

学历水平的提高有利于降低 ECC 的发生。稳定的职业有助于儿童的喂养,降低 ECC 发生。

由此,我们认为预防 ECC 的发生,必须坚持科学喂养,提倡母乳的喂养、钙、维生素 D 的添加至少达到 6 个月。倡导父母维系稳定的家庭社会关系,从事稳定的职业。

参考文献

1 胡翔,梁广雷,梁广生,等. 平玉县城区 2~8 岁儿童龋齿流行病学调查报告[J]. 医学理论与实践,2009, 22 (3):362-363  
 2 李树文. 474 名儿童龋齿患病情况调查[J]. 中国实用医药, 2007, 2(26):96  
 3 袁慧明. 幼儿园儿童乳牙龋齿调查[J]. 浙江预防医学, 2010,22

(4):72-73  
 4 Schwartz SS, Rosivack RG, Michelotti P. A child's sleeping habit as a cause of nursing caries[J]. ASDC J Dent Child, 1993, 60(1):22-25  
 5 Mattos - Graner RO, Zelante F, Line RC, et al. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5 - year - old Brazilian children[J]. Caries Res, 1998,32 (5):319-323  
 6 Bhowmick SK, Johnson KR, Rettig KR. Rickets caused by vitamin D deficiency in breast - fed infants in the southern United States[J]. Am J Dis Child, 1991, 145(2):127-130

(收稿日期:2013-02-25)

(修回日期:2013-04-22)

# 内皮性吲哚胺 2,3 - 过氧化酶抑制心脏移植后冠脉血管病的发生

肖永光 刘天舒 龚丹

**摘要 目的** 探讨内源性吲哚胺 2,3 - 过氧化酶对小鼠心脏移植后移植物发生冠脉血管病变的影响。**方法** 分别利用 IDO<sup>-/-</sup>、高表达 IDO 以及野生型 C57BL/6 小鼠作为供体,bm12 小鼠作为受体,建立小鼠腹部心脏移植模型。分别测量心脏纤维化面积、冠脉血管狭窄程度以及细胞增殖指数。**结果** IDO 是小鼠心脏移植后自身保护机制,IDO<sup>-/-</sup> 供心纤维化面积大大提高。相反,与对照组相比,SB - hIDO 治疗的实验组可明显缓解冠脉血管狭窄程度。**结论** 血管内皮源性吲哚胺 2,3 - 过氧化酶对心脏移植后纤维化和冠脉血管病变发生的有明显的抑制作用。

**关键词** 心肌纤维化 心脏移植 冠脉血管病变

**Endothelial IDO Inhibit Cardiac Vasculopathy after Heart Transplantation in Mice.** Xiao Yongguang, Liu Tianshu, Gong Dan. Thoracic Department, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

**Abstract Objective** To discuss the influence of endothelial Indoleamine - 2,3 - dioxygenase on cardiac fibrosis and vasculopathy after allograft heart transplantation in mice model. **Methods** The donor included C57BL/6 mice of IDO<sup>-/-</sup>, SB - IDO and wild type. The bm12 mice were used to be as recipient and the heart transplantation models were set up. The fibrosis area and coronary artery stenosis were evaluated. **Results** There was significant cardiac fibrosis and vasculopathy after heart transplantation in mice model which received vehicle but not in mice which received SB - hIDO. **Conclusion** Enhanced endothelial IDO can ameliorate cardiac fibrosis and vasculopathy after allograft heart transplantation in mice model.

**Key words** Vasculopathy; Indoleamine - 2,3 - dioxygenase; Cardiac transplantation

心脏移植(heart transplantation, HTx)是治疗终末期心脏病的最有效的措施<sup>[1]</sup>。心脏移植后的长期并发症主要为慢性排斥反应,主要为供心发生纤维化,其病理学表现为心肌内微血管密度降低,正常的心肌纤维结构受到破坏。供心发生纤维化后,引起移植物冠状血管病变发生并导致心脏收缩和舒张功能受损。

心脏纤维化的主要原因是成纤维细胞聚集,并分泌大量细胞外基质沉积<sup>[2]</sup>。但目前对这项慢性反应尚无有效治疗方法。

吲哚胺 2,3 - 过氧化酶(indoleamine 2,3 - dioxygenase, IDO)是肝外唯一的催化色氨酸沿犬尿酸途径分解代谢的限速酶,其活性表达可引起细胞微环境中色氨酸分解代谢增强从而抑制 T 细胞增殖。传统认为,IDO 是一种潜在的免疫抑制酶,可以引起肿瘤

的逃避和自体免疫耐受<sup>[3,4]</sup>。最近发现内皮源性 IDO 可以在调节血管血流稳定方面起到一定作用<sup>[5]</sup>,但对心脏移植后移植物发生纤维形成以及冠脉血管病变有无影响,目前尚无报道。本研究利用拟探讨内皮源性的 IDO 对心脏移植纤维化的影响。

### 材料与方 法

1. 动物模型制作: B6. C-H-2<sup>bm12</sup> K<sup>hEg</sup> (bm12)、C57BL/6 (WT B6) 和 IDO 基因敲除的 C57BL/6 (IDO<sup>-/-</sup>) 的小鼠均购于 Jackson 实验室。所有小鼠鼠龄均为 10~12 周, 体重 20~25g, 在实验开始前 1 周自由采食食物和水分。以 bm12 作为受体, 供体为 WT B6 和 IDO<sup>-/-</sup> 的小鼠。供体小鼠采用 1% 戊巴比妥钠 [0.01ml/g (体重)] 腹腔注射诱导麻醉, 麻醉满意后, 正中切口进腹, 经下腔静脉快速推注 0.2ml 肝素钠。约 1min 后, 剪断腹主动脉, 并充分暴露心脏。分别结扎并切断上、下腔静脉和肺静脉, 将心脏后的组织一并结扎并切断, 于头臂干分支近侧将主动脉和肺动脉一同剪断; 取下供心, 置于 4℃ 生理盐水中保存。将受体小鼠用上法麻醉满意后, 正中切口进腹; 游离下腔静脉及其伴行的主动脉; 阻断下腔静脉和腹主动脉的近心端和远心端。用 30G 针头于腹主动脉戳一小孔, 然后沿小孔作一纵行切口, 行供心主动脉和受体腹主动脉端侧吻合。同法剪开下腔静脉, 行肺动脉和下腔静脉端侧吻合, 松开阻断, 关闭腹腔。

2. 冠脉血管内皮细胞高表达 IDO 小鼠的获取: 先含有人 IDO 基因 (human IDO, hIDO) 的质粒导入大肠杆菌, 然后将大肠杆菌置入含氯霉素的 500ml Terrific 肉汤培养基 (预加温至 37℃), 于 37℃ 剧烈振荡培养 (摇床转速 300r/min), 培养 12~16h。最后收集和裂解细菌, 分离和纯化含有目的 DNA 基因的质粒。利用 sleep-beauty 基因转导系统, 在治疗前一天从受体小鼠尾静脉注入质粒 (SB-hIDO), 获取肺组织高表达 IDO 的小鼠作为供体<sup>[6]</sup>。

3. 术后处理与观察: 小鼠多在术后给予保暖, 直至苏醒。术后单笼饲养, 不禁饮食。每天通过视、触诊观察供心的搏动情况, 以判断移植物的存活情况。于移植后 40 和 60 天随机选取各组小鼠 10 只, 切取移植心。麻醉满意后, 正中切口进腹, 自升主动脉注入适量 100g/L 甲醛液使其充盈, 10min 后心尖部组织连续切片, 切片厚 4μm, 行病理组织检查。

4. 观察指标: 根据移植心脏心尖部冠状动脉平均内膜增厚和管腔狭窄程度判定移植心脏血管病变。评分标准为: 0 分, 无变化; 1 分, 轻度或部分内膜增厚; 2 分, 血管腔圆周状内膜增厚; 3 分, 内膜增厚引起管腔狭窄 < 50%; 4 分, 内膜增厚引起管腔狭窄 > 50%。PCNA 阳性指数 (细胞增殖指数): 测量移植心脏冠状动脉增生的内膜平滑肌细胞中细胞核 PCNA 阳性的细胞数, 即: PCNA 指数 = PCNA 阳性细胞/100 个细胞<sup>[7]</sup>。

5. 统计学方法: 应用 SPSS 10.0 统计软件包对数据进行分析, 所有数据均以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较使用方差分析, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 结 果

1. IDO 是小鼠心脏移植后自身保护机制: 为研究在小鼠心脏移植后 IDO 是否参与心脏纤维化及冠脉血管病变的过程, 我们利用 IDO 基因敲除的 B6 小鼠作为供体, 以 bm12 小鼠作为受体, 建立实验组小鼠心脏移植模型。对照组以野生型 B6 小鼠作为供体, 其余实验条件和方法与实验组相同。两组均建立 6 只小鼠心脏移植模型。实验结果显示与对照组相比, 实验组生存期明显缩短 ( $P = 0.04$ ), 差异具有统计学意义 (图 1)。而且实验组和对照组相比, 实验组心脏纤维化面积明显大于对照组 ( $P = 0.04$ ), 差异具有统计学意义 (图 2)。

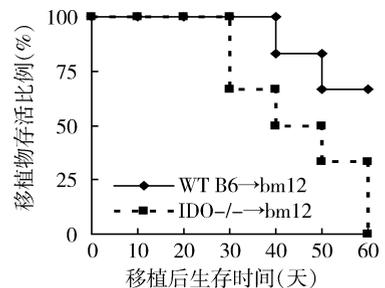


图 1 小鼠心脏移植存活时间

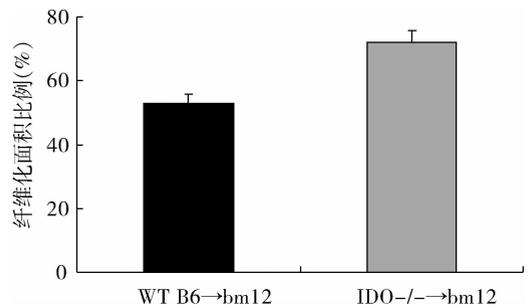


图 2 小鼠心脏移植后纤维化面积

2. 供心冠脉内皮细胞高表达 IDO 能够抑制心脏移植后纤维化过程的发生: 然后笔者研究小鼠供心冠脉血管高表达 hIDO 能够抑制心脏抑制术后纤维化过程。笔者利用 SB-hIDO 系统建立冠脉血管高表达 hIDO 基因的 B6 小鼠作为供体, 以 bm12 小鼠作为受体, 建立实验组小鼠心脏移植模型。对照组以野生型 B6 小鼠作为供体, 其余实验条件和方法与实验组相同。两组均建立 6 只小鼠心脏移植模型。实验结果显示与对照组相比, 实验组生存期明显缩短 ( $P = 0.03$ ), 差异具有统计学意义 (图 3)。而且实验组和对照组相比, 实验组心脏纤维化面积明显大于对照组

( $P=0.03$ ), 差异具有统计学意义(图4)。实验组和对照组供心冠状血管管壁内皮细胞消失, 内膜明显增厚。但实验组内膜增厚的程度均比对照组轻, 中层和外膜无特殊变化。对照组内膜平滑肌细胞中细胞核PCNA的阳性指数比各实验组大, 组间比较, 差异有统计学意义(表1)。

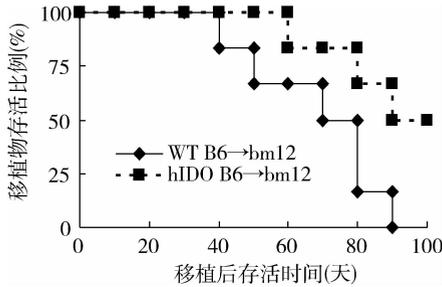


图3 小鼠心脏移植存活时间

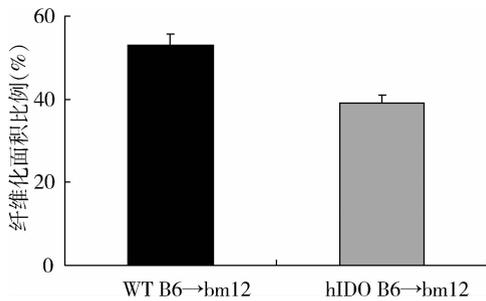


图4 小鼠心脏移植后纤维化面积

表1 冠状血管内膜增生以及PCNA阳性指数的观察( $\bar{x} \pm s$ )

组别	移植心血管病变评分		PCNA的阳性指数	
	40天	60天	40天	60天
对照组	2.8 ± 0.68	3.7 ± 0.42	21.39 ± 5.24	35.29 ± 6.19
实验组	2.3 ± 0.62*	3.1 ± 0.36*	17.25 ± 9.36*	23.58 ± 8.43*

与对照组相比, \*  $P < 0.05$

### 讨 论

本实验结果证明,IDO是针对心脏移植后供心抑制冠状血管病变发生的自身防御机制,可以在病理状态下起到保护供心的作用。我们利用机体这种自身生理防御,加强内皮细胞高表达IDO,结果显示内皮源性的IDO能够有心脏移植后冠状血管病变的发生。有数据表明内皮细胞发生间质化(endothelial-to-mesenchymal)在小鼠心脏移植后供心冠状血管病变的发生和移植植物发生纤维化过程中的起到重要作用,而冠脉血管内皮细胞是最主要的参与者。在此过

程中中层血管平滑肌样细胞的增生起到重要作用,而这些血管平滑肌细胞多起源于血管内膜,通过间质转化的过程,由内皮细胞转变成具有分泌功能的间质细胞,即血管平滑肌样细胞。转型后的血管平滑肌细胞失去既有的收缩功能,转而具有分泌功能,能够大量增生且在血管壁内堆积,导致管壁增厚、弹性减弱,并分泌大量的细胞外基质,从而引起血管管壁增厚和管腔狭窄,最终导致冠脉血管病变<sup>[8,9]</sup>。本实验结果明确显示通过SB基因转导系统诱导血管内皮高表达IDO可以明显减少供心冠状血管病变的形成和发展。有资料显示内皮源性的IDO通过消耗ATP能源,减少蛋白合成,可以抑制平滑肌细胞的增生,并诱导其发生凋亡,抑制上述过程的发生,最终达到治疗供心冠状血管病变和纤维化的目的<sup>[10]</sup>。

### 参考文献

- Eugene B. The management of heart failure: the past, the present, and the future[J]. *Circ Heart Fail*, 2008, 1:58 - 62
- Korewicki J. Cardiac transplantation is still the method of choice in the treatment of patients with severe heart failure[J]. *Cardiol J*, 2009, 16(6):493 - 499
- Liu H, Liu L, Liu K, et al. Reduced cytotoxic function of effector CD8 + T cells is responsible for indoleamine 2,3 - dioxigenase - dependent immune suppression [J]. *J Immunol*, 2009, 183: 1022 - 1031
- Liu H, Liu L, Visner GA. Nonviral gene delivery with indoleamine 2,3 - dioxigenase targeting pulmonary endothelium protects against ischemia - reperfusion injury[J]. *American Journal of Transplantation*, 2007, 7: 2291 - 2300
- Liu H, Visner GA. Applications of sleeping beauty transposons for nonviral gene therapy[J]. *IUBMB Life*, 2007, 59(6): 374 - 379
- 肖永光,黄杰,毛志福,等. 维拉帕米抑制大鼠心脏异位移植术后冠状血管内膜增厚[J]. *中华器官移植杂志*, 2005, 12(26):726 - 727
- Wang Y, Liu H, McKenzie G, et al. Kynurenine is an endothelium - derived relaxing factor produced during inflammation [J]. *Nat Med*, 2010, 16(3):279 - 285
- Galie N, Brundage BH, Ghofrani HA, et al. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension [J]. *Circulation*, 2009, 119(22): 2894 - 2903
- Hara Y, Sassi Y, Guibert C, et al. Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(7):2888 - 2897
- Cho SG, Du Q, Huang S, et al. Drp1 dephosphorylation in ATP depletion - induced Mitochondrial injury and tubular cell apoptosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 299(1):F199 - 206

(收稿日期:2013 - 04 - 08)

(修回日期:2013 - 04 - 15)