

# 新西兰雌-雄兔皮肤移植模型体内细胞毒性实验\*★

梁伟潮, 蒋泽生, 汪燕, 钟利民, 潘明新

## Cytotoxicity assay of New Zealand female-male rabbit skin graft models *in vivo*

Liang Wei-chao, Jiang Ze-sheng, Wang Yan, Zhong Li-min, Pan Ming-xin

### Abstract

**BACKGROUND:** The establishment of an effective assessment model for monitoring post-transplant recipient's immune status is the difficulty in current researches.

**OBJECTIVE:** To establish an *in vivo* method of cytotoxicity assay in rabbits; to verify whether the *in vivo* cytotoxicity assay can detect the immune status of the recipient rabbits.

**METHODS:** New Zealand female-male rabbit skin graft models were established; the untransplanted female and male rabbits served as control. The spleens of both female and male rabbits were removed to prepare single cell suspension; and then live cell dye hydroxyfluorescein diacetate succinimidyl ester of different concentrations were added to stain and prepare for the 1:1 mixed cell suspension. Peripheral blood samples of the male rabbits were collected at 1, 2, 3 and 8 hours after the infusion of the mixed cell suspension. Flow cytometry was used to detect the ratio of the two kinds of fluorescytes in the peripheral blood; the killing rate of specific cells in the donors was calculated.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The female-male rabbit model of skin graft rejection was established in the 2<sup>nd</sup> week after skin transplantaion. The ratio changes in the peripheral blood of model group and control group were different after the infusion of mixed cell suspension; the killing rate in the male rabbits of the model group was significantly higher than that of the control group at 1, 2, 4 and 8 hours after infusion ( $P < 0.01$ ). These findings indicate that cytotoxicity assay *in vivo* can be used to monitor immune state; it can directly reflect the specific immune environment *in vivo* of the skin graft models and the intensity of the immune attack that the graft suffered.

Liang WC, Jiang ZS, Wang Y, Zhong LM, Pan MX. Cytotoxicity assay of New Zealand female-male rabbit skin graft models *in vivo*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(2): 809-812.  
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 建立一种有效的评估模式来监测移植后受者免疫状态是当前的难点。

**目的:** 建立兔体内细胞毒性实验方法, 验证体内细胞毒性实验能否检测出受体的免疫排斥状况。

**方法:** 建立新西兰白兔雌-雄兔皮肤移植模型, 另设未作移植的雌、雄兔为对照组。取雌兔及雄兔脾脏制备脾细胞单细胞悬液, 分别用不同浓度活细胞染料羟基荧光素乙酰琥珀酰亚胺酯染色后制备 1:1 混合细胞悬液。雄兔输注混合细胞后分别于 1, 2, 4, 8 h 抽取外周血, 流式细胞仪检测外周血两种荧光细胞的比例变化, 计算供体特异性细胞杀伤率。

**结果与结论:** 雌-雄兔皮肤移植排斥模型在皮肤移植 2 周后可建立, 混合细胞悬液输注后在模型组和对照组外周血中的比例变化不同, 雄兔输注混合细胞后 1, 2, 4, 8 h 的杀伤率模型组高于对照组, 差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。提示体内细胞毒性实验可用于免疫状态监测, 可以直观地反映皮肤移植模型的体内特异性免疫环境及移植植物所受的免疫攻击强度。

**关键词:** 细胞毒性实验; 移植排斥; 免疫监测; 流式细胞术; 皮肤移植

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.05.012

梁伟潮, 蒋泽生, 汪燕, 钟利民, 潘明新. 新西兰雌-雄兔皮肤移植模型体内细胞毒性实验[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(2): 809-812. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Second Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 515282, Guangdong Province, China

Liang Wei-chao★, Master, Attending physician, Second Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China lwchg@qq.com

Correspondence to: Pan Ming-xin, Professor, Second Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 515282, Guangdong Province, China pmxwy@sohu.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30972825\*

Received: 2011-07-04 Accepted: 2011-10-24

## 0 引言

器官移植后受者免疫状态的监测评估是国内外研究的热点, 可靠的免疫状态监测指标可以为免疫抑制剂的使用提供依据, 使免疫抑制剂可根据排斥反应的程度或耐受情况个体化使用。

本文在供体抗原特异性免疫状态体内定量检测初步研究的基础上<sup>[1]</sup>, 进行兔体内细胞毒性实验, 评价体内细胞毒性实验在移植模型的免疫状态定量检测中的作用, 建立稳定的检测方法。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 于2010-09/2011-04在南方医科大学再生医学研究所完成。

**材料:** 健康、清洁级雌、雄新西兰白兔各10只, 4~6月龄, 体质量2.3~2.6 kg, 购自南方医科大学实验动物中心, 许可证号: SCXK粤2006-0015。实验过程中对动物处置方法符合动物伦理要求<sup>[2]</sup>。

**主要设备及试剂:** 电子分析天平(ER120A), 台式高速离心机(TDL-50B), 恒温水箱(Grant),

南方医科大学附  
属珠江医院肝胆  
二科, 广东省广州  
市 515282

梁伟潮★, 男,  
1979年生, 广东  
省佛山市人, 汉  
族, 2003年中山  
大学毕业, 硕士,  
主治医师, 主要  
从事移植免疫研究。  
lwchng@qq.com

通讯作者: 潘明  
新, 教授, 南方医  
科大学附属珠江  
医院肝胆二科, 广  
东省广州市  
515282  
pmxwxy@  
sohu.com

中图分类号:R617  
文献标识码:A  
文章编号:1673-8225  
(2012)05-00809-04

收稿日期: 2011-07-04  
修回日期: 2011-10-24  
(20110602017/G-LX)

CFDA-SE Cell Tracer Kit(Molecularprobes公  
司), 0.5%锥虫蓝溶液(广州化学试剂厂), 二甲  
亚砷(DMSO)(Sigma)。

**方法:**

**建立新西兰雌-雄兔皮肤移植排斥模型<sup>[3-5]</sup>:** 按  
随机数字表法取雌性新西兰白兔5只(供体), 雄  
性新西兰白兔5只(受体), 雌雄兔配对, 于每只  
雌兔背部剪下约4 cm×2 cm的皮肤一块, 于雄  
兔背部移植雌兔皮肤, 并用3/0无创伤缝线固定  
皮缘, 移植后2周, 移植皮肤完全脱落, 雌-雄  
兔皮肤移植模型建立。另取雌性新西兰白兔5  
只, 雄性新西兰白兔5只, 雌雄兔配对, 作为对  
照组。

**羟基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯**  
(carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester,  
CFDA-SE, 也简称为CFSE)染色: ①戊巴比妥静  
脉麻醉兔, 取出兔脾脏放入Hank's液中, 200  
目不锈钢网研磨法制备脾细胞悬液, 7.5 g/L氯  
化铵裂解红细胞, 0.01 mol/L PBS稀释制备脾细  
胞单细胞悬液。②将10 mmol/L CFSE的二甲  
亚砷溶液以PBS 1:50倍稀释后得200 μmol/L  
CFSE 工作液, 取一定量工作液加入上述脾细  
胞悬液中, 雌性脾细胞用0.3 μm CFSE染色,  
雄性脾细胞用高浓度6 μm CFSE染色。每对雌、  
雄兔脾细胞悬液混合, 制备1:1混合细胞悬液。  
③细胞活力检测。适量细胞混合悬液稀释后,  
取1滴稀释液和1滴0.5%锥虫蓝溶液混合, 静置  
3 min, 加至细胞计数板, 倒置显微镜下观察,  
活细胞不着色, 死细胞核成蓝色, 计数活细胞  
和死细胞数量, 按下式计算百分比, 活细胞比  
例达95%以上。

$$\text{细胞存活率} = \frac{0.5\% \text{锥虫蓝染色阴性细胞}}{100 \text{个细胞/HP} \times 100}$$

**细胞输注:** 于模型组、对照组雄兔耳缘静脉  
静脉输注细胞悬液5 mL, 注射混合细胞总数为  
5×10<sup>9</sup>个左右。

**标本及流式细胞学分析:** 输注混合细胞悬液前  
及输注后1, 2, 4, 8 h于雄兔耳缘静脉取血,  
每次约200 μL。将200 μL血放入5 mL试管, 用  
2 mL氯化铵液在室温下溶解红细胞, 约5 min,  
离心后用3.0~4.0 mL冷BPS清洗, 离心(约  
1 500 r/min), 5 min, 洗3次。每次用吸管将上清  
吸出。将处理完成的细胞悬液上流式细胞仪检测。

**杀伤率计算:** 注射细胞比例为1:1时, 特异  
性杀伤率(R)=1-donor cells/recipient cells×  
100%。

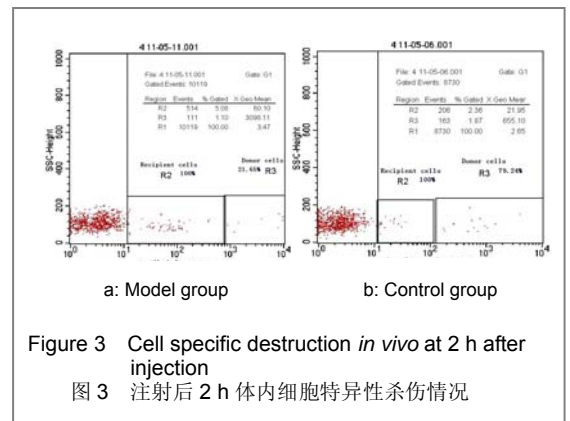
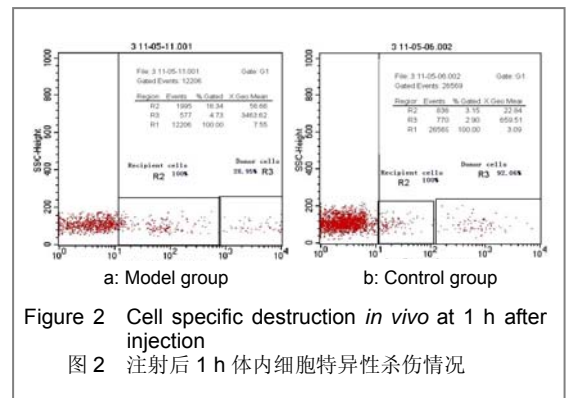
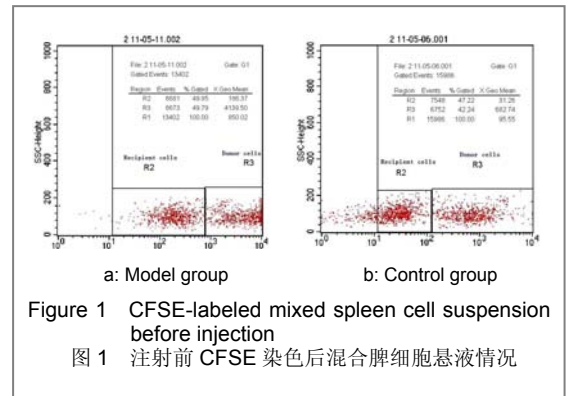
**统计学分析:** 应用SPSS 13.0软件进行统  
计学分析, 所有数据示为 $\bar{x} \pm s$ , 组间杀伤率比较  
用t 检验, P < 0.05认为差异有显著性意义。

**2 结果**

**2.1 实验动物数量分析** 模型组及对照组新  
西兰白兔各10只, 每组分别5对雌、雄兔。全部  
进入结果分析, 无脱失。

**2.2 皮肤移植模型观察结果** 皮肤移植后  
15 d, 移植皮肤完全脱落, 雌-雄兔皮肤移植排  
斥模型建立, 皮肤病理证实。

**2.3 流式细胞学分析结果** 两组的杀伤率情  
况见图1~6及表1。



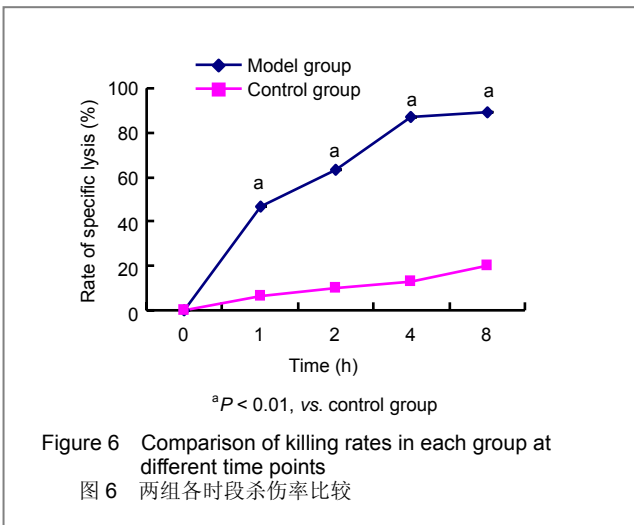
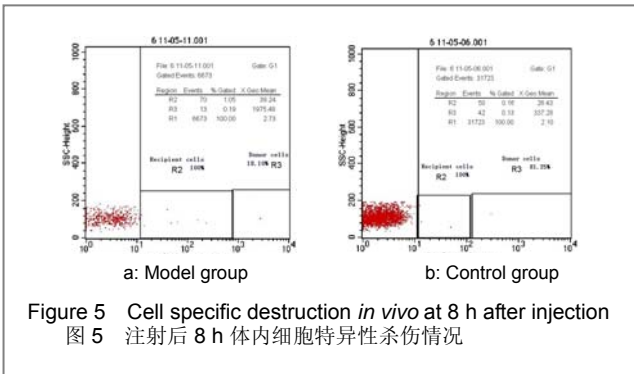
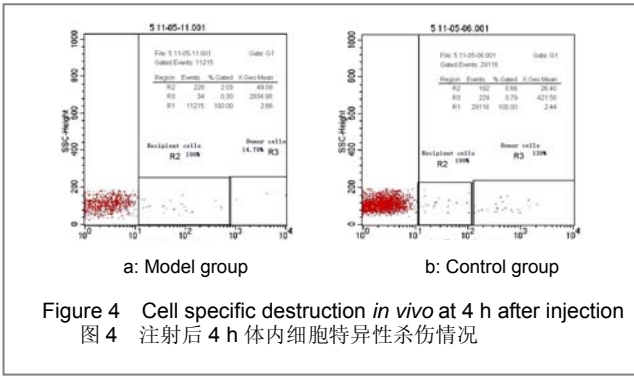


表 1 两组各时段杀伤率比较  
Table 1 Killing rate in each group at different time points ( $\bar{x} \pm s, n=5, \%$ )

Group	1 h	2 h	4 h	8 h
Model	49.9±15.2	63.2±13.9	86.9±11.5	89.4±9.2
Control	6.2±1.8	10.1±2.6	13.2±2.8	19.8±2.4
<i>t</i>	4.530	7.435	8.537	7.968
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

结果显示, CFSE染色后的混合细胞在输注前各为 49.85%及49.79%, 移植模型组供体雌兔脾细胞在输注后 1 h剩4.73%, 在2~4 h后剩0.30%, 8 h后基本清除。而同基因的雄兔脾细胞同对照组一样缓慢下降。对照组同基因细胞在开始1 h下降较快的原因可能与细胞经过

机械处理破坏有关。流式结果能直观反映出排斥反应全过程, 同基因内参照的设置使检测结果更具有可比性。

按杀伤率计算公式计算两组的杀伤率见表1。两组杀伤率折线图表明模型组与对照组输注混合细胞后1, 2, 4, 8 h特异性杀伤率差异有显著性意义( $t=4.533, 7.435, 8.537, 7.968, P$ 均< 0.01)。输注后1, 2 h模型组杀伤率高达(46.9±15.2)%, (63.2±13.9)%, 选择这一时间点可以准确判定两组白兔所处的免疫状态, 且能满足临床要求的快速检测的目的。

### 3 讨论

器官移植需应用免疫抑制治疗, 理想的免疫抑制治疗需在免疫抑制和保持免疫力间取得平衡。免疫抑制剂的用量需根据受体免疫状态的监测来决定。体外细胞毒性细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)活性测试是评价机体的细胞免疫水平的一种常用指标<sup>[6-10]</sup>。CD8<sup>+</sup>CTL细胞是移植排斥免疫反应的中心环节。近年CD8<sup>+</sup>CTL细胞毒性一般用<sup>51</sup>Cr释放实验检测, 但<sup>51</sup>Cr实验有很多缺陷, 包括自发性释放率高, <sup>51</sup>Cr对效应细胞污染,  $\gamma$ 射线放射性危险<sup>[11-14]</sup>。目前常用受体免疫状态的监测方式还有: ①ELISA法检测血清可溶性HLA-抗原水平<sup>[15-16]</sup>、②固相酶联免疫斑点实验(ELISPOT), ELISPOT通过检测抗原诱导的细胞因子(如 $\gamma$ -干扰素)的分泌可体外定量测定患者外周血单个核细胞中抗原特异性T细胞反应<sup>[17]</sup>。③液相芯片技术, 可用于核酸分析, 受体和配体识别分析等研究<sup>[18]</sup>。④分子生物学技术, 通过检测移植体内mRNA, 免疫指标在诊断中的价值受到关注。⑤流式细胞仪技术。利用CD3、CD4和细胞内Th1及Th2多重染色, 应用流式细胞仪技术监测, 急性排斥反应中T细胞CD69表达, Th1细胞增加, Th2细胞减少, Th1/Th2失衡<sup>[19-20]</sup>。但由于免疫反应的复杂性, 依靠上述单一免疫指标来评估机体的免疫状态不太现实, 均有其局限性, 需多种免疫指标监测方法来评估机体的免疫状态<sup>[21-23]</sup>。体外CTL活性测试基于MHC- I +Ag-CTL限制性杀伤理论。目的只是想了解CTL的特异性细胞毒性, 而不是全面反映机体免疫状态。实际上体内的细胞特异性杀伤机制要复杂得多, 且测试影响因素多, 结果受抗原携带的量、体外处理过程影响。

由于动物模型的应用, 为直接体内评估细胞毒性提供了可能, 这样可以避免体外操作所带来的误差, 也能更真实的反映CTL对抗原的攻击。本实验中, 雌-雄新西兰白兔皮肤移植模型输注CFSE标记的混合细胞悬液后对低浓度染色的供体脾细胞显著杀伤, 杀伤率模型组与对照组有显著差异。实验结果表明CFSE作为体内细胞毒性实验荧光染料的具有优越性<sup>[24-26]</sup>: ①不需要抗体为非特异染色; 流式细胞检测的细胞染色常用带有一定

荧光的单抗标记细胞膜抗体来区分细胞, CFSE非特异性与细胞内蛋白结合染色效率高。②能染色所有动物细胞, 应用广泛, 扩大了体内细胞毒性实验的检测范围。③染色过程简单易于操作与掌握, 对实验室条件要求不高, 便于临床应用。④细胞毒性低, 对细胞活性没有影响; 本实验结果显示在一定浓度范围内CFSE对细胞活性没有影响。⑤不容易泄漏, 染的细胞在体内能存活8 h, 能保持高亮度及细胞膜完整性, 而膜抗体染色的荧光容易随着抗体脱落; 两种浓度能完全区分开, 说明染料没有交叉污染细胞, 也说明不容易泄漏。⑥注射细胞后无白兔因为注射荧光染色细胞而死亡, 说明其有一定的生物安全性。

在杀伤率监测方面, 实验结果表明模型建立后注射混合细胞悬液后1 h杀伤率已有差异, 但标准差相对较大, 2~4 h进行流式细胞检测外周血荧光染色阳性细胞为最佳时机, 皮肤移植致敏组和正常对照组杀伤率差异有显著性意义, 2 h检测时间也能满足临床对时间的要求, 因此该方法是一种快速的免疫状态检测方法。

本实验检测靶细胞为供体来源细胞(脾细胞、外周血单个核细胞等), 抗原性与移植物相同, 容易获得, 为复合抗原。内参照细胞为受体来源自身细胞, 不仅控制了实验偶然误差而且减少了系统误差<sup>[27-28]</sup>。雌-雄兔脾细胞在获取、处理及体内所处的免疫环境全部过程始终相同, 最大可能地消除了由于操作及体内外非特异性误差。通过荧光标记流式细胞检测, 准确到单个细胞水平了解受体供体细胞受免疫攻击情况, 可以直观地反映皮肤移植兔的体内特异性免疫环境及移植物反受的免疫攻击强度。因脾细胞悬液集中在淋巴细胞所在的小细胞区, 体内细胞毒性实验有望应用供体外周血淋巴细胞作为监测细胞应用于人的免疫状态的监测, 极具潜力。

#### 4 参考文献

[1] Jiang ZS, Gao Y. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(31):5782-5785. 蒋泽生, 高毅. 供体特异性体内免疫状态的定量检测[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(31):5782-5785.

[2] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.

[3] Chai CK. The effect of inbreeding in rabbits. skin transplantation. Transplantation. 1968; 6(5): 689-693.

[4] Matej H. Hemagglutinating antibodies after skin transplantation in rabbits. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1968;16(5):757-772.

[5] Feng JH, Sun WB, Luo JM, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(31):5758-5762. 冯继红, 孙万邦, 罗军敏, 等. 重组人白细胞介素10抗家兔同种异体皮肤移植排斥模型的建立[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(31):5758-5762.

[6] Uchida T. Development of a cytotoxic T-lymphocyte-based, broadly protective influenza vaccine. Microbiol Immunol. 2011; 55(1): 19-27.

[7] Egilmez NK, Kilinc MO. Tumor-resident CD8+ T-cell: the critical catalyst in IL-12-mediated reversal of tumor immune suppression. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2010; 58(6): 399-405.

[8] Oykhman P, Mody CH. Direct microbicidal activity of cytotoxic T-lymphocytes. J Biomed Biotechnol. 2010; 2010: 249482

[9] Gill D, Tan PH. Induction of pathogenic cytotoxic T lymphocyte tolerance by dendritic cells: a novel therapeutic target. Expert Opin Ther Targets. 2010;14(8):797-824.

[10] Afonina IS, Cullen SP, Martin SJ. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. Immunol Rev. 2010; 235(1):105-116.

[11] Ramos AR, Matte U, Goldani HA, et al. Intestinal permeability assessed by 51Cr-EDTA in rats with CCl4 - induced cirrhosis. Arq Gastroenterol. 2010;47(2):188-192.

[12] Fu X, Tao L, Rivera A, et al. A simple and sensitive method for measuring tumor-specific T cell cytotoxicity J. PLoS One. 2010; 5(7):e11867.

[13] Gutte H, Møller ML, Pfeifer AK, et al. Estimating GFR in children with 99mTc-DTPA renography: a comparison with single-sample 51Cr-EDTA clearance. Clin Physiol Funct Imaging. 2010;30(3): 169-174.

[14] Krog J, Tønnesen EK, Jepsen CF, et al. Natural killer cells as biomarkers of hyperbaric stress during a dry heliox saturation dive. Aviat Space Environ Med. 2010;81(5):467-474.

[15] Tait BD. Solid phase assays for HLA antibody detection in clinical transplantation. Curr Opin Immunol. 2009;21(5):573-577.

[16] Huang SY, Chiang CH, Chen FP, et al. The alteration of placental-derived soluble MHC class I chain-related protein A and B during pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand. 2011;90(7): 802-807.

[17] Ewen CL, Rong J, Kokaji AI, et al. Evaluating antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses by a novel mouse granzyme B ELISPOT assay. Immunol Methods. 2006 308(1-2):156-166.

[18] Jacobson JW, Dunbar SA. Instrumentation and analytical methods. MLO Med Lab Obs. 2006;38(8):20, 22-23.

[19] Amirzargar A, Lessanpezesheki M, Fathi A, et al. TH1/TH2 cytokine analysis in Iranian renal transplant recipients. Transplant Proc. 2005;37(7):2985-2987.

[20] Tung TH, Mohanakumar T, Mackinnon SE. TH1/TH2 cytokine profile of the immune response in limb component transplantation. Plast Reconstr Surg. 2005;116(2):557-566.

[21] Alakulppi NS, Kyllonen LE, Partanen J, et al. Diagnosis of acute renal allograft rejection by analyzing whole blood mRNA expression of lymphocyte marker molecules. Transplantation. 2007;83(6):791-798.

[22] Hu WM, Zhang ZD, Han FH, et al. The experimental research on the perforin and granzyme B expressions to the early diagnostic value of acute rejection response after pancreatic transplantation. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2007;38(1):88-92.

[23] Veale JL, Liang LW, Zhang Q, et al. Noninvasive diagnosis of cellular and antibody mediated rejection by perforin and granzyme B in renal allografts. Hum Immunol. 2006;67(10):777-786.

[24] Becker HM, Chen M, Hay JB, et al. Tracking of leukocyte recruitment into tissues of mice by in situ labeling of blood cells with the fluorescent dye CFDA SE. J Immunol Methods. 2004; 286(1-2):69-78.

[25] Wang XQ, Duan XM, Liu LH, et al. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2005;37(6):379-385.

[26] Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, et al. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. Circulation. 2003;107:2290.

[27] Hong JM, Li QM. Guangxi Yixue. 2009;38(8):1070-1072. 洪介民, 黎庆梅. 内参照细胞在流式细胞术中应用的研究[J]. 广西医学, 2009, 38(8):1070-1072.

[28] Wang JZ. Zhonghua Jianyan Yixue Zazhi. 2003;26(1):5-7. 王建中. 加强临床流式细胞免疫表型分析的质量控制[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(1):5-7.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金声明:** 国家自然科学基金资助项目(30972825)“供体抗原特异性体内免疫状态体内定量检测的基础研究”。

**作者贡献:** 实验设计者为梁伟潮、潘明新、蒋泽生, 实施者为梁伟潮、钟利民, 评估者为汪燕, 所有作者均经过正规培训。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验过程中对动物处置方法符合动物伦理要求。

**本文创新性:** ①实验为体内实验, 内参照细胞为供体来源的脾细胞, 控制了实验偶然误差及系统误差, 其结果有供体特异性及全面性。②测试细胞为供体细胞, 抗原性与移植物完全相同, 结果能准确反映移植物所受的免疫攻击, 流式细胞测试可准确到单个细胞水平, 结果可靠。