

FK506 对心脏移植急性排斥反应 Fas 和 Fas-L mRNA 表达的影响

高立平¹, 王建军², 高 博¹, 王拯民¹, 曹月敏¹

(1. 河北省人民医院胸外科, 河北 石家庄 050051; 2. 武汉协和医院胸外科, 湖北 武汉 430022)

【摘要】 目的 研究心脏移植急性排斥反应中供体心肌组织 Fas 及其配体 Fas-L 的 mRNA 的表达规律。同时探讨 FK506 在发挥免疫抑制作用时对二者的影响, 阐述 FK506 在体内的作用机制。方法 实验分为 6 组: ①同系异体心脏移植组 Sprague-Dawley (SD) to SD, $n = 6$; ②同种异体移植组(Dahl to SD, $n = 6$); ③同种异体移植 FK506 治疗组(0.15 mg/kg · d 肌肉注射, 28 d, $n = 6$), 此 3 组观察移植心脏的存活时间。④~⑥分组情况与①~③相同, 术后第 5 d 摘取移植心脏测定急性排斥反应强度, 同时应用反转录-聚合酶链反应检测心肌 Fas mRNA 和 Fas-L mRNA 的表达水平。结果 ①同系异体移植组、同种异体移植 FK506 治疗组移植心脏存活时间(139.00 ± 31.61)和(53.83 ± 5.19)d 明显长于同种异体移植组(7.17 ± 0.75)d, ($P < 0.001$); 同时, 前二者的急性排斥反应强度也明显低于后者($P < 0.001$)。②同种异体移植组心肌 Fas mRNA 和 Fas-L mRNA 的表达水平(Fas: 0.62 ± 0.26 ; Fas-L: 0.34 ± 0.12)明显高于同系异体移植组(Fas: 0.39 ± 0.16 ; Fas-L: 0.16 ± 0.05 , $P < 0.05$)和同种异体移植 FK506 治疗组(Fas: 0.35 ± 0.18 ; Fas-L: 0.13 ± 0.06 , $P < 0.05$)。结论 心脏移植急性排斥反应中 Fas mRNA 和 Fas-L mRNA 的表达增强。由此可以认为, 急性排斥反应中浸润性免疫细胞表面将大量表达 Fas-L, 从而诱导表达有 Fas 分子的心肌细胞的凋亡。FK506 在发挥免疫抑制作用时能够阻止 Fas 和 Fas-L mRNA 的转录而抑制 Fas 死亡蛋白途径, 抑制排斥反应的发生, 延长移植心脏存活时间。

【主题词】 心脏移植; 移植排斥; 动物; 实验; 大鼠

【中图分类号】 R617 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-3205(2005)06-0423-04

INFLUENCE OF FK506 ON THE EXPRESSION OF FAS AND FAS LIGAND mRNA IN ACUTE CARDIAC ALLOGRAFT REJECTION

GAO Li-ping¹, WANG Jian-jun², GAO Bo¹, WANG Zheng-min¹, CAO Yue-min¹

(1. Department of Thoracic Surgery, the Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China;
2. Department of Thoracic Surgery, the Wuhan Union Hospital, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT: **Objective** To elucidate the expression of Fas and Fas ligand mRNA and the influence of FK506 on them in acute cardiac graft rejection. **Methods** The research was conducted with rats in six groups: ① isograft group[Sprague-Dawley (SD) to SD, $n = 6$]; ② allograft group (Dahl to SD, $n = 6$); ③ Allograft group with immunosuppression with FK506 (0.15 mg/kg · d i.m. 28 d, $n = 6$). The survival time of heart grafts was abserved. ④~⑥ groups were designed as the first three groups. On day five, the acute rejection grade was observed and the expression level of Fas mRNA and Fas ligand mRNA of heart grafts was measured in ④~⑥ groups by semiquantitative RT-PCR. **Results** ① The survival time of isografts and allografts with FK506 (139.00 ± 31.61)d and (53.83 ± 5.19)d was markedly longer than that of allografts (7.17 ± 0.75)d ($P < 0.001$), and the acute rejection grade of isografts and allografts with FK506 was markedly less than that of allografts ($P < 0.001$). ② Expression of Fas and Fas ligand

mRNA were significantly ($P < 0.05$) increased in allograft compared with isograft hearts (Fas; 0.62 ± 0.26 versus 0.39 ± 0.16 , respectively; Fas ligand; 0.34 ± 0.12 versus 0.16 ± 0.05 , respectively, $P < 0.05$) and allografts with FK506 (Fas; 0.35 ± 0.18 ; Fas Ligand; 0.13 ± 0.06 , respectively, $P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Fas mRNA and Fas ligand mRNA was enhanced in acute cardiac allograft rejection. In this regard, it is possible that expression of Fas ligand by infiltrating T lymphocytes causes apoptosis of cardiomyocytes expressing Fas. FK506 inhibites acute allograft rejection and prolongs cardiac allograft survival in part by suppressing the Fas system in cardiac allografts.

MeSH: heart transplantation; graft rejection; animals, laboratory; rats

Fas 死亡蛋白途径是细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) 诱导靶细胞死亡的重要途径之一。FK506 是一种有效应用于临床的免疫抑制剂,并能逆转环孢霉素 A 治疗无效的急性排斥反应而备受瞩目。本研究旨在通过测定大鼠心脏移植急性排斥反应中,心肌组织 Fas 和 Fas-L mRNA 的表达情况,揭示移植心脏心肌组织 Fas 和 Fas-L mRNA 在急性排斥反应中的表达规律,并初步探讨 FK506 对其的影响。

1 材料与方法

1.1 大鼠异位心脏移植模型的建立

1.1.1 实验仪器与药物: Leica 656 型双目手术显微镜 (德国 LEICA 公司), TwinBlockTM System PCR 仪 (美国 ERICOMP 公司), 751 紫外分光光度计 (上海光学仪器厂), 总 RNA 提取试剂盒 (美国 GIBCO 公司), PCR 引物 (上海 Sangon 生物工程公司), FK506 (日本藤泽医药公司)。

1.1.2 实验动物及分组: 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (230 ± 30) g, 雄性 Dahl 大鼠 (220 ± 20) g, 分别由河北医科大学实验动物中心和组织胚胎学教研室提供。本实验共分为 6 组。第 1 组 SD→SD 大鼠同系异体间心脏移植 ($n = 6$); 第 2 组 Dahl→SD 大鼠同种异体间心脏移植 ($n = 6$); 第 3 组 Dahl→SD 大鼠同种异体间心脏移植, 自术日起肌注 FK506 ($0.15 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$, $0 \sim 27 \text{ d}$) ($n = 6$)。此三组均以触诊方式观察移植心脏的存活时间。第 4~6 组分组及处理情况分别与第 1~3 组相同, 于术后第 5 d 处死受体大鼠, 摘取移植心脏。

1.1.3 心脏移植模型的建立: 供体鼠用戊巴比妥进行腹腔内麻醉, 开胸后将主动脉和肺动脉起始部离断 (余大血管均结扎、切断), 摘取心脏置于 4°C 林格液中保存。受体鼠亦经同法麻醉, 取腹横切口, 用显微外科技术将供体的主动脉和肺动脉分别与受体鼠的腹主动脉和肺动脉吻合。术毕视供体气管

跳, 情况良好后关腹。术后通过腹部触诊判断移植心脏的存活情况。所有动物术后均分笼饲养, 标准饮食。

1.2 移植心脏急性排斥反应分级的测定: 分别取第 4~6 组各移植心脏部分心肌组织进行常规病理学处理, 对急性排斥反应强度的分级基本参照 Billingham 和部分国内学者制定的标准进行分级^[1,2]。0 级, 无排斥反应表现。1 级, 心内膜及间质水肿, 血管周围轻度单核细胞浸润, 心内膜下有少量单核细胞浸润。2 级, 间质水肿加重, 血管周围、心内膜下及间质内单核细胞浸润, 心肌细胞出现变性, 有少量小灶状坏死。3 级, 血管周围、心内膜下及间质内中度单核细胞浸润, 有明显的心肌细胞灶状坏死。4 级, 间质及血管周围重度单核细胞浸润, 混有部分中性粒细胞, 间质内出血及大片心肌细胞坏死, 冠状动脉中血栓形成, 血管壁纤维素样坏死。

1.3 移植心脏心肌组织 Fas 和 Fas-L mRNA 表达的测定

1.3.1 总 RNA 的提取: ①取心肌组织 100 mg, 在玻璃匀浆器中研磨; ②向样品管中加入 $2\,000 \mu\text{L}$ 裂解液, 充分振荡使沉淀完全溶解; ③加 $200 \mu\text{L}$ 氯仿充分混匀, $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 min; ④小心吸取上层水相, 加入等体积酚、氯仿、异戊醇提取液 ($24:24:1$) $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 min。重复一次; ⑤吸取上清, 加入 $1/10$ 醋酸钠 ($\text{pH } 5.2$) 1 倍的异丙醇, -20°C 放置 20 min; ⑥ $2\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 min, 弃上清液; ⑦加入 $500 \mu\text{L}$ 70% 的乙醇振荡混匀, 离心 10 min, 弃上清。重复一次; ⑧室温晾干, 用 $50 \mu\text{L}$ DEPC 去离子水重悬。

1.3.2 反转录: 取总 RNA $10 \mu\text{L}$, 加入反应缓冲液 $4 \mu\text{L}$ 、 10 mmol/L dNTP $2 \mu\text{L}$ 、RNasin 20 U 、AMV 反转录酶 5 U 及随机引物 $2 \mu\text{g}$, 用 dH_2O 加至总反应体积到 $20 \mu\text{L}$ 。混匀后 42°C 反应 30 min, 最后加热至 95°C 5 min, 迅速冷却, 存放在 -70°C 的环境

1.3.3 PCR: 共合成 3 对引物, 即 β -actin、Fas、Fas-L, 扩增片段长度分别为 420 bp、386 bp 和 285 bp。反应体系均为 cDNA 5 μ L、反应缓冲液 5 μ L、dNTP 1 μ L、引物 1 μ L 和 TaqE 1 μ L, 用 ddH₂O 加至 50 μ L。循环参数 β -actin mRNA 如下, 首先 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 再 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 次循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。Fas mRNA 如下, 首先 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 再 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 次循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。Fas-L mRNA: 首先 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 再 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 次循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.3.4 结果比较: PCR 扩增反应物经琼脂糖凝胶电泳分离目的区带和参照物扩增区带, 取下二者进行闪烁记数, 比较得出待测 mRNA 的含量。各组所得数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用方差分析进行检验。

2 结 果

2.1 移植心脏存活时间: 同系异体移植心脏的存活时间 (139.00 ± 31.61) d 明显长于同种异体移植心脏的存活时间 (7.17 ± 0.75) d, ($P < 0.001$); 同种异体移植 FK506 治疗组的移植心脏存活时间 (53.83 ± 5.19) d 亦长于非用药组 ($P < 0.001$)。见表 1。

2.2 急性排斥反应强度: 同系异体移植组与同种异体移植 FK506 治疗组的急性排斥反应强度 (0.50 ± 0.55 和 0.83 ± 0.41) 均明显低于同种异体移植组 (3.67 ± 0.52 , $P < 0.001$)。见表 1。

表 1 同系异体移植组、同种异体移植组与 FK506 同种异体移植组移植心脏存活时间及急性排斥反应分级

Table 1 Survival time and acute rejection grade of cardiac isografts, allografts and allografts with FK506

($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Survival time (t/d)	Acute rejection grade
Isografts	139.00 ± 31.60	0.50 ± 0.55
Allografts	$7.17 \pm 0.75^*$	$3.67 \pm 0.52^*$
Allografts with FK506	$53.83 \pm 5.19^{**}$	$0.83 \pm 0.41^{**}$

* $P < 0.001$ vs isografts ** $P < 0.001$ vs allografts by ANOVA test

2.3 Fas-L mRNA 的表达: 同种异体移植急性排斥反应过程中心肌组织 Fas-L mRNA 的表达水平 (0.34 ± 0.12) 明显高于同系异体移植组 (0.16 ± 0.05 , $P < 0.05$)。FK506 能够显著抑制心肌组织 Fas-L mRNA 表达的升高 (0.13 ± 0.06 , $P < 0.05$)。见表 2。

2.4 Fas mRNA 的表达: 同种异体移植急性排斥反应过程中心肌组织 Fas mRNA 的表达水平 (0.62 ± 0.26) 明显高于同系移植组 (0.39 ± 0.16 , $P < 0.05$)。FK506 能够显著抑制心肌组织 Fas mRNA 表达水平的升高 (0.35 ± 0.18 , $P < 0.05$)。见表 2。

表 2 同系异体移植组、同种异体移植组与 FK506

同种异体移植组移植心脏 Fas-L 及 Fas mRNA 的表达

Table 2 Expression of Fas ligand mRNA and Fas mRNA of cardiac isografts, allografts and allografts with FK506

($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Fas-L mRNA	Fas mRNA
Isograft	0.16 ± 0.05	0.39 ± 0.16
Allografts	$0.34 \pm 0.12^*$	$0.62 \pm 0.26^*$
Allografts with FK506	$0.16 \pm 0.09^{**}$	$0.35 \pm 0.18^{**}$

* $P < 0.05$ vs isograft ** $P < 0.05$ vs allografts by ANOVA test

3 讨 论

移植排斥反应仍然是器官移植后移植长期存活的主要障碍。研究发现移植排斥反应中, 细胞毒性 T 淋巴细胞介导的细胞毒作用是引起靶细胞损伤的重要机制。其中, Fas/Fas Ligand 介导的死亡蛋白途径, 是多年来研究的热点。

本研究发现, 同系异体移植心脏没有发生明显的排斥反应, 而同种异体移植心脏发生了严重排斥反应。心脏移植后受体免疫系统将通过多种途径对移植体进行攻击, 导致心肌细胞的死亡。Ettinger R 利用 Fas 或 Fas-L 基因缺陷型小鼠为研究对象, 发现 Fas 或 Fas-L 表达阴性的 T 淋巴细胞不会发生激活诱导的细胞死亡, 证明 Fas/Fas-L 途径在此过程中发挥着重要的作用。CTL 被激活后首先诱导靶细胞表面 Fas 分子的表达, 同时大量表达 Fas L 分子, 尔后二者相互作用诱导靶细胞的凋亡, 但 Fas 和 Fas-L 二者在其间的表达规律尚无统一认识。Yoshihiko 等发现在心脏移植急性排斥反应中 Fas-L mRNA 的表达明显增高, 但 Fas mRNA 表达并无变化^[3]。本研究发现同种异体间心脏移植后, Fas 和 Fas-L 二者的 mRNA 表达均显著增多, 高于同系异体移植的表达水平。细胞毒性 T 淋巴细胞等具有杀伤效应的免疫细胞被同种抗原激活后, 很可能将大量转录并表达 Fas-L。Fas-L 可以与表达在心肌细胞表面的配体 Fas 结合, 经过一系列复杂的信号传递和酶联反应, 最终激活内源性核酸内切酶促使 DNA 断裂而凋亡。同时, 细胞毒性 T 淋巴细胞表面也表达有 Fas, 同样可被其自身或同类细胞激活凋亡过程。二者 mRNA 表达同时增多, 说明细

在细胞毒性 T 淋巴细胞的作用下死亡产生凋亡,而后者也会在这一效应中自身凋亡。当然, Fas 和 Fas-L mRNA 的表达增高并不一定意味着其蛋白质表达增多,这也说明细胞生命过程中存在着多层次的调节机制。

FK506 首次被美国匹兹堡大学医学中心应用。FK506 应用在器官移植术后可取得优于 CsA 的长期存活率,而早期排斥反应的发生率明显低于 CsA^[4],是现在应用最为有效和广泛的免疫抑制剂之一。目前针对其应用分为基础治疗及抢救性治疗两种类型。本研究重点考察了 FK506 作为基础治疗手段,抑制心脏移植急性排斥反应中的作用。研究发现 FK506 能够明显抑制急性排斥反应发生的同时,减少心肌组织中 Fas 和 Fas-L mRNA 的表达水平。细胞毒性 T 淋巴细胞中表达的 Fas-L mRNA 的水平下降,将直接降低 Fas-L 在细胞表面的表达量。同时,心肌细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞本身表达的 Fas 配体减少,也将进一步降低此途径的杀伤性能,从而减少心肌细胞的凋亡,浸润淋巴细胞的凋亡也会受到抑制。Yokoyama 等学者发现 FK506 在体外能明显降低肝细胞 Fas 的表达,与实验的结果相符^[5]。有学者发现 FK506 在防止 Fas 的表达的同时,还可以减少 Fas-L mRNA 转录过程中 c-Jun 转录因子的磷酸化,从而阻断 Fas/Fas-L 系统介导的凋亡途径,而另有研究发现 FK506 不能抑制激活诱导的 Fas mRNA 的表达,但在高浓度时

却能降低 Fas 分子在细胞表面的表达水平^[6,7],说明 FK506 可能在不同层次上对 Fas/Fas-L 系统进行影响。

【参考文献】

[1] Billingham ME. Endomyocardial biopsy diagnosis of acute rejection in cardiac allografts[J]. Prog Cardiovasc Dis, 1990, 33(1): 11-18.

[2] 王建军, 李泽坚. 血清肿瘤坏死因子 α 水平在大鼠心肺移植术后早期急性排斥反应诊断中的意义[J]. 中华器官移植杂志, 1996, 17(1): 18-20.

[3] Yoshihiko Kageyama, Xiao-Kang Li, Seiichi Suzuki, et al. Apoptosis is involved in acute cardiac allograft in rats[J]. Ann Thorac Surg, 1998, 65(6): 1604-1609.

[4] Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, et al. A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years[J]. Transplantation, 2002, 73(8): 775-782.

[5] Yokoyama I, Hayakawa A, Hayashi S, et al. Decreased Fas antigen expression of cultured hepatocytes with FK506[J]. Transplantation Proceedings, 1996, 28(6): 3189-3190.

[6] Ana Martin-Villalba, Ingrid Herr, Imela Jeremias. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons[J]. The Journal of Neuroscience, 1999, 19(10): 3809-3817.

[7] Brunner T, Yoo NJ, LaFace D. Activation-induced cell death in murine T cell hybridomas. Differential regulation of Fas (CD95) versus Fas ligand expression by cyclosporin A and FK506[J]. Int Immunol, 1996, 8(7): 1017-1026.

欢迎投稿 · 欢迎订阅《河北医科大学学报》

邮发代号: 18—31

《河北医科大学学报》是中华人民共和国新闻出版总署批准创办的医学学术刊物。《河北医科大学学报》被美国《化学文摘》(CA)、《中国科学引文数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》、万方数据—数字化期刊群、《中国核心期刊(遴选)数据库》、中文生物医学期刊文献数据库—CMCC、《中文科技期刊数据库》等收录。本刊在国内外享有盛誉,已经产生了较大的影响。《河北医科大学学报》国内外公开发行,国内订户通过全国各地邮局(所)随时均可订阅。

《河北医科大学学报》目前报道范围为基础医学、临床医学、药学、预防医学、中医(药)学以及中西医结合基础与临床等。

《河北医科大学学报》适宜县级和相当县级及其以上各级各类医务工作者、高等医药院校师生及科研工作者阅读和参考。

《河北医科大学学报》欢迎国内外作者踊跃投稿,欢迎国内外广大读者订阅。

《河北医科大学学报》现为双月刊,2006 年每期 6.00 元,全年定价 36.00 元。

编辑部地址: 河北省石家庄市中山路 361 号 邮政编码: 050017 电话: (0311)86266947

传真: (0311)86059153 E-mail: hbykdxzb@periodicals.net.cn

网址: www.hebmu.edu.cn/hbykxb