茯苓素预防大鼠肾移植急性排斥反应的实验研究

丁晨光　田普训　薛武军　管智慧　葛冠群　靳占奎　李钊伦
贾利宁　丁小明　潘晓明　燕　航

摘要　**目的**　探讨茯苓素(Poria cocos)预防大鼠肾脏移植急性排斥反应的作用和机制。**方法**　以Wistar大鼠为供者,SD大鼠为受者,建立原位(腹腔)肾脏移植模型,移植前按照分组分别以生理盐水、茯苓素25 mg·kg^{-1}·d^{-1}、茯苓素50 mg·kg^{-1}·d^{-1}和环孢素A(CsA)5 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃。术后观察大鼠移植肾功能和存活时间,测定各组术后1周外周血中白细胞介素2(IL-2)和γ干扰素(IFN-γ)含量以及CD_4^+、CD_8^+细胞百分比和CD_4^+/CD_8^+的比值,并观察移植肾的病理变化。**结果**　茯苓素50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和CsA组移植肾和受者存活时间较茯苓素25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和生理盐水组显著延长($P<0.05$),而且病理损害程度较茯苓素25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和生理盐水组明显减轻,但茯苓素50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组较CsA组移植肾存活时间显著减少($P<0.05$)。各组移植肾功能和尿量变化与存活时间和移植肾病理变化相一致,茯苓素50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和CsA组肾功能异常发生时间明显晚于茯苓素25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和生理盐水组。茯苓素50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组外周血IL-2和IFN-γ的含量较茯苓素25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和生理盐水组显著降低($P<0.01$),但显著高于CsA组($P<0.01$);茯苓素50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组外周血CD_4^+细胞百分比显著低于茯苓素25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组($P<0.05$)和生理盐水组($P<0.01$),CD_8^+细胞百分比显著低于生理盐水组($P<0.05$)。**结论**　茯苓素对肾脏移植急性排斥反应有较好的抑制作用且与剂量呈正相关,但效果不如CsA。

关键词　茯苓素;急性排斥反应;肾脏移植;环孢素A

Preventive Effect of Poria cocos on Acute Rejection of Renal Transplantation in Rats DING Chen-guang, TIAN Pu-xun, XUE Wu-jun, et al *Department of Renal Transplantation, Center of Nephropathy, the First Affiliated Hospital, Medical College of Xi'an Jiaotong University; Organ Transplantation Institute of Xi'an Jiaotong University; Renal Transplantation Center of Shaanxi Province, Xi'an (710061)*

ABSTRACT　**Objective**　To study the effect of Poria cocos (Pcs) in preventing acute rejection of rats after renal transplantation and its mechanism. **Methods**　Rat orthotopic renal transplantation model was performed with Wistar rat as donor and SD rat as donee. All donees were divided into 4 groups, 10 in each group, before transplantation. They were treated respectively with normal saline 5 mL·kg^{-1}·d^{-1}(A), Pcs 25 mg·kg^{-1}·d^{-1}(B), Pcs 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}(C) and ciclosporin A (CsA) 5 mg·kg^{-1}·d^{-1}(D) by intragastric administration. The renal allograft survival time (ST) was recorded, and the serum levels of creatinine (SCr), interleukin-2 (IL-2), γ-interferon (γ-IFN), CD_4^+, CD_8^+ lymphocytes percentage, CD_4^+/CD_8^+ ratio, as well as the pathologic changes were observed one week after transplantation. **Results**　ST of the renal graft in Groups C and D was significantly longer with pathologic change evidently less than those in Groups A and B ($P<0.01$), and the ST in Group C was shorter that in Group D ($P<0.05$). Changes of renal function and urine volume were identified to the pathological change of graft, the initiating time of renal dysfunction was later in Groups C and D than that in Groups A and B. Serum levels of IL-2, IFN-γ and CD_4^+ percentage in Group C were significantly lower than those in Groups A and B, but higher than those in Group D respectively ($P<0.05$ or $P<0.01$), while CD_8^+ percentage in Group C was significantly lower than that in Group A ($P<0.05$), but insignificantly different to that in Groups B and D ($P>0.05$). **Conclusion**　Pcs shows good dosage-dependent effect in suppressing acute rejection of re-

基金项目:陕西省中医药管理局资助项目(No. 2005003);陕西省科技攻关项目(No. 2008K13-04);国家自然科学基金资助项目(No. 30872578, No. 30753761);西安市科技计划项目(No. SF08006-2);陕西省自然科学基金资助项目(No. SJ08C201)

作者单位:西安交通大学医学院第一附属医院肾病中心肾移植科,西安交通大学器官移植研究所,陕西省肾脏移植中心(西安 710061)
通讯作者:田普训,Tel: 029-85323958, E-mail: yuantian@mail.xjtu.edu.cn

nal transplantation, but the effect is inferior to that of CsA.

KEYWORDS Poria cocos; acute rejection; renal transplantation; ciclosporin A

随着移植物保存技术的提高,组织配型的开展,高效免疫抑制的应用,外科技术的熟练等原因,肾移植患者的1年存活率已达到90%以上[1-3]。而高效免疫抑制剂的非特异性抑制免疫系统和其自身毒性却影响着肾移植患者长期的存活[3],因此安全无毒副反应免疫抑制剂或者免疫抑制剂辅助用药的开发尤其显得重要。我国传统中药具有潜在的开发利用价值。有报道茯苓提取物能保护胎儿免于被母体排斥[4]和高剂量茯苓素能抑制心脏移植的排斥反应的发生[5],而对开展最多的肾移植相关研究并未见报道。本研究通过大鼠肾移植模型观察茯苓素对肾移植受者的大鼠肾功能、移植物存活时间、外周血淋巴细胞、血清细胞因子的影响。

材料与方法

1 试剂 茯苓素由西安交通大学药理学院天然植物药研究所参照王伟等方法[6]协助制备,环孢素 A (CsA: 瑞士诺华公司),白细胞介素-2(IL-2)和 γ 干扰素(IFN-γ) ELISA 试剂盒购自深圳晶美公司,小鼠抗大鼠 CD_4^+、CD_8^+ 单克隆抗体购自 BD Biosciences (San Diego, CA, 美国)。

2 动物 供者为健康雄性 Wistar 大鼠(体重 180~220 g),受者为健康雄性 SD 大鼠(体重 200~230 g),购自西安交通大学医学院实验动物和动物实验中心。均在洁净代谢笼里模拟白天和夜晚的生活环境进行饲养,所进行的试验均按照动物试验规章制度。

3 大鼠肾脏移植模型的建立 左侧原位肾移植,用10-0的丝线行对应血管的端端吻合,输尿管端-端吻合,参照 Hölzen JP 等[7]的方法建立原位肾脏移植模型。移植肾热缺血时间为(4.2±1.3) min,冷缺血时间为(35.7±11.5) min。右侧肾脏在移植手术结束后切除。

4 实验分组 肾移植大鼠分为4组,每组10只。生理盐水组:生理盐水 5 mL·kg^{-1}·d^{-1}灌胃,小剂量组:茯苓提取物 25 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃,大剂量组:茯苓提取物 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃,CsA 组:CsA 5 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃。术前1天按分组要求灌胃给药,至观察终点(术后8周)相同条件下进行饲养并观察各项指标。

5 观察项目

5.1 移植肾功能检测 日立7170型全自动生化分析仪检测移植大鼠外周血(尾静脉取血)肌酐水平,观测记录24 h尿量,记录移植大鼠生存时间。

5.2 病理检测 术后1、5、8周取各组移植肾组织放入10%的福尔马林液中,然后制成石蜡块,按5 μm的厚度进行病理切片,HE染色观察移植肾组织的改变。

5.3 肾移植大鼠的外周血细胞因子测定 酶联免疫反应吸附法(ELISA法)测定术后1周外周血IL-2和IFN-γ的含量。依照试剂盒的说明进行检测。

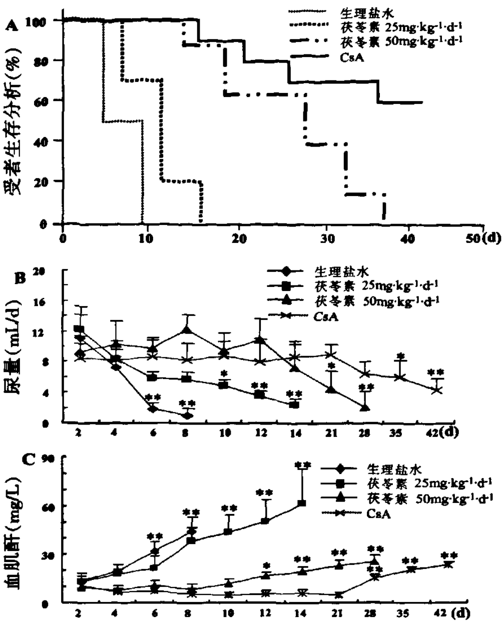
5.4 流式细胞术测定肾移植术后1周外周血淋巴细胞亚群 利用小鼠抗大鼠 CD_4^+、CD_8^+ 单克隆抗体进行染色,Becton dickinson FACSort 流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司)获取 1×10^5 个细胞,CELL Quest 软件分析 CD_4^+、CD_8^+ 淋巴细胞百分比及 CD_4^+/CD_8^+ 比值。

6 统计学方法 用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各指标多组间比较采用方差分析,生存时间分析用 Kaplan-Meier 曲线表示。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 肾移植大鼠生存时间和移植肾功能检测(图1) 生理盐水组和茯苓素 25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组肾移植大鼠精神状态较差,茯苓素 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和环孢素A组精神状态良好。生存时间分析结果表示:茯苓素 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和 CsA 组存活时间较茯苓素 25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和生理盐水组显著延长,而在移植后的第28天茯苓素 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组肾移植大鼠的存活时间显著低于 CsA 组(图1 A)。茯苓素 25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和生理盐水组与移植后第2天的尿量相比,移植后的第4天显著下降,茯苓素 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组则在移植后的21后显著下降(图1 B)。各组血肌酐的变化与尿量变化相符,茯苓素 25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和生理盐水组与移植后第2天的血肌酐相比,移植后的第6天急剧上升,茯苓素 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组血肌酐则在移植后的12天缓慢升高,CsA 组血肌酐在移植后28天开始逐渐升高(图1 C)。

2 移植肾组织病理变化(图2) 术后1周生理盐水组(图2A)和茯苓素 25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组(图2 B)死亡的移植大鼠肾脏,经HE染色可以观察到典型的急性排斥反应征象:肾间质有大量单核细胞,淋巴细

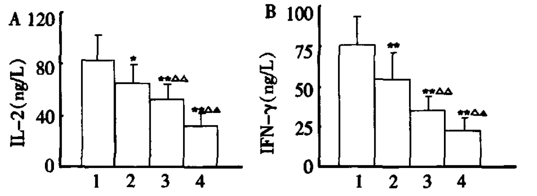


注：A：各组大鼠生存曲线分析；B：各组大鼠不同时间点的尿量变化；C：各组大鼠不同时间点血肌酐变化；与本组术后2天比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

图1 各组大鼠生存曲线、尿量和肌酐的变化

胞浸润，肾小管坏死、溶解，小动脉纤维素样坏死，血小板凝集，纤维蛋白血栓形成；而茯苓素 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组（图2 C）可以观察到病理性损害较生理盐水组减轻，肾间质淋巴细胞浸润较生理盐水组和茯苓素 25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组减少，肾小管坏死程度较其减轻，少见血栓形成；CsA组（图2D）移植肾组织结构基本正常，间质少量淋巴细胞浸润。部分茯苓素 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组（图2 E）术后5周肾小管萎缩、肾间质大量淋巴细胞浸润、肾小球硬化、肾间质纤维素样坏死；部分CsA组（图2 F）成活超过8周的受者移植肾经HE染色可以观察到慢性排斥反应：肾小管萎缩、硬化，肾小球硬化，肾间质轻度纤维化，血管内膜增厚，基质退行性变。

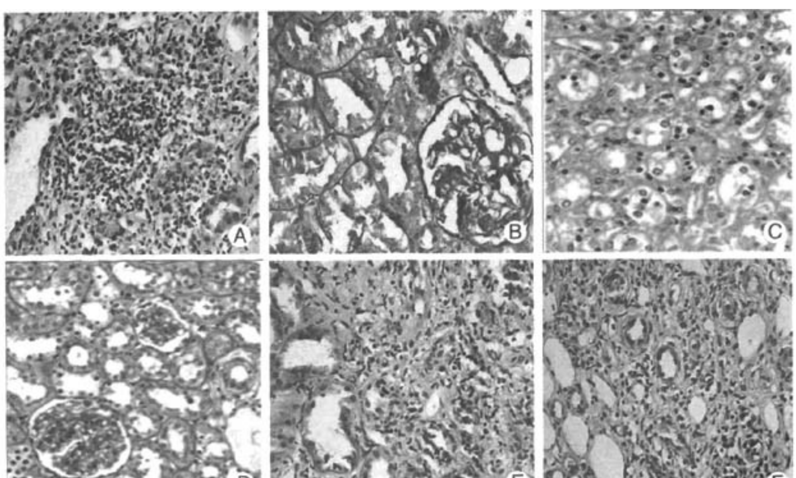
3 血清细胞因子IL-2和IFN-γ水平（图3） 术后1周，茯苓素 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和CsA组IL-2水平显著低于茯苓素 25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和生理盐水组，而茯苓素组的IL-2水平显著高于CsA组（图3A）。外周血IFN-γ水平变化与IL-2相似（图3B）。



注：1为生理盐水组；2为茯苓素 25mg·kg^{-1}·d^{-1}组；3为茯苓素 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组；4为CsA组；下图同。A为IL-2含量；B为IFN-γ含量；与生理盐水组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与茯苓素 25mg·kg^{-1}·d^{-1}组比较，$^{\triangle}P<0.05$；$^{\triangle\triangle}P<0.01$；与茯苓素 50mg·kg^{-1}·d^{-1}组比较，$^{\blacktriangle}P<0.01$

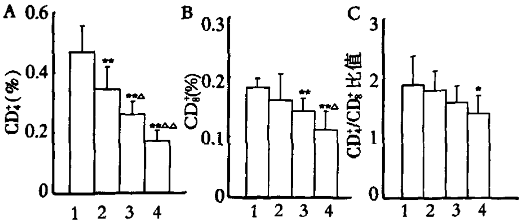
图3 术后1周各组血清细胞因子含量比较

4 外周血淋巴细胞亚群 CD_4^+，CD_8^+，CD_4^+/CD_8^+ 比值分析（图4） 茯苓素 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和CsA组 CD_4^+ 百分比显著低于茯苓素 25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组和生理盐水组，而茯苓素 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组的 CD_4^+ 百



注：A为生理盐水组术后1周；B为茯苓素 25 mg·kg^{-1}·d^{-1}组术后1周；C为茯苓素 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组术后1周；D为CsA组术后1周；E为茯苓素 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}组术后5周；F为CsA组术后8周

图2 各组移植肾病理结果（HE，×200）



注:A 为 CD_4^+细胞;B 为 CD_8^+细胞;C 为 CD_4^+/CD_8^+比值;与生理盐水组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$;与茯苓素 25mg·kg⁻¹·d⁻¹组比较,△$P<0.05$,△△$P<0.01$

图 4 术后 1 周各组外周血 CD_4^+、CD_8^+ 细胞和 CD_4^+/CD_8^+比值比较

分比显著高于 CsA 组(图 4A)。CsA 组外周血中 CD_8^+ 百分比显著低于茯苓素 25 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$组和生理盐水组,茯苓素 50 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$组显著低于生理盐水组($P<0.05$,图 4B)。$CD_4^+/CD_8^+$ 比值除 CsA 组显著低于生理盐水组外,其余各组间比较差异无统计学意义(图 4C)。

讨 论

茯苓素为一组小分子的四环三萜类化合物,它以酸的形式存在于植物中,其具有免疫调节和抗癌活性,在体内还可拮抗醛固酮活性[8];另外,茯苓三萜类化合物在体外对淋巴细胞转化有抑制作用[9]。本研究观察不同剂量茯苓素对肾移植大鼠的影响,结果提示茯苓素 50 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$组与生理盐水组比较,可显著延长移植肾存活时间,减轻病理损害,而长期的存活不如 CsA 组,且移植肾组织病理较 CsA 组损害严重。各组血肌酐和尿量的变化更好地反应了移植肾的功能,这与病理结果和存活时间相一致。这些结果表明茯苓素具有抑制排斥反应的作用但效果不如 CsA 明显。

为进一步研究茯苓素抑制排斥反应的机制,我们检测了肾移植大鼠 1 周外周血 CD_4^+、CD_8^+ 细胞、CD_4^+/CD_8^+ 的比值和 IL-2 及 IFN-γ 的含量。结果提示茯苓素 50 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$及 25 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$均可抑制淋巴细胞增殖,且对 CD_4^+ 的抑制更为显著,且这种抑制作用与茯苓素剂量正相关。茯苓素抑制淋巴细胞增殖可能是与其降低了肾移植大鼠外周血中 IL-2 和 IFN-γ 的水平有关。茯苓素 50 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$组降低外周血中 IL-2和 IFN-γ 的水平较茯苓素 25 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$组差异有统计学意义,这与其抑制淋巴细胞增殖情况相符。我们的结果和 Zhang GW[5] 等的研究有些不一致,这可能与我们用的移植模型不同有关,大鼠的肾脏移植模型相对来说受到的影响因素较多,且在移植后要切掉固有的肾脏,而心脏移植则不用。

综上所述,茯苓素具有抑制肾移植急性排斥反应的作用,且呈剂量正相关性;但作用效果不如 CsA。作者认为茯苓素可能从多环节分步骤地抑制急性排斥反应的发生,但尚不知哪一种或几种成分起到关键作用,进一步研究茯苓素的免疫抑制作用,对茯苓有效成分加以开发利用,发掘新药,将对传统中药茯苓的开发有重要意义。

参 考 文 献

[1] Vincenti F. A decade of progress in kidney transplantation [J]. Transplantation, 2004, 77(9):S52-S61.

[2] Nashan B. Maximizing the clinical outcome with mTOR inhibitors in the renal transplant recipient: defining the role of calcineurin inhibitors [J]. Transplant Int, 2004, 17(6): 279-285.

[3] De Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future[J]. Am J Kidney Dis, 2002, 35(2): 333-346.

[4] 伍朝霞. 寄生茯苓汤治疗先兆和习惯性流产 53 例[J]. 山西中医, 2000, 16(6):17.
Wu ZX. The report of Jisheng Fuling Decoction in treating 53 cases of aura and habitual abortion[J]. J Shanxi Tradit Chin Med, 2000, 16(6):17.

[5] Zhang GW, Liu HY, Xia QM, et al. Anti-rejection effect of ethanol of poria cocos wolf in rats after cardiac allograft implantation[J]. Chin Med J, 2004, 117(6):932-935.

[6] 王伟, 刘宁宇, 李建军. 茯苓提取工艺优化研究[J]. 安阳师范学院学报, 2005,(5):44-46.
Wang W, Liu NY, Li JJ. Optimization of condition for extracting from poria cocos wolf[J]. J Anyang Teach Coll, 2005, (5):44-46.

[7] Hölzen JP, Palmes D, Langer M, et al. Microsurgical training curriculum for learning kidney and liver transplantation in the rat[J]. Microsurgery, 2005, 25(8):614-623.

[8] 张敏, 高晓红, 孙晓萌, 等. 茯苓的药理作用及研究进展[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2008, 9(1):63-68.
Zhang M, Gao XH, Sun XM, et al. Pharmacological mechanisms and advancement of poria cocos[J]. J Beihua Univ (Nat Sci), 2008, 9(1):63-68.

[9] Chen YY, Chang HM. Antiproliferative and differentiating effects of polysaccharide fraction from fu-ling (poria cocos) on human leukemic U937 and HL-60 cells[J]. Food Chem Toxicol, 2004, 42(5):759-769.

(收稿:2008-12-03 修回:2009-12-28)