

· 论 著 ·

# 益生注射液抗大鼠移植心脏慢性失功能加快模型的机制探讨

李 明

(重庆医科大学附属第一医院普外科 400016)

**摘要:**目的 探讨中药益生注射液抗大鼠移植心脏慢性失功能加快模型的机制。方法 采用雌性封闭群 SD 大鼠 20 只, 随机数字表法分为 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, 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 8 mg/kg, 连续 7 d。在移植术后第 8 天, 取 2 组移植心脏进免疫组织化学染色, 检测心肌组织中核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、细胞黏附分子-1(ICAM-1)、II 类主要组织相容性复合物(MHC-II)和转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )的表达情况。结果 2 组心肌组织中均有 NF- $\kappa$ B、ICAM-1、MHC-II 和 TGF- $\beta_1$  的表达, 但实验组 4 种分子的表达明显低于对照组( $P < 0.05$ )。结论 在缺血-再灌注损伤诱导的移植心脏慢性失功能加快模型中, 益生注射液对移植心脏有保护作用, 其机制可能是减轻缺血-再灌注损伤所致的炎性级联反应。

**关键词:**再灌注损伤; 大鼠; 移植慢性失功能; 益生注射液

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.31.006

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)31-3134-04

## The possible mechanism of Yisheng injection for reducing the progress of a novel accelerated rat cardiac graft failure model

Li Ming

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the possible mechanism of the traditional chinese medicine Yisheng injection, which can reduce the progress of a novel accelerated rat cardiac graft failure model induced by ischemia/reperfusion injury. **Methods** 20 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 at 4℃ for 3 hours before transplantation. After transplantation, the experimental group recipients were treated with Yisheng injection 8 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> for 1 week. Grafts were excised on the 8 days after transplantation to detect the expression of NF- $\kappa$ B, ICAM-1, MHC-II and TGF- $\beta_1$  using immunohistochemistry methods. **Results** We can detect the expressions of NF- $\kappa$ B, ICAM-1, MHC-II, and TGF- $\beta_1$  by 8 day after transplantation in two groups. However, the expressions of NF- $\kappa$ B, ICAM-1, MHC-II, and TGF- $\beta_1$  were significantly decreased in the experimental group. **Conclusion** It demonstrated that Yisheng injection can reduce the progress of a novel accelerated rat cardiac graft failure model induced by ischemia/reperfusion injury. Its possible molecular mechanism is that Yisheng injection could reduce the cytokine adhesion molecules cascade.

**Key words:** reperfusion injury; rat; chronic graft failure; Yisheng injection

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, 移植器官近期存活率不断提高。但远期效果仍不甚理想<sup>[1]</sup>。影响移植器官长期存活的因素中最重要的是慢性排斥反应(chronic rejection, CR)<sup>[2-3]</sup>。CR 更确切地说应该称为移植器官慢性失功能<sup>[4]</sup>。在其治疗上, 应采取以预防为主措施, 如尽量减少缺血-再灌注损伤、有效控制急性排斥反应等。作者前期研究发现中药益生注射液有抗移植慢性失功能的作用<sup>[5-7]</sup>。本实验采用缺血-再灌注损伤诱导的大鼠移植心脏慢性失功能加快模型<sup>[8]</sup>, 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, 术后取移植心脏行免疫组织化学染色, 以探讨益生注射液抗大鼠移植心脏慢性失功能加快模型的机理, 旨在为临床器官保存及器官移植提供部分实验依据。

### 1 材料与方 法

**1.1 实验材料** 雌性封闭群 SD 大鼠 20 只, 2~3 月龄, 体质量(220±20)g, 购自华西医科大学实验动物中心。益生注射液(20 mg/mL, 批号 990705)由成都市药物制剂研究所提供; 转

化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )一抗; 细胞黏附分子-1(ICAM-1)一抗、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)购自武汉博士德公司; II 类主要组织相容性复合物(MHC-II)一抗购自晶美生物公司。即用型 SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒购自博士德公司; 显微外科手术器械购自上海手术器械厂。

### 1.2 实验方 法

**1.2.1 实验分组** 采用缺血-再灌注损伤诱导的大鼠移植心脏慢性失功能加快模型, 将 SD 大鼠 20 只采用随机数字表法分为 2 组, 对照组(生理盐水组)和实验组(益生注射液组), 每组 10 只大鼠。对照组的离体心脏用 4℃ 肝素生理盐水(肝素浓度为 50 U/mL)进行灌注降温; 而实验组的离体心脏用 4℃ 含益生注射液的肝素生理盐水进行灌注降温(益生注射液浓度为 0.5 mg/mL, 肝素浓度同对照组)。离体心脏取下后, 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。

**1.2.2 手术方 法** 大鼠心脏移植参照参考文献<sup>[9]</sup>所用方法, 供离体心脏移植于受体腹腔内, 离体心脏主动脉升支与受体腹

主动脉行端侧吻合,离体心脏主肺动脉与受体下腔静脉行端侧吻合。对照组移植术后不给任何药物处理;实验组移植术后每天腹腔注射益生注射液,剂量为 8 mg/kg,连续 7 d。在设定采集标本的时间点分别取 2 组的植入心脏,10%中性甲醛固定,脱水、石蜡包埋。

**1.2.3 免疫组织化学染色** 2 组大鼠在移植后 8 d 取下移植的心脏行免疫组织化学染色,采用 SABC 法,DAB 显色。光镜下观察 NF- $\kappa$ B、ICAM-1、MHC-II 和 TGF- $\beta_1$  的表达情况。阴性对照用磷酸二氢盐缓冲液(PBS)液代替一抗作为阴性对照,其余步骤相同。ICAM-1 的阳性对照为大鼠小肠切片;NF- $\kappa$ B 的阳性对照为大鼠的脑组织切片;MHC-II 的阳性对照为大鼠脾脏切片;TGF- $\beta_1$  的阳性对照为动物乳腺癌切片。

**1.2.4 结果判断** 阳性反应为棕黄色。各种蛋白定位如下: NF- $\kappa$ B 定位于细胞质;ICAM-1 定位于细胞膜和细胞质;MHC-II 定位于细胞膜和细胞质;TGF- $\beta_1$  定位于细胞质。镜下观察免疫组织化学染色结果用 Mias-2000 计算机图像分析系统采集图像,每张切片至少选 15 个视野,选中阳性染色部分,并将其转化为灰度值(灰度是指黑白图像中点的颜色深度,范围一般从 0 到 255,白色为 255,黑色为 0,故黑白图片也称灰度图像,在医学、图像识别领域有很广泛的用途)。同时可自动测出阳性细胞数,对实验组和对照组的阳性染色细胞的灰度值和阳性细胞数进行比较,同一类分子在相同的放大倍数下进行比较。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS10.0 软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间采用配对 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

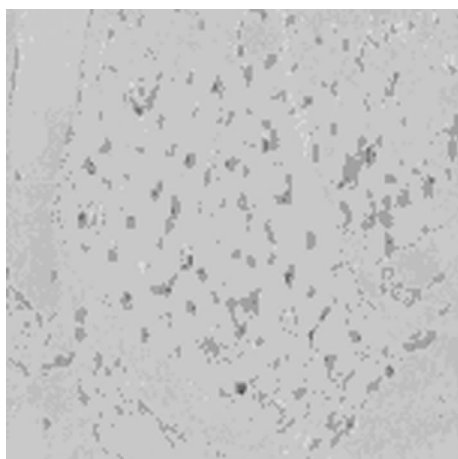
**2 结 果**

实验组和对照组 4 种蛋白的表达情况,见表 1、2。

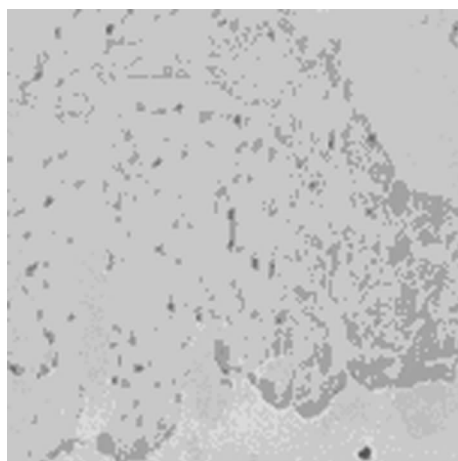
**表 1 对照组和实验组中 NF- $\kappa$ B 和 ICAM-1 蛋白表达的比较( $\bar{x} \pm s$ )**

分组	NF- $\kappa$ B		ICAM-1	
	灰度	阳性细胞数(个)	灰度	阳性细胞数(个)
实验组	116.35 $\pm$ 5.07	15.50 $\pm$ 5.40 <sup>a</sup>	143.17 $\pm$ 2.24	15.20 $\pm$ 3.04 <sup>a</sup>
对照组	120.67 $\pm$ 8.24	48.00 $\pm$ 7.50	143.77 $\pm$ 3.42	34.80 $\pm$ 6.16

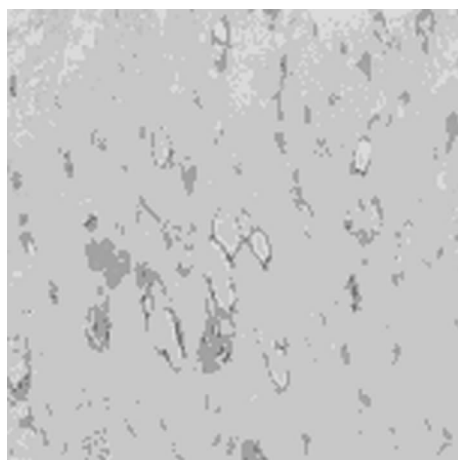
<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较



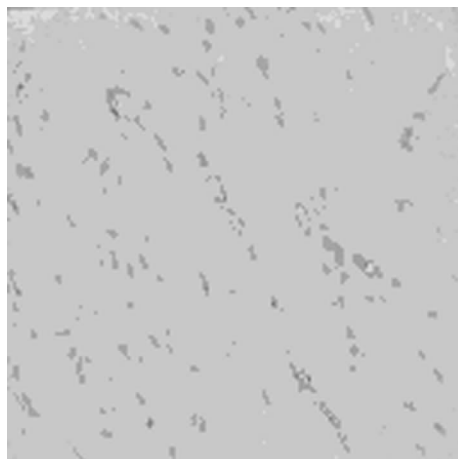
**图 1 对照组大鼠心脏移植 1 周后心肌组织 NF- $\kappa$ B 免疫组织化学染色为强阳性(SABC $\times$ 400)**



**图 2 实验组大鼠心脏移植 1 周后心肌组织 NF- $\kappa$ B 免疫组织化学染色为弱阳性(SABC $\times$ 400)**



**图 3 对照组大鼠心脏移植 1 周后心肌组织 ICAM-1 免疫组织化学染色为强阳性(SABC $\times$ 400)**



**图 4 实验组大鼠心脏移植 1 周后心肌组织 ICAM-1 免疫组织化学染色为弱阳性(SABC $\times$ 400)**

大鼠心脏移植后 1 周,移植心脏心肌组织的免疫组织化学染色可见: NF- $\kappa$ B 定位于细胞质,见图 1、2; ICAM-1 定位于细胞膜和细胞质,见图 3、4; MHC-II 定位于细胞膜和细胞质,见图 5、6; TGF- $\beta_1$  定位于细胞质,见图 7、8。2 组中 4 种蛋白阳性染色细胞的灰度值差别不大;但对照组阳性细胞数明显高于实验组。

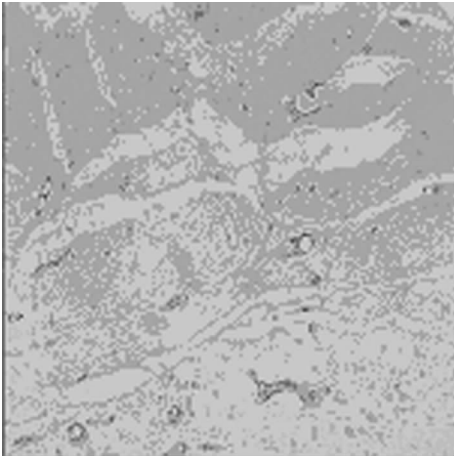


图 5 对照组大鼠心脏移植 1 周后心肌组织 MHC-II 免疫组织化学染色为强阳性(SABC×200)

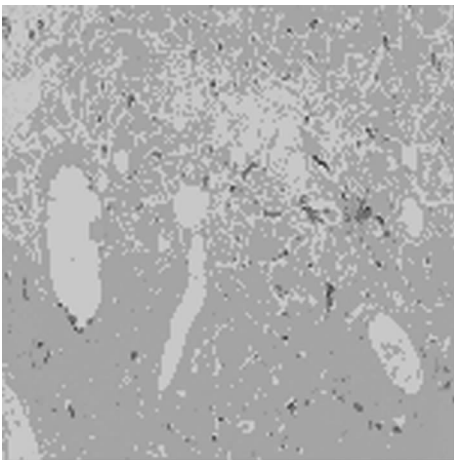


图 6 实验组大鼠心脏移植 1 周后心肌组织 MHC-II 免疫组织化学染色为弱阳性(SABC×200)

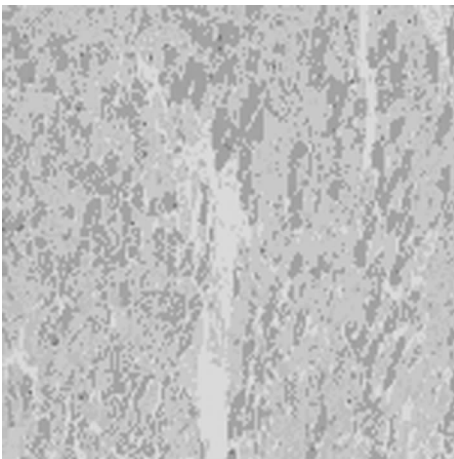


图 7 对照组大鼠心脏移植 1 周后心肌组织 TGF-β<sub>1</sub> 免疫组织化学染色为强阳性(SABC×200)

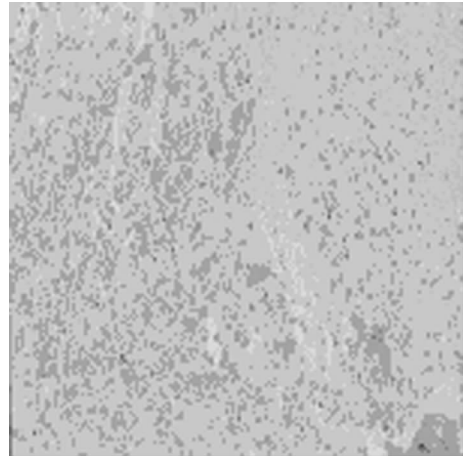


图 8 实验组大鼠心脏移植 1 周后心肌组织 TGF-β<sub>1</sub> 免疫组织化学染色为弱阳性(SABC×200)

### 3 讨 论

移植器官慢性失功能是移植器官功能长期存活的主要障碍之一,因其机制不清,到目前为止,移植器官失功能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<sup>[2]</sup>。由于常规的三联免疫抑制剂并不能阻止移植器官失功能的进程,相反会造成移植体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移植器官失功能的进程。骁悉(mycophenolate mofetil, MMF)和雷帕霉素(rapamycin)具有一定的抗移植器官失功能作用<sup>[10-11]</sup>。但这些药物或由于价格昂贵,或由于毒性作用,难以在国内临床应用。

中国是一个药材资源十分丰富的国家,从传统中医药宝库中去探索治疗移植器官失功能的有效药物具有重要的现实意义。随着对移植器官失功能机制研究的深入,非免疫学因素对移植器官失功能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移植器官失功能的目的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缺血-再灌注<sup>[12]</sup>。作者以前的研究已证实缺血-再灌注损伤可促进移植器官失功能的发生和发展,因此,通过抗缺血-再灌注损伤来延缓移植器官失功能无疑极具研究价值<sup>[8]</sup>。

益生注射液是一种天然药物,含 A、B 两种生物碱, A 药具有免疫抑制作用; B 具有改善微循环,降低血小板黏附及抗脂质过氧化作用<sup>[13]</sup>。

本实验采用免疫组织化学方法,对移植后 8 d 的心脏组织中 NF-κB、ICAM-1、MHC-II 和 TGF-β<sub>1</sub> 的表达进行了检测。结果发现,这 4 类炎症级联反应的关键蛋白表达均增加。说明缺血-再灌注损伤所生成的超氧化物可激活 NF-κB,后者进入细胞核,启动基因的转录,导致 ICAM-1、MHC-II 和 TGF-β<sub>1</sub> 的表达增加。ICAM-1 的上调可使内皮细胞活化并激活白细胞,产生炎症反应;另外, MHC-II 表达增加可使移植器官免疫原性增加, T 细胞对抗原的识别增加,从而加重了炎症反应;与之相应的 TGF-β<sub>1</sub> 的表达增加则是机体对损伤的一种保护性反应。已证实 TGF-β<sub>1</sub> 是一种多功能的生长因子,在调节细胞增殖、分化、细胞外基质沉淀和免疫抑制等诸多方面均起着重要作用。TGF-β<sub>1</sub> 通过受体信号转导促进细胞合成胶原蛋白、纤连蛋白、层连蛋白及蛋白多糖等,调节组织正常的损伤修复,并对炎症细胞具有抑制作用,但其过量生成则与慢性纤维化有

表 2 对照组和实验组中 MHC-II 和 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达的比较( $\bar{x} \pm s$ )

分组	MHC-II		TGF-β <sub>1</sub>	
	灰度	阳性细胞数(个)	灰度	阳性细胞数(个)
实验组	124.08±5.10	19.33±5.31 <sup>a</sup>	130.83±5.33	32.42±10.25 <sup>a</sup>
对照组	133.93±10.43	31.43±7.56	134.43±7.41	118.2±14.16

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

关。Waltenberger 等<sup>[14]</sup>用大鼠心脏同种移植模型研究 TGF- $\beta_1$  的表达, 结果发现, 移植心脏在发生慢性排斥时 TGF- $\beta_1$  生物活性明显升高, TGF- $\beta_1$  mRNA 水平也明显升高。

本研究中, 对照组与实验组相比, 4 种蛋白的表达均显著性增加, 说明对照组的缺血-再灌注损伤更重, 炎症反应也更强烈。实验组由于用益生注射液治疗, 可使缺血-再灌注损伤减轻, 从而使炎症反应减轻; 另外, 益生注射液中的 A 成分具有免疫抑制作用, 可抑制 T、B 淋巴细胞和巨噬细胞的增殖, 也可减轻炎症反应。对照组中 TGF- $\beta_1$  明显升高, 可能是其迅速发生移植器官失功能病理变化的重要原因。

综上所述, 益生注射液对缺血-再灌注损伤诱导的移植心脏慢性失功能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。其具体的机制为减轻缺血-再灌注损伤, 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 JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ. 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] 李明, 严律南. 益生注射液抗大鼠移植心缺血再灌注损伤的实验研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(23): 3197-3199.
- [4] 夏穗生. 临床移植医学[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999.
- [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 ES. Improved technique of heart transplantation in rats[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1969, 57: 225.
- [10] Allison AC, Eugui EM. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. Transplantation[J]. 2005, 80(2 Suppl): S181-190.
- [11] Jolicoeur EM, 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.
- [12] 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: 460-466.
- [13] 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.
- [14] Waltenberger J, Wanders A, Fellstrom B, et al. Induction of transforming growth factor-beta during cardiac allograft rejection[J]. J Immunol, 1993, 151(2): 1147-1157.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-05-12)

(上接第 3133 页)

及细胞内  $Ca^{2+}$  超载, 达到降低肝脏缺血再灌注损伤的作用, 同时降低肝细胞的凋亡程度, 稳定肝细胞膜, 改善肝脏微循环功能障碍, 减轻肝细胞损伤。但具体机制尚待进一步研究。

尽管作者在高渗盐水联合牛磺酸预处理对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用的研究中取得了一些具有说服力的资料, 可以为临床上防治肝脏缺血再灌注损伤提供可靠的依据和新的思路, 但是由于整个实验受技术、资金和时间的限制, 未能在分子、基因水平进行进一步的分析和研究, 这也将是本研究下一阶段研究的主要目标。

#### 参考文献:

- [1] 郑鸿伟, 张继峰, 凌世长, 等. 高渗盐水和牛磺酸在失血性休克治疗中的作用[J]. 北京医科大学学报, 1994, 26(6): 433-435.
- [2] Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology[J]. Acta Physiol Scand, 1980, 492: 153-168.
- [3] Mizoe A, Kondo S, Azuma T, et al. Preventive effects of superoxide dismutase derivatives modified with monosaccharides on reperfusion injury in rat live transplantation

[J]. J Surg Res, 1997, 73(2): 160.

- [4] Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, et al. Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat[J]. Surg Gynecol Obstet, 1990, 171(2): 120-125.
- [5] Troy CM, Shelanski ML. Down-regulation of copper/zinc superoxide dismutase causes apoptotic death in PC12 neuronal cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(14): 6384-6387.
- [6] 柯庆宏, 郑树森, 梁廷波, 等. 高渗盐水预处理可减轻中性粒细胞介导的肝脏缺血再灌注损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(7): 1326-1330.
- [7] David J, Ciesla MD, Ernest E, et al. Hypertonic saline attenuation of polymorphonuclear neutrophil cytotoxicity: timing is everything[J]. Trauma, 2000, 48: 388-395.
- [8] Angle N, Hoyt DB, Coimbra R, et al. Hypertonic Saline resuscitation diminishes lung injury by suppressing neutrophil activation after hemorrhagic shock[J]. Shock, 1998, 9(3): 164-170.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-06-14)