

心脏移植中细胞凋亡的研究进展

杨海玲

心脏移植已成为终末期心脏病人的有效治疗手段。全世界心脏移植每年以 2 000 ~ 3 000 例手术量增加,出现了相当数量生存质量高及长期存活的群体。然而,急慢性移植排斥反应及移植物血管病仍是心脏移植患者长期存活的主要障碍。目前,许多证据表明,细胞凋亡在心脏移植排斥反应及移植物血管病中起重要作用。本文就细胞凋亡在心脏移植中的研究进展作出综述。

1 心脏移植中细胞凋亡存在的证据

细胞凋亡是一种主动性细胞死亡方式,参与机体许多生理及病理过程。对细胞凋亡在心血管疾病发病中作用的研究已更新了人们对许多心血管疾病的认识。目前,在动物模型和人体上的许多研究证实,细胞凋亡在心脏移植排斥反应和移植物血管病中起重要作用。

Koglin 等^[1]在研究 CBA 小鼠对 C57BL/6 小鼠心脏移植急性排斥反应时,发现 DNA 梯状水平(ladder)、DNA 裂解片段、Caspase-1 转录水平及 TUNEL + 细胞在排斥反应时明显升高,并且以上指标在急性排斥反应是慢性排斥反应的 2 倍以上,而对照组却未测出上述指标。

Dong 等^[2]将 Lewis 大鼠心脏移植给 F344 大鼠,发现心脏移植 Bax 表达明显增多,用 TUNEL 法(TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记法)检测凋亡细胞,发现 TUNEL + 细胞分布在高表达 Bax 的心肌细胞及浸润淋巴细胞中。提示移植物血管内皮细胞损伤与浸润淋巴细胞凋亡主要由 Bax 介导。

Laguens 等^[3]研究 6 例心脏移植患者移植术后 7 ~ 146 d 中的 63 个心内膜活检标本,发现排斥等级 3A 的标本均发生细胞凋亡,排斥等级为 2 的标本 50% 发生细胞凋亡,排斥等级为 1B 的标本有 3 个发生细胞凋亡,而在排斥等级为 1A 和 0 的标本中未发现细胞凋亡。

Jollow 等^[4]通过对心脏移植病人定期进行心内膜活检,发现在排斥等级 3A 的病人中,85% ~ 98% 的心脏移植单核浸润细

胞发生凋亡,但是未见心肌细胞凋亡。

Birks 等^[5]发现心脏移植 pro-caspase-9, caspase-3, pro-caspase-3, caspase-9 均显著升高,认为细胞凋亡是导致移植心脏功能障碍的主要机制。

细胞凋亡是心脏移植排斥反应中心肌细胞死亡的主要机制,并且蛋白水解作用在终端补体复合体所导致的心肌细胞凋亡中起关键作用。

2 心脏移植中细胞凋亡的机制

2.1 NO 途径 NO 是体内重要的生物活性物质,在 NOS 作用下由 L-精氨酸氧化生成,广泛参与人体内生理、病理、生长发育与衰老死亡等一系列重要过程。结构型 NOS(cNOS)主要存在于神经细胞和内皮细胞,通常合成 NO 很少,主要参与机体正常生理功能的维持。诱导型 NOS(iNOS)主要存在于巨噬细胞,在炎症刺激因子等作用下诱生大量的 NO,主要参与机体的病理生理过程。

Takahashi^[6]将 BABL/C 小鼠心脏移植给 C3H/He 小鼠,实验组用氨基胍抑制 iNOS 活性,对照组使用 BABL/C 小鼠同系移植,第 7 天对照组血清 NO 浓度达到峰值,而实验组显著降低。实验组凋亡细胞的数量、心肌细胞凋亡比例、DNA 梯状水平明显降低,心肌组织损害减轻,生存时间延长。认为急性移植排斥反应引起的移植物衰竭主要与 NO 介导的细胞凋亡有关。

Szabolcs 等^[7]通过对 30 例心脏移植排斥等级 3A/B(国际心肺移植学会标准)病人与 12 例移植排斥等级为零(标准同上)即未排斥病人右心室内膜活检发现,3A/B 等级病人心肌细胞凋亡数是零等级病人的 30 倍。并且绝大多数是巨噬细胞(CD68+)富集与浸润的心肌细胞,在这些巨噬细胞和心肌细胞中,iNOS 活性最强。iNOS 基因表达水平和活性心肌细胞凋亡有时间相关性。提示细胞凋亡是人类心脏移植排斥反应心肌细胞死亡的主要方式并且这种凋亡与 iNOS 表达增加紧密相关。

Yang 等^[8]发现同种异体心脏移植心肌环氧化酶-2(COX-2)在心脏移植排斥反应中表达增强,并且与诱导型 NO 合

的凋亡可能是通过 NO 来诱导的。

2.2 颗粒酶-穿孔素途径 颗粒酶途径介导的细胞凋亡参与了 NK 细胞和细胞毒性 T 细胞对细胞内病原、肿瘤细胞防御机制。Froelich^[9]研究认为穿孔素和丝氨酸水解蛋白酶-颗粒酶均参与了这一过程。CD8 淋巴细胞诱导的细胞凋亡中 Grb 可能要在穿孔素作用下经过受体介导进入靶细胞,并激活 caspases 导致细胞凋亡。Talanian^[10]认为颗粒酶 B(Grb)在这一细胞凋亡机制中起关键作用,且是首先激活 caspase-10 或 caspase-7 发挥作用的。

Kageyama 等^[11]将 DA 大鼠心脏移植给 Lewis 大鼠,发现心脏移植 Fas, FasL, 颗粒酶 B 和穿孔素基因表达水平显著升高,心肌细胞凋亡在移植后第 5 天达到高峰。认为心脏移植排斥反应所导致的心肌细胞凋亡是通过穿孔素-颗粒酶途径和 Fas-FasL 途径。

而 Alexander 等^[12]在研究中发现虽然移植术后 5 ~ 12 d 可见颗粒酶 B 表达增高,但是 CD8 阴性小鼠同样发生排斥反应,说明 CD8 淋巴细胞的细胞毒性在排斥反应中不是必需的,提示移植排斥反应中有其他的细胞凋亡途径。

2.3 Fas-FasL 途径 Fas 属于肿瘤坏死因子/神经生长因子超家族成员,是位于细胞膜上的 I 型跨膜受体。FasL 属于肿瘤坏死因子/神经生长因子受体超家族成员,FasL 为 Fas 的配体。以往研究表明,两者结合将启动死亡信号,导致 Fas 阳性细胞凋亡。Fas/FasL 系统在免疫介导的细胞凋亡中起重要作用。Fas/FasL 介导的细胞凋亡与移植免疫耐受和移植排斥的关系也非常密切。

Hoffen 等^[13]对心脏移植病人心内膜活检时发现,65.7% 的 CD4+ 和 26.6% 的 CD8+ T 细胞发生凋亡。绝大多数浸润细胞表达 Fas, 绝大多数 T 细胞及所有巨噬细胞表达 FasL。在排斥反应中,浸润 T 细胞在导致心肌损伤的同时发生自身凋亡。

Xu 等^[14]在心脏移植慢性排斥反应时可见 DNA 裂解片段和 caspases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 表达增加。

细胞,发现凋亡细胞(包括 T 细胞、单核巨噬细胞和内皮细胞)均表达 Fas/FasL,认为 Fas-FasL 途径是心脏移植慢性排斥反应的主要机制。

李天发等^[15]将 SD 大鼠心脏移植给 Wistar 大鼠,检测到术后第 3 天即有一定量 TUNEL 阳性心肌细胞,术后第 5 天 TUNEL 阳性心肌细胞数达高峰,持续至术后第 9 天并检测到大量 FasL 阳性心肌浸润细胞。认为是表达 FasL 的心肌浸润细胞诱导 Fas 阳性心肌细胞凋亡,介导移植排斥反应。

Dong 等^[16]在 12 例心脏移植后患有移植冠状动脉病(TxCAD)的病人冠状动脉活检中发现,所有样本中都可检测到 Fas。并且 100%的内皮细胞和几乎 33%的 T 细胞和巨噬细胞为 Fas+并且 TUNEL+细胞几乎都是 Fas+细胞。提示 TxCAD 病人的血管内皮细胞损伤是通过 Fas 介导的细胞凋亡途径。并且 CD4+T 细胞是主要的效应细胞。

也有研究对 Fas-FasL 途径介导的心肌损害作用提出了置疑。有报道发现在同种异型抗原作用下 Fas 阴性 T 细胞仍能引起移植细胞凋亡^[17],认为 Fas-FasL 途径介导的细胞凋亡不是心脏移植排斥反应的主要机制。

3 细胞凋亡在心脏移植中的应用

3.1 检测排斥反应 心内膜活检术是检测心脏移植排斥反应的金标准,但为有创性检查,不宜反复进行。有研究利用细胞凋亡的有关原理,寻找无创性检查方法。凋亡早期磷脂酰丝氨酸从细胞内转移到细胞外,Annexin V(钙依赖性磷脂结合蛋白)可以特异性结合到凋亡细胞的磷脂酰丝氨酸上。

Kown 等^[18]利用 ^{99m}Tc 标记的 annexin V 显象术检测急性排斥反应中的细胞凋亡,并与心内膜活检术相对比。在 10 例病人中,8 例病人心脏移植排斥等级(国际心肺移植学会标准)为 1A 或以下。其中 5 例右心室有两处或以上热点显影。2 例活检阳性的病人中 1 例排斥等级为 2 的两处热点显影,另 1 例排斥等级为 3A 的有 3 处显影。另外 5 例只有 1 处或没有显影的病人心内膜活检为阴性。认为使用 ^{99m}Tc 标记的 annexin V 未见并发症,可以成为检测急性心脏移植排斥反应的无创性方法。Narula^[19]用 ^{99m}Tc 标记的 annexin V 检查 18 例患者,13 例阴性 5 例阳性。心内膜活检证实 5 例阳性标本中均有中等以上的排斥反应,且存在细胞凋亡的证据。

3.2 抗细胞凋亡抑制排斥反应

途径在急性排斥反应移植植物衰竭中起重要作用。在大鼠心脏移植术后即开始皮下注射 NOS2 单体二聚化的变构抑制剂 BBS-1 或 BBS-2,发现实验组平均生存时间 13.3~14.2 d,而对照组平均 6.8 d。且术后第 5 天 NOx 合成减少 53%,心肌水肿、T 淋巴细胞和巨噬细胞炎性浸润、移植排斥分数、心肌细胞凋亡明显减少。认为选择性抑制 NOS2 二聚化可以延长生存时间,减轻急性心脏移植排斥反应中的心肌损害和炎性浸润。Koglin 等^[21]通过基因敲除受体小鼠的 NOS2 基因,发现 NOS2 缺失受体小鼠的移植排斥分数、细胞凋亡数、p53 转录水平、caspase-3 表达水平与 NOS2 正常受体小鼠相比均明显降低;并且 Bcl-2/Bax 比率明显上升。提示 NOS2 基因缺失,可通过下调 p53 基因转录水平而发挥抗凋亡作用。

Fas/FasL 途径在诱导淋巴细胞凋亡中起重要作用。表达 FasL 的细胞能通过 Fas/FasL 途径促使 Fas+细胞凋亡。如果能使 Fas+T 细胞凋亡,则能抑制心肌细胞凋亡。Takeuchi 等^[22]通过转基因技术,使心脏移植植物高表达 FasL,发现心脏移植植物不仅没有杀伤活化 T 细胞(Fas+),反而自身被更快地排斥掉。其机制与表达 FasL 的供体心肌细胞被大量中性粒细胞浸润及移植手术操作有关,并且两者起协同作用。Min 等^[23]通过对小鼠树突状细胞(DC)进行基因改造,使 DC 表面高表达 FasL。在心脏移植前,将改造的 DC 输给小鼠,发现心脏移植植物在受体小鼠存活时间明显延长(20±4)d 而在未输改造 DC 的受体小鼠体内仅存活(10±2)d。提示表达 FasL 的 DC 细胞通过 Fas/FasL 途径诱导 Fas+活化 T 细胞凋亡,从而达到免疫抑制。

在心脏移植中,心肌细胞的凋亡是 p53 依赖性的。通过基因工程突变或基因工程敲除技术,使 p53 基因工程突变或缺失,则能抑制移植植物凋亡。Hu 等^[24]将 C57BL/6-J 小鼠心脏移植给 BALB/c 小鼠。发现 p53 缺失的 C57BL/6-J 小鼠心脏移植给 BALB/c 小鼠后,心脏移植植物存活时间为(10.5±1.1)d。而 p53 正常表达的供心仅存活(7.6±0.5)d。并且发现,在 p53 缺失的供心中 Bcl-2 高表达, Bax 低表达。提示 p53 缺失可能是通过提高 Bcl-2/Bax 比例而发挥抗凋亡作用的。

4 展望

细胞凋亡与心脏移植存在着密切的关系,从抗细胞凋亡途径保护供心,将为心脏移植提供新的研究方法。目前,细胞

一步探讨和研究。我们相信,随着对凋亡机制的进一步阐明,最终将给心脏移植带来更加广阔的前景。

5 参考文献

- 1 Koglin J, Russell ME. Alloimmune-mediated apoptosis: comparison in mouse models of acute and chronic cardiac rejection. *Transplantation*, 1999, 67(6): 904-909
- 2 Dong CM, Granville DJ, Tuffnel CE, et al. Bax and apoptosis in acute and chronic rejection of rat cardiac allografts. *Lab Invest*, 1999, 79(12): 1643-1653
- 3 Laguens RP, Meckert PM, Martino JS, et al. Identification of programmed cell death (apoptosis) in situ by means of specific labeling of nuclear DNA fragments in heart biopsy samples during acute rejection episodes. *J Heart Lung Transplant*, 1996, 15(9): 911-918
- 4 Jollow KC, Sundstrom JB, Gravanis MB, et al. Apoptosis of mononuclear cell infiltrates in cardiac allograft biopsy specimens: questions studies of biopsy-cultured cells. *Transplantation*, 1999, 63(10): 1482-1489
- 5 Birks EJ, Yacoub MH, Burton PS, et al. Activation of apoptotic and inflammatory pathways in dysfunctional donor hearts. *Transplantation*, 2000, 70(10): 1498-1506
- 6 Takahashi W, Suzuki JI, Izawa A, et al. Inducible nitric oxide-mediated myocardial apoptosis contributes to graft failure during acute cardiac allograft rejection in mice. *Jpn Heart J*, 2000, 41(4): 493-506
- 7 Szabolcs MJ, Ravalli S, Minanov O, et al. Apoptosis and increased expression of inducible nitric oxide synthase in human allograft rejection. *Transplantation*, 1998, 27(6): 804-812
- 8 Yang XC. Upregulation of COX-2 during cardiac allograft rejection. *Circulation*, 2000, 101(4): 430-438
- 9 Froelich CJ. Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunol Today*, 1998, 19(1): 30-36
- 10 Talanian RV. Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J Exp Med*, 1997, 20, 186(8): 1323-1331
- 11 Kageyama Y. Apoptosis is involved in acute cardiac allograft rejection in rats. *Ann Thorac Surg*, 1998, 65(6): 1604-1609
- 12 Alexander DZ, Pearson TC, Hendrix R, et al. Analysis of effector mechanisms in murine cardiac allograft rejection. *Transpl Immunol*, 1996, 4(1): 46-48
- 13 Van Hoften E, Van Wichen DF, Leemans

- stimulation? *Am J Pathol*, 1998, 153(4): 1813-1824
- 14 Xu B. Apoptosis in chronic rejection of human cardiac allografts. *Transplantation*, 2001, 27, 71(8): 1137-1146
- 15 李天发, 于波, 张瑶, 等. 心肌细胞凋亡与急性心脏移植排斥的关系. *哈尔滨医科大学学报* 2001 35(4): 263-265
- 16 Dong CM. Human transplant coronary artery disease: pathological evidence for Fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy. *Lab Invest*, 1996, 74(5): 921-931
- 17 金惠铭, 卢建, 殷莲华. 细胞分子病理生理学. 郑州: 郑州大学出版社 2002 225
- 18 Kown MH. In vivo imaging of acute cardiac rejection in human patients using (99m) technetium labeled annexin V. *Am J Transplant*, 2001, 1(3): 270-277
- 19 Narula J. Annexin-V imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection. *Nat Med*, 2001, 7(12): 1347-1352
- 20 Szabolcs MJ. Effects of selective inhibitors of nitric oxide synthase-2 dimerization on acute cardiac allograft rejection. *Circulation*, 2002, 29, 106(18): 2392-2396
- 21 Koglin J, Granville DJ, Glysing-Jensen T, et al. Attenuated acute cardiac rejection in NOS2 -/- Recipients correlates with reduced apoptosis. *Circulation*, 1999, 99(6): 836-842
- 22 Takeuchi, Ueki T, Nishimatsu H, et al. Accelerated rejection of Fas ligand-expressing heart grafts. *J Immunol*, 1999, 162(1): 518-522
- 23 Min WP, Gorczynski R, Huang XY, et al. Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival. *J Immunol*, 2000, 164: 161-167
- 24 Hu YH, Zou Y, Hala M, et al. Prolonged survival of heart allografts from p53-deficient mice. *Transplantation*, 2000, 69(12): 2634-2640
- (收稿: 2004-12-07 修回: 2005-02-02)

计算机辅助手术在骨科的应用

李健 谭平先 高梁斌

计算机辅助手术 (computer-assisted surgery, CAS) 是综合当今先进的成像设备 (如 CT、MRI)、计算机技术、空间定位技术等进行图像三维重建及融合, 术前充分评估病人的情况, 规划手术路径、方案、模拟手术、术中追踪手术器械, 引导手术, 确定手术范围, 从而使外科手术更精确、安全、微创化的一门综合性技术。计算机辅助手术在骨科的综合应用称为计算机辅助骨科手术 (computer-assisted orthopaedic surgery, CAOS)。CAOS 技术从 90 年代初在欧洲和北美问世发展十分迅速^[1-3]。现就其在骨科的应用情况做一介绍。

1 CAOS 基本概况

医学影像技术的发展 (如 CT、MRI 等可以显示结构复杂部位的三维结构) 虽然使医生对病人的情况做出比以前更充分、精确的评估, 然而这些图像特征并不适用于手术过程中, 术中医生主要靠二维的 X 光图像, 且有暴露于射线的危险。因此发展术中三维成像系统对部分骨科手术十分必要。手术导航的出现为上述问题提供了重要线索, 其设计原理来自全球卫星定位技术。计算机辅助外科手术 (CAS) 最早起源于神经外科的立体定向技术, 空间定位技术经历了机械手定位法, 光学定位法, 和不受光线遮挡的电磁定位法。由于空间定位技术的发展其设备对手术的影响越来越小, 逐渐被应用于脊柱外科的手术。随着医学影像技术、计算机技术的快

速发展, CAOS 经历了初期基于术前 CT 图像引导 (preoperative CT-based image guidance) 的需要手工注册的 CAOS 系统, 术中 CT 或 X 光图像引导 (intraoperative CT-based image guidance or fluoroscopy-based image guidance) 的自动注册的 CAOS 系统, 三维 C 型臂 (three-dimensional C-arm fluoroscopy) 的导航, 未来的 CAOS 系统会是自动注册匹配的基于术中真实三维图像的技术^[4, 5]。

1.1 CAOS 系统的组成 CAOS 系统可分为硬件和软件部分。各种导航的硬件组成大致相同: 包括成像设备、导航定位工具、计算机工作站等。各种导航的定位工具也大致相同: 包括动态参照基 (dynamic reference base, DRB)、校正装置 (calibration fixture)、发射器 (transmitter)、接受器 (receiver) 等。软件主要是指计算机的操作程序: 包括图像的处理、匹配算法、工具注册、定位、角度、距离的测量等操作系统。其中图像处理涉及三维重建, 图像分割, 图像融合等。软件系统是 CAOS 技术的核心。目前, 各种 CAOS 产品的软件互不兼容且不同的手术如膝关节置换、髋关节置换、椎弓根螺钉导航等要求不同的软件包。因此, 开发兼容的软硬件可能是未来 CAOS 发展的方向^[5, 6]。

1.2 CAOS 工作模式 术前采集图像, 即病人术前有关的 X 线片、CT、MRI 的图像信息输入 CAOS 系统的电脑, 通过软件包的处理进行三维构建, 根据病人的解剖信息医生可以制定术前计划和模拟手术,

置。进入手术室后在 C 型臂的影像增强器上安装校正装置, C 臂的视频光缆连接导航, 在病人身上固定发射器, 连接发射器, 接受器于导航系统。调节 C 臂与病人手术部位的距离, 获得图像信息, 配准图像, 注册工具, 计算机经过运算进行定位, 追踪器械, 显示图像, 证实工具指示的位置与导航图像上的位置相同后开始手术。不同的导航具体的操作不同, 但大致程序相似。术中导航系统跟踪手术器械, 并实时显示多维图像指导手术。由于 CAOS 的引入, 骨科医生可以更完美地解决解剖比较隐蔽、晦涩、复杂的手术^[4-6]。

2 CAOS 在脊柱外科的应用

CAOS 最早应用于椎弓根螺钉技术^[1], 从腰椎、下胸椎应用椎弓根螺钉固定到上胸椎和颈椎, 在脊柱侧弯畸形矫正、颈椎侧块螺钉技术、脊柱前路内固定系统及椎体切除等广泛推广应用, 技术日趋成熟。由于在脊柱畸形矫正、脊柱骨折等手术中解剖变异大, 个体差异明显, 椎弓根螺钉植入解剖学标志不明显, CAOS 技术可将螺钉位置不当的发生率降至最低, 因此应用 CAOS 系统比传统螺钉植入技术更精确、安全, 手术人员和病人术中暴露射线量明显减少, 手术更趋微创化^[3-6]。

2.1 腰椎 传统的腰椎弓根螺钉技术螺钉位置不当的发生率较高, Foley 等^[2]应用导航技术在 6 具尸体上从 T₁₁-S₁ 植入椎弓根螺钉没有一例穿破皮质。Kalfas 等^[3]临床应用导航在 30 名病人腰椎上共植入 150 枚螺钉, 140 枚螺钉位置都正