

# 细胞凋亡与肺移植术的研究进展

江科 王建军

[摘要] 细胞凋亡即程序性细胞死亡,其在器官移植中的作用研究正日渐成为现代移植免疫病理学的热点之一。细胞凋亡与供肺保存、缺血再灌注损伤、移植肺排斥反应均密切相关。抗细胞凋亡治疗有血红素加氧酶、预处理、转基因,它们均可在肺移植中充分应用。

[关键词] 细胞凋亡; 肺移植

[中图分类号] R655.3 [文献标识码] A [文章编号] 1005-6483(2006)01-0040-03

细胞凋亡,亦称为程序性细胞死亡,是细胞在一定的生理或病理条件下,遵循自身程序,在细胞基因调控下的一种自主性的自杀现象。细胞凋亡在许多领域均有重要作用,对其在器官移植中的作用研究正日渐成为现代移植免疫病理学的热点之一。

## 一、细胞凋亡与供肺保存

低温保存可降低移植器官的新陈代谢而保存其活力,是器官移植成功与否的关键因素。尽管低温可增强移植植物对缺血的耐受性,但低温本身也可引起组织细胞损害,细胞凋亡在心、肝等实体器官冷保存所引起的组织细胞损害中发挥重要作用。国内外多项研究表明,在冷灌注液中心、肝保存时间越长,其产生的细胞凋亡数目相对较多,进而影响移植器官功能的正常发挥。但细胞凋亡在肺灌注保存液中引起的细胞损害与心、肝等器官有所不同。Fischer 等<sup>[1]</sup>研究发现各种形式的冷保存液中供肺保存 1~5 h 很难发现凋亡细胞,并且在缺血期凋亡细胞仍很少。后来他在鼠的肺移植研究中进一步发现将鼠肺保存在 4℃ 保存液中分别 20 min、6 h、12 h,少于 2% 的细胞死亡,但将其时间延长至 18 h、24 h,却有 11% 和 27% 的细胞死亡,并且死亡的主要形式不是凋亡而是坏死<sup>[2]</sup>。因此单纯延长供肺的保存时间不会导致供肺的细胞凋亡率提高,但是冷缺血时间长短将影响供肺的细胞坏死程度,从而影响供肺的生理功能,所以目前常规供肺保存

时间为 6~8 h。对于冷缺血期不诱导肺细胞凋亡产生,Fischer 等认为与低温下细胞膜的代谢率较低有关,但与心、肝等实体器官的差异仍不清楚。

## 二、细胞凋亡与供肺缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R) 损伤

近年来,国内外学者大量研究发现,细胞凋亡参与了供肺 I/R<sup>[3]</sup>。肺细胞凋亡是 I/R 后移植肺功能障碍甚或原发性无功能可能的重要原因之一。与缺血期相比,肺细胞凋亡主要发生在再灌注期。Kwon 等<sup>[4]</sup>在犬的同种单肺移植实验中发现,在 10℃ 保存 20 h(缺血期)行活检其肺细胞凋亡指数远低于再灌注后 2 h 的肺细胞凋亡指数。并且有研究发现移植肺细胞凋亡率与再灌注时间成动态变化,Stammler 等<sup>[5]</sup>在原位同基因鼠的单肺移植研究中发现,将鼠肺保存 18 h 后,分别再灌注 2 h、4 h、8 h、12 h 后再用 TUNEL 法检测,其肺细胞凋亡率在再灌注 2 h 达高峰为 16.8%±2.2%,后依次递减,因此他们认为细胞凋亡发生在肺移植早期。Fischer 等<sup>[1]</sup>在 20 例人肺移植标本活检中研究发现,从再灌注 30 min 到 2 h,供肺细胞凋亡率从 16.6% 升至 34.9%,并且大多数凋亡细胞是 II 型肺泡细胞。肺细胞凋亡虽然发生在再灌注期,但与肺缺血时间长短仍密切相关。Fischer 等<sup>[2]</sup>将鼠肺置于 4℃ 保存液中 6、12、18、24 h 后移植再灌注 2 h,发现在 6 h 组和 12 h 组接近 30% 的细胞发生凋亡,少于 2% 的细胞坏死;但在 18 h 组和 24 h 组中却有 21% 与 29% 的细胞发生坏

标志氧饱和度呈负相关。

细胞凋亡不仅参与了供肺的 I/R 损伤,而且在心、肝、肾等实体器官中普遍存在。它在 I/R 损伤中的作用和影响值得进一步研究。肺 I/R 损伤与其细胞凋亡的具体机制不完全清楚,其可能与氧自由基激活、细胞内钙离子超载、线粒体破坏有关。同时有学者研究发现它与蛋白酪氨酸磷酸化(PTP)有关。Keshavjee 等<sup>[6]</sup>研究发现 PTP 活性在肺移植后再灌注前显著增强,但再灌注 2 h 后其 PTP 活性显著下降。SRC 蛋白酪氨酸激酶(PTK)在再灌注期间下降 50% 左右,与之相对应的是 SRC 蛋白和人肌动联合蛋白活性下降。PTP 活性在再灌注 2 h 后逐步恢复正常,这与其他学者研究发现再灌注 2 h 后细胞凋亡达高峰相一致。PTP 和 PTK 活性的动态变化可以解释肺 I/R 后其细胞凋亡的动态变化。

## 三、细胞凋亡与移植肺排斥反应

许多研究表明,细胞凋亡广泛存在于器官移植排斥反应中,包括同种移植及异种移植的超急性排斥、急性排斥和慢性排斥。无论是动物实验还是临床移植物活检标本的检测,均可见发生排斥反应时移植物中存在细胞凋亡。

肺移植后发生慢性排斥反应,其远期最常见的并发症是闭塞性细支气管炎,其排斥反应的靶区是移植肺的支气管上皮。有研究者在猪的异位支气管移植模型中研究发现,其闭塞性细支气管炎的发生与其支气管上皮细胞的凋亡相关联,其上皮细胞凋亡指数很高(>

细胞凋亡指数较低( $<1\%$ ),与之相伴随的是上皮保存较好<sup>[7]</sup>。因此,上皮细胞的凋亡是肺移植后发生慢性排斥反应造成闭塞性细支气管炎的重要机制之一。

在器官移植排斥反应中,主要是细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)介导的细胞毒作用,而这种细胞免疫介导的靶细胞损害作用正是通过细胞凋亡途径而实现的。细胞凋亡参与器官移植免疫排斥反应机制涉及的因素较多,目前认为 CTL 通过两种途径来攻击靶细胞,诱导靶细胞凋亡。

1. 通过穿孔素和颗粒酶 B 途径。器官移植急性排斥反应发生时,激活的 CTL 含有大量的颗粒,颗粒中主要包括穿孔素和颗粒酶 B。穿孔素不仅可增加细胞膜的通透性,导致靶细胞的死亡,更主要的是通过与颗粒酶 B 的协同作用,使颗粒酶 B 进入靶细胞内,激活内切酶系统,导致靶细胞的 DNA 断裂,产生细胞凋亡。

2. 通过 Fas/FasL 系统的相互作用。Fas 受体属 I 型糖蛋白,为肿瘤坏死因子受体家族;Fas 配体(FasL)属 II 型糖蛋白,为肿瘤坏死因子家族成员。它们是以膜分子或可溶性分子形式存在于哺乳类机体细胞株表面,介导细胞凋亡的蛋白质分子。通常认为它们是致死基因,因为两者的相互作用往往导致表达 Fas 的细胞发生凋亡。Fas 系统诱导细胞凋亡的作用方式有:①相邻细胞的 Fas 和 FasL 相互作用导致彼此杀伤,即细胞间凋亡;②细胞自身的 Fas 和 FasL 相互作用引起自身细胞凋亡;③sFasL 杀伤相邻 Fas 阳性细胞,即旁分泌杀伤;④sFasL 杀伤自身细胞,即自分泌杀伤。

#### 四、抗细胞凋亡在肺移植中的应用

绝大多数学者认为细胞凋亡是器官移植组织损伤的一种机制,预防移植细胞的凋亡能减少移植损伤而延长其存活时间,促进移植抗原特异的淋巴细胞凋亡则有利于移植耐受,这些策略有可能成为抗排斥治疗的新手段。

1. 血红素加氧酶(heme oxygenase, HO):HO 是血红素降解的起始酶和限速酶,HO 有三种表型:HO-1,HO-2,HO-3。体内外大量实验已证实 HO-1 有

以减轻心、肝、肾等器官移植 I/R 损伤。HO-1 在灌注期明显上调,它的过表达能对 I/R 造成的细胞损伤有保护作用,这已在心、肝 I/R 损伤的动物模型中得到验证。同时在心脏移植模型中,人们发现移植存活时间的延长与内皮细胞和心肌细胞抗氧化和抗凋亡基因的表达有关,HO-1 被视为器官移植存活的关键“保护基因”<sup>[8-9]</sup>。Song 等<sup>[10]</sup>最近研究发现吸入一氧化碳对移植肺有抗细胞凋亡作用,而一氧化碳正是 HO-1 的降解产物。最近 De Perrot 等<sup>[11]</sup>则认为 HO 是减轻 I/R 损伤的未来潜在途径之一,并且 Bonnell 等<sup>[12]</sup>已在实验中证实 HO-1 过表达可以减轻肺移植中 I/R 损伤。

2. 预处理:预处理就是通过各种方式触发机体组织产生内源性抗损伤机制而发挥脏器保护作用。最初研究发现预先反复短暂缺血可以延缓或减轻心脏后续 I/R 损伤的现象,并提出缺血预处理概念。经过多年的研究已发现缺血预处理保护作用不仅存在于心脏,而且存在于心脏以外的其他组织器官。

缺血预处理被认为是一种机体抗 I/R 损伤的重要保护机制之一。国内有人研究发现缺血预处理可通过减轻 I/R 时肺组织中性粒细胞的浸润与激活,提高机体抗氧化自由基的能力,而减轻 I/R 引起的肺损伤。Waldow 等<sup>[13]</sup>研究发现全身缺血预处理后可以减轻肺的急性 I/R 损伤。此外,有研究发现不同的方式缺血预处理其产生的保护效果有差异。Friedrich 等<sup>[14]</sup>在犬肺移植实验中研究发现在供肺缺血 3 h 再灌注 8 h 之前使之缺血 5 min,再灌 15 min 比缺血 10 min,再灌 10 min,再缺血 10 min,再灌 10 min 效果好,可以产生良好的供肺保护作用。

3. 转基因治疗:随着基因工程的发展,近 10 年来,人们将转基因技术引入器官移植领域,试图通过向移植器官转入目的基因,使其表达转基因产物,从而减缓排斥反应和 I/R 损伤。白介素-10 是炎症因子释放抑制因子,Fischer 等<sup>[15]</sup>通过腺病毒将白介素-10 转染入移植狗肺,发现它虽不能减少细胞死亡总数,但

重要的抗细胞凋亡基因,最近 Cooke 等<sup>[16]</sup>研究发现通过腺病毒将人 bcl-2 转染入供体,可以减少 Caspase 酶活性和白介素-1 $\beta$ 的产物,从而减轻 I/R 损伤,改善移植肺功能。相信不久的将来基因技术会在肺移植中得到广泛的应用。

虽然细胞凋亡在生物学、免疫学等其他学科的研究较深入,但在移植免疫学方面的研究中才起步。现有报道对细胞凋亡在移植排斥和免疫耐受等方面的意见并不一致,而且大多数报道只是粗略地观察有无凋亡,并没有分清楚是移植脏器实质细胞凋亡,还是浸润至移植物的受体免疫细胞凋亡。因此,现在断言细胞凋亡在器官移植中起何种作用还为时尚早。深信随着研究的深入,人们将会揭示细胞凋亡与器官移植的关系,为器官移植的研究和临床实践开辟新的领域。

#### 参考文献

- [1] Fischer S, Cassivi SD, Xavier AM, et al. Cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation [J]. Ann Surg, 2000, 231(3): 424-431.
- [2] Fischer S, Maclean AA, Liu M, et al. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(5): 1932-1939.
- [3] Ng SC, Wan S, Yim AP. Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury: role of apoptosis [J]. Eur Respir J, 2005, 25(2): 356-363.
- [4] Kwon KY, Cho CH, Kim SP, et al. Apoptosis induced by preservation and reperfusion in canine lung transplantation [J]. Transplant Proc, 2003, 35(1): 134-137.
- [5] Stammberger U, Gasper at, Hillinger S, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation [J]. Ann Thorac Surg, 2000, 69(5): 1532-1536.
- [6] Keshavjee S, Zhang XM, Fischer S, et al. Ischemia reperfusion induced dynamic changes of protein tyrosine phosphorylation during human lung [J]. Transplantation, 2000, 70(3): 525-531.
- [7] Alho HS, Salminen US, Maasilta PK, et al. Epithelial apoptosis in experimental obstructive airway disease after lung transplantation [J]. J Heart Lung Transplant, 2003, 22(9): 1014-1022.
- [8] 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.
- [9] Coito AL, Shaw GD, Li L, et al. Selective

- induction in cardiac allograft recipients[ J ]. Lab Invest, 2002, 82(1): 61-70.
- [ 10 ] Song R, Kubo M, Morse D, et al. Carbon monoxide induces cytoprotection in rat orthotopic lung transplantation via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects[ J ]. Am J Pathol, 2003, 163(1): 231-242.
- [ 11 ] De Perrot M, Liu M, Waddell TK, et al. Ischemia-reperfusion-induced lung injury[ J ]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(4): 490-511.
- [ 12 ] Bonnell MR, Visner GA, Zander DS, et al. Heme-oxygenase-1 expression correlates with severity of acute cellular rejection in lung transplantation[ J ]. J Am Coll Surg, 2004, 198(6): 945-952.
- [ 13 ] Waldow T, Alexiou K, Witt W, et al. Protection against acute porcine lung ischemia/reperfusion injury by systemic preconditioning via hind limb ischemia[ J ]. Transpl Int, 2005, 18(2): 198-205.
- [ 14 ] Friedrich I, Spillner J, Lu EX, et al. Ischemic pre-conditioning of 5 minutes but not of 10 minutes improve lung function after warm ischemia in a canine model[ J ]. J Heart Lung Transplant, 2001, 20(9): 985-995.
- [ 15 ] Fischer S, De Perrot M, Liu MY, et al. Interleukin 10 gene transfection of donor lungs ameliorates posttransplant cell death by a switch from cellular necrosis to apoptosis[ J ]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 126(4): 1174-1180.
- [ 16 ] Cooke DT, Hoyt EG, Robbins RC. Overexpression of Human Bcl-2 in syngeneic rat donor lungs preserves posttransplant function and reduces intra-graft caspase activity and interleukin-1b production[ J ]. Transplantation, 2005, 79(7): 762-767.
- [ 作者简介 ] 江科(1977-), 男, 在读博士。  
(收稿日期: 2005-01-17)

## ·短篇报道·

### 新生儿十二指肠瓣膜梗阻五例诊治体会

马万选 黄松 曹运萍 张佳勋

[ 中图分类号 ] R726.1 [ 文献标识码 ] D [ 文章编号 ] 1005-6483(2006)01-0042-01

先天性十二指肠瓣膜致新生儿十二指肠完全性、不完全性梗阻在基层医院不多见。我院自 1990 年至 2004 年共收治 5 例, 报告如下。

#### 临床资料

1. 一般资料: 本组 5 例, 男 4 例, 女 1 例。入院时间最早出生后 2 h, 最晚出生后 20 d。入院诊断: 新生儿吸入性肺炎 1 例, 呕吐原因待查 3 例, 高位不全肠梗阻 1 例。主要临床表现为呕吐, 呕吐物为白色黏液、咖啡样液或黄绿色液; 不排胎便或胎便排出迟, 1 例 6 d 才排胎便。X 线腹平片检查 2 例, 其中 1 例胃泡影除肝外几乎占据全腹, 1 例呈双气泡征, 4 例泛影葡胺胃十二指肠造影, 显示肠不全梗阻, 十二指肠近端扩张, 扩张远端处受阻, 少量液体随蠕动进入空肠, 且可见逆蠕动。术中发现十二指肠球部闭锁 1 例, 球部扩张壁厚呈乳头状与胃延续为一体, 而闭锁处稍细, 其远侧十二指肠、空、回肠一致性纤细、薄壁, 系膜连续。风袋形瓣膜 2 例, 1 例位于降段, 中央孔 0.15 cm, 胆总管开口在瓣膜近侧面基部, 1 例位于升段, 中央孔偏于后侧约 0.1 cm, 回

盲部位于右上腹。降部远端水平形瓣膜 1 例, 中央孔 0.15 cm。球部漏斗形瓣膜 1 例, 中央孔 0.3 cm, 合并降段肠外膜状粘连变细。

2. 手术方法: 1 例十二指肠闭锁行扩张球部纵梭形切口与降段近端肠壁纵切口侧侧吻合。2 例风袋形瓣膜行瓣膜切除。1 例漏斗形瓣膜切除, 肠壁切口跨瓣膜两侧纵切横缝, 并分离肠外膜状粘连。1 例水平形瓣膜前侧方剪开至基部, 瓣膜迅速自行展平至肠内壁, 剪开处黏膜呈菱形口贴在内壁, 只显示基部略隆起, 但柔软。

3. 结果: 本组 5 例术后均无呕吐、黄疸及上腹部胀, 无切口裂开及感染, 无粘连性肠梗阻发生。肠闭锁者 1 个月后死于食欲差、营养不良。肠狭窄 4 例随访, 最短 1 年, 最长 12 年, 智力正常, 身高、体重在正常范围。

讨论 通过腹平片、胃十二指肠造影检查能明确诊断十二指肠梗阻, 但不易明确是否为瓣膜所致梗阻。本组 5 例均为术中才明确瓣膜所致梗阻, 1 例伴发肠外膜状粘连。有孔瓣膜主要临床表现为呕吐无规律性, 与其他因素引起的新生儿呕吐不易区分, 便量少, 往往由于有

能及时明确诊断。本组 1 例, 呕吐十余天才来儿外科就诊。

风袋形瓣膜基部附着肠壁平面与远端狭窄肠管平面有一定间距, 与风袋向远端脱垂长度一致。本组 2 例风袋长度为 1~1.5 cm, 纵行切开扩张部肠前壁, 其与远侧狭窄肠内交界区无器质性改变, 才考虑为风袋形瓣膜, 再向近侧探查而明确诊断。此型易漏诊, 尤有外源性肠梗阻病变时, 如并存肠外粘连, 肠旋转不良等, 更易漏诊。

十二指肠乳头开口位置的观察及防止损伤胆总管是十二指肠瓣膜病手术中应十分重视的一点。本组 1 例十二指肠乳头呈小凹陷的开口在风袋形瓣膜近侧面后基部, 切除瓣膜、在靠近开口处瓣膜创缘处缝一针, 结扎时由于肌层的牵拉作用, 立即见胆汁流出受阻, 拆除此缝线, 胆汁排出恢复正常。新生儿胆总管及乳头开口细小, 仔细观察瓣膜近、远侧面, 尤其后基部, 有无乳头开口及有无胆汁附着。十二指肠乳头开口与瓣膜非常靠近, 应注意不要缝扎创缘, 以免造成开口梗阻, 术后发生梗阻性黄疸。

[ 作者简介 ] 马万选(1949-), 男, 副主任医师。

作者单位: 115000 辽宁省营口市第二人民医院外科