

氧化苦参碱延长小鼠异体移植心肌存活期及其免疫机理的研究*

北京医科大学 第三医院成形研究中心 秦泽莲 庄红明 刘 燕
免疫学教研室 邓鸿业 邓玉兰 边建朝 王宝勤

内容提要 本实验观察到肌肉注射氧化苦参碱具有明显延长小鼠异体游离移植心肌存活期的作用,并随剂量加大其作用增强。检查药物对移植和非移植小鼠的脾脏淋巴细胞转化和免疫球蛋白分泌细胞的影响。实验发现,移植术后10天小鼠体外脾脏细胞自发增殖增强,对刀豆蛋白A(ConA)刺激的转化反应则明显减弱。氧化苦参碱显著抑制正常小鼠的脾脏细胞的自发增殖及对ConA或脂多糖(LPS)刺激的转化反应,而对手术已使之显著降低的脾细胞对ConA刺激的转化反应无影响。这种选择性抑制作用可能利于避免用其他常规非特异免疫抑制剂所带来的危害。

关键词 氧化苦参碱 小鼠 异体移植 心肌存活期 脾脏细胞增殖反应 抗体分泌细胞

由于常规免疫抑制剂毒性较强⁽¹⁾,寻找可用于抗移植排斥反应的新药物始终是异体移植研究领域的重要课题。我中心多年来一直从事这方面的工作。氧化苦参碱是中药苦参(*Sophora flavescens* Ait)提出的生物碱。不少研究指出,氧化苦参碱具有一定的免疫抑制作用^(2,3),我们将其用于抗移植排斥反应观察到有延长同种异体游离移植心肌组织存活期的作用,并对其免疫机理作了初步研究。现报告如下。

材料与方法

一、动物:(1)小鼠异体游离移植心肌存活期实验:受体为成年雄性LACA小鼠,供体为不分性别的新生48h内的昆明种小鼠。(2)免疫功能实验:受体为雄性成年BALB/c鼠,供体为新生48h内不分性别的C₅₇BL小鼠。以上小鼠均由北京医科大学实验动物部提供。

二、药品:氧化苦参碱为宁夏盐池制药厂提纯的原料药,水溶性黄色结晶粉末。1987年7月订购。临用时溶于无菌生理盐水注射液中,配制药物浓度为2.25%和0.75%。

三、分组

1.小鼠移植心肌存活期实验分为3组:(1)生理盐水对照组,每日剂量10ml/kg。(2)75mg苦参组,氧化苦参碱按75mg/kg给予。(3)225mg苦参组,按

225mg/kg给药。如表1所示。各组均从移植手术前1天起开始肌肉注射给药,至术后14天止。

2.免疫实验分为4组:(1)非手术盐水组,盐水剂量10ml/kg。(2)非手术苦参组,按225mg/kg给药。(3)手术盐水组。(4)手术苦参组。后二组除进行移植手术外,给药剂量与非手术组相同。四组均从移植术前1周开始肌肉注射给药,非手术组共给药14天,手术组则为16天。而后进行免疫实验。

四、方法

1.移植方法:采用我中心以前的方法进行半心移植⁽⁴⁾。即将供心取出纵剖为二,将半心植入受体一侧耳廓皮下。术后以心电图监测排斥终点。

2.免疫实验:(1)淋巴细胞转化试验:每只小鼠的脾细胞用RPMI-1640营养液(含有新生牛血清、青霉素、链霉素及谷氨酰胺)配成 5×10^6 个/ml的细胞悬液,于96孔细胞培养板中每孔加入0.1ml,共9孔。将9孔分为3组,第1组各孔再加入营养液0.1ml,第2组各孔再加入6 μ g/ml之ConA溶液(营养液配制),第3组各孔再加入20 μ g/ml之LPS溶液(营养液配制)。加完后将细胞培养板放入37°C CO₂温箱培养66h取出,各孔加入³H-胸腺嘧啶核苷0.2- μ Ci,继续培养6h,用半自动细胞收获器收获细胞,用液闪计数器测量⁽⁵⁾,用cpm值表示各孔细胞增殖反应的强弱。(2)抗体分泌细胞(RPFC)的检测:具体方法按参考文献⁽⁶⁾所述进行。

结 果

一、氧化苦参碱对小鼠异体移植心肌存活期的影响：肌肉注射两种剂量的氧化苦参碱后，小鼠移植心肌存活较对照组均明显延长，且随剂量加大作用更强。详见表1。

表1 氧化苦参碱对小鼠异体移植心肌存活期的作用

组别	剂 量 (mg/kg)	鼠数 (只)	移植心肌存活时间 ($\bar{x} \pm s$ 天)	P 值*
对照		8	10.75 $\pm$ 1.67	
苦参	75	12	12.17 $\pm$ 1.34	<0.05
苦参	225	12	15.66 $\pm$ 2.15	<0.001

* 与对照组比较

二、小鼠异体心肌移植术后免疫功能的变化：在移植术后10天检测手术盐水组小鼠的脾脏细胞功能状态。实验发现，与非手术盐水组小鼠比较，其脾细胞自发增殖反应明显增强，对ConA刺激的增殖反应则明显抑制，对LPS刺激的增殖反应和RPFC无变化。详见表2。

表2 氧化苦参碱对异体移植小鼠免疫功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数 (只)	脾脏细胞转化(cpm) 自发	ConA	RPFC LPS (个/10E5)
非手术盐水	5	580 $\pm$ 233	24945 $\pm$ 9837	12877 $\pm$ 3246
非手术苦参	5	258 $\pm$ 88.1*	10410 $\pm$ 5910*	2713 $\pm$ 533***
手术盐水	7	2783.8 $\pm$ 1069**	10109 $\pm$ 1219**	14349 $\pm$ 2741
手术苦参	6	2394 $\pm$ 2017	9504 $\pm$ 2645	10402 $\pm$ 3419 Δ

注：与非手术盐水组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

*** $P < 0.001$; 与手术盐水组比较 $\Delta P < 0.05$

三、氧化苦参碱对正常小鼠免疫功能的影响：非手术的给药组与相应盐水组小鼠相比，氧化苦参碱显著抑制脾脏细胞的自发增殖和在ConA或LPS刺激下的转化反应，对RPFC无显著影响。参见表2。

四、氧化苦参碱对异体移植小鼠免疫功能的影响：它明显降低移植后小鼠脾脏细胞对LPS刺激的增殖转化和RPFC反应。而对脾细胞的自发增殖和在ConA刺激下的转化反应抑制不显著。详见表2。

讨 论

在实验动物的选择上，当观察临床疗效时，我们考虑到人体移植的情况，特选择了杂系和近交系小鼠进行氧化苦参碱延长异体移植心肌存活期的实验。当证明了药物疗效后，进而再选择纯系小鼠作免疫机理的探讨，以排除个体遗传性差异的影响。

本实验发现，小鼠异体心肌组织游离移植后，其脾脏淋巴细胞自发增殖明显增加，而T细胞在体外对刺激的增殖反应反而下降。淋巴细胞的这种变化与移植排斥反应的关系尚不清楚。但这提示有可能用它作为监测移植排斥反应的指标。移植后T细胞对体外刺激的转化反应降低的原因尚待研究。

本研究所用剂量的氧化苦参碱在移植和非移植小鼠均表现明显的抑制B细胞活化增殖的作用。在移植小鼠，它还影响了B细胞的终末效应细胞——浆细胞的功能。氧化苦参碱显著抑制正常小鼠的T细胞对ConA刺激的增殖，而对移植术后已大为降低了的这一反应无明显影响。这似说明氧化苦参碱延长小鼠同种异体游离移植心肌组织存活期主要与抑制B细胞功能有关。B细胞除了有合成分泌抗体的作用外，它参与免疫调节的功能近年来也受到人们的重视。

常规免疫抑制剂的毒副作用所致并发症，如患者全身免疫力过度低下等是造成移植失败的原因之一。氧化苦参碱选择性作用于移植小鼠的B细胞，对T细胞仅有不显著的抑制作用。这种选择性的免疫抑制作用可能有利于避免应用其他非特异免疫抑制剂带来的危害。它的临床疗效和免疫作用机理需要进一步研究。

参 考 文 献

1. 唐锦治, 等. 大剂量肾上腺皮质激素抗急性排斥反应的探讨. 中华器官移植杂志 1981; 2:16.
2. 韩家文, 等. 氧化苦参碱对小鼠激活的巨噬细胞吞噬功能的影响. 北京医科大学学报 1987; 19:269.
3. 李悦松, 等. 氧化苦参碱对小鼠免疫功能的影响. 第一军医大学学报 1987; 7(1):41.
4. 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.
5. 邓鸿业, 等. 一种非T细胞性促有丝分裂素——猪苓多糖. 中国免疫学杂志 1988; 4(4):228.
6. 邓鸿业, 等. 不同纯系小鼠免疫球蛋白分泌细胞的检测. 中国免疫学杂志 1988; 4(4):235.

bidirective immunomodulatory action in normal healthy mice, recovering the immune indices to normal value from either originally lower or higher than the medium figure, by significant difference in comparison with the Cy control groups ($P < 0.05 \sim 0.01$). (3) The total saponin had actions to prevent from fatigue and to tolerate hypoxia under usual atmospheric pressure. The above description indicates that the total saponin of *Gynostemma pentaphylla* is a better immunomodulator, seems to be like the actions of some Chinese drugs, for example, *Panax ginseng*, *Astragalus membranaceus* etc.

(Original article on page 96)

Study on Effect of Oxymatrine on Prolonging the Survival Time of Cardiac Tissue Allograft in Mice and Its Immunological Mechanisms

Qin Zelian(秦泽莲), Den Hongye(邓鸿业)*, Zhuang Hongming(庄红明), et al
Research Center of Plastic Surgery, the 3rd Hospital of Beijing Medical University;
*Dept. of Immunology, Beijing Medical University, Beijing (100083)

Oxymatrine is an extract from *Sophora flavescens* Ait. A daily dose of 75 mg/kg or 225 mg/kg of oxymatrine was given to the recipient intramuscularly for 14 days. The survival time of cardiac tissue allograft was prolonged significantly to 12.2 days (at the dose of 75 mg/kg, $P < 0.05$) and 15.7 days (at the dose of 225 mg/kg, $P < 0.001$) by oxymatrine, while that in the control group was 10.8 days.

The effects of oxymatrine on immune-function in BABL/c mice with or without heart allograft were further studied. Experiments showed that in vitro spontaneous proliferation of spleen cells increased markedly on the 10th day after transplantation, while the proliferation response to Con A of spleen cells decreased. The spontaneous proliferation and proliferation responses to Con A or to LPS of spleen cells could be inhibited significantly in normal mice by oxymatrine. The proliferation response to LPS of spleen cells and RPFC was inhibited obviously in transplanted mice by oxymatrine. However, oxymatrine did not affect the proliferation response to Con A of spleen cells, which had been decreased after transplantation. The results suggested that this drug exhibited selective immuno-suppression on function of B cells without obvious effect on T cell function in transplanted mice. This characteristics of the drug seemed beneficial for avoiding side-effect produced by the conventional immuno-suppressive agents.

(Original article on page 99)

Effect of Extract of *Paeonia lactiflora* on the Blood Coagulative and Fibrinolytic Enzymes

Wang Yubin(王玉琴), Ma Riyu(马立昱)

Dept. of Experimental Acupuncture, Beijing College of TCM, Beijing (100013)

Paeonia lactiflora with the action of promoting blood circulation and removing blood stasis had been shown to be able to inhibit thrombosis and platelet aggregation, increase fibrinolytic activity and promote thrombolysis. This paper described the influence of the extract of *Paeonia lactiflora* in vitro experiments on prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (PTT), anti-thrombin effect, activity of plasminogen and urokinase. The experimental results showed that: (1) The extract of *Paeonia lactiflora* prolonged the time of PT and PTT. (2) The extract of drug was able significantly to inhibit the thrombin. (3) In study of fibrinolysis by fibrin standard plate experiments, the drug possessed activative effect on the plasminogen. (4) The activity of urokinase was reduced, while the extract of *Paeonia lactiflora* existed. The inhibitory effect on thrombin and effective effect on plasminogen of the drug might be an important mechanism of its action of promoting blood circulation and removing blood stasis.

(Original article on page 101)