文章编号:1000-5404(2005)17-1773-03

论著

草麻黄中补体抑制成分抑制大鼠异种心脏移植超急性排斥反应的实验研究

李 军[1],杨 康[1],白 云[2],吴 蔚[1],熊 刚[1] (第三军医大学:[1]西南医院胸心外科,[2]基础医学部分子遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 初步探讨草麻黄中补体抑制成分(complement inhibiting component, CIC)对异种心脏移植超急性排斥反应的作用。**方法** 按是否给予CIC灌胃处理,将动物模型分为对照组和实验组,观察对照组和实验组术后供心存活时间,在术后早期及供心失活时取两组心脏组织行光镜、电镜病理检查,并在术后固定时间分别抽鼠血行血清学检查,用微量法测定CH_{50}、APH_{50},用透射比浊法测定C_3。**结果** 实验组移植心脏存活时间为(51.00±3.46)min,与对照组(30.30±3.46)min比较差异极显著($P<0.01$)。**结论** 豚鼠至大鼠异种心脏移植后,补体的经典途径和替代途径均被激活。CIC能明显抑制补体活性,延缓超急性排斥反应的发生,从而使移植心脏的存活时间延长。

关键词:异种心脏移植;超急性排斥反应;补体;补体抑制剂;草麻黄
中图法分类号:R282.71;R617;R654.2 **文献标识码**:A

Ephedra sinica in preventing hyperacute rejection in guinea pig-to-rat cardiac xenotransplantation

LI Jun[1], YANG Kang[1], BAI Yun[2], WU Wei[1], XIONG Gang[1] ([1] Department of Cardiothoracic Surgery, Southwest Hospital, [2]Department of Molecular Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study Ephedra sinica in preventing hyperacute rejection in guinea pig-to-rat cardiac xenotransplantation. **Methods** The recipient rats were divided into two groups: control group and experiment group, according to whether administrated complement inhibiting component (CIC) from Ephedra sinica. In 15 min after operation, 4 rats from control group and 4 from experiment group were sacrificed to detect the pathologic changes in cardiac tissues. The complement parameters including CH_{50}, APH_{50}, and C_3 were determined during the period of 0, 10, 15, 30, 45 min in serial serum. **Results** The survival time was significantly prolonged and pathological changes were less in experiment group than that in control group. **Conclusion** The study reveals that both classical pathway and alternative pathway of complement activation can be induced by xenotransplantation and Ephedra sinica can prolong the xenograft time by inhibiting complement activities and postposing hyperacute rejection.

Key words: cardiac xenotransplantation; hyperacute rejection; complement; complement inhibiting agent; Ephedra sinica

异种器官移植的主要障碍是超急性排斥反应,其中补体起关键作用,阻断补体活性及抑制补体激活是克服超级性排斥反应的关键。Ling等[1]从草麻黄中纯化出一单体成分(complement inhibiting component, CIC),初步鉴定为高分子碳水化合物,该成分在体外具有良好的补体抑制活性。本实验在已建立的豚鼠至大鼠异种异位心脏移植的动物模型上应用草麻黄中的补体抑制成分CIC,观察CIC对异种心脏移植超急性排斥反应的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康15个月三色豚鼠30只,雄性,体质量约300~400 g;健康15个月Wistar大鼠30只,雄性,体质量约250~350 g,均购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 主要药品

硅胶GF254(青岛海洋华工厂);绵羊红细胞(第三军医大学实验动物中心);溶血素(第三军医大学全军免疫学研究所);兔红细胞(第三军医大学实验动物中心);C_3检测试剂盒(Sigma公司);兔抗鼠C_3(Sigma公司);生物素标记羊抗兔Ig(Sigma公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 豚鼠至大鼠腹腔内异位心脏移植模型的建立 采用

基金项目:国家医药技术创新博士基金资助项目(969010665)
Supported by the National Research Foundation for Innovation Projects of Doctors (969010665)
作者简介:李 军(1973-),男,云南省蒙自县人,硕士,主治医师,主要从事心脏移植的基础和临床方面的研究。电话:(023)68765330
通讯作者:杨 康,E-mail:ykang39@yahoo.com.cn
收稿日期:2004-10-02;修回日期:2005-04-18

改良 Ono 氏术[2]建立豚鼠至大鼠腹腔内异位心脏移植模型，观察供心存活时间。

1.3.2 草麻黄中补体抑制成分 CIC 的提纯及活性鉴定 参照文献[3]进行。

1.3.3 大鼠口服 CIC 后补体抑制活性检测

1.3.3.1 动物分组和处理 按是否给予 CIC 灌胃处理，将动物模型随机分为对照组(15 只)和实验组(15 只)。对照组：受体鼠术前 3 天口腔灌注生理盐水 1 ml/只，1 次/d，连续 3 d。实验组，受体鼠术前 3 天口腔灌注 CIC 12 mg/kg 体质量，1 次/d，连续 3 d。

1.3.3.2 检测指标及方法 观察对照组和实验组术后供心存活时间；实验组心脏移植后 15 min 各取 4 只移植心脏作病理检查，其余所有动物移植心脏停止跳动时，取出移植心作病理检查；分别于移植后 0、10、15、30、45 min 分别抽鼠血行血清学检查，微量法测定 CH_{50}、APH_{50}，透射比浊法测定 C_3；分别于移植后 0、10、15、30、45min 及供心失活时取两组心脏组织用 SABC 法作 C_3 免疫组化检查。

1.4 统计处理

采用 SPSS 11.0 统计包行统计学分析。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 t 检验。

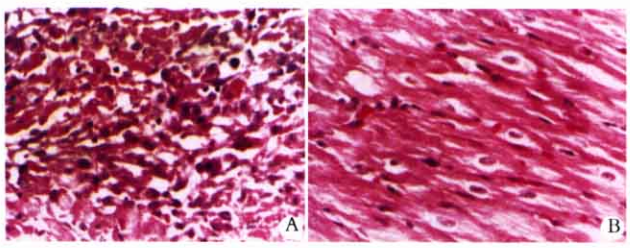
2 结果

2.1 CIC 对移植心脏存活时间及受体的影响

全部心脏移植手术均获成功，各组移植心脏恢复血流灌注后迅速充盈，颜色红润，弹性好，心脏搏动良好。实验组移植心脏存活时间为(51.00 ± 3.46) min，与对照组(30.30 ± 2.52) min 比较，差异极显著($P<0.01$)。

2.2 病理检查

2.2.1 光镜检查 对照组：移植后 15 min，移植心脏心肌间质出血水肿严重，量多且范围广；有淋巴细胞和单核细胞浸润；部分心肌细胞有凝固性坏死表现，可见冠状小血管及部分中型静脉内有血栓形成，管周水肿明显，管腔内淤血，见图 1A。实验组：移植后 15 min，移植心脏心肌间质出血水肿，出血量及范围较对照组轻，心肌坏死亦少于对照组，可见心肌细胞水肿空泡变性，亦有炎性细胞浸润；有血管内淤血和血栓形成，见图 1B。



A: Control; B: Experiment

图 1 移植后 15 min 心肌细胞 (HE ×400)

Fig 1 Edema and inflammatory infiltration in myocardium cells in 15 min after heart transplantation (HE ×400)

2.2.2 电镜检查 对照组：心肌细胞肿胀明显，有多处肌纤维断裂、溶解，肌纤维间有大量脂滴沉着；线粒体数量明显减少，外形极度不规则，部分呈梭形或哑铃形，嵴消失呈空泡状，未见有糖原颗粒，部分心肌细胞核溶解破裂，有毛细血管淤血，管壁空泡样变性，管周可见淋巴细胞、单核细胞。实验组：心肌细胞肿胀明显，部分肌纤维断裂，间质水肿出血；线粒体数量变化不明显，但外形肿胀明显，有空泡变性及部分嵴消失，胞核核孔增大，少量核变形。

2.3 血清学检查

2.3.1 移植后补体经典途径活性(CH_{50})和替代途径活性(APH_{50})的动态变化 CH_{50} 和 APH_{50} 分别反映了血清中补体经典途径和替代途径的总活性。心脏移植后，对照组在移植后 30min 内 CH_{50} 和 APH_{50} 呈显著下降趋势，直至供心失活终止观察($P<0.01$)。实验组由于移植前 CH_{50} 和 APH_{50} 已下降至较低水平，故在移植后 15 min 内下降不显著($P>0.05$)，在移植后 30min 时呈显著下降趋势($P<0.05$)，45 min 时下降极显著，$P<0.01$，见表 1，2。

表 1 心脏移植后血清 CH_{50} 的动态变化($\bar{x} \pm s$, $n=15$, U/ml)

Tab 1 Serum CH_{50} changes of rat transplanted heart at different time($\bar{x} \pm s$, $n=15$, U/ml)

Group	After transplantion				
	0 min	10 min	15 min	30 min	45 min
Control	89.7 ±6.1	58.4 ±4.2▲	55.7 ±5.8▲	47.3 ±4.8▲	-
Experiment	40.1 ±4.5	40.0 ±3.2	39.2 ±7.1	38.2 ±5.0☆	30.5 ±6.2▲

☆: $P<0.05$, ▲: $P<0.01$, *vs* 0 min

表 2 心脏移植后血清 APH_{50} 的动态变化($\bar{x} \pm s$, $n=15$, U/ml)

Tab 2 Serum APH_{50} changes of rat transplanted heart at different time($\bar{x} \pm s$, $n=15$, U/ml)

Group	After transplantion				
	0 min	10 min	15 min	30 min	45 min
Control	127.0 ±8.3	101.5 ±6.7▲	84.2 ±10.8▲	73.2 ±4.6▲	-
Experiment	63.3 ±5.3	63.3 ±5.3	62.1 ±4.6	61.1 ±5.7☆	51.0 ±7.3▲

☆: $P<0.05$, ▲: $P<0.01$, *vs* 0 min

2.3.2 受体血清 C_3 变化 心脏移植后，对照组在移植后 30 min 内 C_3 呈显著下降趋势，直至供心失活终止观察($P<0.01$)。而实验组在移植后 15 min 内 C_3 下降不显著，$P>0.05$，在移植后 30 min 时 C_3 显著下降($P<0.05$)，45 min 时下降极显著($P<0.01$)，见表 3。

表 3 心脏移植后血清 C_3 的动态变化($\bar{x} \pm s$, $n=15$, U/ml)

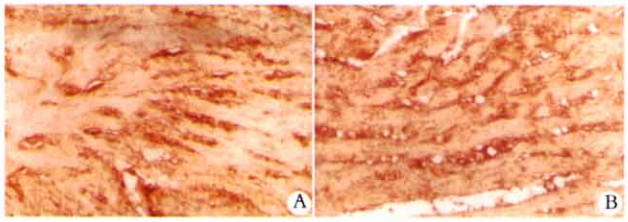
Tab 3 Serum C_3 changes of rat transplanted heart at different time($\bar{x} \pm s$, $n=15$, U/ml)

Group	After transplantion				
	0 min	10 min	15 min	30 min	45 min
Control	127.0 ±8.3	101.5 ±6.7▲	84.2 ±10.8▲	73.2 ±4.6▲	-
Experiment	63.3 ±5.3	63.3 ±5.3	62.1 ±4.6	61.1 ±5.7☆	51.0 ±7.3▲

☆: $P<0.05$, ▲: $P<0.01$, *vs* 0 min

2.4　免疫组织化学检查

在移植后 15 min，对照组大鼠心脏切片免疫组织化学检查表明，补体 C_3 广泛附着于心脏血管内皮细胞膜，见图 2A。而在实验组仅有微量 C_3 附着，见图 2B。



A：Control；B：Experiment

图 2　移植后 15min，免疫组化检查 C_3 沿血管内皮细胞膜的沉积（SABC×400）

Fig 2　C_3 aggraded along the endothelial membrane in 15 min after heart transplantation（SABC×400）

3　讨论

豚鼠至大鼠器官移植属于非协调性异种器官移植，当血管通路建立后超急性排斥反应是首当其冲的最主要的排斥反应，常常使移植器官在十几分钟内丧失功能。其中补体起关键作用，因此用何种方法抑制补体激活为抗超急性排斥反应首要考虑的问题，亦是多年研究热点之一[4,5]。

目前国内外有关补体抑制剂的研制主要涉及补体调节蛋白、补体成分的抗体、人工合成化合物及植物提取成分等[6]。其中，由于从中药或动植物中分离补体抑制剂的成本低廉、方法简便而备受制药业的关注。草麻黄在我国分布广泛，廉价易得，是中药方剂的常用药材。Ling 等[1]从草麻黄中纯化出一单体成分 CIC，初步鉴定为高分子碳水化合物（$>100\times10^3$），不溶于碱，溶于酸，并证实该成分在体外具有良好的补体抑制活性，其对补体激活的经典途径、替代途径及终末途径均有抑制作用。Ling 等[1]在体外实验中提出 CIC 通过与补体蛋白 C_2 的活性部位结合从而抑制补体激活的经典途径，且此结合为不可逆的；其次通过抑制补体蛋白 C_9 的活化而抑制终末途径激活补体；CIC 对替代途径激活补体的抑制机制尚不明确，有可能是通过抑制 B 因子的活性而发挥作用。

本研究以从草麻黄水抽提物中获得的单体成分 CIC 应用于豚鼠至大鼠异种心脏移植模型，动物实验研究表明，CIC 纯化产物在体内对经典途径和替代途径均有良好的抑制作用，延缓了超急性排斥反应的发生。CIC 纯化产物在体内实验结果提示两种可能：一是 CIC 通过对后段成分单一靶点的作用实现其对补体双途径的抑制；二是在经典途径和替代途径中均存在作用靶点。良好的补体抑制功能为探讨其在异种心脏移植动物模型中治疗作用提供了进一步研究的基础。

动物实验研究表明，移植前受体血清补体 CH_{50}、APH_{50} 已下降至较低水平，从而抑制了补体激活，延缓了超急性排斥反应的发生，使移植心脏存活时间，从平均 30 min 延长到平均 50 min。实验对照组、实验组移植心脏存活时间差异有统计学意义，但实验组移植心脏未有超过 1 h 存活者。根据 CIC 对大鼠体内补体活性抑制实验进一步证明 CIC 纯化产物在体内对经典途径和替代途径均有良好的抑制作用，具体量效关系确立依据有待进一步进行药物的性质及药代动力学研究后明确。在超急性排斥反应中，抑制补体激活虽然是最主要和最有效的治疗目标，但单纯抑制补体活性并不足以使移植器官存活时间显著延长，还需通过综合手段如脾切除、血浆置换、器官灌注等来去除天然抗体，以及使用抗 B 细胞的免疫抑制剂对补体以外的抗体进行处理。其次，补体激活是一个多环节的级联反应过程，其中任何一个环节受阻均可抑制其活化，减少活性片段产生，减轻炎性损伤。因此，从理论上讲补体系统为我们提供途径的过程，而且在不同活化阶段产生的裂解片段具有不同的生物活性，单一途径或单一靶点的抑制不能消除其他活性片段的作用。所以，最终治疗补体介导的疾病可能有赖于针对多途径、多靶点的、综合治疗方案。

参考文献：

[1] Ling M, Piddlesden S, Morgan B. A component of the medicinal herb ephedra blocks activation in classical and alternative pathways of complement[J]. Clin Exp Immunol, 1995, 102 (3): 582 - 588.

[2] Oberholzer J, Yu D, Triponez F, *et al*. Decomplementation with cobra venom factor prolongs survival of xenografted islets in a rat to mouse model [J]. Immunology, 1999, 97(1): 173 - 180.

[3] 杨　康，刘维永，白　云，等. 草麻黄中补体抑制成分的纯化和活性[J]. 第四军医大学学报，2000，21(12)：1558 - 1560.

[4] Niemann H, Verhoeyen E, Wonigeit K, *et al*. Cytomegalovirus early promoter induced expression of hCD59 in porcine organs provides protection against hyperacute rejection[J]. Transplantation, 2001, 72 (12): 1898 - 1906.

[5] Chen G, Wang X M, Sun Q Y, *et al*. Prevention of hyperacute rejection of pig-to-monkey cardiac xenografts by Chinese cobra venom factor [J]. Transplant Proc, 2001, 33(7-8): 3857 - 3858.

[6] Meyer zu Vilsendorf A, Link C, Jorns A, *et al*. Preconditioning with the prostacyclin analog epoprostenol and cobra venom factor prevents reperfusion injury and hyperacute rejection in discordant liver xenotransplantation[J]. Xenotransplantation, 2001, 8(1): 41 - 47.

（编辑　周　芳）