

文章编号: 1000- 2235(2002)04- 0466- 03

心脏移植与细胞凋亡的关系

黄瑞健(综述) 孙培吾(审校)

关键词: 脱噬作用; 心脏移植; 移植物排斥; 心肌再灌注损伤; 免疫耐受

中图分类号: R654. 2 文献标识码: A

细胞凋亡(apoptosis,又称为程序性细胞死亡,PCD)的概念最早于1972年由Kerr等首次提出的,它是机体内衰老的、无用的或某些损伤细胞死亡的一种不同于细胞坏死的特殊的细胞死亡形式^[1]。近年来随着分子生物学技术的发展,国内外对细胞凋亡的研究不断深入,大量的实验和临床资料均表明细胞凋亡具有重要的生物学意义,并且已证实心脏移植过程中的重要环节即缺血再灌注损伤、移植后的排斥反应及免疫耐受等均与细胞凋亡及其调控基因存在密切关系。笔者就心脏移植过程中缺血再灌注损伤、免疫排斥及耐受与细胞凋亡之间的关系作一阐述,为研究细胞凋亡与器官移植相关性作一探讨。

1 细胞凋亡与心脏移植时缺血再灌注(I/R)损伤的关系

心脏移植过程中存在的I/R损伤是影响心脏移植早期及远期疗效的重要环节之一,减轻I/R损伤对于提高移植术后的疗效至关重要。心外科中I/R的研究已开展多年,并证实其与氧自由基和“钙超载”有关。但随着对细胞凋亡的深入研究,人们又发现凋亡在其中起了重要的作用^[2]。Formigli等在大鼠心脏移植实验中发现恢复再灌注后除了移植心脏细胞凋亡增加外,还发现血管内皮细胞亦同样有凋亡,而对照组未见或仅见少量阳性凋亡细胞,说明细胞凋亡参与了心脏移植后的I/R损伤^[3]。Musall-Marcu等在体外灌注大鼠心脏发现其早期即可发生心肌细胞凋亡,并且抑制凋亡则伴随着心功能的恢复,提示心肌细胞凋亡参与心功能衰竭过程的形成^[4]。Gottlieb亦经过实验证实了再灌注损伤使心肌细胞凋亡,而在实验动物心肌缺血前给予胰岛素样生长因子-1(IGF-1)或抑制凋亡的bcl-2基因产物,可明显减轻I/R引起的细胞凋亡^[5];更进一步的研究是Fliss等对大鼠进行再灌注实验时,发现持续缺血组心肌缺血2.5h细胞凋亡明显,而再灌注组缺血45min,再灌注仅1h细胞凋亡就非常明显,认为凋亡主要是由缺血造成,而再灌注加重并加快凋亡的产生,因此再灌注对于细胞凋亡的形成更起关键性作用^[6]。

此外,人们对I/R损伤致细胞凋亡的基因调控机制的研究也取得进展。许多资料说明细胞凋亡的触发是一个级联式

基因表达的结果,许多基因参与这些过程。目前已知的有ced基因家族、bcl-2白介素 β 转化酶基因家族、p53 Fas FasL、c-myc Jun c-fos myb基因等^[7]。近期人们又发现还与Caspase-3径路、一氧化氮合成酶(eNOS)、核转录因子等明显有关。Grunfelder等在大鼠心脏移植前2h每只供体和受体腹部注射DEV D-CHO(一种caspase-3抑制剂)500mg,用RT-PCR和ELISA技术,结果示缺血30min,再灌注48h后,出现bcl-2 mRNA表达的明显上调,TNF α 下降至基础值,认为阻断Caspase-3径路能减轻再灌注损伤,其机制是通过上调bcl-2和抑制TNF α 的表达^[8]。Iwata等在兔同种异体心脏移植实验中,于移植前把包含有eNOS基因的脂质体注入供体冠脉循环中,24h后供体钙依赖性亚硝酸盐产物比对照组明显增加,心肌间中性粒细胞和T淋巴细胞数仅为对照组的一半,血管内皮细胞和心肌细胞周围的核转录因子(NF-kb)激活,血管内皮细胞粘附分子-1和细胞间粘附分子-1的表达比对照组明显下降($P < 0.01$)。认为通过术中脂质体介导的eNOS转染能减少心脏移植I/R损伤,机制是通过抑制NF-kb激活、粘附分子的表达和早期白细胞浸润^[9]。

2 细胞凋亡与心脏移植排斥反应的关系

近年来的研究发现,心脏移植中排斥反应与细胞凋亡的产生及其基因表达调控有关。Oh Si等人应用RT-PCR技术和免疫组织化学方法,检测了人心脏移植在排斥和非排斥状态心内膜活检标本上的Fas及FasL的表达,发现两种状态下的标本均有Fas表达,但是FasL的表达在排斥组明显高于非排斥组($P < 0.05$),而且FasL还在移植物中的各种浸润细胞上表达,认为这种FasL的上调可能是人类心脏移植排斥过程中心肌细胞凋亡产生的机制^[10]。Dong也检测了12例同种异体心脏移植的冠状动脉,发现10例存在冠状动脉病的患者和另外14个正常动脉中的细胞凋亡和Fas表达,所有同种异体心脏移植的冠状动脉中大多数内皮细胞,大量浸润淋巴细胞及巨噬细胞上都有Fas染色且Fas阳性的内皮细胞中出现凋亡现象,浸润淋巴细胞和巨噬细胞中凋亡细胞的增加情况与排斥的严重程度有关^[11]。实验表明,在大鼠心脏移植中发现同种异体急性排斥反应中心肌细胞,巨噬细胞和内皮细胞均存在凋亡现象,并且发现凋亡程度与NO诱导酶(iNOS)的表达相平行,从NOS-2释放的NO可导致炎

并且心肌细胞成串样分布于心肌动脉周围。Xu 等人在研究慢性心脏排斥病理过程中发现,凋亡存在于动脉壁和血管周围区域,用双标记显示凋亡细胞包括 T 细胞 (CD_3^+) 单核细胞/巨噬细胞 (CD_{68}^+) 和血管内皮细胞 (VWF),微量法分析可显示凋亡相关的 caspases 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (其中 caspases 8 9 和 10 上升显著),在凋亡细胞的区域可见 Fas 及 FasL 的表达,而 bcl-2 免疫反应阳性区域却很少有凋亡细胞,认为凋亡细胞包括 T 细胞、单核细胞/巨噬细胞和血管内皮细胞可能是通过 Fas/FasL 系统起作用,凋亡参与了慢性心脏排斥病理过程^[16]。

人们认为同种异体心脏移植的排斥反应时细胞凋亡具有其特性^[17]:包括细胞凋亡在移植后 3~5 天达到高峰,此后逐渐减少,但是整个急性反应期仍持续存在;凋亡的心肌细胞孤立散在分布且大多分布于心肌间质;急性排斥反应时细胞凋亡可以不重,这可能与细胞凋亡发生快而且凋亡细胞消失也快,即被清除的快有关。钟氏经实验证实了这一点,还发现未发生排斥反应时组织切片中也可见少量凋亡细胞,认为可能与移植心的冷保存和 I/R 有关^[18]。

细胞凋亡发挥其生物学效应的机制可能与两个方面有关:(1)通过颗粒胞吐途径即细胞毒性 T 细胞 (CTL) 攻击靶细胞,诱导靶细胞凋亡的过程中通过穿孔素依赖的颗粒胞吐 (granule-exocytosis) 途径^[19]。在该途径中,TCR 活化导致裂解颗粒释放,裂解颗粒内含有穿孔素和被称为粒酶的丝氨酸蛋白酶,当器官移植发生急性排斥时,激活的 CTL 含有大量的颗粒并且 CTL 颗粒中的内容物胞吐到 CTL 和靶细胞之间的细胞间隙,在 Ca^{2+} 存在下,穿孔素分子聚合,增加了细胞膜的通透性并在靶细胞上钻孔,使粒酶 (主要是颗粒酶 B) 进入靶细胞内,激活内切酶系统致靶细胞的 DNA 断裂,产生细胞凋亡。(2) Fas 途径^[20]。Fas 属于 TNF 受体超家族, Fas 受体含有一个泡内死亡结构区域,若与其配体如 FasL 或抗 Fas 抗体等类似物结合,可使膜上表达 Fas 的细胞凋亡。因此这些与排斥相关的凋亡基因等物质的变化也可作为监测急性排斥的一个指标。但是单纯 FasL 的变化尚非排斥的诊断的敏感指标,若 Fas/FasL、粒酶 B 同步增高时则可当作同种异体移植的高敏感、高特异指标。

3 细胞凋亡与心脏移植免疫耐受形成的关系

近年来随着对移植免疫耐受与细胞凋亡研究的加强,人们对这两者之间的相互关系的认识也进入了一定的深度^[21]。研究结果表明,器官移植后间质浸润的 CTL 可能是移植排斥效应途径中的重要成分,其凋亡可能与免疫耐受的诱导有关^[22]。Alexander 等实验证明, CD_8^+ T 细胞的凋亡优先被高浓度的抗原所触发,抗原作用于 T 细胞表面具有较高亲和力的 TCR 引起 T 细胞的凋亡^[23]。一些实验也发现 FasL 的持续表达可阻断移植器官免疫浸润淋巴细胞的攻击。Luo 把二肽酮酸 (DPBA, 一种能减轻心肌细胞凋亡的蛋白酶抑制

天或每天 1 mg/kg, 连续 4 天, 然后每天 0.5 mg/kg, 连续 12 天, 分别能延长移植心脏存活达 35.5 天和 36.2 天, 而对照组仅 7.3 天, 差异显著; 若于移植后 72 h 按每天 1 mg/kg, 连续应用 4 天, 也能延长移植心存活达 19.8 天, 且无肝、肾、胰、心脏的毒副作用, 被认为这可能是较佳的治疗心脏移植排斥的新措施^[24]。

目前对细胞凋亡与心脏等器官移植耐受的作用机制提出了两种观点, 其一是否决现象^[25], 即在某些生理条件下, 当 T 淋巴细胞借助自己的抗原特异性受体与携带自身抗原的另一个 T 淋巴细胞即否决细胞结合时, 能启动否决信号, 使具有自身反应性的细胞克隆经凋亡而清除。其二是免疫特赦^[26], 即 FasL 大量存在可特赦区并与进入该区的活化淋巴细胞上高度表达的 Fas 抗原结合, 导致淋巴细胞的凋亡, 从而维持这些区域的特赦。

4 心脏移植中可应用的细胞凋亡检测手段

早期细胞凋亡检测主要靠形态学特征, 即经典方法, 依靠光镜和电镜对组织和细胞进行各种染色观察。其次是根据生化原理来检测, 这是因为细胞凋亡时, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖的内源性核酶的激活将 DNA 双螺旋结构由核小体间连接区断裂, 形成约 180~200 bp 或多聚体的核苷酸片段, 用琼脂糖凝胶电泳后呈现 DNA 梯形圈即 DNA ladder 方法, 若断裂的片断 > 200 bp 碱基对, 可用脉冲场倒转琼脂糖凝胶电泳和微琼脂技术^[27]。近年来国内外最常用的原位末端标记技术即是利用渗入到凋亡细胞中的外源性核苷酸在某种酶的催化下结合到 DNA 断裂口, 通过显示系统使之显示出来^[28]。亦有利用流式细胞仪 (FCM) 的方法, 利用一些 DNA 结合荧光染料对其 DNA 进行染色, 通过 FCM 可将凋亡细胞检测出来, 染色方面包括 PI 单染色, FITC Annexin V /PI 双染色等。

现阶段大多数学者认为细胞凋亡是引起心脏移植植物组织损伤的一个重要因素。一方面, 在心脏移植急性和慢性排斥过程中, 人们可监测有关细胞凋亡及其影响基因的变化, 提高了人们无创性诊断移植排斥的水平。通过观察细胞凋亡及相关基因的变化, 尤其是穿孔素和粒酶 B 的变化, 有助于诊断是否存在排斥现象^[29]。Nnarula 发现细胞凋亡时细胞膜的成分之一磷脂酰丝氨酸受损 (磷脂正常时可限制细胞内容物的外溢), 用得 ^{99m} 标记的 Annexin-V (是一种内源性蛋白, 能高效地与磷脂酰丝氨酸结合, 已被用于经静脉注射作为无创性鉴定细胞凋亡的方法) 来检测临床心脏移植病人的细胞凋亡状况, 结果示 Annexin-V 阳性者均有至少中度移植排斥和 caspase-3 染色阳性, 提示凋亡存在于所检测的对象中, 该方法简单、无侵入性, 便于临床推广^[30]。另一方面, 根据凋亡及凋亡相关基因发挥生物学的机制, 若在心脏移植过程中的缺血再灌注及移植后尽量减少心肌细胞凋亡的形成, 则可能有利于保护移植心的结构与功能^[2]; 而应用 FasL 抗体等方法能促进活化 T 淋巴细胞 (CTL) 等的凋亡将可能是预防和

者报道了川芎嗪能抑制再灌注大鼠心肌细胞凋亡及 *c-fos* 基因的表达^[31]; 单体人参皂甙 Rb1 对成年大鼠心肌缺血再灌注时凋亡减少明显, 能有效地保护心肌^[32], 这些中药临床上也常用于治疗心脑血管疾病等, 也可能推广应用心脏移植中, 提高手术后的疗效。

参考文献:

- [1] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR, et al. Apoptosis—a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239~257.
- [2] Katori M, Buelow R, Ke B, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway [J]. *Transplantation*, 2002, 73(2): 287~292.
- [3] Formigli L, Ibbi-Manneschi L, Pema AM, et al. Ischemia-reperfusion-induced apoptosis and P53 expression in the course of rat heterotopic heart transplantation [J]. *Microvasc Res*, 1998, 56(3): 277~281.
- [4] Musal-Marcu S, Guater HE, Fugduitt BC, et al. Inhibition of apoptosis after ischemia reperfusion in rat myocardium by cycloheximide [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31(5): 1073~1082.
- [5] Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes [J]. *J Clin Invest*, 1994, 94(4): 1621~1628.
- [6] Fliss H, Gattlinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium [J]. *Circ Res*, 1996, 79(5): 949~956.
- [7] 陈实. 移植免疫学 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 30~33.
- [8] Grunfelder J, Miniati DN, Murata S, et al. Upregulation of bcl-2 through caspase-3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat cardiac allografts [J]. *Circulation*, 2001, 104(12 Suppl 1): 202~206.
- [9] Iwata A, Sai S, Nitta Y, et al. Liposome-mediated gene transfection of endothelial nitric oxide synthase reduces endothelial activation and leukocyte infiltration in transplanted hearts [J]. *Circulation*, 2001, 103(22): 2753~2759.
- [10] Oh Si, Kim IW, Jung HC, et al. Correlation of Fas and Fas ligand expression with rejection status of transplanted heart in human [J]. *Transplantation*, 2001, 71(7): 906~909.
- [11] Dong C. Human transplant coronary artery disease: pathological evidence for Fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy [J]. *Laborat Invest*, 1996, 74(5): 921~931.
- [12] Bergese SD, Klenotic SM, Wakely MZ, et al. Apoptosis in murine cardiac grafts [J]. *Transplantation*, 1997, 63(2): 320~325.
- [13] White WL, Zhang YL, Shelly J, et al. Myocardial apoptosis in a heterotopic murine heart transplantation model of chronic rejection and graft vasculopathy [J]. *J Heart Lung Transplant*, 1997, 16(2): 250~255.
- [14] 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 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2001, 35(4): 263~267.
- [15] 李天发, 于波, 张瑶, 等. 川芎嗪对再灌注大鼠心肌细胞 *c-fos* 基因表达及凋亡的影响 [J]. 心脏杂志, 2000, 12(3): 213~215.
- [16] Xu B, Sakas LI, Siachta CA, et al. Apoptosis in chronic rejection of human cardiac allografts [J]. *Transplantation*, 2001, 71(8): 1137~1146.
- [17] 胡野, 凌志强, 单小云. 细胞凋亡的分子医学 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2002. 273~288.
- [18] 钟红兴, 韩辉, 章咏裳, 等. 大鼠心脏移植的细胞凋亡及其与急性排斥的关系 [J]. 中华器官移植杂志, 2000, 21(3): 153~155.
- [19] Pham CTN, Ley TJ. The role of granzyme B cluster proteases in all-mediated cytotoxicity [J]. *Seminars Immunol*, 1997, 9(2): 127~133.
- [20] Chinaiyan AM, KO Kouke M, Dixit VM, et al. FADD, a novel death domain containing protein interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis [J]. *Cell*, 1995, 81(4): 505~512.
- [21] 龚非力. 同种器官移植免疫耐受的研究进展 [J]. 中华器官移植杂志, 1998, 19(3): 129.
- [22] Qian S, Lu L, FU F, et al. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction [J]. *J Immunol*, 1997, 158(10): 4654~4661.
- [23] Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Sarin A, et al. Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL [J]. *J Exp Med*, 1996, 184(2): 485~492.
- [24] Luo H, Wu Y, QI S, et al. A proteasome inhibitor effectively prevents mouse heart allograft rejection [J]. *Transplantation*, 2001, 72(2): 196~220.
- [25] George JF, Thomas JM. The molecular mechanisms of veto-mediated regulation of alloresponsiveness [J]. *J Mol Med*, 1999, 77(7): 519~526.
- [26] Griffith TS. The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege [J]. *Immunol Today*, 1997, 18: 240~244.
- [27] 谭晓华, 张亚历, 周殿元, 等. 细胞凋亡的方法学研究进展 [J]. 肿瘤, 1997, 17(5): 288~291.
- [28] Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z, et al. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cell by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(7): 1945~1951.
- [29] Legros-Maida S, Soulie A, Benvenuti C, et al. Granzyme B and perforin can be used as predictive markers of acute rejection in heart transplantation [J]. *Eur J Immunol*, 1994, 24(1): 229~233.
- [30] Narula J, Acio ER, Narula N, et al. Annexin-V imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection [J]. *Nat Med*, 2001, 7(12): 1847~1852.
- [31] 李源, 段红, 王天成, 等. 川芎嗪对再灌注大鼠心肌细胞 *c-fos* 基因表达及凋亡的影响 [J]. 心脏杂志, 2000, 12(3): 213~215.
- [32] 张文健, 张文杰, 李英骥, 等. 单体人参皂甙 Rb1 对成年大鼠