-1 and tumor necrosis factor in an *in vivo* model of inflammation. *Agents Actions*, 1989, 26 (1-2): 186-188
- 6 Pohlman TH, Stanness KA, Baetz PG, et al. An endothelial cell surface factor(s) induced *in vitro* by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor increases neutrophil adherence by a CDw 18-dependent mechanism. *J Immunol*, 1986, 136 (12): 4548-4553
- 7 Tracey KJ, Lowry SF, Cerami A. Cachectin /TNF- $\alpha$  —in septic shock and septic adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 1988, 138 (6): 1377-1379
- 8 龚少华. 移植免疫学. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 13-33

(2003-08-20 收稿)

(本文编辑 汤亚玲)