

大黄素抗小鼠皮肤移植排斥反应的实验研究

陈佩¹ 贾志姣² 陈璿^{3△}

[摘要] **目的:**探讨大黄素抑制同种异体小鼠皮肤移植排斥反应的作用。**方法:**采用 BALB/c 供体鼠 → C57BL/6 受体鼠背-背皮肤移植法建立模型,分为假手术组、模型组、大黄素组(50 mg/kg)、环孢素 A 组(10 mg/kg)、大黄素+亚剂量环孢素 A 组(大黄素 50 mg/kg+环孢素 A 5 mg/kg),腹腔注射给药 10 d,记录受体鼠移植皮片的存活时间;取血浆,酶联免疫吸附法检测 Th1 类细胞因子(IL-2, IFN- γ)和 Th2 类细胞因子(IL-4, IL-10)水平;取脾脏,流式细胞仪分析 T 淋巴细胞亚群 CD4⁺ 及 CD25⁺ 的比例。**结果:**与模型组比较,各给药组受体鼠移植皮片的存活时间均有明显延长,组间差异均有统计学意义($P < 0.01$);大黄素联合环孢素 A 组的移植皮片存活时间比大黄素组或环孢素 A 组均有明显延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,大黄素联合环孢素 A 组及大黄素组均可显著降低血浆 IL-2 和 IFN- γ 的水平,差异有统计学意义($P < 0.01$),显著升高 IL-4 和 IL-10 的水平,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,大黄素联合环孢素 A 组及大黄素组均可显著升高脾脏 CD4⁺ 及 CD25⁺ 调节性 T 细胞的比例,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论:**大黄素可抑制同种异体小鼠的皮肤移植排斥反应,其机制或与促使 Th1 向 Th2 细胞的偏移,刺激 CD4⁺ 及 CD25⁺ 调节性 T 细胞的表达,诱导免疫耐受等相关。

[关键词] 大黄素;免疫抑制;皮肤移植

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)08-0005-04

Effects of Emodin on Experimental Skin Transplantation of Mice

CHEN Pei¹ JIA Zhijiao² CHEN Jin^{3△}

¹ Medical Engineering Department, Hospital of Beijing Armed Police Forces, Beijing 100027, China;

² Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

³ First Department of Internal Medicine, Hospital of Beijing Armed Police Forces, Beijing 100027, China.

Abstract Objective: To investigate the effects of emodin against mice with xenogenic skin transplantation. **Methods:** The tergal skin transplantation model was achieved by an operation (BALB/c mice as donors and C57BL/6 mice as acceptors, respectively). Then acceptors were divided randomly into 5 groups, namely sham, model, emodin (50 mg/kg), ciclosporin A (10 mg/kg), combination of emodin and ciclosporin A (emodin 50 mg/kg and ciclosporin A 5 mg/kg). All acceptor mice were intraperitoneally administered 10 d. The skin graft survival time of all mice were documented every day. At the end of the experiment, the levels of Th1 cytokines (IL-2 and IFN- γ) and Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) in plasma were detected by ELISA and the spleen in all mice were removed and quantity of CD4⁺, CD25⁺ T cells were analysed by flow cytometry. **Results:** Compared with the survival days of skin graft of model group, those in groups treated with drugs were all significantly prolonged ($P < 0.01$). Combination of emodin and ciclosporin A group showed a longer survival days than emodin or ciclosporin A group ($P < 0.05$). IL-2 and IFN- γ levels in plasma in groups treated with emodin or combination of emodin and ciclosporin A were evidently decreased ($P < 0.01$) while IL-4 and IL-10 levels were evidently increased ($P < 0.01$) comparing with those of model group. Compared with the amount of CD4⁺, CD25⁺ T cells in spleen of model group, those in groups treated with emodin or combination of emodin and ciclosporin A were all significantly increased

($P < 0.01$). **Conclusion:** Emodin has an immunosuppressive effect against mice with xenogenic skin transplantation. The effectiveness of emodin appears to be associated with balance of Th1/Th2 cytokines and increasement of expression of CD4⁺, CD25⁺ T cells, etc.

Keywords: emodin; immunosuppressive effect; skin transplantation;

基金项目:国家自然科学基金项目(81773859)

¹ 武警北京市总队医院医学工程科(北京,100027)

² 北京中医药大学东方医院

³ 武警北京市总队医院内一科

[△]通信作者 E-mail:PC2005CP@163.com

大黄素(Emodin)即 1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌,是中药大黄、何首乌、虎杖等的主要有效成分之一,具有抗炎、抗肿瘤、抑制血小板聚集、保护脏器药理作用^[1,2]。近年来文献报道大黄素具有免疫抑制作用,可改善动物器官移植的排斥反应^[3-5]。本研究拟建立同种异体皮肤移植小鼠模型,探讨大黄素对皮肤移植排斥反应的抑制作用及机制,以期为大黄素在器官移植领域的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠和 BALB/c 小鼠,雄性,体质量约 18~22 g,由河北医科大学实验动物中心提供,许可证号为 SCXK(冀)2013-1-008。

1.2 药品和试剂

大黄素(纯度 $\geq 98\%$),由辽宁生物医药科技有限公司提供,先溶于二甲基亚砜,再用生理盐水配制而成。环孢素 A(Ciclosporin A)注射液,由瑞士诺华制药有限公司提供。淋巴细胞分离液,由天津市灏洋生物制品科技有限责任公司提供。小鼠 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素 II(IL-2)、IL-4 和 IL-10 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒,均由武汉博士德生物工程有限公司提供。异硫氰酸荧光素标记的抗小鼠 CD4 单克隆抗体、藻红蛋白标记的抗小鼠 CD25 单克隆抗体,由美国 eBioscience 公司提供。

1.3 小鼠同种异体皮肤移植模型

采用背-背皮肤移植手术法制备模型(以 BALB/c 小鼠为供体,以 C57BL/6 小鼠为受体)^[6]。用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,小鼠均俯卧固定,于背部移植区去毛、消毒,其中受体鼠切去移植区皮肤,形成面积约 $1.6\text{ cm} \times 1.4\text{ cm}$ 的植皮创基;供体鼠则于背部切取一块全层皮肤,修剪成面积约 $1.5\text{ cm} \times 1.3\text{ cm}$ 的皮片,铺于受体鼠的植皮创基上并使其紧密接触,常规缝合、包扎、固定,术毕受体鼠单笼饲养。

1.4 分组和给药

术毕将受体鼠随机分为模型组(等体积溶媒)、大黄素组(50 mg/kg)^[3]、环孢素 A 组(10 mg/kg)、大黄素+亚剂量环孢素 A 组(大黄素 50 mg/kg +环孢素 A 5 mg/kg),每组 20 只;另取 20 只健康 C57BL/6 小鼠将背部移植区皮肤切取后植入原位,作为假手术组(等体积溶媒)。各组均于术毕当天开始腹腔注射给药,1 次/d,连续 10 d。每组随机抽取 10 只小鼠观察移植皮片的存活时间,余下 10 只进行细胞因子和 T 淋巴细胞亚群的测定。

1.5 观察指标

1.5.1 移植皮片的存活情况

于术后第 5 天将小鼠

的包扎拆除,每天定时观察各组小鼠移植皮片的生长情况并记录移植皮片的存活时间。评估标准如下:1)无排斥:皮片与背部愈合,色泽红润,有新的毛发生长。2)排斥起点:皮片色泽暗黄,没有新的毛发生长。3)排斥终点:皮片变黑变硬,结痂、坏死,毛发脱落。

1.5.2 测定血浆细胞因子水平 于术后第 10 天各组小鼠给予末次药物后,摘眼球取血,3 500 r/min 离心得血浆,ELISA 法上 MK3 型酶标仪(美国赛默飞公司)测定血浆中 IFN- γ 、IL-2、IL-4 及 IL-10 水平,测定方法按试剂盒说明书进行。

1.5.3 测定脾脏 CD4⁺ 及 CD25⁺ T 淋巴细胞亚群 各组小鼠取血后处死,无菌条件下取脾脏,研磨过筛后获得细胞悬液,加入淋巴细胞分离液,采用梯度离心法制备淋巴细胞,将淋巴细胞密度调整为 2×10^6 个/mL,取 1 mL 淋巴细胞悬液分别加入异硫氰酸荧光素标记的抗小鼠 CD4 单抗、藻红蛋白标记的抗小鼠 CD25 单抗或相应的阴性对照,室温条件下避光孵育 30 min,将细胞密度调整为 1×10^6 个/mL,取 400 μL 上 ELX-800 型流式细胞仪(美国 BD 公司)分析 CD4⁺ 及 CD25⁺ T 淋巴细胞亚群的比例。

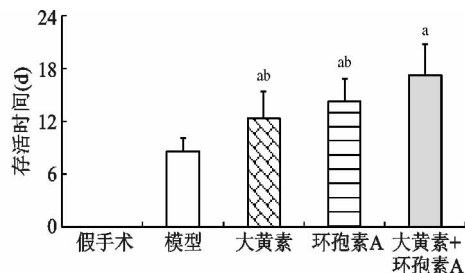
1.6 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较行单因素方差分析,两组间比较行 q 检验,采用 SPSS 22.0 软件处理数据, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄素对移植皮片存活时间的影响

试验期间假手术组小鼠未发现移植排斥反应,愈合良好;模型组受体鼠的排斥起点多出现在术后 5~7 d,随着时间推移,移植皮片的排斥区域亦逐渐增大,直至排斥终点皮片坏死。与模型组存活时间(8.6 d)比较,各给药组受体鼠皮片的存活时间均有显著延长,组间差异均有统计学意义($P < 0.01$)。大黄素联合环孢素 A 组皮片的存活时间(17.3 d)比大黄素组(12.4 d)或环孢素 A 组(14.3 d)均有明显延长,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1;各组移植皮片的代表性照片见图 2。



注: a)与模型组比较, $P < 0.01$; b)与大黄素+环孢素A组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 各组移植皮片存活时间($\bar{x} \pm s, n=10$)

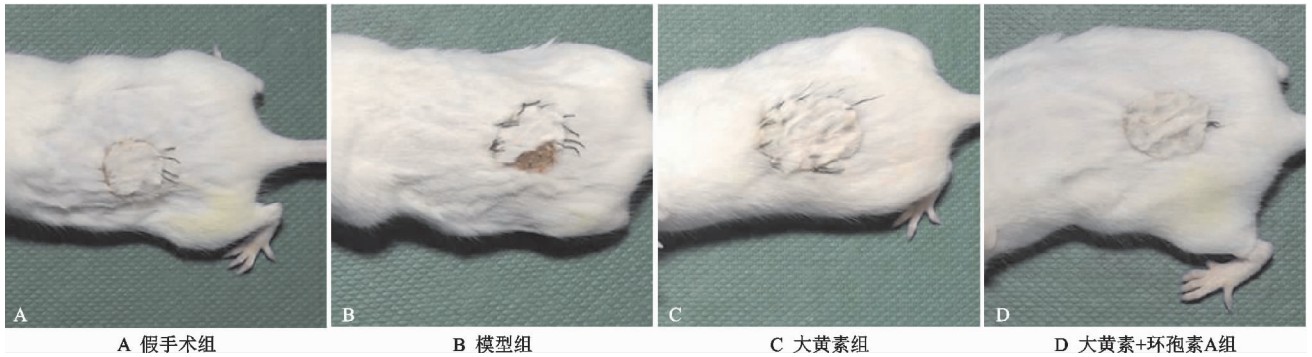
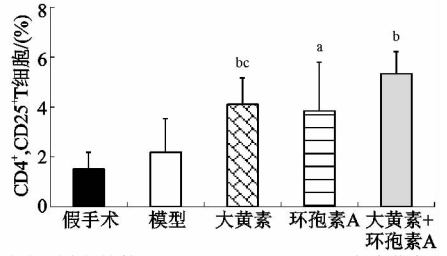


图 2 各组移植皮片的代表性照片

2.2 大黄素对血浆细胞因子的影响

与假手术组比较,模型组受体鼠血浆 IL-2 和 IFN- γ (Th1 类细胞因子)含量明显增高,IL-4 和 IL-10 (Th2 类细胞因子)含量则明显降低,组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,大黄素联合环孢素 A 组以及大黄素单用组均可显著降低血浆 IL-2 和 IFN- γ 含量,差异有统计学意义($P < 0.01$),显著升高血浆 IL-4 和 IL-10 含量,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,环孢素 A 组亦可显著降低血浆 IL-2 和 IFN- γ 含量,差异有统计学意义($P < 0.01$),显著升高 IL-10 含量,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3-4。

A 组(3.85%)均可显著升高脾脏 CD4⁺ 及 CD25⁺ T 淋巴细胞亚群的比例,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 5。



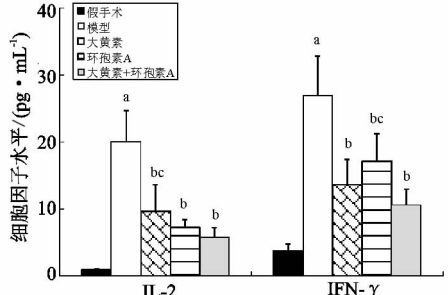
注:与假手术组比较, a) $P < 0.05$, b) $P < 0.01$; c)与大黄素+环孢素A组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 各组脾脏 CD4⁺ 及 CD25⁺ T 细胞数量($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3 讨论

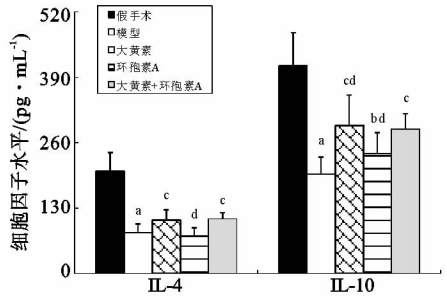
免疫抑制剂可有效提高同种移植器官的存活率,但目前临床常用的免疫抑制剂存在肝肾不良反应大、患者难以长期耐受及增加机体感染风险等缺点,因此,寻找新型的免疫抑制药物依然是器官移植领域关注的热点。大黄素的免疫抑制活性已引起国内外研究者的重视,但其抗皮肤移植排斥反应的研究鲜有报道。本研究探讨了大黄素对同种异体皮肤移植小鼠的影响,发现大黄素可明显延长受体鼠移植皮片的平均存活时间,提示大黄素可有效抑制急性排斥反应,这与刘原兴等^[3]的研究结果一致;而大黄素联合亚剂量环孢素 A 组的移植皮片存活时间比大黄素或环孢素 A 单用组均有显著延长,提示二者合用可能具有协同效应。传统免疫抑制剂环孢素 A 的临床应用因其严重不良反应而受限,若能将环孢素 A 与高效低毒价廉的药物联合使用,这对于提高用药安全性、降低药源性并发症风险、增强病人依从性、降低医疗成本等方面均具有重要意义。孟珂伟等^[7]、荆河等^[8]均认为大黄素联合环孢素 A 具有协同作用,可显著延长同种异体肝移植术后大鼠的存活时间。

伴随于同种异体器官移植的急性排斥反应是由 T 淋巴细胞所介导,体内 T 淋巴细胞亚群及相关细胞因子的水平可作为反映排斥反应程度的指标之一。异体器官移植发生后,体内 T 淋巴细胞激活并增殖,会释放过量细胞因子,同时使某些效应细胞活化,导致炎性



注: a)与假手术组比较, $P < 0.01$; b)与模型组比较, $P < 0.01$; c)与大黄素+环孢素A组比较, $P < 0.01$ 。

图 3 各组血浆 Th1 类细胞因子表达水平($\bar{x} \pm s, n = 10$)



注: a)与假手术组比较, $P < 0.01$; 与模型组比较, b) $P < 0.05$, c) $P < 0.01$; d)与大黄素+环孢素A组比较, $P < 0.01$ 。

图 4 各组血浆 Th2 类细胞因子表达水平($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.3 大黄素对脾脏 T 淋巴细胞亚群的影响

与假手术组(1.52%)比较,模型组受体鼠脾脏 CD4⁺ 及 CD25⁺ T 淋巴细胞亚群比例(2.19%)组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,大黄素+环孢素 A 组(5.34%)、大黄素组(4.10%)或环孢素

介质分泌增多、血管收缩、血栓产生,进而损伤甚至破坏移植体^[9]。T 淋巴细胞的几种亚群包括 Th1, Th2 及 Treg(主要为 CD4⁺ 及 CD25⁺ 调节性 T 细胞)均与移植排斥反应关系密切。Th1 细胞的激活与免疫排斥反应相关联, Th2 细胞的激活则主要与诱导免疫耐受相关联,促使 Th1 亚群向 Th2 亚群转化,被认为是促进异体移植器官产生耐受的重要因素^[10]。Th1 型细胞因子如 IL-2 和 INF- γ 一方面可促进 T 淋巴细胞激活和增殖,一方面可促进主要组织相容性复合体分子表达和抗原提呈,使巨噬细胞活化,参与移植排斥反应的进程并发挥重要作用^[11];而 Th2 型细胞因子如 IL-4 和 IL-10 则可抑制 Th1 亚群的增殖,促使 Th1 向 Th2 亚群分化,与移植排斥反应呈负相关;据报道,外源性 IL-10 可成功诱导异体移植角膜的免疫耐受,提高其存活率^[12]。本研究探讨了大黄素对皮肤移植受体鼠血浆中 Th1/Th2 细胞因子的影响,发现大黄素与环孢素 A 联合用药组以及大黄素单用组均可显著降低 Th1 型细胞因子(IL-2, IFN- γ)的含量,显著升高 Th2 型细胞因子(IL-4, IL-10)的含量,提示大黄素可能是通过调控 T 淋巴细胞分化,促使 Th1 向 Th2 细胞亚群偏移,进而诱导异体移植皮肤的免疫耐受。这与林文琴等^[13]、荆河等^[14]关于大黄素影响 Th1/Th2 型细胞因子的研究结果一致。

CD4⁺ 及 CD25⁺ 调节性 T 细胞亚群被证实亦具有抑制排斥反应、诱导免疫耐受等作用。CD4⁺ 及 CD25⁺ 调节性 T 细胞激活后可抑制免疫球蛋白的形成,还可通过抗原非特异性方式抑制 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的激活及增殖,发挥免疫负调控作用^[15]。本研究探讨了大黄素对皮肤移植受体鼠脾脏中 CD4⁺ 及 CD25⁺ 调节性 T 细胞的影响,发现大黄素组以及大黄素联合环孢素 A 组均可显著升高脾脏 CD4⁺ 及 CD25⁺ 调节性 T 细胞的比例,提示大黄素可能是通过刺激 CD4⁺ 及 CD25⁺ 调节性 T 细胞的表达,在抑制机体细胞免疫应答的同时诱导移植物的免疫耐受,缓解排斥反应对移植物的破坏损伤,从而延长了移植物的存活时间。蒋力等^[16]研究发现大黄素可上调肝脏及外周血中 CD4⁺ 及 CD25⁺ 调节性 T 细胞的比例,延长大鼠肝移植的术后存活时间。

总之,大黄素具有较好的免疫抑制活性,与环孢素 A 联合应用可能具有协同作用;其作用机制可能与促使 Th1 向 Th2 细胞的偏移,刺激 CD4⁺ 及 CD25⁺ 调节性 T 细胞的表达,诱导免疫耐受等相关。

参考文献

[1] DONG X, FU J, YIN X, et al. Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics[J]. *Phytother Res*, 2016, 30(8): 1207-1218.

- [2] 薛丽,唐坚,褚永权,等. 大黄素对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤抑癌基因去甲基化作用[J]. *医学研究杂志*, 2018, 47(1): 74-78.
- [3] 刘原兴,沈乃营,刘昌,等. 大黄素在小鼠皮肤移植中的免疫抑制作用的实验研究[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(4): 301-304.
- [4] TONG H, CHEN K, CHEN H, et al. Emodin prolongs recipient survival time after orthotopic liver transplantation in rats by polarizing the Th1/Th2 paradigm to Th2[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2011, 294(3): 445-452.
- [5] QIU F, LIU H, LIANG C L, et al. A new immunosuppressive molecule emodin induces both CD4⁺, FoxP3⁺ and CD8⁺, CD122⁺ regulatory T cells and suppresses murine allograft rejection[J]. *Front Immunol*, 2017, 8(11): 1519-1525.
- [6] 蔡春晓,马春梅,孟立正,等. 小鼠异种皮肤移植模型的建立及对免疫抑制药物的药效评价[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(11): 1613-1619.
- [7] 孟珂伟,宋占文,周先亭,等. 大黄素对大鼠原位肝移植术后急性排斥反应的干预[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(47): 9427-9430.
- [8] 荆河,林胜璋,杨潇,等. 大黄素和环孢素 A 在抗大鼠肝移植排斥反应中的协同作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 2008, 28(7): 614-616.
- [9] LOPEZ-HOYOS M, SAN SEGUNDO D, BRUNET M. Regulatory T cells as biomarkers for rejection and immunosuppression tailoring in solid organ transplantation[J]. *Ther Drug Monit*, 2016, 38(Suppl 1): 36-42.
- [10] WANG M M, YANG Y L, SUN J J, et al. Induction of immune tolerance and altered cytokine expression in skin transplantation recipients[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2018, 34(6): 330-334.
- [11] KE N, SU A, HUANG W, et al. Regulating the expression of CD80/CD86 on dendritic cells to induce immune tolerance after xeno-islet transplantation[J]. *Immunobiology*, 2016, 221(7): 803-812.
- [12] LI B, TIAN L, DIAO Y, et al. Exogenous IL-10 induces corneal transplantation immune tolerance by a mechanism associated with the altered Th1/Th2 cytokine ratio and the increased expression of TGF- β [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(6): 2245-2250.
- [13] 林文琴,杨潇,荆河,等. 大黄素对大鼠肝移植排斥反应相关细胞因子的影响[J]. *中草药*, 2008, 39(12): 1853-1855.
- [14] 荆河,林胜璋,杨潇. 大黄素对大鼠原位肝移植急性排斥反应中 TNF- α , IL-10 水平的影响[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(11): 1435-1438.
- [15] 袁勃,吴轲,陈忠华. 体外分化的 CD4⁺, CD25⁺ 调节性 T 细胞可减轻小鼠皮肤移植急性排斥反应[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2010, 39(6): 733-737.
- [16] 蒋力,刘垚,张珂,等. 大黄素对大鼠肝移植后 CD4⁺, CD25⁺ 调节性 T 细胞的影响[J]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2010, 4(3): 271-277.