维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)05-0655-05

HO-1 在延迟性异种心脏移植排斥反应中的表达及意义

刘胜春,姚榛祥,孙正魁,唐 华,董蒲江

(重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨血红素氧合酶-1 在延迟性异种心脏移植排斥反应中的表达及意义。方法:建立 NIH-Wistar 颈部异位心脏移植模型,分别于移植前、移植后 1h、6h、12h、24h、48h 和 72h 切取移植心脏,应用 RT-PCR、Western Blot 检测 HO-1mRNA、HO-1 蛋白表达并检测 HO-1 酶活性;同时比较钴原卟啉(CoPP)诱导 HO-1 对延迟性异种心脏移植排斥反应的影响。结果:移植心脏均有 HO-1 表达,HO-1mRNA($t=2.5170, P<0.05$)、HO-1 蛋白表达($t=2.3702, P<0.05$)及酶活性($t=2.246, P<0.05$)移植术后 24~48h 表达到达高峰;CoPP 诱导的 HO-1 明显延长了移植心脏的存活时间($t=4.74442, P<0.001$)。结论:HO-1 表达在延迟性异种心脏移植后 24~48h 到达高峰;CoPP 诱导的 HO-1 能延长延迟性异种心脏移植的存活时间。

【关键词】血红素氧合酶-1;延迟性异种移植排斥反应;心脏

【中国图书分类法分类号】R645.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-03-09

Expression and significance of heme oxygenase-1 in delayed cardiac xenograft rejection

LIU Shengchun, et al

(*Department of surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression and significance of heme oxygenase-1(HO-1) in delayed cardiac xenograft rejection in NIH-Wistar. *Methods*: The model of cervical heterotopic heart transplantation in NIH-Wistar was established. The hearts were harvested 1,6,12,24,48 as well as 72 hours before and after transplantion respectively. HO-1mRNA and HO-1 protein were examined by RT-PCR and Western Blot, HO-1 enzymatic activity was examined. The survival time of transplanted heart, in which HO-1 was induced by cobalt protoporphyrin(CoPP), was compared with the control. *Results*: HO-1 was expressed in transplanted heart. The expression of HO-1mRNA($t=2.5170, P<0.05$), protein($t=2.3702, P<0.05$) and enzymatic activity($t=2.246, P<0.05$)in heart 24 and 48 hours after transplantion were higher than those in other groups. *Conclusion*: The expression peak of HO-1 in NIH-Wistar cardiac transplantation is 24~48 hours after transplantion. HO-1 induced by CoPP can prolong the survival time of delayed xenograft cardiac transplantation.

【Key words】Heme oxygenase-1; Delayed xenograft rejection; Heart

HO-1 是降解血红素为胆绿素、CO 和 Fe^{2+} 的起始酶和限速酶。近年研究发现 HO-1 对移植器官的细胞保护起重要作用。本实验利用 DXR 心脏移植模型,探讨 HO-1 在 DXR 中的表达及意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

供体:健康雄性 NIH 小鼠,体重 25~35g;受体:Wistar 大鼠,200~250g 分别购自重庆医科大学动物实验中心及第三军医大学野战外伤研究所。袖套法建立颈部异位心脏移植模型。

实验一:随机将动物($n=42$)分 7 组,每组 6 只,心脏移植前不给任何处理因素。分别于移植前、移植后 1h、6h、12h、24h、48h 和 72h 切取移植心脏,将其一分为二后立即置-80℃保存和多聚甲醛固定,石蜡包埋。

实验二:设立 A 组,空白对照组($n=8$),心脏移植前不给任何处理因素。B 组,CoPP 组($n=8$):术前 24h 及 1h 前按 5mg/kg 体重给予 HO-1 的诱导剂 CoPP(Sigma Adrich)移植后每天给药 1 次。术后每 12h 触摸移植心脏,以心脏停跳为排斥标准,排斥后立即切取心脏并将其切为两半,分别

作者简介:刘胜春(1968)男,副教授,副主任医师,博士,主研方向:外科基础与肿瘤外科。

维普资讯 http://www.cqvip.com

置-80℃保和多聚甲醛固定,石蜡包埋。

1.2 H.E及免疫组化检测 HO-1在心肌组织中的表达

免疫组化所用兔抗鼠 HO-1 均购自武汉博士德公司,采用 SABC 法染色,实验中设置阳性(正常小鼠脾脏组织,下同)及阴性对照。

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

1.4 HO-1蛋白印迹杂交

4℃下在匀浆器中用 0.5ml 蛋白提取液提取 0.1g 心肌组织总蛋白,以 0.1g 正常小鼠脾脏组织作为 HO-1 阳性对照,紫外分光光度计测定并调整总蛋白浓度为 0.5mg/ml,10%SDS-PAGE 电泳(9V/cm 进入分离胶后增加为 15V/m),电泳 4h 后电转到硝酸纤维膜上(电流 0.65mA/cm,时间 15h)。5% 脱脂奶粉 PBST 封闭 1h,加兔抗鼠 HO-1 多克隆抗体(1∶200)过夜,羊抗兔二抗 HRP(1∶1000,Santa Cruz,北京中山分装)1h,利用 ECL 试剂盒(SC-2048,Santa Cruz)化学发光法显色,胶片暴光 3″-5″,扫描入计算机分析积光光密度。

1.5 HO-1的酶活性测定

取 100mg 心肌组织按 1∶4 加入 0.1mol KH_2PO_4,冰上匀浆,4℃下 12000×g 离心 20min 后在将上清液在 4℃下 12000×g 离心 60min。20μl 上清,50mmHemin,2mmG-6-P,G-6-P 脱氢酶,0.25μl 0.8mmol/L NADPH,1.8ml 0.1mol KH_2PO_4 标准肝组织匀浆上清液 20μl,37℃避光反应 60min 后冰上终止反应。以不含 NADPH 的样品作空白对照,464nm,530nm 测定胆红素生成(胆红素的摩尔消光系数为 40mmol/L·cm)。

1.6 统计学处理

实验结果中计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,利用 SPSS 软件进行分析,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

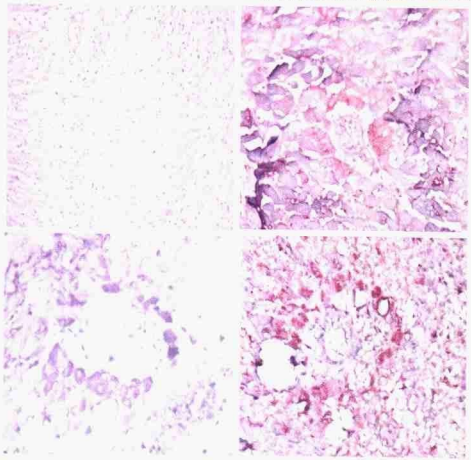


图 1 各组心肌组织 HO-1 免疫组织化学染色,SABC。a.空白对照组阴性;b.术后 6h 可见 HO-1 阳性表达;c,d,24-48h 阳性表达最强 400×

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结 果

2.1 移植心脏存活时间

NIH 小鼠－wistar 大鼠心脏移植多在 48h 开始搏动明显减弱，大多在 72h 前后停跳。CoPP 组移植心脏存活时间 70±14h，明显长于空白对照组 44±11h($t=4.13037$, $P<0.001$)。

2.2 免疫组化检测结果

空白对照组无 HO－1 表达(见图 1－a)。移植心脏中 HO－1 蛋白主要表达在血管内皮及周围临近心肌细胞，浸润的炎症细胞中有表达。阳性细胞记数结果显示术后 12hHO－1 表达开始增加，24～48h 到达高峰，图 1－bcd。

表 1 移植心脏 HO－1mRNA 表达及其与 β－actin OD 比值

组 别	n	HO－1mRNA/β－actin(OD)值	$\bar{x}\pm s$
移植前	6	0.02471～0.03001	0.02675±0.001196
1h 组	6	0.02664～0.03421	0.02875±0.002396
6h 组	6	0.02704～0.03860	0.03209±0.012051
12h 组	6	0.06802～0.1076	0.081271±0.01428
24h 组	6	0.12964～0.17041	0.16752±0.0304496
48h 组	6	0.12642～0.16212	0.150875±0.027486
72h 组	6	0.04786～0.0986	0.06209±0.0314797

24h 组和 48h 组分别与其余各组比较均有显著性差异($t=2.847$, $P<0.02$; $t=2.5170$, $P<0.05$)

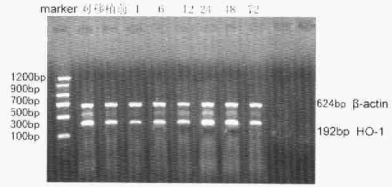


图 2 各组移植心肌 HO－1mRNA 表达结果

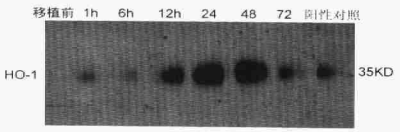


图 3 各组心肌组织 HO－1 蛋白印迹杂交(Western blot)结果

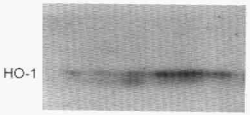


图 4 空白对照组及 CoPP 组 HO－1 蛋白印迹杂交结果

表 2 移植心脏组织 HO－1 蛋白表达

组 别	n	HO－1 蛋白表达(积光光密度)	$\bar{x}\pm s$	t(与相邻上组比较)	P
移植前	6	——	——	——	——
1h 组	6	3.81～8.16	4.2742±0.42157	—	—
6h 组	6	3.24～9.27	6.2525±1.0032	0.7538	>0.05
12h 组	6	13.84～38.26	23.4617±7.0136	3.1504	<0.01
24h 组	6	19.47～40.36	34.2712±4.3423	2.3702	<0.05
48h 组	6	21.42～44.68	38.3476±6.6478	0.8776	>0.05
72h 组	6	11.54～32.32	18.9367±5.9049	2.3001	<0.05

24h 组和 48h 组与其余任意组比较均有显著性差异($t=2.9986$, $P<0.01$)。

表 3 移植心脏组织 HO－1 酶活性

组 别	n	HO－1 酶活性范围 (nmol 胆红素/mg 蛋白质/1h)	$\bar{x}\pm s$
移植前	6	——	——
1h 组	6	0.122～1.250	0.7935±0.2714
6h 组	6	0.750～4.500	0.9375±1.17017
12h 组	6	1.250～2.012	1.1458±0.4579
24h 组	6	1.424～2.433	1.8646±1.1104
48h 组	6	1.642～2.564	1.9047±1.4342
72h 组	6	0.250～2.250	1.3750±0.6313

*24h 组及 48h 组 HO－1 酶活性高于其余各组($t=2.246$, $P<0.05$)

2.3 RT－PCR 检测 HO－1mRNA 的表达

各实验组心脏均有 HO－1mRNA 表达，移植术后 24～48h 表达到达高峰。HO－1mRNA 与 β－actin 的 RT－PCR 结果及 OD 比值见图 2 及表 1。24hHO－1mRNA 约高于 48h，但其差异无显著性。

2.4 HO－1 蛋白印迹杂交(Western blot)

HO－1 在各组中的蛋白表达见图 3 及表 2 移植前组心肌组织中没有 HO－1 蛋白表达，移植术后 HO－1 表达逐渐增多，以 48h 为高峰。加用 CoPP 组 HO－1 蛋白表达(61.2525±16.0032)明显高于对

维普资讯 http://www.cqvip.com

照组(28.9847±7.8946)($t=5.11457, P<0.001$)(见图 4)。

2.5 HO-1 的酶活性测定

HO-1 酶活性测定结果见表 3,移植术后 HO-1 酶活性逐渐增高,48h 高于 24h 组但其差异无显著性。

3 讨 论

HO-1 是细胞应激最敏感的指标之一。在炎症、缺血、缺氧、氧过量、高热及放射损伤等应激细胞保护机制激活时上调,并在细胞损伤时保持氧化和抗氧化平衡中起关键作用。器官移植后移植物的成活时间的延长与内皮细胞和心肌细胞抗氧化和抗凋亡基因如 A20、bcl-xl、HO-1 等的表达有关,而 HO-1 被视为器官移植成活的关键保护基因[1]。近年来对 HO-1 在器官移植中的表达时间与排斥反应发生的顺序关系存在不同看法:Lu 等发现在人肺移植活检组织标本中,HO-1 随急性排斥反应的加强而增加[2],而 Chok 却在心脏移植活检标本中发现 HO-1 在无排斥反应组的表达高于排斥反应组[3]。本组实验结果,NIH-Wistar 心脏移植 6h 后移植物组织中的 HO-1mRNA 开始增加,24h 达到高峰,48h 已开始下降。而其蛋白表达高峰则在 48h,HO-1 酶活性与蛋白表达基本一致。说明器官移植后移植物组织内的 HO-1 蛋白表达及其酶活性峰值略迟于 mRNA,但其表达高峰多在 24~48h 内,在接近发生排斥反应时 HO-1mRNA 及蛋白表达均已在下降。本组资料虽与 Chok 的结论接近,但需要说明的是,前两作者的结论均在同种移植中得出;本实验 NIH-Wistar 心脏移植系协调性异种器官移植,通常不发生 HAR,而于移植后 2~3 天发生延迟性异种移植排斥反应 DXR[4]。对于 HO-1 在器官移植中的表达时间与排斥反应发生的顺序关系仍有待进一步研究。文献报道[5]机体应激后 4hHO-1 表达开始增加,24h 到达高峰,72h 基本恢复正常,本实验结果与该文献基本一致。协调性异种器官移植通常移植后 2~3 天发生延迟性异种移植排斥反应,用于 HO-1 对器官移植影响的研究较为合适。

已有作者发现通过药理学方法和基因工程诱导的 HO-1 可维持组织的结构,保护器官的功能并能延长移植器官的存活时间,增加 HO-1 的表达与 mouse-to-rat 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,且 HO-1 的诱导剂 CoPP 可阻止移植后移植物的动脉硬化[6]。有作者通过腺病毒介导 HO-1 基因治疗或 CoPP 处理原位肝移植实验延长了肝成活的时间[7],Yang 等证实在减体肝移植中诱导 HO-1 表达有助于移植物的存活[8]。Visner 等证实 HO-1 能减轻气管移植后的堵塞性气管炎样损害[9],血红素诱导的 HO-1 过度表达还能减轻心肌缺血再灌注损失及心肌梗塞面积[10]。Hancock 等[11]在心脏移植慢性排斥反应的大鼠模型中的证实了 HO-1 表达对抗移植物动脉硬化的细胞保护和免疫调节功能,他们在实验中应用辅助性 HO-1 诱导剂 CoPP 和 CD4 单克隆抗体,与单用 CD4 单克隆抗体比较,基本上完全保护了免疫球蛋白和补体的沉积,该发现提示 HO-1 经抑制体液免疫反应在移植物慢性功能衰竭中起到至关重要的作用。本组实验结果发现,经用 HO-1 的诱导剂 CoPP 处理后移植物组织内的 HO-1 蛋白表达明显高于对照组($t=5.11457, P<0.001$),移植物存活时间也较对照组长($t=4.13037, P<0.001$),与该文献一致。

尽管如此,HO-1 对细胞损伤的保护作用机制尚不甚清楚,目前认为有两种可能:①在器官移植后,HO-1 可清除氧化的肌红蛋白和血红蛋白所释放出来而堆积的游离血红素,而 HO-1 活性被抑制时,堆积的血红素激活血管内皮细胞,并表达部分涉及移植物排斥反应的炎症前基因如 ICAM-1、VCAM-1 等[10]。②另一种可能是,HO-1 酶活性是血红素代谢成终产物如胆绿素、游离铁和 CO 所必须的酶,该代谢产物作为抗炎症分子物质能削弱并消除导致移植物排斥反应的炎症前期反应。有作者在 DXR 模型中将移植物暴露在 0.04% CO 中,发现其结果完全能达到 CoPP 诱导 HO-1 对细胞的保护效果[12]。而且 Soares 等[1]认为在 HO-1 活性抑制的情况下,外源性 CO 还能抑制排斥反应,并使异种移植物被长期接受,该作用主要通过抑制血小板聚集,血栓形成和凋亡而起作用。同时有学者认为 CoPP 对其他酶也有作用,有报道在体外实验中 HO-1 的抑制剂 ZnPP 能剂量依赖性地抑制 NOS 的活性。另有报道 ZnPP 在低浓度水平(nm)能激活纯化的鸟苷酸环化酶而在高水(μm)平不能激活[6]。CoPP 对 NOS 及鸟苷酸环化酶的作用尚未见报道。重要的是 HO-1 和 NOS 表达的调节是明显相互关

维普资讯 http://www.cqvip.com

联的,CO 产物增加会导致 NO 减少,反之也然。同 NO 一样,CO 也通过激活鸟苷酸环化酶刺激 cGMP 的产生[6],因此 CO 和 NO 刺激酶表达和激活酶的活性以及各种酶的反馈调节组成了复杂的调节网络。

尽管其作用机制有待进一步研究,HO-1 及其副产物作用的发现对避免器官移植后炎症介导和免疫介导对移植物的每一步损伤均提供了一个新思路。

参 考 文 献

[1] Soares M, Lin Y, Anrather J, et al. Expression of heme oxygenase - 1 can determine cardiac xenograft survival[J]. Nature Med, 1998;4:1073 - 1077.

[2] Lu F, Zander DS, Visner GA. Increased expression of heme oxygenase - 1 in human lung transplantation[J]. J Heart Lung Transplant, 2002;21:1120 - 1126.

[3] Chop MK, Senechal M, Dorent R, et al. Apoptosis and expression of heme oxygenase - 1 in heart recipients during acute rejection episodes[J]. Transplant Proc, 2002;21:3239 - 3240.

[4] Sawyer GJ, Gustafsson K, Fabre JW. Vascularised mouse - to - rat heart graft: an unexpectedly difficult model of xenotransplantation[J]. Transplant Proc, 1995;27:309 - 318.

[5] Redaeli CA, Tian YH, Schaffner, et al. Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase - 1 [J]. Hepatology, 2002; 35(5):1082 - 1092.

[6] Masamichi K, Roland B, Bibo K, et al. Heme oxygenase - 1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antipoptotic pathway[J]. Transplantation, 2002;73(2):287 - 292.

[7] Kato H, Amersi F, Melinek J, et al. Heme oxygenase - 1 overexpression pretects rat liver from ischemia/reperfusion injury with extend cold preservation[J]. Am J Transplant, 2001;1:121 - 129.

[8] Yang ZF, Tsui TY, Ho DW, et al. Heme oxygenase potentiates the survival of small - for - size liver graft[J]. Liver Transpl, 2004;10(6):784 - 793.

[9] Visner G, Lu F, Zhou HL, et al. Graft protective effects of heme oxygenase - 1 in mouse tracheal transplant - related obliterative bronchiolitis[J]. Transplantation, 2003; 76(4):650 - 656.

[10] Hangaishi M, Ishizawa N, Aizawa T, et al. Induction of heme oxygenase - 1 can act pritecively against cardiac ischemia/reperfusion in vivo[J]. Biochen Biophys Res Com, 2000;279(2):582 - 588.

[11] Hancock W, Buelow R, Sayegh M, Turka L. Antibody - induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti - oxidant and anti - apoptotic genes[J]. Nat Med, 1998; 4 (12): 1392 - 1401.

[12] Sato K, Balla J, Otterbein L, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase - 1 suppresses the rejection of mouse - to - rat cardiac transplants[J]. J Immunol, 2001; 166 (6): 4185 - 4194.

****

(上接第 654 页)

to growth factor responsiveness[J]. Blood, 1989;74(1):56 - 65.

[2] Frankel AE, Powell BL, Hall PD, et al. Phase I trial of a novel diphtheria toxin/granulocyte macrophage colony - stimulating factor fusion protein (DT388GMCSF) for refractory or relapsed acute myeloid leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2002; 8 (5):1004 - 1013.

[3] Friesen C, Lubatschofski A, Kotzerke J, et al. Beta - irradiation used for systemic radioimmunotherapy induces apoptosis and activates apoptosis pathways in leukaemia cells[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2003; 30(9):1251 - 1261.

[4] Kim CN, Bhalla K, Kreitman RJ, et al. Diphtheria toxin fused to granulocyte - macrophage colony - stimulating factor and Ara - C exert synergistic - toxicity against human AML HL - 60 cells[J]. Leuk Res, 1999;23(6):527 - 538.

[5] Gopal AK, Gooley TA. High - dose radioimmunotherapy versus conventional high - dose therapy and autologoushematopoietic stem cell transplantation for relapsed follicular non - Hodgkinlymphoma: a multivariable cohort analysis [J]. Blood, 2003;102(7):2351 - 2357.

[6] 刘长征,王浩丹,胡雅儿.实验核医学与核药学[M].人民卫生出版社,1999.

[7] Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis - inducing factor[J]. Nature, 1999;397:441 - 446.

[8] Shimizu S, Konishi A, Kodama T, et al. BH4 domain of antiapoptotic Bcl - 2 family members closes voltage - dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000;97:3100 - 3105.

[9] Kim HF, Han SJ, Kasza T, et al. Platelet - derived growth factor (PDGF) signaling mediates radiateon - induced apoptosis in human puostate cancer cells with loss of P53 function[J]. Int J Radiat Omcol Biol Phys, 1997;39(30):731 - 736.