

血液中不同成份對複合異體組織移植的影響

Study of different blood components transfusion in composite tissue allotransplantation

NSC 88-2314-B-002-269

一、中文摘要

本計劃的目的在瞭解複合組織移植後，不同的提供者淋巴細胞對複合組織移植所可能產生的影響；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) 大鼠為移植物提供者，以 Lewis (LEW) 大鼠為移植物接受者。LEW 鼠自移植前一天起開始投與免疫抑制劑 (LEF 10mg/day, FK506 0.5mg/kg/day) 至移植後 30 天止；移植後每週由尾靜脈抽血，經同時以抗 BN 鼠 MHC I 抗體及抗 CD4 or CD8 抗體染色後，再以流式細胞計數儀分析。結果移植物在移植後第六週開始發生排斥，第八週時全部發生排斥，而移植後一週即可偵測到細胞交移現象，三週時達到最高，之後降低，八週後即偵測不到。而偵測到的細胞中，早期表現 CD8 分子者較 CD4 分子者為多，但發生排斥時，反而 CD8 分子的比率即減少，故初步認為，這些表現 CD8 分子的淋巴球應有助於移植物的維持。

關鍵詞：帶骨骼、肌肉、血管及皮膚瓣移植、CD8、流式細胞計數儀

Abstract

Purpose: To understanding that the osteomyocutaneous allograft is affected by different chimeric lymphocyte, we perform this research. **Material and method:** Male Brown Norway and Lewis rats are the donor and recipient respectively. Immunosuppressant administration (combination of Leflunomide 10mg/kg/day and FK506 0.5mg/kg/day) start at the day before transplantation and cease at 30th day after transplantation. After transplantation, whole blood was collected from recipient tail weekly. Those blood was treated by Anti-BN MHC I monoclonal antibody and anti-CD4 or Anti-CD8 monoclonal antibody, then analyzed by flowcytometry. **Result:** some graft appeared rejection from sixth week after transplantation and all rejected at eighth week. Lymphocyte chimerism found within the first week, but just few. At the third week, lymphocyte chimerism mount to the top then descent. After eighth week, chimerism was undetectable. At the early stage after transplantation, chimeric lymphocyte expressed much CD8 molecules than CD4. When rejection, the rate of CD8 molecule expression was decrease. We thought that the lymphocyte expressed CD8 may play important role for maintenance of graft survival.

Keywords: Osteomyocutaneous allotransplantation, CD8, 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，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。

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；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，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；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。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。

在一些針對細胞交移的研究中，報告了一些細胞交移的種類、時間及頻率的相資料；1995 年對同時有骨髓與心臟（或肺臟）移植的病人追蹤研究指出，在 15 個伴隨有骨髓移植的臟器移植病人中，有 11 個人周邊血液在移植後 220 天（最後一次追蹤）仍能偵測到提供者的白血球；而未伴隨骨髓移植的臟器移植，則僅有一個病人（1/5）移植 15 天會被檢測到提供者的白血球，其餘均無法偵測到。1997 年對伴隨有骨髓移植的大鼠腎臟移植實驗中發現，提供者的 CD8+ 細胞在移植後會短暫出現接受者週邊血液中，而提供者的 CD16+ 細胞則無法在移植後被偵測到，而該項實驗模式的移植物長期存活率（存活 120 天以上）僅有 50%。1998 年另一組針對大鼠心臟異位移植（伴隨有心臟移植）的研究中指出，在移植後 56 天仍可在接受者週邊血液中偵測到提供者的細胞，但超過 100 天後就測不到了；而當老鼠犧牲後，可分別在接受者的心臟(95%)、皮膚(80%)及脾臟(23%)偵測到提供者的基因物質(DNA)存在，而且伴隨有骨髓移植的大鼠偵測到的比率越高。

本實驗擬應用大鼠的模式，以帶骨頭肌肉皮膚瓣移植，藉由免疫螢光作用及流式細胞分析儀的分析來瞭解移植後提供者淋巴細胞出現在接受者周邊血液的情形，並瞭解其中不同淋巴細胞對移植物維持可能產生的影響。

材料與方法：

實驗動物：

分別採用購自國科會實驗動物中心之雄性Brown-Norway(BN/SsN, RT-1ⁿ)

（體重300公克）與Lewis (LEW/SsN, RT-1^l)大鼠（體重350公克）為組織之捐贈者及接受者，BN和LEW有著極強之免疫不相容性。

帶骨骼、肌肉、皮膚及血管組織的異位移植：

組織捐贈者老鼠 (BN) 麻醉：先以4% halothan伴隨N₂O作引導，再以腹腔注射Sodium pentobarbital麻醉，劑量65mg/kg。

帶骨頭、肌肉、皮膚及血管移植之截取：將右後肢內、外側及下腹部剃毛（手術需無菌操作），將動物固定在手術板上，利用小電毯及紅外燈維持動物體溫。手術方式採用本實驗室所發展出之大鼠帶骨骼、肌肉、皮膚及血管的移植模式，分別於後肢之踝關節及股骨中段作皮膚環切，之後將內側皮膚延血管向踝關節處切開並鈍剝；皮膚往上鈍剝至脛骨前緣，往下則一直鈍剝至肢體後緣，使內側肌肉完全呈現；外側皮膚則延續肢體內側後緣皮膚的鈍剝，直至前脛骨肌接合處。由皮膚剝開面，小心將外包於股骨及脛骨的所有肌肉剝除，內側沿著股動、靜脈延伸的血管後緣將肌肉剪除；外側則將皮膚未附著之肌肉全部剝除，最後僅留腓腸肌附著於脛骨上，肌肉剝除過程中所遇到的血管及神經分支均需做適當處理（如結紮或燒灼後切斷），之後將股動脈及股靜脈小心剝離。待一切處理好後，分別以刀片小心將膝關節與踝關節切開，使移植上僅剩完整的脛、腓骨、腓腸肌、股動、靜脈及其延伸的血管與附著在移植上的皮膚；此時移植之剝離已完成，移植僅以股動、靜脈與大鼠連接，故先以無菌紗布沾濕後包被，等待接受者大鼠處理好後，即可截取移植。移植取下後，組織捐贈者以過量之Sodium pentobarbital做心臟注射，行安樂死。

移植手術：組織接受者老鼠 (LEW) 先以 4% halothan 伴隨 N₂O 作引導之後，以 1-2% halothan 維持麻醉。大鼠於左後肢內側剃毛，經無菌處理後，延腹股溝做二公分之皮膚切口，再將皮膚延血管向下剪至踝關節處，之後鈍剝皮膚，將整個內側肌肉均呈現出來。小心剝離腹股溝處之股動脈及股靜脈，於肢體端將其結紮，結紮點儘量靠近 epigastric vessels 與 saphenous vessels 的分叉點，之後以血管夾夾住股動脈及靜脈後，剪斷血管，並立即將截取之移植固定於內側肌肉上，進行移植與接受者血管的吻合。血管吻合後，小心修整移植組織的皮膚面積，使其符合皮膚切口大小與形狀，再縫合接受者與移植組織的皮膚。手術前後動物不給予抗生素，並以 X-光片軟片所改製之 Elizabethan collar 置於大鼠頸部 6 天，防止自殘現象。

免疫抑制劑劑量

合併使用 LEF 及 FK506，劑量分別為 LEF 10mg/kg/day；FK506 0.5mg/kg/day。

移植後周邊血液的細胞像變化

自移植後每週抽取血液，同時以抗 BN MHC I 抗體(OX-27, Serotec)及抗 CD4 (Phamingen) or 抗 CD8(Phamingen)抗體標定及螢光呈色後，於流式細胞計數儀計算移植後 BN 鼠 CD4 及 CD8 細胞在一週邊血液出現比率的變化。

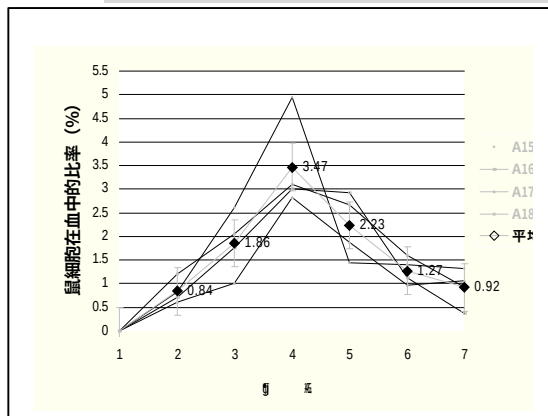
結果：

表一、移植後周邊血液出現 BN 淋巴球的比率

週數	淋巴出現的比率
一	0.84 %

二	1.84 %
三	3.47 %
四	2.23 %
五	1.27 %
六	0.92 %

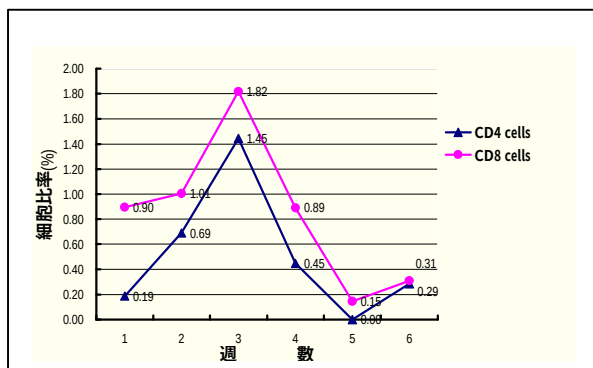
圖一、移植後周邊血液出現 BN 淋巴球的比率



表二、週邊血液中 BN 鼠來源淋巴球表面分子表現比率

週數	CD4 分子(%)	CD8 分子(%)
一	0.19	0.9
二	0.69	1.01
三	1.45	1.82
四	0.45	0.89
五	0	0.15
六	0.29	0.31

圖二、週邊血液中 BN 鼠來源淋巴球表面分子表現比率



討論

由本實驗得知，移植後一週內即可由 LEW 鼠週邊血液中發現 BN 鼠的淋巴球，這種現象叫做細胞交移 (cell chimerism)，但是比率極低，僅 0.84%；而在第三週時達到最高量，平均約 3.47%，但隨後即下降；第六週後，部分老鼠出現排斥現象，因此逐漸無法偵測到細胞交移現象（僅有 0.92%）；第八週後，因所有移植物均已發生排斥現象，因此無法偵測到細胞交移的現象。

由於本實驗中所採用之帶肌肉骨骼皮膚瓣移植模式中，移植了完整的脛腓骨，相當於將 BN 鼠的小部分骨髓（含完整的骨髓腔）移植至 LEW 鼠身上，因此該骨髓應具有不斷更新 BN 鼠血球細胞的能力；而由結果中亦證實該骨髓的確發揮應有的功能，在前幾週能不斷補充新生的 BN 鼠血球細胞至 LEW 鼠血液循環中，只是在第三週後，因某種因素（或許是即將發生排斥）使該骨髓失去功能或被抑制住，使得被送入 LEW 鼠血液中的 BN 鼠血球細胞減少。

一般而言，大鼠平常血液中的淋巴球以 T 淋巴球為主，而 T 淋巴球中表現 CD4 分子者佔約 50-60%，CD8 分子約 20-30%，但本實驗中發現，在移植後的早期（前二至三週），由移植物移動到接受者血液中的淋巴球以表現 CD8 分子者佔優勢，但在後半段 CD4 分子的比率即逐漸提升，此時細胞交移的情形也逐漸減少；就以往的文獻表示，CD8 分子為細胞毒殺性 T 細胞 (cytotoxic T cell) 主要的表現分子，是執行細胞免疫的重要角色，因此在移植前清除此類細胞時可能有助於移植物的存活；但有趣的是，部分研究也指出，具 CD8 分子的細胞可媒介一些特殊效應（如 veto phenomenon 等），有助於移植物的長期存活；因此本實驗中具 CD8 分子與 CD4 分子的細胞消長結果，我們初步判定此類具 CD8 分子細胞應與移植物的維持有關。

雖然許多研究中均提到產生細胞交移不一定能使接受者對移植物產生免疫耐受性，而產生免疫耐受性的接受者體內，也不一定有細胞交移的情形，但本實驗的結果似乎較支持「維持細胞交移有利於移植物的存活」。

計畫成果自評

1. 本實驗已使本實驗室研究人員熟悉流式細胞技術儀的操作，並能利用及分析細胞表面抗原螢光雙重染色的結果。
2. 藉由流式細胞計數儀的分析，可瞭解複合組織移植後移植物提供者 (donor) 來源的淋巴球所佔的比率，更可藉由細胞表面抗原的螢光複染色，瞭解不同淋巴球所佔的比率。

致謝

此實驗接受國科會補助研究經費 NSC 88-2314-B-002-269。

参考文献

1. 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.
2. Fukuzaki T, Hancock WW, Monaco AP, Maki T. Indefinite survival of skin allografts in adult thymectomized, antilymphocyte serum-treated mice given bone marrow and thymus grafts of donor origin: tolerance induction by donor bone marrow and thymus. *Transplantation* 1998;65(8):1036.
3. Hariharan S, Hunda R, Cavallo T, Demmy AM, Schroeder TJ, Alexander JW, First MR. Rescure therapy with tacrolimus after combined kidney/pancreas and isolated pancreas transplantation in patients with severe cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1996;61:1161.
4. 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 Proceedings* 1993; 25(1):658.
5. 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.
6. Leenaerts PL, Vandeputte M, Waer M. Determination of mixed chimerism by a simple flow cytometry method. *Journal of Immunological Methods* 1990;130:163.
7. Murase N, Starzl TE, Tanabe M, Fujisaki S, Miyazawa H, Ye Q, Delaney CP, Fung JJ, Demetris AJ. Variable chimerism, Graft-versus-host disease, and tolerance after different kinds of cell and whole organ transplantation from Lewis to brown Norway rats. *Transplantation* 1995; 60:158.
8. Naar JD, et al. Flow cytometric analysis of chimerism in the rat tolerant to a renal allograft. *Journal of Surgical Research* 1998; 77:179.
9. Okasha KM, Al-Tweigeri TA, Jurado AV, Shoker AS. Analysis of the relationship between chimerism and the allogeneic humoral response. *Transplantation* 1998;66(8):1028.
10. Min Z, Jones NF. Limb transplantation in rats: immunosuppression with FK-506. *Journal of Hand Surgery-American Volume* 1995; 20:77.
11. Pham SM et al. Perioperative donor bone marrow infusion augments chimerism in heart and lung transplant recipients. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1015.
12. 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

13. Terakura M, Murase N, Demetris AJ, YeQ, Thomson AW, Starzl TE.
Lymphoid/nonlymphoid compartmentalization of donor leukocyte chimerism in
rat recipients of heart allografts, with or without adjunct bone marrow.
Transplantation 1998;66(3): 350.
14. Yeh LS, Hou SM, Lin AC. Vascularized autogenous canine coccygeal bone
transfer. Microsurg. 1991;12:321.
15. Yeh LS, Hou SM, Lin AC, Lin J. A modified free gracilis flap in the rat.
Microsurg. 1994;15:322.