

· 基础研究 ·

细胞间黏附分子 1 与血管细胞黏附分子 1 在心脏移植慢性排斥反应中的表达及意义

赵鑫 宋光民 徐巨林 王绪健 宋惠民 曲迅

【摘要】 目的 研究细胞间黏附分子 1(ICAM-1)与血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)在心脏移植慢性排斥反应中的表达及作用。**方法** 采用供体脾细胞(SPC)和环磷酰胺(CP)预处理移植受体,然后行异位心脏移植术,免疫组织化学检测移植心脏中 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达。**结果** SPC 和 CP 预处理后,移植心脏中 ICAM-1、VCAM-1 的表达水平明显减低,而 ICAM-1 和 VCAM-1 在急性排斥反应和环孢素 A(CsA)治疗组中的表达明显增强(均 $P < 0.05$)。急性排斥反应与 CsA 治疗组比较差异无统计学意义。**结论** ICAM-1 和 VCAM-1 的表达水平与心脏移植排斥反应的程度密切相关。

【关键词】 心脏移植; 胞间黏附分子 1; 血管细胞黏附分子 1; 移植排斥; 大鼠

Expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule in cardiac allografts and significance thereof; experiment with rats ZHAO Xin, SONG Guang-min, XU Ju-lin, WANG Xu-jian, SONG Hui-min, QU Xun. Department of Cardiovascular Surgery, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China

Corresponding author: SONG Guan-min, Email: songgm@sdu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in allograft with chronic rejection (CR) after heart transplantation. **Methods** Seventy-two SD rats receiving transplantation of the hearts of 71 Wistar rats were divided into 4 equal groups: Group A, undergoing heterotopic cervical heart transplantation (transplanted with donor's heart subcutaneously at the neck) and receiving none intervention, and with the transplanted hearts taken out 3 d after transplantation to the end of CR; Group B, injected intravenously with the splenocytes (SPCs) of the donors on day 0, injected with cyclophosphamide (CP) on d2, transplanted with the donor hearts on d15, with the transplanted hearts taken out 15 - 120 days after transplantation; Group C, transplanted with the donor's heart and injected intraperitoneally with cyclosporine A (CsA) 10 mg/kg every other day for 8 - 10 times, and with the transplanted hearts taken out 60 d after transplantation to the end of CR; and Group D, injected intravenously with the SPCs of the donors on day 0, injected with CP on d2, transplanted with the donor hearts on d15, with the transplanted hearts taken out 150 - 420 days after transplantation. Immunohistochemical method was used to detect the expression of ICAM-1 and VCAM-1 in the allografts. **Results** The cardiac allograft survival time of Group B was the longest. Less ICAM-1 and VCAM-1 expression and lymphocyte infiltration were observed in SPC and CP-pretreated group. Conversely, protein expression levels of ICAM-1 and VCAM-1 were both high and significant lymphocyte infiltration was seen in Groups B and D. There was no significant difference in the expression of ICAM-1 and VCAM-1 between Groups A and C ($P > 0.05$). **Conclusion** The expression levels of ICAM-1 and VCAM-1 are associated with the occurrence and development of rejection and have positive correlation with the severity of graft rejection. Determination of ICAM-1 and VCAM-1 can predict the function of allograft and provide evidence for early diagnosis and prevention of CR.

【Key words】 Heart transplantation; Intercellular adhesion molecule-1; Vascular cell adhesion molecule-1; Graft rejection; Rats

细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 及血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 与同种

异体器官移植排斥反应联系密切,但与慢性排斥反应(chronic rejection, CR)的关系还不十分明确。本研究采用供体脾细胞(splenocyte, SPC)和环磷酰胺(cyclophosphamide)预处理移植受体,诱导受体对移植物的免疫耐受,通过对同种异体移植心脏组织中 ICAM-1 和 VCAM-1 表达状况的检测,探讨二者表达水平与移植心脏 CR 的关系。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31050131);山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(02BS093)

作者单位:250012 济南,山东大学齐鲁医院心血管外科

通讯作者:宋光民,Email:songgm@sdu.edu.cn

一、材料与方法

1. 实验动物和试剂:健康近交系封闭群 Wistar 大鼠为供体,SD 大鼠为受体,各 72 只,体重 180 ~ 250 g,雌雄不限。分别购于山东省实验动物中心和山东大学医学院实验动物中心。兔抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体、兔抗大鼠 VCAM-1 单克隆抗体和免疫组化染色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

2. 受体鼠的预处理和心脏移植术:将制备好的供体脾细胞(splenocyte, SPC) $5 \sim 10 \times 10^7$ 个自 SD 大鼠的尾静脉内注入(d_0),第 2 天注入环磷酰胺,雌性 50 mg/kg,雄性 80 mg/kg。采用颈部心脏移植模型^[1],将供心的无名动脉和肺动脉分别与受体的右颈总动脉和右颈外静脉行套管法连接,将供心移植于受体的右侧颈部皮下。

3. 实验分组:A 组(急性排斥反应组),供、受体均未用任何干预措施。B 组, d_0 :SPC; d_2 :环磷酰胺; d_{15} :心脏移植术。术后 15 ~ 120 d 取下移植心脏。C 组[环孢素 A (cyclosporine A, CsA) 组],供、受体术前未做任何预处理,手术当日开始用 CsA 10 mg/kg,每 2 d 1 次,共 8 ~ 10 次,腹腔内注入。D 组, d_0 :SPC; d_2 :环磷酰胺; d_{15} :心脏移植术。术后 150 ~ 420 d 取下移植心脏。B、D 两组均为免疫耐受组,A 组在术后 3 d 至排斥终末、C 组在术后 60 d 至排斥终末时取下移植心脏^[2]。

4. 标本的采集与组织制片:为了更好地将 A 组与 B 组、C 组与 D 组进行对比分析,B 组受体被较早处死,B、D 两组在取移植心脏时受体仍然存活,移植心脏仍在跳动。取下的移植心脏均放入质量浓度为 10% 的甲醛溶液内浸泡固定。将移植心脏沿心室长轴的水平面切开以便观察冠状动脉的断面,石蜡包埋切片,采用 HE、VG 及 Masson 染色,同时做免疫组织化学检测,光镜观察,诊断标准参照国际心脏

移植学会 (ISHT) 的心脏免疫排斥病理工作分类法^[3],存在以内膜增厚为特征的血管病即可诊断 CR^[4]。

5. 免疫组化染色步骤:采用免疫组化 SABC 法检测:(1)将石蜡切片脱蜡、水化,阻断内源性过氧化物酶。(2)热修复抗原:将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH6.0),微波炉加热至沸腾后断电,间隔 5 ~ 10 min 后,反复 1 ~ 2 次,冷却后磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗。(3)5% 山羊血清封闭。(4)加一抗 4 °C 过夜。一抗分别为兔抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体 (1:200)、兔抗大鼠 VCAM-1 单克隆抗体 (1:100)。(5)用 PBS 冲洗后加生物素化山羊抗兔二抗,37 °C 孵育 10 ~ 15 min。(6)PBS 冲洗后加链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物,37 °C 孵育 10 ~ 15 min。(7)PBS 冲洗后镜下控制 DAB 显色。(8)蒸馏水洗涤,苏木素复染,脱水后封片。

6. 图像分析定量研究:OLYMPUS-IX81 电动倒置显微镜下摄取图像。ICAM-1 和 VCAM-1 的表达采用 Image Pro Plus 5.0 图像分析软件 400 倍光镜下计数每张切片单位视野内的积分光密度 (IOD)。每张切片随机选取 10 个视野,取其平均值。

7. 统计学方法:应用 SPSS13.0 软件分析。各组间进行单因素方差分析后行 q 检验。

二、结果

1. 移植心脏组织病理学改变:Masson 染色的组织切片上,胶原纤维被染成绿色,肌纤维染成红色。根据胶原纤维含量的不同,将排斥反应的程度分为 3 级,即轻度:纤维化范围 $< 1/3$;中度:纤维化范围占心肌的 $1/3 \sim 2/3$;重度:纤维化范围 $> 2/3$ ^[2]。A 组平均存活时间为 (7.2 ± 2.4) d,镜下观察移植心肌间质内可见大量细胞浸润,存在局限或大片坏死灶,各级冠状动脉内膜出现明显的增生,外膜炎性细胞浸润,中外层玻璃样变性。C 组移植心脏的平均

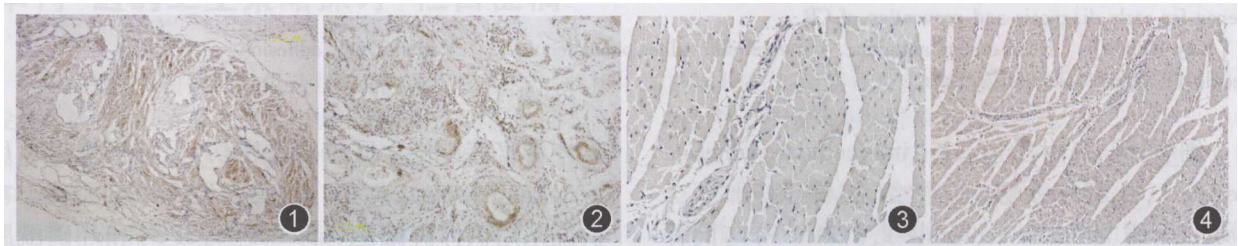


图 1 ICAM-1 在 A 组移植心脏中的表达,心肌纤维化明显,肌纤维排列紊乱,可见心肌纤维及间质广泛黄染 DAB $\times 200$ 图 2 VCAM-1 在 C 组移植心脏血管壁中的表达,心肌纤维化明显,肌纤维排列紊乱,可见心肌纤维、间质广泛黄染,血管壁高密度黄染, DAB $\times 200$ 图 3 ICAM-1 在 B 组移植心脏中的表达,心肌纤维排列基本正常,几乎无黄染 DAB $\times 400$ 图 4 VCAM-1 在 D 组移植心脏心肌中的表达,心肌纤维化轻度,肌纤维排列基本正常,未见明显黄染区 DAB $\times 400$

存活时间为 (110 ± 73) d, 镜下观察细胞外基质 (ECM) 成分占多数, 心肌纤维化严重。B、D 两组镜下移植心脏大体结构基本正常, 有时可见近似三级淋巴结的局限淋巴细胞团^[5], 冠状动脉主干及各级分支动脉内膜不同程度增厚呈向心性狭窄。排斥反应的程度 A 组较 B 组、C 组较 D 组均严重^[2]。

2. 移植心脏 ICAM-1、VCAM-1 的表达: 二者的表达状况基本相似, 各组移植心脏的心肌细胞、血管内皮细胞及周围间质均可见表达, VCAM-1 的表达部位以血管壁及血管周围间质为主。在 A、C 两组中二者表达明显且广泛 (图 1, 2), B、D 组二者表达散在且微弱 (图 3, 4)。将各组的表达情况进行比较表明, 二者变化趋势基本一致: A 组与 B、D 组比较差异均有统计学意义, C 组与 B、D 组比较差异也有统计学意义; 而 A 组与 C 组, B 组与 D 组比较差异均无统计学意义 (表 1)。

表 1 ICAM-1、VCAM-1 在各组移植心脏组织中的 量化表达 IOD 值 (×10 ⁷)			
组别	鼠数	ICAM-1	VCAM-1
A 组	9	1.38 ± 0.64	1.32 ± 0.66
B 组	9	0.35 ± 0.28	0.30 ± 0.23
C 组	9	0.83 ± 0.71	1.25 ± 0.99
D 组	9	0.32 ± 0.28	0.59 ± 0.17
F 值		5.476	6.698
P 值		0.002	0.001

注: ICAM-1、VCAM-1 的表达程度分级: IOD < 0.4 × 10⁷ 为低度, > 0.8 × 10⁷ 为高度, (0.4 ~ 0.8) × 10⁷ 为中度

三、讨论

移植 CR 的特点为移植纤维化和血管病变, 是不可逆的病理过程^[6], 其发病机制中黏附分子起着重要作用。ICAM-1 和 VCAM-1 是细胞间及细胞与 ECM 间相互作用的信号分子, 参与免疫介导的连锁反应。ICAM-1 的表达谱极广, 其配体是淋巴细胞功能相关抗原-1 (lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1)。ICAM-1 在移植心脏中与 LFA-1 识别后, 可通过细胞间的黏附作用协调抗原依赖性 T 淋巴细胞的运输和激活。VCAM-1 主要在内皮细胞、树突状细胞和巨噬细胞上表达, 与其配基很晚期抗原-4 (very late antigen-4, VLA-4) 结合作为激活 T 细胞的第二信使^[7]。当效应 T 细胞激活后即可发挥其细胞毒作用并释放大炎症性介质、细胞因子等^[8], 参与免疫识别、趋化、黏附及侵入等环节, 破坏心肌细胞、血管内皮细胞, 启动平滑肌的病理性修复, 促进内膜和平滑肌的增生。移植心肌局部 ICAM-1 和 VCAM-1 的强烈上调可能与细胞上配受

体间相互作用的正反馈调节有关^[9]。如此局部炎症可持续发展, 从而导致移植心脏的纤维化和血管硬化。

虽有研究表明 ICAM-1 和 VCAM-1 与急性排斥反应有一定的关系^[10], 但在 CR 中的作用尚待研究。本实验采用 CsA、供体脾细胞和环磷酰胺等治疗移植受体, 建立了不同排斥反应的大鼠同种异体心脏移植的动物模型, 在我们前期研究工作的基础上, 对移植心脏组织的 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达情况进行分析, 结果证实 ICAM-1 和 VCAM-1 在各移植组中均呈阳性表达, 其表达程度与移植心肌纤维化和移植心脏血管病的病变程度密切相关, ICAM-1 和 VCAM-1 的表达贯穿于整个排斥反应的过程之中。通过测定受体移植心脏中 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达水平可以预测移植心肌纤维化和移植心脏血管病的病变程度, 从而为 CR 的早期诊断、预防和治疗提供理论基础和依据。至于黏附分子和排斥反应确切的因果关系, 还需要进一步的探讨。

参 考 文 献

[1] 宋光民, 宋惠民, 李德才, 等. 套管法建立大鼠颈部心脏移植. 中华器官移植杂志, 2000, 21:218-219.

[2] 杨长征, 宋光民, 徐巨林, 等. 大鼠移植心脏心肌纤维化的实验研究. 中华胸心血管外科杂志, 2001, 17:294-295.

[3] Billingham ME, Cary NRB, Hammond ME, et al. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection. J Heart Lung Transplant, 1990, 9: 587-593.

[4] Chalasani G, Li Q, Konieczny B, et al. The allograft defines the type of rejection (acute versus chronic) in the face of an established effector immune response. J Immunol, 2004, 172: 7813-7820.

[5] Baddoura FK, Nasr IW, Wrobel B, et al. Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection. Am J Transplant, 2005, 5:510-516.

[6] Mitchell RN. Allograft arteriopathy: pathogenesis update. Cardiovasc Pathol, 2004, 13:33-40.

[7] Kurkijarvi R, Jalkanen S, Isoniemi H, et al. Vascular adhesion protein-1 (VAP-1) mediates lymphocyte-endothelial interactions in chronic kidney rejection. Eur J Immunol, 2001, 31:2876-2884.

[8] Hribova P, Kotsch K, Brabcova I, et al. Cytokines and chemokine gene expression in human kidney transplantation. Transplant Proc, 2005, 37:760-763.

[9] Alam AKMS, Florey O, Weber M, et al. Knockdown of mouse VCAM-1 by vector-based siRNA. Transpl Immunol, 2006, 16: 185-193.

[10] Rothman A, Mann D, Behling CA, et al. Increased expression of endoarterial vascular cell adhesion molecule-1 mRNA in an experimental model of lung transplant rejection: diagnosis by pulmonary arterial biopsy. Transplantation, 2003, 75:960-965.