

· 论 著 ·

受体小鼠诱导一氧化碳延长同种移植心存活时间实验研究

张松林, 孙宗全[△], 于 利

(华中科技大学同济医学院附属协和医院心血管外科, 武汉 430022)

摘要:目的 观察受体小鼠诱导一氧化碳(CO)对同种移植心存活时间的影响,并探讨其可能的机制。方法 建立小鼠颈部异位心脏移植模型(C57BL/6→Balb/c 小鼠)。受体小鼠自移植前 1 d 至移植后第 6 天(MC_{1周}组)或至第 13 天(MC_{2周}组)以二氯甲烷(MC)100 mg/kg 体质量灌胃,或以同体积不含 MC 的橄榄油灌胃(Tx 组)。观测移植心存活时间,于移植后第 6、10 天检测受体血清 TNF- α 、IL-10 的含量和移植心肌 TNF- α 、IL-10 mRNA 的表达及病理学改变。结果 受体以 MC 灌胃后血液中碳氧血红蛋白(CO_hb)浓度在 3 h 达到峰值;与 Tx 组比较,受体诱导 CO(MC 组)可以明显延长移植心存活时间,差异有统计学意义($P < 0.01$),降低血清 TNF- α 的含量和移植心肌 TNF- α mRNA 的表达,差异有统计学意义($P < 0.01$),心肌的病理学改变明显减轻,以 MC_{2周}组明显;各组血清 IL-10 含量和移植心肌 IL-10 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 受体小鼠诱导 CO 明显延长同种移植心的存活时间,其主要机制可能与 CO 降低受体血清 TNF- α 含量和移植心肌 TNF- α mRNA 表达有关。

关键词:一氧化碳;排斥反应;生存率;心脏移植;小鼠

中图分类号:R654.2

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)14-1808-03

Experimental study of carbon monoxide with methylene chloride in recipients prolongs cardiac allograft survival in mice

ZHANG Song-lin, SUN Zong-quan[△], YU Li

(Department of Cardiovascular Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: Objective To investigate whether induction of carbon monoxide(CO) in recipients could prolong cardiac graft survival and the possible mechanisms in mice. **Methods** Inbred male C57BL/6 mice were used as donors and Balb/c mice were used as recipients to establish allogeneic heart transplantation model. Recipients were treated with either methylene chloride (100mg/kg, per os, Group MC) or olive oil(Group Tx) day 1 prior to transplantation to day 6 posttransplantation (Group MC_{1w}) or day 13 posttransplantation(Group MC_{2w}). Recipients mice were killed at day 6 and day 10 after transplantation for serum and cardiac graft samples ($n=5\sim6$ for each time point). The serum TNF- α and IL-10 and the TNF- α mRNA and IL-10 mRNA in cardiac grafts were measured, respectively. The survival of cardiac grafts was recorded. **Results** Following MC application serum CO_hb peaked within 3h in recipients. Compared with Group Tx, induction of CO in recipients, especially in Group MC_{2w}, prolonged significantly the cardiac graft survival ($P < 0.01$), down-regulated the levels of serum TNF- α and cardiac graft TNF- α mRNA ($P < 0.01$), and decreased lymphocyte and monocyte infiltration in cardiac grafts. The levels of serum IL-10 and graft IL-10 mRNA did not differ between the groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Induction of carbon monoxide in recipients could prolong cardiac graft survival via down-regulation of the levels of serum TNF- α and TNF- α mRNA in grafts in mice.

Key words: carbon monoxide; rejection; survival; heart transplantation; mice

既往对排斥反应的研究主要集中在抑制 T 细胞介导的免疫应答,而对免疫应答所引起的移植物损伤的保护的研究很少。研究表明,血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)可以通过抗炎、抗凋亡等功能而发挥其对移植物的保护作用^[1]。一氧化碳(carbon monoxide, CO)是 HO-1 催化亚铁血红素生成的产物之一。长期以来,由于 CO 具有极强的干扰体内氧运输的特性而一直被认为是一种有害的废弃物。事实上 CO 是与一氧化氮(NO)类似的重要信号分子,低浓度的 CO 具有调节血管张力、抗炎和抗凋亡等功能,多数情况下可以替代 HO-1 而保护器官移植物^[2]。目前,CO 主要用于各种移植物缺血再灌注损伤的保护,而极少用于排斥反应的研究。本研究在小鼠心脏移植模型的基础上,观察受体小鼠诱导 CO 对同种移植心存活时间的影响,并探讨其可能的机制。

1 材料与方

1.1 主要试剂 二氯甲烷(methylene chloride, MC)由中国上海国药集团化学试剂有限公司生产,纯度大于或等于 99.5%。

TNF- α 和 IL-10 ELISA 试剂盒(武汉博士德公司)、Trizol 试剂盒和 SYBER Green I mixture(Invitrogen 公司)。

1.2 建立小鼠颈部异位心脏移植模型 供体为雄性 C57BL/6 小鼠(6~8 周, H-2^b),体质量 16~22 g;受体为雄性 Balb/c 小鼠(8~12 周, H-2^d),体质量 22~28 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。参照肖亚等^[3]的方法并以 cuff 技术改良,即采用 cuff 技术制作小鼠颈部异位心脏移植模型。利用自制套管将受体右颈动脉与供心主动脉吻合,受体右颈外静脉与供心主肺动脉吻合。术后每日触诊心跳情况,心跳持续时间大于 72 h 视为手术成功,心跳停止视为排斥反应终点。

1.3 体内诱导 CO 的方法及血液中 CO 含量的检测 MC 为 CO 的药物前体(Prodrugs),主要在肝脏由细胞色素 P450 氧化酶代谢,产生 CO 和 CO₂^[4]。MC 用橄榄油稀释,浓度为 15 mg/mL,以 100 mg/kg 体质量灌胃。血液中 CO 的含量用碳氧血红蛋白(CO_hb)占总血红蛋白的百分率表示,分别于灌胃后 0、1、3、6、12 和 24 h 剪尾采血(每一时间点 $n=5$),每次约 80~

[△] 通讯作者, E-mail: sunzquan@yahoo. cn.

表 1 受体血液中 TNF- α 、IL-10 含量及移植心肌组织 TNF- α 、IL-10 mRNA 的相对表达水平

组别	时间	n	TNF- α (pg/mL)	IL-10(pg/mL)	TNF- α mRNA	IL-10 mRNA
Tx	d ₆	6	254.28±36.23	52.13±9.07	24.61±3.38	4.82±0.95
MC _{1周}	d ₆	6	63.90±13.38*	52.05±7.08	5.84±1.06*	4.99±0.86
	d ₁₀	6	137.22±35.91	56.91±11.45	13.93±2.44	4.89±0.96
MC _{2周}	d ₆	5	62.65±12.57*	51.26±9.17	5.52±0.66*	5.31±1.22
	d ₁₀	5	66.60±11.06 [#]	53.98±8.72	7.67±1.03 [#]	5.36±0.93

相同时间点,与 Tx 组比较,* :P<0.01;与 MC_{1周}组比较,[#] :P<0.01。

100 μ L,用德国 Bayer 400 血气分析仪测 COHb 的含量。

1.4 实验分组与方法 CO 诱导组(MC 组):受体小鼠自移植前 1 d 至移植后 6 d(d₆)(MC_{1周}组)或自移植前 1 d 至移植后 13 d(d₁₃)(MC_{2周}组)用含 MC 的橄榄油(100 mg/kg 体质量)灌胃处理,每日 1 次;移植对照组(Tx):受体小鼠自移植前 1 d 至移植后心跳停止当天用不含 MC 的同体积橄榄油灌胃处理,其余同 MC 组。于移植后 6、10 d 分批处死受体小鼠,收集移植心肌及血液标本(每一时间点 n=5~6/组)。另建立上述 3 组模型(n=6~8/组),观测移植心存活时间。

1.5 检测指标

1.5.1 移植后受体血液 TNF- α 、IL-10 的含量 采用 ELASA 法检测。相应时间点经下腔静脉采血,离心后按照 ELASA 试剂盒说明书进行,每个标本作双复孔,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.5.2 移植心 TNF- α 、IL-10 mRNA 的表达 采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测。各取 50 mg 心肌组织,Trizol 法提取心肌细胞总 RNA。按逆转录酶说明书将 1 μ g 总 RNA 逆转录成 cDNA。引物序列^[5]:TNF- α 上游引物:CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A,下游引物:TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC;IL-10 上游引物:GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA,下游引物:ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT;内参基因 GAPDH 上游引物:TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC,下游引物:GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA。然后于 ABI Prism™ 7900 型荧光定量 PCR 仪中进行反应,具体方法、步骤参照文献[5]及该 PCR 仪的中文操作手册,结果以与 GAPDH 的比值(倍数)表示。

1.5.3 移植心组织病理学改变 取移植心肌组织,4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片后 HE 染色。

1.6 统计学方法 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS15.0 统计软件进行统计学分析。组间比较应用单因素方差分析或 t 检验;存活时间采用 Kaplan-Meier 生存期分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠 MC 灌胃后血液 COHb 的浓度变化 正常 Balb/c 小鼠血液中 COHb 的浓度为(0.85±0.28)%。以 MC 100 mg/kg 体质量灌胃后可迅速增加小鼠血液中 COHb 的水平,其峰值出现在灌胃后 3 h,达到(5.24±0.45)% (与橄榄油组比较,P<0.01),24 h 后仍高于灌胃前水平(1.32±0.21)%;而用同体积橄榄油灌胃,24 h 内 COHb 浓度与正常 Balb/c 小鼠无明显区别。血氧饱和度、pH 值、HCO₃⁻ 等指标在各组之间无明显区别。

2.2 移植心存活时间 Tx 组平均生存期为(6.33±0.56)d;MC_{1周}组平均生存期为(12.14±0.87)d(与 Tx 组比较,P<0.01);MC_{2周}组平均生存期为(19.83±0.95)d(与 Tx 组、MC_{1周}组比较,P<0.01)。这提示受体诱导 CO 能明显延长移

植心的存活时间。

2.3 移植后受体血液中 TNF- α 、IL-10 含量变化 表 1 显示,受体诱导 CO 明显降低血清中 TNF- α 水平(与 Tx 组比较 P<0.01);且移植后第 10 天 MC_{2周}组 TNF- α 水平低于 MC_{1周}组(P<0.01)。各组血清 IL-10 含量差异无统计学意义(P>0.05)。

2.4 移植心 TNF- α 、IL-10 mRNA 的表达 与受体血液中 TNF- α 、IL-10 含量变化相一致,受体诱导 CO 明显降低心脏移植植物 TNF- α mRNA 表达水平(与 Tx 组比较,P<0.01),同时增加 IL-10 mRNA 的表达,但差异无统计学意义(P>0.05)。见表 1。

2.5 组织病理学改变 移植后第 6 天 Tx 组见心肌组织内大量淋巴细胞和单核细胞浸润,伴明显心肌水肿、出血和坏死改变;MC_{1周}组和 MC_{2周}组见少量淋巴细胞和单核细胞浸润。

3 讨 论

CO 是一种与 NO 类似的体内重要信号分子,由于它的毒性而长期忽视了其生物学性能。内源性 CO 主要由 HO-1 催化亚铁血红素生成,对于维持细胞内环境的稳定有重要作用。资料表明,外源性低浓度的 CO 在各种应激条件下可以弥补内源性 CO 的短缺,发挥调节血管张力、抗炎、抗凋亡等作用^[2]。本研究采用的 MC,是卤代饱和的碳氢化合物,为 CO 药物前体,可以在体内迅速吸收,主要在肝脏由细胞色素 P450 氧化酶代谢,主要产物为 CO 和 CO₂,极少量的 MC 经肾脏和肺排出^[4]。选用 100 mg/kg 体质量灌胃,在血液中产生 COHb 峰值小于 10%^[6],因此该剂量是安全的。本实验采用 MC 处理受体,可以明显增加血液 COHb 水平,而对血氧饱和度、pH 值等指标无明显影响,提示移植后 MC 组移植心存活时间明显延长主要与产生 CO 有关。这与直接吸入低浓度的 CO 延长大鼠肺、胰岛等移植物的存活时间的作用是一致的^[7-8]。

研究表明,促炎细胞因子在器官移植后的排斥反应发生中起重要作用^[9]。TNF- α 是移植排斥损伤的重要促炎细胞因子,在移植排斥损伤过程中 TNF- α 表达增加,而使用 TNF- α 抗体可明显减轻移植排斥反应^[10]。本研究同样发现 Tx 组血液 TNF- α 含量和移植心 TNF- α mRNA 表达明显增加,排斥反应明显较 MC 组重,导致移植心存活时间明显较 MC 组短。这印证了 TNF- α 在移植排斥反应中的重要作用,同时表明受体诱导 CO 延长移植心存活时间与降低血液 TNF- α 含量和抑制心肌 TNF- α mRNA 表达有关。而 Song 等^[7]在大鼠肺移植实验中,发现吸入 CO 除了可以减少移植肺 TNF- α 等促炎因子的表达外,还明显降低肺上皮细胞的凋亡指数,从而提示 CO 除了抗炎作用外,还可以通过抗凋亡功能保护器官移植植物。这与 CO 缓解移植植物缺血再灌注损伤的机制具有相似之处^[2,11-12]。

与 TNF- α 作用相反的是,IL-10 是一种抑制性的细胞因子,它不仅抑制 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子的分泌,

而且可以通过下调单核细胞表面 MHC-II 类抗原分子和 T 淋巴细胞激活所必需的共刺激分子的表达而实现其抑制抗原递呈的功能^[13]。因此,上调 IL-10 的表达可以诱导移植耐受,研究结果也证实,受体转染重组 IL-10 可以明显降低移植排斥反应的发生率并延长移植体生存时间。但本实验结果发现,3 组血清 IL-10 含量和移植心肌 IL-10 mRNA 表达水平无明显差别,提示受体诱导 CO 延长移植体存活时间并不是通过上调 IL-10 的表达而实现的。

综上所述,受体小鼠诱导 CO 明显延长同种移植体的存活时间,其主要机制可能与 CO 降低受体血清 TNF- α 含量和下调移植心肌 TNF- α mRNA 表达有关。

参考文献:

- [1] Schnickel GT, Hsieh GR, Kachikwu EL, et al. Cytoprotective gene HO-1 and chronic rejection in heart transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2006, 38(10): 3259.
- [2] Nakao A, Choi AM, Murase N. Protective effect of carbon monoxide in transplantation[J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(3): 650.
- [3] 肖亚, 张良甫, 黄赤兵, 等. 改良法建立小鼠颈部异位心脏移植模型[J]. *重庆医学*, 2006, 35(16): 1471.
- [4] Martins PN, Reutzel-Selke A, Jurisch A, et al. Induction of carbon monoxide in donor animals prior to organ procurement reduces graft immunogenicity and inhibits chronic allograft dysfunction[J]. *Transplantation*, 2006, 82(7): 938.
- [5] Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, et al. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression[J]. *J Biomol Tech*, 2003, 14(1): 33.
- [6] Chauveau C, Bouchet D, Roussel JC, et al. Gene transfer of heme oxygenase-1 and carbon monoxide delivery inhibit chronic rejection[J]. *Am J Transplant*, 2002, 2(7): 581.
- [7] 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.
- [8] Wang H, Lee SS, Gao W, et al. Donor treatment with carbon monoxide can yield islet allograft survival and tolerance[J]. *Diabetes*, 2005, 54(5): 1400.
- [9] Xia J, Xu L, Yang C. Expression of cytokines in acute heart transplantation rejection[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol(Med Sci)*, 2006, 26(5): 583.
- [10] Pascher A, Klupp J, Langrehr JM, et al. Anti-TNF-alpha therapy for acute rejection in intestinal transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(3): 1635.
- [11] Kaizu T, Ikeda A, Nakao A, et al. Protection of transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury with carbon monoxide via MEK/ERK1/2 pathway downregulation[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 294(1): G236.
- [12] Zhou H, Ding W, Cui X, et al. Carbon monoxide inhalation ameliorates conditions of lung grafts from rat brain death donors[J]. *Chin Med J*, 2008, 121(15): 1411.
- [13] 张波, 府伟灵, 王璐, 等. 血清 IL-10 和 TNF- α 水平的动态检测在早期预测肝移植术后急性排斥反应中的作用[J]. *重庆医学*, 2003, 32(12): 1634.

(收稿日期: 2009-12-01 修回日期: 2010-04-20)

(上接第 1807 页)

比较和 Meta 分析或系统评价。对直径小于或等于 2 cm 肝硬化 SHCC, RFA 与 PEI 治疗总体效果可能相似的结果需谨慎对待。作者认为对单个肿瘤直径小于或等于 5 cm 或肿瘤数目 1~3 个且直径小于 3 cm 的 SHCC 尤其是伴肝硬化者、不适合手术者的治疗 RFA 应优先 PEI 使用。

参考文献:

- [1] Lencioni RA, Allgaier HP, Cioni D, et al. Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radiofrequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection[J]. *Radiology*, 2003, 228: 235.
- [2] Lin SM, Lin CJ, Lin CC, et al. Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma ≤ 4 cm[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127: 1714.
- [3] Lin SM, Lin CJ, Lin CC, et al. Randomized controlled trial comparing percutaneous radiofrequency thermal ablation, percutaneous ethanol injection, and percutaneous acetic acid injection to treat hepatocellular carcinoma of 3 cm or less[J]. *Gut*, 2005, 54: 1151.
- [4] Shiina S, Teratani T, Obi S, et al. A randomized controlled trial of radiofrequency ablation with ethanol injection for small hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2005, 129: 122.
- [5] Brunello F, Veltri A, Carucci P, et al. Radiofrequency ablation versus ethanol injection for early hepatocellular carcinoma: A randomized controlled trial[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2008, 43(6): 727.
- [6] 周可. B 超引导经皮肝穿射频治疗肝癌 46 例临床分析[J]. *重庆医学*, 2009, 38(10): 1223.
- [7] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2005, 42(5): 1208.
- [8] Ohnishi K, Yoshioka H, Ito S, et al. Prospective randomized controlled trial comparing percutaneous acetic acid injection and percutaneous ethanol injection for small hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 1998, 27: 67.
- [9] Huang GT, Lee PH, Tsang YM, et al. Percutaneous ethanol injection versus surgical resection for the treatment of small hepatocellular carcinoma: a prospective study[J]. *Ann Surg*, 2005, 242(1): 36.

(收稿日期: 2009-09-16 修回日期: 2009-12-20)