文章编号:1000-5404(2007)23-2267-04

论著

来氟米特在大鼠异种心脏移植排斥反应中对 NF-κB P65 的影响

杨光伦,姚榛祥,黄 平,涂 刚 (重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

提 要:目的 复制小鼠到大鼠异种心脏移植模型,探讨来氟米特(leflunomide, Lef)在大鼠异种心脏移植排斥反应中对 NF-κB P65 的影响。**方法** 实验动物按随机数字表法分成4组,每组6只:空白移植组、环孢素A(CsA)组、来氟米特(Lef)组、Lef + CsA 组。采用免疫组化法和蛋白印迹杂交法检测各组移植心肌组织中 NF-κB P65 的表达;凝胶电泳迁移率法检测 NF-κB DNA 结合活性。**结果** 单用 CsA 不能延长移植心脏存活时间[(2.50 ± 1.05)d],也不能抑制移植心肌 NF-κB P65 蛋白的表达(263.09 ± 28.81,IOD)和 NF-κB DNA 结合活性(227.49 ± 14.83,IOD);而单用 Lef 可显著延长移植心脏存活时间[(4.17 ± 1.33)d],也能显著抑制移植心肌 NF-κB P65 蛋白的表达(173.48 ± 5.85,IOD)和 NF-κB DNA 结合活性(109.96 ± 12.46,IOD),与空白移植和 CsA 组比较,均有显著性差异($P < 0.05$)。Lef 与 CsA 联合应用使移植心脏存活(6.50 ± 2.56)d,抑制移植心肌组织中 NF-κB P65 蛋白的表达(67.79 ± 3.79,IOD)和 NF-κB DNA 结合活性(43.61 ± 7.42,IOD)最为显著,与其他3组比较,均有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** 在大鼠心脏异种移植中 Lef 与 CsA 联用可通过显著抑制 NF-κB P65 蛋白表达和 NF-κB DNA 结合活性来延长移植心脏的存活时间,二者具有免疫协同作用。

关键词:异种移植;心脏移植;免疫抑制剂;NF-κB
中图法分类号:R392.4; R654.2; R979.5 **文献标识码**:A

Effect of leflunomide on NF-κB P65 in mouse to rat cardiac xenograft

YANG Guang-lun, YAO Zhen-xiang, HUANG Ping, TU Gang (Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** By reproducing mouse to rat heart xenograft, to determine the effect of leflunomide on NF-κB P65 in the transplanted heart. **Methods** The recipient rats were randomly divided into 4 groups: group A ($n = 6$) receiving no immunosuppressant as control; group B ($n = 6$) cyclosporine (CsA); group C ($n = 6$) leflunomide (Lef), group D ($n = 6$) Lef plus CsA. The expressions of NF-κB P65 protein and NF-κB P65 DNA binding activity in transplanted heart tissues were determined by immunohistochemistry, Western blot and electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **Results** Administration of CsA alone had no appreciable effect on the survival time of xenografts [(2.50 ± 1.05) d] and could not suppress the protein expression of NF-κB P65 [(263.09 ± 28.81), IOD] and NF-κB P65 DNA binding activity [(227.49 ± 14.83), IOD] in the tissues of xenografts. Administration of Lef alone could significantly prolong the survival time of xenografts [(4.17 ± 1.33) d] and could suppress the protein expression of NF-κB P65 [(173.48 ± 5.85), IOD] and NF-κB P65 DNA binding activity [(109.96 ± 12.46), IOD] ($P < 0.05$, *vs* group A and group B respectively). Lef plus CsA could significantly prolong the survival time of xenografts to (6.50 ± 2.56) d and suppress the protein expression of NF-κB P65 [(67.79 ± 3.79), IOD] and NF-κB P65 DNA binding activity [(43.61 ± 7.42), IOD] ($P < 0.05$, *vs* group A, B and group C respectively). **Conclusion** Combination of Lef and CsA can significantly prolong the survival time of xenograft through suppressing the protein expression of NF-κB P65 and NF-κB P65 DNA binding activity in the tissues of transplanted hearts and exerts synergistic immunosuppressive effect in mouse to rat cardiac xenograft.

Key words: xenotransplantation; heart transplantation; immunosuppressant; NF-κB

NF-κB 信号系统调控着众多的细胞因子、黏附分子和凋亡相关基因的表达,在器官移植排斥反应中起着重要的作用。我们先期研究发现 NF-κB P65 在心脏异种移植中呈高表达状态[1]。来氟米特(leflunomide,

作者简介:杨光伦(1963-),男,重庆市人,博士,副主任医师,主要从事普通外科基础疾病及器官移植方面的研究。电话:(023)89011191,E-mail:guanglunyang@163.com

收稿日期:2007-06-06;修回日期:2007-10-19

Lef)是一种新型免疫抑制剂,可明显延长大鼠异种移植存活时间。本实验中通过小鼠到大鼠心脏异种移植模型,探讨 Lef 在大鼠心脏异种移植排斥反应中对 NF-κB P65 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

供体选用雄性 NIH 小鼠,体质量 20 ~ 25 g。受体选用 Wistar 大鼠,体质量 250 ~ 300 g,雌雄不拘。供体、受体各 24 只,均由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 心脏移植

采用改良袖套法把供心升主动脉和肺动脉分别与受体右颈总动脉和右颈外静脉端端吻合[2]。移植后每天在颈部触摸检测移植心脏跳动,以心跳停止作为排斥反应发生的时间,并经病理检查证实。

1.3 实验动物分组

根据随机数字法把移植的动物分成 4 组,每组 6 只:空白移植组、环孢素 A(CsA)组、来氟米特(Lef)组、Lef + CsA 组。移植排斥后立即将标本置于液氮保存,并行常规病理检查。

1.4 免疫抑制剂的使用

CsA 购自 Sandoz 公司,用 10% 脂肪乳配置,于移植当日(0 d)腹腔注射,每 2 天 1 次,每次 20 mg/kg。Lef 购自 Sigma 公司,自移植当日(0 d)起 10 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 腹腔注射,临用前把 Lef 粉剂与 10 g/L 羟甲基纤维素充分碾磨混匀后配制成浓度为 5.0 mg/ml 的溶液,1 次/d 灌胃,直至出现排斥反应。

1.5 免疫组化检查

抗 P65 多克隆抗体(兔抗鼠)购自美国 Santa Cruz 公司,SABC 试剂盒购自北京中山公司。

1.6 蛋白印迹杂交法(Western blot)检测空白移植组心肌组织 NF-κB P65 的表达

试剂:抗 P-65 多克隆抗体(兔抗鼠)和发光试剂购自美国 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自美国 Jackson 公司。方法:组织总蛋白的提取采用 Santa Cruz 公司方案。RIPA 液裂解排斥后的心肌组织采用 Bradford 法检测蛋白浓度,-70 ℃冻存。以每泳道 60 μg 上样,经 SDS-PAGE 电泳后,电转至硝酸纤维膜,先加入兔抗鼠 P65 多克隆抗体,再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,以 Western blot 发光试剂检测杂交信号。凝胶成像分析系统进行密度扫描;Image Master VDS Software 软件分析蛋白区带;P65 量用蛋白区带积分光密度值(IOD)表示。

1.7 凝胶电泳迁移率(electrophoretic mobility shift assay,EMSA)检测 NF-κB DNA 结合活性

试剂:T_4 多核苷酸激酶,NF-κB 探针序列:上游:5′-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3′,下游:5′-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3′,购自美国 Promega 公司;[γ-^{32}P]ATP (370 MBq/ml)购自北京亚辉公司。方法:组织核蛋白的提取参照 Deryckere 等[3]的方法,称取 100 mg 组织块,加入 1 ml 核蛋白提取液 A 混匀,用组织匀浆器于冰上充分裂解组织,4 ℃ 5 000 r/min 离心 10 min。取沉淀(核小团)加入核蛋白提取液 B 100 μl,冰浴 30 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min。取上清为核蛋白,Bradford 法检测蛋白浓度,-70 ℃保存。采用 T_4 多核苷酸激酶末端标记法将 NF-κB 探针标记上[γ-^{32}P]ATP。将提取的核蛋白(4 μg)与同位素标记的寡核苷酸探针(1.75 pmol)在结合缓冲液中充分结合后,行 7% 非变性 SDS-PAGE,80 ℃干胶后于 -70 ℃下放射自显影 48 ~ 72 h,冲洗 X 线平片。以 IOD 值作为 NF-κB 活性的量化值。

1.8 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 各实验组移植心脏存活时间

单用 CsA 不能显著延长移植心脏存活时间,空白移植组[(2.17 ± 0.41)d]、CsA 组[(2.50 ± 1.05) d]组间无统计学差异($P > 0.05$)。而单用 Lef 可显著延长移植心脏存活时间,Lef 组[(4.17 ± 1.33)d]与空白移植组比较有显著性差异($P < 0.05$),但与 CsA 组比较则无统计学意义($P > 0.05$)。Lef 联用 CsA 使移植心脏存活时间达(6.50 ± 2.56) d,与其他 3 组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 病理学检测

各实验组被排斥的心脏中均有大量血管内血栓形成,出血、炎症细胞浸润及较多心肌细胞凝固性坏死。

2.3 免疫组化检查

各组中 P65 蛋白阳性信号主要定位于细胞质、细胞膜及细胞核。空白移植组中 P65 主要表达于细胞质和细胞核,其表达在各组中最为强烈(图 1);CsA 组中 P65 主要表达细胞质和细胞核,且位于血管周围,其表达强度弱于空白移植组组(图 2);Lef 组中 P65 主要表达于细胞质和细胞核,但表达强度明显弱于空白移植组和 CsA 组(图 3);Lef + CsA 组中 P65 表达于细胞质、细胞核和血管旁,但强度明显弱于其他 3 组(图 4)。

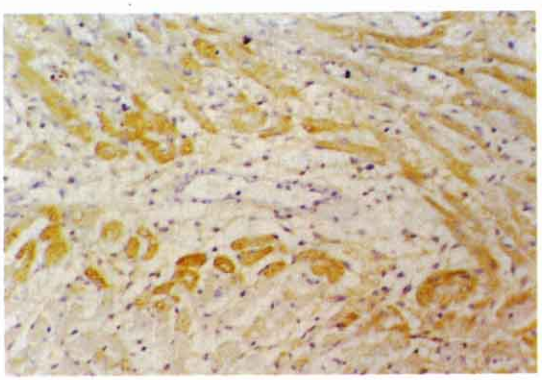


图 1 空白移植组 P65 染色结果 (SABC ×200)

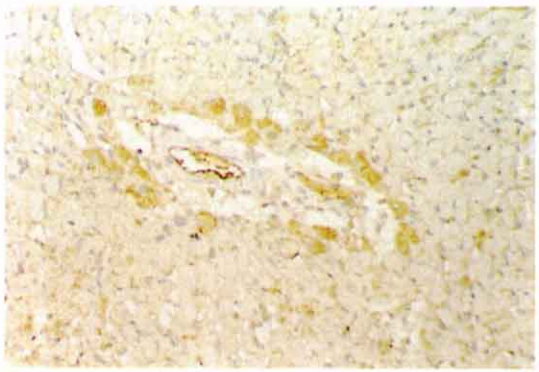


图 2　环孢素 A（CsA）组 P65 染色结果　（SABC ×200）

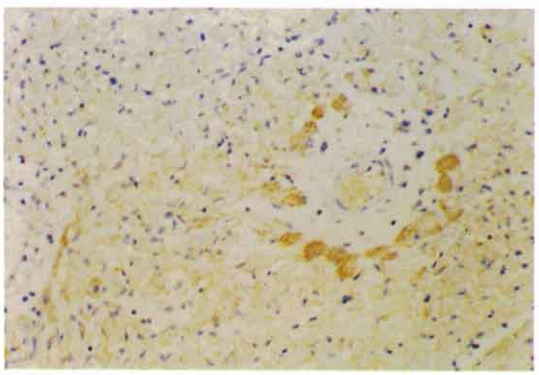


图 3　来氟米特（Lef）组 P65 染色结果　（SABC ×200）

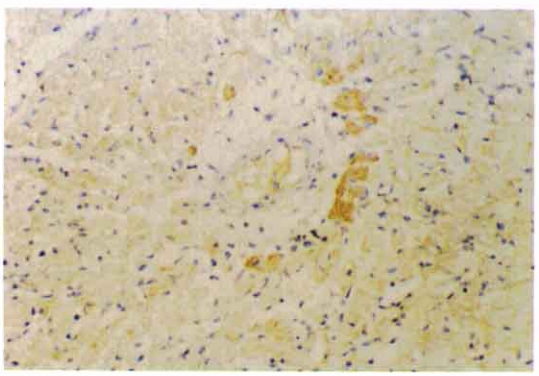


图 4　Lef + CsA 组 P65 染色结果　（SABC ×200）

2.4　Western blot 分析 NF-κB P65 蛋白的表达

P65 蛋白的 Western blot 蛋白电泳条 IOD 值见表 2、图 5。Lef 组蛋白表达显著低于空白移植组及 CsA 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）；Lef + CsA 组蛋白表达显著低于 Lef 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

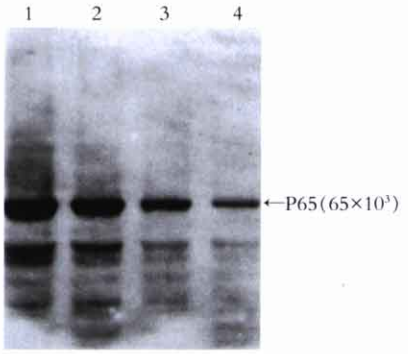
2.5　EMSA 检测 NF-κB DNA 结合活性

NF-κB DNA 结合活性采用方差分析，两两比较显示 Lef 组明显低于空白移植组及 CsA 组，Lef + CsA 组明显低于其他 3 组，差异有统计学意义（$P<0.05$），空白移植组与 CsA 组间差异无统计学意义（$P>0.05$），结果见表 2、图 6。

表 2　各组 NF-κB P65 蛋白表达和 NF-κB DNA 结合活性（IOD，$\bar{x}\pm s$）

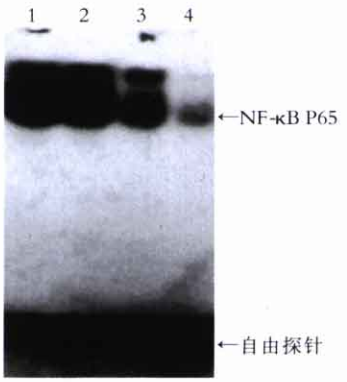
组别	NF-κB P65	NF-κB DNA 结合活性
空白移植组	261.33 ± 31.61[a]	234.30 ± 8.71
CsA 组	263.09 ± 28.81[a]	227.49 ± 14.83
Lef 组	173.48 ± 5.85	109.96 ± 12.46
Lef + CsA 组	67.79 ± 3.79[a]	43.61 ± 7.42

a：$P<0.05$，与 Lef 组比较



1：空白移植组；2：环孢素 A（CsA）组；3：来氟米特（Lef）组；4：Lef + CsA 组

图 5　Western blot 检测 NF-κB P65 蛋白在各组中的表达



1：空白移植组；2：环孢素 A（CsA）组；3：来氟米特（Lef）组；4：Lef + CsA 组

图 6　EMSA 检测各组中 NF-κB DNA 结合活性

3　讨论

3.1　Lef、CsA 对小鼠到大鼠移植心脏存活时间的影响

Lef 的早期实验显示其活性代谢产物能阻止 T 细胞增殖，也能阻止 B 细胞增殖和 B 细胞产生抗体[4]。最近的研究阐明 Lef 是一种强力的二氢乳清酸脱氢酶（dihydroorate dehydrogenase，DHODH）抑制剂。DHODH 是一种限制嘧啶生物的酶，主要抑制嘧啶核苷酸合成和阻止酪氨酸蛋白磷酸化。Lef 通过抑制 DHODH 而抑制 T 和 B 细胞增殖[5]。Lef 可特异性抑制受体产生抗供体特异性抗体。CsA 抑制异种淋巴细胞毒性抗体反应并能抑制异种抗体产生的 IgG。CsA 作用机制是通过抑制钙调磷酸酶、IL-10 和其他转录因

子来发生作用的，并抑制 $CD4^+$ T 细胞释放的使 B 细胞增殖的细胞因子以抑制抗体产生[6]。体内和体外实验结果均表明 Lef 与 CsA 联用具有协同作用，Lef 和 CsA 联用可使仓鼠到大鼠移植心脏存活大于100 d，并显著降低异种特异性 IgG 抗体的产生[7]。

表 1 中单用 Lef 可显著延长小鼠到大鼠移植心脏的存活时间[(4.17 ± 1.33)d]，与空白移植组存活(2.17 ± 0.41)d 比较有显著差异($P < 0.05$)；Lef 和 CsA 联用使移植心脏存活(6.50 ± 2.56)d，与单用 Lef 和单用 CsA 相比较有显著差异($P < 0.05$)，提示本模型中 Lef 和 CsA 联用可获得协同作用，与黄平等[8]研究结果相似。

3.2 Lef 和 CsA 对 NF-κB P65 的影响

带血管的异种移植中血管内皮细胞(EC)是受体异种免疫反应首先攻击的目标，在 DXR 中被激活的 EC 表达产生黏附分子和分泌细胞因子。在调节 EC 激活的许多转录因子中，NF-κB 基因的产物对炎症和免疫反应以及其快速反应的转录因子起着重要作用[9]。NF-κB 是一个与早期基因表达有关的转录激活剂，活性的 DNA 结合形式是由 NF-κB/Rel 转录因子家族成员组成的异源二聚体，最常见的组成形式为 NF-κB1(P65)和 RelA(P65)。在静止的细胞中 NF-κB 与其抑制蛋白 IκB 结合并滞留于细胞质，当细胞受刺激激活时，IκB 被磷酸化而降解，并与 NF-κB 二聚体分离，从 IκB 中释放的 NF-κB 使得有活性的 P50-P65 二聚体立即移至细胞核内，并与其靶 DNA 结合而激活转录。在同种大鼠移植和猪内皮细胞体外实验中都发现 NF-κB 激活[10]。猪内皮细胞体外实验显示 Lef 抑制了 TNF 诱导的 NF-κB 报告基因的表达，IκB 的磷酸化，IKK、caspase 的激活；IκB 的磷酸化通过 IKKα、IKKβ、IKKγ、NIK、TGF-β 激活的激酶-1、AKT、MEKK1、MEKK 等大量激酶调节 IκB 的磷酸化。但只有 IKKβ 介导了 TNF 诱导的 IκBα 在 32、36 位磷酸化，Lef 可能通过抑制 IKKβ 而抑制 NF-κB 的激活。这样 Lef 阻断了 TNFR1-、TRAF2-和 NIK 诱导的 NF-κB 介导的报告基因的表达。抑制 NF-κB 的激活也可起到抗凋亡的作用[10]。

CsA 通过阻断 Ca-钙调素-依赖性磷酸化酶钙调磷酸酶的活性而干扰 Ca 信号途径，降低了钙调磷酸酶诱导的 NF-κB 的活性和 IκBα 的降解[6]。在 Bcl-2 转染入仓鼠到大鼠移植冠状血管 ES 的模型中，显示在 Bcl-2 表达期间冠状血管的病变被明显抑制。在协同性异种移植延长存活时间的作用是异种移植物血管内皮细胞内 A_{20}、Bcl-2、Bcl-XL 抗凋亡基因受到保护的结果，说明 NF-κB 信号途径调控抗凋亡基因的转录[11]。在同种心脏移植中全身给予缺乏活性 NF-κB 的树突状细胞可延长移植物的存活时间[12]。

通过免疫组化、Western blot、NF-κB DNA 结合活性研究发现单用 CsA 不能明显延长移植物存活时间，可能是由于 CsA 只能部分抑制 NF-κB 信号途径而不能完全阻断其激活。Lef 能明显延长移植物存活时间，与 Lef 能抑制 NF-κB 信号传导途径激活的多个环节有关。Lef 与 CsA 联用能显著延长移植物存活时间，可能是两种免疫抑制剂通过不同的途径来协同抑制 NF-κB 信号传导途径的结果，即 NF-κB 信号传导途径被抑制而使其控制的抗凋亡基因受保护，其具体机制有待进一步研究。

总之，本实验证明 Lef 和 CsA 联用可明显延长移植到大鼠的小鼠心脏的存活时间，并能抑制 NF-κB 的活性。移植物未能长期存活，还与目前未知的诸多因素有关，但通过抑制 NF-κB P65 激活来延长异种移植物的存活时间以预防延迟性异种移植排斥反应(DXR)的发生，不失为一种有效的探索途径。

参考文献：

[1] 杨光伦，姚榛祥，黄 平，等. NF-κB P65 在大鼠异种心脏移植后心肌中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报，2007，29(1)：51-52.

[2] 杨光伦，罗诗樵，姚榛祥. 改良袖套法建立异种心脏颈部移植模型[J]. 重庆医科大学学报，2004，29(1)：64-65.

[3] Deryckere F, Gannon F. A one-hour minipreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues [J]. Biotechniques, 1994,16(3): 405.

[4] Siemasko K F, Chong A S, Williams J W, *et al*. Regulation of B cell function by the immunosuppressive agent leflunomide[J]. Transplantation, 1996, 61(4): 635-642.

[5] Williamson R A, Yea C M, Robson P A, *et al*. Dihydroorotate dehydrogenase is a high affinity binding protein for A77 1726 and mediator of a range of biological effects of the immunomodulatory compound[J]. J Biol Chem, 1995, 270(38): 22467-22472.

[6] Schreiber S L, Crabtree G R. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506[J]. Immunol Today,1992, 13(4): 136-142.

[7] Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74(4): 609-619.

[8] 黄 平，姚榛祥. 来氟米特延长大鼠异种移植心脏存活时间的实验研究[J]. 中华器官移植杂志，2001，22(6)：356-357.

[9] Barnes P J, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases[J]. N Engl J Med, 1997, 336(15): 1066-1071.

[10] Anrather J, Csizmadia V, Brostjan C, *et al*. Inhibition of bovine endothelial cell activation *in vitro* by regulated expression of a transdominant inhibitor of NF-kappa B[J]. J Clin Invest, 1997, 99(4): 763-772.

[11] Ferran C, Stroka D M, Badrichani A Z, *et al*. Adenovirus-mediated gene transfer of A20 renders endothelial cells resistant to activation: a means of evaluating the role of endothelial cell activation in xenograft rejection [J]. Transplant Proc, 1997, 29(1-2): 879-880.

[12] Tiao M M, Lu L, Tao R, *et al*. Prolongation of cardiac allograft survival by systemic administration of immature recipient dendritic cells deficient in NF-kappa B activity[J]. Ann Surg, 2005, 241(3): 497-505.

(编辑 汪勤俭)