

针对细胞凋亡的靶向治疗在心脏移植中的意义

祝曙光 熊利华

摘要 近年来发现细胞凋亡在移植免疫中发挥了重要的作用, 预防心肌细胞的凋亡能减少移植物的损伤, 而延长其存活时间, 这些策略将为心脏移植提供新的研究方向, 本文就此作一综述。

关键词 细胞凋亡 排斥反应 心脏移植

细胞凋亡也称为程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD)。1972 年, Kerr 等^[1] 首先提出细胞凋亡 (apoptosis) 的概念, 细胞凋亡发生于分散的单个细胞, 主要表现为细胞皱缩、染色质致密或边聚、细胞核裂解, 终末期形成凋亡小体。细胞凋亡时发生一系列信号传递反应, 使核酸内切酶激活, DNA 被核酸内切酶切割成为 180 ~ 200 bp 的片段, 提取凋亡细胞的 DNA, 经琼脂糖电泳出现具有特征性的阶梯状条带, 而细胞坏死时 DNA 断裂是随机的。可以用 TUNEL (TDT-mediated dTUP nick end labeling) 法检测到原位细胞的 DNA 片段, 从而对凋亡细胞进行定量分析。凋亡的另一特征是有新的 RNA 及蛋白质合成。以往曾认为凋亡不发生在终末分化的组织, 如心肌细胞等^[2], 近年来, 随着心脏移植的不断开展和深入研究, 人们发现细胞凋亡在心脏移植中具有特殊的生物学意义, 细胞凋亡是由许多因素控制的级联反应, 它不同于细胞坏死, 可以被阻断或者逆转, 因此每一个与凋亡有关的环节都可能成为治疗的新靶点, 其在器官移植中的作用正成为现代移植免疫学研究的热点之一。

1. 与抗细胞凋亡有关途径在心脏移植中的应用

1.1 NO 合酶-2 途径 近年来, 有研究显示 NO 合酶-2 (NOS-2) 介导途径在急性排斥反应移植物功能衰竭中起了重要的作用, 而且此作用与诱导移植物凋亡有关^[3], Szabolcs 等^[4] 在大鼠同种异体心脏移植中发现移植后的 3 ~ 5 天心肌细胞凋亡就快速增加, 从 $0.31/\text{mm}^2$ 增加到 $1.27/\text{mm}^2$ 心室组织, 第 5 天移植中的心肌细胞、巨噬细胞和内皮细胞的凋亡

均比同系移植物显著增加, 其机制可能与 NOS-2 所产生的 NO 有关。此外, Szabolcs 等^[5] 在大鼠心脏移植前供体和受体均皮下注射 BBS-1 (一种 NO 合酶-2 抑制剂) 30 mg/kg, 移植物存活时间显著延长 (存活时间 6.8 ~ 13.3 天), 在移植后的第 5 天, NO 的生成下降到 53%, 在炎症浸润区的 T 淋巴细胞和巨噬细胞显著减少, 心肌水肿和损伤明显减轻, 心肌细胞凋亡数显著减少。Delikouras 等^[6] 用多克隆鼠抗人 IgG 和猪的原代内皮细胞及猪的永生化的内皮细胞共同孵育, 然后检查基因表型的改变, 这些细胞获得了对肿瘤坏死因子- α 介导的细胞凋亡的抵抗力, 并且有出现 Bcl-2 和 Bcl-x1 的表达上调。这些变化持续伴随着 NOS-2 高表达和由内皮细胞产生的 NO 增加。提示由抗体介导的 NO 生成可防止内皮细胞的凋亡, 其机制可能与 Bcl-2 和 Bcl-x1 的表达上调有关。Koglin 等^[7] 在研究同种异体小鼠心脏移植中将受体小鼠的 NOS-2 基因敲除, 发现 NOS-2 基因缺失受体小鼠的移植排斥分数、细胞凋亡数、P53 的转录水平、caspase-3 表达水平与 NOS-2 基因正常受体小鼠相比均明显下降。在 NOS-2 存在下, P53 可通过 NOS 介导的途径, 使 Bax 上调, 而 Bcl-2 和 Bcl-x1 则下调。Yan 等^[8] 在研究大鼠同种异体心脏移植中发现移植物中的环氧合酶-2 (COX-2) 在心脏移植排斥反应中表达增强, 并且与诱导型 NO 合酶 (iNOS) 的表达呈平行关系, 提示心肌细胞的凋亡可能是通过 NO 来诱导产生的, 最近有报道认为 NO/CO 系统是重要的气体信使分子, 对细胞因子的产生、细胞的增殖和凋亡有重要的作用^[9]。

各种蛋白分子结合发挥生物学功能。血红素加氧酶(HO)是血红素降解的起始酶和限速酶,它在体内以HO1、HO2和HO3三种形式存在,HO1为诱导型,其另外两种为组成型。各种因素如激素、内毒素、热休克、化学物质及氧化刺激等均可诱导HO1的过表达。HO1不仅可以降解血红素,减轻氧化损伤,而且其降解产物也具有重要的生理活性。胆绿素和胆红素有抗补体和抗氧化作用;CO是重要的细胞信息分子,除了调节血管张力外,它还具有抗炎、抗细胞凋亡和抑制平滑肌增殖等作用^[10]。在同种和异种心脏移植模型中,人们发现移植物存活时间的延长与内皮细胞和心肌细胞抗氧化及抗凋亡基因的表达有关。如bcl-2、bcl-x1和HO1等,其中以HO1最为重要,HO1被视为器官移植存活的关键基因^[11]。Katori等^[12]在研究同基因大鼠心脏移植缺血再灌注模型中,实验组供体于切取心脏前48小时用CoPP(一种HO1诱导剂)预处理,对照组用磷酸盐缓冲液预处理,在缺血24小时后再行心脏移植再灌注,实验组移植物细胞凋亡显著减少,而抗凋亡基因(Bcl-2/Bag-1)蛋白表达则明显上调,这提示HO1的过表达对移植器官有保护作用,而此作用又与HO1介导的抗凋亡途径有关,特别在缺血再灌注的早期更明显。Ke等^[13]通过用腺病毒转染白介素-13(IL-13)基因进行人脐静脉内皮细胞培养和大鼠心脏移植的研究,发现细胞凋亡显著减少及移植物存活延长,并且有HO1表达显著上调,提示HO1是IL-13作用下游分子事件的一个效应器。然而,Chok等^[14]研究人心脏移植活检组织标本,发现HO1在无排斥反应组的表达高于排斥反应组。由于临床器官移植术后均使用免疫抑制剂,因此,人们推测免疫抑制剂可能会影响HO的表达^[11],从而使移植物细胞凋亡减少。

1.3 粘附分子途径 粘附分子是一大类膜蛋白,它们介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质、及某些血浆蛋白之间的识别与结合,并参与细胞内外的信号转导。粘附分子参与众多的病理过程,如缺血再灌注损伤、急、慢性排斥反应等。T细胞表面上的一些分子与其在抗原递呈细胞(APC)的配体相互作用是T细胞活化所必须的,而后导致各种免疫反应。损伤的重要机制是白细胞在内皮细胞上的粘附,而内皮细胞和白细胞的粘附主要受粘附分子调控^[15]。

层粘连蛋白单克隆抗体预处理移植受实验组较对照组肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-2、干扰素- γ (IFN- γ)显著下降,而炎症浸润细胞凋亡则显著增多。提示层粘连蛋白在免疫排斥反应中起了重要的作用,并可能成为一个新的治疗靶点。Yamani等^[17]对临床心脏移植的病人进行心内膜活检,这些病人的急性排斥反应包括从0级到3A级,用免疫组化和Western印迹方法检测蛋白质,发现急性排斥反应的T细胞激活和细胞因子的释放均与整合素 $\alpha 5 \beta 3$ (integrin $\alpha V \beta 3$)的表达呈正相关。Coito等^[18]在进行大鼠同种异体心脏移植中,用重组P-选择素糖蛋白配体(rPSGL-Ig)预处理移植受体,实验组较对照组TNF- α 、IL-2、IFN- γ 显著下降,移植物心肌细胞凋亡显著下降,并且有HO1表达显著上调。提示粘附分子在急性排斥反应的级联反应中起了重要的作用。正常情况下内皮细胞表达少量细胞间粘附分子-1(ICAM-1),心肌细胞一般很少表达ICAM-1。IL-1、TNF、IFN等可诱导内皮细胞和心肌细胞表达ICAM-1,也可诱导多形核粒细胞(PMN)上粘附分子的表达,并可增加相互间的粘附,PMN粘附及跨内皮细胞迁移依赖于PMN上的CD18和内皮细胞上的ICAM-1,与心肌细胞粘附也依赖ICAM-1,激活的PMN与内皮细胞结合可产生大量的H₂O₂,从而促进细胞凋亡和加重组织损伤^[19]。心肌内有PMN浸润,其胞浆的嗜天青颗粒中含有大量的髓过氧化物酶(MPO),它是一种重要溶酶体酶,既能间接反映心肌浸润PMN的数量,又能反映其激活程度。Byrne等^[20]在研究兔的心脏移植模型中,发现再灌注4、8、12小时后MPO明显升高,心肌细胞ICAM-1表达增高,心肌细胞凋亡增多,与心肌血再灌注损伤密切相关。而抑制ICAM-1的表达则可以保护移植心脏的功能。

1.4 褪黑素途径 褪黑素(melatonin)主要是由松果体细胞合成和分泌的一种吲哚类激素。在哺乳动物中具有许多重要的功能,如调节生殖、增强免疫、调节昼夜节律等。同时它是一种强自由基清除剂,它能有效清除各类氧自由基,尤其是羟自由基。它清除羟自由基的作用比常规羟自由基清除剂苯甲酸脂(benzoate)强500倍^[21]。褪黑素清除氧自由基主要通过两个途径:(1)直接与自由基结合,阻止自由基氧化的连锁反应;(2)维持和保护细胞抗氧化酶

糖 6-磷酸脱氢酶), 氧自由基的产生^[22]。有研究报道, 氧化应激是缺血心肌细胞凋亡的主要机制^[23]。氧化应激时, 大量的氧自由基攻击生物膜磷脂中的多聚不饱和脂肪酸, 引起膜脂质过氧化, 线粒体肿胀、溶解, 多聚核糖体解聚、脱落及溶酶体的外漏, 胞内钙离子超载, 并激活转录因子使凋亡基因 (P53、ced-4) 上调, 导致细胞凋亡^[24]。Gatti 等^[25] 在进行大鼠同种异体心脏移植中, 在移植鼠的腹腔注射褪黑素, 对照组的腹腔则注射生理盐水, 实验组较对照组移植心的存活时间显著延长, 实验组移植心肌细胞凋亡明显减与移植排斥反应有关的分子 (如内皮素-1、粘附分子) 也明显下降。

2. 结语

细胞凋亡在移植免疫学方面的研究才刚刚起步, 现有研究对细胞凋亡在移植排斥和免疫耐受等方面的意见尚有争议, 大多数报道只是粗糙地观察有无凋亡, 而没有明确是移植脏器的实质细胞凋亡, 还是浸润至移植物的受体免疫细胞的凋亡。移植免疫学中的细胞凋亡的防治策略仍需进一步研究, 主要是去除诱因和阻断信号传递、改变凋亡相关基因的表达等措施。若在心脏移植过程中的缺血再灌注和移植后尽量减少心肌细胞的凋亡, 则可能有利于保护移植心的结构和功能^[12]; 而促进活化 T 淋巴细胞等凋亡的方法将可能是预防和治疗移植排斥、诱导免疫耐受的一种新措施。深信随着研究的深入, 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提供新的理论指导。

参 考 文 献

- Kerr JF, Wllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26(4): 239—257.
- Narula J, Arbustini E, Chandrasekhar Y, et al. Apoptosis and the systolic dysfunction in congestive heart failure. Story of apoptosis interruptus and zombie myocytes. *Cardiol Clin*, 2001; 19(1): 113—126.
- Oyama J, Frantz S, Blais C Jr, et al. Nitric oxide, cell death, and heart failure. *Heart Fail Rev*, 2002; 7(4): 327—334.
- Szabolcs MJ, Ma N, Athan E, et al. Acute cardiac allograft rejection in nitric oxide synthase-2 (—/—) and nitric oxide synthase-2 (+/+) mice: effects of cellular chimeras on myocardial inflammation and cardiomyocyte damage and apoptosis. *Circulation*, 2001;

- nitric oxide synthase-2 dimerization on acute cardiac allograft rejection. *Circulation*, 2002; 106(18): 2392—2396.
- Delikouras A, Hayes M, Malde P, et al. Nitric oxide mediated expression of Bcl-2 and Bcl-x1 and protection from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in porcine endothelial cells after exposure to low concentration of xenoreactive natural antibody. *Transplantation*, 2001; 71(5): 599—605.
- Koglin J, Granville DJ, Glysing-Jensen T, et al. Attenuated acute cardiac rejection in NOS2—/— recipients correlates with reduced apoptosis. *Circulation*, 1999; 99: 836—842.
- Yan X, Ma N, Matthias J, et al. Upregulation of cox-2 during cardiac allograft rejection. *Circulation*, 2000; 101(4): 430—438.
- Otterbein LE. Carbon monoxide: innovative anti-inflammatory properties of an age-old gas molecule. *Antioxid Redox Signal*, 2002; 4(2): 309—319.
- Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med*, 2000; 192: 1015—1016.
- Braudeau C, Bouchet D, Tesson L, et al. Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther*, 2002; 11(8): 710—710.
- Katori M, Buelow R, Ke B, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation*, 2002; 73(2): 287—292.
- Ke B, Shen DX, Zhai Y, et al. Heme oxygenase 1 mediates the immunomodulatory and antiapoptotic effects of interleukin 13 gene therapy in vivo and in vitro. *Hum Gene Ther*, 2002; 13(15): 1845—1857.
- Chok MK, Senechal M, Dorent R, et al. Apoptosis and expression of heme oxygenase-1 in heart transplant recipients during acute rejection episodes. *Transplant Proc*, 2002; 34: 3239—3240.
- Ohkohchi N, Hirano T, Satake M, et al. Immunological reactions in liver graft perireperfusion in living donor liver transplantation: change of expression of adhesion molecules, deposition of immunoglobulins and cytokine level. *Hepatogastroenterology*, 2003; 50(52): 1090—1096.
- Riederer I, Silva SD, Rodrigues ML, et al. Local antilaminin antibody treatment alters the rejection pattern of murine cardiac allografts: correlation between cellular infiltration and extracellular matrix. *Transplantation*, 2002; 74(11): 1515—1522.
- Yamani MH, Yang J, Masri CS, et al. Acute cellular rejection following human heart transplantation is associated with increased expression of vitronectin receptor (integrin alpha V beta 3). *Am J Transplant*, 2002; 2(2): 129—133.
- Coito AJ, Shaw GD, Li J, et al. Selectin-mediated interactions regulate cytokine networks and macrophage heme oxygenase-1 induction in cardiac allograft recipients. *Lab Invest*, 2002; 82(1): 61—70.

migration via mast cell-derived IL-1 alpha and beta. *Immunol*, 2002; 169(8): 4522—4530.

20. Byrne JG, Karavas AN, Elhalabi A, et al. Myocardial neutrophil sequestration during reperfusion of the transplanted rabbit heart. *Heart Lung Transplant*, 2000; 19: 786—791.

21. Bandyopadhyay D, Biswas K. Melatonin protects against stress-induced gastric lesions by scavenging the hydroxyl radical. *J Pineal Res*, 2000; 29: 143—151.

22. Sener G, Tosun O, Sehirdi AO, et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci*, 2003; 72(24): 2707—2718.

23. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T. Status of myocardial antioxi-

dants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2000; 47: 446—447.

24. Cinolo MR, Aquilano K, De Martino A, et al. Differential role of superoxide and glutathione in S-nitrosoglutathione-mediated apoptosis: a rationale for mild forms of familial amyotrophic lateral sclerosis associated with less active Cu, Zn superoxide dismutase mutants. *Neurochem*, 2001; 77(6): 1433—1443.

25. Gatti S, Colombo G, Buffa R, et al. Alpha-melanocyte stimulating hormone protects the allograft in experimental heart transplantation. *Transplantation*, 2002; 74(12): 1678—1684.

(收稿日期: 2004—10—19)

。综述。

机器人外科

朱越锋 沈来根

摘要 目前,正在结合自动机械技术、远程通讯技术和计算机技术开创一个机器人外科的新时代,本文综述了当前机器人外科的研究进展及其在临床上的应用。

关键词 机器人 外科 临床应用

20 世纪医学科学对人类文明的重要贡献之一是以腹腔镜技术为代表的微创外科(minimal invasive surgery)的形成与发展。今天,微创外科不仅引发了外科学领域的一场新技术革命,而且正在结合自动机械技术、远程通讯和计算机技术开创一个机器人外科的新时代。

1. 背景及历史

微创外科起源于 1987 年的首例腹腔镜胆囊切除术。此后,微创外科的发展主要是在器械的改进和手术医师操作技能的提高。许多研究显示,腹腔镜手术能减少住院时间、较快的恢复体力、减少疾病、较美观、术后免疫功能恢复较好。但是腹腔镜器械存在着一些显著的缺陷,主要是缺乏触觉的反馈、自然的眼手协调性和灵活性,这将使精细的解剖和吻合变得更加困难。因此,克服当前腹腔镜技术存在的缺陷和追求更完美的微创手术成为手术机器人发展的推动力^[1]。

最早应用于手术的机器人叫“美洲狮 560”,

1985 年 Kwah 等用于提高神经外科活检的精确度。3 年后, Davies 等用“美洲狮 560”行经尿道前列腺切除术获得成功。这套设备最终演化成 PROBOT——一种被设计成专门经尿道前列腺切除的设备。在 PROBOT 发展的同时, Sacramento CA 联合手术设备有限公司发明了“ROBODOC”,被用于在髋关节置换术中精确的调整股骨。“ROBODOC”是第一个被 FDA 通过的手术机器人^[2]。

值得一提的是美国加州 Computer Motion 公司,过去是由军方提供风险基金研究内镜自动定位系统——伊索(AESOP)——一种能由手术医师声控的“扶镜”电子机械手。在伊索上市后不久, Mountain View 公司整合手术系统(现在的直视手术)通过 SRI Green 远程手术系统的许可。这个系统经过广泛的重新设计并被称为达芬手术系统。1 年后, Computer Motion 公司的宙斯系统也投产。

2. 当前机器人手术系统

现在许多机器人和机器人辅助设备正在研究