

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

移植前 DST 及 RT 在肢體異體移植上之應用

計畫編號：NSC 87-2314-B-002-031

執行期限：86 年 8 月 1 日至 87 年 7 月 31 日

主持人：侯勝茂 國立台灣大學醫學院骨科

一、中文摘要

本計劃的目的在瞭解移植前以不同途徑輸入特定來源的血液是否能延長肢體異體移植物的存活時間；使用的移植模式為帶骨骼、肌肉、血管及皮膚瓣移植模式 (Osteomyocutaneous)，以 Brown Norway (BN) 大鼠為移植提供者，以 Lewis (LEW) 大鼠為移植接受者。實驗共分五組，A 組是在移植前第 8 天由口給予 1ml 新鮮的 BN 鼠全血，並於移植前一天起開始投與免疫抑制劑 (LEF 10mg/day, FK506 0.1mg/kg/day) 至移植後 30 天止，若投藥期間發生排斥現象時，則將 FK506 的劑量提高至 0.5 mg/kg/day 連續給予 7 天後再恢復原來劑量，而 LEF 的劑量則不改變；B 組及 C 組之實驗流程與 A 組相同，但血液輸入途徑分別改由 LEW 的背部皮下 (B 組) 或經由尾靜脈 (C 組) 給予；D 組之實驗流程與 C 組相同，但在血液給予的前一天 (移植前 9 天) 即開始投與免疫抑制劑至移植後 30 天為止，A、B、C 及 D 組則分別於輸血前後由尾靜脈採取血液，以流式細胞計數儀分析周邊血液 CD4 及 CD8 細胞的比率；E 組為實驗對照組，不做輸血，於移植前 1 天開始投藥至移植後 30 天為止。結果發現輸血對複合組織移植並沒有正面的影響，相反因為接受被致敏化後而有負面影響。

關鍵詞：帶骨骼、肌肉、血管及皮膚瓣移植、輸血、流式細胞計數儀

Abstract

To understand how the survival time of osteomyocutaneous allograft is affected by different pathway of donor-specific blood transfusion, we performed this study. Male

Brown Norway and Lewis rats were served as the donor and recipient respectively. Rats of Group A were feed with 1ml-blood 8 days before transplantation. Immunosuppressant administration (combination of Leflunomide 10mg/kg/day and FK506 0.1mg/kg/day) started at the day before transplantation and ceased at the 30th day after transplantation. If graft was rejected during immunosuppressive treatment, the dosage of FK506 was increased for 7 days. The programs of group B and C were similar to group A, but the blood was administrated by different pathway. The pathways were subcutaneous and intravenous respectively. Group D was similar to Group C, only the immunosuppressant administration was from 9 days before transplantation to 30 days after transplantation. Recipient blood samples of each group were taken fore blood administration and transplantation, then analyzed the ratio of CD4 and CD8 cells in periphery blood by flow cytometry. Group E was similar to group A, but without blood transfusion. The result showed that the administration of donor blood before transplantation could not prolong the survival time of limb graft, but induced acute rejection instead. According to the result of flow cytometry, transfusion may sensitize the recipient.

Keywords: Osteomyocutaneous allotransplantation, Transfusion, Flowcytometry

計畫緣由與目的

四肢殘缺會造成功能上極大的不便，也影響到外觀，引起心理及人際關係的障

礙，尤其上肢之功能特別重要；雖然目前我們可以用義肢以及小部份的自體移植手術（例如足部構造移植至手），但其來源有限，因此臨床上往往病人會問我們是否可如其他器官如心臟、腎臟做異體移植。我們顯微實驗室也朝此方向努力(30,31)，並成功地利用適當免疫抑制劑（cyclosporin 及 leflunomide）移植老鼠的下肢，並得到滿意的功能性恢復(3,6)。

輸血主要用來治療動物貧血，是將一個個體的血液注入另一個需要血液的個體，但就其形式而言，輸血其實也可算是一種移植；輸血的原意本來是為了治療貧血，但其本身亦存在許多的危險性，包括血型不符所導致的輸血反應、個體差異導致的過敏化作用(Sensitization)及隱藏在血液提供者本身的一些潛在性傳染疾病，如 Hepatitis B, Cytomegalovirus..等，其中輸血導致的過敏化與器官移植較有關係。早期因為腎臟疾病導致的貧血，常需要以輸血來暫時挽救病患的生命，但輸血後會使血液中含有抗體，容易導致未來腎臟移植的失敗。

早在 1953 年 Billingham 等即發現，血球細胞在小白鼠的皮膚移植模式中具有免疫調節的功能(4)；1973 年，Newton 及 Anderson 的研究也指出，在腎臟移植前將白血球先注入接受者的血中，可改善腎臟移植的成功率(23)；而真正導引醫學界去瞭解輸血在移植免疫學上所扮演角色的應是 Opelz 等的研究(24)，他們整理幾個腎臟移植中心的資料發現，在腎臟移植前接受過輸血（Random transfusion, RT）的患者，其腎臟移植後存活率較未接受過輸血的患者高 15% 至 20%，且輸血越多次腎臟的存活率越高越長（10 次以上輸血的移植一年存活率近 70% vs 0 次輸血一年存活率 30%）(1)，這似乎與以往免疫學的理论相違背；1979 年 Cochrum 等的研究亦指出，在 one HLA haplotype-mismatched 的親屬間腎臟移植，若於移植前進行 Donor-specific transfusion(DST)後，其腎臟的存活率與 HLA-identical 的腎臟移植相

同(9)；之後 DST 不僅在人臨床醫學上，實際被用來避免腎臟移植所產生的排斥反應(14,16,17,21)，更在許多其他器官或組織移植如心臟、胰臟、小腸及皮膚等的動物模式中，成功的延遲或避免排斥反應的產生(7,11,20,27,29)。

雖然 DST 能有效的延長移植物的存活，但由於多次輸血所帶來過敏化的危險性，卻也讓許多研究者對 DST 的功效產生疑慮，只是在配合免疫抑制劑 azathioprine 的使用下，已將促敏化的發生率降至 8%-14%(2)，而在使用 CsA 之後，更將發生率降低至 4%(10)。另外一方面，減少輸血的次數或縮短輸血與移植手術的間隔時間，也是避免產生促敏化的策略之一；在經抗淋巴球處理過的小鼠皮膚移植模式中，發現每 7 天或 14 天做一次輸血連作四次，而在最後一次輸血後兩天進行皮膚移植，皮膚可存活最久(26)；而在免疫抑制劑 CsA 的配合下，於移植前 24 小時僅做一次 DST，可以有效的控制腎臟的排斥反應，但在大鼠的小腸移植模式中，卻無法使移植植物長期存活(13)。

FK506 是作用機制與 CsA 相似的免疫抑制劑，但效果較 CsA 高出許多，而副作用卻明顯較小(8)；在骨髓移植時 FK506 能有效治療 GVHD，在心臟移植也有不錯的抗排斥效果(28)，甚至在腎臟與胰臟同時移植的病例報告指出，當無法有效的以 CsA 控制排斥反應時，FK506 能用來逆轉初期產生的排斥反應(15)；另外在肢體的異體移植上，以 ACI to LEW 大鼠的研究模式中，長期的間段投予 FK506(2mg/kg) 能成功的使移植植物存活近 300 天，沒有出現排斥反應，甚至能逆轉早期之排斥反應(18,22)。新近的報告發現，FK506 可增加體內神經生長因子的分泌，而神經在受到擠壓的傷害時，FK506 有促進受損的神經功能恢復的能力(19)。

由於肢體的組織及功能相當複雜，而且肢體移植的成績不僅在求移植物的存活，還必須使移植後的肢體發揮正常功

能,故目前將 DST 應用肢體移植的報告很少;在大鼠的研究模式中發現,於移植前 7 天起連續 14 天每天給予 1mg/kg 的 FK506,能使移植的肢體延後發生排斥的時間至 36 天,若於移植前 7 天進行一次 DST 並不能加乘 FK506 的效果(12)。本實驗擬應用大鼠的模式,比較移植前不同途徑給予固定來源血液,及在併用免疫抑制劑 LEF 及 FK506 的配合使用下,對複合組織移植後的影響。

材料與方法：

移植方式

將 Brown Norway (BN) 大鼠後肢的複合組織(含有脛、腓骨,伸、屈指肌及所附著的血管、皮膚)移植至 Lewis (LEW) 大鼠的對側大腿內側,並以顯微手術接合移植植物及接受者的股動、靜脈,作為移植植物的血液循環來源。

實驗分組

於移植前第 8 天將 1mlBN 鼠全血經由不同途徑給予 LEW 鼠,並自移植前一天起連續投予免疫抑制劑至移植後 30 天止,之後停藥並每日觀察移植植物的情形。

分組	輸血途徑	備註
A	經口給予	
B	經皮下給予	
C	經血管給予	
D	經血管給予	自輸血前一天給予免疫抑制劑
E	未輸血	

免疫抑制劑劑量

合併使用 LEF 及 FK506,劑量分別為 LEF 10mg/kg/day; FK506 0.1mg/kg/day。若投藥期間發生排斥現象,則將 FK506 的劑量提高為 0.5mg/kg/day,連續使用 7 天後再降回原來的量。

輸血前、後周邊血液細胞像變化

於輸血前及移植前一天分別抽取 LEW 鼠血液,經抗 CD4 及 CD8 抗體標定及螢光呈色後,於流式細胞計數儀計算輸血前後 CD4 及 CD8 細胞比率的變化。

結果：

停藥後發生排斥時間

分組	發生排斥時間	備註
A	17,20	經口給予
B	22,6 ^a	經皮下給予
C	24,17	經血管給予
D	17,10	經血管給予
E	22,17,19,94	未輸血

a: 移植後 6 天即排斥,即使提高免疫抑制劑劑量仍無法逆轉。

流式細胞計數儀分析結果

分組	輸血前		輸血後	
	CD4%	CD8%	CD4%	CD8%
A	51.79	18.47	52.97	21.58
B	55.46	20.90	53.63	25.20
C	58.09	15.97	57.11	26.96
D	63.00	18.37	59.31	17.00

討論

就以往的研究來說,移植前輸血有利於移植器官的存活,且對移植後器官的功能也有正面的影響,但對複合組織移植的影響則較少人探討;本實驗的結果發現輸血對複合組織移植並沒有正面的影響,相反的有負面影響。

在本實驗的對照(E)組中,移植植物多在停藥後 20 天左右發生排斥,僅一隻移植植物存活達 90 天以上才有排斥症狀,其他各個實驗組也幾乎都在停藥後 20 天左右發生排斥,表示輸血對複合組織移植並沒有正面的影響;相反的,在 B、C 兩組中,移植植物會在移植後 3 至 4 天有急性排斥症狀出現,需將免疫抑制劑的劑量提高連續使用 7 天後,才可能使移植植物耐過該急性排斥,甚至在 B 組有一隻實驗無法逆轉該急性排斥反應,故表示移植前輸血反而會使複合組織更容易被排斥,這可能是因為移植前的輸血反而使接受者事先被血液的抗原致敏。

而為了解決接受者被致敏化的問題,我們加作 D 組,希望在輸血前先投予免疫抑制劑,可使接受者在免疫抑制的情形下先與提供者細胞產生細胞交移,繼而有利於移植植物的存活,但實驗結果似乎不如我們預期;本組實驗僅抑制了移植後的急性排斥,但停藥後仍然在 20 天之前即發生慢

性的排斥反應。

在對輸血前後周邊血液 CD4 及 CD8 細胞比率的分析上發現，經口、皮下或靜脈給予血液都會造成周邊血液中 CD8 細胞比率的上升（18.47 21.58 / 20.90 25.20 / 15.97 26.96），雖然許多研究指出輸血造成免疫抑制的原因可能來自 CD8 細胞，但我們比照實驗的結果，認為 CD8 細胞比率上升應該是接受者免疫系統被致敏化的結果，故 B、C 兩組的移植物都在移植後 3 至 4 天發生急性排斥現象；而在 D 組的實驗中，CD8 細胞的比率不升反降則證實輸血造成的致敏化可被事前投予免疫抑制劑給抑制住(5)，故移植後也不會有急性排斥產生，但對延長移植物存活則沒有貢獻。

計畫成果自評

1. 本實驗在暫時不管肢體移植後功能恢復的情形下，成功發展較簡易的大鼠複合組織的移植模式，取代較複雜而費時的肢體移植模式。
2. 許多報告均指出輸血有利於器官移植的成功，但本實驗則證實其對複合組織或甚至肢體移植並沒有正面的效果。
3. 藉由流式細胞計數儀的分析，可用來作為輸血並不會造成免疫抑制的效果或較不利於複合組織移植的佐證。

參考文獻

1. Alexander JW, Davies CB, Cofer BR, Munda R, Madden RL, Hariharan S. Single pretransplant donor-specific transfusion in cadaver and living related donor renal transplantation. *Transplantation Proceedings* 1993;25(1):485.
2. Anderson CB, Sicard GA, Etheredge EE. Pretreatment of renal allograft recipients with azathioprine and donor-specific blood products. *Surgery* 1982; 92(2):315
3. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989; 83:129.
4. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953;172:603.
5. Black KS, Hewitt CW, Woodward TL, Adrig LM, Litke DK, Howard EB, Achauer BM, Martin DC, Furnas DW. Efforts to enhance survival of limb allografts by prior administration of whole blood in rats using a new survival end-point. *J Microsurgery*. 1982; 3:162
6. Brown CJ, Evans PJ, Mackinnon SE. Inter-and intraobserver reliability of walking-track analysis used to assess sciatic nerve function in rats. *Microsurgery*. 1991;12:76.
7. Brennan DC, Mohanakumar T, Flye MW. Donor-specific transfusion and donor bone marrow infusion in renal transplantation tolerance: a review of efficacy and mechanisms. *American Journal of Kidney Diseases* 1995; 26(5):701.
8. Buttemeyer R, Jones NF, Min Z, Rao U. Rejection of the component tissues of limb allografts in rats immunosuppressed with FK-506 and cyclosporine. *Plastic & Reconstructive Surgery* 1996; 97:139.
9. Cochrum KC, Hames D, Potter D, Vincenti F, Amend W, Feduska N, Perkins H, Salvatierra O. Donor-specific blood transfusions in HLA-D-disparate one-haplotype-related allografts. *Transplantation Proceedings* 1979;11(4):1903.
10. Cheigh JS, Suthanthiran M, Fotino M, Riggio RR, Schechter N, Stubenbord WT, Stenzel KH, Bubin AL. Minimal sensitization and excellent renal allograft outcome following donor-specific blood transfusion with a short course of cyclosporine. *Transplantation* 1991; 51:378
11. Emma L, Lagaaih et al. Effect of one-HLA-DR-antigen -matched and completely HLA-DR-mismatched blood transfusions on survival of heart and kidney allografts. *N Engl J Med* 1989;321:701.
12. Fealy MJ, Umansky WS, Bickel K, Nino JJ, Morris RE, Ress BH. Efficacy of

- rapamycin and FK506 in prolonging rat hind limb allograft survival. *Ann Surg Transplant Proc* 1994; 219:88.
13. Fecteau A, Tchervenkov J, Guttman FM, Rosenmann E. Small bowel transplantation in the rat: the effect of donor-specific transfusion 24 hours pretransplant and cyclosporine. *Transplantation Proceedings* 1992;24(3):1166.
 14. Flye MW, Burton K, Mohanakumar T, Brennan D, Keller C, Goss JA, Sicard GA, Anderson CB. Donor-specific transfusions have long-term beneficial effects for human renal allografts. *Transplantation* 1995;60:1395.
 15. Hariharan S, Hunda R, Cavallo T, Demmy AM, Schroeder TJ, Alexander JW, First MR. Rescur therapy with tacrolimus after combined kidney/pancreas and isolated pancreas transplantation in patients with severe cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1996;61:1161.
 16. Jayes RL, Levey AS. Donor specific transfusions or cyclosporine for related-donor kidney transplantation? *Kidney International* 1989;36:485
 17. Kong JM, Jeong JH, Kang JK, Seong IG, Kim BC. Donor-specific transfusion in living related and unrelated donor kidney transplantation: minimal sensitization and excellent graft outcome. *Transplantation Proceedings* 1995;27(1):1036.
 18. Kuroki H, Bean MA, Ikuta Y, Akiyama M, Burgess EM. Effect of FK506 and donor-specific blood transfusion on the rat composite tissue limb allograft and the mechanism of long-term graft survival. *Transplantation Proceeding* 1993; 25(1):658.
 19. Kuroki H, Ikuta Y. Nerve regeneration of vascularized rat limb allograft and functional recovery of long-term graft survivals treated by short course of FK506 or Cyclosporine. *Transplantation* 1995;27:348.
 20. Light JA, Metz S, Oddenino K, Strong DM, Simonis T, Biggers JA, Bueno CF. Donor-specific transfusion with diminished sensitization. *Transplantation* 1982; 34(6):352.
 21. Mazzali M, Fiho GA, Alves MAVFR, Faria JBLD. Comparative study of two protocols for living-related renal transplantation: donor-specific transfusion versus cyclosporine. *Transplantation Proceedings* 1995; 27(2):1832.
 22. Min Z, Jones NF. Limb transplantation in rats: immunosuppression with FK-506. *Journal of Hand Surgery-American Volume* 1995; 20:77.
 23. Newton WT, Anderson CB. Planned preimmunization of renal allograft recipients. *Surgery* 1973;74:430.
 24. Opelz G, Serger DPS, Mickey MR, Terasaki PI. Effect of blood transfusion on subsequent kidney transplants. *Transplant Proc.* 1973;5:253
 25. Opelz G, Terasaki PI. Improvement of kidney-graft survival with increased numbers of blood transfusions. *N Engl J Med* 1978;299:799.
 26. Sanfilippo F, Spees EK, Vaughn WK. The timing of pretransplant transfusions and renal allograft survival. *Transplantation* 1984; 37(3):344
 27. Sollinger HW, Burlingham WJ, Sparks EMF, Glass MR, Belzer FO. Donor-specific Transfusions in unrelated and related HLA-mismatched donor-recipient combinations. *Transplantation* 1984;38(6):612.
 28. Tanabe M, Todo S, Murase N, Irish W, Miyazawa H, Fujisaki S, Starzl TE. Combined immunosuppressive therapy with low dose FK506 and antimetabolites in rat allogeneic heart transplantation. *Transplantation* 1994;58:23
 29. van Twuyver E, Mooijaart RJD, tem Berge IJM, van der Horst AR, Wilmink JM, Kast WM, Melief CJM, de Waal LP. Pretransplantation blood transfusion revisited. *N Engl J Med* 1991;325:1210
 30. Yeh LS, Hou SM, Lin AC. Vascularized autogenous canine coccygeal bone transfer. *Microsurg.* 1991;12:321.
 31. Yeh LS, Hou SM, Lin AC, Lin J. A

modified free gracilis flap in the rat.
Microsurg. 1994;15:322.