

表 2 吸收促进剂对豆腐果苷大鼠小肠吸收的影响

 $(\bar{x} \pm s, n=5)$ Table 2 Effect of absorption enhancer on helicid absorption in small intestine of rats $(\bar{x} \pm s, n=5)$

组别	K_a/h^{-1}	$t_{1/2}/h$	P/%
豆腐果苷 $(13.393 \mu g \cdot mL^{-1})$	0.0577 ± 0.0020	12.02 ± 0.42	6.20 ± 1.59
0.5% 牛胆盐	0.1130 ± 0.0372	6.65 ± 2.12	7.89 ± 1.72
1.0% 牛胆盐	0.1630 ± 0.0363	4.42 ± 0.99	11.31 ± 3.33
十二烷基硫酸钠	0.0602 ± 0.0092	11.73 ± 1.85	6.85 ± 1.31
卡波姆	0.1246 ± 0.0280	5.82 ± 1.15	9.94 ± 2.35
冰片	0.0725 ± 0.0166	8.36 ± 0.71	8.19 ± 1.78

4 讨论

酚红在肠吸收实验中用于测定肠对水分的吸收,以计算肠循环液中药物质量浓度的变化。

实验中考察了低、中、高质量浓度豆腐果苷 K_a 。无显著性差异,说明 K_a 不随质量浓度变化,认为豆腐果苷的大鼠小肠吸收属于一级动力学过程,吸收机制为被动扩散。

在本实验研究过程中发现,豆腐果苷不同质量浓度下, $t_{1/2}$ 较长,而 P 只有不到 10%,属于吸收较差的药物。为提高豆腐果苷口服生物利用度,考察了多种吸收促进剂^[7]对豆腐果苷肠吸收的影响。胆酸盐是常规的黏膜吸收促进剂,其作用机制是可逆性调节紧密连接,毒性低。实验考察了两个质量浓度牛胆盐对豆腐果苷小肠吸收的影响情况,结果表明,牛胆盐具有较明显的促吸收效果,且质量浓度越高促吸收效果越明显。卡波姆是生物黏附性高分子聚合物,由于生物黏附性和安全性使其应用前景广阔。作为促进剂,卡波姆能够打开紧密连接,增加旁细胞转运,同时抑酶效应和生物黏附性也可促使药物肠吸收增加。实验结果表明,卡波姆对豆腐果苷有较强的促吸收作用。中医认为,冰片味辛苦、微寒,归心、肝、肺,有开窍醒神、通诸窍等作用,常作为多种中药的

“药引”,但其促吸收机制还未明确。实验考察 0.04% 的冰片即可使豆腐果苷的 K_a 增加 1.3 倍。冰片对豆腐果苷吸收具有促进作用。十二烷基硫酸钠促吸收机制是溶解肠黏膜成分,释放蛋白质和磷脂,影响乳酸脱氢酶和线粒体乳酸脱氢酶的活性,一般来说促吸收效应强但毒性大,在研究中常作为对照物。实验中由于溶解度的关系,为得到澄清供试液,十二烷基硫酸钠浓度仅为 0.7 mmol/L,结果表明,该浓度下对豆腐果苷肠吸收并无影响。

大鼠在体吸收实验应能代表药物在正常剂量下的吸收。成年人正常服用豆腐果苷的剂量约为 50 mg/次,根据人与大鼠之间的体表面积换算法^[8],得到大鼠正常服用剂量为 0.89 mg/次。本实验豆腐果苷质量浓度确定为 4.464~40.179 $\mu g/mL$,即循环液含药物 0.22~2.01 mg,基本可以代表药物在正常剂量下的吸收情况。实验结果提示在肠道的吸收较差,但是多种常用吸收促进剂可在一定程度上改善其吸收,这为豆腐果苷剂型设计和开发提供了科学依据,对制剂处方具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] 陆保平,常 鸿. 豆腐果中豆腐果苷含量的快速测定 [J]. 中国执业药师, 2007, 12: 34-35.
- [2] 赵 楠,杨红菊,王艳华,等. 豆腐果苷抗神经病理性疼痛药效学评价 [J]. 中国药理通讯, 2005, 22(3): 38-39.
- [3] 张德元,冯 平. 豆腐果苷片治疗紧张型头痛的临床观察 [J]. 中华实用中西医杂志, 2005, 18(7): 1049-1050.
- [4] 兰胜作,李 杰,熊生才,等. 豆腐果苷片配合睡眠卫生指导治疗失眠症临床观察 [J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(8): 604-606.
- [5] 卢文芸,陆伟根,陈亭亭,等. 豆腐果素缓释微丸的研究. I. 在大鼠胃肠道的吸收 [J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(3): 241-244.
- [6] 陆 彬. 药剂学实验 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1994.
- [7] 沈 腾,徐惠南. 肠吸收促进剂的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(9): 476-480.
- [8] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 1991.

大黄素对大鼠肝移植排斥反应相关细胞因子的影响

林文琴¹,杨 满²,荆 河²,徐贤绸²,童洪飞²,林胜璋^{2*}

(1. 温州医学院附属第一医院,浙江 温州 325027; 2. 温州医学院附属第二医院,浙江 温州 325027)

摘 要:目的 探讨大黄素对肝移植大鼠排斥反应中相关细胞因子表达的影响。方法 采用大鼠原位肝移植模型,随机分为 3 组:对照组、移植组、大黄素组,于术后第 5 天取血。用 ELISA 法检测血清中白细胞介素-2 (IL-2)、 γ -干

收稿日期:2008-03-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30572395)

作者简介:林胜璋(1969),男,教授,硕士,研究方向为肝胆胰外科基础与临床。Tel: 13858864450

* 通讯作者 林胜璋 E-mail: wzf21sz@163.com

扰素 (INF- γ)、白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-10 (IL-10)、白细胞介素-12 (IL-12)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平。结果 移植组 IL-2、IL-12、INF- γ 、TNF- α 表达明显升高, IL-4、IL-10 表达显著降低, 与对照组相比, 差异非常显著 ($P < 0.01$)。大黄素组 IL-2、IL-12、INF- γ 、TNF- α 表达显著降低, 而 IL-4、IL-10 表达显著升高, 与移植组相比, 差异非常显著 ($P < 0.01$)。结论 大黄素抑制肝移植排斥反应主要与其抑制 IL-2、IL-12、INF- γ 、TNF- α 等 Th1 型细胞因子的表达, 促进 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-10 的表达, 使免疫反应由 Th1 型向 Th2 型偏移有关。

关键词: 大黄素; 肝移植; 移植排斥; 细胞因子

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)12-1853-03

大黄素是一种从大黄中提取的蒽醌类化合物, 能延长肝移植后大鼠的存活时间, 有效减轻排斥反应, 具体机制有待阐明^[1]。目前众多实验证实, 细胞因子在移植排斥反应中发挥重要作用。移植排斥反应时, Th1 型细胞因子能促进同种抗原特异性的细胞毒性 T 细胞活化、增殖、分化, 从而加速移植排斥反应, Th2 型细胞因子则通过抑制 Th1 型细胞因子表达而调控移植排斥反应^[2]。常见的 Th1 型核心细胞因子有白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-12 (IL-12)、 γ -干扰素 (INF- γ) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等, Th2 型核心细胞因子有 IL-4 和 IL-10 等^[3]。大黄素对 IL-2、INF- γ 、IL-4、IL-10、IL-12 和 TNF- α 等这些在移植排斥反应中调节 T 细胞增殖分化的细胞因子的表达有无影响, 目前国内外尚未见报道。本研究拟通过大鼠原位肝移植模型, 探讨大黄素对大鼠肝移植排斥反应中 IL-2、INF- γ 、IL-4、IL-10、IL-12 和 TNF- α 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与模型制备: 健康雄性近交系 LEW 大鼠 32 只和 BN 大鼠 16 只, 体质量 250~280 g, 购自北京维通利华公司, 饲养条件符合 SPF 级。随机分为 3 组, 对照组: 供、受体各 8 只, 均为 LEW 大鼠 (同基因移植, 无排斥反应); 移植组: 供、受体各 8 只, LEW 大鼠为供体, BN 大鼠为受体; 大黄素组: 供、受体各 8 只, 供体为 LEW 大鼠, 受体为 BN 大鼠, 肝移植术后每天 ip 大黄素 (购自西安华萃公司, 质量分数 98%) 50.0 mg/kg。大鼠原位肝

移植模型是笔者根据文献介绍的两袖套法进行适当改进与简化制成的^[4], 入选模型动物均为排除手术并发症者。

1.2 指标检测: 于术后第 5 天麻醉后, 下腔静脉穿刺取血。ELISA 法检测血清中 IL-2、INF- γ 、IL-4、IL-10、IL-12 和 TNF- α 的水平。ELISA 试剂为 Biorapid 公司产品。切取肝组织作病理切片, 观察排斥反应程度与细胞因子水平的关系。

1.3 统计学处理: 所得计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 10.0 统计分析软件包对数据进行处理。

2 结果

2.1 肝移植排斥反应病理观察结果: 移植组大鼠肝组织发生严重排斥反应, 肝组织汇管区大量炎性细胞浸润, 胆管内皮有坏死。与移植组相比, 大黄素组大鼠肝组织排斥反应明显减轻, 汇管区少量炎性细胞浸润, 胆管内皮基本完整, 见图 1。

2.2 大黄素对肝移植大鼠血清各相关细胞因子的影响: 见表 1。移植组大鼠血清中 IL-2、INF- γ 、IL-12 和 TNF- α 水平明显升高, 而 IL-4 和 IL-10 水平显著降低, 与对照组相比, 差异非常显著 ($P < 0.01$); 大黄素组血清中 IL-2、INF- γ 、IL-12 和 TNF- α 水平明显降低, 而 IL-4 和 IL-10 水平显著升高, 与移植组比较, 差异均非常显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究结果显示, 肝脏移植急性排斥反应时, IL-2、IL-12、INF- γ 和 TNF- α 水平明显升高, 而 IL-4 和 IL-10 水平显著降低, 表明肝脏移植急性排

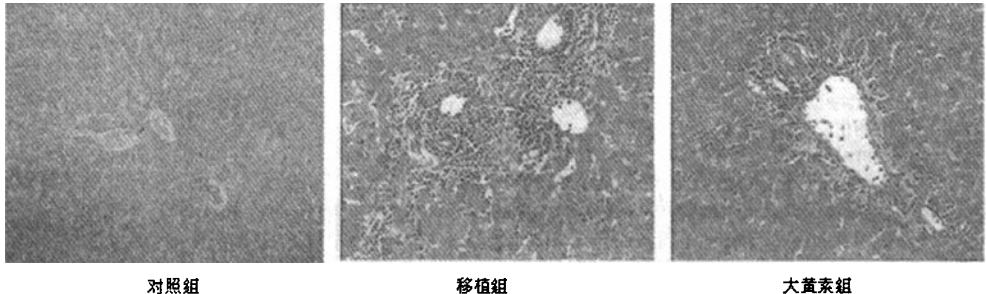


图 1 各组肝移植大鼠肝组织病理变化

Fig. 1 Pathological changes of liver tissue in every group of liver transplanted rats

表 1 大黄素对肝移植大鼠血清中 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-12 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)Table 1 Effect of emodin on levels of IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12, and TNF- α in serum of liver transplanted rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	IL-2/ (pg · mL ⁻¹)	IFN- γ / (pg · mL ⁻¹)	IL-4/ (pg · mL ⁻¹)	IL-10/ (pg · mL ⁻¹)	IL-12/ (pg · mL ⁻¹)	TNF- α / (pg · mL ⁻¹)
对照	—	27.95 ± 3.26	40.70 ± 5.87	20.98 ± 2.69	18.50 ± 2.64	8.68 ± 1.86	274.35 ± 28.40
移植	—	95.66 ± 11.26 [#]	180.20 ± 17.50 [#]	16.94 ± 2.84 [#]	11.07 ± 3.72 [#]	68.58 ± 6.48 [#]	614.58 ± 56.15 [#]
大黄素	50	78.51 ± 7.99 ^{**}	84.46 ± 10.14 ^{**}	39.47 ± 4.36 ^{**}	41.54 ± 4.95 ^{**}	39.39 ± 5.96 ^{**}	249.33 ± 29.38 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.01$; 与移植组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{*} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs transplantation group

斥反应主要为 Th1 型免疫反应。大黄素能显著抑制心脏移植排斥反应中 IL-2、IL-12、IFN- γ 和 TNF- α 等 Th1 型细胞因子的表达,促进 Th2 型细胞因子 IL-4 和 IL-10 的表达。

IL-2、IL-12、IFN- γ 和 TNF- α 是 Th1 型核心细胞因子,在诱导 Th1 型免疫反应中起重要作用。移植排斥反应越严重, Th1 型细胞因子水平越高。文献报道^[5],肝脏移植后,发生排斥时,移植肝单核-巨噬细胞内表达 TNF- α 增加,与血清中的变化同步。IL-2、IFN- γ 水平是与急性排斥反应移植血管疾病 (GVD) 密切相关的^[6]。而 IFN- γ 与 IL-12 被证实存在异基因移植排斥中有调节作用^[7]。Th1 型细胞因子具有相似的生物学作用,表现在:促进活化的 T 细胞及 NK 细胞增殖、分化,诱导多种细胞产生 Th1 型细胞因子,促进 Th1 细胞发育,抑制 Th2 细胞发育,从而加速移植排斥反应。

IL-4 和 IL-10 是主要的 Th2 型细胞因子。IL-4 主要由 CD4⁺ T 细胞产生,它可与 IL-2 竞争 IL-2R 的 γ 链,抑制 IL-2 的生物学作用,它还可以自分泌方式促进其他 Th2 型细胞因子产生及 Th2 细胞的增殖分化,抑制 Th1 型细胞因子的产生及 Th1 细胞的增殖与分化^[3]。IL-10 通过与其受体结合,发挥如下功能:①抑制 Th1 细胞因子 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 等的合成;②抑制巨噬细胞产生活性氧的中间体;③抑制单核细胞 HLA II 类抗原 DP、DR、DQ 的表达;④抑制 B7、细胞黏附分子 ICAM-1 的表达^[8,9]。

本研究发现大黄素组 IL-2、IL-12、IFN- γ 和 TNF- α 水平明显下调,也就是说,大黄素通过减少 IL-2、IL-12、IFN- γ 和 TNF- α 的产生,广泛抑制了以 Th1 型免疫反应为特征的移植排斥反应。本研究还发现,大黄素组 IL-4 和 IL-10 水平有上调,说明

大黄素对 Th2 型细胞因子的产生有较强的促进作用。综上所述,大黄素通过抑制 IL-2、IL-12、IFN- γ 和 TNF- α 产生和促进 IL-4 和 IL-10 的上调,使免疫反应向 Th2 型偏移,从而较好地解释了其抗肝移植排斥反应的效应。至于大黄素对上述细胞因子表达调控的具体机制尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 林胜璋, 徐贤绸, 童洪飞, 等. 大黄素对大鼠肝移植排斥反应的抑制作用 [J]. 中华器官移植杂志, 2007, 28(3): 147-149.
- [2] Hutchison I V, Pracica V, Perrey C, *et al*. Cytokine gene polymorphisms and relevance to forms of rejection [J]. *Transpl Proc*, 1999, 31: 734-736.
- [3] Mulligan M S, Warner R L, McDuffie J E, *et al*. Regulatory role of Th-2 cytokines, IL-10, and IL-4, in cardiac allograft rejection [J]. *Exp Mol Pathol*, 2000, 69: 1-9.
- [4] 郑树森. 肝脏移植 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2001.
- [5] Teramoto K, Tanaka Y, Kusano F, *et al*. Expression of tumor necrosis factor- α gene during allograft rejection following rat liver transplantation [J]. *Liver*, 1999, 19: 19-24.
- [6] Holweg C T, Peeters A M, Balk A H, *et al*. Recipient gene polymorphisms in the Th-1 cytokines IL-2 and IFN- γ in relation to acute rejection and graft vascular disease after clinical heart transplantation [J]. *Transpl Immunol*, 2003, 11: 121-127.
- [7] Wang H, DeVries M E, Deng S, *et al*. The axis of interleukin 12 and gamma interferon regulates acute vascular xenogeneic rejection [J]. *Nat Med*, 2000, 6: 549-555.
- [8] Ito K, Takaishi H, Jin Y. Staphylococcal enterotoxin B stimulates expansion of autoreactive T cells that induce apoptosis in intestinal epithelial cells: Regulation of autoreactive response by IL-10 [J]. *J Immunol*, 2000, 164: 2994-3001.
- [9] Tashiro H, Shinozaki K, Yhata H. Prolongation of liver allograft survival after interleukin-10 gene transduction 24-48 hours before donation [J]. *Transplantation*, 2000, 70: 336-339.