文章编号:1000-5404(2006)14-1483-04

论著

热休克处理诱导小鼠心脏 HO-1 表达并延长其移植至大鼠的存活时间

刘胜春,姚榛祥,唐 华,孙正魁,董蒲江 (重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆市普通外科学重点实验室,重庆 400016)

提 要:目的 探索热休克诱导 NIH 小鼠心脏表达 HO-1 的方法及其对延迟性异种心脏移植排斥反应的影响。**方法** 采用取暖器加热 NIH 小鼠,使其温度维持在 42 ℃ 20 min,分别于加热后 1、6、12、24、48、72 h 切取心脏,应用 RT-PCR、Western blot 分别检测 HO-1 mRNA、HO-1 蛋白以及 HO-1 酶活性检测。借助 NIH 小鼠 - Wistar 大鼠颈部异位心脏移植模型,对热休克处理供体并结合 CoPP(cobalt protoporphyrin, CoPP)、ZnPP(zinc protoporphyrin, ZnPP)了解热休克诱导 HO-1对移植心脏存活时间的影响。**结果** 热休克预处理 6 h 后心脏组织 HO-1 mRNA、蛋白表达及酶活性开始增多,以 24 ~48 h为高峰, 24 h 组和 48 h 组与其余任意组比较均有显著性差异($t=3.507$, $P<0.05$),72 h 后开始下降。热休克组心脏存活时间明显长于空白对照组($t=5.703$, $P<0.01$)和 ZnPP + 热休克组($t=4.913$, $P<0.001$)。而热休克 + CoPP 组移植心脏存活时间[(6.250 ± 1.512)d]明显长于热休克组[(4.750 ± 1.363)d]($t=2.084$, $P<0.01$)。当热休克与 ZnPP 和 CoPP 同时使用时,移植心脏存活时间略短于热休克组,但其差异无显著性($t=0.816$, $P>0.05$)。**结论** 取暖器加热 NIH 小鼠可诱导心脏 HO-1 的产生,能延长 NIH 小鼠-Wister 大鼠心脏移植存活时间,推迟 DXR 的发生。

关键词: 预处理;热休克;血红素氧合酶-1;异种心脏移植
中图法分类号: R322.11;R341;618 **文献标识码:** A

Effect of heme oxygenase-1 induced by heat shock on delayed rejection in mouse to rat xeno-heart transplantation

LIU Sheng-chun, YAO Zhen-xiang, TANG Hua, SUN Zheng-kui, DONG Pu-jiang (Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the method of inducing heme oxygenase-1 expression in NIH mouse heart by heat shock and the effect of heme oxygenase-1 on delayed xenograft heart rejection. **Methods** Totally 76 NIH mice were heated by heater to 42 ℃ of rectal temperature and maintained for 20 min. The hearts were harvested at 1, 6, 12, 24, 48, 72 h after heat shock respectively. The HO-1 mRNA and HO-1 protein were assessed by RT-PCR and Western blotting respectively, and the HO-1 enzyme activity was examined. The NIH mouse hearts, preconditioned by heat shock only, or with cobalt protoporphyrin (CoPP) and/or zinc protoporphyrin (ZnPP), were transplanted into Wistar rats' necks to evaluate the effect of HO-1 on survival time of xenograft. **Results** The HO-1 mRNA, and HO-1 protein began to increase from 6 h after heating and those in 24 and 48 h were higher than that in other groups ($t=3.507$, $P<0.005$). The survival time of transplanted hearts in only heat shock group was longer than that in control ($t=5.703$, $P<0.001$) and heat shock + ZnPP group ($t=4.913$, $P<0.001$), but shorter than that in heat shock + CoPP group ($t=2.084$, $P<0.002$). The difference between only heat shock group and heat shock + ZnPP or CoPP was not significant ($t=0.816$, $P>0.05$). **Conclusion** HO-1 can be induced to express more by heat shock in NIH mouse heart and prolong the survival time of NIH mouse to Wistar rat cardiac xenograft, postpone the xenograft rejection.

Key words: preconditioning; heat shock; heme oxygenase-1; xeno-heart transplantation

近年来,器官预处理的报道多与热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)32 即 HO-1 的表达有关[1]。这种预处理能通过诱导表达 HO-1 改变器官对随后的致命性应激的耐受性。本实验利用热休克预处理 NIH 小鼠,并在小鼠心脏、肝和脾脏诱导出 HO-1 表达,借助 NIH 小鼠-Wistar 大鼠异位心脏移植模型,探讨 HO-1 对 DXR 的影响。

作者简介:刘胜春(1958 -),男,重庆永川市人,博士,副教授,主要从事外科基础方面的研究。电话:(023)89011191

收稿日期:2005-05-16;修回日期:2005-09-11

1 材料与方法

1.1 实验动物和药物

供体:健康雄性 NIH 小鼠 76 只,体质量 25 ~ 35 g;受体:Wistar 大鼠 40 只,200 ~ 250 g,分别购自重庆医科大学实验动物中心及第三军医大学野战外伤研究所实验动物中心。Zn-PPIX Zinc(Zn) protoporphyrin(PP)美国 Sigma-Aldrich 公司产品。CoPP Cobalt protoporohyrin (CoPP)美国 Sigma 公司产品,由 Song Weihong 教授 (The University of British Columbia)惠赠。

1.2 热休克预处理小鼠

取 40 cm × 50 cm × 60 cm 纸箱,于一侧近底部用钳钻一小孔,并于近该小孔侧顶盖取另一孔,将取暖器置于小孔对侧。用 2.5% 戊巴比妥腹腔注射麻醉 NIH 小鼠,并于腹腔内注射生理盐水 1.5 ml 后置入纸箱小孔侧底部,任选 1 只小鼠并将体温计插入肛门用胶布将其固定在小鼠尾根部,体温计尾部经小孔伸出箱外。盖好顶盖,将另一温度计从顶盖小孔插入箱内,取暖器升温使箱内温度升至 50 ℃并恒定在 45 ~ 55 ℃。同时监测小鼠肛温,当小鼠肛温升至 42 ℃时维持 20 min 后自然降温。

1.3 检测 HO-1 在热休克后的表达

1.3.1 免疫组化检测 分别于热休克后 1、6、12、24、48、72 h各取 6 只小鼠,处死后切取心脏,HO-1 免疫组化染色。免疫组化所用兔抗鼠 HO-1 抗体购自武汉博士德公司,采用 SABC 法染色,实验中以小鼠脾脏作为阳性对照及阴性对照。

1.3.2 RT-PCR 检测 HO-1 mRNA 的表达 经典总 RNA 提取试剂盒(上海生工,SK1351)提取总 RNA,按试剂盒操作说明合成第一条链。紫外分光光度计测定 RNA 浓度,琼脂糖电泳证实 RNA 的完整性。

HO-1 的引物序列为:正义引物 5′-CGAAACAAGCAGAACCCA-3′,反义引物 3′-GTAGGACTCGACGACCAC-5′,产物 cDNA 192 bp;β-actin 正义引物 5′-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3′,反义引物 3′-CACCAATGTCCTTCAGGGAG-5′,产物长度624 bp。PCR 反应条件:预变性 94 ℃ 2 min,95 ℃变性 1 min,55 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃延伸5 min。产物在质量浓度为 1% 的琼脂糖上电泳,利用 Syngene 系统进行图像分析,作 OD(HO-1)/OD(β-actin)光密度比值测定。

1.3.3 HO-1 蛋白印迹杂交 4 ℃下在匀浆器中用 0.5 ml 蛋白提取液提取 0.1 g 心肌组织总蛋白,紫外分光光度计测定并调整总蛋白浓度为 0.5 mg/ml,10% SDS-PAGE 电泳(电泳电压 9 V/cm,进入分离胶后增加为 15 V/cm),电泳 4 h 后电转到硝酸纤维膜上(电流 0.65 mA/cm, 15 h)。5% 脱脂奶粉 PBST 封闭 1 h,加兔抗鼠 HO-1 多克隆抗体(1∶200)过夜,羊抗兔二抗 HRP(1∶1 000,Santa Cruz,北京中山生物试剂公司分装)1 h,利用 ECL 试剂盒(SC-2048,Santa Cruz)化学发光法显色,胶片曝光 3 ~ 5 min,扫描入计算机分析积光光密度。

1.3.4 HO-1 的酶活性测定 取 100 mg 心肌组织按 1∶4 加入 0.1 mol KH_2PO_4,冰上匀浆,4 ℃下 12 000 × g 离心 20 min 后再将上清液在 4 ℃下 12 000 × g 离心 60 min。20 μl 上清液,50 mmol/L Hemin, 2 mmol/L G-6-P、G-6-P 脱氢酶, 0.25 μl 0.8 mmol/L NADPH,1.8 mmol/L 0.1 ml KH_2PO_4,标准肝组织匀浆上清液 20 μl,37 ℃避光反应 60 min 后冰上终止反应。以不含 NADPH 的样品作空白对照,464、530 nm 测定胆红素生成(胆红素的摩尔消光系数为 40 mmol · L^{-1} · cm^{-1})。

1.4 实验分组

按以下分组进行 NIH 小鼠-Wistar 大鼠心脏移植:A 组,对照组(n = 8):心脏移植前后不给任何处理因素。B 组,热休克组(n = 8):移植前 24 h 进行热休克处理供体。C 组,热休克 + ZnPP 组(n = 8):供体在 B 组基础上,取供心前 24 h 及 1 h 按 1.5 mg/kg 经腹腔注射 ZnPP(Sigma),移植后每天给药 1 次。D 组,热休克 + CoPP 组(n = 8):在 B 组基础上,术前 24 h 及 1 h 前按 5 mg/kg 给予 CoPP(Sigma Adrich),移植后每天给药 1 次。E 组,热休克 + CoPP + ZnPP(n = 8):在 B 组基础上同时给予 ZnPP 和 CoPP。袖套法建立颈部异位心脏移植模型[1]。术后每 12 h 触摸移植心脏,以心脏停跳为排斥标准。

1.5 统计学处理

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 SPSS 软件,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 热休克诱导 HO-1 在 NIH 小鼠心肌细胞中的表达

免疫组化结果显示,热休克处理 NIH 小鼠后 HO-1 在心肌细胞主要表达位于血管周围及散在心肌组织的心肌细胞质,见图 1。

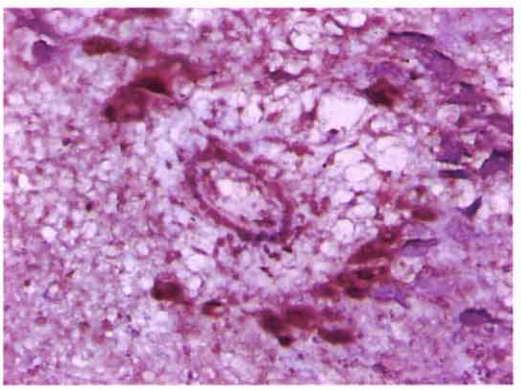


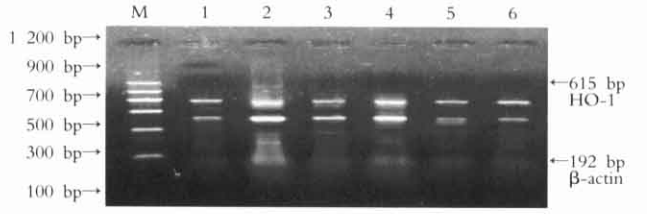
图 1 热休克处理 24 h NIH 小鼠心脏 HO-1 免疫组化染色结果 (SABC × 400)

2.2 热休克诱导 HO-1 mRNA 表达结果

各实验组心脏均有 HO-1 mRNA 表达(图 2),热休克预处理后 24 ~ 48 h 表达到达高峰。HO-1 mRNA 与 β-actin mRNA OD 比值中,24 h 的 OD 比值(1.841)约高于 48 h (1.671),但其差异无显著性(t = 0.912, P > 0.05)。24 h 组和 48 h 组分别与其余各组比较均有显著性差异(t = 2.866, P < 0.05)。

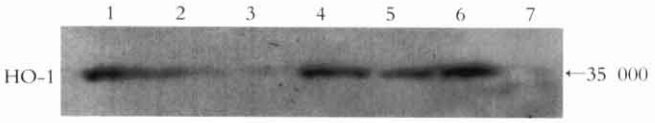
2.3 热休克诱导 HO-1 蛋白 Western blot 检测结果

HO-1 在各组中的蛋白表达见图 3,热休克预处理后心脏组织 HO-1 蛋白表达 6 h 开始增多,以 24 ~ 48 h 为高峰, 48 h HO-1蛋白约高于 24 h,但其差异无显著性(t = 0.987, P > 0.05)。24 h 组和48 h 组与其余任意组比较均有非常显著性差异(t = 3.507, P < 0.01)。48 h 后开始下降。



M：标准；1－6：分别为热休克预处理后 1、6、12、24、48、72 h

图 2　热休克诱导 NIH 小鼠心脏 HO-1 mRNA 表达 RT-PCR 检测结果



1：阳性对照；2－7：分别为热休克预处理后 1、6、12、24、48、72 h

图 3　热休克诱导 NIH 小鼠心肌组织 HO-1 蛋白表达

2.4　热休克诱导 HO-1 酶活性检测结果

HO-1 酶活性测定结果：热休克诱导后 NIH 小鼠心肌 HO-1 酶活性逐渐增高，48 h 组高于 24 h 组但其差异无显著性，但该两组 HO-1 酶活性高于其余各组（$t=2.246$，$P<0.05$）。

2.5　各实验组移植心脏的成活时间

热休克组移植心脏存活时间[（4.750 ± 1.363）d]明显长于空白对照组[（2.000 ± 0.598）d]（$t=5.703$，$P<0.01$）和 ZnPP + 热休克组[（2.250 ± 0.463）d]（$t=4.913$，$P<0.01$）。而热休克 + CoPP 组移植心脏存活时间（6.250 ± 1.512）d 明显长于热休克组[（4.750 ± 1.363）d]（$t=2.084$，$P<0.01$）。当热休克与 ZnPP 和 CoPP 同时使用时，移植心脏存活时间[（4.250 ± 1.069）d]略短于热休克组，但其差异无显著性（$t=0.816$，$P>0.05$）。

3　讨论

HSP32 即 HO-1 表达是器官预处理的重要措施之一[2]。Kopecky 等报道将动物长期暴露在高海拔水平的低氧状态能增加心脏的缺血耐受，Lai 等[3]报道将 Wistar 大鼠在海拔5 500 m高度放置 15 h/d 造成低氧刺激，发现低氧 1 周后实验组大鼠 HO-1 mRNA 及蛋白表达均较对照组明显增加；2 周后用无损伤血管钳钳夹右肝动脉 45 min 造成肝损害，发现实验组大鼠肝损害明显轻于对照组。他们认为缺氧 1 周 HO-1 mRNA 及蛋白表达提示细胞已开始参与对缺氧的反应，该预处理－预缺氧能保护缺血再灌注损伤。并认为低氧应激可诱导产生核因子、缺氧诱导因子、NO 合酶和 VEGF。Redaelli 等[4]对供体用 42 ℃热浴 20 min 预处理后 4 h 开始表达 HO-1，24 h 达到高峰，48 h 以后已开始下降。热浴后 24 h 行同种肝移植，结果显示对照组供肝冷缺血超过 44 h 的受体均在 3 d 内全部死亡，供肝有 5% 的肝细胞 TUNEL 染色阳性，激活的 caspase-3 较少。而接受热浴预处理冷缺血超过 44 h 供体的受体存活时间均在 3 周左右（$P<0.01$），TUNEL 染色阳性细胞有降低但其差异无显著性，Bcl-X_L 表达增加。他们认为热浴预处理诱导 HO-1 表达能提高肝移植后受体的生存时间并延长冷缺血保存后移植物的功能；在观察用 HO-1 诱导剂 CoPP 和阻止剂 SnPP 处理供体的作用后，认为 HO-1 是该作用的中心关键，因而推测药物诱导的HO-1在延长移植物的冷缺血时间有临床价值。由于小鼠对热休克预处理的耐受性差，本研究在预实验中用热浴预处理导致小鼠全部死亡，后采用取暖器加热法对 NIH 小鼠在高热环境下进行热休克预处理，成功在小鼠心脏组织中诱导出 HO-1 的表达，并发现 HO-1 表达及酶活性在热休克预处理后 24 h 到达高峰，48 h 以后开始下降，与 Redaelli 等[4]热休克诱导 HO-1 在 Wistar 大鼠肝脏中的表达时间基本一致。

研究表明，HO-1 被视为器官移植成活的关键保护基因[5]。近年来已有作者发现增加 HO-1 的表达与小鼠到大鼠的心脏移植成活时间的延长有关，而 HO-1 缺乏的供体被急剧排斥[6]。本实验在热休克诱导 HO-1表达基础上，借助 NIH 小鼠-Wistar 大鼠延迟性异种心脏移植模型。热休克预处理组移植心脏存活时间明显长于空白对照组（$t=5.703$，$P<0.01$），热休克预处理作用可被 HO-1 抑制剂 ZnPP 阻断（$t=4.913$，$P<0.01$）。说明热休克预处理是通过诱导产生 HO-1 对移植心脏的心肌细胞产生保护作用而延长异种心脏移植的存活时间，从而推迟了异种心脏移植排斥反应的发生。

对于供体和受体分别诱导 HO-1 对移植器官的影响是否存在差异，Araujuo 等[7]用 HO-1 的转基因大鼠（BALB/c）作为同种心脏移植模型，在移植物局部 HO-1表达的模型中，转基因大鼠作为供体移植心脏存活时间（10.5 ± 0.7）d 明显长于野生型（wild-type）供体（6.5 ± 0.4）d（$P<0.01$）。而转基因大鼠作为受体移植心脏存活时间（26.8 ± 3.4）d 也明显长于野生型作为受体移植心脏存活时间（6.3 ± 0.1）d（$P<0.01$）。用 HO-1 的抑制剂 SnPP 阻断 HO-1 的活性则导致急性排斥反应。他们研究发现野生型供体在血管平滑肌和内皮细胞中表达 HO-1，有 $CD4^+$、$CD8^+$浸润，T 细胞有免疫激活物 CD25 释放。而转基因来源供心 HO-1 表达于心肌和血管内皮细胞，没有白细胞浸润，炎症细胞和 T 细胞激活标志物均较少。本组实验中，热休克处理诱导供体产生 HO-1 移植心脏存活时间（4.750 ± 1.363）d。热休克同时 HO-1 诱导剂 CoPP 处理受体移植心脏的存活时间（6.250 ± 1.512）d 明显长于前者（$t=2.084$，$P<0.01$）；其原因可能在于前者

HO-1只表达于供体心肌组织，受体体内没有HO-1的变化，后者则在供体心脏及受体各器官内均有HO-1的表达，从而影响了移植心脏存活时间，该结论与文献[2]报道基本一致。移植物内的HO-1无差异，转基因鼠或CoPP处理组作为受体移植物心脏存活时间得以延长，其作用应为受体器官内HO-1的变化所致。Araujuo等[7]在转基因小鼠脾中检测到HO-1过度表达可能是由于HO-1过度表达在免疫细胞内或提示在细胞微环境中过度表达，该环境中细胞与宿主的免疫全能相互作用。CD4 T细胞和巨噬细胞浸润较少可能是免疫激活CD25缺少，导致炎症细胞缺乏，从而延长了移植物的生存。

参考文献：

[1] 刘胜春，姚榛祥，唐 华，等. 小鼠-大鼠异位心脏移植的手术技巧及并发症的预防[J]. 中国现代手术学杂志，2004，8(4)：228-230.

[2] VAN DER WOUDE F J, SCHNUELLE P, YARD B A. Preconditioning strategies to limit graft immunogenicity and cold ischemic organ injury[J]. J Investig Med, 2004, 52(5): 323-329.

[3] LAI I R, MA M C, CHEN C F, *et al*. The protective role of heme oxygenase-1 on the liver after hypoxic preconditioning in rats[J]. Transplantation, 2004, 77(7): 1004-1008.

[4] REDAELLI C A, TIAN Y H, SCHAFFNER T, *et al*. Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1? [J]. Hepatology, 2002, 35(5): 1082-1092.

[5] SOARES M P, LIN Y, ANRATHER J, *et al*. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival [J]. Nat Med, 1998, 4(3): 1073-1077.

[6] KATORI M, BUELOW R, KE B, *et al*. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury *via* an antiapoptotic pathway[J]. Transplantation, 2002, 73(2): 287-292.

[7] ARAUJUO J A, MENG L, TWARD A D, *et al*. Systemic rather than local heme oxygenase-1 overexpression improves cardiac allograft outcomes in a new transgenic mouse[J]. J Immunol, 2003, 171(3): 1572-1580.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)14-1486-01

非发酵菌感染的菌群分布分析

李 强，解晓珍，李 阳，李 蒙 （第三军医大学新桥医院检验科，重庆 400037）

目前，非发酵菌引起的感染日益增多，且耐药率不断增高，临床治疗困难。为了解非发酵菌感染的菌群分布以及常用抗生素的耐药情况，我们对本院送检的568株非发酵菌进行分析，现报告如下。

1 材料与方法

将本院2004年4月至2006年4月送检的临床标本，接种于羊血琼脂平板、麦康凯平板中，经35 ℃ 24 h培养，分离纯菌，VITEK-Ⅱ全自动细菌鉴定仪做菌株鉴定；采用VITEK-Ⅱ药敏分析系统，MIC判定药敏结果。质控菌株用大肠埃希菌ATCC25923，铜绿假单胞菌ATCC27853。

2 结果

分离出的568株非发酵菌从临床科室分布上分析，脑外科、呼吸科、骨科分离率最高，为24.9%、23.2%、及10.8%，肾内科、神经内科、肿瘤科、消化科、泌尿外科分别占6.2%、5.8%、4.6%、4.6%，其他占14.7%；从标本分布上分析，痰液最高占61.4%，创口分泌物、尿液、脑脊液、粪便、血液、胸腹水分别为12.0%、8.7%、6.2%、3.3%、2.5%、2.1%、其他共计3.7%；从菌株构成比上分析，铜绿假单胞最高占46.0%，依次为鲍曼不动杆菌(13.7%)，浅黄华丽单胞菌(5.8%)，洋葱假单胞菌(4.6%)、荧光假单胞菌(4.6%)、产碱假单胞菌(2.9%)，嗜麦芽假单胞菌(2.5%)，其他非发酵菌共计19.9%；从耐药率上分析，耐药率较低的为泰能(16.6%)，阿米卡星(29.3%)，哌拉西林(30.7%)、头胞吡肟(31.3%)、头胞他啶(38.2%)，耐药率较高的为头胞唑啉(83.4%)、氯霉素(66.8%)、头胞噻肟(55.6)、氨曲南(54.8%)，庆大霉素(53.9%)，其他环丙沙星(40.2%)、氧氟沙星(44.8%)、妥布霉素(47.3%)。

3 讨论

非发酵菌为一类不发酵糖类或仅以氧化形式利用葡萄糖，需氧或兼性厌氧的无芽孢革兰阴性杆菌，它包括假单胞菌属等9个属近百种细菌，现已成为机会感染与院内感染的主要菌群之一[1-3]。本次调查显示：感染非发酵菌检出率较高的科室，均与患者各种基础疾病以及大量应用广谱抗生素、激素导致机体免疫功能降低有关。在检出的568株非发酵菌中，铜绿假单胞菌的检出率居首位，其次为鲍曼不动杆菌，浅黄华丽单胞菌，洋葱假单胞，荧光假单胞。医院感染的监测资料表明，非发酵菌在消毒不严的病房床单、床头柜、空气中、潮湿的地下都能检测到，并且非发酵菌所引起的感染又具持续性、难治性等特点。药敏结果表明：泰能对大多数非发酵菌仍保持较高的抗

（下转1508页）

作者简介：李 强(1971-)，男，重庆市人，博士，主治医师，主要从事检验方面的研究。电话：(023)68774702

收稿日期：2006-05-16；修回日期：2006-06-09