文章编号:1000-5404(2007)04-0357-03

论著

CVF在大鼠移植心脏缺血再灌注损伤中的保护作用研究

兰 纲[1],杨 康[1],吴 蔚[1],白 云[2],蒋 彬[1],李 军[1],熊 刚[1] (第三军医大学:[1]西南医院胸心外科,[2]基础医学部医学遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究中华眼镜蛇毒因子(cobra venom factor, CVF)对同种大鼠移植心脏缺血再灌注损伤的保护作用机制。**方法** 近交系雄性B/N大鼠为供体,Lewis大鼠为受体,建立腹腔异位心脏移植模型。实验组术前给予CVF尾静脉注射,观察移植心的存活时间,并设B/N大鼠同系对照组。免疫组化法测定各组术后第1、3、5天移植心脏的C3沉积,并观察移植心的病理变化。**结果** 接受CVF 20 μg/kg,2 d 1次,尾静脉给药的大鼠,移植心存活时间明显延长,平均达(11.69±0.72)d,而对照组为(6.65±0.35)d($P<0.01$),组织内C3沉积较对照组同期明显减轻,病理损害程度减轻,优于同期对照组。**结论** CVF消耗补体显著延长移植心脏存活时间,能明显减轻近交系大鼠移植心脏缺血再灌注损伤。

关键词:眼镜蛇毒因子;心脏移植;缺血再灌注;补体;大鼠
中图法分类号:R341;R392.4;R654.2 **文献标识码**:A

Protective effect of cobra venom factor on ischemia/refusion injury of cardiac transplantation in inbred rats

LAN Gang[1], YANG Kang[1], WU Wei[1], BAI Yun[2], JIANG Bin[1], LI Jun[1], XIONG Gang[1] ([1]Department of Cardiothoracic Surgery, Southwest Hospital, [2]Department of Molecular Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the protective effect of cobra venom factor (CVF) on ischemia/refusion injury of cardiac trasnsplantation in inbred rats. **Methods** Inbred male Lewis rats were used as recipients and Brown-Norway rats as donors to establish heterotopic heart transplantation model. The allograft hearts were divided into 2 groups ($n=16$ in each group). After the rats were infused low-dose CVF 20 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-2}$ to the CVF-treated group, the cardiac allograft survival time was observed in each group. Three rats chosen from the two groups were killed on day 1, 3, 5 in each group, and the pathologic alterations, the complement activity in serum, the deposition of C3 in tissues were compared. **Results** In treatment group, the survival time of the donor heart was significantly prolonged and pathologic lesion was relieved. The deposition of C3 in tissues was significantly reduced as compared with control group. **Conclusion** Complement depletion by CVF acts well on ameliorating cardiac ischemia/refusion injury. The survival time of cardiac allograft treated with CVF can be significantly prolonged.

Key words: cobra venom factor; cardiac transplantation; ischemia refusion injury; complement; inbred rat

中华眼镜蛇毒因子(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,一般主要应用在抗异种移植超急排及抗肿瘤领域。心脏移植急性排斥反应发生机制尚未完全清楚,但一般认为除了体液免疫和细胞免疫反应,与机械性、外科性创伤及缺血再灌注损伤有密切关系。前期实验表明纯化的云南南部眼镜蛇毒因子能有效的抑制大鼠同种心脏移植排斥反应,使移植心长期存活,其中的发生机制不明[1]。我们通过观察应用CVF消耗补体在心脏移植中的作用,对同种移植排斥反应中补体抑制在缺血再灌注损伤中的保护作用进行了初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级雄性健康近交系B/N大鼠(供体)、Lewis大鼠(受体),均由北京维通利华实验动物中心提供,各32只,体质量(270±30) g。饲养于第三军医大学实验动物

作者简介:兰 纲(1977-),男,山西省大同市人,硕士研究生,医师,主要从事心脏移植方面的研究,现在解放军252医院胸心外科。电话:(023)68765333
通讯作者:杨 康,电话:(023)68754183, E-mail: ykang940928@gmail.com
收稿日期:2006-03-28;修回日期:2006-06-27

中心。

1.1.2 试剂与仪器 CVF 由中科院昆明动物研究所毒素室提供,其纯度超过 99.9%,抗补体活性为 1 595 U/mg,使用前将 CVF 用 0.01 mol/L PBS 缓冲液稀释至 30 μg/ml,分成若干小包装,置于 0 ℃保存待用。改良 St. Thomas 停跳液(第三军医大学西南医院配制),山羊抗豚鼠 C3 单克隆抗体(华美生物试剂公司),XTS-4A 型双人双目手术显微镜(镇江中天光学仪器厂),显微手术器械包(上海医疗器械厂)。溶血素(浙江南方试剂厂),绵羊红细胞(本校实验动物中心)。

1.2 方法

1.2.1 心脏移植动物模型的制备 采用改良 Ono 术式[2]建立大鼠腹腔异位心脏移植模型,实验鼠术前禁食 12 h,自由饮水,40 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,仰卧固定,术区剪毛备皮,碘附消毒,先游离受体大鼠腹部供吻合的腹主动脉和下腔静脉段,后切取供心,进行异位心脏移植手术,供心升主动脉与主肺动脉分别与受体腹主动脉与下腔静脉行端侧连续吻合,建立移植心脏的冠脉循环,恢复血液供应后,若移植心搏动良好且无明显出血则关腹。手术在清洁环境下进行。

1.2.2 实验分组及处理 建立 6 只 B/N 到 Lewis 大鼠的同种异位心脏移植模型,其移植心存活时间分别为 6.3、6.5、6.5、6.7、6.6、7.0 d,中位数是 6.6 d。取其整位数 6,作为分组的依据。正式实验时大鼠随机分 2 组。CVF 组($n=16$)术前 3、2 d CVF 50 μg/kg 尾静脉注射,术前 12 h 起 CVF 20 μg/kg,2 d 1 次,尾静脉注射至移植心停跳;对照组($n=16$),受体鼠术后不予任何特殊处理。

1.2.3 观察存活时间与取材 术后每日 2 次通过腹部触诊或彩色多普勒超声来监测移植心搏动强度及存活情况,以移植心的停跳确定为急性排斥反应的终点。实验组和对照组随机取 1 只分别于 1、3、5 d 共 3 个时间点活杀,各组受体活杀后,切取移植心,4% 多聚甲醛溶液固定,进行病理学检查和 C3 免疫组织化学检测。分别于术前经尾静脉,活杀切取移植心前,先打开胸腔,经心脏取血,分离血清,测定血清总补体活性。每组取 8 只进行生存时间观察。

1.2.4 血清学检查 测定血清总补体活性 CH50 法原理:利用绵羊红细胞与相应抗体(溶血素)结合成的复合物,可激活血清中的补体,导致红细胞溶解,当红细胞和溶血素量一定时,在规定反应的时间内,溶血程度与补体量及活性呈正相关。在接近 50% 溶血时(CH50)二者之间近似直线关系,故以 50% 溶血作为最敏感的判定终点,可计算出待测血清中总的补体溶血活性,以 CH50 U/ml 表示[3]。

1.2.5 病理学检查 移植心石蜡包埋切片,HE 染色,光镜观察。

1.2.6 免疫组化 将移植心标本用 4% 的多聚甲醛溶液固定 12 h(4 ℃),然后放入 20% ~30% 蔗糖溶液(4 ℃)脱水,待组织块沉底后,放入超薄冰冻切片机切片,贴于玻片,放于 -30 ℃ 冰箱保存,PBS(pH 7.2,0.01 mol/L)中洗 3 次,10 min/次;滴加血清,37 ℃孵育 40 min,PBS(pH 7.2,0.01 mol/L)洗 1 次,10 min;滴加山羊抗豚鼠 C3 单克隆抗体(1:30),4 ℃放置过夜;浸入 PBS 中洗 3 次,10 min/次;50% 缓冲甘油封固、镜检;检测移植心脏组织中补体成分 C3 表达及沉积情况。

1.3 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析和配对 t 检验。

2 结果

2.1 移植心存活天数

CVF 组、对照组移植心的存活时间分别为(11.69 ±0.71)d 和(6.65 ±0.34)d。CVF 组的存活时间均较对照组显著延长($P<0.01$)(表 1)。CVF 组第 6 天大鼠移植心脏彩色多普勒超声检查结果提示心脏存活良好(图 1)。

表 1 对照组、实验组 1-8 号大鼠移植心存活天数

组别	1	2	3	4	5	6	7	8
对照组	6.0	6.7	6.8	6.3	6.8	7.1	6.8	6.7
CVF 组	11.7	10.8	12.6	11.4	11.6	10.8	12.7	11.9

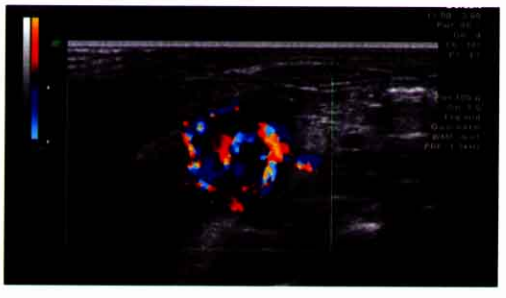


图 1 CVF 组术后 6 d 移植心彩色多普勒超声检查结果

2.2 血清学检查

CH50 反映了血清中补体的总活性。心脏移植后,对照组补体活性均为 100%,血清补体活性未受影响,CVF 组 1 ~5 d 定时活杀的受体血清补体活性控制在(7.33 ±2.45)%(表 2)。

表 2 2 组大鼠各时间点的血清补体活性(%)

组别	时间点		
	1 d	3 d	5 d
对照组	100	100	100
CVF 组	10.25	6.75	7.94

2.3 移植心病理检查

与对照组相比,CVF 组大鼠移植心脏病理症状明显减轻,HE 染色检测提示心肌组织中浸润的炎性细明显减少(表 3)。

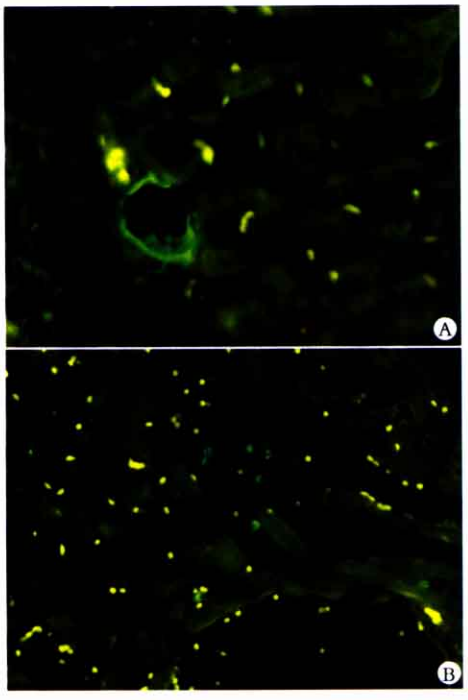
表 3 2 组大鼠各时间点组织病理学分级

组别	时间点		
	1 d	3 d	5 d
对照组	0	ⅠA	ⅢA
CVF 组	0	0	ⅠA

2.4 免疫组化

对照组 1 d 心肌组织内浸润弥散的大量巨噬细胞细胞质内 C3 染色,3 d 血管壁即可见 C3 沉着,5 d 血管壁上 C3 沿血管内膜沉着。CVF 组 1 ~3 d 心肌组织内浸润的少量散在巨噬细胞胞浆内可见 C3 染色,巨噬细胞浸润明显较对照组减轻,1 ~5 d

均未见明显 C3 沉着(图 2)。



A：对照组；B：CVF 组

图 2　2 组大鼠术后 3 d 补体成分 C3 染色结果　(免疫荧光 ×200)

3　讨论

CVF 是眼镜蛇毒中主要的抗补体成分，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。补体系统激活后产生多种生物活性的补体片段，具有调控炎症反应，调控趋化作用，清除免疫复合物，溶解微生物、激活炎性细胞等作用，并且可以通过与免疫细胞表面的补体受体和补体调节蛋白结合，影响 APC 抗原呈递和淋巴细胞的功能，参与和调节特异性免疫应答[4]。

心肌缺血再灌注损伤是指心肌组织在恢复血流灌注后发生的细胞死亡或功能降低。补体成分 C3 及 C5b－9 的局部沉积和白细胞堆积认为是缺血再灌注损伤的特征，新近研究表明补体系统激活后的各种补体成分在参与介导移植物缺血再灌注损伤起着非常重要的作用[5]，缺血再灌注损伤早期，大量补体通过经典和或替代途径迅速激活，生成 MAC、C5b-9、C3a、C5a 等补体成分，通过直接的 MAC 及间接的中性粒细胞损伤作用，导致心肌缺血再灌注损伤的加重[6]。当移植心脏与宿主血运循环建立之后，针对移植物的天然抗体，缺血缺氧的细胞所释放的 DNA，线粒体和脂质类物质均能激活宿主的补体系统，补体活化后产生的过敏毒素 C3a、C5a 能趋化白细胞并通过内皮细胞、粒细胞上的 C3aR，C5aR 结合，导致组织胺的释放，血管通透性增加，补体活化生成 MAC，除了细胞毒作用还能直接刺激细胞活化，特别是内皮细胞的活化，表达 MCP-1、IL-1，P-selectin 等炎性分子，扩大局部炎症损伤[8,9]。

补体激活的最终产物膜攻击复合体(MAC)具有穿孔素样活性，使 MAC 嵌入细胞膜形成通道使离子，水分子等自由进出细胞，而不能通过蛋白质等大分子，使细胞内环境的稳定性遭到破坏，细胞溶解直接引起靶细胞的死亡。补体裂解产物如 C3a、C5a、C567 复合物等具有趋化性和过敏毒素样活性，诱导中性粒细胞和血小板在损伤区的聚集，还可引起微血管收缩，造成组织微循环障碍，同时释放 IL-1、IFN、TNF 等细胞因子和活性自由基导致细胞损伤、坏死。应用 C3 或 C5a 的抗体可以明显减少中性粒细胞的集聚减轻 IR 损伤[10]。

上述研究表明，补体成分在参与同种心脏移植缺血再灌注损伤中起重要作用，CVF 延长同种心脏移植排斥反应发生的时间可能与其消耗宿主的补体，减轻缺血再灌注有关。我们采用近交系大鼠作为供受体进一步研究和评价补体抑制对移植心脏缺血再灌注损伤的保护作用，为探讨 CVF 在同种移植排斥反应中的作用机制，加深和扩展补体抑制在同种移植急、慢性排斥反应的研究奠定实验基础。

参考文献：

[1] 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.

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

[3] Vogel C W，Muller-Eberhard H J. The cobra venom factor－dependent C3 convertase of human complement. A kinetic and thermodynamic analysis of a protease acting on its natural high molecular weight substrate[J]. J Biol Chem，1982，257(14)：8292－8299.

[4] 陈　川，舒雨雁. 眼镜蛇蛇毒因子[J]. 广西医学院学报，1989，6(2)：75－80.

[5] Zhou W，Farrar C A，Abe K，*et al*. Predominant role for C5b－9 in renal ischemia/reperfusion injury[J]. J Clin Invest，2000，105(10)：1363－1371.

[6] Kilgore K S，Friedrichs G S，Homeister J W，*et al*. The complement system in myocardial ischaemia/reperfusion injury[J]. Cardiovasc Res，1994，28(4)：437－444.

[7] Stoica S C，Goddard M，Large S R. The endothelium in clinical cardiac transplantation[J]. Ann Thorac Surg，2002，73(3)：1002－1008.

[8] Baldwin W M，3rd.，Samaniego-Picota M，Kasper E K，*et al*. Complement deposition in early cardiac transplant biopsies is associated with ischemic injury and subsequent rejection episodes[J]. Transplantation，1999，68(6)：894－900.

[9] 薛福平，李荣山. 中华眼镜蛇毒抑制肾缺血再灌注损伤的实验研究[J]. 中华肾脏病杂志，2005，21(8)：483－486.

[10] Sacks S H，Chowdhury P，Zhou W，*et al*. Role of the complement system in rejection[J]. Curr Opin Immunol，2003，15(5)：487－492.

(编辑　陈聪连)