

雷公藤延长同种小鼠心肌移植存活时间的研究

中山医科大学病理生理教研室

赵波 黄献诚 杜宏微 吴小春 王贵喜* 李树浓*

内容提要 本文采用小鼠心肌移植模型观察了雷公藤对排斥反应的影响。结果表明,雷公藤生药及雷公藤片可明显延长小鼠心肌移植物的存活时间,明显降低心肌移植物的排斥率。组织学检查表明,移植术后12天,给药组移植心肌结构基本完整,而生理盐水对照组的心肌广泛坏死,内有大量淋巴细胞浸润。

通过有效的免疫抑制剂控制同种移植后的急性排斥反应,仍是目前临床上常用的措施。但现可供选择的免疫抑制药物多有严重的副作用,使用上受到一定限制。近年来国内一些单位开展中草药用于控制排斥反应的临床和实验研究^(1~8),提示从中草药中寻找有效、低毒的免疫抑制剂有广阔的前景。有报道中药雷公藤对自身免疫性疾病有显著疗效,并认为其作用机理可能是通过抑制免疫反应⁽⁴⁾;有人证明雷公藤及其提取物可明显抑制溶血素形成及二硝基氯苯(DNCB)所致小鼠迟发型超敏反应^(5,6);刘立华等报道雷公藤煎剂可显著延长同种小鼠皮肤移植存活时间⁽⁷⁾,提示雷公藤具有免疫抑制作用。本实验用同种小鼠心肌移植模型观察比较雷公藤生药及雷公藤片对排斥反应的影响,并初步探讨其可能作用机理。

材料与方法

一、实验动物:供心为新生小鼠 BALB/C (出生24小时内),由本室动物室繁殖。受鼠 NIH, 体重18~22g,由广东省医用实验动物场提供。

二、雷公藤(*Tripterygium Wilfordii* Hook f) 生药(福建曹娥产,由第一军医大学惠赠);水煎剂之制备,将雷公藤生药根茎部剪碎,20g 生药加水 800ml,煮沸后文火煎煮20分钟,60℃ 恒温水浴箱中浓缩成浓度分别为25%和50%的溶液,保存于4℃。

三、雷公藤片(福州市皮肤病院生产,批号850603),每片含生药量2g,主要成分为雷公藤生物碱及总二萜内酯。将雷公藤片用蒸馏水溶解,配成50%水溶液,保存于4℃。

四、硫唑嘌呤(广州第二制药厂出品,批号780101),每片100mg。用前将片剂碾成粉末,用蒸馏水配成0.2%混悬液,保存于4℃。

五、实验分组:将受鼠随机分成5组:生理盐水对照组;硫唑嘌呤对照组;雷公藤生药水剂每日0.05g组;生药水剂每日0.1g组及雷公藤片组。手术当天开始经胃灌药,以后每天1次,每次0.2ml。各组均于排斥反应终点(即移植心肌消失)停止给药。

六、心肌移植及排斥反应监测:参照史美浩等的方法⁽⁸⁾稍加修改,受鼠经0.5%戊巴比妥(0.1ml/10g体重)腹腔麻醉后剃毛,用1%新洁尔灭局部消毒。按清洁手术要求,先在耳廓背侧皮下注射少量消毒生理盐水使成一小泡,然后在近耳根处剪开小泡,排出生理盐水后稍加分离即得一小囊袋。将供心取出剪成基本等大的两块,分别植入两只受鼠的耳廓囊袋,缝合。从供心离体到植入在两分钟内完成。术后6天起在乙醚麻醉下隔日测录移植心肌的心电活动,接近排斥终点时每日测录。连续两天无心电为排斥终点。如手术后8天仍未出现心电则为移植手术失败,不列入统计。

七、移植物的切片:以预实验中生理盐水对照组移植心肌平均存活天数为据,术后12天各组随机取2只鼠处死,切下带有移植心肌的耳廓,以10%福尔马林固定,切片,HE染色。显微镜下观察其组织学改变。

结 果

一、雷公藤生药及雷公藤片对同种小鼠心肌移植存活时间的影响

各组小鼠心肌移植存活时间见附表。实验结果表明,雷公藤生药(每天0.05g及0.10g)、雷公藤片

(0.10g)及硫唑嘌呤(0.40mg)均可明显延长小鼠心肌移植的存活时间 ($P<0.01$)。两个雷公藤生药组的移植存活时间均较硫唑嘌呤组长,但未达到统计学差异;而雷公藤片组的延长作用最显著,与硫唑嘌呤组相比, $P<0.05$ 。

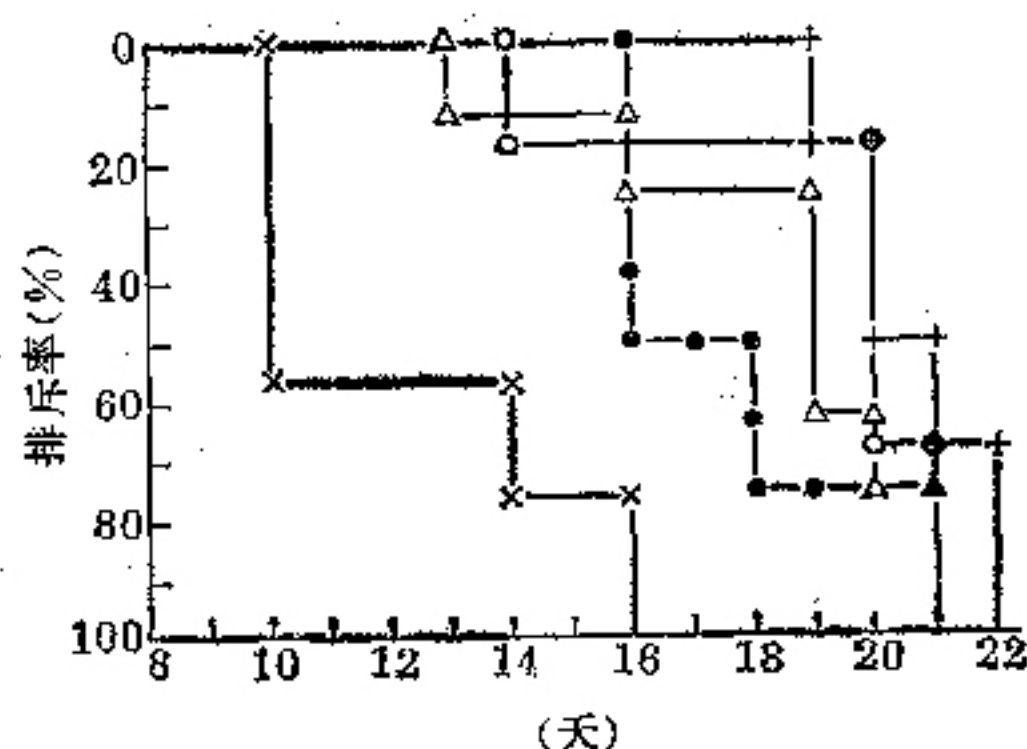
附表 各组小鼠心肌移植存活时间

组别	动物数	移植心肌存活天数	$\bar{X} \pm SD$
生理盐水	7	10~16	12.3 ± 2.9
硫唑嘌呤	4	16~21	$17.8 \pm 2.9^{\Delta}$
雷公藤生药0.1g	6	14~21	$19.3 \pm 2.7^{\Delta\Delta*}$
雷公藤生药0.05g	8	13~21	$18.5 \pm 2.7^{\Delta\Delta*}$
雷公藤片	6	19~22	$20.7 \pm 1.2^{\Delta\Delta**}$

注:与生理盐水组比 $\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta<0.001$;与硫唑嘌呤组比 $*P>0.05$, $**P<0.05$

二、雷公藤生药及雷公藤片对同种小鼠心肌移植排斥率的影响

动态观察各组小鼠心肌移植物的排斥率可见,术后10天,生理盐水对照组已有4只动物发生排斥(排斥率为57%),而其余各组无一出现排斥;术后14天,生理盐水组排斥率达71%,而雷公藤生药两组均低于20%,硫唑嘌呤和雷公藤片组还未出现排斥;术后19天,生理盐水组排斥率为100%,硫唑嘌呤组已达75%,而雷公藤生药0.1g组及雷公藤片组仅为17%(附图)。



附图 小鼠心肌移植排斥率的动态观察。○——○为雷公藤生药0.1组,△——△为雷公藤生药0.05g组,+——+为雷公藤片组,•——•为硫唑嘌呤组,x——x为生理盐水组

三、移植心肌组织学改变

生理盐水组移植心肌纤维断裂、坏死,坏死区有大量淋巴细胞及一些单核细胞浸润,还可见广泛出血及中性粒细胞浸润和纤维细胞增生,血管扩张、淤血,白细胞附壁及游走至血管外。雷公藤生药组及雷公藤

片组移植心肌结构完整,心肌纤维中淋巴细胞及单核细胞浸润均未出现,亦未见出血及中性粒细胞浸润。

讨 论

一、关于移植模型:同种小鼠心肌移植可用心电作为指标来精确监测移植心肌的功能及排斥终点,指标较为客观,且手术简便,成功率高,重复性好,国内外已用于移植免疫学研究^(9,10)。我们采用皮下注射生理盐水形成小泡再分离的方法,耳廓局部损伤较钝性分离为轻,手术野出血甚少,术后充血明显减轻,效果较文献中介绍的方法更满意。

二、雷公藤延长移植存活时间的可能机理:生理盐水组移植心肌组织中有大量淋巴细胞及少量单核细胞浸润(王雪圃等报告主要为单核细胞浸润⁽¹¹⁾),提示本模型的排斥机理中有细胞免疫参与。雷公藤生药组及雷公藤片组无上述组织学改变,提示雷公藤可能通过抑制动物细胞免疫来延长移植物的存活时间。我们另一工作证实雷公藤可抑制同种心肌移植后小鼠体内淋巴细胞转化率(本组未发表资料)也支持这一推论。至于心肌组织中的粒细胞浸润,则可能是心肌坏死所致的炎症反应的结果。

Ellis等用免疫荧光法测得移植心肌表面存在大量心肌反应抗体⁽¹⁰⁾,说明这一模型的排斥机理中可能也有体液免疫参与,而已有报告雷公藤可抑制抗体形成,提示其延长同种小鼠心肌移植存活与体液免疫抑制也有关,但其确切作用机理尚待进一步研究。

三、有关毒性反应:雷公藤有一定的毒性作用,过量可致死。我们在预初实验中采用文献中介绍的剂量^(6,7),结果大部分动物在移植被排斥前死亡,这可能与动物品系不同,药物产地及处理方法不同有关。按本实验采用的剂量,仍有部分小鼠出现毒性反应,表现有松毛、腹胀、活动减少、角膜溃疡等,少数死亡,但有效剂量的硫唑嘌呤毒性作用更明显,半数以上的小鼠在心肌移植排斥之前死去。二者相比,雷公藤的使用安全性似更大一些。

雷公藤的毒性成分主要在根皮部⁽⁴⁾,去除其根皮可减少其毒副作用。雷公藤片主要所含的雷公藤生物碱及总二萜内酯具有生药所具有的免疫抑制作用,而安全范围较大⁽¹²⁾,其延长小鼠心肌移植存活时间的作用比硫唑嘌呤更显著 ($P<0.05$),也优于生药,可能是雷公藤的毒性作用较少,对移植存活时间的干扰减少。因而可以设想,去除雷公藤的毒性成分,可望获得一种较理想的免疫抑制剂。

参 考 文 献

1. 庄红明, 等. 五仁醇延长小鼠同种异体心肌组织移植存活期的初步观察. 中西医结合杂志 1987; 7(1): 33.
2. 苏祥扶, 等. 中医中药在同种肾移植中的应用. 中西医结合杂志 1984; 4(6): 342.
3. 朱洪荫, 等. 中西医结合治疗家兔同种肾移植排斥反应的初步观察报告. 中医杂志 1982; 2: 69.
4. 黄先石, 等. 雷公藤的研究. 中药材科技 1984; 6: 47.
5. 黄幼兰, 等. 雷公藤煎剂及其部位(T74-1)对免疫功能的影响. 福建医药杂志 1982; 4(4): 39.
6. 常金丽, 等. 雷公藤总甙免疫抑制作用初步探讨. 中华微生物与免疫学杂志 1984; 4(5): 331.
7. 刘立华, 等. 雷公藤延长小鼠同种皮肤移植存活时间. 中国免疫学杂志 1985; 1(3): 40.
8. 史美浩, 等. 小鼠耳后心脏/心肌组织移植模型之探讨. 上海免疫学杂志 1981; 1(3): 41.
9. 曹锡坤, 等. 输供体血合并应用ATS与PCH延长同种小鼠心脏移植存活的研究. 上海免疫学杂志 1985; 5(4): 226.
10. Robert JE, et al. Tolerance to myocardial tissue allografts by pretreatment with cross-reactive streptococcal membrane antigen. Surgery 1974; 76(7): 142.
11. 王雪圃, 等. 422只小鼠异位游离心脏移植的实验观察. 中华器官移植杂志 1984; 5: 21.
12. 程自珍, 等. 雷公藤片研制. 中草药 1981; 12(5): 14.

益气活血治疗血栓闭塞性脉管炎 22 例

黑龙江省鹤岗市中医院 韩志楼 王振兴

1976~1986年, 我们以益气活血法治疗血栓闭塞性脉管炎(简称TAO)22例, 取得良好疗效, 报告如下。

临床资料 22例中男21例, 女1例。首次发病年龄最小15岁, 最大56岁, 21~41岁18例。有吸烟史者19例, 外伤史者4例, 冻伤史者2例。参照1965年7月在南京召开的TAO临床研究交流会议标准, 本组病例均符合下列条件: (1)患肢有缺血症状: 肢端畏冷、麻木、间歇跛行、静息痛、溃疡、坏疽等; (2)足背动脉或胫后动脉搏动减弱或消失; (3)伯尔格氏试验阳性, 部分患者有游走性静脉炎病史; (4)排除雷诺氏病、动脉硬化症、糖尿病引起的坏疽等。

中医辨证与西医分期对比: (1)阴寒型: 喜暖怕冷, 麻木, 疼痛遇冷加重。舌淡苔白, 脉沉细或迟。可诊为TAO缺血期。(2)血瘀型: 趾甲增厚, 紫红肿胀, 持续疼痛, 夜间尤甚。舌暗红可见瘀斑, 苔白或腻, 脉沉迟。可诊为TAO瘀血期。(3)热毒型: 喜冷怕热, 溃疡流脓。舌红绛, 苔黄, 脉细数。多为TAO坏死期Ⅰ、Ⅱ级。(4)气血双亏型: 畏寒自汗, 面黄肌瘦, 溃疡经久不愈。舌淡苔白, 脉沉细无力。多为TAO坏死期Ⅲ级。

治疗方法 (1)内服中药基本方: 黄芪30~80g, 丹参30~40g, 当归、鸡血藤各15~20g, 土鳖虫、桃

仁、山甲各10~15g, 甘草10g。阴寒型及血瘀型加附子、肉桂、干姜; 热毒型加银花、公英、连翘; 气血双亏型加党参、白术; 痛甚加乳香、没药, 下肢痛加牛膝。每日煎服1剂, 1个月为1疗程。(2)动脉注射法: 以下肢为例, 注射前半小时先服中药, 选患侧肢体股动脉常规消毒后, 注射复方丹参注射液2ml加25%葡萄糖20ml, 每3~4日1次, 1个月为1疗程。

疗效标准 基本按1965年在南京召开的TAO临床研究交流会议疗效标准。治愈: 自觉症状消失, 能参加工作, 连续行走1500米无跛行。显效: 自觉症状明显减轻, 能参加轻工作。有效: 自觉症状减轻, 应继续治疗。无效: 治疗前后无变化。

结 果 治愈19例占86.4%, 其中阴寒型6例, 血瘀型8例, 热毒型4例, 气血双亏型1例。显效2例占9.1%, 其中血瘀型及热毒型各1例。有效1例, 为气血双亏型。治疗时间最短1个疗程, 最长3个疗程。

体 会 据本病基本病理改变属中医血瘀证, 故选用基本方益气活血而治之, 然需临床辨证加减方能切中病机、提高疗效。本组病例又配合动脉注射活血化瘀药丹参, 力图提高疗效。22例的治疗结果表明, 本法疗效尚佳。但须注意股动脉穿刺技术和严格消毒。

Effect of *Salvia Miltiorrhiza* on Survival Time of Heart Allograft in Experimental Animals

Zhuang Hongming (庄红明), Zhu Hongyin (朱洪荫), Qin Zelian (秦泽莲), et al

Research Centre of Plastic Surgery, the 3rd Teaching Hospital of
Beijing Medical University, Beijing

Heterotopic heart allotransplantation was performed in rats and rabbits. On the basis of successful operations, one of traditional Chinese drugs of promoting the blood circulation, *Salvia miltiorrhiza* was evaluated for its effect in increasing the survival time of cardiac allograft. We found that at the dose of 12 g/kg and 24 g/kg per day, *Salvia miltiorrhiza* prolonged the survival time of cardiac allograft significantly in rats, but there was no significant difference in allograft survival time between the two groups in which *Salvia miltiorrhiza* was used. In rabbit cardiac allograft model a dose of 6 g/kg per day of *Salvia miltiorrhiza* combined with prednisolone (5 mg/kg, administered respectively at the time of 0, 2, 4, 6, 8, 11, 14, 17, 20 days after transplantation) showed stronger anti-rejection effect than either drug used alone. No significant toxic effect was noticed in our experiment.

(Original article on page 29)

Study of *Tripterygium wilfordii* on Prolonging Survival Time of Mice Myocardial Allografts

Zhao Bo (赵波), Huang Xiancheng (黄献诚), Du Hongwei (杜宏微), et al

Dept. of Pathophysiology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou

Myocardial tissues of new-born BALB/c mice (within 24 hrs after birth) were transplanted to adult NIH mice as free allografts. ECG activity was used to detect rejection. Three groups of mice were treated with *Tripterygium wilfordii* Hook f. in doses of 0.05g/day, 0.10 g/day and extract tablets *Tripterygium wilfordii* 0.10g/day, p. o. The control groups were treated with normal saline (NS) and azathioprine. The average survival time of grafted heart tissue for the NS group was 12.3 ± 2.9 days and for the azathioprine group 17.8 ± 2.9 days. The survival time of grafted heart tissue was significantly prolonged by *Tripterygium wilfordii* and its extracts. The average survival time was as follows: for 0.05 g/day 18.5 ± 2.7 days, for 0.10 g/day 19.3 ± 2.7 days and for extract-tablets 20.7 ± 1.2 days. Comparing the above-mentioned groups with the NS group, the difference was significant, $P < 0.001$. The survival time for extract-tablets group was longer than that of the azathioprine group ($P < 0.05$). Comparing the rejection percentage at definite times, the rate of drug administered groups decreased remarkably: Ten days after transplantation, 57% of the NS group were rejected, and none of the drug administered groups were rejected ($P < 0.05$). 19 days after transplantation, 100% of the NS group were rejected, but the extract group for 0.10 g/day only 17% were rejected ($P < 0.05$). A histological examination of the grafts revealed that there were large amount of lymphocytes and certain amount of monocytes infiltrated in the broken-down myocardial fibers in the control groups 12 days after transplantation. While in the drug administered groups, the myocardial fibers remained intact. All these data mentioned suggested that *Tripterygium wilfordii* can prolong the survival time of allografted myocardial tissue significantly. Its mechanism is possibly the inhibition of cell mediated and humoral immunity.

(Original article on page 31)

"Activating Blood Circulation and Relieving Stasis" in Treating Experimental Peritonitis

Zhou Zhenli (周振理), Wu Xianzhong (吴咸中)

Tianjin Medical College, Tianjin

The treatment of "activating blood circulation and relieving stasis" therapy (the main component of which is *Salvia miltiorrhiza*) was used alone in early experimental peritonitis in rats, with a result of acceleration in absorption of exudative fibrinogen and of the elimination of intraperitoneal infection. The mortality of the medicated group (16.7%) was significantly lower than that of the control (60%, $P < 0.05$), and the severity of pathologic changes milder as well, the mean diameter of intraperitoneal abscess and the length of intestinal adhesion were shorter than that of the control ($P < 0.001$ and 0.005 respectively). Hence the results provided a sound basis for the application of "activating blood circulation and relieving stasis" herbal medicines during the early and middle stages of peritonitis.

(Original article on page 34)