

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

合併使用 FK506 及 leflunomide 在大鼠肢體移植上的研究

Combination leflunomide and FK506 in rat limb allotransplantation

計畫編號：NSC 87-2313-B-002-095

執行期限：86 年 8 月 1 日至 87 年 7 月 31 日

主持人：葉力森 國立台灣大學獸醫學系

e-mail: lsyeh@ccms.ntu.edu.tw

中文摘要

肢體異體移植因為其組成組織之複雜及高抗原性，在免疫學上一直具有極高的難度。在我們較早的研究中，leflunomide (LEF) 合用環孢靈(cyclosporine, CsA) 已能有效控制不相容肢體之異體移植，且恢復理想之肢體功能。因為新一代的免疫抑制劑 FK506 有高於 cyclosporine 的藥效，有增加組織對抗缺氧的能力，而且常常能夠引發其它動物模式之免疫耐性出現，本研究中採用相同之動物組合，研究 leflunomide(LEF) 及 FK-506 的組合對於異體肢體移植之影響。Brown-Norway 大鼠之帶血管/皮膚/肌肉/骨骼瓣用於移植至 Lewis 大鼠身上。實驗組中接受者於手術前 1 日開始投與 LEF (10mg/kg/24hr/PO)，以及 FK-506 (0.1 or 0.5 mg/kg/24hr/SC)，或 CsA (Neoral, 5mg/kg/24hr/PO)。此免疫抑制治療持續至移植後 30 日或至肢體產生排斥反應為止。所有實驗組大鼠在投藥期間均存活，且沒有排斥及 GVHD 症狀出現。採用 FK-506 0.1 mg/kg 劑量處理之大鼠有 75% 於停藥後 20 日出現排斥現象，且經回復投藥無法逆轉。採用 FK-506 0.5 mg/kg 處理之動物，則於停藥後 100 日仍未出現排斥作用。於術後 30 日停藥後，所有 CsA 治療組動物多在二週內發生排斥。每一個實驗組在停藥後均沒有發生 GVHD。本研究目前顯示，以 LEF 及 FK-506 之組合，優於先前之 LEF 與 CsA 之組合，對於免疫抗原性特高之肢體組織，仍能成功引發組織耐性，這是以往文獻所不曾出現的現象，值得深入研究。

關鍵詞：肢體移植、排斥、移植物宿主病
Abstract

Whole limb allotransplantation presents a tremendous immunologic challenge due to the antigenicity of skin, muscle and bone marrow. In our previous study, leflunomide (LEF) combined with cyclosporine (CsA) prevented limb allograft rejection across a strong histocompatibility barrier. Using the same model, LEF plus FK506, a new immunosuppressant with higher efficiency than CsA, was administered to rats receiving vascularized osteo-myo-cutaneous allografts. Vascularized osteo-myo-cutaneous of rear limbs were transplanted from Brown-Norway to Lewis rat recipients. Recipients were administered LEF (10 mg/kg/24hr/PO) and FK506 (0.1 or 0.5 mg/kg/24hr/SC) or CsA (Neoral, 5mg/kg/24hr/PO) starting 1 days prior to surgery. Treatment continued for 30 days or until graft rejection. All treated allografts survived the 30 day period without signs of rejection and GVHD. In the group treated with FK506 0.1mg/kg, 75% recipients showed rejection 20 days after cessation of treatment. No rejection presented in those recipients treated with FK506 0.5mg/kg over 100 days after cessation of treatment. All recipients treated by CsA showed rejection within 2 week after cessation of treatment. According to the result of this research, combination of LEF and FK506 can induce immune tolerance in the high antigenetic limb transplantation. We never review similar report in other article.

Abstract: Osteo-myo-cutaneous transplantation, rejection, GVHD

計劃緣由及目的

長久以來,有肢體缺損的患者僅能藉由兩種方式來改善肢體的缺憾:裝置義肢(Prosthesis)與進行重建手術(Reconstruction);但義肢的功能有限,與正常組織的功能相距甚遠;而重建手術除了會對捐贈區組織造成損傷外,尚受限於組織區域的大小,且移植後外表的美觀與否仍是個值得考慮的問題;因此發展出一種更妥善的治療方法是很迫切需要的,而異體組織移植應是一個很適當的發展方向。

以往肢體移植的研究多以犬、兔及狒狒等做為實驗動物^(13,22,31),近年來因顯微手術的發達,再加上多種系內品種大鼠的組織相容性抗原(MHC)多已被標定出來,故目前的研究多改以大鼠作為實驗動物之模式;而不同品系之MHC抗原存在不同程度之差異,可作為研究異體移植之排斥反應與GVHD的參考,目前較常被使用做移植研究之高不相容性組合有ACI to WF, WF to LEW, ACI to LEW,及BN to LEW。

由於肢體移植所牽涉的組織相當多,包括皮膚、肌肉、神經、血管和骨骼等,功能相對的也很複雜;其中皮膚與肌肉是最容易引起排斥反應的組織,而骨髓常常是造成移植宿主病(Graft versus host, GVHD)的主要原因,故相較於其它組織或器官的移植,肢體移植需要使用更高劑量的免疫抑制劑,來維持移植體的存活;但提高免疫抑制劑的劑量後相對的也會使接受者暴露在病原感染、高血壓、肝腎失常以及惡性腫瘤的威脅之下,因此在權衡抑制免疫反應及藥物毒性的考量下,發展出一個有效而副作用小的治療排斥的方法是必須的。

使用免疫抑制劑是目前治療排斥最方便的方法;早期常使用的抗排斥藥如Azathioprine是一種抗代謝藥物,可干擾RNA的合成與功能;還有一些特殊的抗生素如mitomycin C與actinomycin等均曾被

用來治療排斥,但效果都不顯著,直至環孢靈(cyclosporine, CsA)被發展出來,能成功地運用在腎臟、肝臟、小腸及皮膚等器官或組織的移植上,使移植體能長期存活^(27,30,32),才使治療排斥的方法有較大的進展,但單獨使用於肢體移植的抗排斥作用仍無法令人滿意^(11,12,21)。

FK506是由黴菌*Streptomyces tsukubaensis*所分離出之macrolide antibiotic,其作用機制與CsA相似,但效果是CsA的10-100倍,而毒性卻明顯較小;曾有報告指出其對大鼠之小腸異體移植特別有效,在骨髓移植時亦能有效治療GVHD,在心臟移植也有不錯的抗排斥效果⁽³³⁾,甚至在腎臟與胰臟同時移植的病患,無法有效以CsA控制排斥反應時,可以FK506來逆轉初期的排斥反應⁽¹⁹⁾;而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)能成功的使移植體存活近300天,沒有出現排斥反應,甚至能逆轉早期之排斥反應^(7,10,28)。另在94年及95年的報告指出,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投予FK506,可加速受損的神經恢復功能⁽²⁶⁾。

Leflunomide(LEF)是最近新發展出的免疫抑制劑,在大鼠的動物模式中,能有效的抑制或逆轉腎臟、心臟、小腸甚至皮膚的異體排斥作用以及GVHD^(16,23),而在hamster到大鼠的異種心臟移植中,他亦能延長心臟的存活;在DA × LEW的心臟移植模式中,LEF(10mg/kg)的抗排斥效果被評估與CsA(15mg/kg)、FK506(1mg/kg)相同⁽³³⁾。

在以藥物控制移植的排斥問題之下,尚須注意的是該免疫抑制劑所帶來的副作用;CsA雖然有不錯的免疫抑制效果,但卻具有極高的副作用,包括肝毒性、腎毒性及神經毒性等,故在臨床運用上需要特別小心;FK506之副作用較CsA輕微,然而在大鼠模式的移植研究中,FK506的有效劑量多數均在0.5-1mg/kg以上⁽²⁵⁾,甚

至有人使用10mg/kg以上的劑量做單一一次的給藥⁽²⁴⁾；在大鼠模式的研究上，這樣高的劑量雖然沒有被特別指出會導致副作用，但卻不適宜使用在人或其他動物身上。故如何在有效的範圍內降低免疫抑制劑的使用劑量，以減少副作用產生，是目前最重要的課題。

本研究室在先前的研究中，併用低劑量的LEF(10mg/kg/day)與CsA(5mg/kg/day)有效的控制肢體異體移植的排斥反應，使移植存活60天以上，沒有出現任何排斥現象及副作用，肢體功能恢復情形也很好，表示LEF與CsA的合用具有良好的加成效果；因FK506之作用機制與CsA相似，但副作用較小且免疫抑制的效果較CsA好，故本實驗擬在不考慮肢體功能恢復的情形下，利用新發展的帶血管/肌肉/骨骼/皮膚瓣移植模式，以併用低劑量之FK506與LEF來控制移植後所產生之排斥反應，一方面可使兩種作用機制不同的免疫抑制劑效果加乘，另一方面可使副作用降低。

材料與方法

本實驗以公的Brown Norway(BN, RT1ⁿ)及Lewis(LEW, RT1^l)分別當作複合組織提供者及接受者，兩種大鼠的組織相容性抗原(Major histocompatibility complex)存在極大的差異。自移植前1天起，每隻被移植的大鼠都投予LEF 10 mg/kg/24hrs/PO，同時也投予FK506 0.5 mg/kg/24hrs/SC or 0.1 mg/kg/24hrs/SC或Neoral 5mg/kg/24hrs/PO，至移植後30天停止給藥，觀察移植植物是否有發生排斥或移植植物抗宿主病。

複合組織的移植是依本實驗室新發展出來的移植模式。BN鼠先以4% halothan伴隨N₂O作引導，再以腹腔注射Sodium pentobarbital麻醉，劑量65mg/kg，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。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。在皮膚剝開面剪掉部分肌肉，內側沿著隱動、靜脈後緣將薄肌與半腱狀肌剪開；外側則將皮膚未附著之二頭股肌全部剝除，肌肉僅留腓腸肌及伸屈指肌附著於脛骨上，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，使移植植物上僅剩完整的脛、腓骨、腓腸肌、伸屈指肌、股動、靜脈及其延伸的血管與附著在移植植物上的皮膚；此時移植植物之剝離已完成，移植植物僅以股動、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，即可截取移植植物。移植植物取下後，組織捐贈者以過量之Sodium pentobarbital做心臟注射，行安樂死。

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，再將皮膚延隱靜脈向下剪至踝關節處，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，結紮點儘量靠近上腹靜脈與隱靜脈的分叉點，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植物固定在內側肌肉上，進行移植植物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。

移植後以觀察所移植組織的皮膚為準，若發現皮膚紅腫，為排斥（急性）的起始；若皮膚開始壞死，則計為排斥的終點。停藥後若發現下痢及體重下降

超過15%則判定為GVHD，若發現皮膚、分泌物及掉毛則判定為發生排斥(慢性)。若停藥後100天(即移植後130天)，如無發生排斥現象，則判定接受者對該移植物產生耐受性。

結果

所有的移植物接受者及被移植的複合組織於移植後均供存活下來，手術操作時間約需 2.5 至 4 小時，而移植物缺血時間大約是 60 至 90 分鐘；在移植後 2 至 5 天期間，移植物會出現水腫現象，之後即漸漸消腫；移植後接受者體重會下降約 10%至 15%，但 10 天後體重即會漸漸回升。

投藥期間，各個實驗組的接受者及被移植的複合組織全部存活，沒有任何排斥及 GVHD 的症狀出現，被移植的複合組織皮膚也逐漸長出新的毛髮。停藥後所有被移植的老鼠都沒有發生 GVHD，而同時投予 LEF 及 Neoral(5mg/kg/24hrs/PO)的大鼠分別於 30,18,6,15 及 10 天(平均 15.8 天)出現皮膚及掉毛的現象，經移植另一 BN 鼠的皮膚血管瓣後，證實發生排斥反應；同時投予 LEF 及 FK506 (0.1mg/kg/24hrs/SC)的大鼠則分別在停藥後 22,17,19 及 94 天(平均 38 天)發生排斥現象；發生排斥現象的大鼠，再恢復給予免疫抑制劑治療或甚至將 FK506 的劑量提高至 0.5mg/kg/ 24hrs/SC 連續給予 7 天後，仍無法逆轉其排斥的症狀。而同時投予 LEF 及 FK506 (0.5mg/kg/ 24hrs/SC)的大鼠在停藥後 100 天仍未出現任何排斥現象，移植物皮毛完好且組織柔軟。

討論

本研究室在先前的肢體移植研究中，併用低劑量的 LEF(10mg/kg/day)與 CsA(5mg/kg/day)連續投藥 60 天，能有效的控制肢體異體移植的排斥反應，而且沒有任何副作用，肢體功能恢復情形也很好，表示 LEF 與 CsA 的合用具有良好的加成果效；但可惜的是在停藥後一週內，實驗的大鼠均會發生 GVHD，雖然這種

GVHD 的症狀能很輕易的被一個劑量的免疫抑制劑給逆轉，但接著而來的卻發生排斥反應。

為解決停藥後產生 GVHD 及排斥的問題，我們選擇作用機制與 CsA 相似但效果較其強 10 至 100 倍的 FK506 來與 LEF 搭配使用。另外因以往使用的大鼠肢體移植模式手術過程非常耗費時間(約需 4.5 至 6.5 小時)，對實驗大鼠的傷害與緊迫也相當大，因此我們將研究方向暫時著重在移植後排斥反應與 GVHD 的預防上，先不管肢體的功能恢復情形，因而發展出本實驗用的帶血管/肌肉/骨骼/皮膚瓣移植模式，此種模式相較於肢體移植模式有許多優點；其操作時間僅需 2.5 至 4 小時，較原肢體移植模式節省 2 小時，移植物缺血時間也較其縮短 0.5 至 1 小時，因為本模式僅切開接受者後肢內側的皮膚及縫合血管，故對其接受者的傷害較小，緊迫相對也降低很多。

本實驗中，併用 Neoral(CsA 的新劑型)與 LEF 的結果與以往肢體移植模式的結果相近似，移植物會在停藥後二週左右發生排斥，不同的是投藥時間僅有 30 天，而且停藥後並未出現 GVHD 的症狀；雖然肢體移植模式中出現的 GVHD 不會像骨髓移植中出現 GVHD 的一樣具有致命性，但研究肢體移植後產生的 GVHD 仍是一個重要而有趣的課題。

LEF 與 FK506 併用的效果確實優於與 Neoral 併用的效果，FK506 只要使用 Neoral 五十分之一的量(0.1 mg/kg/24hrs)即能使移 1 植物存活時間延長(n=4)，其中有一隻還是在停藥後 94 天才有排斥症狀產生；另一實驗組將 FK506 的劑量提高到 0.5 mg/kg/24hrs 後，所有移植物(n=3)在停藥後 100 天仍沒有出現任何排斥症狀及 GVHD；雖然 100 天後它們也陸續出現了排斥現象(皮膚、掉毛)，但對複合組織或真正的肢體移植應該是一個很大的鼓勵，未來在本移植模式下，針對停藥後未發生排斥的期間深入探討體內的免疫相關機制應是一個重要的研究課題。

参考文献

1. Arai K, Hotokebuchi T, Miyahara H, et al. Limb allografts in rats immunosuppressed with FK506. *Transplantation* 1989; 48:782.
2. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, perineal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989; 83:129.
3. Black KS, Hewitt CW, Fraser LA, et al. Composite tissue (limb) allografts in rats. *Transplantation* 1985; 39:365
4. Black KS, Hewitt CW, Grisham GR. Two new composite tissue allograft models in rats to study neuromuscular functional return. *Transplant Proc* 1987; 19:118
5. 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.
6. Buelow R, Veyron P, Clayberger C, Pouletty P, Tourain JL. Prolongation of skin allograft survival in mice following administration of allotrap. *Transplantation* 1995; 59:455.
7. 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.
8. Doi K, Desantis G, Singer DI, et al. The effect of immunosuppression on vascularized allografts. *J Bone Joint Surg* 1989; 71-B:576.
9. D'Silva M, Candinas D, Achilleos O, Lee S, Antoniou E, DeRoover A, Germenis A, Stavropoulos C, Buckels J, Mayer D, McMaster P. The immunomodulatory effect of leflunomide in rat cardiac allotransplantation. *Transplantation* 1995; 60:430.
10. 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.
11. Fritz W, Swartz WM, Rose S, Futrell JW, Klein E. Limb allografts in rats immunosuppressed with cyclosporin A. *Ann Surg* 1984;199:211.
12. Furnas DW, Black KS, Hewitt CW, Fraser LA, Achauer BM. Cyclosporine and long-term survival of composite tissue allografts (limb transplants) in rats. 1983; 15:3063.
13. Goldwyn RM, Beach PM, Feldman D, et al. Canine limb homotransplantation. *Plast. Reconstr Surg* 1966; 47:184.
14. Gruber SA, Canafax DM, Cipolle RJ, et al. Local immunosuppression of the vascularized graft. *Surgery* 1990; 107:209
15. Guzman-Stein G, Shons AR. Composite grafts, intestine, and neurological tissue. *Transplant Proc* 1987; 19:1115
16. He G, McAlister VC, Lee TDG et al. Oral leflunomide prevents small bowel allograft rejection in the rat. *Transplant Proc*. 1994; 26:1613.
17. Hewitt CW, Black KS, Fraser LA, et al. Composite tissue (limb) allografts in rats I. dose-dependent increase in survival with cyclosporine. *Transplantation* 1985; 39:360.
18. Hewitt CW, Black KS, Dowdy SF, et al. Composite tissue (limb) allografts in rats III. *Transplantation* 1986; 41:39
19. 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.
20. Inceglu S, Siemionow M, Chick L, Craven CM, Lister GD. The effect of combined immuno-suppression with

- systemic low-dose cyclosporin and topical fluocinolone acetonide on the survival of rat hind-limb allografts. *Ann Plast Surg* 1994;33:57
21. Kim SK, Aziz S, Oyer P, Hentz VR. Use of cyclosporin A in allotransplantation of rat limbs. *Ann Plast surg* 1984; 12:249.
 22. Kniha H, Randzio J, Gold ME, et al. Growth of forelimb allografts in young rabbits immunosuppressed with cyclosporine. *Ann Plast Surg* 1989; 22:135
 23. Kuchle CCA, Thoenes GH, Langer KH, Schorlemmer HU, Bartlett RR, Schleyerbach R. Prevention of kidney and skin graft rejection in rats by leflunomide, a new immunomodulation agent. *Transplant Proc* 1991; 23:1083.
 24. Kuroki H, Ikuta Y, Akiyama M. Experimental studies of vascularized allogeneic limb transplantation in the rat using a new immunosuppressive agent, FK-506; morphological and immunological analysis. *Transplant Proc* 1989; 21:3187.
 25. Kuroki H, Bean MA, Ikuta Y, Akiyama M, Surgess EM. Effect of FK 506 and donor-specific blood transfusion on the rat composite tissue limb allograft and the mechanism of long-term graft survival. *Transplant Proc* 1993; 25:658.
 26. 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. *Transplant Pro* 1995 ; 27:348
 27. Lee KKW, Schraut WH. Structure and function of orthotopic small Bowel allografts in rats treated with cyclosporine. *Am J Surg* 1986; 151:55
 28. Min Z, Jones NF. Limb transplantation in rats: immunosuppression with FK-506. *Journal of Hand Surgery-American Volume* 1995; 20:77.
 29. Salyer KE, Kyger DR. Studies in rats of survival of composite homotransplants of skin and subcutaneous tissue, with microvascular anastomoses. *Plast Resonstr Surg* 1973; 51:672.
 30. Sobrado L, Pollak R, Robichaux WH, Martin PC, Sullivan KA, Swartz WM. The survival and nature of the immune response to soft-tissue and composite-tissue allografts in rats treated with low-dose cyclosporine. *Transplantation* 1990;50:381
 31. Stark GB, Swartz WM, Narayanan K, Moller AR. Hand transplantation in baboons. *Transplant Proc* 1987;19:3968.
 32. Tan CM, Yaremchuk MJ, Randolph MA, Lee WPA, Burdick J, Weiland AJ. Vascularized muscle allografts and the role of cyclosporine. *Plast Reconstr Surg* 1991;87:412
 33. 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