

· 临床研究 ·

## 肾移植术后抗体介导排斥反应模型的构建与鉴定

程宏,周嘉俊,王子杰,张恒诚,郑明,韩志坚,陶俊,居小兵,王增军,谭若芸\*,顾民\*

南京医科大学第一附属医院泌尿外科,江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:构建并鉴定一种肾移植术后抗体介导排斥反应(antibody-mediated rejection, AMR)的动物模型。方法:AMR动物模型采用Wistar大鼠作为供体,SD大鼠作为受体。将Wistar大鼠背部皮肤移植至SD大鼠背部,构建同种异体大鼠皮肤移植模型,分别在皮肤移植后1、3、7、10、14、21、28、35 d取大鼠血清,采用流式细胞术检测供者特异性抗体(donor specific antibody, DSA)。在DSA最高时将供体肾脏移植至受体,构建同种异体大鼠肾移植AMR动物模型。分别于肾移植术后1~5 d收取移植肾及血清标本,行常规病理染色、C4d免疫荧光染色,以及血清DSA检测。结果:大鼠受体的血清DSA在皮肤移植术后第14天达到最高。相较于各对照组,AMR组大鼠移植肾出现显著的管周毛细血管炎和肾小球炎,免疫荧光示管周毛细血管C4d沉积显著增多,血清DSA显著升高( $P < 0.05$ ),管周毛细血管炎、肾小球炎、C4d评分显著增高( $P < 0.05$ )。结论:成功构建并鉴定一种同种异体肾移植术后AMR的动物模型。该模型操作简便易行,稳定性和性价比较高,具有较高的推广价值。

**[关键词]** 抗体介导排斥反应;动物模型;肾移植

**[中图分类号]** R692

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)05-677-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190510

## Construction and identification of an antibody - mediated rejection model after kidney transplantation

Cheng Hong, Zhou Jiajun, Wang Zijie, Zhang Hengcheng, Zheng Ming, Han Zhijian, Tao Jun, Ju Xiaobing, Wang Zengjun, Tan Ruoyun\*, Gu Min\*

Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** The purpose of this research is to build and identify the animal model of an antibody-mediated rejection (AMR) after kidney transplantation. **Methods:** In animal model of AMR, Wistar rats were used as donors and SD rats were used as the recipients. To construct allograft rat skin graft model, the back skins of Wistar rats were transplanted to the back of SD rats. After skin transplantation, serum was taken from rats at 1, 3, 7, 10, 14, 21, 28, and 35 days respectively, and donor specific antibodies (DSAs) of serum were detected by flow cytometry. When DSAs reached the highest, the kidney of Wistar rats was transplanted to SD rats to build AMR model of allogeneic rat kidney transplantation. Transplanted kidney and serum were collected 1 - 5 days after kidney transplantation, and routine pathological staining, C4d immunofluorescence and serum DSAs detection were performed. **Results:** DSAs of serum in recipients reached the peak after 14 days of skin transplantation. Compared with control group, transplanted kidney in AMR group showed glomerulitis with a significant increase of peritubular capillaries (PTC), C4d deposition on peritubular capillaries, and serum DSAs levels ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** An animal model of AMR after renal allograft transplantation was successfully constructed and identified. This model is easy to operate, stable and cost-effective, and has high popularization value.

**[Key words]** antibody-mediated rejection; rat model; kidney transplantation

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(05): 677-681]

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金(81870512, 81570676, 81770751, 81100532, 81470981);江苏省“六大人才高峰”资助(2010WSN-56, 2011-WS-033);江苏省“科教兴卫”工程医学重点人才培养资助(RC2011055);江苏省卫生厅面上项目(H2009907);江苏省“333高层次人才培养工程”(2011, 2013)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: tanruoyun112@vip.sina.com; Lancetgu@aliyun.com

由于患者术后生活质量的显著提高,肾移植被认为是终末期肾病患者的最佳治疗方法之一<sup>[1]</sup>。肾移植术后排斥反应是影响移植肾长期存活率的主要因素<sup>[2-3]</sup>。根据免疫应答的机制,可将肾移植术后排斥反应分为细胞免疫介导的排斥反应和抗体介导的排斥反应(antibody-mediated rejection, AMR)<sup>[4]</sup>。既往研究表明细胞免疫介导的排斥反应是肾移植术后移植肾功能丢失的主要原因<sup>[5]</sup>。然而近年来,越来越多的研究发现 AMR 亦与移植植物功能丧失密切相关<sup>[6]</sup>。目前对于 AMR 的作用及机制仍不清楚。

目前认为 B 淋巴细胞分化为浆细胞并产生供者特异性抗体(donor specific antibodies, DSA),后者与内皮细胞上的人类白细胞抗原(anti-human leukocyte antigen, HLA)或非 HLA 分子结合造成内皮细胞损伤是 AMR 的主要机制。相关研究报道,同种异体抗体的最初攻击目标是供体的内皮细胞,这些抗体称之为 DSA 或者反应性抗体<sup>[7-8]</sup>。当这些抗体与内皮细胞的相应抗原结合时,会通过不同途径对内皮细胞造成损伤,如经典补体途径、不依赖补体的抗体介导的细胞毒性作用途径。

由于目前对肾移植术后 AMR 的机制及干预研究尚需深入,因此建立 AMR 相关的方便而稳定的动物模型具有重要意义。但国内外尚无 AMR 相关大鼠模型构建和鉴定的报道,因此,本研究拟构建并鉴定一种同种异体肾移植术后 AMR 动物模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

雄性 Wistar 大鼠 36 只,体重 180~200 g,雄性 SD 大鼠 48 只,体重 180~200 g(北京维通利华有限公司),手术显微镜(镇江新天医疗器械有限公司),四孔手术无影灯(江苏科凌医疗器械有限公司),显微外科手术器械(上海金钟医疗器械有限公司),直尺、记号笔、采血针、青霉素、2%的戊巴比妥钠、高渗枸橼酸盐嘌呤溶液(上海输血技术有限公司),组织 C4d 免疫荧光抗体(武汉塞维尔生物科技有限公司),细胞计数板。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 同种异体大鼠皮肤移植模型的构建

将 Wistar 大鼠皮肤移植至 SD 大鼠,建立同种异体大鼠皮肤移植模型(皮肤移植组),随后将皮肤供者的肾脏移植于皮肤受者,建立同种异体大鼠肾移植 AMR 模型(AMR 组)。此外,将 Wistar 大鼠肾脏移植于 SD 大鼠,建立同种异体大鼠肾移植急性排组

(肾移植组),并采用正常 SD 大鼠左肾原位移植于 SD 大鼠,建立假手术组。每组大鼠 5 例, Wistar 大鼠用 2% 戊巴比妥钠 0.3 mL/kg 麻醉后,固定,背部剃毛后用记号笔,直尺画 1.0 cm×1.0 cm 的正方形,碘伏消毒 3 遍后取出皮肤并剔除多余的脂肪及其他组织,置于预先配好的抗生素(青霉素 80 万 U/mL)中,转移至冰上等待移植。SD 大鼠用戊巴比妥钠麻醉后进行同样的操作,取出的皮肤丢弃,然后将 Wistar 大鼠皮肤置于 SD 大鼠的背部贴合缝合,消毒,包扎。术后禁食 8 h,不禁水。每天观察大鼠背部移植皮瓣变化以及大鼠的活动状态。

#### 1.2.2 同种异体大鼠肾移植 AMR 模型的构建

大鼠术前禁食 12 h,禁水 8 h,手术器械高压消毒,铺无菌巾。供者 Wistar 大鼠戊巴比妥钠麻醉后固定,碘伏消毒,沿腹中线做切口,拉钩,取无菌纱布湿润包裹腹中胃肠等,充分暴露腹主动脉,下腔静脉,左肾及肾动静脉,分离肾动静脉周围多余的脂肪组织和包膜,然后分离输尿管。分离腹主动脉上的一段约 1.5 cm,便于采血针灌注。结扎腹主动脉上极,采血针连接注射器从腹主动脉进针灌注,待肾脏颜色变成均匀土黄色后结束灌注。肾动静脉靠近腹主动脉端切断,取出肾脏置于 4 °C 灌注液中保存。

受者 SD 大鼠麻醉后固定,暴露后分离肾动静脉周围多余组织,血管夹在腹主动脉端阻断血流,在靠近受者近端切断肾动静脉,取出供肾进行血管缝合,肾动脉行端端间断缝合,肾静脉行端端连续缝合,输尿管行包埋式吻合,开放血流,观察移植肾的颜色恢复。移植肾颜色恢复良好则手术成功,颜色变深红色则提示存在血管吻合梗阻。确定手术成功后分离对侧肾脏动静脉,并结扎对侧肾脏,离断后取出,关腹,缝合消毒,包扎。术后 12 h 后开始进食,不使用抗生素。肾移植术后第 1、2、3、4、5 天分别通过受者内眦静脉取血,各时间点大鼠处死后取移植肾标本。

#### 1.2.3 DSA 检测

在无菌条件下提取正常 Wistar 大鼠脾脏淋巴细胞并计数至  $1 \times 10^6$  个/mL。在室内用正常 SD 大鼠血清孵育脾脏淋巴细胞,在室温下孵育细胞 30 min, PBS 洗涤 2 遍后,在室温下用 FITC 标记的抗大鼠 IgG 抗体孵育 30 min,用 PBS 洗涤 2 遍后用流式细胞仪分析细胞,流式分析软件 Kaluza Analysis(贝克曼公司,美国)分析结果,测定平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI),然后转换成等量可溶性荧

光素分子(equivalent soluble fluorescent molecules, MESF)评估DSA水平。

#### 1.2.4 常规病理染色

大鼠肾移植术后第4天获取移植肾标本。处死大鼠获得移植肾脏后,用福尔马林固定,石蜡包埋,HE染色。尼康E100显微镜(尼康公司,日本)下观察病理切片。AMR的特征:①病理特征:管周毛细血管炎、小球炎;②管周毛细血管C4d的沉积;③血清DSA升高,移植肾AMR的病理变化由具有肾脏病理学经验的2位临床医生鉴定,根据2013 Banff评分标准分别进行评估<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.5 组织间接免疫荧光染色检测

采用免疫荧光法,先将肾组织冷冻,石蜡包埋。将冷冻切片与兔抗C4d[在磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)中1:50稀释]室温孵育30 min。PBS洗涤4次,随后加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的山羊抗兔IgG。C4d荧光面积用Image-Pro Plus6.0(Media Cybernetics 图像技术公司,美国)评估。

#### 1.3 统计学方法

采用SPSS17.0.0版本统计进行分析。数据为计量资料,组间比较采用方差分析及两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

SD大鼠接受皮肤移植后,背部的移植皮肤皱缩,变硬,至第3天坏死面积超过50%,提示出现明显的皮肤移植排斥反应(图1A)。检测受者体内血清DSA的表达变化,结果表明在皮肤移植3 d后血清DSA水平显著高于术前水平( $P < 0.05$ ),并呈现出显著的时间依赖性,在第14天达到峰值,随后逐

渐降低(图1B)。

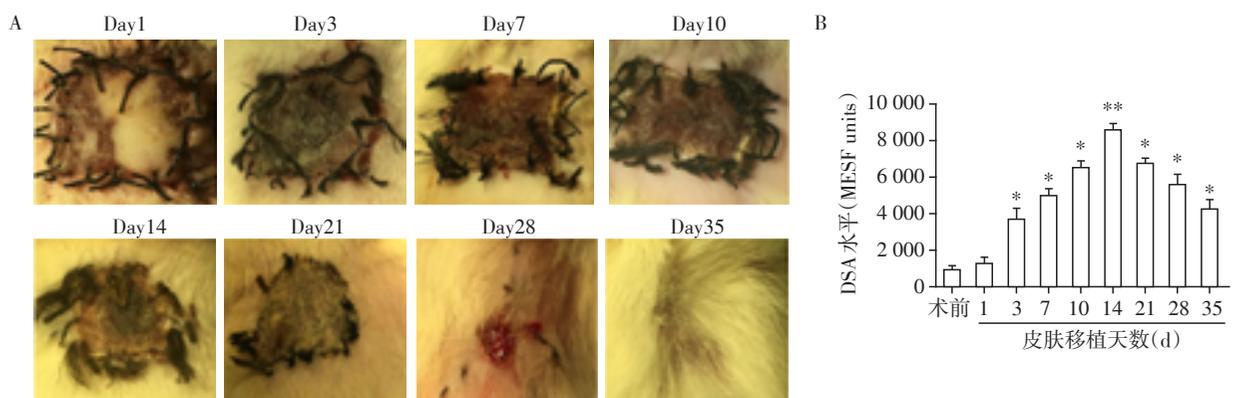
随后,选择血清DSA水平最高的第14天行同种异体肾脏移植,将皮肤移植的供者左肾原位移植于皮肤移植受者。与对照组相比,AMR组的移植肾组织中出现显著的管周毛细血管炎和肾小球炎,同时可见明显的中性粒细胞和单核细胞浸润(图2A)。参照Banff标准对各组移植肾形态进行评分,结果表明,AMR组在小球炎、管周毛细血管炎及血管炎评分均显著高于其他各组;此外,AMR组的移植肾组织在肾小球炎、管周毛细血管炎及血管炎评分上均呈现显著的时间依赖性,即随着移植时间延长,各评分均出现显著升高( $P < 0.05$ ,图2B~D)。

接下来,对各组移植肾组织进行了C4d免疫荧光染色,并检测了各组大鼠体内血清DSA水平。与各对照组相比,AMR组大鼠移植肾组织中C4d沉积在管周毛细血管区域明显增多( $P < 0.05$ ,图3A, B)。此外,AMR组中大鼠体内血清DSA值显著高于对照组、皮肤移植组和肾移植组( $P < 0.05$ ,图3C)。结合上述结果,该同种异体大鼠肾移植AMR模型构建成功。

## 3 讨论

由于缺乏有效的防治措施,AMR对移植肾功能的影响及相关机制逐渐受到关注。本研究构建并鉴定了一种简便而稳定的同种异体肾移植AMR动物模型,该方法不仅有利于肾移植术后AMR的体内机制研究,更对研究AMR的防治措施及干预效果意义重大。

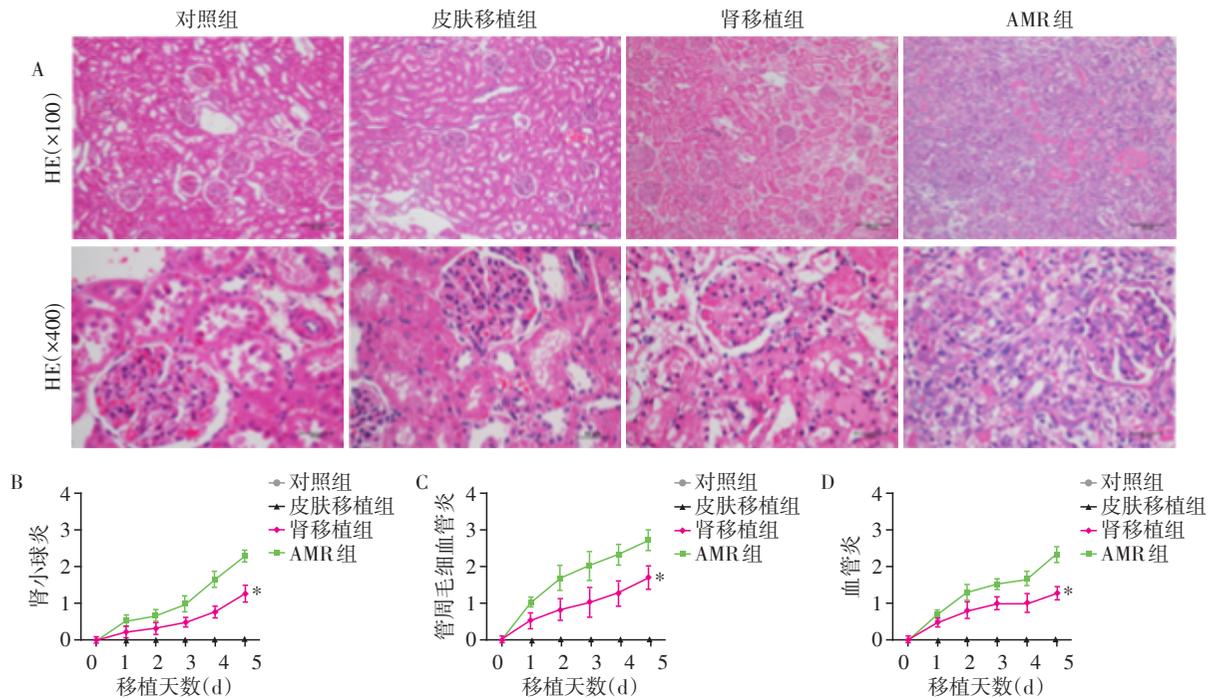
目前国内外对同种异体大鼠肾移植AMR模型的构建方法尚无定论。根据既往参考文献,构建该模型的方法有两种:通过提取供体大鼠的淋巴细



A: 大鼠皮肤移植后皮肤外观;B: 皮肤移植后大鼠血清中DSA的水平变化,与术前相比,\* $P < 0.01$ ,\*\* $P < 0.001$ 。

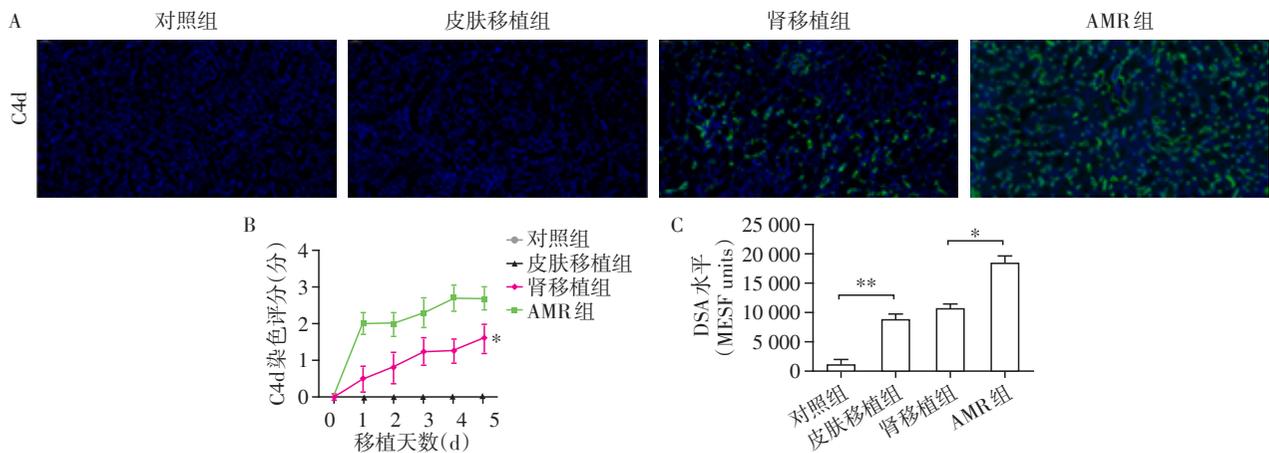
图1 同种异体大鼠皮肤移植模型的鉴定

Figure 1 Identification of rat skin allograft models



A: 各组大鼠移植肾组织 HE 染色结果; B~D: 各组大鼠移植肾 Banff 评分中肾小球炎(B)、管周毛细血管炎(C)及血管炎(D)的比较结果。与对照组相比, \* $P < 0.05$ 。

图2 同种异体大鼠肾移植 AMR 模型移植肾 HE 染色  
Figure 2 HE staining of allograft kidney in AMR model of rat kidney transplantation



A: 各组大鼠移植肾组织 C4d 免疫荧光染色结果( $\times 200$ ); B: 各组大鼠移植肾组织 C4d 免疫荧光强度的定量结果; C: 各组大鼠体内血清 DSA 水平变化。两组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ 。

图3 同种异体大鼠肾移植 AMR 模型移植肾 C4d 免疫荧光染色和血清 DSA 结果  
Figure 3 C4d fluorescence staining and serum DSA in AMR model of allogeneic rat kidney transplantation

胞,输注到受体进行预致敏,之后行同种异体大鼠肾移植模型构建 AMR 模型;第二种为通过皮肤移植进行预致敏,而后行同种异体大鼠肾移植构建大鼠 AMR 动物模型。国内仅有黄耿文等<sup>[10-11]</sup>应用了输血预致敏受者大鼠,后采用 Brown-Norway 大鼠左肾原位移植于 Lewis 大鼠,构建同种异体大鼠肾移植 AMR 模型。然而,在该研究中,模型并未依据 Banff

标准进行 AMR 的诊断,因此无法准确鉴定该模型的成功构建。

本研究行皮肤移植构建皮肤移植模型时,取皮瓣大小为 1.0 cm $\times$ 1.0 cm,与既往研究的 2 cm $\times$ 2 cm 或者 1.5 cm $\times$ 1.5 cm 相比<sup>[12-13]</sup>,在不影响模型构建的情况下,缩短了皮肤移植时间,皮肤移植后大鼠的生理状态更加稳定,感染率更低。大量研究结果表

明,同种异体器官移植可引起机体复杂的免疫应答过程,在无免疫抑制剂的情况下,通常导致免疫排斥反应并使移植物皮肤坏死。本研究通过构建皮肤移植排斥反应预致敏,构建容易、不违背伦理、可重复性好,具有较好的推广价值。

参照已有模型构建方法,另外对同种异体大鼠肾移植 AMR 模型进行了以下创新。首先,采用了 SD 和 Wistar 大鼠构建该模型。在动物模型构建中发现,相较于 SD 和 Wistar 大鼠, Brown-Norway 大鼠和 Lewis 大鼠不易获得,且单价远高于本实验的品系。更重要的是,上述两种大鼠的血管变异较大,尤其体现在肾动静脉的变异上。因此,使用 Brown-Norway 大鼠和 Lewis 大鼠构建该模型不仅增加了实验的成本,还显著增加了肾移植模型的手术难度,进而影响模型的构建成功率。本研究采用 SD 和 Wistar 大鼠,不仅成功鉴定了该 AMR 模型,还保持了较高的成功率和稳定性,因此更加易于推广。其次,采用同种异体皮肤移植模型进行预致敏。相较于输血预致敏的方法,该方法更加简便且易于操作。在前期研究中已发现,在术后第 14 天大鼠体内的血清 DSA 水平达到峰值,进而在该时间节点进行同种异体大鼠肾移植可成功构建 AMR 动物模型。该方法不仅大大减少了因输血带来的不良反应,而且简单稳定,适用于更多移植中心及实验室。此外,赵大强等<sup>[14]</sup>近期报道了小鼠 AMR 模型的构建及鉴定方法。然而,小鼠肾移植模型的手术方法难度非常大,对手术者的技巧和仪器设备的要求更高,不利于 AMR 动物模型的广泛推广。因此,笔者构建的同种异体大鼠肾移植 AMR 模型简单、稳定,且性价比较高,具有很高的推广价值。

综上所述,在本研究成功构建并鉴定了一种同种异体肾移植 AMR 模型,包括了动物模型,不仅为研究者提供了体内 AMR 模型,而且上述模型操作简易,稳定性和性价比较高,因此具有较高的推广价值。

#### [参考文献]

- [1] Carney EF. Transplantation: Survival benefit of accepting a diabetic deceased donor kidney [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13(8): 444
- [2] 阙宏亮,韩志坚,耿亮,等.器官捐献肾移植受者近期预后的影响因素分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(5): 11-15
- [3] See SB, Aubert O, Loupy A, et al. Post-transplant natural antibodies associate with kidney allograft injury and reduced long-term survival [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2018, 29(6): 1761-1770
- [4] Rodríguez-Perálvarez M, De Luca L, Crespo G, et al. An objective definition for clinical suspicion of T-cell-mediated rejection after liver transplantation [J]. *Clinical Transplantation*, 2017, 31(7): e13005
- [5] Rodriguez-Barbosa JI, Ferreras MC, Buhler L, et al. Therapeutic implications of NK cell regulation of allogeneic CD8 T cell - mediated immune responses stimulated through the direct pathway of antigen presentation in transplantation [J]. *Taylor & Francis*, 2018, 10(7): 1030-1044
- [6] Cioni M, Nocera A, Tagliamacco A, et al. Failure to remove de novo donor - specific HLA antibodies is influenced by antibody properties and identifies kidney recipients with late antibody - mediated rejection destined to graft loss-a retrospective study [J]. *Transplant International*, 2019, 32(1): 38-48
- [7] Okada M, Kamei K, Matsuoka K, et al. Development of antibody mediated rejection shortly after acute cellular rejection in a pediatric kidney transplantation recipient [J]. *CEN*, 2018, 7(2): 288-291
- [8] Hamada AM, Yamamoto I, Kawabe M, et al. Clinicopathological features and outcomes of kidney allografts in plasma cell-rich acute rejection: A case series [J]. *Nephrology*, 2018, 23(1): 22-26
- [9] Haas M, Sis B, Racusen LC, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions [J]. *American Journal of Transplantation*, 2014, 14(2): 272-283
- [10] 黄耿文,丁翔,雷鹏,等. 硼替佐米对大鼠肾移植 AMR 的保护作用及机制研究 [J]. *实用药物与临床*, 2014, 17(12): 1560-1563
- [11] 黄耿文,丁翔,雷鹏,等. 雷公藤内酯醇对大鼠肾移植抗体介导排斥反应的影响 [J]. *中华器官移植杂志*, 2014, 35(3): 175-178
- [12] 赵威,杨时昕,郭晋宣. HA-VEGF 缓释体对大鼠皮肤移植作用的实验研究 [J]. *中国医疗前沿*, 2010, 5(1): 15
- [13] 张美红,蔡霞,高学军,等. 联合阻断 CD28/B7 和 ICOS 对大鼠皮肤移植的影响 [J]. *中外医学研究*, 2011, 9(15): 18-19
- [14] 赵大强,孙启全. 抗体介导的小鼠肾移植急性排斥反应动物模型 [J]. *器官移植*, 2015, 6(4): 222-223

[收稿日期] 2019-02-13