

文章编号 :1671-7554(2005)02-0170-02

川芎醇抗心脏移植急性排斥反应的实验研究

张昌来¹, 张祥玉², 赵清军², 宋惠民¹, 邵 军³, 吕立红³, 尹金岭³

(1.山东大学齐鲁医院心外科,山东 济南 250012; 2.章丘市人民医院麻醉科,山东 章丘 250200,

3.山东大学医学院普外科实验室,山东 济南 250012)

[关键词] 川芎醇;心脏移植;移植物排斥;免疫抑制

[中图分类号] 622.49 [文献标识码] B

川芎可用于移植物抗排斥反应^[1]。川芎生物碱的主要成分是川芎嗪,川芎醇是川芎嗪在体内的主要代谢产物^[2],具有与川芎嗪相似的药理活性。本文研究了川芎醇对大鼠心脏移植模型的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 川芎醇的制备 川芎醇由山东大学药学院药物化学研究所合成,由川芎嗪经双氧水氧化、醋酐酰化、水解制得,其化学结构由元素分析、红外光谱、核磁共振和质谱分析所证实^[3]。川芎嗪,石家庄制药厂生产(批号:0010206012)。

1.1.2 大鼠心脏移植模型的建立 受者为健康雄性SD大鼠,体重200~250 g;供者为健康雄性Wistar大鼠,体重160~200 g,均购自河北医科大学动物实验中心,在通风、温度、湿度适宜的动物室内饲养。采用文献^[4]的套管法建立大鼠颈部异位移植模型。

1.1.3 试剂 ELISA试剂盒购自深圳晶美公司;小鼠抗大鼠CD3、CD4、CD8单克隆抗体购自英国Seropec公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 移植大鼠分4组,每组20只,术前1 d按分组要求插管灌胃给药,至观察终点。①对照组 灌等量蒸馏水;②川芎醇小剂量组:川芎醇 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃;③川芎醇大剂量组:川芎醇 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃;④环孢素A(CsA)组 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃。术后第7天,每组取材10只,另10只观察存活天数。另设空白对照组(正常SD大鼠10只),相同条件下饲养7 d后取材。

1.2.2 移植心搏动强度观察 术后每天颈部触

诊,判定移植心搏动强度。将移植心搏动强度分为5级:I级:移植心无搏动;II级:移植心有微弱搏动;III级:移植心搏动弱,需稍用力方可触及;IV级:移植心搏动较强,轻触颈部即可触及;V级:移植心搏动强,肉眼可见心脏搏动。

1.2.3 取材 术后第7天,采血2 ml,其中1 ml以乙二胺四乙酸抗凝,即刻用流式细胞仪检查;另1 ml离心,取血清, $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。取移植心,用10%甲醛固定,送病理检查。

1.2.4 血清细胞因子测定 用双抗体夹心法(ELISA法)测定外周血白细胞介素2(IL-2)和干扰素 γ (IFN- γ)的含量。用Multiskan exprimary EIAV.2.1-0型酶标仪测定450 nm处的吸光度值,制作标准曲线,确定上述各指标含量。

1.2.5 外周血淋巴细胞亚群测定 用Becton Dickinson FACSsort流式细胞仪获取 10^4 个细胞,CELLQuestVersion3.3软件分析CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞百分比和CD4⁺/CD8⁺比值。

1.2.6 病理学检查 移植心石蜡包埋切片,HE染色,光镜观察。

1.3 统计学处理 所得数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。移植心搏动级别采用非参数检验中多个样本间两两比较的秩和检验,其余各指标采用多个样本均数间两两比较的方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 移植心搏动情况 移植术后第7天,川芎醇大剂量组及CsA组移植心的搏动强度均为V级。川芎醇小剂量组3只为IV级,7只为V级。对照组7只为I级,3只为II级。3个用药组间移植心搏动强度的差异无统计学意义,但均明显优于

照组($P<0.01$)。

2.2 移植心存活天数 川芎醇大剂量组、川芎醇小剂量组、CsA 组及对对照组移植心的存活时间分别为 (28.0 ± 0.00)、(14.45 ± 4.85)、(28.0 ± 0.00)及 (6.05 ± 0.76)d,3 个用药组的存活时间均较对照组显著延长($P<0.01$)。

2.3 血清细胞因子测定 血清 IL-2 及 IFN- γ 水平川芎醇大、小剂量组显著低于对照组,甚至低于正常水平,见表 1。

表 1 各组心脏移植后血清 IL-2 及 IFN- γ 水平
($\bar{x}\pm s$ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

| 组别 | n | IL-2* | IFN- γ |
|---------|----|--------------|-------------------------------|
| 空白对照组 | 10 | 596 \pm 16 | 260 \pm 15 $\Delta\Delta$ |
| 对照组 | 10 | 863 \pm 21 | 349 \pm 26** $\Delta\Delta$ |
| 川芎醇小剂量组 | 10 | 520 \pm 21 | 71 \pm 13** |
| 川芎醇大剂量组 | 10 | 546 \pm 15 | 56 \pm 9** $\Delta\Delta$ |
| CsA 组 | 10 | 618 \pm 12 | 246 \pm 19** $\Delta\Delta$ |

* $P<0.05$ 组间比较; ** $P<0.01$ 组间比较; $\Delta\Delta P<0.01$ 组间比较

2.4 外周血淋巴细胞亚群测定 对照组 CD3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ 细胞百分比和 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 比值较空白对照组升高,川芎醇大、小剂量组及 CsA 组上述指标的升高均受抑制,见表 2。

2.5 术后第 7 天移植心病理学检查 对照组移植心肿胀,质硬色暗,间质水肿出血,弥漫性炎性细胞浸润,大量心肌细胞坏死、溶解,横纹不清。CsA 组移植心色红质软,外膜下、细胞间局灶性水肿,炎性细胞浸润,肌细胞结构完整。川芎醇小剂量组移植心质软色红,局部灰白,外膜下、细胞间局灶性水肿,炎性细胞浸润,散在心肌细胞溶解。川芎醇大剂量组移植心色红质软,个别移植心右心局部灰白,搏动减弱,外膜下、细胞间局灶性水肿,炎性细胞浸润,个别移植心右室可见灶状散在的心肌细胞变性坏死。

表 2 外周血 CD3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ 细胞百分比及 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 比值($\bar{x}\pm s$ %)

| 组别 | n | CD3 $^{+}$ | CD4 $^{+}$ | CD8 $^{+}$ | CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ |
|---------|----|---------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| 空白对照组 | 10 | 0.410 \pm 0.016 | 0.255 \pm 0.011 $\Delta\Delta$ | 0.153 \pm 0.012 | 1.6 \pm 0.11 |
| 对照组 | 10 | 0.552 \pm 0.025** | 0.369 \pm 0.018 | 0.180 \pm 0.014 | 1.9 \pm 0.17 $\Delta\Delta$ |
| 川芎醇小剂量组 | 10 | 0.445 \pm 0.027** | 0.282 \pm 0.016 $\Delta\Delta$ | 0.159 \pm 0.013 | 1.7 \pm 0.11 $\Delta\Delta$ |
| 川芎醇大剂量组 | 10 | 0.415 \pm 0.014** | 0.254 \pm 0.012 $\Delta\Delta$ | 0.157 \pm 0.010 | 1.5 \pm 0.15 $\Delta\Delta$ |
| CsA 组 | 10 | 0.341 \pm 0.032** | 0.197 \pm 0.020 $\Delta\Delta$ | 0.140 \pm 0.011 | 1.3 \pm 0.10 $\Delta\Delta$ |

** $P<0.01$ 组间两两比较; $\Delta\Delta P<0.01$ vs 对照组; $\Delta P<0.01$ 组间两两比较

3 讨论

中药川芎具有活血化淤,行气定痛之功效。川芎醇具有扩张小动脉和小静脉,抗血小板凝集,改善微循环,抑制血管平滑肌增殖及保护氧化损伤的血管内皮细胞等药理活性^[5,6]。对移植模型,川芎具有保护移植物,延长其存活的作用,因此,川芎醇可能存在免疫抑制或诱导耐受的作用。

本研究观察了川芎醇对大鼠心脏移植模型的保护作用,结果表明,川芎醇大、小剂量组均可显著延长移植心存活时间,减轻病理损害,大剂量组的作用更为显著,与 CsA 组作用相当,表明川芎醇合成物具有明显的抑制排斥反应的作用。

IL-2 及 IFN- γ 是参与急性排斥反应的重要的细胞因子,主要促进细胞免疫应答。IL-2 诱发 T 细胞增殖、活化,生成细胞毒性 T 细胞,攻击破坏移植物,产生排斥反应。IFN- γ 能直接促进 T、B 淋巴细胞分化和毒性淋巴细胞(CTL)成熟。同种器官移植后,受体外周血中以 T 辅助淋巴细胞为主的淋巴细胞大量增殖分化,CD3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 淋巴细胞百分比升高,CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 比值升高。

本研究表明,大小剂量的川芎醇均可显著降低外周血中 IL-2 及 IFN- γ 含量,甚至使其远低于正常水平。川芎醇大、小剂量组均可降低外周血 CD3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ 细胞及 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 比值,表明川芎醇在体内可有效抑制淋巴细胞增殖,且对 CD4 $^{+}$ 的 T 辅助淋巴细胞的抑制更为显著。这种抑制增殖作用,可能与其降低外周血中上述细胞因子水平有关。川芎醇大剂量组与小剂量组相比,移植心存活时间显著延长,但其病理损害的差异并不显著,本研究结果尚不能解释这一现象,尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 王学,沈文律,杜成友,等.川芎抗异品系兔甲状腺组织移植排斥反应的应用[J].中华实验外科杂志, 1995, 12(6):342~343.
- [2] 刘新泳,葛尉颖,张君仁,等.川芎嗪体内代谢产物的合成[J].山东医科大学学报, 1997, 35:180~183.
- [3] Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications[J]. Am Cardiol, 2002, 90(10C):40~48.

(下转第 177 页)

待局部感染控制后再手术,然而感染消除的同时一方面会造成颈部间隙的广泛粘连,使手术时解剖层次不清,增加了手术的难度和风险,淋巴结和颈部重要的解剖结构如颈动静脉、喉返神经、副神经、舌下神经等发生粘连,使手术时对这些结构的暴露和解剖难度加大,导致误伤,手术后会遗留相应的并发症和后遗症,粘连严重者可能造成肿瘤无法彻底切除;另一方面,消除感染需要时间,对于恶性肿瘤患者,有可能失去手术的最好时机,导致肿瘤的转移和远处扩散,使患者失去治疗机会。

3.4 对于此类诊断明确的患者我们主张在积极做好术前准备的同时采取手术治疗:①合理术前准备及用药,如发热患者术前不用阿托品,应用物理降温,体温在 38.5°C 以上的患者,在抗生素治疗的情况下静脉滴注地塞米松,以减轻周身中毒情况,降低体温,减轻炎症反应和手术反应,使生命体征处于较为平稳的状态;②术中注意体温的变化,密切检测血压和脉搏,防止发热时大量出汗导致的体液丢失,有效循环血量不足,在手术操作时

严格遵循无菌技术原则,熟练而规范,多使用锐性分离,动作轻柔,避免挤压肿块,以防止肿瘤细胞种植和尽量减少组织损伤。我们在手术中看到部分患者的颈部间隙出现感染坏死物质的浸润,胸锁乳突肌内侧面粗糙、发白,但是淋巴结和周围结构粘连较轻、间隙清楚,比较容易分离;手术结束时用甲硝唑彻底冲洗术腔,严密止血,并放置负压引流;③术后:加强引流,应用抗生素至患者体温、白细胞完全正常 $3\sim 5\text{d}$ 止,同时重视患者的营养状况,提高机体的抵抗力,注意水电解质平衡。

[参考文献]

- [1] 罗德红,石木兰,徐震钢,等.颈部转移性淋巴结的CT、B超扫描与病理研究[J].中华放射学杂志,1997,31(9):608~613.
- [2] 李树玲.新编头颈肿瘤学[M].北京:北京科学技术出版社,2002,85.

[收稿日期 2004-04-12]

(编辑:高淑桂)

(上接第171页)

- [4] Qi Z, Riesbeck K, Ostraat O, et al. Single dose anti- CD_4 monoclonal antibody for induction of tolerance to cardiac allograft in high-and low-responder rat strain combinations[J]. Transpl Immunol, 1997, 5(3): 204~211.
- [5] 吴国新,呈锦昌.四甲基吡嗪对犬体循环中血小板及动

脉血栓形成的抑制作用[J].中国药理学报,1992,13: 330~335.

- [6] 林蓉,刘俊田,李旭,等.川芎嗪对血管内皮细胞损伤的保护作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2000,14: 425~428.

[收稿日期 2004-06-15]

(编辑:高淑桂)