文章编号:1000-5404(2007)11-1063-03

论著

CVF联合小剂量CsA对大鼠同种异体心脏移植急性排斥反应的影响

蒋 彬,杨 康,兰 纲,熊松柏,吴 蔚,朱晓星 (第三军医大学西南医院胸心外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨小剂量环孢素A(cyclosporine,CsA)联合眼镜蛇毒因子(cobra venom factor, CVF)对大鼠同种异体心脏移植急性排斥反应的影响。**方法** 采用改良Ono's方法建立大鼠心脏移植排斥反应动物模型,将实验动物分为5组,每组9只。A组:对照组;B组:半量CsA组;C组:全量CsA组;D组:CVF组;E组:半量CsA联合CVF组。分别在1、3、5、7 d从各组中取1只处死,其余5只观察移植心脏存活天数,应用HE染色进行供心排斥反应病理分级,免疫组织化学检查$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$T淋巴细胞浸润情况,RT-PCR法检测供心IL-2、IL-10 mRNA表达水平。**结果** A、B、C、D和E组大鼠移植心脏存活时间分别为(7.88±0.99)、(14.94±1.43)、(20.76±0.94)、(14.96±2.29)d和(31.10±3.36) d,与A组相比,各治疗组大鼠心脏存活时间均明显延长($P<0.01$),E组移植心脏存活时间较B、C、D组明显延长($P<0.01$)。各实验组免疫排斥发生时间延后,排斥反应分级减轻,$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$T淋巴细胞浸润减少,尤其C、E两组明显($P<0.01$)。A与D组IL-2、IL-10 mRNA含量无明显差异($P>0.05$),E组与B、C组比较,IL-2、IL-10 mRNA含量也无明显差异($P>0.05$)。**结论** CsA和CVF在抗急性排斥反应上具有协同效应,小剂量CsA联合使用CVF能增强抗排斥反应疗效,优于大剂量CsA单用组,CVF能单独或者协同CsA抑制T细胞的浸润,但CVF对排斥相关细胞因子的分泌无明显作用,也不加强CsA抑制细胞因子分泌的效应,其抗排斥反应的机制还需进一步探讨。

关键词: 环孢素;蛇毒因子;心脏移植;同种异体移植物排斥;补体;免疫抑制剂
中图法分类号: R392.4;R654.2;R976 **文献标识码:** A

Effect of minidose CsA combined with CVF in preventing rat cardiac allograft acute rejection

JIANG Bin, YANG Kang, LAN Gang, XIONG Song-bai, WU Wei, ZHU Xiao-xing (Department of Cardiothoracic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of a low dose of CsA combined with CVF in preventing rat cardiac allograft acute rejection. **Methods** Wistar to SD rat cardiac allograft model was employed in all groups by modified Ono's method, and the recipient rats were divided into 5 groups with 9 rats in each group: blank control (A), half-dose CsA (B), full-dose CsA (C), CVF (D), half-dose CsA combined with CVF (E). One rat in the five groups was killed daily on day 1, 3, 5, 7, and the other five rats were used to observe the survival time of the allograft. The pathologic grade of acute rejection were compared by HE, the $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T cells infiltration by immunohistochemistry and the mRNA expressions of IL-2, IL-10 by PT-PCR were performed. **Results** The average survival days of the allograft in groups A-E were (7.88±0.99), (14.94±1.43), (20.76±0.94), (14.96±2.29) and (31.10±3.36), which was significantly shorter in group A than groups B-E ($P<0.01$), longer in group E than groups B-D ($P<0.01$). The pathological grade of acute rejection was lower and $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T cells infiltration was milder in groups B-E than group A, expecially in groups C and E. The mRNA expressions of IL-2 and IL-10 was not found significant difference between group A and group D, as well as among groups B, C, E. **Conclusion** CVF and CsA has cooperativity in preventing rat cardiac allograft acute rejection. When minidose CsA combined with CVF was applied, the rejection effect would be redued significantly, even compared with the full-dose CsA treatment. CVF could inhibit the T cells infiltration in its sole application or combined with CsA, but it could not regulate the secretion of inflammatory cytokines such as IL-2 or IL-10. The mechanism of anti-rejection effect of CVF still be hazy and need progressive study.

Key words: cyclosporine; cobra venom factor; cardiac transplantation; allograft rejection; complement; immunological inhibitor

作者简介: 蒋 彬(1977-),男,四川省达州市人,硕士研究生,医师,主要从事心脏移植方面的研究。电话:(023)68765333
通讯作者: 杨 康,电话:(023)68754183
收稿日期: 2007-01-18;**修回日期:** 2007-01-30

随着移植免疫机制研究的深入，体液免疫和非特异性免疫在同种移植中的作用越来越受到重视[1-4]。经典的移植排斥理论认为，同种异体器官移植排斥反应是由T细胞介导的细胞免疫反应，环孢素A（cyclosprine，CsA）就是通过抑制T淋巴细胞的活化增殖实现对排斥反应的抑制[5]，它的发现和在移植领域的运用开创了器官移植的新时代，器官移植挽救了众多终末期患者的生命。但是CsA和一些免疫抑制药物都具有较大的毒副作用，而且几乎不能改变移植器官慢性失功的发生，从而导致各种严重并发症和移植器官最后的失效。眼镜蛇毒因子（cobra venom factor，CVF）是从眼镜蛇毒中分离纯化出来的一种酸性糖蛋白，具有抗补体活性，通过激活补体替代途径，导致补体不断被消耗，直至耗竭。我们前期的实验发现[6]，CVF可以显著减轻大鼠同种异体心脏移植排斥反应发生的强度，推迟其发生的时间，但是实验同样也表明，单用CVF不能阻止近交系大鼠同种异体心脏移植急性排斥反应的发生。本实验拟联合运用CVF和CsA，观察大鼠同种异体心脏移植后急性排斥反应的发生情况，观察两者有无协同作用，以期找寻移植术后新的更安全经济的免疫抑制治疗策略。

1 材料与方法

1.1 建立动物模型

采用Ⅱ级雌性SD大鼠45只，体质量200～250 g作为受体，雌性Wistar大鼠，体质量150～200 g作为供体，由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。采用改良Ono's方法[7]，建立稳定的大鼠腹腔异位心脏移植模型。

1.2 实验药品

环孢素A（CsA，瑞士诺华公司），生理盐水配制成2.5 mg/ml，置于4 ℃冰箱备用；CVF，中国科学院昆明动物研究所提供，按说明用糖盐水配制成25 μg/ml，无菌EP管分装，每管0.2 ml，置于4 ℃冰箱备用[8]。

1.3 实验分组

实验大鼠分为5组，每组9只，A组：对照组，未给予任何治疗；B组：半量CsA组，腹腔内注射CsA，5 mg·kg^{-1}·d^{-1}，术前1 d到术后6 d，连续7 d；C组：全量CsA组，腹腔内注射CsA，10 mg·kg^{-1}·d^{-1}，术前1 d到术后6 d，连续7 d[9]；D组：CVF组，术前1 d开始尾静脉注射CVF，20 μg·kg^{-1}·3 d^{-1}；E组：联合组，术前1 d开始尾静脉注射CVF，20 μg·kg^{-1}·3 d^{-1}加上腹腔内注射CsA，5 mg·kg^{-1}·d^{-1}，术前1 d到术后6 d，连续7 d。每组分别于术后1、3、5、7 d处死1只大鼠，其余5只大鼠观察移植心脏存活时间。

1.4 观察指标

①用CH50法检测各组大鼠血清总补体活性[10]：于0、1、3、5、7 d时间点和排斥反应终末受体尾静脉采血0.5 ml，分离血清，测定血清总补体活性（CH50法），0 d的补体活性用100%表示。②移植心脏存活时间：每日早晚定时触摸移植心脏跳动情况，对终末期增加触摸次数，观察移植心脏存活时间，触诊判断困难时借助超声或者心电图检测判断供心存活情况。③供心移植排斥反应分级[按照国际心脏移植协会（international society for heart transplantation，ISHT）分级标准[11]]和免疫组化检查：各组大鼠于术后第1、3、5、7天分别处死1只，其余大鼠待移植心脏排斥终点活杀取移植心脏标本。将移植心脏分为两份，1份10%甲醛固定保存，以进行常规HE染色和免疫组化染色，另外1份置于液氮中保存，进行分子生物学检查。④半定量RT-PCR法检测供心IL-2、IL-10 mRNA表达水平：Trizol法提取供心总mRNA，以β-actin为内参，两步法进行RT-PCR反应，RT-PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳，电泳结果用Kodak DNA Analysis1.0凝胶图像分析软件处理。测定IL-2、IL-10、β-actin特异性条带的灰度和面积，以其乘积表示cDNA的量，再以同一反应体系IL-2、IL-10/β-actin cDNA的比值表示IL-2、IL-10 mRNA的表达水平。

1.5 统计学方法

实验数据以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件进行组间均数方差分析和q检验。

2 结果

2.1 总补体溶血活性（CH50法）

A、B、C组补体活性为100%，D组排斥反应终末期受体大鼠血清中补体活性为（6.55±4.47）%。D、E组处死的受体大鼠血清补体活性均在5%以下，E组排斥终末期补体活性为100%。

2.2 移植心脏存活时间

A、B、C、D、E组供心存活时间分别为（7.88±0.99）、（14.94±1.43）、（20.76±0.94）、（14.96±2.29）和（31.10±3.36）d，与A组相比，各治疗组大鼠移植心脏存活时间明显延长（$P<0.01$）。E组较B、C、D组移植心脏存活时间延长（$P<0.01$）。

2.3 移植心脏排斥反应分级

移植心脏10%甲醛固定后，行常规HE染色，判断心脏移植排斥反应分级，0级：无排斥反应；Ⅰ级：A-灶性轻度急性排斥，B-弥漫性轻度急性排斥；Ⅱ级：灶性中度急性排斥；Ⅲ级：A-多灶性中度排斥反应，B-弥漫性界限型重度急性排斥反应；Ⅳ级：重度急性排斥反应。由表1可见，B、C、D、E组排斥反应均较A组发生延后及减轻，其中E、C两组排斥反应发生最晚，排斥反应发生程度最轻。

表1 各组各时相点移植心脏组织排斥反应级别

组别	1 d	3 d	5 d	7 d	终末期
A组	ⅠB	Ⅱ	ⅢA	ⅢB	Ⅳ
B组	ⅠA	ⅠA	ⅠB	ⅢA	ⅢB
C组	0	0	ⅠA	ⅠA	ⅢB
D组	ⅠA	ⅠB	Ⅱ	ⅡA	Ⅳ
E组	0	0	ⅠA	ⅠB	ⅢB

2.4　免疫组化检查

第 1 天各组供心均未出现 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞浸润，A 组供心 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞浸润在第 3 天开始出现，第 7 天达到同排斥终点相近的高峰。C 组第 3、5、7 天少量淋巴细胞，排斥终末期可见大量淋巴细胞浸润；B 组第 3、5、7 天淋巴细胞浸润明显多于 C 组，终末可见大量 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞；D 组第 3、5、7 天淋巴细胞浸润明显多于 C 组，终末可见大量 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞，E 组第 3、5、7 天均未见明显的淋巴细胞浸润，而终末期淋巴细胞浸润也较其他组轻微。

2.5　各组 IL-2、IL-10 mRNA 表达水平变化

A、D 组 IL-2、IL-10 mRNA 含量无显著性差异（$P>0.05$），E 组与 B、C 组比较 IL-2、IL-10 mRNA 含量也无显著性差异（$P>0.05$）。

3　讨论

环孢素 A（cyclosporine，CsA）是一种经典的抗排斥反应药物，是由 Borel 于 1972 年从真菌中提纯的一种代谢产物[12]，CsA 对排斥反应过程中起重要作用的某些 T 淋巴细胞亚群具有高度特异性抑制作用，另外，CsA 对 B 淋巴细胞也有一定影响，不仅阻止 B 淋巴细胞增生，似乎还可诱发和促进 B 淋巴细胞程序性死亡。在活体内，CsA 通过抑制 Th 的功能间接影响 B 淋巴细胞产生抗体的功能。但 CsA 并不阻断 IL-2 受体的表达及对已活化的 T 细胞对淋巴因子的反应，也不阻止抗原预致敏[13]。

CsA 是一种剂量依赖性药物，有效的血药浓度是发挥抑制排斥反应的前提，随着 CsA 的日益广泛使用，其潜在不良反应和毒性作用也越来越受到学者关注，危害尤其严重的是其骨髓抑制作用和肝肾毒性，限制了它在临床上的应用，使患者和医生在利弊的权衡中难以抉择。本实验结果证明，CsA 在一定范围内呈剂量依赖性，要达到满意的免疫抑制效果就必须在机体内达到一定的血药浓度，同时也证明，CsA 无消耗和抑制补体的作用，并与血药浓度无关。

CVF 是眼镜蛇毒中主要的抗补体成分，在与血清中的 B 因子结合后，能被 D 因子酶解形成 CVFBb，具有稳定的 C3 转化酶活性，可激活补体替代途径，不断消耗补体成分，直至耗竭[14]。吴蔚等[6]报道 CVF 在低剂量就可长期显著地抑制血清中的补体活性，消耗补体从而抑制急性排斥反应，显著延长大鼠同种异体移植心脏的存活时间，同时发现移植心脏中的 T 淋巴细胞浸润明显减少。

本实验通过联用小剂量 CsA 同 CVF，使大鼠同种异体移植心脏存活时间显著延长，急性排斥反应发生的时间延后，强度降低，$CD4^+$ 与 $CD8^+$ T 细胞的浸润都显著减少。从而证明了 CVF 同 CsA 有协同效应，然而，我们运用 RT-PCR 法检测 IL-2、IL-10 mRNA 表达情况，观察到 CVF 并不能显著增强 CsA 抑制 IL-2 产生的效应，IL-10 的表达水平也同单用 CsA 无显著性差异，表明 CVF 延长同种异体心脏存活时间的机制并不清楚，它可能不是延传统的抑制细胞免疫的途径起作用，可能有其特异性的作用机制，也可能就是通过非特异性的抗缺血再灌注损伤和抑制炎性细胞趋化等机制起抗排斥方应作用，具体的机制有待进一步研究。

参考文献：

[1] Pratt J R, Hibbs M J, Laver A J, *et al*. Effects of complement inhibition with soluble complement receptor-1 on vascular injury and inflammation during renal allograft rejection in the rat[J]. Am J Pathol, 1996, 149(6): 2055 - 2066.

[2] Wang H, Jiang J, Liu W, *et al*. Prevention of acute vascular rejection by a functionally blocking anti-C5 monoclonal antibody combined with cyclosporine[J]. Transplantation, 2005, 79(9): 1121 - 1127.

[3] Molne J, Nyberg G, Blohme I, *et al*. Glomerular C3c deposition and intravascular macrophage accumulation in early humoral renal allograft rejection signifies a poor short-term outcome[J]. APMIS, 2006, 114(10): 700 - 711.

[4] Pratt J R, Basheer S A, Sacks S H. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection[J]. Nat Med, 2002, 8(6): 582 - 587.

[5] Kahan B D. Cyclosporine[J]. N Engl J Med, 1989, 321(25): 1725 - 1738.

[6] 吴　蔚，杨　康，白　云，等. 蛇毒因子消耗补体对大鼠同种心脏移植急性排斥反应的影响[J]. 免疫学杂志，2006，22(1)：61 - 64.

[7] Ono K, Lindsey E S. Improved technique of heart transplantation in rats[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1969, 57(2): 225 - 229.

[8] 孙黔云，吕秋敏，王婉瑜，等. 一个高活性的孟加拉眼镜蛇毒抗补体因子[J]. 生物化学与生物物理学报，2001，33(5)：488 - 495.

[9] 钱叶本，陈规划，黄洁夫. 环孢素 A 对心肌细胞凋亡的影响[J]. 安徽医科大学学报，2004，39(1)：54 - 56.

[10] 王兰兰，柳永和. 临床免疫学和免疫检验[M]. 北京：人民卫生出版社，2003：179 - 182.

[11] Brunner-La-Rocca H P, Sutsch G, Schneider J, *et al*. Natural course of moderate cardiac allograft rejection (International Society for Heart Transplantation grade 2) early and late after transplantation[J]. Circulation, 1996, 94(6): 1334 - 1338.

[12] Morris R. Modes of action of FK506, cyclosporin A, and rapamycin [J]. Transplant Proc, 1994, 26(6): 3272 - 3274.

[13] Garlicki M, Czub P, Labus K, *et al*. Conversion from cyclosporine to tacrolimus improves renal function and lipid profile after cardiac transplantation[J]. Ann Transplant, 2006, 11(1): 24 - 27.

[14] Chen G, Wang X M, Sun Q Y, *et al*. Prevention of hyperacute rejection of pig-to-monkey cardiac xenografts by Chinese cobra venom factor [J]. Transplant Proc, 2001, 33(7 - 8): 3857 - 3858.

（编辑　张大春）