

· 博士之窗 ·

苏木对同种异位心脏移植大鼠心肌穿孔素 mRNA 表达的影响*

周亚滨 姚凤祯 韩佳瑞 杨 焱 张春芳 石月平

摘要 目的:观察苏木(Sappan Wood)对同种异位心脏移植大鼠心肌穿孔素(perforin, PFP) mRNA 表达的影响。方法:以 Wistar 大鼠为供体,以 SD 大鼠为受体,建立腹腔异位心脏移植模型,以 RT-PCR 法检测苏木对穿孔素 mRNA 表达的影响。结果:苏木可明显降低穿孔素 mRNA 的表达,并能明显减轻病理形态学及心肌细胞超微结构的损伤。结论:苏木有明显的抗免疫排斥作用,可能是通过降低穿孔素 mRNA 的表达而发挥免疫抑制的作用。

关键词 苏木 同种异位心脏移植 穿孔素

Effect of Sappan Wood on Perforin mRNA Expression in Myocardium of Rats after Allogeneic Cardiac Transplantation ZHOU Ya-bin, YAO Feng-zhen, HAN Jia-rui, et al *The First Affiliated Hospital, Heilongjiang TCM University, Harbin (150040)*

Objective: To observe the effect of Sappan wood (SW) on the expression of perforin mRNA in myocardium of rats after allogeneic cardiac transplantation. **Methods:** The animal model of allogeneic (abdominal) cardiac transplantation was established by taking Wistar rat as provider and SD rat as receptor, perforin mRNA expression in the model's myocardium was detected by RT-PCR. **Results:** SW could obviously reduce the perforin mRNA expression, it also could alleviate the pathological morphology and ultrastructural damage of myocardial cells. **Conclusion:** SW has obvious effect in antagonizing immune rejection after transplantation, the mechanism of its immunosuppression could be through lowering the perforin mRNA expression.

Key words Sappan Wood, allogeneic cardiac transplantation, perforin

近年来的研究表明,急性排斥反应的机制主要是细胞免疫引起的免疫损伤,穿孔素和颗粒酶是主要的效应分子^[1]。我们在大鼠同种异位心脏移植模型中,应用苏木进行抗排斥治疗,观察了苏木对移植心脏穿孔素 mRNA 表达的影响,现报告如下。

材料与方法

1 实验动物 Wistar 大鼠、雄性,160~200g,18~19 周龄,SD 大鼠、雄性,体重 200~250g,25~26 周龄。均购自北京医科大学实验动物中心,在通风、温度、湿度适宜的动物室内常规饲养。

2 实验用药 (1)环孢菌素 A(CsA):将新山地明(瑞士山德士药厂生产,每粒含 CsA 25mg)溶于生理

盐水,稀释 1mg/ml 浓度,4℃ 保存备用。(2)苏木水提液的制备:苏木,购自黑龙江省药材公司,产地云南,经生药鉴定。浸泡 1h 后,水煎 3 次,每次 40min,煎液混合后水浴 80℃ 浓缩成 1.75g/ml 浓度,4℃ 保存备用。

3 实验试剂 (1)Trizol Regent (15596-026):GIBCO 公司出品。(2)焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)美国 Sigma 公司出品。

4 引物 (1)穿孔素:上游引物 5' TGC TAC ACT GCC ACT CGG TCA 3',下游引物 5' GCA TGC TCT GTG GAG CTG TTA 3' (2)β-actin:上游引物 5' GCC ATC CTG CGT CTG GAC CTG 3',下游引物 5' CAT TTG CGG TGC ACG ATG GAG 3'。

5 主要仪器 SXP-1B 型双人双目手术显微镜:上海光学仪器厂;ALLEGRA 21R 型低温高速离心机:BECKMAN 公司出品;PTC-140、PTC-100™ PCR 仪:BECKMAN 公司出品。

6 模型的制备 将供体心脏的主动脉和肺动脉,分别与受体腹主动脉和腹腔静动脉端在双人双目显微镜下吻合,复制成大鼠异位全心移植模型。

* 本课题为黑龙江省教育厅科研课题,获 2001 年度黑龙江省科技进步三等奖,为周亚滨博士后工作报告的部分内容

黑龙江中医药大学附属第一医院(哈尔滨 150040)

通讯作者:周亚滨, Tel: 0451-2161734, Fax: 0451-2118412,

E-mail: zhoyabin@hotmail.com

7 实验分组及处理 将术后清醒(约 2h)能站立 移植心跳有力(24h 内供心不停跳)者,作为实验用动物模型。将上述大鼠随机分成 3 组,每组 5 只。模型组除正常喂养外,灌服同体积生理盐水。CsA 组于手术后 24h 后,灌服配制好的 CsA 溶液,按 40mg/kg 给药。苏木组于术后 24h 后,灌服苏木水提液,按 17.5g/kg 给药。连续灌服 11 日后,分别处死动物。

8 标本的采集 实验期满,将动物经戊巴比妥钠(1mg/kg)麻醉,常规固定、消毒、铺巾等处理。沿正中线切开腹壁,剥离出下腔静脉,用无菌注射器抽取血液约 5ml,其中 1ml 用肝素抗凝,其余血样分装不同试管后,4℃ 保存备检。快速用 180℃、12h 处理过的手术剪(0.1% 二乙基焦磷酸胺(DEPC)水处理后)剪取心肌约 400mg 左右,分别用液氮速冻、-70℃ 低温冰箱保存备检和 -70℃ 低温冰箱保存作为备份。余下心肌剪取近心尖部迅速切成 1cm×1cm×1cm 的小组织块,2.5% 戊二醛固定,其余均用 10% 甲醛固定。

9 穿孔素 mRNA 半定量 计算目的 RNA 的 RT-PCR 产物荧光强度与内参照基因 RT-PCR 产物荧光强度的比值,即为目的 RNA 的相对表达量。

10 统计学处理 多样本均数比较用 F 检验进行方差分析,两两比较用 q 检验。

结 果

1 心肌组织穿孔素 mRNA 的 RT-PCR 结果 见图 1。RT-PCR 产物琼脂糖电泳凝胶紫外灯下均可见 465bp 片段,但各组电泳条带亮度有明显差异。

2 心肌穿孔素半定量结果 见表 1。苏木组和 CsA 组与模型组比较差异有显著性($P < 0.05$),但 CsA 的作用优于苏木($P < 0.05$)。

3 病理形态学改变 模型组可见移植心脏完全被腹腔组织包裹,看不到心脏搏动。心脏肿大、呈花斑状,心室肌切面可见心脏壁增厚、松弛、部分区域呈灰白色。低倍光镜下可见心肌细胞水肿较明显,并见有片状出血和坏死。周围可见有大量炎性细胞浸润,少量的心肌细胞纤维(见图 2A)。在高倍镜下,可见大量的单个核细胞浸润,可见少量心肌纤维,部分心肌细胞肿胀、空泡变性,可见有心肌溶解,纤维细胞增生和胶质纤维化等改变(见图 2B),同时可见血管扩张,心肌细胞崩解成细颗粒。苏木组的心脏表面光滑红润、在腹腔内无包裹现象,心跳搏动有力。低倍镜下整个病变较轻,可见有弥漫性的炎细胞浸润,部分心肌细胞变性,周围可见水肿(见图 2C)。高倍镜下偶见心肌细胞颗粒变性,并仍可见有横纹,间质见有少量单核、淋巴

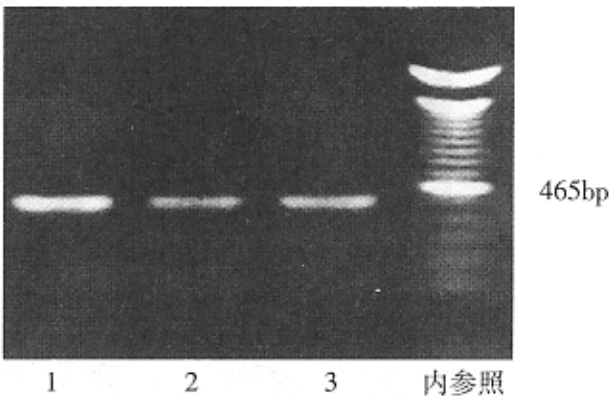


图 1 各组 PFP RT-PCR 结果
注:1 为模型组,2 为 CsA 组,3 为苏木组

表 1 穿孔素 mRNA RT-PCR 半定量结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	mRNA RT-PCR
模型	5	2.25 ± 0.16
CsA	5	0.84 ± 0.14*△
苏木	5	1.80 ± 0.14*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与苏木组比较,△ $P < 0.05$

细胞浸润,水肿较轻(见图 2D)。CsA 组心脏表面光滑、无包裹,心搏有力。低倍镜下可在内膜下层见有局灶性炎细胞浸润,周围无明显水肿(见图 2E)。高倍镜下在心内膜下见有小灶状细胞浸润,外膜可有少量淋巴细胞浸润,心肌细胞改变不明显(见图 2F)。

4 超微结构的改变 心肌透射电镜下,模型组可见大量炎细胞,细胞核幼稚,主要为淋巴细胞、浆细胞、粒细胞等,并可见间质出血,心肌细胞线粒体空泡变性较明显,肌丝囊空泡变性,部分肌丝排列松散,断裂,润盘发育较差。苏木组可见心肌细胞发育良好,间质可见大量炎细胞,以淋巴细胞、浆细胞为多,线粒体结构发育良好。血管内皮细胞中有大量吞饮泡和质状突起。CsA 组可见较少量炎细胞,心肌纤维 Z 线两端明暗带较清楚,线粒体发育良好,未见索状变性和断裂,血管内皮细胞发育良好。

讨 论

穿孔素(PFP)作为一种蛋白质颗粒,主要存在于细胞毒性 T 细胞(CTL)、自然杀伤细胞(NK)细胞胞浆中。这两类细胞是心脏移植急性排斥反应的主要攻击细胞,PFP 是其主要杀伤机制。PFP 可能主要通过下列两种途径介导靶细胞溶解。(1)直接作用^[2]释放出的 PFP 随即进入细胞间隙,对靶细胞进行致死性攻击。对靶细胞攻击后的 Tc 细胞仍完整无缺,经与裂解的靶细胞分离后,又可继续攻击其它靶细胞。另外,活化的 Tc 细胞还可释放淋巴毒素(LT),后者可与靶

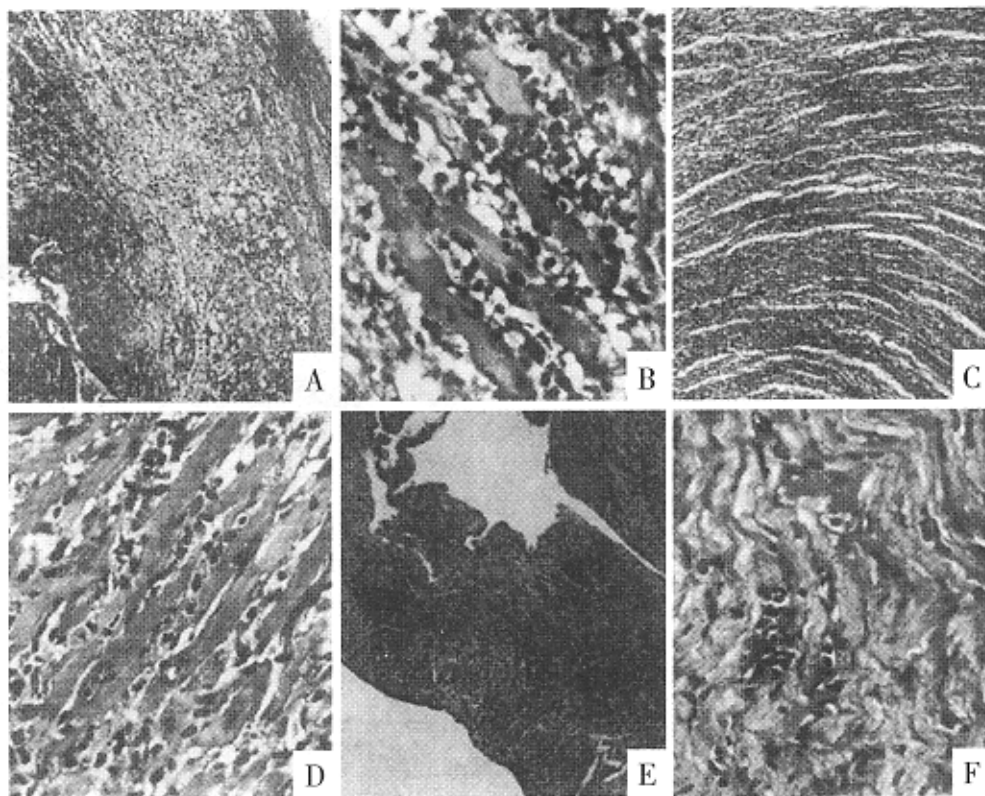


图 2 各组病理形态学改变

注:A 模型组低倍镜下可见心肌细胞水肿较明显,并见有片状出血和坏死。周围可见有大量炎细胞浸润,少量的心肌细胞纤维($\times 200$)。B 模型组在高倍镜下,可见大量的单个核细胞浸润,少量心肌纤维,部分心肌细胞肿胀、空泡变性($\times 400$)。C 苏木组低倍镜下整个病变较轻,可见有弥漫性的炎细胞浸润,部分心肌细胞变性,周围可见水肿。D 苏木组高倍镜下偶见心肌细胞颗粒变性,并仍可见有横纹,间质见有少量单核、淋巴细胞浸润,水肿较轻。E CsA 组低倍镜下可在内膜下层见有局灶性炎细胞浸润,周围无明显水肿。F CsA 组高倍镜下在内膜下见有小灶状细胞浸润,外膜可有少量淋巴细胞浸润,心肌细胞改变不明显。

细胞表面相应受体结合,诱导靶细胞凋亡。(2)间接作用:PFP 还可作为 GrA、TLA^[3]等其它效应分子的通道,帮助它们进入细胞内,使 DNA 裂解而致细胞凋亡。当心脏移植后发生急性排斥反应时,CTL 被激活、聚集,PFP 表达水平明显升高,并在靶细胞接触部位释放穿孔素颗粒,经过胞吐作用,使得单体 PFP 与细胞外钙接触并发生聚合,并在脂质双层上形成离子通道,当离子通道形成较多后,靶细胞将不能排出离子和水份而导致靶细胞渗透性水肿与细胞裂解,从而形成对靶细胞的“致死性打击”。纯化的穿孔形成蛋白可用于实验性细胞裂解^[4]。近年的研究表明,PFP 可以作为心脏移植急性排斥反应早期较敏感的指标。

从本研究的结果来看,未经任何处理的模型组心肌组织,在 11 天时,其 PFP 的 mRNA 表达水平明显增高,与同期的心肌病理形态学和超微结构的变化相吻合。CsA 可以明显抑制 PFP 的 mRNA 表达水平,从而抑制急性排斥反应。苏木组的 PFP 的 mRNA 表达水平明显低于模型组,但要较 CsA 组略高,表明苏

木可以抑制 CTL 细胞 PFP 的表达,具有一定的免疫排斥作用,但其作用较 CsA 为弱。本研究的结果尚不能确定苏木的抑制作用是直接还是间接抑制 CTL 细胞中的 PFP 基因 mRNA 表达的。但可以看出中药苏木具有较好的免疫抑制作用。

参 考 文 献

- 1 龚非力主编.基础免疫学.武汉:湖北科技出版社,1998:263—265.
- 2 Lin CC, Walsh GM, Young JDE, et al. Perforin 'structure and function. Immunol Today 1995;16:194—197.
- 3 Tian Q, Streuli M, Saito H, et al. A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. Cell 1991;67(3):629—639.
- 4 林学颜,张 铃,主编.现代细胞与分子免疫学.北京:科学出版社,1999:274—276.

(收稿 2002-03-13 修回 2003-02-15)