

HTK 液 3 种不同灌注方法对兔心脏保存移植后 心肌组织 ICAM 和 IL-17 表达的影响

韦雪梅¹ 郭义龙² 徐志新¹

摘要 目的 研究 HTK 液 3 种不同灌注方法(单纯低温浸泡、持续灌注与间断 2 h 灌注)对同种异体兔心保存移植后心肌组织细胞间黏附分子(ICAM)-1 和白细胞介素(IL)-17 表达的影响,探讨 HTK 液灌注方式对心脏移植后急性排斥反应的影响机制。方法 选择健康 2 月龄新西兰兔共 18 对 36 只,雌雄各半,体质量(2.15 ± 0.33) kg,随机分为 3 组,即单纯低温浸泡组(单纯组)5 对、持续灌注组(持续组)5 对和间断 2 h 灌注组(间断组)8 对。供体心脏离体后经主动脉根部灌注 HTK 液停跳保护心脏,4℃保存心脏 8 h,根据改良 Ono 术式完成心脏移植模型,取出供体心脏。制备石蜡切片,光学显微镜下 HE 染色观察组织和细胞的病理改变,分别采用实时定量 RT-PCR 和 Western blot 检测组织 ICAM-1 和 IL-17 水平,TUNEL 试剂盒检测细胞凋亡率。结果 HE 染色发现 3 组大部分心肌组织结构完整,伴细胞水肿、黏液样变性或坏死,炎性细胞浸润、脂肪化生及小血管生成。半定量分析发现,间断组细胞水肿、炎性细胞和小血管数目明显少于持续组,单纯组最多($P < 0.05$)。定量检测 ICAM-1 和 IL-17 mRNAs 和蛋白表达水平发现,间断组显著低于持续组,单纯组最高($P < 0.05$)。间断组细胞凋亡率低于持续组,单纯组最高($P < 0.05$)。结论 HTK 液不同灌注方法对同种异体兔心移植后的急性排斥反应影响不同,间断 2 h 灌注可明显降低受体心肌 ICAM-1 和 IL-17 表达,抑制细胞凋亡效应最明显。

关键词 HTK 液; 间断灌注; 移植心脏; 急性排斥反应; 细胞间黏附分子; IL-17; 凋亡

中图分类号 R 654.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)01-0104-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.022

供体心脏通常需要经过一定时间的保存才能进行移植,此时离体心脏的保存技术可能对受体心脏发生缺血再灌注损伤和急性排斥反应产生重要影响^[1]。再灌注损伤和急性排斥反应也是导致心脏移植失败、受体心脏复跳欠佳和失能的主要机制^[2-3]。低温和 HTK 停搏保护液是目前应用最成熟的离体心脏保存技术,可显著降低心肌能耗,保护心肌功能^[4]。其中 HTK 液单纯低温浸泡应用最广泛,简单、安全,缺点是未能及时清除停搏期间心肌组织代谢产物和氧自由基,补充心肌代谢需要,导致钙超载、细胞水肿、炎症反应、氧化应激、免疫损伤等^[5]。研究发现^[6-7],持续灌注或间断 2 h 灌注可明显改善复跳效果,降低心律失常和心肌损伤风险,提高受体心脏存活率。细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM)-1 和白细胞介素(interleukin, IL)-17 的表达在同种异体心脏移植早期再灌注损伤和急性排斥反应过程中表达明显上调,可能参与受体心脏存活和功能恢复过程^[8-9]。既往关于 HTK 液不同灌注方式对移植心脏受体心肌免疫损伤和炎症反应的研究较少,因此,该研究通过比较 HTK 液 3 种不同灌注方法对同种异体兔心保存移植后心肌组织 ICAM-1 和 IL-17 表达的影响,探讨

2019-10-10 接收

基金项目: 海南省科技厅自然科学基金(编号: 818QN319)

作者单位: 海南医学院第二附属医院¹ 麻醉科、² 心脏外科,海口 570311

作者简介: 韦雪梅,女,副主任医师,责任作者, E-mail: hkwxm1978@163.com

leukin-17 (IL-17) and interferon-gamma (INF- γ) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). **Results** The inflammation began on the 3rd day after immunization, and reached the peak on the 14th day. The pathological and clinical manifestations on the 14th day after immunization suggested that the ocular inflammation and pathological changes of the experimental group were significantly better than those of the control group. The expression levels of inflammatory factors IL-17 and INF- γ in the experimental group were significantly lower than those of the control group. **Conclusion** MANF vitreous cavity administration can reduce the inflammation of EAU in rats, and the decrease of the expressions of IL-17 and INF- γ may be a part of the effect, and the specific mechanisms need to be further studied.

Key words uveitis; autoimmune disease; IRBP; animal model; MANF

HTK 液灌注方式对心脏移植后急性排斥反应的影响机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 18 对 36 只 2 个月大小雌雄不限的健康新西兰兔购于长沙市天勤生物技术有限公司, 供受体配对, 平均体质量(2.15 ± 0.33) kg, 合格证号 43006700016096 数量 10 只, 合格证号 43006700016142 数量 10 只, 合格证号 43006700016249 数量 16 只。由我院动物实验中心购买和饲养, 饲养环境: 通风透气, 除添水、添料、清扫卫生和观察健康的时间外, 兔舍内均保持黑暗。兔舍温度保持 25℃ 左右, 湿度 55% ~ 65%。

1.1.2 实验试剂与仪器 HTK 灌注液和 KH 缓冲液(德国科勒化学制药公司), TRIzol 提取试剂和反转录试剂(美国 Sigma 公司), HE 染色试剂和 ECL 显色液(南京碧云天有限公司), BCA 蛋白提取试剂(美国 Invitrogen 公司), 鼠抗兔 ICAM-1、IL-17 和 GAPDH 一抗和二抗(美国 R&D 公司), TUNEL 试剂(美国 Santa Cruz 公司)。显微外科手术器械(上海医用器械厂), 离体心脏灌流系统(上海奥尔科特生物公司)。

1.2 实验方法 18 对实验兔随机抓取分为 3 组, 分别是单纯低温浸泡组(单纯组) 5 对、持续灌注组(持续组) 5 对和间断 2 h 灌注组(间断组) 8 对。腹腔注射戊巴比妥钠麻醉, 气管插管人工呼吸, 静脉肝素化, 开胸阻断主动脉, 灌注 HTK 保护液, 剪断上下腔静脉及肺动脉充分引流, 离体取出心脏, 经主动脉根部灌注 HTK 停跳液保护心脏, 悬挂于 Langendorff 灌注模型上。首先对离体心脏进行平衡灌注, 采用 KH 缓冲液(37℃、pH 7.4)经 95% O₂ + 5% CO₂ 预处理, 灌注压力为 7.35 kPa, 5 ~ 10 min 后心脏搏动处于稳定状态, 然后进行停跳灌注。单纯组灌注 HTK 保护液(4℃、5 ~ 6 ml)后静置保存, 间断组间隔 2 h 灌注 HTK 保护液(30 ml/kg), 持续组采用微量泵灌注速度 0.025 ml/(g · h); 处理完成后于 4℃ 保存 8 h。建立移植心脏模型参照改良 Ono 术式^[10], 即分别将供心升主动脉与受体腹主动脉端端吻合, 供心肺动脉与受体下腔静脉吻合, 建立在体动静脉循环。

对心脏移植供、受体进行血型、HLA 抗原、淋巴细胞毒及群体反应性抗体等检测, 采用氨基酸三联体及交叉反应方法对供、受者匹配程度进行评价。

1.3 观察指标与检测方法 根据改良 Ono 术式完成心脏移植模型, 取出供体心脏。常规制作心肌切片, 厚度 5 μm, 石蜡包埋, 用于 HE 染色观察组织和细胞的病理改变; 分别采用实时定量 RT-PCR 和蛋白印迹法检测组织 ICAM-1 和 IL-17 水平, TUNEL 试剂检测细胞凋亡率。

TUNEL 检测细胞凋亡主要步骤: 石蜡切片经脱蜡、水化、H₂O₂ 封闭抗体、蛋白酶消化、缓冲液保湿等处理后; 根据说明书提示, 首先取出 TdT 和 DIG-d-UTP 各 1 μl, 与缓冲液混匀, 湿盒内 37℃ 反应 2 h; 洗涤后滴加生物素-抗地高辛抗体反应 30 min, 洗涤后滴加 SABC 反应 30 min, DAB 显色。凋亡细胞的判断以细胞核中出现棕黄色颗粒为阳性, 凋亡率计算方法: 每例标本随机挑选 5 张切片, 每张切片随机挑选 4 个高倍镜视野(400×)人工计数, 凋亡细胞占有视野下细胞百分比即凋亡率, 取平均值。

RT-PCR 法主要步骤: 根据试剂操作提示提取总 RNA, 测定浓度和纯度, 合成 cDNA; 由专业生物公司设计目的引物序列, ICAM-1: (F) 5'-GGAATTG-GAGGAGAGCA-3', (R) 5'-ACAGATCCTCAATCTT-3', 123 bp; IL-17: (F) 5'-AACGGCTCTTGCT-3', (R) 5'-GTAAAGGCAGACCGCA-3', 252 bp; GAPDH: (F) 5'-CGAGCCGATGACAG-3', (R) 5'-GCTGT-GCGCGTAT-3', 69 bp。PCR 扩增体系为 Master Mix 10 μl + 上下游引物各 0.5 μl + cDNA 模板 1 μl, 加反应水至 20 μl。扩增条件为 95℃、5 min, (95℃、25 s, 60℃、30 s) 共 30 个循环, 60℃、40 s 终止反应, 电泳扩增产物, 获得融解曲线, 系统软件自动计算 Ct 值, 结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示。

Western blot 主要步骤: 加入细胞裂解液, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 参照蛋白 GAPDH 作标准化处理; 各组分别取 30 μg 样品蛋白, 经 8% SDS-PAGE 上样加热, 分离电泳并转移至 PVDF 膜, 摇床室温封闭; 洗涤后滴加鼠抗兔 ICAM-1、IL-17 和 GAPDH 抗体(1:2000)静置过夜, 洗涤后滴加辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗(1:500)室温孵育 4 h, ECL 显色, 结果行半定量分析。

1.4 统计学处理 以 SPSS 20.0 统计软件对计量资料作单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 法检验, 3 组间比较采用 F 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HE 染色结果比较 HE 染色发现 3 组

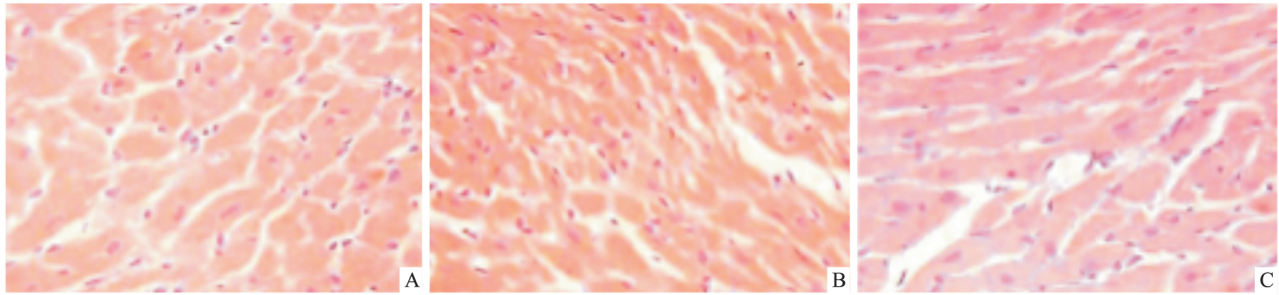


图1 HE染色观察各组心肌组织的病理改变 ×200

A: 单纯组; B: 持续组; C: 间断组

大部分心肌组织结构完整,伴细胞水肿、黏液样变性或坏死、炎性细胞浸润、脂肪化生及小血管生成。见图1。半定量分析发现,间断组细胞水肿、炎性细胞和小血管数目明显少于持续组,单纯组最多($P < 0.05$)。见表1。

表1 HE染色半定量分析各组心肌组织的病理改变(个/视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	细胞水肿	炎性细胞	小血管
单纯组	10	3.3 ± 0.7	3.4 ± 0.8	2.7 ± 0.8
持续组	10	2.8 ± 0.6^a	2.7 ± 0.5^a	2.1 ± 0.5^a
间断组	16	2.3 ± 0.5^{ab}	2.1 ± 0.4^{ab}	1.5 ± 0.3^{ab}
F值		3.968	4.025	4.121
P值		0.029	0.022	0.014

与单纯组比较: $^a P < 0.05$; 与持续组比较: $^b P < 0.05$

2.2 各组心肌组织 ICAM-1 和 IL-17 mRNAs 和蛋白表达水平的比较 间断组 ICAM-1 和 IL-17 mRNAs 和蛋白表达水平显著低于持续组,单纯组最高($P < 0.05$)。见表2、图2。

表2 各组心肌组织 ICAM-1 和 IL-17 mRNAs 和蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	ICAM-1		IL-17	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
单纯组	10	0.35 ± 0.07	0.39 ± 0.11	0.49 ± 0.16	0.44 ± 0.13
持续组	10	0.29 ± 0.06^a	0.31 ± 0.08^a	0.41 ± 0.12^a	0.32 ± 0.09^a
间断组	16	0.23 ± 0.05^{ab}	0.25 ± 0.06^{ab}	0.33 ± 0.08^{ab}	0.26 ± 0.05^{ab}
F值		4.562	4.659	4.285	4.729
P值		0.004	0.002	0.009	0.001

与单纯组比较: $^a P < 0.05$; 与持续组比较: $^b P < 0.05$

2.3 各组心肌细胞凋亡率的比较 间断组细胞凋亡率低于持续组,单纯组最高($P < 0.05$)。见图3、4。

3 讨论

临床和实验中需要挑选最佳的心脏停搏保护

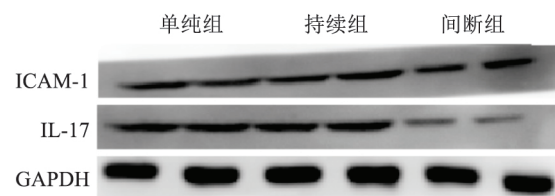


图2 Western blot法半定量比较各组心肌组织 ICAM-1 和 IL-17 蛋白表达水平 ×200

液,其中 HTK 液单次低温灌注可实现较低的心脏基础代谢,提供必要的心肌代谢底物和氧气,不增加心肌损伤和心脏移植后的功能障碍,而且易制备、操作简单、安全性高。良好的供体心脏保存技术是移植心脏得以存活的重要环节。HTK 液灌注不仅持续提供停搏期间心肌代谢需要的营养物质和氧气,同时可及时清除代谢产物,减轻酸碱失衡、细胞水肿、氧化功能障碍、炎症反应等损伤^[10]。该研究提出 HTK 液不同灌注方式可能对受体移植心脏的再灌注损伤和急性排斥反应可能产生不同的影响,进而影响心脏复跳后的功能恢复。

本研究显示,3组大部分心肌组织结构完整,伴细胞水肿、黏液样变性或坏死,炎性细胞浸润、脂肪化生及小血管生成。提示停跳期间心肌细胞保持低水平的能量代谢,离体对心肌细胞产生一定的影响,如无氧糖酵解、细胞肿胀、钙超载、氧自由基产生过多、炎性细胞浸润、新生血管等。半定量分析表明,间断组细胞水肿、炎性细胞和小血管数目明显少于持续组,单纯组最多。提示间断灌注对心肌损伤程度较轻。进一步研究显示,间断组 ICAM-1 和 IL-17 mRNAs 和蛋白表达水平显著低于持续组,单纯组最高。急性排斥反应是移植心脏较常见的并发症,也是受体心脏复跳失败和失能以及慢性排斥反应的重要原因。ICAM-1 主要识别白细胞表面的特定结构,具有高度特异性,进而趋化白细胞、淋巴细胞聚集,

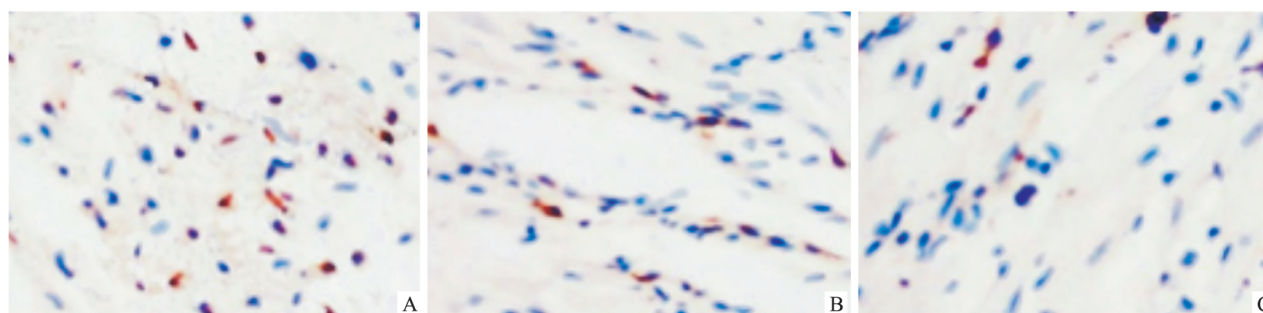


图3 TUNEL 比色法检测心肌凋亡 ×400

A: 单纯组; B: 持续组; C: 间断组

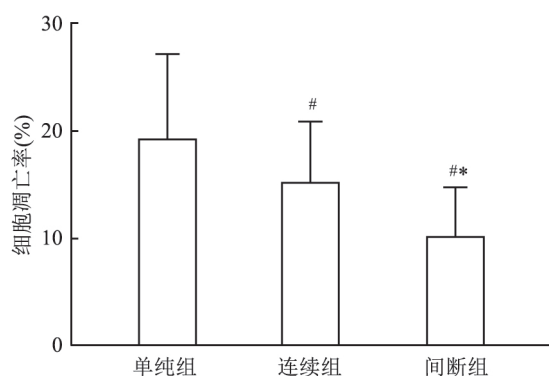


图4 TUNEL 法检测各组心肌细胞凋亡率

与单纯组比较: # $P < 0.05$; 与连续组比较: * $P < 0.05$

发挥杀伤外源性分子,介导细胞间黏附功能,在免疫反应、肿瘤转移等多种生物行为中扮演重要角色^[11]。在移植物免疫排斥反应中,受体器官可高表达 ICAM-1,与排斥反应时间相一致,其升高水平与细胞毒性 T 淋巴细胞的功能活化程度密切相关^[12]。此外,ICAM-1 可协同抗原呈递细胞共同识别异源性分子,激活细胞和体液免疫反应。具体反应过程是在免疫识别阶段,ICAM-1 强化辅助性 T 细胞和抗原提呈细胞的黏附、聚集活性,趋化有活性 T 细胞向移植物内皮细胞黏附,增加内皮细胞损伤,增加血管壁通透性,释放多种细胞因子和炎症介质,如 IL-17、TNF- α ^[13];免疫效应阶段主要强化毒性 T 细胞与移植物细胞黏附和杀伤作用,导致移植物细胞功能障碍,凋亡增加。IL-17 主要由辅助性 T 淋巴细胞分泌,在抗原呈递、介导细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞杀伤病原体 and 异源性细胞、激活 B 淋巴细胞中发挥重要作用^[14]。间断组细胞凋亡率低于持续组,单纯组最高。细胞凋亡是再灌注损伤、急性排斥反应、供体复跳失败的重要机制,也是供体心脏功能恢复不佳的重要原因。

综上所述,HTK 液不同灌注方法对同种异体兔心移植后的急性排斥反应影响不同,以间断 2 h 灌注可明显降低受体心肌 ICAM-1 和 IL-17 表达,抑制细胞凋亡效应最明显。移植心脏后功能是否能够恢复至移植前的影响因素和参与机制较多,如何探寻特异性的干预靶点,对提高供体保存技术和受体移植物存货质量具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] 李勇男,吉冰洋,高秉仁.机械灌注保存供体心脏研究进展[J].中国分子心脏病学杂志,2015,15(6):1550-3.
- [2] 伊雪,杨学慧,杨述亮,等. Akt/GSK-3 β 通路介导调控莱菔硫烷减轻心脏移植缺血再灌注损伤的研究[J].中国现代医学杂志,2017,27(9):8-12.
- [3] 胡志斌,严志焜,王惠菊,等.脂肪源性干细胞输注剂量对抑制大鼠心脏移植急性排斥反应的影响[J].医学研究杂志,2017,46(12):50-89.
- [4] 汪源,周璞,周曼玲,等. HTK 液与高钾停搏液在成人心脏手术中心肌保护效果的荟萃分析[J]. 华中科技大学学报(医学版),2017,46(4):484-8.
- [5] 张洪宇,庄建.不同停搏时间下 HTK 液对幼兔未成熟心脏的保护作用[J].中国胸心血管外科临床杂志,2015,22(3):234-40.
- [6] 郑卫萍.采用体外心肌持续灌注技术修复心脏死亡捐献器官功能对扩大心脏捐献人群的可行性研究[J/CD].实用器官移植电子杂志,2015,3(2):111.
- [7] 胡志斌,严志焜,王海涛,等.间断灌注保存对离体猪心冠状动脉保护效果的观察[J/CD].心血管外科杂志(电子版),2015,4(2):81-5.
- [8] 史海蛟,杨可鑫,周亚滨.苏木乙酸乙酯提取物对心脏移植模型大鼠 ICAM-1 mRNA 表达影响[J].辽宁中医药大学学报,2017,19(5):25-8.
- [9] 魏冬,王志维.大鼠心脏移植中常山酮对树突状细胞的抑制作用及对血清 IL-17 的影响[J].解放军医药杂志,2016,28(9):31-5.
- [10] 贾蕾蕾,王爱玲.棉子酚通过干扰氧化应激反应、抑制 JNK/p38 MARK 信号通路的激活减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤

- 伤[J]. 安徽医科大学学报 2017, 52(10): 1424-9.
- [11] 黄洁, 廖中凯. 中国心脏移植免疫抑制治疗及排斥反应诊疗规范(2019版) [J/CD]. 中华移植杂志(电子版), 2019, 13(1): 15-20.
- [12] Salehi S, Sosa R A, Jin Y P, et al. Outside-in HLA class I signaling regulates ICAM-1 clustering and endothelial cell-monocyte interactions via mTOR in transplant antibody-mediated rejection[J]. *Am J Transplant* 2018, 18(5): 1096-109.
- [13] Kim J Y, Yoon J S, Kang B M, et al. Allogeneic hair transplantation with enhanced survival by anti-ICAM-1 antibody with short-term rapamycin treatment in nonhuman primates[J]. *J Invest Dermatol* 2017, 137(2): 515-8.
- [14] Pilat N, Sabler P, Klaus C, et al. Blockade of adhesion molecule lymphocyte function-associated antigen-1 improves long-term heart allograft survival in mixed chimeras[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2018, 37(9): 1119-30.

Effect of tissue ICAM and IL-17 expressions after preservation and transplantation of rabbit heart with three different perfusion methods of HTK solution

Wei Xuemei¹, Guo Yilong², Xu Zhixin¹

(¹Dept of Anesthesiology, ²Dept of Cardiac Surgery, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570311)

Abstract Objective To study the influences of intercellular cell adhesion molecule (ICAM)-1 and interleukin (IL)-17 expressions in myocardial tissues after preservation and transplantation of rabbit heart allograft with three different perfusion methods of HTK solution (simple low temperature immersion, continuous or intermittent 2 h perfusion), and explore the mechanism of HTK infusion types on acute rejection after heart transplantation. **Method** 18 pairs healthy 2-month-old New Zealand rabbits (mean weight 2.15 ± 0.33 kg, male and female in half) were chosen and divided randomly into three groups: simple low temperature immersion group (simple group, $n = 5$ pairs), continuous group ($n = 5$ pairs) and intermittent 2 h perfusion group (intermittent group, $n = 8$ pairs). Donor hearts were isolated with perfusing HTK solution through aortic root to arrest and protect the heart, and then preserved for 8 h at 4 °C. According to modified Ono procedure, heart transplantation model was established and donor heart was removed. Then pathological changes with HE staining was observed, quantitative expressions of ICAM-1 and IL-17 were detected by RT-PCR and Western blot, and apoptotic rate was detected by TUNEL. **Results** HE staining showed that most myocardial tissues in the three groups were intact, accompanied by cell edema, myxoid degeneration or necrosis, inflammatory cell infiltration, adipogenesis and angiogenesis. Semi-quantitative analysis showed that the number of cell edema, inflammatory cells and small vessels in the intermittent group was significantly less than that in the continuous group, which was the most in the simple group ($P < 0.05$). Quantitative detection showed that ICAM-1 and IL-17 mRNAs and protein were significantly lower in the intermittent group than those in the continuous group, which was the highest in the simple group ($P < 0.05$). What's more, the apoptotic rate in the intermittent group was more less than that in the continuous group, and that in the simple group was the most ($P < 0.05$). **Conclusion** Different perfusion methods of HTK solution have different effects on acute rejection after allograft heart transplantation in rabbits, especially it can significantly reduce ICAM-1 and IL-17 expressions in recipient myocardium and inhibit apoptotic effect with intermittent 2 h perfusion.

Key words HTK solution; intermittent perfusion; transplant heart; acute rejection; intercellular cell adhesion molecule; IL-17; apoptosis