

· 实验研究 ·

中药甘黄注射液在异种排斥反应中作用初探^{*}石 斌¹ 殷惠军¹ 黄秀英¹ 吉瑞瑞² 孙方臻¹

摘要 目的:研究中药甘黄注射液在异种排斥反应中的作用。方法:通过 RT-PCR 技术检测甘黄注射液对猪血管内皮细胞(porcine endothelial cells, PECs)激活相关基因表达的影响及采用⁵¹Cr 释放法检测其对 NK 细胞杀伤与粘附作用的影响。结果:未灭活人血清及人 NK-92 细胞可以上调猪血管内皮细胞 E-selectin 和 IL-1 α 基因的 mRNA 表达,具有激活 PECs 作用;甘黄注射液可抑制人血清处理和 NK 细胞处理的 PECs 激活相关基因的表达。细胞毒实验结果认为,该中药也可以抑制 NK 细胞对 PECs 细胞毒作用,而且具有剂量依赖关系,这与该药抑制 NK 细胞对 PECs 的粘附作用是一致的。结论:甘黄注射液不仅可抑制超急性排斥反应中血清对内皮细胞激活作用,而且可抑制延迟性排斥反应中 NK 细胞的作用。

关键词 异种移植 甘黄注射液 猪内皮细胞激活 NK-92 细胞 细胞粘附作用 细胞毒作用

Preliminary Study on Effect of Ganhuang Injection on Reject Reaction of Xenograft SHI Bin, YIN Hui-jun, HUANG Xiu-ying, et al *Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing (100080)*

Objective: To study the effect of Ganhuang Injection (GHI) on reject reaction of xenograft. **Methods:** RT-PCR technique was used to detect the activated relevant gene expression in porcine endothelial cells (PEC), and ⁵¹Cr releasing method was used to test the killing and adhesion action of NK cells. **Results:** The normal human serum and human NK-92 cell could up-regulate the mRNA expressions of E-selectin and IL-1 α gene in PEC, showing the PEC activating action, GHI could inhibit these activated gene expressions. Cyto-toxic experiment showed that GHI could also inhibit the cytotoxicity of NK cell on PEC dose-dependently, which was in accord with its inhibition on adhesive action of NK on PEC. **Conclusion:** GHI could inhibit not only the PEC activation in hyperacute rejection, but also the function of NK cells in delayed xenograft rejection.

Key words xenotransplantation, Ganhuang Injection, porcine endothelial cell activation, NK-92 cell, cell adhesion, cyto-toxic action

人类移植器官的短缺促进了异种移植的发展。基于社会伦理学、动物生理及解剖学特征等方面的原因,猪被认为是最理想的异种器官供体动物。但是猪到人或灵长类的远缘异种器官移植中,在几分钟到几小时之内不可避免地要发生超急性排斥反应(HAR),接着会发生延迟性排斥反应(DXR)。在 HAR 中,主要是体液成分参与的免疫排斥反应,受体血清中存在的异种天然抗体(XNAs)与供体细胞表面的抗原结合,通过激活补体介导超急性排斥反应的发生。在延迟性排斥

反应中,NK 细胞的作用备受关注。许多体外实验研究证实,NK 细胞不仅作为“自然”杀伤细胞,可以对猪内皮细胞具有细胞毒作用^[1],而且其具有的非细胞毒作用,可以诱导猪内皮细胞产生显著的形态学变化^[2],出现促凝血表型^[3],激活内皮细胞,上调细胞因子和粘附分子的表达。因此 NK 细胞通过这两种效应参与异种移植排斥反应。粘附分子在这两种效应的产生、发展过程中都起重要作用,它可以介导 NK 细胞对猪内皮细胞的粘附,从而介导对内皮激活、表型变化及杀伤。那么通过药物抑制内皮细胞的细胞因子及粘附分子表达是否会抑制 NK 细胞对内皮细胞的粘附和杀伤作用呢?本实验通过中药甘黄注射液来抑制猪内皮细胞细胞因子及粘附分子的表达,进一步观察甘黄注射液是否可以抑制 NK 细胞对内皮细胞的激活和杀伤作用。

^{*} 国家自然科学基金委“九五”重大项目基金资助课题(No. 39993430)和国家“863”计划资助课题(No. 2001AA216071)

1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所(北京 100080); 2. 中国医学科学院中国协和医科大学心血管研究所 阜外心血管病医院

通讯作者:孙方臻, Tel: 010-62645835, E-mail: sunfangzhen@sina.com

材料与方法

1 试剂

Taq 酶为 TaKaRa 公司产品;逆转录试剂盒为 Promega、TaKaRa 公司产品;台盼蓝、乙二醛、DEPC、DMSO 为 Sigma 公司产品;Trizol 试剂盒、Extaq、M199 培养基、琼脂糖为 GIBCO 公司产品。胎牛血清(FCS)为北京军区兽医防治中心生物工程开展研究室产品;人血清(NHS)购自北京红十字会血液中心。 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 溶液(1mCi/ml)为英国 Amersham 公司产品。其他试剂为 AR 或以上级。

2 细胞准备

2.1 猪内皮细胞分离培养与鉴定 参照 Ryan 等^[4]的方法,无菌条件下取新鲜的猪胸主动脉,纵向剪开血管,用手术刀轻轻刮取血管内表面的内皮细胞层,获取细胞后以 M199 培养液培养(含 15% FCS, 0.01mmol/L 胸苷等)。经形态学、vWF 免疫组化及 Dil-Ac-LDL 摄取法鉴定,均未发现杂细胞。取 5~10 代细胞用于实验。

2.2 NK-92 细胞的培养 购自美国 ATCC,由 Gong 等^[5]建系,表型为 $\text{CD}_3^- \text{CD}_{16}^- \text{CD}_{56}^+$ 。用含 15% FCS、15% 马血清和 100U/ml rhIL-2 的 α -MEM 培养液培养。

3 甘黄注射液的制备 甘黄注射液由甘草、大黄组成,采用水醇法,根据中药有效成分大部分既溶于水又溶于醇的原理,利用其中所含成分在水中或乙醇中溶解度不同而进行纯化。具体制备方法严格按注射液制备流程进行。2g/2ml 安瓿熔封,4℃ 贮存备用。

4 甘黄注射液药物半数致死量(LD_{50})的确定 细胞于 60mm 培养板中长至 80%~90% 汇合时,吸去培养液, PBS 洗单层细胞 2 次,分别加入含 20% 胎牛血清的 M199 培养液,然后加入不同剂量药物培养 4h 后,制备单个细胞悬液(10^6 细胞悬液),取 9 滴细胞悬液移入小试管中,加 1 滴 0.4% 台盼蓝溶液混匀,在 3min 内,用血球计数板分别计数活细胞和死细胞。

5 激活相关基因表达的 RT-PCR 检测 PEC 在培养板中生长至汇合时,吸去培养液,用 PBS 洗细胞两次,加入 20% 人血清或人 NK-92 细胞(NK-92:PEC 为 25:1),再加入一定量甘黄注射液,共孵育 4h 后,弃上清, PBS 彻底洗细胞两次,迅速加入 Trizol 变性液,提取细胞总 RNA,操作按 Trizol 试剂(GIBCO)说明书进行。然后取 2 μg 总 RNA,以 Oligod(T)₁₅ 为引物按照 Promega 公司提供的操作步骤,进行逆转录反应,再用 β -actin, IL-1 α , E-selectin 的特异引物进行 PCR 扩增

反应,检测猪血管内皮细胞激活相关基因(IL-1 α , E-selectin)的表达,以 β -actin 作为基因转录内对照。

根据已知序列合成 β -actin, IL-1 α , E-selectin 的上下游引物分别为:

β -actin: 5'ATGTTTGAGACCTTCAACAC 3'

5'CACGTCACACTTCATGATGGA 3'

IL-1 α : 5'GCAGCCACCGGAAGATTCTG 3'

5'CTACATACGGCCTGTCAACAC 3'

E-selectin 5'GACTCGGGCAAGTGAATGATGAG 3'

5'CATCACCATTCTGAGGATGGCCGA 3'

IL-1 α 的扩增条件为 94℃ 30s, 63℃ 30s, 72℃ 90s, 进行 35 个循环。 β -actin 和 E-selectin 的扩增条件为 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 1min, 进行 35 个循环。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

6 细胞粘附检测 参照 Inverardi 等^[6]的方法,以 ^{51}Cr 标记进行粘附率检测。内皮细胞经胰酶消化、离心、计数,调整到适当的浓度后,接种于 24 孔板中,长至汇合状态。吸去培养液, PBS 洗 3 次,加入含甘黄注射液 37℃ 预热的培养液,预孵育 30min 后,加入 NK-92 细胞。NK-92 细胞用 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 标记(37Bq/细胞), 37℃ 5% CO_2 培养箱中孵育 90min。用 2 倍体积的 Hank's 液洗 3 次,然后加入新鲜完全培养液,调整细胞浓度,以一定比例和内皮细胞孵育 30min,再用 37℃ 预热的培养液轻轻洗去未粘附细胞。加入 1% SDS 溶液 400 μl 裂解细胞, 37℃ 孵育 30min,取 200 μl 上清在 γ -计数器检测同位素释放量。每孔粘附细胞数和抑制率按如下公式计算:

粘附细胞数/孔 = (同位素释放量 $\times 2$) / (同位素标记量 $\times 3.035$) / 标记细胞数

抑制率(%) = (对照组粘附数 - 加药组粘附数) / 对照组粘附数 $\times 100\%$

(注: γ 计数器通过测定 1Bq = 3.035cpm)

7 细胞毒检测 以 ^{51}Cr 释放法测定 NK 细胞杀伤率。 ^{51}Cr 标记参照 Inverardi 等^[6]的方法,内皮细胞经胰酶消化、离心、计数、调整细胞浓度后,接种于 24 孔板中,待贴壁后,加入适量 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (22.2Bq/细胞), 37℃ 孵育 1.5h,以预热的 M199 培养液洗 3 遍。按不同效靶比调整 NK 细胞浓度,每孔加入 100 μl NK 细胞,最大释放组每孔加入 100 μl 4% SDS,自发释放组每孔加入 100 μl 培养液,终体积为 400 μl ,药物处理组在加入 NK 细胞前,加入含甘黄注射液的培养液,预孵育 30min 后,再加入 NK 杀伤细胞,每组重复 4 孔。37℃ 5% CO_2 培养 4h 后,以 200 $\times g$ 离心 5min,每孔取 200 μl 上清测定 γ 计数,按以下公式计算 ^{51}Cr 释放率

(杀伤率):

释放率(%)=(实验组-自发释放组)/(最大释放组-自发释放组)×100%

8 统计学方法 采用 t 检验。

结 果

1 甘黄注射液药物半数致死量(LD₅₀)的确定
台盼蓝染色后,显微镜下观察发现,死细胞被染成淡蓝色,而活细胞拒染。确定 LD₅₀为 300μg/ml。

2 甘黄注射液对猪血管内皮细胞激活的影响
RT-PCR 结果显示(见图 1),iNHS 处理组未检测到 E-selectin 和 IL-1α 的 cDNA,NHS 处理组可检测到 E-selectin 和 IL-1α 的 cDNA,说明 NHS 中的补体可导致 PEC 的激活,导致激活相关的基因被诱导表达,而灭活补体的 iNHS 则不具有这种激活作用。当含 NHS 的 M199 培养液中加入药物(160μg/ml)培养 4h 后,PCR 结果显示,加甘黄注射液组未检测到 E-selectin 和 IL-1α 的 cDNA,说明甘黄注射液具有抑制 NHS 刺激猪血管内皮细胞激活相关基因表达的作用。



图 1 甘黄注射液抑制人血清激活的 PECs 激活相关基因的表达

注:NHS 表示未灭活正常人血清,iNHS 表示灭活人血清,NHS+药表示正常人血清加甘黄注射液,beta-actin 为 RT-PCR 基因转录的内对照

3 甘黄注射液抑制 NK-92 对猪内皮细胞激活作用
图 2 结果显示,当不加药物时,NK-92 可以激活 PECs,使其表达 IL-1α 和 E-selectin(有两条带,出现非特异性扩增)。当加入 40μg/ml 的药物共孵育时,激活相关基因的表达水平较阳性对照为低。当加入的剂量为 80μg/ml 时,可以完全抑制 IL-1α 的表达,E-selectin 的表达也下降到较低的水平。结果表明,甘黄注射液不仅可以抑制 NK-92 细胞对 PECs 的激活作用,而且这种抑制作用具有浓度依赖效应。



图 2 甘黄注射液以剂量依赖方式抑制 NK 细胞激活的 PECs 激活相关基因表达

注:beta-actin 为 RT-PCR 的内对照,E-selectin 出现两条带是非特异扩增,1 为不加药物组,2 为加 40μg/ml 药物组,3 为加 80μg/ml 药物组

4 甘黄注射液对 NK 细胞粘附的影响
粘附实验结果表明(见图 3),当用药浓度为 80μg/ml 时,各不同的效靶比例组,甘黄注射液抑制 NK 细胞对猪内皮的粘附(经配对 t 检验,加药组与对照组相比,t=2.615,P<0.05),并且随着效靶比增加,抑制作用趋



图 3 甘黄注射液在不同效靶比例条件下对 NK 细胞粘附的抑制作用

注:图中纵轴示粘附的 NK 细胞数(NK 细胞数/10 000 个内皮细胞),横轴示效靶比,NK 细胞与内皮细胞的比例

于明显,抑制率范围为 4%~39%。图 4 结果显示,随着甘黄注射液浓度的增加,NK-92 对 PECs 的粘附作用逐渐减少,粘附率与药物浓度两者呈负相关(r=-0.945,P<0.01)。

5 甘黄注射液处理猪内皮细胞后对 NK 细胞杀伤作用的影响
细胞毒结果(如图 5)显示,在 E:T 比例为 5:1、10:1、25:1、50:1 条件下,NK 细胞对未进行药物处理的 PEC 的杀伤率分别为 29.5%、34.8%、51.6%、75.1%;对药物处理的 PEC 的杀伤率分别为 4.4%、7.4%、8.7%、5.7%;表明甘黄注射液在不同 E:T 比例下可明显抑制 NK 细胞对 PEC 的细胞毒作

讨 论

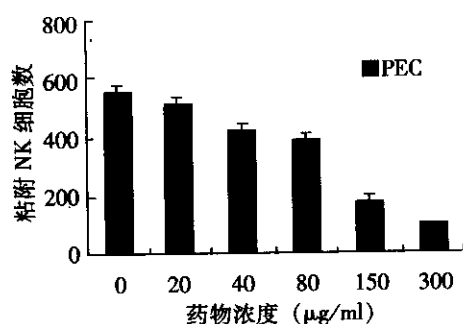


图 4 甘黄注射液呈浓度依赖方式抑制 NK 细胞对猪内皮细胞的粘附作用

用(经配对 t 检验,加药组与对照组相比, $P < 0.05$)。提示甘黄注射液可用于异种移植排异反应中,抑制 NK 细胞的杀伤作用。图 6 结果显示,随着甘黄注射液浓度的增加, NK-92 对 PECs 的杀伤作用逐渐减弱,杀伤率与药物浓度两者呈负相关($r = -0.931$, $P < 0.05$)。

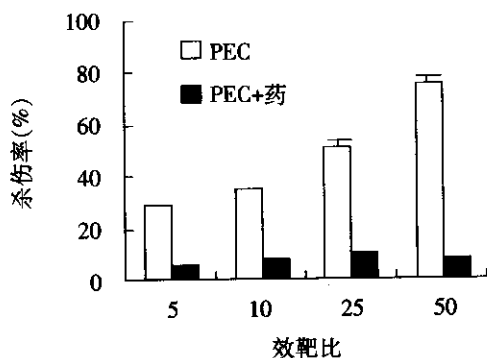


图 5 甘黄注射液抑制 NK 细胞对猪内皮细胞的杀伤作用
注:图中纵轴为 PEC 的死亡百分比,横轴是刺激细胞(Effector)与靶细胞(Target)的比例,分别是 5:1、10:1、25:1、50:1

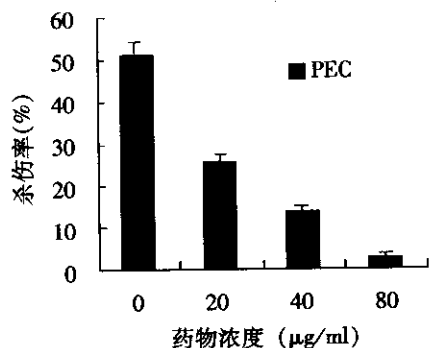


图 6 甘黄注射液呈浓度依赖方式抑制 NK 细胞对猪内皮细胞的杀伤作用

大黄甘草汤源于张仲景的《伤寒杂病论》,书中用于治疗肠痈(化脓性阑尾炎)。现代临床有用于治疗系统性狼疮性肾炎等的报道。本研究经过一定的工艺改造,将其改制成甘黄注射液。甘草的主要成分为甘草甜素,其水解产物为甘草次酸,甘草次酸的化学结构与糖皮质激素相似,故有糖皮质激素样作用,它可使健康人血中游离型皮质醇含量增高,还能抑制肝脏对皮质激素的灭活。实验研究表明:甘草粗提物能降低免疫记忆细胞数和产生抗体的细胞数,阻碍巨噬细胞传递免疫信息,呈免疫抑制作用。甘草次酸对大鼠的棉球肉芽肿及皮下肉芽肿性炎症及实验性关节炎有抑制作用。甘草甜素或甘草次酸对蛋白引起的豚鼠的过敏反应均有不同的抑制作用。大黄含有大黄素、大黄酸、大黄酚及鞣酸等成分,能够抑制胶原合成,抑制组织异常增生,促进分解,使增生变性的结缔组织软化、吸收。改善局部循环及血管通透性,减少渗出,促进炎症局限化及吸收等。它能抑制二磷酸腺苷、胶原、花生四烯酸等诱导的血小板聚集,抑制组织 5-羟色胺(5-HT)从血小板释放,提高血小板内 cAMP 含量,影响血栓素 A_2 /前列腺素 I_2 (TXA_2/PGI_2)平衡调节系统,可抑制 TXA_2 的合成和活性,从而使 PGI_2 抗血小板凝集作用明显增强。

本研究采用 RT-PCR 技术,首先研究了中药甘黄注射液对人血清处理激活的猪内皮细胞抑制作用。在超急性排斥反应中,人血清中异种天然抗体可以通过补体途径激活猪内皮细胞,这一点在本次实验和其他实验室研究中得到证实^[7]。我们通过施加甘黄注射液发现,该药可以抑制由未灭活血清激活的猪内皮细胞激活相关基因表达(E-selectin 和 $IL-1\alpha$),因此提示该药用于异种超急性排斥反应中,可以抑制内皮细胞 I 型激活,但其抑制机制并不清楚。已有实验研究显示,某些药物可以调节粘附分子的表达。阿司匹林可抑制细胞因子(如 $TNF-\alpha$ 等)诱导的 E 选择素 mRNA 的转录,减少细胞膜上蛋白的表达,其作用机理是抑制转录因子 $NF-\kappa B$ 的激活^[8]。花生四烯酸及其衍生物 15-HETE、15-HPETE 均可抑制 $TNF-\alpha$ 诱导的 E 选择素的表达,其作用机理可能与抑制蛋白激酶 C 的易位有关^[9]。酸性成纤维细胞生长因子与肝素合用可完全抑制 $IL-1$ 诱导的 ICAM-1 表达增加,亦可减少 E 选择素的表达,但其作用机制不明^[10]。

接着我们研究了甘黄注射液对 NK 细胞激活猪内皮细胞的影响,结果发现甘黄注射液可以抑制 NK 对

猪内皮细胞的激活,而且随着用药剂量升高,其抑制作用增强。进一步研究甘黄注射液对 NK 细胞介导细胞毒作用的影响时发现,甘黄注射液处理内皮细胞后,处理组的⁵¹Cr 释放率明显低于未处理组,表明该中药也可以抑制 NK 细胞对 PEC 细胞毒作用,提示其用于异种移植中,不仅可以抑制内皮细胞的 II 型激活,而且可以抑制 NK 细胞介导的细胞排斥反应。甘黄注射液抑制 NK 细胞的杀伤作用的机制不明,可能与该药物抑制粘附分子(如 E-selectin 等)及细胞因子(如 IL-1 α)的表达有关。Dawson 等^[2]研究认为,NK 细胞对猪内皮细胞的激活和杀伤是通过不同的机制,对激活而言,可能有象 LT $\alpha\beta$ 这样的膜分子介导激活作用,杀伤作用可能是通过“迷失自我”机制在起作用。这两种机制起作用的前提是均需要细胞与细胞的直接接触,粘附分子起到加强作用。因此,通过抑制 NK 细胞的粘附作用,可以抑制其杀伤效应。本研究结果表明,甘黄注射液可以抑制 NK-92 细胞对猪内皮细胞的粘附作用,而且存在剂量效应依赖关系。这与甘黄注射液对 NK 细胞杀伤效应的影响是一致的,在同样的剂量水平存在量效关系。近年来对 NK 细胞介导的细胞毒作用机制研究较多,认为不仅有粘附分子的参与,而且还有靶细胞表面的 MHC I 类分子^[11]与 NK 细胞表面的抑制性受体及靶细胞表面激活性糖抗原(α -Gal 等)与 NK 细胞表面的激活性受体介导的作用^[12]。甘黄注射液是否影响这些过程,需要进一步研究。

细胞粘附是细胞识别和杀伤的第一步,淋巴细胞与内皮细胞的粘附是一种复杂的细胞表面粘附分子及细胞因子间的相互作用。在发生排斥的移植体中,有大量的 E-selectin 表达。E-selectin 主要介导淋巴细胞的滚动粘附,其主要配基是 sialyllewisx(slex)。猪 E-selectin 已被克隆,与人 cDNA 有 70% 的同源性,尽管与人 E-selectin 相比只包括 2 个 SCR 结构域,但仍可以粘附人白细胞,建议该反应性是跨物种保留着^[13]。当 COS 细胞过表达猪 E-selectin 时,可以介导中性粒细胞的粘附;当猪 E-selectin 的选择素结合域和人选择素的表皮生长因子结构域融合到人 IgG 固定区域,组成嵌合分子,可以结合猪粒细胞和淋巴细胞;而缺乏 E-selectin 的鼠可表现正常的白细胞的滚动,但在细胞因子激活的内皮细胞中减少了白细胞的粘附^[14]。用抗体封闭 CD₆₂E 后,可以抑制 NK 细胞对猪内皮细胞的杀伤^[15]。E 选择素在静息的内皮细胞不存在,某些细胞因子可诱导其转录,用 IL-1 α 刺激内皮细胞可以上调 E-selectin 的表达,从而增加白细胞的粘附,封闭 E 和 P-selectin 可以抑制淋巴细胞的滤过。IL-1 等细

胞因子激活内皮细胞的时间不同,E 选择素及 CD₁₁/CD₁₈ 所起作用也不同。有实验表明^[16],激活后 4h,E 选择素、CD₁₁a/CD₁₈ 及 CD₁₁b/CD₁₈ 所介导的粘附大约各占 1/3。激活后 24h,E 选择素介导的粘附却加强,这与内皮细胞表面的 E 选择素及 ICAM-1 分子的表达相一致。IL-1 激活内皮细胞后 2~8h,E 选择素表达最高,随后逐渐消退,而 ICAM-1 的 mRNA 要在激活后 4h 才开始升高,到 24h 达到最高点。

总之,甘黄注射液不仅可抑制人血清处理猪内皮细胞的激活作用,而且可抑制 NK 细胞对猪内皮细胞的激活作用;它不仅可以抑制 NK 细胞的细胞毒作用,而且可以抑制 NK 细胞对猪内皮细胞的粘附作用。因此认为,该中药不仅可以抑制异种超急性排斥反应中的人血清的反应,而且对延迟性排斥反应中 NK 细胞的反应(包括非毒性反应和毒性反应)有抑制作用。

参 考 文 献

- 1 Matter-Reissmann UB, Forte P, Schneider MK, et al. Xenogeneic human NK cytotoxicity against porcine endothelial cells is perforin/granzyme B dependent and not inhibited by bcl-2 overexpression. *Xenotransplantation* 2002 5(5):325—337.
- 2 Dawson JR, Vidal AC, Malyguine AM. Natural killer cell-endothelial cell interactions in xenotransplantation. *Immunol Res* 2000 23(2—3):165—176.
- 3 Malyguine AM, Saadi S, Holzknecht RA, et al. Induction of procoagulant function in porcine endothelial cells by human natural killer cells. *J Immunol* 1997 159:4659—4664.
- 4 Ryan US, Maxwell G. Isolation, culture and subculture of bovine pulmonary artery endothelial cells. *Mechanical Methods* 1986 10(1):3—5.
- 5 Gong JH, Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994 8(4):652—658.
- 6 Inverardi L, Chissi B, Stolzer AL, et al. Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionarily conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissues. *Transplantation* 1997 63(9):1318—1330.
- 7 Palmethofer A, Galili U, Dalmasso AP, et al. Alpha-galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells (Type I activation). *Transplantation* 1998 65(6):844—853.
- 8 Weber C, Erl W, Pietsch A, et al. Aspirin inhibits nuclear factor- κ B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation* 1995 91(7):1914—1917.

9. Huang ZH, Bates EJ, Ferrante JV, et al. Inhibition of stimulus-induced endothelial cell intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cellular adhesion molecule-1 expression by arachidonic acid and its hydroxy and hydroperoxy derivatives. *Circ Res* 1997;80(2):149—158.
10. Minter AJ, Keoshkerian E, Chesterman CN, et al. Fibroblast growth factor and heparin protect endothelial cells from the effects of interleukin 1. *J Cell Physiol* 1996;167(2):229—237.
11. King A, Allan DS, Bowen M, et al. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol* 2000;30(6):1623—1631.
12. Costa C, Zhao L, Burton WV, et al. Transgenic pigs designed to express human CD59 and H transferase to avoid humoral xenograft rejection. *Xenotransplantation* 2002;9(1):45—57.
13. Tsang YTM, Stephens PE, Licence ST, et al. Porcine E-selectin: cloning and functional characterization. *Immunology* 1995;85:140—145.
14. Robinson LA, Tu LL, Steeber DA, et al. The role of adhesion molecules in human leukocyte attachment to porcine vascular endothelium: implications for xenotransplantation. *J Immunol* 1998;161:6931—6938.
15. Tsuyuki S, Horvath A, Arcidiacono JA, Bloom ET. Effect of redox modulation on xenogeneic target cells: the combination of nitric oxide and thiol deprivation protects porcine endothelial cells from lysis by IL-2 activated human NK cells. *J Immunol* 2001;166:4106—4114.
16. Kunkel C, Ley K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice, E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res* 1996;79(6):1196—1204.

(收稿 2002-12-30 修回 2003-02-15)

葛根素罕见的严重不良反应

徐 芳 何可南

病历简介 患者刘某,女性,72岁。因乏力、心悸5天于2000年5月4日疑为冠心病住院,既往有冠心病及肝硬化史。入院检查除腹壁手术疤痕外,无异常表现,化验常规、肝功酶谱及肾功能均在正常范围,腹腔B超、CT示肝硬化,EKG示窦缓、心肌损害。入院后予5%葡萄糖注射液500ml加葛根素500mg静脉滴注,症状改善,连续用药10天,间隔4天后重复相同剂量静脉滴注,当天在滴注将毕时感左腰部不适,因尿意起床,出现一过性眩晕,平卧后好转,由而置疑与葛根素有关,次日在严密观察下滴注,约1h后(滴入150ml左右),患者诉有便意,眼睛发花,解软便1次,旋即感到左腰部疼痛,难以忍受,并向左大腿部放射,查体见BP120/67.5mmHg,T36.8℃,神志淡漠,面色灰暗,全身皮肤呈青紫网状花纹,滴注局部有荨麻疹样皮疹,巩膜不黄,颈神经(-),颈软,心肺无殊,腹平软,左CV角击痛明显,锥体束征(-)。考虑为葛根素不良反应所致,立即停用,予静脉推注地塞米松10mg和10%葡萄糖酸钙注射液10ml及输液处理,历2h皮疹及青紫网状花纹逐渐隐退,腰痛亦趋缓解,但解出尿液初似浓茶,入晚呈暗红色共约500ml,尿检仅见少许红细胞而隐血试验强阳性,且体温亦渐升至38.6℃。次日查房,其体温降至正常,尿浓茶色,量稍少,左肾区轻叩痛,但巩膜皮肤黄染。血生化示总胆红素(TBIL)288.1 μ mol/L,直接胆红素(DBIL)146.3 μ mol/L,ALT1068IU/L,AST1072IU/L,碱性磷酸酶(AKP)193IU/L, γ -谷氨酰转氨酶(GGT)200IU/L,胆碱酯酶(CK)251IU/L,羟丁酸脱氢酶

(HDBH)1741IU/L,BUN10.9 μ mol/L,肌酐(Cr)83 μ mol/L,总胆汁酸(BA)53.6 μ mol/L,乳酸脱氢酶(LDH)2108IU/L,HBsAg(-),血红蛋白由12.5g/L降至8.5g/L,经输血400ml及红细胞2U,补液、护肝药(甘利欣、肝复肽等)治疗,5天后血红蛋白尿消失,8天后尿素氮降至正常,15天后肝酶谱恢复正常,1个月后血TBIL及DBIL至正常范围,HBsAg(-),反应后约1周内患者有厌食乏力及肝区不适之主诉。

讨 论 葛根素有扩张冠脉和脑血管、降低心肌耗氧、抑制血小板凝集、降低血粘度及改善微循环作用,且用药较安全,应用于临床各科,但随着用药的日益广泛,其不良反应的报道亦有所增加,但在同一病例同时出现血管内溶血,持续5天的血红蛋白尿以及见有肾绞痛、发热及溶血性贫血,肝细胞严重损害,总胆红素与直接胆红素急剧上升,肝功酶谱的显著异常等在临床上颇为罕见,其黄疸的性质也是溶血性与肝细胞性共同所致。本例入院时各项肝功能指标在正常范围,反应经治疗后均得恢复。固然如此,对有慢性肝病患者使用葛根素有无不利影响,尚有待今后临床与药理上的观察与探讨。

对葛根素不良反应的发生机制尚不完全明确,《中国医学论坛报》第28卷19期刊载《葛根素静滴可致急性溶血和肾衰》一文中,首次报道了北京大学第一临床医院朱玉珍氏运用药物模拟试验手段,在1例重复使用葛根素致急性溶血和肾衰病例中查到了IgM型抗葛根素抗体,证实了葛根素注射液确存在有过敏反应,值得在今后临床用药时引起重视,尤其是对重复静脉滴注葛根素的患者。

(收稿 2002-12-30)