基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0294-04

益生注射液抗大鼠移植心慢性失功加快模型的实验研究

李 明[1],严律南[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016;2. 四川大学华西医院普外科,成都 610041)

【摘 要】目的:探讨中药益生注射液对大鼠移植心慢性失功(Chronic graft failure,CGF)加快模型的保护作用,为临床应用提供部分实验依据。方法:采用雌性封闭群 SD 大鼠 40 只,随机分 2 组,对照组的离体心脏用 4℃生理盐水保存 3 h 后,行心脏移植,术后不给任何药物处理,实验组的离体心脏则用含益生注射液的 4℃生理盐水保存 3 h 后,行心脏移植,术后每天腹腔注射益生注射液,剂量为 8 mg/(kg·d),连续 9 d。分别采集受体术前和术后 1、3、5、7、9 d 血液,检测丙二醛(Malondialdehyde,MDA)和超氧化物歧化酶(Super oxide dismutase,SOD)含量变化。另外,在移植术后 12 周,取 2 组移植心脏的组织学标本进行比较分析。结果:对照组和实验组心脏移植术后血浆 MDA 含量显著升高,而 SOD 活性却显著降低,术后第 1 天下降最明显。对照组与实验组相比,术前 2 组血浆的 MDA 含量和 SOD 活性相似;术后第 1 天,对照组血浆 MDA 含量升高,并明显高于实验组 45.27 ± 6.48 与 32.78 ± 6.61,$P<0.05$,而 SOD 活性下降,并明显低于实验组 529.77 ± 46.31 与 663.33 ± 45.92,$P<0.05$;此后,2 组的血浆 MDA 含量和 SOD 活性逐渐恢复到正常,但对照组恢复较慢,术后第 9 天才接近正常,实验组恢复较快,术后第 5 天已恢复正常。对 2 组移植心脏的组织学标本进行比较,移植后 12 周,实验组与对照组相比,移植心慢性排斥程度明显减轻(2.20 ± 0.40 与 3.6 ± 0.48,$F=100.41$,$P<0.000\,1$),心肌间质纤维化程度也减轻(1.00 ± 0.32 与 1.60 ± 0.48,$F=21.63$,$P<0.000\,1$)。结论:在缺血再灌注损伤(Ischemia reperfusion injury,I/R)诱导的 CGF 加快模型中,益生注射液对移植心的 I/R 损伤有保护作用,并能减轻其慢性失功的进程。

【关键词】益生注射液;缺血再灌注损伤;大鼠;移植物慢性失功

【中国图书分类法分类号】R657.3 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-05-15

Experimental study on Yisheng injection for a novel accelerated rat cardiac graft failure model induced by ischemia/reperfusion injury

LI Ming, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate whether the traditional chinese medicine Yisheng injection can reduce the progress of a novel accelerated rat cardiac graft failure model induced by ischemia/reperfusion injury. *Methods*: 40 female closed colony SD rats were divided into two groups at random. In the control group, the isolated rat hearts were preserved in 0.9% sodium chlorine solution at 4℃ for 3 hours before transplantation, while in the experimental group, the hearts were preserved in 0.9% sodium chlorine solution containing Yisheng injection 0.5 mg/ml at 4℃ for 3 hours before transplantation. After transplantation, the experimental group recipients were treated with Yisheng injection 8 mg/(kg·d) for 9 days.The specimens of blood were harvested from recipients before transplantation and on 1, 3, 5,7,9 day after transplantation.The changes of MDA and SOD were observed in two groups. Grafts were excised at 12 weeks after transplantation to assess the graft vasculopathy and interstitial fibrosis using HE and Masson staining for two groups. *Results*:The MDA and SOD of two groups were similar before transplantation. However, the MDA of the two groups increased and the SOD of two groups decreased, especially the first day after transplantation, but it was more significant in the control group. Then, The MDA and SOD of the two groups recovered to normal gradually, but the experimental group recovered to normal on the 5 day after transplantation, faster than the control group, which recovered to normal on the 9 day after transplantation. By 12 weeks, compare the changes of histology of the grafts of the two groups, grafts vasculopathy and interstitial fibrosis were decreased significantly in experimental group. *Conclusion*: It demonstrated that Yisheng injection can decrease ischemia/reperfusion injury and reduce the development of rat cardiac chronic graft failure in a novel accelerated rat cardiac graft failure model induced by ischemia/reperfusion injury.

【Key words】Yisheng injection; ischemia/reperfusion injury; closed colony SD rat; chronic graft failure

作者介绍:李 明(1973-),男,主治医师,讲师,博士,

研究方向:肝胆外科及器官移植。

通信作者:严律南,男,教授,Email: YanLunan@hotmail.com。

随着近年来组织配型、器官保存、外科手术及临床与实验诊断技术的不断提高，尤其是强有力的免疫抑制剂的合理应用，急性排斥反应的发生已能得到良好的控制，移植物近期存活率不断提高。但远期效果仍不甚理想，半寿期提高不明显[1]。影响移植物长期存活的因素中最重要的就是慢性排斥(Chronic rejection，CR)[2,3]。CR，更确切地说应为移植物慢性失功能(Chronic graft failure，CGF)[4]。在其治疗上，应采取以预防为主，如尽量减少缺血再灌注损伤、有效控制急性排斥反应等。我们前期已研究发现中药益生注射液有抗 CGF 的作用[5-7]。本实验采用缺血再灌注损伤(Ischemia rep erfusion injury，I/R)诱导的大鼠移植心慢性失功加快模型[8]，并用益生注射液进行离体心脏的冷保存和心脏移植后的早期治疗，了解该药对离体心脏的 IR 是否具有保护作用，以及是否能延缓 CGF 的发展。旨在验证以前的研究结果，并为临床器官保存中和器官移植后应用该药提供部分实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性封闭群 Sprague Dawley 大鼠（简称 SD 大鼠)40 只，2~3 月龄，体重(220 ± 20) g，均购自华西医科大学实验动物中心。

1.2 主要药品与试剂

益生注射液(规格 20 mg/ml，批号 990705，成都市药物制剂研究所提供)；丙二醛(Malondialdehyde，MDA)测定试剂盒：100 人份购自南京建成公司；超氧化物歧化酶(Super oxide dismutase，SOD)测定试剂盒：100 人份购自南京建成公司。

1.3 器械及检测仪器

显微外科手术器械(上海手术器械厂 SSW-3 手术显微外科器械)；UV-1601PC 紫外分光光度仪(日本岛津)；Mias-2000 图像分析仪。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 采用 I/R 诱导的大鼠 CGF 加快模型，将 SD 大鼠随机分为 2 组，每组 20 只，对照组(生理盐水组)和实验组(益生注射液组)。2 组供心的保存液、强化冷缺血时间、术后药物治疗及观察时间(见表 1)，实验过程中受体无死亡。

1.4.2 保存液及冷缺血方法 供心切取时，对照组供心用 4℃肝素生理盐水(肝素浓度为 50 U/ml)进行灌注降温，而实验组供心用 4℃含益生注射液的肝素生理盐水进行灌注降温(益生浓度为 0.5 mg/ml，肝素浓度同对照组)；供心取下后，对照组置于 4℃生理盐水中保存，而实验组供心置于 4℃含益生注射液的生理盐水(益生浓度为 0.5 mg/ml)中保存；2 组均在冷保存 3 h 后，进行心脏移植。

1.4.3 手术方法 大鼠心脏移植采用改良的 Ono 氏术式[9]，即将供心异位移植于受体腹腔内，供心主动脉升支与受体腹主动脉行端侧吻合，供心主肺动脉与受体下腔静脉行端侧吻合，循环开放后，供心循环途径为：受体腹主动脉→供心胸主动脉→冠状动脉→心肌→冠状静脉→右心房→右心室→肺动脉→受体下腔静脉。供心不参与血液循环，无射血功能，专供实验研究。

1.4.4 给药方法 对照组，移植术后不给任何药物处理；实验组，术后每天腹腔注射益生注射液，剂量为 8 mg/kg，连续 9 d。

1.4.5 标本留取方法

1.4.5.1 血液标本 用于检测 MDA 和 SOD。采用尾尖采血法，采血时将大鼠固定在采血盒内，露出尾巴，将鼠尾置于 45℃~50℃热水中浸泡数分钟，使尾部血管扩张。擦干鼠尾后，剪去尾尖 5~10 mm，自尾根部向尾尖按摩，血自尾尖流出，用 0.5 ml 离心管收集血液 0.5 ml，肝素抗凝，1 500 r/min，离心 10 min，留取血浆备用。分别采集受体术前和术后 1、3、5、7、9 d 血液，实验组和对照组各采 5 只。采完血后，先用冷水冲洗大鼠尾部降温，再用棉球压迫数分钟止血。

1.4.5.2 组织学标本 在设定采集标本的时间点，分别切取 2 组植入的心脏，10%中性甲醛固定液固定，脱水、石蜡包埋、做 5 μm 厚组织切片，分别作 H·E 染色和 Masson 三色染色[10]。

1.4.6 观察指标及方法

1.4.6.1 MDA 测定 采用 TBA(硫代巴比妥酸)法，利用过氧化脂质降解产物中的 MDA 可与 TBA 缩合，形成红色产物，在 532 nm 处有最大吸收峰，用 UV-1601PC(日本津岛)紫外分光光度仪在 532 nm 处检测其吸光度，利用以下公式可计算出实验组和对照组血浆样品中 MDA 含量。

$$\text{血浆中 MDA 含量} = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{标准空白管吸光度}} \times \text{标准品浓度} \times \text{样本测试前稀释倍数}$$

1.4.6.2 SOD 测定 采用黄嘌呤氧化酶法来测定 SOD 活力。即通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基，后者氧化羟胺形成亚硝酸盐，在显色剂的作用下呈现紫红色，用可见光分光光度计在 550 nm 处测其吸光度。当被测样品中含 SOD 时，则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用，使形成的亚硝酸盐减少，比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值，利用以下公式可计算出实验组和对照组血浆样品中的 SOD 活力。

$$\text{SOD 活力 NU/ml} = \frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{标对照管吸光度}} \div 50\% \times \text{稀释倍数}$$

1.4.6.3 H·E 染色和 Masson 三色染色 按照大鼠心脏移植慢性排斥反应的诊断评分标准[11]，并根据 Banff'97 肾脏移植慢性排斥诊断标准中间质纤维化的定量标准[12]，对实验组和对照组移植术后 12 周所取的组织学标本进行分析比较。

1.5 统计学方法

所得计量资料均以($\bar{x} \pm s$)表示，采用 SPSSV10.0 软件

表 1 2 组供体心脏冷保存的实验分组

组别	冷缺血时间(h)	保存液	药物处理	观察时间(周)
对照组	3	4℃生理盐水	无	12
实验组	3	4℃生理盐水 + 益生注射液	益生注射液	12

包，对术前和术后的计量资料进行配对 t 检验，术后实验组与对照组同一时间点的计量资料比较采用 t 检验，对表 3 中对照组和实验组移植心 12 周后的血管内膜增生评分和心肌间质纤维化评分，采用重复测量的方差分析，当 $P<0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血浆 MDA 和 SOD 的测定

MDA 是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸，引发脂质过氧化作用，并形成脂质过氧化物中的 1 种。脂质过氧化作用及其产物可对细胞造成损伤，因此测定 MDA 的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度，间接地反映出细胞损伤的程度。SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用，此酶能清除超氧阴离子自由基而保护细胞免受损伤。因此，测定 SOD 活力的高低可间接反映机体清除氧自由基的能力。本实验中，血浆 MDA 和 SOD 的测定结果(见表 2)。从表中可见，对照组和实验组心脏移植术后血浆 MDA 含量显著升高，而 SOD 活性却显著降低，术后第 1 天下降最明显。对照组与实验组相比，术前 2 组血浆的 MDA 含量和 SOD 活性相似；术后第 1 天，对照组血浆 MDA 含量升高，并明显高于实验组 45.27 ± 6.48 与 32.78 ± 6.61，$P<0.05$，而 SOD 活性下降，并明显低于实验组 529.77 ± 46.31 与 663.33 ± 45.92，$P<0.05$，此后，2 组的血浆 MDA 含量和 SOD 活性逐渐恢复到正常，但对照组恢复较慢，术后第 9 天才接近正常，实验组恢复较快，术后第 5 天已恢复正常。可见益生注射液对移植心的 I/R 损伤确实有保护作用，这与益生注射液的离体心冷保存实验结果一致。

2.2 组织病理学变化

按照心脏移植慢性排斥反应的诊断分级标准和移植心心肌间质纤维化的定量评分标准，对实验组和对照组的 HE 染色和 Masson 三色染色结果进行比较，结果见表 3。从表中可见，移植后 12 周，实验组与对照组相比，移植心慢性排斥程度明显减轻(2.20 ± 0.40 与 3.60 ± 0.48，$F=100.41$，$P<0.000\,1$)，心肌间质纤维化程度也减轻(1.00 ± 0.32 与 1.6 ± 0.48，$F=21.63$，$P<0.000\,1$)。说明益生注射液有抗 CGF 作用。

3 讨 论

CGF 是移植物功能长期存活的主要障碍之一，因其机理不清，到目前为止，CGF 在临床上还无满意的治疗药物。现行的治疗方案是抗急性排斥药物的超长应用[4]。由于常规的三联免疫抑制剂并不能阻止 CGF 的进程，相反会造成移植物和自身器官的药物性损害，因此，国内外都在积极研制新的免疫抑制剂，以阻止 CGF 的进程。骁悉(Mycophenolate mofetil，MMF)[13]和雷帕霉素(Papamycin)[14,15]是一类新型免疫抑制剂，具有一定的抗 CGF 作用。但这些药物或由于价格昂贵，或由于毒性作用，难以在我国临床上推广应用。我国是一个药材资

表 2 对照组和实验组大鼠心脏移植后血浆 MDA 和 SOD 的测定结果

时间	对照组(n=5)		实验组(n=5)	
	MDA(nmol/ml)	SOD(Nu/ml)	MDA(nmol/ml)	SOD(Nu/ml)
术前	18.17 ± 0.91	734.61 ± 43.37	17.53 ± 0.90	731.00 ± 43.19
术后 1 d	45.27 ± 6.48#	529.77 ± 46.31#	32.78 ± 6.61*#	663.33 ± 45.92*#
术后 3 d	40.85 ± 4.40	588.79 ± 73.48	27.40 ± 6.06*	704.52 ± 38.48*
术后 5 d	36.20 ± 4.57	621.67 ± 68.99	23.28 ± 5.84*	735.00 ± 40.26*
术后 7 d	25.89 ± 4.82	675.37 ± 71.73	17.80 ± 1.52*	783.60 ± 37.10*
术后 9 d	17.75 ± 1.31	715.22 ± 72.24	17.45 ± 1.10	729.46 ± 47.24

注：# 表示术后与术前比较 $P<0.05$；* 表示实验组与对照组同一时间点比较 $P<0.05$

表 3 对照组和实验组移植心慢性排斥的诊断分级

分组	移植后时间(周)	血管内膜增生评分	心肌间质纤维化评分
对照组	12	3.6 ± 0.48	1.6 ± 0.48
实验组	12	2.2 ± 0.40*	1.0 ± 0.32*

注：* 表示实验组与对照组比较 $P<0.05$

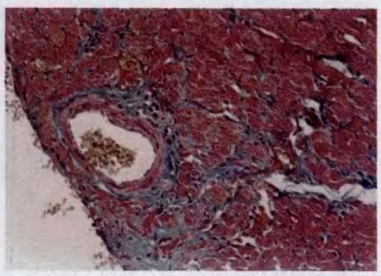


图 1 实验组心脏移植后 12 周示轻度慢性排斥反应 (Masson ×200)

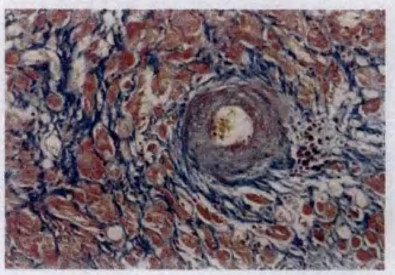


图 2 对照组心脏移植后 12 周示中度慢性排斥反应 (Masson ×200)

源十分丰富的国家,从传统中医药宝库中去探索治疗 CGF 的有效药物具有重要的现实意义。随着对 CGF 机制研究的深入,非免疫学因素对 CGF 的影响日益受到重视,通过对非免疫学因素的干预来达到预防和治疗 CGF 逐渐成为日益瞩目的研究课题。而在非免疫学因素中,最重要最早期的损伤是 I/R[8]。我们以前的实验已证实 I/R 损伤可促进 CGF 的发生和发展,因此,通过抗 I/R 损伤来延缓 CGF 无疑极具研究价值。

益生注射液是一种天然药物,含 A、B 2 种生物碱,A 成分具有免疫抑制作用,B 成分具有改善微循环、降低血小板粘附及抗脂质过氧化作用[16]。初步研究发现,在大鼠腹主动脉移植硬化加快模型中,A 成分可通过下调 TGF-β1 的表达而减缓 CGF 的发展[17]。体外实验显示,B 成分可通过保护血管内皮细胞而发挥抗 CGF 作用[18]。但对其抗 CGF 作用尚需进一步在实质性器官移植模型中加以证实,并对其机理作进一步探讨。另外,益生注射液低毒价廉,与现有免疫抑制剂有协同作用[16],若能对其抗 CGF 作用进行开发,无疑具有十分重要的社会和经济价值。

众所周知,I/R 损伤的关键介质是自由基和活性氧,它们由白细胞和内皮细胞产生,因此有人将 I/R 损伤简称为"氧自由基损伤"。本实验中,我们检测了大鼠心脏移植后,血浆 MDA 含量和 SOD 活性,结果发现:与移植前相比,对照组移植后血浆 MDA 含量显著升高,SOD 活性显著降低,移植后第 1 天最明显,第 9 天恢复正常,这说明大鼠心脏移植后发生了 I/R 损伤,这与氧自由基含量升高而清除它的酶类下降有关。实验组心脏移植后 MDA 含量也升高,SOD 活性也下降,但其变化幅度较低,而且恢复快,移植后第 5 天恢复正常。这说明益生注射液有抗脂质过氧化和保护 SOD 活性的作用。

引起 I/R 损伤的介质除氧自由基外,有研究表明,补体也介导 I/R 损伤,尽管机体有正常的限制补体攻击的内源性途径存在[19]。同样的,在 I/R 损伤中发生的血栓形成也加重移植物的损害,特别是血管结构:内皮细胞活化可导致促凝因子增加(组织因子),加上抗凝、抗血栓和抗补体调节机制的丧失[17]。以往的研究证实,益生注射液中的 B 成分可保护体外培养的人胎儿肾毛细血管内皮细胞免受缺氧再给氧损伤,并能抑制缺氧时内皮素 -1 的分泌,促进 PGI_2 的分泌[16]。在大鼠血瘀模型中,益生注射液中的 B 成分可改善微循环,降低全血粘度,抑制血小板聚集[18]。保护血管内皮细胞,以避免补体的激活,改善微循环,以抑制血栓形成,可能是益生注射液抗 I/R 损伤的其它机制。

本实验研究还发现,在 I/R 损伤诱导的 CGF 加快模型中,移植后 12 周,治疗组与对照组相比,移植心血管内膜增生和心肌间质纤维化评分均明显降低,说明益生注射液有抗 I/R损伤诱导的 CGF 加快模型的作用。

综上所述,益生注射液对 I/R 损伤诱导的 CGF 加快模型的干预可能是通过对移植心脏血管内皮细胞的保护作用来实现的。其可能的机制为:抗脂质过氧化,保护 SOD 活性,改善微循环,降低全血粘度,抑制血小板聚集,从而减轻 I/R 损伤,减少或避免内皮细胞活化,抑制炎症级联反应的发生。

参 考 文 献

[1] Chapman J R, O'Connell P J, Nankivell B J. Chronic renal allograft dysfunction[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(10): 3015-3026.

[2] 李 钺,龚建平,刘长安,等.TIMP-3 在移植物慢性排斥反应血管病变中的作用研究[J].第三军医大学学报,2007,29(12):1215-1217.

[3] 黄亚冰,刘 斌,朱 珉,等.白细胞介素 -5 在慢性排斥反应中作用机制的探讨[J].第三军医大学学报,2004,26(10):902-904.

[4] 夏穗生.临床移植医学[M].杭州:浙江科学技术出版社,1999.19.

[5] 步 宏,陈卫国,刘于宾,等.益生注射液抗大鼠腹主动脉移植硬化的实验研究[J].华西药学杂志,2000,15(3):185.

[6] 辛宇鹏,袁光亚,卢一平,等.缺血再灌注损伤致慢性移植肾肾病的发病机理及药物干预的实验研究[J].四川大学学报·医学版,2007,38(6):918-923.

[7] 辛宇鹏,卢一平,高 锐,等.益生注射液延缓大鼠慢性移植肾肾病的进程[J].中华器官移植杂志,2005,26(3):171-174.

[8] 李 明,李幼平,严律南.大鼠移植心慢性失功加快模型的建立[J].重庆医科大学学报,2006,31(1):58-62.

[9] Ono K, Lindesey E S. Improved technique of heart transplantation in rats[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1969, 57(2): 225-229.

[10] 许良中.实用肿瘤病理方法学[M].上海:上海医科大学出版社,1997.108.

[11] Knight R J, Dikman S, Liu H, et al. Cold ischemic injury accelerates the progression to chronic rejection in a rat cardiac allograft model[J]. Tranplantation, 1997, 64(8): 1102-1107.

[12] Solez K, Benediktsson H, Cavallo T, et al. Report of the third Banff conference on allograft pathology (July 20-24, 1995) on classification and lesion scoring in renal allograft pathology[J]. Transplant Proc, 1996, 28(1): 441-444.

[13] Allison A C, Eugui E M. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection[J]. Transplantation, 2005, 80(2s): 181-190.

[14] Jolicoeur E M, Qi S, Xu D, et al. Combination therapy of mycophenolate mofetil and rapamycin in prevention of chronic renal allograft rejection in the rat[J]. Transplantation, 2003, 75(1): 54-59.

[15] Azuma H, Binder J, Heemann U, et al. Effects of RS61443 on functional and morphological changes in chronically rejecting rat kidney allografts[J]. Transplantation, 1995, 59(4): 460-466.

[16] 杨华蓉,蔡绍辉,刘应宾,等.中药注射液 A、B 抗慢排机理研究[R].1999.

[17] 步 宏,陈卫国,刘于宾,等.益生注射液抗大鼠腹主动脉移植硬化的实验研究[J].华西药学杂志,2000,15(3):185.

[18] 李胜富,蒋红梅,李幼平,等.益生注射液对人内皮细胞缺氧再给氧损伤的拮抗机理研究[J].华西医科大学学报,2002,33(2):215-219.

[19] Dong J, Pratt J R, Smith R A G, et al. Strategies for targeting complement inhibitors in ischemia/reperfusion injury[J]. Mol Immu, 1999, 36(3): 957-963.

[20] Sriramarao P, Languino L R, Altieri D C. Fibrinogen mediates leukocyte-endothelium bridging in vivo at shear forces[J]. Blood, 1996, 88(9): 3416-3423.

(责任编辑:张学颖)