

细胞凋亡在脑死亡供体肾中的研究进展

胡 龙¹, 叶启发^{1,2}, 王彦峰², 李 玲², 张 洋¹, 付 贞¹

摘 要: 细胞凋亡是指细胞在一定的生理或病理条件下, 受基因严格调控的细胞自杀现象。与细胞凋亡有关的酶和基因的表达在脑死亡供体(DBD)中可以发生改变, 且与脑死亡(BD)过程中免疫反应有着密切的联系。细胞凋亡可能是一条引起 BD 捐献供体肾损伤比较重要的途径。文章主要从细胞凋亡相关基因 B 淋巴细胞瘤/白血病基因 2(Bcl-2)和白细胞介素-18(IL-18)、高迁移率族蛋白(HMGB1)、 β -葡萄糖醛酸酶(GUSB)、蛋白酶 caspase 3(CASP 3)、分化群 95(CD95 or FAS)和肿瘤基因 p53 的表达及细胞凋亡与免疫之间的关系这两大方面来探讨细胞凋亡在 BD 捐献供体肾中的作用, 希望能够从细胞凋亡的角度来改善 DBD 肾的质量。

关键词: 脑死亡; 肾移植; 供体肾; 细胞凋亡; 基因表达

中图分类号: R699.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-7090(2014)01-0090-04

Progress of apoptosis in kidney of brain dead donor HU Long¹, YE Qi-fa^{1,2}, WANG Yan-feng², LI Ling², ZHANG Yang¹, FU Zhen¹ (1. Department of Organ Transplantation of The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, Hunan, China; 2. Zhongnan Hospital of Wuhan University, Institute of Hepatobiliary Diseases of Wuhan University, Transplant Center of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China)
Corresponding author: YE Qi-fa. E-mail: yqf_china@163.com.

细胞凋亡(apoptosis)概念的提出并没有很长的历史,但是由于它与机体很多疾病都有密切的联系而受到重视。脑死亡(brain death, BD)是一个动态的过程,会引起机体内血流动力学的改变、激素的改变、免疫的激活等, 这些因素的改变都可以引起肾脏的改变,引起肾脏功能的减低,甚至衰竭^[1]。细胞凋亡可能通过凋亡通路在脑死亡供体 (donor from brain death, DBD)肾中发挥作用,也可能通过免疫反应损伤 DBD 肾, 所以研究细胞凋亡在 DBD 肾中的作用有比较大的价值。

1 细胞凋亡

细胞凋亡是指细胞在一定的生理或病理条件下, 遵循自身的程序, 结束其生命的生理性死亡, 是受基

因严格调控的细胞自杀现象。各种不同的内、外界刺激经相应受体或目前尚未清楚的途径激发凋亡信号传导, 通过效应分子相互作用引起蛋白酶(caspase, CASP)家族的级联反应, 降解各种细胞内底物, 随之出现细胞凋亡现象。但是它也是由很多生理和病理因素的刺激才能发生, 这些刺激包括有脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)的损伤、死亡受体的激活、刺激细胞凋亡通路、直接的身体细胞的损伤^[2]。目前认为, 细胞凋亡主要是通过 3 条途径实现的, 这 3 条途径分别是死亡受体通路(外源性凋亡途径)、线粒体通路(内源性凋亡途径)、内质网通路。而这 3 条通路最后都要通过激活蛋白酶 caspase 3(CASP 3)来诱导细胞凋亡。凋亡相关基因或酶可以调节这 3 条途径, 从而调节细胞的凋亡。

2 脑死亡后凋亡相关基因和酶的表达

细胞凋亡受多种基因调控, 有些是促进细胞凋亡的活化基因, 有些是抑制细胞凋亡的抑制基因。影响细胞凋亡通路的一些酶在 DBD 肾脏当中也会被检测到发生改变, 并且与供体肾的质量及移植后肾功能的恢复密切相关。研究表明, B 淋巴细胞瘤/白血病基因 2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)的表达与肾移植后早期肾功能的恢复呈正相关, 并与 Bcl-2 抑制细胞凋亡有关^[3,4]。白细胞介素-18(interleukin, IL-18)、高迁

作者单位: 1. 中南大学湘雅三医院 卫生部移植医学工程技术中心, 湖南 长沙 410013; 2. 武汉大学中南医院, 武汉大学肝胆疾病研究院, 武汉大学移植医学中心, 湖北 武汉 430071

收稿日期: 2013-09-04; 修回日期: 2013-10-30

作者简介: 胡龙(1988-), 男, 湖南永州人, 硕士研究生, 主要从事器官移植研究和肝胆外科工作。E-mail: 617215128@qq.com。

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(6107002; 117019; 114075); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20100141110016); 武汉市科技攻关项目资助(201161038344-01)

通讯作者: 叶启发(1954-), 男, 湖北襄樊市人, 博士, 主任医师, 教授, 主要从事外科工作和器官移植研究。电话: 027-67812988。E-mail: yqf_china@163.com。

版权©保护, 不得翻录。

移率族蛋白 (high mobility group box-1 protein, HMG-B1)、 β -葡萄糖醛酸酶 (glucuronidase beta, GUSB)、CASP3、分化群 95 (cluster of differentiation 95, CD95 or FAS) 和肿瘤基因 p53 (tumor suppressor, p53) 均被发现表达在 DBD 肾上比活供体肾明显增加^[5]。CASP 3、p53、Bcl-2 在移植延迟肾功能恢复的肾脏上表达增加, 并且与冷缺血时间的长短密切相关^[6]。BD 后肾脏凋亡细胞增多, 且与移植后肾脏功能的恢复有着密切的关系。虽然细胞凋亡的机制目前还没有完全弄清楚, 但是与凋亡相关的基因与酶的存在可以作为细胞凋亡的指示。下面主要通过 Bcl-2、CASP 3 和 FASL 来研究细胞凋亡在 DBD 当中的影响。

2.1 Bcl-2 基因的表达

Bcl-2 是与细胞凋亡密切相关的一类基因, 包括 15 个成员, Bcl-2 家族中既有抗凋亡的基因表达, 也有促凋亡的基因表达, Bcl-2 家族中抗凋亡基因有 Bcl-2、B 淋巴细胞瘤/白血病基因-特大型 (B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xl) 和 Bcl-2 等, 促凋亡基因有 Bcl-2 相关 X 蛋白 (BCL-2-associated X protein, Bax) 和 Bcl-xs 等, 正常情况下抗凋亡基因和凋亡基因的表达保持平衡。有研究表明, 冷保存可以使抗凋亡基因 Bcl-xl 在心脏死亡供体肾表达增加, 减少近端小管上皮细胞的凋亡^[7], 冷缺血时间的延长也可以使 Bcl-2、p53、CASP 3 表达增加, p53 和 CASP 3 的增加与肾功能延迟恢复 (delayed allografts function, DGF) 有关, 且在肾脏移植后发生急性排斥反应的患者尿液中可以检测到抗 Bcl-2 表达增多^[6,8]。凋亡在器官移植后功能的恢复中越来越受到重视, 尤其是 Bcl-2 家族蛋白保持平衡对细胞的凋亡起重要的调节作用。抗凋亡基因 Bcl-2 可能在移植后肾功能的恢复当中扮演重要的角色。在肝脏移植中腺病毒 Bcl-2 转录产生相应蛋白可以使肝功能早期恢复和使延长了冷、热缺血的肝脏移植后存活率增高^[9]。

2.2 蛋白酶 caspase 的表达

CASP 共有 14 种, 结构相似, 都以酶原的形式分泌, 是细胞凋亡中起重要调节作用的一类关键的蛋白酶。CASP 可专一、高效地特异性水解一系列蛋白质底物, 并导致蛋白质功能丧失或改变。它们有的启动细胞凋亡, 有的参与细胞凋亡的效应。如 CASP 8、10、9、2 参与启动细胞凋亡。而 CASP 3、7、6 则参与细胞凋亡的效应, 它们执行选择性、限制性地清除关键的信号复合物的任务, 调节不同的生物过程如凋亡、炎症等^[10,11]。其中 CASP 3 的作用最重要。实验表明, 抑制剂抑制 CASP 3 和 CASP 7 表达后, 供体肝细胞的凋亡减少而

灌注增多, 移植后存活率增高^[12]。同样也有实验表明, 缺血可以导致肾小管间质的损伤, 同时可以检测到 CASP 3 的表达增加^[13]。在小肠移植中细胞因子信号 1 抑制剂 (suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1) 对小肠移植后所起的保护作用主要通过下调 CASP 3 的表达而产生^[14]。有人用小鼠做实验研究缺血再灌注 CASP 3 的表达, 结果显示: 缺血再灌注后 CASP 3 的表达增加, 尿液中肌酐和尿素氮增多^[15]。CASP 在正常的细胞凋亡中发挥重要的作用, 它也在器官移植的过程中发挥重要作用。而且阻断 CASP 3 基因的表达对肾脏具有保护的作用^[13,15]。

2.3 FAS/FASL 的表达

Fas (CD95) 是细胞表面重要的死亡受体, 是细胞凋亡的信号分子。Fas 与其配体 FasL 结合, 活化并传导凋亡信号, 是诱导细胞凋亡的重要途径。DBD 肾移植后, 在产生急性排斥反应的肾脏当中可以发现 FAS (CD95) 的上调, 也就是表明, 诱导细胞凋亡的死亡受体途径上调^[5]。小鼠缺血再灌注的肾脏肾小球 FASL 的表达也增加且肾小球内皮细胞凋亡增加, 但是在缺血前静脉注射 FAS-FC 融合蛋白后, 在灌注以后可以发现肾小球内皮细胞凋亡减少^[16]。有研究表明: 下调 FASL 可能减轻肾移植排斥反应^[17]。

3 细胞凋亡与免疫反应

BD 使移植更容易发生炎症反应并且移植前供体肾就有更多的 T 淋巴细胞和巨噬细胞浸润^[18]。在 DBD 中炎症反应和细胞凋亡均会增强^[19]。凋亡和免疫之间可以通过某些途径相互联系。如炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 可以通过激活核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 途径抑制细胞凋亡^[20], 同时它又可以促进细胞凋亡^[21,22]。凋亡细胞的监督可以减少全身抗移植 T 细胞和 B 细胞的反应^[23]。DBD 中的免疫反应的 2 条途径主要是补体途径 (经典途径) 和 TOLL 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 信号传导途径, 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPKs) 可能是这 2 条途径的关键枢纽, 而细胞凋亡的诱导可以通过 p38MAPK 途径完成^[22-24]。免疫和凋亡可能通过这个途径相互影响。免疫反应可以引起供体的坏死, 在正常的细胞当中凋亡主要是通过内在和外 2 条途径实现, 而外在的途径当中死亡诱导信号复合体 (death-inducing signaling complex, DISC) 是个关键的复合物, 它由凋亡调节蛋白 (flc-like inhibitory protein, FLIP)、CASP 8、具有死亡功能区的 FAS 相关蛋白 (Fas-associating protein with a

novel death domain, FADD) 组成, 它可以诱导细胞的凋亡, 同时它也可以抑制细胞的坏死, 而使细胞继续生存。当这个复合物中任何一个或两个成分缺失时, 将会导致细胞的坏死和 T 细胞的增多。TNF 可以通过 DISC 来激活 CASP 8、10^[25, 26]。干扰素诱导蛋白-10(interferon-inducible protein-10, IP-10) 既是趋化因子基因, 也是凋亡基因, 且移植后患者尿液当中 IP-10 排泄增多, 肾移植后血液中 IP-10 增多可能是移植后器官功能丧失的重要指标^[27, 28]。细胞免疫和凋亡 2 条途径都可以影响供体的质量, 虽然它们对供体质量影响的机制尚不清楚, 但是它们确实同时存在于 DBD 肾当中, 它们之间到底在什么条件下可以相互促进或相互抑制机制不清楚, 但是它们之间存在交叉点, 它们是相互联系的。

4 前景展望

缺血再灌注肾脏中与凋亡相关的酶可见明显增加^[29]。细胞凋亡存在于全身的各个器官和组织当中, 当人体受到生理或病理的刺激后, 可能会启动细胞凋亡从而引起组织或器官的损伤。细胞凋亡是一个很复杂的过程, 现在很多研究表明, BD 的肾脏都存在细胞的凋亡, 并且会影响到供体的质量及移植后功能的恢复。DBD 肾中与细胞凋亡相关的各种酶和蛋白的表达, 可以作为细胞凋亡的指示, 从这些酶和基因入手研究 DBD 肾中细胞凋亡对其的影响。细胞凋亡与免疫存在密切的关系, 可以通过研究细胞凋亡与免疫之间的交叉点来研究这两者对 DBD 肾的影响。引起细胞凋亡的原因比较多, 目前 DBD 肾脏中引起细胞凋亡的机制是死亡受体引起的? 还是通过免疫介导的? 或者是 DNA 的损伤引起? 这些都还不清楚, 但是很多实验研究表明, DBD 肾中确实凋亡细胞增多且与供体质量相关。如果研究人员能通过研究如何控制 DBD 肾脏中细胞凋亡来改善供体的质量, 这将是 BD 器官移植领域的一个较大的进步。

参考文献:

- [1] Bos EM, Leuvenink HG, van Goor H, *et al.* Kidney grafts from brain dead donors: Inferior quality or opportunity for improvement [J]? *Kidney Int*, 2007, 72(7): 797-805.
- [2] Kam PC, Ferch NI. Apoptosis: mechanisms and clinical implications[J]. *Anaesthesia*, 2000, 55(11): 1081-1093.
- [3] Kamińska D, Tyran B, Mazanowska O, *et al.* Peri-transplant apoptosis in renal allografts [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2008, 17(2): 197-200.
- [4] Isaka Y, Suzuki C, Abe T, *et al.* Bcl-2 protects tubular epithelial cells from ischemia/reperfusion injury by dual mechanisms[J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(1): 52-54.
- [5] Kamińska D, Kościelska-Kasprzak K, Drulis-Fajdasz D, *et al.* Kidney ischemic injury genes expressed after donor brain death are predictive for the outcome of kidney transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2011, 43(8): 2891-2894.
- [6] Iznerowicz A, Chudoba P, Kamińska D, *et al.* Duration of brain death and cold ischemia time, but not warm ischemia time, increases expression of genes associated with apoptosis in transplanted kidneys from deceased donor[J]. *Transplant Proc*, 2011, 43(8): 2887-2890.
- [7] Zhang Y, Cheng G, Xu ZW, *et al.* Down regulation of TRAIL and FasL on NK cells by Cyclosporin A in renal transplantation patients[J]. *Immunol Lett*, 2013, 152(1): 1-7.
- [8] Barth C, Diening U, Stachowski J, *et al.* Survival- and apoptosis-inducing genes of the Bcl-2 gene family expressed in urine lymphocytes to monitor renal transplant function[J]. *Transplantation Proc*, 2011, 3(3): 255-255.
- [9] Rentsch M, Kienle K, Mueller T, *et al.* Adenoviral bcl-2 transfer improves survival and early graft function after ischemia and reperfusion in rat liver[J]. *Transplantation*, 2005, 80(10): 1461-1467.
- [10] Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond[J]. *Oncogene*, 2008, 27(48): 6194-6206.
- [11] Salvesen GS, Ashkenazi A. Snapshot: caspases [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 476-476.
- [12] Mueller TH, Kienle K, Beham A, *et al.* Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation[J]. *Transplantation*, 2004, 78(9): 1267-1273.
- [13] Haylor JL, Harris KP, Nicholson ML, *et al.* Atorvastatin improving renal ischemia reperfusion injury via direct inhibition of active caspase-3 in rats[J]. *Exp Biol Med*(Maywood), 2011, 236(6): 755-763.
- [14] Suo GJ, Qin J, Zhong CP, *et al.* Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits apoptosis of islet grafts through caspase 3 and apoptosis-inducing factor pathways in rats[J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(7): 2658-2661.
- [15] Zheng X, Zhang X, Sun H, *et al.* Protection of renal ischemia injury using combination gene silencing of complement 3 and caspase 3 genes[J]. *Transplantation*, 2006, 82(12): 1781-1786.
- [16] Zhiyun OC, Hideshi Y, Manas K, *et al.* Inhibition of Fas/Fas ligand interaction reduces apoptosis of glomerular endothelial cells induced by ischemia and reperfusion in mouse kidney[J]. *Inflamm Regen*, 2006, 26(3): 160-168.
- [17] Jani A, Zimmerman M, Martin J, *et al.* Perfusion storage reduces apoptosis in a porcine kidney model of donation after cardiac death[J]. *Transplantation*, 2011, 91(2): 169-175.
- [18] de Vries DK, Lindeman JH, Ringers J, *et al.* Donor brain death

- predisposes human kidney grafts to a proinflammatory reaction after transplantation[J]. *Am J Transplantat*, 2011, 11(5): 1064–1070.
- [19] Adrie C, Monchi M, Fulgencio JP, *et al.* Immune status and apoptosis activation during brain death[J]. *Shock*, 2010, 33(4): 353–362.
- [20] Kadomatsu M, Nakajima S, Kato H, *et al.* Cordycepin as a sensitizer to tumour necrosis factor (TNF)- α -induced apoptosis through eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α) – and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-mediated inhibition of nuclear factor(NF)- κ B[J]. *Clin Exp Immunol*, 2012, 6, 168(3): 325–332.
- [21] Wang Z, Larregina AT, Shufesky WJ, *et al.* Use of the inhibitory effect of apoptotic cells on dendritic cells for graft survival *via* T-cell deletion and regulatory T-cells [J]. *Am J Transplant*, 2006, 6(6): 1297–1311.
- [22] Kim JK, Yu SJ, Oh HJ, *et al.* Panaxydol induces apoptosis through an increased intracellular calcium level, activation of JNK and p38 MAPK and NADPH oxidase-dependent generation of reactive oxygen species[J]. *Apoptosis*, 2011, 16(4): 347–358.
- [23] Damman J, Daha MR, van Son WJ, *et al.* Crosstalk between complement and Toll-like receptor activation in relation to donor brain death and renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Transplant*, 2011, 11(4): 660–669.
- [24] Lu J, Xu SY, Zhang QG, *et al.* Bupivacaine induces apoptosis *via* mitochondria and p38 MAPK dependent pathways[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 657(1–3): 51–58.
- [25] Peter ME. Programmed cell death: Apoptosis meets necrosis[J]. *Nature*, 2011, 471(7338): 310–312.
- [26] Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(4): 348–355.
- [27] Matl I, Hribova P, Honsova E, *et al.* Potential predictive markers in protocol biopsies for premature renal graft loss[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2010, 33(1): 7–14.
- [28] Kusaka M, Fukami N, Sasaki H, *et al.* IP-10, Apoptotic genes, and calcineurin subtype messenger RNA kinetics occurring in rat renal isografts from brain-dead donor[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(1): 361–363.
- [29] Canacankatan N, Sucu N, Aytacoglu B, *et al.* Affirmative effects of iloprost on apoptosis during ischemia-reperfusion injury in kidney as a distant organ[J]. *Ren Fail*, 2012, 34(1): 111–118.

·信息动态·

科学家们将肠道干细胞诱导分化成为不同类型的成熟肠道细胞

据 Xiaolei Yin 2013 年 12 月 1 日 (Nat Methods, 2013. doi: 10.1038/nmeth2737.) 报道, 美国布莱根妇女医院等的研究者通过研究, 使得肠道干细胞不断生长增殖, 进而诱导其分化成为不同类型的成熟的肠道组织。

对于胃肠道病症, 比如克罗恩病及溃疡症等, 一般的疗法只能通过药物或者膳食改变来缓解不适的症状, 但是如果有一天科学家们开发了一种新型疗法, 使用新的肠道组织来替换掉原先炎性的病灶组织, 那么对于治疗胃肠道疾病来说将是非常大的进步。

使用大量的肠道干细胞就可以帮助治疗那些患有克罗恩病等肠道疾病的患者; 很多制药公司利用这些干细胞来筛选并且分离那些用于调节、治疗炎症肠病的新药, 然而到目前为止, 研究者们并没有开发出有效的方法来扩增肠道干细胞的数量。

人类肠道中的隐窝是一种未成熟的成体干细胞, 其与帕内特细胞一起生存, 隐窝当与帕内特细胞在一起时就会处于未成熟的状态, 但是研究者们发现, 当帕内特细胞被移除或者被两种细胞信号分子替换时, 这些信号分子就会指挥隐窝细胞发育成为纯正的增殖干细胞, 通过将其他分子引入到干细胞中, 最终这种纯正的增殖干细胞就会分化成为特殊的成熟肠道细胞。

这种方法可以帮助产生大量的相关成熟肠道细胞, 同时也可以使用不同类型的成熟肠道细胞来进行高通量的药物筛选。这项研究可以帮助科学家们进行体内研究, 寻找新型的分子, 帮助移除肠道的损伤组织。该研究为研究者将来开发一种新型肠道组织用于治疗肠道疾病患者及进行安全的药物筛选提供了新的思路和帮助。