

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00650

· 研究快报 ·

小剂量阿斯匹林对受体大鼠慢性移植肾肾病的治疗作用

贾其磊^{1,2}, 侯子珍¹, 包军胜¹, 郝新生¹, 岳中瑾^{1*}

- 1. 兰州大学第二医院泌尿外科, 兰州 730030
- 2. 攀枝花市第二人民医院泌尿外科, 攀枝花 617068

[摘要] **目的** 观察小剂量阿斯匹林对同种异基因移植受体大鼠慢性移植肾肾病的作用并探讨可能的作用机制。**方法** 建立大鼠肾移植慢性排斥反应模型, 移植受体大鼠随机分为2组($n=10$), 均自术前1 d开始每日以环孢素A 5 mg/kg灌胃, 治疗组每日给予阿斯匹林 5 mg/kg灌胃, 对照组每日给予生理盐水 2 ml灌胃, 术后8周采静脉血测定血清肌酐、尿素氮水平; 处死动物取移植肾组织进行H-E染色及免疫组化染色(测定TGF- β_1 表达)。**结果** 阿斯匹林治疗组大鼠血肌酐、尿素氮升高程度, 组织病理损害及TGF- β_1 表达程度均较生理盐水对照组轻($P<0.05$)。**结论** 肾移植术后在常规抗排斥治疗基础上使用小剂量阿斯匹林对慢性移植肾肾病有治疗作用, 其机制可能与致纤维化因子TGF- β_1 的表达减少有关。

[关键词] 肾移植; 阿司匹林; 移植排斥; 转化生长因子 β_1

[中图分类号] R 692 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)06-0650-03

Therapeutic effect of low-dose aspirin on chronic allograft nephropathy in renal recipient rats

JIA Qi-lei^{1,2}, HOU Zi-zhen¹, BAO Jun-sheng¹, XI Xin-sheng¹, YUE Zhong-jin^{1*}

- 1. Department of Urology, Second Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China
- 2. Department of Urology, Second People's Hospital of Panzhihua, Panzhihua 617068, Sichuan, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of low-dose aspirin on allogeneic chronic allograft nephropathy in renal recipient rats and the possible mechanisms. **Methods** Chronic allograft nephropathy model of rats were established and the recipient rats were randomly divided into 2 groups with 10 in each group. Cyclosporine A (5 mg/kg) was administered as a basic treatment one day before surgery to prevent and treat acute rejection. Aspirin therapy group was given oral aspirin (5 mg/kg) daily, and control group were given oral saline 2 ml/d. Animals were sacrificed 8 weeks after operation and the serum creatinine, urea nitrogen levels were determined. Renal histomorphology and immunohistochemistry approaches were used to examine TGF- β_1 expression. **Results** The severity of pathological lesion, increase of serum creatinine and blood urea nitrogen levels, and expression of fibrosis associated factor TGF- β_1 in aspirin therapy group were significantly slighter than those of the saline control group($P<0.05$). **Conclusion** Low-dose aspirin in addition to routine anti-rejection treatment can be used for treatment of chronic allograft nephropathy in rats, which might be associated with the decreased expression of anticoagulation factor TGF- β_1 .

[Key words] renal transplantation; aspirin; graft rejection; transforming growth factor beta 1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(6):650-652]

慢性移植肾肾病(chronic allograft nephropathy, CAN)一般指在肾移植术6个月后才发生的没有明确原因的移植肾功能进行性减退, 最终导致移植肾功能衰竭, 发生率超过50%, 是导致移植肾晚期功能丧失最主要原因之一^[1]。免疫因素和非免疫因素可能共同导致了CAN, 包括排斥反应、免疫抑制剂的使用、缺血再灌注损伤、代谢异常等^[1]。目前对肾移植术后急性排斥反应有效的药物大多对CAN无效, 有效诊治CAN患者是临床研究的热点。阿斯匹林是一种化学合成的非甾体抗炎药(NSAID), 具

有解热、镇痛、抗血小板聚集等作用, 临床应用较广泛。体外研究发现小剂量阿司匹林具有免疫调节作用, 可能具有改善移植肾功能的作用^[2], 但确切疗效仍不清楚。故本研究在制备大鼠慢性移植肾肾病模型的基础上, 采用常规抗排斥措施联合阿司匹林进行治疗, 观察治疗效果并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 环孢素A(CsA)、阿司匹林购自华北制药厂, 氯吡格雷购自杭州赛诺菲安万特

[收稿日期] 2009-12-01 [接受日期] 2010-04-10

[作者简介] 贾其磊, 硕士, 主治医师, E-mail: jq11234@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0931-8942960, E-mail: yuezhongjin@sina.com

公司, HC-A 肾保存液(第二军医大学长征医院研制)。血清肌酐(Cr)测试盒、尿素氮(BUN)测试盒购自南京建成生物工程研究所, 免疫组化染色试剂盒由美国 Zymed 公司提供。

1.2 动物来源及处理 健康封闭群雄性 F344 大鼠和 Lewis 大鼠, 体质量 250~300 g, 由兰州军区总医院实验动物中心提供, 合格证号: SYXK(军 2002-026)。动物模型的建立: 选用 F344 大鼠为供体, Lewis 大鼠为受体。取供体左肾, 采用 HC-A 肾保存液原位灌注, 将供肾动脉带腹主动脉与受体腹主动脉做端侧吻合、肾静脉与受体肾静脉行端端吻合, 供体输尿管带膀胱瓣与受体膀胱行端侧吻合, 建立大鼠肾移植排斥反应模型^[3]。受体大鼠从术前 1 d 开始至移植术后 8 周均给予 CsA ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 治疗, 并随机分为 2 组(每组 10 只): 阿斯匹林治疗组(术后阿斯匹林 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃)及生理盐水对照组(生理盐水 2 ml/d 灌胃)。

1.3 观察指标

1.3.1 肾功能检测 大鼠处死前采血 2 ml, 分离血清, -80°C 保存待用; 用苦味酸法测定 Cr 含量, 用乙酰-肟法测定 BUN 含量, 均按试剂盒说明操作。

1.3.2 移植肾组织形态学观察 所有动物于术后 8 周处死, 于肾蒂平面横断移植肾, 取肾组织标本, 以 10% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋、切片, 片厚 $4 \mu\text{m}$, 行 H-E 染色, 光镜下观察。间质纤维化、小管萎缩、小管病损及血管内膜增厚均以半定量方式表示, 并按照“Banff 97”评分标准计算总分以表示慢性移植肾肾病的损害程度, 每张切片根据炎细胞浸润情况(包括间质炎、小管炎、早期移植肾小球炎和动脉内膜炎等观察), 各部位计 0~3 分, 总分 12 分^[4]。0 分: 肾小管上皮细胞无萎缩变性, 间质无或散在单核细胞浸润; 1 分: 肾小管上皮细胞萎缩变性轻, 炎细胞浸润, 病变范围 $<25\%$; 2 分: 肾小管上皮细胞萎缩变性较明显, $26\% \sim 50\%$ 炎细胞浸润; 3 分: 肾小管上皮细胞萎缩变性明显, 炎细胞浸润 $>50\%$ 。

1.3.3 肾组织中 TGF- β_1 表达水平的检测 按照试剂盒说明进行操作, 移植肾组织石蜡切片, 常规脱蜡至水, 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min。3% H_2O_2 去离子水以消除内源性过氧化物酶活性。滴加正常山羊血清工作液室温孵育 5~10 min。滴加适当比例稀释(1:100)的一抗, 4°C 过夜。PBS 冲洗后滴加生物素化二抗工作液(IgG/Bio), 37°C 孵育 15 min, PBS 冲洗。滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素注射液(HRP), 37°C 孵育 15 min。PBS 冲洗后滴加 DAB 显色剂显色。自来水充分冲洗。复染, 脱水, 透明。

中性树胶封片剂封片。置光学显微镜下观察 TGF- β_1 的表达情况。以 TGF- β_1 出现沉积为阳性, 按着色程度不同分为 0~3 级, 0 级: 无明显着色, 1 级: 少量着色, 2 级: 中等着色, 3 级: 大量着色。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 一般情况 手术时间 120~180 min; 两组各有 1 例受体大鼠死于围术期, 未纳入结果分析。其余受体均存活至 8 周。并发症有吻合口出血、静脉血栓形成、急性排斥反应等。

2.2 移植肾脏的形态学改变 大体形态学变化: 两组移植肾脏颜色均发白, 伴不同程度纤维化, 体积较原移植肾脏增大, 表面凹凸不平。冠状面切开移植肾, 见皮质增厚, 与髓质界限清晰, 未见肾盂积水征。H-E 染色结果(图 1A、1B): 光镜下见两组肾组织均出现明显的慢性移植肾肾病病理改变, 表现为小动脉内膜纤维化增厚, 管腔狭窄, 肾间质纤维组织灶状增生, 肾小管变形、水肿伴不同程度萎缩, 小动脉内膜、肾小管、间质单核细胞浸润明显; 肾小球出现不同程度变形, 局灶出现节段性硬化。阿斯匹林治疗组肾小管、间质单核细胞浸润范围 $26\% \sim 50\%$; 生理盐水对照组肾小管、间质单核细胞浸润大部分大于 50% , 阿斯匹林治疗组 Banff 97 评分(8.4 ± 0.50)明显优于生理盐水对照组(10.5 ± 0.40), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

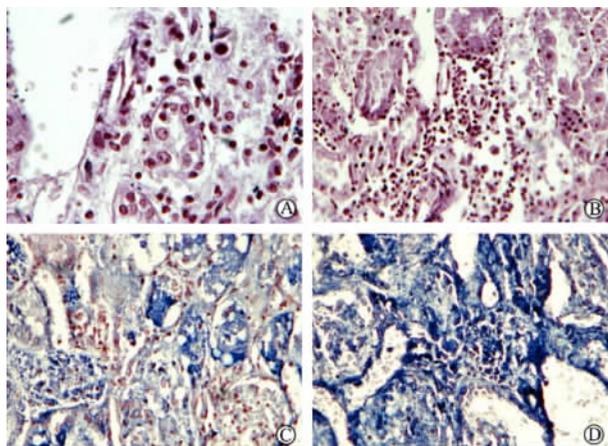


图 1 两组大鼠移植肾组织病理改变(A,B)及 TGF- β_1 (C,D)表达

Fig 1 Histopathological image(A, B) and TGF- β_1 expression(C, D) of rat kidney after renal transplantation in two groups

A, C: Aspirin treatment group; B, D: Saline control group. Original magnification: $\times 400$

2.3 各组肾功能及肾组织 TGF- β_1 表达水平的比较 生理盐水对照组受体大鼠血清 Cr、BUN 水平较

阿斯匹林治疗组高,差异有统计学意义($P < 0.05$,表1)。免疫组化染色结果(图1)表明:阿斯匹林治疗组移植肾肾小管、肾间质出现 TGF- β_1 表达,肾小球表达不明显;生理盐水对照组移植肾肾小管、肾间质、肾小球均见 TGF- β_1 表达,且着色程度(2.7 ± 0.15)重于阿斯匹林治疗组(2.1 ± 0.18),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 两组大鼠肾功能指标、Banff 97 评分及免疫组化分级的比较

Table 1 Comparison of renal function, Banff 97 score, and immunohistochemical grade between two groups

[$n=9, \bar{x} \pm s, c_B / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$]

Group	BUN	Cr
Asprin	$8.32 \pm 0.47^*$	$94.17 \pm 3.51^*$
Saline control	10.64 ± 0.46	112.39 ± 3.46

* $P < 0.05$ vs saline control group

3 讨论

CAN 的发病是免疫性和非免疫性多种因素共同作用的结果,其中非免疫因素可能是导致 CAN 的重要原因。长期反复免疫反应和不良刺激持续对血管内皮细胞造成损害,排斥反应和慢性损伤逐渐引起血管内膜损伤,内膜下胶原和基质暴露,血细胞与血小板、内皮细胞及多种细胞因子等参与修复损伤,激活和诱导血小板的聚集、黏附和释放的级联反应,可能引起血液凝血系统的变化,激活内源性凝血系统,形成不同程度的微血栓,参与了 CAN 进程^[5]。导致移植物血管收缩,管壁增厚,管腔变窄和微血栓形成,进而局部缺血、坏死、纤维化,最终使移植肾功能丧失^[6]。

小剂量阿司匹林通过不可逆地抑制血小板生成血栓素 A₂ (TXA₂),抑制血小板聚集,减少心血管事件的发生^[5]。近年来,阿斯匹林被用于移植领域,不但可以抑制血小板聚集,减少微动脉血栓的形成,还参与了免疫调节^[7]。Buckland 等^[7-8]发现,树突状细胞(DC)可以诱导和调节 CD4⁺ T 细胞免疫功能,诱导免疫耐受,阿斯匹林则能够影响 DC 加工处理抗原的能力,从而调节反应性 T 细胞的杀伤功能。阿斯匹林处理过的 DC 能抵抗刺激成熟的效应,其 CD40、CD80、CD83、CD86 的表达处于低水平,而能使抑制 T 细胞活性增强的因子 IL-3 的表达水平增高,而 IL-2 的水平降低,使 T 细胞增殖减少,使 DC 在一些非特异性细胞因子的作用下比未成熟 DC 产生较少的 IL-10 和 IL-12,抑制 T 细胞活性。

TGF- β_1 是一种多功能生长因子,与 CAN 发病有关,其表达情况对移植肾远期肾功能有预测作

用^[9]。本研究中 TGF- β_1 的表达与病理改变程度相关,提示阿司匹林的作用还可能与 TGF- β_1 的表达有关。Grotz 等^[10]认为小剂量阿司匹林可明显改善患者的移植肾功能,平均生存时间延长;一方面通过抗血小板凝集作用减少移植物血栓的形成,延缓血管病变的进程,进而延缓移植肾失功的进程;另一方面,改善了受者的心血管功能,降低心血管原因的死亡率,延长了受者的生存时间。

本研究中的大鼠移植肾组织病理学检查符合 Banff 97 标准慢性排斥反应改变^[5]。大鼠存活时间达到了预期的实验要求,证明大鼠慢性排斥反应模型的建立是成功的。本实验在成功建立了大鼠肾移植慢性排斥反应模型的基础上,用小剂量阿司匹林作为辅助治疗措施,结果显示移植术后 8 周,实验组移植肾组织淋巴细胞和单核细胞浸润、肾小管萎缩和病理损害程度较对照组明显减轻,血肌酐、尿素氮水平较低,明显减少移植肾组织纤维化因子 TGF- β_1 的表达,减轻移植肾纤维化的进程。结果提示阿司匹林可能通过抗血小板凝集而减少微血栓形成和参与免疫调节,减少促纤维生长因子 TGF- β_1 的表达,进而减轻大鼠慢性移植肾肾病病理损害的程度。

[参考文献]

- [1] 王平贤.慢性移植肾肾病[J].中华器官移植杂志,2004,25:319-320.
- [2] Hackstein H, Shapiro R, Thomson A W. Aspirin promotes kidney allograft survival and function[J]. Transplantation, 2005, 79:253-254.
- [3] 朱佳庚,张 炜,钱立新,孟小鑫.一种大鼠肾移植模型的建立[J].中华实验外科杂志,2004,21:103-104.
- [4] 陈惠萍.移植肾病理诊断的分类及各型病理特征[J].中华肾脏病杂志,1998,14:393-395.
- [5] Lemström K, Koskinen P, Häyry P. Molecular mechanisms of chronic renal allograft rejection[J]. Kidney Int Suppl, 1995, 52:S2-S10.
- [6] Baigent C, Patrono C. Selective cyclooxygenase 2 inhibitors, aspirin, and cardiovascular disease: a reappraisal[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48:12-20.
- [7] Buckland M, Jago C, Fazekasova H, George A, Lechler R, Lombardi G. Aspirin modified dendritic cells are potent inducers of allo-specific regulatory T-cells[J]. Int Immunopharmacol, 2006, 6(13-14):1895-1901.
- [8] Buckland M, Jago C B, Fazekasova H, Scott K, Tan P H, George A J, et al. Aspirin-treated human DCs up-regulate ILT-3 and induce hyporesponsiveness and regulatory activity in responder T cells[J]. Am J Transplant, 2006, 6: 2046-2059.
- [9] Hiong L C, Voon K L, Abdullah N A, Sattar M A, Rahman N A, Khan A H, et al. Effect of TGF-beta1 antisense oligodeoxynucleotide on renal function in chronic renal failure rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29:451-457.
- [10] Grotz W, Siebig S, Olschewski M, Strey C W, Peter K. Low-dose aspirin therapy is associated with improved allograft function and prolonged allograft survival after kidney transplantation[J]. Transplantation, 2004, 77:1848-1853.

[本文编辑] 贾泽军