

·基础研究·

环孢霉素 A 对大鼠心脏移植模型淋巴细胞分子表达与移植心脏病理学改变时相关性的影响

许秀芳¹, 辛毅¹, 李娜¹, 张颖¹, 黄益民¹, 顾云¹, 周玉杰², 张兆光^{2*}
(首都医科大学附属北京安贞医院 1.北京市心肺血管疾病研究所分子生物学研究室, 2.外科, 北京 100029)

摘要:【目的】通过环孢素 A(CsA)干预的异体异位心脏移植动物模型的研究,对移植术后淋巴细胞分子表达、心肌组织淋巴细胞浸润能力和移植心脏病理改变时相进行比较,探讨环孢素 A 对其影响。【方法】SD 大鼠为移植心脏供体, Wistar 大鼠为移植心脏受体。实验分为心脏移植对照组和环孢素 A 干预+心脏移植组实验组两组。在移植前及移植后 24 h、3 d、7 d、10 d 和 12 d 时间点免疫荧光测定淋巴细胞在心肌组织中浸润能力、实时定量 PCR 检测淋巴细胞编码基因 CD4、CD8 和酪氨酸激酶 P59 mRNA 表达水平、心肌组织病理学检查判断排斥反应程度。【结果】①心脏移植后 24 h 内,外周血淋巴细胞基因的转录与表达为一过性降低;②心肌组织 CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞浸润和 II 级排斥反应病理改变,主要出现于心脏移植后的 d3 ~ d7;③环孢素 A 不能有效抑制移植后 3 d 内心肌组织 CD4⁺、CD8⁺淋巴细胞浸润程度的快速增加,但可明显降低移植后 d3 ~ d7 的心肌组织 CD4⁺ 淋巴细胞的浸润程度;④环孢素 A 不能完全阻断淋巴细胞 P59 基因的表达;⑤环孢素 A 不能有效抑制淋巴细胞 CD4 基因正调表达,但可抑制 CD8 基因的转录。【结论】环孢素 A 的移植排斥反应的抑制作用在大鼠移植后 d3 ~ d7。淋巴细胞基因表达、心肌组织淋巴细胞浸润与排斥反应病理改变有关。这将有助于同种移植病人环孢素 A 的临床应用。

关键词:大鼠心脏移植模型/心脏外科;心肌组织淋巴细胞浸润/病理学;外周血淋巴细胞基因表达时相/免疫学
中图分类号: R329.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2013)02-0161-09

Influence of Cyclosporin A on Molecular Expression of Lymphocytes and Relationship with Pathological Changes after Allogenic Heart Transplantation

XU Xiu-fang¹, XIN Yi¹, Li Na¹, ZHANG Ying¹, HANG Yi-min¹, GU Yun¹, ZHOU Yu-jie², ZHANG Zhao-guang^{2*}
(1.Molecular Biology, Beijing Institute of Heart, Lung & Blood Vessel Diseases, 2. Department of Surgery, Capital Medical University Affiliated Beijing Anzhen Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effects of cyclosporine A (CsA) on the molecular expression of the lymphocytes and the relationship with the pathological changes after the allogenic heart transplantation. 【Methods】To use SD rats as the donors and Wistar rats as recipients. The animals were divided into two groups: allogenic heart transplantation Wistar rats with cyclosporine A intervention were used as experimental group and without the cyclosporine A intervention as control group. Before the operation, 24 h, 72 h, 7 d, 10 d, and 12d after the transplantation, the lymphocyte infiltrating in myocardial tissues was observed using fluorescence antibodies. CD4, CD8, and P59 mRNA expression level were analyzed by quantified PCR. The histopathological changes in myocardial tissues were monitored to judge the allogenic rejection. 【Results】(1) 24 h after heart transplantation the transcription and expression of peripheral blood lymphocytes genes were reduced. (2) CD4⁺, CD8⁺ lymphocyte infiltration increased after the transplantation and the II degree rejection pathological changes happened between d3 and d7 after heart transplantation. (3) Cyclosporine A did not affect CD4⁺ and CD8⁺ expression and the lymphocytes infiltration in the first 3 days after the transplantation. But CsA significantly reduced the CD4⁺ infiltration degree in myocardial tissues between d3 and d7. (4) In both groups, CsA was not

收稿日期: 2012-12-19

基金项目: 首都医学发展科研基金(重点学科)(ZB199814)。

作者简介: 许秀芳, 博士, 副研究员, 研究方向: 移植免疫和组织工程, E-mail: drxuxiufang@yahoo.com.cn; * 通信作者: 张兆光, 教授, 主任医师, 研究方向: 心脏外科, E-mail: ssnfder@163.com

able to completely block P59 gene expression. (5) Although cyclosporine A did not effectively suppress lymphocyte CD4 gene positive expression but it could suppress CD8 gene transcription. 【Conclusions】 The immunosuppressive effects of CsA was majorly happened in d3~d7 after the allogenic heart transplantation. The peripheral blood lymphocytes genes expression, lymphocytes infiltration in myocardial tissues were correlated with the pathological changes. This finding may provide a better understanding of the clinical use of the CsA for the allogenic heart transplantation patients.

Key words: rat heart transplantation model; cardiac surgery; lymphocytes infiltrating ability in myocardial tissues; pathology; time phages of the peripheral blood leukocyte gene expression; immunology

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(2):161-169]

心脏移植后排斥反应主要涉及到淋巴细胞的激活与效应机制^[1-3]。环孢素 A (Cyclosporin A, CsA) 作为一种选择性作用于 T 淋巴细胞的强效免疫抑制剂, 抑制辅助性 T 细胞活化及对 IL-2 的反应性, 主要用于预防移植术后的移植物抗宿主 (GVH) 反应, 或治疗多种自身免疫病。但是目前环孢素 A 的确切反应机理仍然不是太明确^[4]。本文通过环孢素 A 干预的异体异位心脏移植动物模型的研究, 对移植术后外周血淋巴细胞表面蛋白分子、基因表达和移植心脏病理改变时相进行比较, 系统探讨心脏移植后淋巴细胞表面蛋白分子、基因表达和移植心脏病理改变时相的特征以及彼此间的进程关系; 环孢素 A 对心脏移植后淋巴细胞表面蛋白分子、基因表达和移植心脏病理的改变时相的具体影响, 并为进一步解释临床研究所提出的有关问题打下基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组

分别选择 SPF 级 SD 大鼠, 体质量为 (235 ± 15) g, 作为移植心脏供体, 体质量 (235 ± 15) g 的 SPF 级 Wistar 大鼠作为心脏移植的受体, 雌雄各半, 以上动物被分为心脏移植对照组和环孢素 A+ 心脏移植组 2 组。在实施心脏移植术前, 环孢素 A 干预组的供体与受体大鼠按照每天 15 mg/kg 的剂量给予环孢素 A (Neoral Sandimmun, Cyclosporin, Novartis) 灌胃 5 d。心脏移植后环孢素 A 组的受体仍按照每天环孢素 A 15 mg/kg 剂量给予连续灌胃。

1.2 大鼠同种异体异位心脏移植模型的建立

以上 2 组的供、受体大鼠按照 45 mg/kg 体质量的剂量, 用 3% 戊巴比妥钠经腹腔注射麻醉。供体大鼠心脏经灌注停跳液使心脏停跳, 于根部前 5 mm 处快速游离供体心脏的主动脉和肺动脉。将

供体大鼠心脏的主动脉和肺动脉分别与受体大鼠的腹主动脉和下腔静脉行端/侧吻合, 建立供心冠脉循环^[5]。待供体心脏建立循环后复跳 30 min、无出血及异常搏动、无可见心肌梗死后关腹 (图 1)。

1.3 样本采集

1.3.1 采集血样 移植对照组和环孢素 A 干预组的受体大鼠分别在心脏移植前, 心脏移植后 24 h、3 d、7 d、10 d 和 12 d, 按照 45 mg/kg 体质量的剂量, 用 3% 戊巴比妥钠经腹腔注射麻醉。麻醉后的大鼠经颈动脉穿刺取血, 1:9 2% EDTA 抗凝, 备用。每个时间点的实验大鼠为 6~12 只。

1.3.2 采集移植心脏 在实验设计的各时间点, 取血后的大鼠, 快速游离移植心脏, 冰冻保存, 用于免疫组化和病理检测。

1.4 指标测定

1.4.1 淋巴细胞在心肌组织中浸润能力的测定

分别取对照组和环孢素 A 组各实验时间点大鼠的冰冻心脏, 于中、远 1/3 处横段面取材并做冰冻切片, 95% 乙醇固定 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。分别用 Immunotech 公司不同荧光标记的抗大鼠 CD4、CD8 单克隆抗体与心肌组织切片于 37 °C 恒温条件下孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。甘油封片后 4 °C 避光保存。荧光显微镜下分别进行 CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞计数, 并与 CD4、CD8 免疫分子表达水平进行相关性分析。

1.4.2 心肌组织病理学检查 分别取对照组和环孢素 A 干预组各实验时间点大鼠的冰冻心脏, 于中、远 1/3 处横段面取材并做石蜡切片, HE 染色。根据国际器官移植排斥反应病理诊断分级的标准, (既 0 级: 无排斥变化, I A 级: 灶状炎性细胞浸润、无组织坏死, I B 级: 弥漫性轻度炎性细胞浸润、无组织坏死, II 级: 炎性细胞浸润集中于有损伤心肌处, III A 级: 多灶性炎性细胞浸润及心肌细胞损伤, III B 级: 弥漫性炎性细胞浸润及心肌组

组织坏死,Ⅳ级:弥漫性炎性细胞浸润、并有心肌组织坏死和水肿、血管炎等多种变化综合出现),利用光学显微镜对心肌组织切片进行观察,并对排斥反应程度进行分级。其中ⅠA级为早期排斥反应,ⅠB级与Ⅱ级为中度排斥反应,ⅢA级、ⅢB级与Ⅳ级为严重排斥反应。

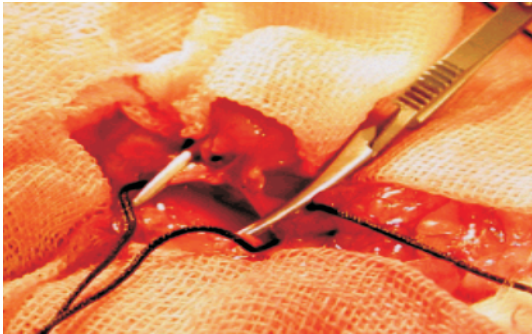


图 1 供体大鼠心脏主动脉、肺动脉分别与受体大鼠腹主动脉、下腔静脉吻合,建立冠脉循环

Fig.1 Donor rats heart aorta and pulmonary arteries were respectively inosculated with the abdominal aorta and inferior vena cavas to build up the coronary circulation

1.4.3 淋巴细胞蛋白分子编码基因表达水平的实时定量 PCR 检测 ①提取淋巴细胞总 RNA:用淋巴细胞分离液分离各时间点抗凝血样本的淋巴细胞。采用 Trizol 法(GIBCO 公司试剂盒)按说明书操作:将淋巴细胞加入 1 mL Trizol 使细胞裂解,4 ℃离心 12 000 r/min ($r = 10\text{ cm}$), 10 min,取上清,加 0.2 mL 氯仿震荡混匀,4 ℃ 12 000 r/min ($r = 10\text{ cm}$)离心 20 min,取最上层加 0.5 mL 异丙醇,12 000 r/min ($r = 10\text{ cm}$), 4 ℃离心 15 min,弃上清留沉淀,加入 1 mL 750 mL/L 乙醇,7 500 r/min ($r = 10\text{ cm}$), 4 ℃离心 5 min,弃上清,750 mL/L 乙醇挥发后溶于 20 μL 0.1% DEPC 水中。②淋巴细胞表面蛋白分子编码基因特异性引物和探针的设计与合成:首先利用 Oligo-3.0 版本的核苷酸设计软件,分别以基因库中人细胞表面蛋白分子 CD4、CD8、P59 和 β -actin 的 mRNA 为模板设计特异性上、下游引物与探针。按照所设计的特异性引物与探针的核苷酸序列合成引物和探针。在特异性探针的 5'端联结荧光基团-Fam、其 3'端联结荧光淬灭基团-Tamra。③淋巴细胞表面蛋白分子编码基因表达水平测定及半定量分析:按 GIBCO 公司

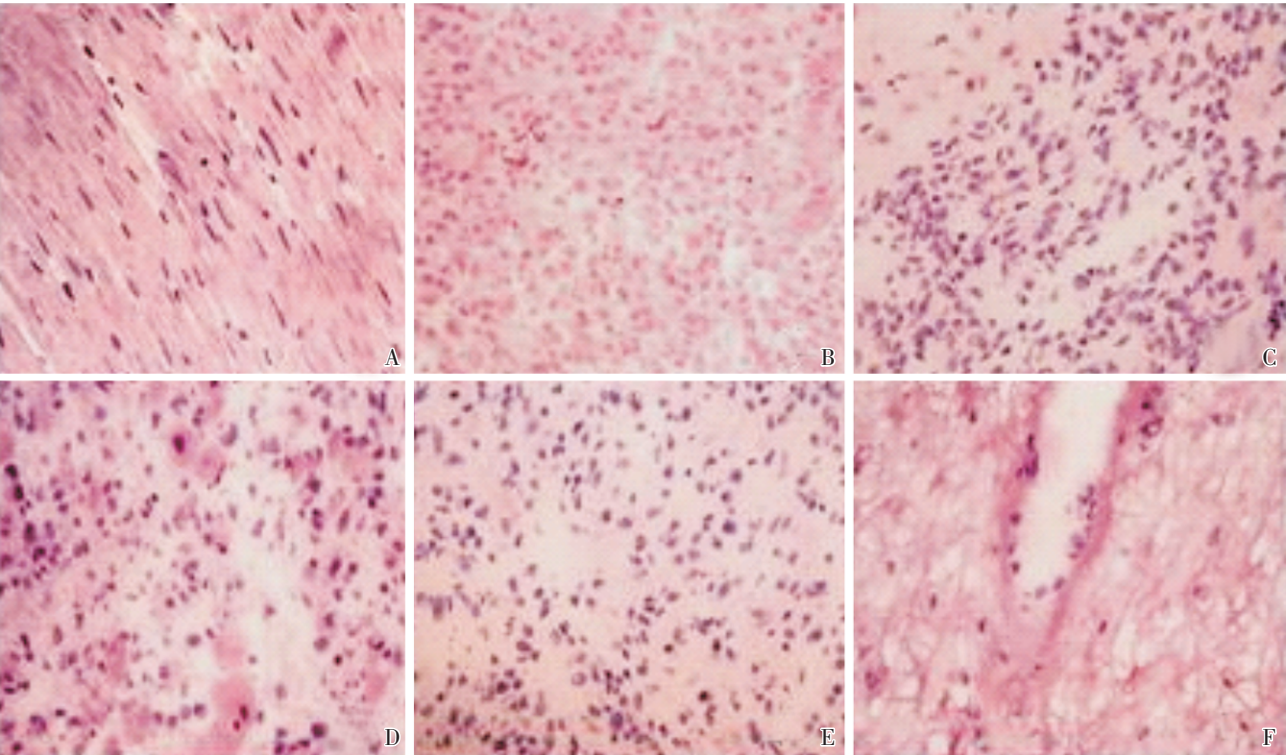


图 2 移植心脏的病理变化

Fig.2 Pathological changes of transplanted rat heart

A: normal myocardium; B: transplantation heart IA level; C: transplantation heart IB level; D: II level; E: IIIA level; F: IIIB level (x100).

试剂盒说明书操作。反应体系为 24 μL ,其中包括总 RNA 2 μL (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、 Mg_2SO_4 1 μL ($25\times 10^{-3}\text{ mmol/L}$)、dNTP 1 μL (10 mmol/L)、RT-PCR 酶混合物 1 μL 、1 $\times$ buffer 5 μL , 淋巴细胞表面蛋白分子编码基因(CD4、CD8、P59 和 β -actin)上、下游特异性引物各 2 μL ($31.25\times 10^{-3}\text{ mmol/L}$), 淋巴细胞表面蛋白分子编码基因特异性荧光标记探针 2 μL ($3.13\times 10^{-3}\text{ mmol/L}$),其余用灭菌水补足。反应条件为 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 1 个循环; 93 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共 5 个循环; 93 $^{\circ}\text{C}$ 变性, 10 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共 40 个循环; 最后降温至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。使用光循环实时 PCR 仪(LightCycler Realtime Online PCR, 罗氏公司, 瑞士)测定和记录反应结果。

1.5 统计分析

利用 SPSS14 统计软件进行动物实验两组心脏移植前后各时间点的各指标参数均值和标准差;所有数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并利用 t 检验分别进行参数间的显著性检验, 设定 $P<0.05$ 时具有显著性差异。心肌组织淋巴细胞浸润程度与移植心脏的病理分级进行 r 相关分析。

2 结 果

2.1 对照组和环孢素 A 组移植心脏的病理学改变时相

在移植后的 7 d 内,对照组移植心脏发生排斥反应病理学改变的比例和等级逐渐增加, 其中从 24 h ~ 72 h II 级以上的病理学改变分别为 12.5% 和 16.7%,变化幅度只有 4.2%。但是从 d3~d7, II

级以上的排斥反应病理学改变便由 16.7%快速增长到 100%,变化幅度达到了 83.3%,其中主要为 III A 和 III B 级的病理变化(图 2)。第 10 d 以后,则都为 III A 级以上的病理改变。这些结果不仅说明从心脏移植后第 24 h 便开始发生急性排斥反应,同时说明以 II 级以上的病理学改变为主要特征的移植心肌组织坏死时相—即排斥反应效应期则主要出现于移植后 d3 ~ d7,这与同组在移植后 d3 ~ d7 移植心脏大量停跳、坏死的时相一致。证明排斥反应性病理改变是本实验中影响移植心脏存活率的主要原因。

环孢素 A 组在移植后第 24 h ~ 72 h 发生 II 级以上排斥反应病理学改变的比例分别为 33.3%和 91.7%,不仅表现出其病理变化开始时间和加重时间的时相与对照组相同,还显示了环孢素 A 组的病理改变较对照组更加严重。这是环孢素 A 组移植后第 72 h 的移植心脏存活率低于对照组的主要病理学基础。但是自 72 h 后,环孢素 A 组发生 II 级以上病理学改变的比例低于对照组,这是此时相内环孢素 A 组仍具有较高的移植心脏存活率的主要病理学基础。

2.2 两组移植心肌组织中 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞浸润度改变时相

对照组在移植后第 24 h 的移植心脏组织中, CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞浸润程度均比移植前明显降低,降低幅度分别为 CD4⁺T 淋巴细胞 -69%、CD8⁺T 淋巴细胞 -80%。此后于第 72 h 开始逐渐升高,并于移植后第 7 d 时达到移植后的峰值,但仍低于移植前的水平(表 1)。这些结果说明,CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞的浸润功能在心脏移植后的

表 1 对照组和环孢素 A 组移植术前术后心肌组织中 CD4⁺CD8⁺ 淋巴细胞浸润度的变化
Table 1 CD4⁺CD8⁺ lymphocyte infiltration degree changes in control group and CsA group before and after the transplantation (cells number, $\bar{x}\pm s$)

Group/time	Anterial	24 h	3 d	7 d	10 d	12 d
CD4 in control group	15.5 $\pm$ 3.1	4.8 $\pm$ 1.2 ³⁾	5.3 $\pm$ 2.1 ³⁾	11.8 $\pm$ 1.7 ¹⁾	9.2 $\pm$ 2.2 ²⁾	11.8 $\pm$ 3.5
cases(n)	6	6	7	6	6	7
CD4 in CsA group	0.5 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.6 ³⁾	8.8 $\pm$ 2.5 ³⁾	5.5 $\pm$ 0.5 ³⁾	4.3 $\pm$ 1.7 ³⁾	4.5 $\pm$ 0.5 ³⁾
cases(n)	6	6	12	10	12	10
CD8 in control group	16.8 $\pm$ 4.8	3.3 $\pm$ 1.03	3.7 $\pm$ 1.1	8.2 $\pm$ 2.9	6.5 $\pm$ 1.1	6.7 $\pm$ 1.6
cases(n)	6	6	7	6	6	7
CD8 in CsA group	3.0 $\pm$ 1.1	2.2 $\pm$ 1.2	7.0 $\pm$ 1.9	6.2 $\pm$ 0.8	7.2 $\pm$ 2.6	3.5 $\pm$ 0.8
cases(n)	6	6	12	10	12	10

Compared with the pretransplantation, 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$, 3) $P<0.001$

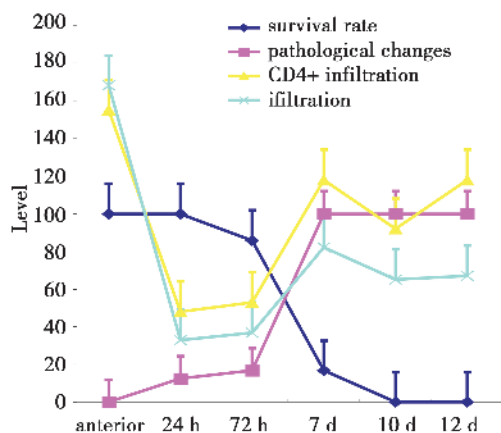


图3 心脏移植前后对照组移植心脏存活率时相与心肌Ⅱ级以上组织病理改变时相以及心肌CD4⁺、CD8⁺淋巴细胞浸润时相的比较

Fig.3 Comparing transplantation heart survival rate, myocardial pathology changes above II degree with CD4⁺/CD8⁺ filtration before and after the transplantation in control group

24 h内被一过性抑制。而它们的免疫浸润程度在移植后的第24 h~3 d开始被激活,浸润功能快速增长的时相是移植后的d3~d7(表1),与本组移植心肌组织大幅度发生Ⅱ级以上排斥反应病理学改变的时相和移植心脏大量停跳、坏死的时相相一致。进一步证明,以CD4⁺和CD8⁺T细胞开始浸润为主要特征的急性细胞免疫排斥反应是造成本组移植心脏病理改变和死亡的主要原因之一,主要发生于移植后d3~d7。

由于移植前环孢素A组已进行了5 d的环孢素A干预,因此其移植前心肌组织中的CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞浸润程度明显低于对照组,说明环孢素A可明显抑制淋巴细胞在正常大鼠心肌组织中的浸润(表1)。与对照组不同的是CD4⁺T细胞的浸润程度在移植后第24 h已有所增加,并在第72 h达到峰值,此后逐渐降低(图3、4)。而CD8⁺细胞毒T细胞浸润程度在移植后第24 h稍有降低,但在第72 h与CD4⁺T细胞浸润程度同步增高到峰值,并持续到移植后第10 d才开始下降(图4)。因此,环孢素A组出现心肌组织CD4⁺和CD8⁺T细胞浸润峰值的时相比对照组7 d出现峰值的时相早3 d~4 d。

心肌组织CD4⁺和CD8⁺T细胞浸润程度与移植心脏的病理分级明显正相关($r_{CD4^+} = 0.723$;

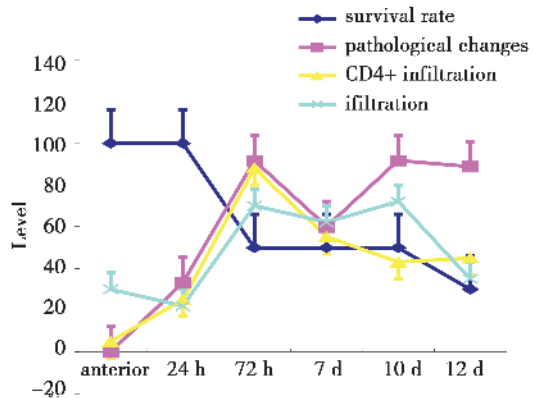


图4 心脏移植前后环孢素A干预组移植心脏存活率时相与心肌Ⅱ级以上组织病理改变时相以及心肌CD4⁺、CD8⁺淋巴细胞浸润时相的比较

Fig.4 Comparing transplantation heart survival rate, myocardial pathology changes above II degree with CD4⁺/CD8⁺ filtration before and after the transplantation in CsA group

$r_{CD8^+} = 0.663$)、与移植心脏的存活率明显负相关($r_{CD4^+} = -0.917$, $r_{CD8^+} = -0.896$),进一步证实了T细胞活化和浸润在本实验移植心脏病理改变和器官存活中发挥着关键作用。

2.3 对照组与环孢素A组外周血淋巴细胞分子编码基因半定量表达时相

2.3.1 酪氨酸蛋白激酶P59的编码基因的表达时相 本研究中,对照组在心脏移植前后72 h内,外周血淋巴细胞P59基因mRNA表现为负调表达,此后表现为正调表达,并于第7 d时再次开始负调表达。其移植后的表达水平始终明显低于移植前水平(图5)。于移植前,环孢素A组外周血淋巴细胞P59基因mRNA的表达水平比对照组明显降低,提示环孢素A对淋巴细胞P59的基因表达具有一定的抑制作用。但是在移植后的12 d内其表达水平不稳定,分别表现为移植后的前24 h内和d3~d7有两个负调表达时相,第24 h~72 h和d7~d10时有两个正调表达时相,并分别于d3和d10达到表达峰值(图5)。但是环孢素A组的P59基因表达峰值仍低于对照组同一时间的表达水平。

2.3.2 淋巴细胞CD4分子编码基因的表达时相

对照组外周血淋巴细胞蛋白分子CD4的编码基因表达水平,于移植后前24 h内首先表现为负调表达,于第24 h~72 h出现第一个正调表达时相,

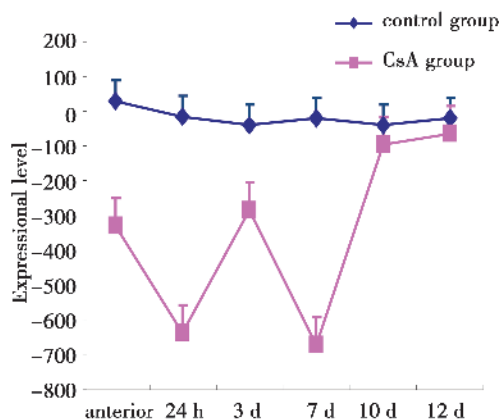


图 5 对照组与环孢素 A 组外周血淋巴细胞酪氨酸蛋白激酶 P59 编码基因表达趋势时相比较

Fig.5 Lymphocyte tyrosine protein kinase P59 gene expression tendency in control group and CsA group

并于第 72 h 达到正调表达峰值。此后,分别于 d3 ~ d7 和 d7 ~ d10 再次依次出现第二个负调表达时相和正调表达时相(图 6)。移植后前 24 h 内 CD4 编码基因的负调表达时相与此期间 P59 编码基因的负调表达时相一致,但是其后第 24 h ~ 72 h CD4 编码基因的正调表达则与 P59 编码基因的继续负调表达相反(图 7),说明心脏移植后第 24 h ~ 72 h,与 TCR 相连的 P59 不是介导此时对照组 T 细胞 CD4 编码基因转录的主要信号传导通路成分。对照组在移植后 72 h 内依次出现的 CD4 编码基因负调表达和正调表达时相,证实了器官移植后的 24 h 内存在着短暂的 CD4⁺T 淋巴细胞功能的一过性抑制期。心脏移植前,环孢素 A 组的 CD4 编码基因表达水平明显高于对照组(图 6)。与对照组相同的是,移植后的前 24 h 内展现一个负调表达的时相,并于第 24 h 达到低谷,以及第 24 h ~ 72 h 出现第一个正调表达时相(图 6)。此后再次负调表达并于第 10 d 时又一次正调表达。其中移植后前 72 h 内的 CD4 编码基因先负调后正调表达趋势与此时同组 P59 的表达趋势相一致(图 8),提示 MHC/TCR 可能是通过 P59 信号传导通路而对环孢素 A 组的 T 细胞 CD4 基因的转录进行调控。

2.3.3 淋巴细胞表面蛋白分子 CD8 编码基因 mRNA 的半定量表达时相 移植后,对照组外周血淋巴细胞表面蛋白分子 CD8 编码基因的平均表

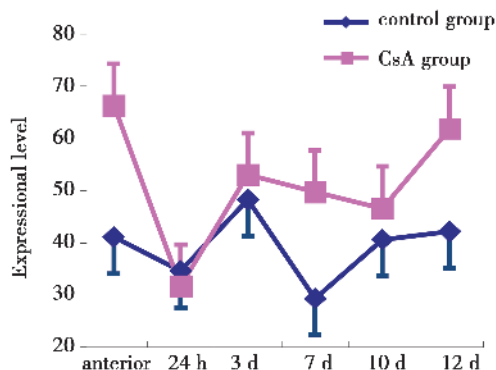


图 6 对照组与环孢素 A 组外周血淋巴细胞表面蛋白分子 CD4 编码基因的表达趋势时相

Fig.6 Lymphocyte surface protein CD4 gene expression tendency in control group and CsA group

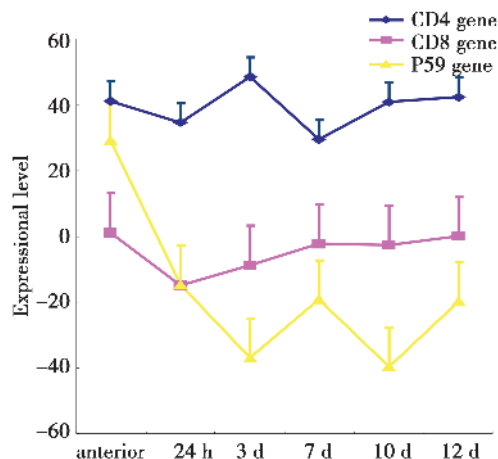


图 7 对照组外周血淋巴细胞 P59、CD4、CD8 编码基因表达趋势的比较

Fig.7 In control group P59, CD4, and CD8 gene expression tendency of peripheral blood lymphocytes

达水平于第 24 h 负调表达到谷底,此后逐渐正调表达,于 d7 时达到峰值并基本保持平稳,表现为在移植后的前 24 h 有一个负调表达的时相和第 24 h ~ 7 d 的逐步正调表达时相(图 8)。提示在心脏移植后的前 24 h 内,对照组的 CD8 编码基因与 CD4 编码基因的转录过程都被抑制。而转录启动是从移植后第 24 h 开始的。此外移植后第 24 h 开始的 CD8 编码基因的逐步正调表达趋势与此时 P59 编码基因的表达趋势也不吻合(图 7),提示信号传导通路中的 P59 分子不参与对 CD8 基因的转录调控。但是对照组 CD8 基因在心脏移植后的前 24 h 内的负调表达和第 24 h ~ 7 d 的正调表达

变化趋势,证实了器官移植后存在短暂的 CD8⁺ 淋巴细胞功能抑制期。

在心脏移植前,环孢素A组的外周血淋巴细胞表面蛋白分子CD8编码基因的表达水平已明显低于对照组,并于移植后的前72 h内持续大幅度负调表达,至第72小时达到谷底。此后开始正调表达,于d10时达到峰值。表现出于移植后前72 h内的一个负调表达时相和一个从第72 h~10 d的正调表达时相(图8,9)。说明环孢素A可以抑制器官移植前和移植后早期外周血淋巴细胞表面蛋白分子CD8的转录,但并不能抑制移植72 h后CD8的转录。除了移植前后24 h内的CD8与P59基因都表现为负调表达外,此后两基因的表达趋势完全不同,提示信号传导通路中的P59成分也

不参与心脏移植后环孢素A组CD8分子的转录和翻译过程(图8)。

3 讨论

T细胞活化是细胞免疫介导的急性器官移植排斥反应早期过程中的主导环节。T细胞的抗原受体(T cell receptor, TCR)通过与抗原呈递细胞(antigen presenting cells, APC)表达的相关配体MHC肽相互作用,导致了TCR- ζ 链胞内区在磷酸酪氨酸激酶的作用下发生磷酸化,从而将免疫信号传导入T细胞内,启动许多支链信号通路的瀑布反应,完全活化T细胞。因此,酪氨酸磷酸化是T细胞开始活化的最初典型的信号特征^[6-8]。

环孢素A作为免疫抑制剂已被常规用于临床器官移植排斥反应的防治,但是环孢素A的免疫抑制有效剂量与其毒性剂量之间的窗口较小,加上免疫配型的多样性,往往造成其临床防治排斥反应的效果不尽人意,在用药后仍经常发生急性排斥反应^[9-10]。

需深入探讨以下问题:①心脏移植后外周血淋巴细胞主要表面蛋白分子表达时相、基因表达时相和移植心脏病理改变时相的进程关系如何?②环孢素A对心脏移植后淋巴细胞蛋白分子、基因表达时相和移植心脏病理改变时相的具体影响?为了更进一步探讨和解答临床研究中提出的问题,本实验同时对大鼠心脏移植组和环孢素A组两组大鼠于心脏移植后的心脏存活率、心肌组织排斥反应病理改变、心肌组织淋巴细胞浸润、淋巴细胞表面蛋白分子编码基因表达时相进行了系统比较,其结果如下:

移植心脏存活率时相与心肌组织病理改变时相以及心肌淋巴细胞浸润时相的比较

心脏移植后对照组的移植心脏存活率快速降低时相主要出现于移植后的d3~d7,并于d10时存活率降为0。说明免疫排斥反应进程中,以各种活化的杀伤细胞和因子攻击所造成的移植组织坏死为标志的排斥反应效应期主要发生于移植后的d3~d7。

对照组移植心脏Ⅱ级以上病理改变的快速增长时相,以及移植心脏组织中CD4⁺和CD8⁺淋巴细胞浸润数的快速增长时相也都发生于移植后d3~d7,与移植心脏存活率大幅度降低的时相同步,并

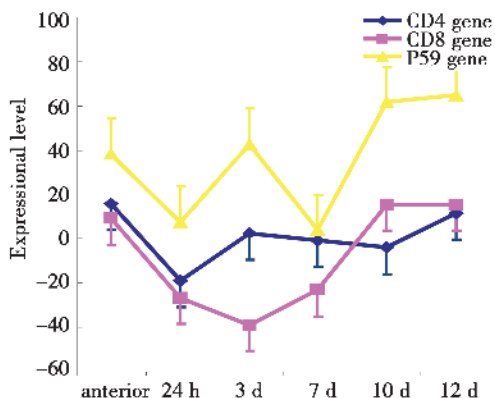


图8 环孢素A组外周血淋巴细胞P59、CD4、CD8编码基因表达趋势的比较

Fig.8 In CsA group P59, CD4, and CD8 gene expression tendency of peripheral blood lymphocytes

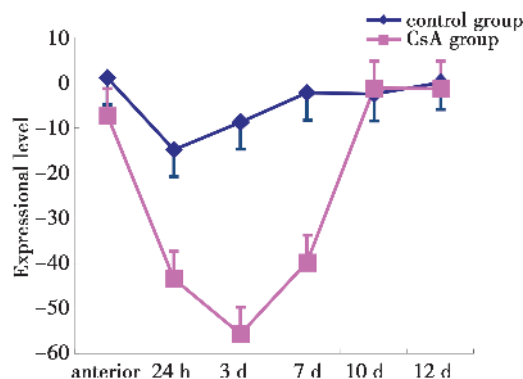


图9 对照组与环孢素A组外周血淋巴细胞表面蛋白分子CD8编码基因的表达趋势时相

Fig.9 In control group and CsA group CD8 gene expression tendency of peripheral blood lymphocytes

且 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞浸润数分别与移植心脏的病理分级明显正相关、与移植心脏的存活率明显负相关。这些结果不仅进一步证明了本实验中,急性心脏移植免疫排斥反应的效应期主要发生于移植后的 d3 ~ d7 的时相内,同时说明本实验中的急性排斥反应主要是由淋巴细胞介导的。

但研究显示,移植心肌组织中 CD4⁺和 CD8⁺淋巴细胞的浸润数于移植后的前 24 h 内首先为快速降低,并于此后的 2 d 内维持在一个低谷水平,只有在移植后第 3 d 时才开始快速增加,表现为移植后前 3 d 内的淋巴细胞浸润能力处于抑制期。

环孢素 A 组出现心肌组织 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞浸润峰值的时相比对照组 d7 出现峰值的时相早 3d ~ 4d(图 3、4),进一步提示了环孢素 A 不但不能有效抑制器官移植后早期 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞的活化和向异体心脏迁移、浸润以及对异体心脏进行损伤的能力,反而使其有所提高。这可能是导致环孢素 A 组在移植后的前 3 d 的时相内比对照组具有更高的 II 级以上排斥反应病理学改变和较低的移植心脏存活率的主要原因之一。

尽管环孢素 A 组在移植后的 d7 ~ d12 的移植心脏存活率明显高于对照组,证实了其抑制免疫排斥反应的能力。但是于移植后的第 24 h ~ 3 d,环孢素 A 组仍然出现了移植心脏存活率快速降低的时相,比对照组的快速降低期提前了 2 d。同时其移植心脏 II 级以上病理改变的快速增长时相,以及移植心脏组织中 CD4⁺淋巴细胞浸润数的快速增长时相都发生于移植后的前 3 d 内,这与移植心脏存活率快速降低的时相同步,并比对照组的相应时相开始时间提前了 2 d ~ 3 d。而移植心肌组织中 CD8⁺细胞浸润数首先于第 24 h 有所降低,但于第 24 h ~ 3 d 变为快速增长时相,也比对照组 CD8⁺细胞浸润程度的快速增长时相开始时间提前了 2 d。表明在移植后 3 d 内环孢素 A 组比对照组有一个加强了而不是减弱以 T 细胞介导为主的排斥反应时相。

众多的研究证明环孢素 A 通过抑制移植心脏组织中 CD4⁺、CD8⁺淋巴细胞和 NK 细胞的浸润,而阻断排斥反应^[9-10]。在本研究中,环孢素 A 的干预可明显抑制移植前正常大鼠心肌组织中 CD4⁺和 CD8⁺细胞的浸润数,但是与对照组相比较,在本实验中的环孢素 A 干预剂量条件下,移植后的前 3 d 内移植心肌组织中 CD4⁺和 CD8⁺细胞浸润数非但

没有被有效抑制,反而其浸润程度快速增加。说明环孢素 A 组中由淋巴细胞介导的移植心脏排斥反应的效应相不但没有得到很好的抑制,反而使其发生的时间提前了。然而环孢素 A 仍然对第 3 d 后的 CD4⁺淋巴细胞浸润程度产生了显著的抑制作用,并由此提高了 d7 ~ d12 的移植心脏存活率。

外周血淋巴细胞表面蛋白分子编码基因表达时相的比较

在 T 细胞受体 TCR 复合物中 CD3、CD4 分子的帮助下,MHC 肽复合物与 TCR 识别并形成免疫突触后的最早信号传导事件之一是,结合在 CD4 或 CD8 胞浆尾部的磷酸酪氨酸激酶家族成员开始对 CD3 和 TCR- ζ 链胞浆尾部的抗原识别激活基模中的酪氨酸进行磷酸化,由此启动了激活淋巴细胞的信号传导通路。P56、P59 是酪氨酸激酶家族中最主要的成员之一。随着酪氨酸磷酸化的信号传导,淋巴细胞以瀑布反应形式快速的活化与增殖,并以包括 CD4、CD8、IL-2 等在内的多种细胞表面蛋白分子快速正调表达为主要特征。早期 T 细胞活化事件中的另一个关键元件是 CD45 分子,CD45 的胞浆尾部具有内在的酪氨酸磷酸酶活力,通过祛除 lck 和 fyn 中负调酪氨酸残基上的磷酸基团,起到促进其他底物酪氨酸磷酸化的作用,进而激活 T 细胞^[11-14]。

本研究的动物实验中,在对心脏移植前后心肌淋巴细胞浸润程度变化时相与病理改变进行比较的同时,还对淋巴细胞编码基因 P59、CD4、CD8 的表达时相与心肌组织病理改变进行了比较,借此分析由 MHC 肽复合物启动 TCR-P59Fyn 信号传导通路,到以 CD4、CD8 编码基因正调表达为特征的淋巴细胞活化所需要的具体时间进程。

首先,在移植后的前 24 h 内,对照组外周血淋巴细胞分子 CD4 和 CD8 的 mRNA 出现负调表达时相,并于第 24 h 开始正调表达,说明移植后 24 h 内淋巴细胞活性抑制期是由于此时其编码基因的转录被抑制,而淋巴细胞基因转录引发的早期活化则是从移植后第 24 h 开始,淋巴细胞活化相主要出现于其后的第 24 h ~ 3 d,排斥反应的效应相主要出现于 d3 ~ d7。

P59 除了使 T 细胞内底物蛋白的酪氨酸磷酸化外,还可通过激活和招募 ZAP-70、磷酸化 SLP-76 接头蛋白等方式激活 T 细胞的 Ras-Mitogen 通路,并同时通过活化磷脂酶 C- γ 和磷脂酰激醇-3

激酶而激活IP₃、DG等第二信使通路^[14]。而本实验中,对照组的P59 mRNA于心脏移植后的前72 h内持续负调表达,并于移植后的第72 h~12 d维持一个波动的低表达平台区,这与同组CD4、CD8 mRNA第24 h开始的正调表达时相不一致,至少提示移植后早期(3 d)淋巴细胞信号传导通路的P59成分处于低活状态,与此阶段内CD4、CD8基因转录和分子表达的调控无关。有关机理我们将在体外研究中进一步探讨。

本研究中,环孢素A组外周血淋巴细胞的P59和CD4的mRNA只在心脏移植后的前24 h内负调表达,于移植后第24 h~72 h则为正调表达,说明环孢素A并不能阻断移植24 h后由TCR介导的P59信号传导通路的活化和CD4、P59等基因的转录过程。

在本研究中,环孢素A组外周血淋巴细胞CD8的mRNA于移植后的72 h内持续负调表达,此后才逐步正调表达,比对照组移植后第24 h~72 h的正调表达时相晚2 d,表现出移植后的72 h CD8的转录过程被明显抑制。环孢素A组CD8 mRNA和CD8分子开始正调表达的时间比对照组推迟了2 d的结果,进一步提示环孢素A可能通过抑制CD8基因的转录过程,或抑制IL-2的转录与表达,而推迟了CD8分子的正调表达期。这可能是导致环孢素A组在移植后第7 d~12 d比对照组具有较高的移植心脏存活率的机理之一。

参考文献:

- [1] van de Berg PJ, Hoevenaars EC. Circulating lymphocyte subsets in different clinical situations after renal transplantation[J]. *Immunology*, 2012, 136(2): 198–207.
- [2] Liu W, Xiao X, Demirci G, et al. Innate NK cells and macrophages recognize and reject allogeneic nonself in vivo via different mechanisms [J]. *J Immunol*, 2012, 188(6): 2703–2711.
- [3] Shipkova M, Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation [J]. *Clin Chim Acta*, 2012, 413(17–18): 1338–1349.
- [4] 郭庆,黄君龄,王祥慧,等.环孢素对心脏移植大鼠急性排斥反应及血清IDO活性的影响[J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2010, 30(7): 779–782, 811.
- Guo Q, Huang JL, Wang XH, et al. Effects of cyclosporin on acute rejection and serum IDO activity of rats with heart transplantation [J]. *J Shanghai Jiaotong University (Med Sci)*, 2010, 30(7): 779–782, 811.
- [5] Skopianr E, Bilgin N. A simple technical modification for abdominalcardiac transplantation in rats [J]. *Transplantation Proceedings*, 1998, 30(9): 807–808.
- [6] Luo C, Laaja P. Inhibitors of JAKs/STATs and the kinases: a possible new cluster of drugs[J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9(6): 268–275.
- [7] Okamura T, Kikuchi T, Nodaira M, et al. Effects of halogenation on tyrosine phosphorylation and peptide binding to the SRC homology 2 domain of lymphocyte-specific protein tyrosine kinase [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(3): 433–437.
- [8] Chauhan AK, Moore TL. T cell activation by terminal complex of complement and immune complexes [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(44): 38627–38637.
- [9] Groth K, Akhi SN, Möln J, et al. Effects of immunosuppression by cyclosporine A on allogenic uterine transplant in the rat [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2012, 163(1): 97–103.
- [10] Hoerning A, Köhler S, Jun C, et al. Cyclosporin but not everolimus inhibits chemokine receptor expression on CD4+ T cell subsets circulating in the peripheral blood of renal transplant recipients [J]. *Clin Exp Immunol*, 2012, 168(2): 251–259.
- [11] 樊华,陈大志,贺强,等.外周血T淋巴细胞亚群变化能预测肝移植急性排斥反应吗[J]. *肝胆外科杂志*, 2010, 18(3): 177–179.
- Fan H, Chen DZ, He Q, et al. The change of T-lymphocytes in acute rejection in recipients of liver transplantation [J]. *J Hepat Surgery*, 2010, 18(3): 177–179.
- [12] Stachlewitz RF, Hart MA, Bettencourt B, et al. A-770041, a novel and selective small-molecule inhibitor of Lck, prevents heart allograft rejection [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 315(1): 36–41.
- [13] Salmond RJ, Filby A, Qureshi I, et al. T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance[J]. *Immunol Rev*, 2009, 228(1): 9–22.
- [14] Stoss O, Novoyatleva T, Gencheva M, et al. p59(fyn)-mediated phosphorylation regulates the activity of the tissue-specific splicing factor rSLM-1 [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 27(1): 8–21.

(编辑 孙慧兰)