

雷公藤多甙对大鼠肾移植慢性排斥移植肾组织病理学的影响*☆

余鹏程¹, 刘永光¹, 李 民¹, 郭 颖¹, 陈 桦¹, 岳良升¹, 吴建平², 赵 明¹

Effect of tripterygium wilfordii polyglucoside on histological changes of a rat model of chronic renal allograft rejection

Yu Peng-cheng¹, Liu Yong-guang¹, Li Min¹, Guo Ying¹, Chen Hua¹, Yue Liang-sheng¹, Wu Jian-ping², Zhao Ming¹

Abstract

BACKGROUND: Tripterygium wilfordii polyglucoside possess a variety of immune regulation. Whether it can be used for chronic renal allograft rejection needs animal experiments as well as multi-center, large-sample clinical trials.

OBJECTIVE: To explore the effect of TWP on chronic renal allograft rejection in rats.

METHODS: Orthotopic kidney transplantation was performed in strain combinations of SD-Wistar. The native kidney of the recipients were kept and used as an internal control. All recipients received a short course treatment of cyclosporine A (CsA microemulsion) (2 mg/kg/d for 10 days *i.p.*) after transplantation to prevent acute rejection to establish chronic renal allograft rejection model. Fifteen successful recipient rats were randomized into TWP-treating group ($n=8$) and control group ($n=7$). The recipient rats of the two groups were treated with TWP at doses of 30 mg/kg (TWP-treating group) or the same volume of 0.9% saline solution (control group) per day from day 10 until week 12 after transplantation. All recipient rats were killed in week 12 after transplantation, the histology examination of grafts and native kidneys was performed in parallel according to the Banff 07 working classification for renal allograft pathology. Graft histology was quantified by using the Banff sum score. Immunohistochemistry of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) of each allograft was examined and was semiquantitatively evaluated.

RESULTS AND CONCLUSION: All allografts of each group survived up to 12 weeks after transplantation and develop chronic renal allograft rejection, characterized by neointimal hyperplasia, interstitial fibrosis, tubular atrophy, glomerulosclerosis and mononuclear cell infiltration. Compared with those in the control group, the Banff sum scores and TGF- β 1 expressions in the renal allograft tissues were significantly decreased in the TWP-treating group in week 12 ($P < 0.01$ for both). The native kidney of recipients of each group showed no inflammation or histological alterations. In conclusion, TWP effectively reduces the histological damages and the expression of TGF- β 1 in the renal allograft tissues and may be used as a new agent to treat chronic renal allograft rejection.

Yu PC, Liu YG, Li M, Guo Y, Chen H, Yue LS, Wu JP, Zhao M. Effect of tripterygium wilfordii polyglucoside on histological changes of a rat model of chronic renal allograft rejection. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(18):3319-3322. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 雷公藤多甙所具有的多种免疫调节作用, 是否可用于肾移植慢性排斥, 缺乏严密的动物实验研究和多中心、大样本临床试验研究证据的支持。

目的: 观察雷公藤多甙对大鼠肾移植慢性排斥的作用。

方法: 选用 SD 大鼠为供体, Wistar 大鼠为受体, 制作 SD-Wistar 大鼠肾移植慢性排斥模型, 完整保留受体右肾作为每个移植肾的内对照。所有受体均于移植后 10 d 内接受小剂量环孢素抑制急性排斥反应。移植成功受体随机分成治疗组与对照组, 治疗组自移植后 10 d 起每日经胃灌服雷公藤多甙, 对照组给予相同容量的生理盐水, 连续灌服至移植后 12 周。移植后 12 周收获动物, 取受体移植肾组织送检组织病理学, 并用免疫组织化学染色法检测移植肾转化生长因子 β 1 的表达。

结果与结论: 移植后 12 周, 两组受体移植肾均存活, 体积较正常右肾略小, 色泽较苍白, 出现不同程度的单个核细胞浸润、肾小球硬化、肾小管萎缩、间质纤维化和小动脉内膜纤维性增厚等慢性排斥组织病理学改变。治疗组大鼠移植肾组织的病理改变明显轻于对照组 ($P < 0.01$)。两组所有受体自身右肾均未出现任何组织病理学改变。转化生长因子 β 1 主要在治疗组和对对照组的肾小管、间质表达, 治疗组肾组织的转化生长因子 β 1 表达明显低于对照组 ($P < 0.01$)。提示, 雷公藤多甙能够减轻大鼠移植肾慢性排斥模型移植肾组织病理学损害, 下调移植肾组织转化生长因子 β 1 的表达可能是其作用机制之一。

关键词: 雷公藤多甙; 组织病理学; 肾移植; 慢性排斥; 转化生长因子 β 1; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.18.022

余鹏程, 刘永光, 李民, 郭颖, 陈桦, 岳良升, 吴建平, 赵明. 雷公藤多甙对大鼠肾移植慢性排斥移植肾组织病理学的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(18):3319-3322. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

肾移植是治疗终末期肾病患者的最有效手段, 近年来随着对移植免疫的进一步认识以及新型免疫抑制剂的问世, 急性排斥反应发生率明显下降, 慢性排斥反应已成为阻碍移植肾长

期存活的主要原因^[1]。迄今为止, 对慢性排斥反应的防治主要集中于几种免疫抑制剂, 这些药物尚不能真正有效地防治移植肾慢性排斥, 且价格昂贵并能引起严重不良反应, 尚无任何药物及其他疗法能真正有效地防治移植肾慢性排斥^[2], 临床上迫切需要寻求防治移植肾慢性排斥的新疗法。

¹Organ Transplant Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China; ²Department of Nephrology, First Hospital of Quanzhou, Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Yu Peng-cheng ☆, Studying for doctorate, Attending physician, Organ Transplant Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China nananyu@sohu.com

Correspondence to: Zhao Ming, Professor, Doctoral supervisor, Organ Transplant Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China zhaoming02@hotmail.com

Supported by: Science and Technology Plan of Quanzhou City, No. 2009Z39*

Received: 2011-02-16 Accepted: 2011-03-14

¹ 南方医科大学珠江医院器官移植中心, 广东省广州市 510282; ² 福建医科大学附属泉州第一医院肾内科, 福建省泉州市 362000

余鹏程, 男, 1972年生, 福建省南安市人, 汉族, 南方医科大学在读博士, 主治医师, 主要从事肾内科及肾移植的基础和临床研究。
nananyu@sohu.com

通讯作者: 赵明, 男, 主任, 教授, 博士生导师, 南方医科大学珠江医院器官移植中心, 广东省广州市 510282
zhaoming02@hotmail.com

中图分类号: R617
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)18-03319-04

收稿日期: 2011-02-16
修回日期: 2011-03-12
(20110216009/D · W)

雷公藤多甙是从中药雷公藤提取的含雷公藤二萜内酯和雷公藤生物碱等成分的提取物, 含少量甙类^[3]。该药具有抗炎、免疫调节等多种药理作用, 临床上广泛应用于包括肾脏病在内的多种自身免疫疾病, 近年来部分学者将其应用于器官移植包括肾移植临床, 发现雷公藤多甙对肾移植患者, 具有抗急性排斥作用^[4], 单中心的临床研究发现雷公藤多甙能提高移植肾5年存活率^[5]。但是有关雷公藤多甙对于移植肾慢性排斥的确切作用仍不清楚。课题组开展此研究, 通过观察移植肾慢性排斥模型移植肾组织病理学的微观变化以及转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)的表达, 进一步了解雷公藤多甙对肾移植慢性排斥的确切效果。

1 材料和方法

设计: 随机对照, 动物实验。

时间及地点: 实验于2009-05/2010-02在南方医科大学珠江医院移植免疫研究所及广东省神经外科研究所完成。

材料:

实验动物: 供体为健康SD大鼠20只, 体质量250~300 g; 受体为健康Wistar大鼠20只, 体质量300~350 g, 均为雄性, 由南方医科大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK粤2006-0015。动物使用实验动物中心提供的标准鼠粮和自来水, 自由饲养。实验过程中对动物的处置符合相关动物伦理学的标准^[6]。

药物: 雷公藤多甙由浙江得恩制药有限公司提供, 使用时以生理盐水配成混悬液。环孢素软胶囊(微乳化制剂)由杭州中美华东制药有限公司提供, 使用时用生理盐水配成混悬液。

试剂: 兔抗大鼠TGF- $\beta 1$ 多克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司; SABC免疫组化检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

方法:

模型与分组: 按文献^[7]用显微外科方法进行左肾原位移植, 制作SD-Wistar大鼠肾移植慢性排斥模型, 完整保留受体右肾作为每个移植肾的内对照。所有受体均于移植后当天1次性肌肉注射氨苄青霉素50 mg/kg预防感染, 10 d内接受小剂量环孢素(2 mg/kg, 腹腔注射)抑制急性排斥反应。取移植成功存活受体18只, 随机数字

表法分成治疗组与对照组, 每组9只。

治疗: 治疗组每只受体自造模后10 d起每日经胃灌服雷公藤多甙30 mg/kg^[8], 连续治疗至移植后12周; 对照组给予相同容量的生理盐水经胃灌服, 连续灌服至移植后12周。

组织学检查: 造模后12周收获动物, 在3.6%水合氯醛麻醉下取移植肾脏, 以体积分数10%中性甲醛固定液固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片厚度为2 μm , 行苏木精-伊红染色、PASM-Masson染色和PAS染色。按照Banff 2007移植肾病理分类方案^[9]由两位观察者光镜下双盲方式观测组织病理学变化情况, 分别对移植肾组织的单个核细胞浸润以及肾小球硬化、肾小管萎缩、间质纤维化、小动脉内膜纤维性增厚等慢性损害进行评分, 每项分为0~3分, 每个标本观察10个不重复的100倍(评价肾小球时观察200倍)镜视野, 取其平均值。

免疫组化: 采用免疫组化SABC法, 按说明书进行操作。石蜡切片常规脱蜡水化, 抗原修复后系列染色, 一抗为兔抗大鼠TGF- $\beta 1$ 多克隆抗体, DAB显色, 以胞浆或(和)胞膜中出现棕黄色颗粒为阳性, 每批另用PBS代替一抗作阴性对照。肾组织TGF- $\beta 1$ 表达采用半定量分析方法, 兼顾阳性染色强度(0~3分)和阳性细胞数面积, 由两位观察者进行双盲评分。染色强度和阳性细胞数的乘积为每个视野的分数, 每张切片选取10个有代表性的区域, 于光镜下计数, 取其平均值。

主要观察指标: ①大鼠移植肾组织病理学变化。②大鼠移植肾TGF- $\beta 1$ 的表达。

统计学分析: 由第一作者用SPSS软件12.0版本进行计算分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用t检验, 以 $\alpha=0.05$ 作为显著性检验水准。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验共纳入20对大鼠行肾移植, 移植后受体死亡1只, 血管吻合失败1只, 18只受体移植成功而进行分组观察。但到观察终点移植后12周时, 发现治疗组1只、对照组2只因移植肾坏死而剔除出实验, 实际纳入最后实验结果分析的共15只, 治疗组8只, 对照组7只。

2.2 组织病理学检测结果 移植后12周, 两组大鼠纳入统计的受体移植肾均存活, 体积较正常右肾略小, 色泽较苍白, 出现不同程度的

单个核细胞浸润、肾小球硬化、肾小管萎缩、间质纤维化和小动脉内膜纤维性增厚等慢性排斥组织病理学改变。治疗组大鼠移植肾组织的病理改变明显轻于对照组 ($P < 0.01$) 见图1, 表1。两组所有受体自身右肾均未出现任何组织病理学改变。

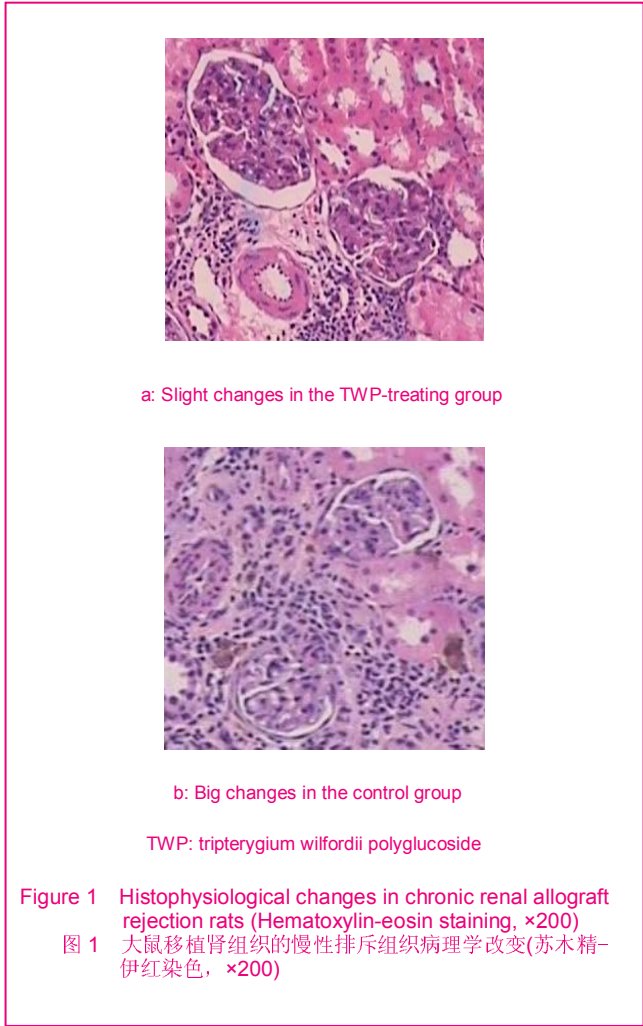


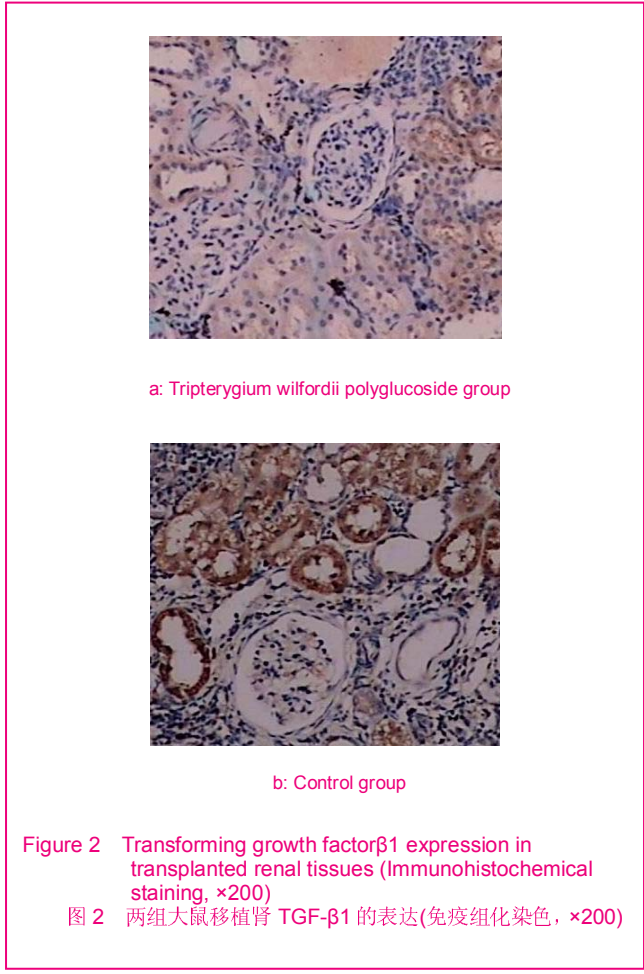
表 1 移植后 12 周时两组受体移植肾组织的组织病理学变化和 TGF- $\beta 1$ 表达评分

Table 1 Histophysiological changes and transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) expression at 12 wk ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Banff score	TGF- $\beta 1$ expression
TWP	8	6.58 \pm 1.20 ^a	6.02 \pm 1.15 ^a
Control	7	8.54 \pm 0.88	8.58 \pm 0.71

TWP: tripterygium wilfordii polyglucoside; ^a $P < 0.01$, vs. control group

2.3 移植肾组织 TGF- $\beta 1$ 的表达 TGF- $\beta 1$ 主要在治疗组和对照组的肾小管、间质表达。治疗组少量散在的棕黄色颗粒沉积于肾小管, 着色弱, 见图2a; 对照组密集的棕黄色颗粒沉积于肾小管、间质, 着色深, 见图2b。治疗组肾组织的 TGF- $\beta 1$ 表达明显低于对照组 ($P < 0.01$)。



3 讨论

移植肾慢性排斥反应一度定义为慢性移植肾肾病^[10], 它是抗原依赖性和非抗原依赖性等多种因素共同作用的结果, 是有别于环孢素A毒性、高血压等血管疾病、返流或感染的独立疾病, 是导致移植肾慢性失功的主要原因^[1]。其发病机制目前认为是体液免疫为主, 主要是抗体介导的血管内皮细胞损伤, 最后导致血管内增生性改变和纤维化, 实质组织发生缺血性结构破坏和功能丧失^[11]。移植肾慢性排斥具有特征性的组织病理学改变, 包括血管周围和间质的炎症、纤维化、肾小球硬化、血管内膜增厚以及肾小管萎缩等组织学变化^[8,12]。目前其治疗主要集中于几种免疫抑制剂种类和剂量的调整, 价格大多昂贵且疗效不明显^[2]。雷公藤多甙原名为雷公藤总甙, 为含雷公藤二萜内酯和雷公藤生物碱等成分的提取物, 只含有很少量的甙类^[3]。研究证实雷公藤及其提取物对T细胞的增殖有抑制作用。雷公藤多甙能抑制辅助性CD4 T细胞功能, 改善CD8 T细胞功能, 下调CD4/CD8的比例^[13]。雷公藤及其提取物还可以抑制B细胞增殖及产生免疫球蛋白。很多研究表明雷公藤对Th1、Th2及其细胞因子具有多种调节作用, 有助于恢

复Th1/Th2 动态平衡, 改善炎症损伤^[14]。雷公藤多甙作为抗移植排斥反应的免疫抑制剂, 目前在肾脏移植临床中得到较为广泛的应用, 与其他免疫抑制剂合用, 能够明显降低急性排斥反应的发生率^[4]。并且常用于各种原因引起的肾移植后蛋白尿的治疗, 具有较明显的效果^[15]。然而对于移植肾慢性排斥的效果, 目前仅见于少量的临床报道, 缺乏严密的动物实验研究以及多中心的临床试验证实, 尚未有明确的结论。TGF- β 1是同肾脏和其他器官慢性疾病的纤维化相关的一种关键性纤维生成细胞因子^[16]。研究表明, TGF- β 1的表达与肾移植后肾组织纤维化有显著相关性, 在慢性排斥过程基质扩张中起着决定性作用^[17-18]。本文参考既往文献, 在短期使用小剂量环孢素抑制急性排斥反应的实验条件下, 诱导大鼠肾移植受体移植肾的长期存活, 成功建立了SD-Wistar大鼠间移植肾慢性排斥模型, 在此基础上给予雷公藤多甙干预, 以移植肾组织的组织病理学微观变化为观察指标, 观察雷公藤多甙抗移植肾慢性排斥的效果。实验结果发现表明移植后即使用30 mg/(kg·d)的雷公藤多甙的确能够减轻移植肾慢性排斥的组织病理学损害, 并且可下调移植肾组织TGF- β 1的表达。提示雷公藤多甙对移植肾慢性排斥确有治疗作用, 下调移植肾组织TGF- β 1的表达可能是其作用机制之一, 为临床使用雷公藤多甙防治肾移植慢性排斥进一步提供了实验依据。实验仅仅是雷公藤多甙对大鼠肾移植慢性排斥的作用的初步动物实验观察, 进一步应深入研究雷公藤多甙对肾移植慢性排斥状态下体内各种体液免疫以及细胞免疫指标的影响。

4 参考文献

[1] Howard RJ, Patton PR, Reed AI, et al. The changing causes of graft loss and death after kidney transplantation. *Transplantation*. 2002;73(12):1923-1928.

[2] Zhao XJ, Lu FM. Neike Lilun yu Shijian. 2008;3(3):203-206. 赵霞娟, 陆福明. 慢性移植肾病的研究现状[J]. 内科理论与实践, 2008, 3(3):203-206.

[3] Luo JB, Li JL, He F. Zhongguo Zhongyi Jichu Yixue Zazhi. 2000; 6(2):59-63. 罗佳波, 李吉来, 贺丰. 雷公藤在移植免疫中的研究与应用概况[J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(2):59-63.

[4] 钱叶勇, 李炎唐, 敖建华, 等. 雷公藤多甙在同种肾移植患者的近期疗效观察[J]. 中华器官移植杂志, 1993, 14(3):133-135.

[5] Ji SM, Wang QW, Yi G, et al. Yixue Yanjiusheng Xuebao. 2007; 20(1):53-57. 季曙明, 王庆文, 尹广, 等. 同种异体肾移植术后长期应用雷公藤多甙的临床观察[J]. 医学研究生学报, 2007, 20(1):53-57.

[6] Bédard EL, Jiang J, Arp J, et al. Prevention of chronic renal allograft rejection by SERP-1 protein. *Transplantation*. 2006; 81(6):908-914.

[7] Jolicœur EM, Qi S, Xu D, et al. Combination therapy of mycophenolate mofetil and rapamycin in prevention of chronic renal allograft rejection in the rat. *Transplantation*. 2003;75(1): 54-59.

[8] Qian YY, Shi BY, Li J, et al. Zhongguo Zhongyixi Jiehe Zazhi. 2002;22(6):120-121. 钱叶勇, 石炳毅, 李静, 等. 雷公藤多甙对同种异体肾移植大鼠外周血肿瘤坏死因子的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(6):120-121.

[9] Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 2008;8(4):753-760.

[10] Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*. 1993;44(2):411-422.

[11] Chen S, Guo H. Beijing: The Publishing House of People's Health. 2009:252. 陈实, 郭晖. 移植病理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009:252.

[12] Paul LC. Functional and histologic characteristics of chronic renal allograft rejection. *Clin Transplant*. 1994;8(3 Pt 2):319-223.

[13] Bai HT. Shiyong Erke Linchuang Zazhi. 2002;17(4):335-336. 白海涛. 雷公藤多甙对儿童过敏性紫癜免疫功能的干预作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2002, 17(4):335-336.

[14] Wang J, Zhou ZY, Yi JF, et al. Zhongguo Zhongyi Jichu Yixue Zazhi. 2006;12(3):230-232. 王珏, 周志愉, 易剑峰, 等. 雷公藤免疫调节作用研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(3):230-232.

[15] Liu JD, Song WL. Zhonghua Qiguan Yizhi Zazhi. 2005;26(7):437. 刘俊铎, 宋文利. 雷公藤多甙治疗肾移植后的蛋白尿22例[J]. 中华器官移植杂志, 2005, 26(7):437.

[16] Yamanaka O, Liu CY, Kao WW. Fibrosis in the anterior segments of the eye. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2010; 10(4):331-335.

[17] Paul LC, Saito K, Davidoff A, et al. Growth factor transcripts in rat renal transplants. *Am J Kidney Dis*. 1996;28(3):441-450.

[18] Mannon RB, Kopp JB, Ruiz P, et al. Chronic rejection of mouse kidney allografts. *Kidney Int*. 1999;55(5):1935-1944.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 泉州市科技计划项目(2009Z39), 课题名称: 丹参联合雷公藤多甙防治同种异体肾移植慢性移植肾病的实验研究。

作者贡献: 第一作者、通讯作者进行实验设计, 第一、二、五作者进行实施, 第三、七作者进行实验评估, 资料收集为第一、四、六作者, 第一作者行文, 通讯作者审核, 第一作者、通讯作者对文章负责。

致谢: 感谢南方医科大学珠江医院神经外科肖宗宇博士、整形外科黄进军博士、骨科胡孔和博士对本实验提供的显微外科技术支持。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物的处理符合动物伦理学的标准^[6]。

本文创新性: 检索 CNKI, PubMed 数据库, 检索时间 2001/2011-01, 检索关键词设定为雷公藤多甙, 肾移植, 慢性排斥, TGF- β 1, 大鼠; Tripterygium Wilfordii Polyglucoside, Kidney Transplantation, Chronic Renal Allograft Rejection, TGF- β 1, Rat. 检索结果显示, 首次观察到雷公藤多甙可减轻大鼠肾移植慢性排斥模型移植肾组织病理学损害, 同时可下调转化生长因子 β 1 的表达, 为临床使用雷公藤多甙防治肾移植慢性排斥进一步提供了实验依据, 具有一定的创新性和临床指导意义。