论著

文章编号:1000-5404(2006)12-1320-04

氯沙坦预防肾移植后慢性移植物肾病的临床研究

王平贤,张艮甫,黄赤兵,范明齐,冯嘉瑜,方针强,肖 亚,贾维胜 (第三军医大学新桥医院泌尿外科,全军肾脏病中心,重庆 400037)

提 要:目的 探讨血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂氯沙坦(losartan)对同种异体肾移植患者移植肾远期功能的保护作用。**方法** 2000年1月至2001年10月期间,对肾移植术后时间达1年、移植肾功能正常、尿TGF-β_1(transforming growth factor β_1,TGF-β_1)相对浓度≥250.0 pg/mg的36例患者(A组)连续使用氯沙坦(50 mg/d)1年以上,与同期内、相同条件、未服用氯沙坦的31例患者(B组)作对比,观察两组肾功能的动态变化;3年后比较两组患者血和尿TGF-β_1相对浓度、肌酐清除率(creatinine clearance rate, Ccr)减少量和肾功不全的病例数有无差异;比较A组服用氯沙坦前后,移植肾组织中TGF-β_1 mRNA表达量有无变化;观察服用氯沙坦的不良反应。**结果** B组Ccr进行性降低;在3年随访期内,A组Ccr减少量为(5.1±4.6)ml/min,有3例(8.3%)患者肾功能不全,均明显低于B组($P<0.01$,$P<0.05$),后者分别为(13.2±9.7)ml/min和11(35.5%)例;3年后A、B两组尿TGF-β_1浓度分别为(327.0±45.6)、(511.9±50.8)pg/mg,A组明显低于B组($P<0.01$);两组血TGF-β_1浓度无明显差异($P>0.05$);A组服用氯沙坦1年后,TGF-β_1 mRNA表达量由(1.52±0.33)降为(0.96±0.25);使用氯沙坦无不良反应发生;A、B两组中肾功不全者,穿刺活检证实均为慢性移植物肾病。**结论** 氯沙坦对同种异体肾移植患者移植肾具有保护作用,其作用机制可能与降低移植肾内TGF-β_1的分泌有关。

关键词: 肾移植;肾病;转移生长因子;氯沙坦

中图法分类号: R692.01;R699.2;R972.4 **文献标识码:** A

Losartan in preventing chronic allograft nephropathy

WANG Ping-xian, ZHANG Gen-fu, HUANG Chi-bing, FAN Ming-qi, FENG Jia-yu, FANG Zhen-qiang, XIAO Ya, JIA Wei-sheng (Renal Diseases Research Center, Department of Urinary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe whether losartan, a specific angiotensin Ⅱ receptor blocker, plays a role in preventing allograft from falling chronic allograft nephropathy (CAN) in renal transplant recipients. **Methods** From January 1 of 2000 to October 31 of 2001, 36 renal transplant recipients whose urine TGF-β_1 concentration were higher than 250.0 pg/mg with normal renal function began angiotensin converting enzyme inhibitor (Losartan) therapy one year after surgery, serving as Group A. Each patient in Group A took 50 mg losartan everyday for at least one year. Thirty-one recipients who never received angiotensin converting enzyme inhibitor were studied as Group B in the same way. Side effects for taking Losartan were investigated in all patients of Group A. The values of TGF-β_1 mRNA expression in renal grafts were compared between before and 1 year after Losartan therapy in Group A. In three years after initiation of Losartan, renal function and blood and urine TGF-β_1 concentrations were compared between two groups. **Results** Ccr decreased faster in Group B than Group A. Three years later, Ccr had decreased by (5.1±4.6) ml/min and there were 3 recepients with CAN in Group A, but Group B had decreased by (13.2±9.7) ml/min in Ccr and 11 recepients with CAN. There were significantly more loss of renal function and more CAN cases in Group B than Group A. Urine TGF-β_1 concentrations were (327.0±45.6) and (511.9±50.8) pg/mg in Groups A and B respectively in 3 years after initiation of Losartan therapy. The values of blood TGF-β_1 concentration did not reveal any significant difference between two groups. One year after Losartan therapy TGF-β_1 mRNA expression in Group A significantly decreased from (1.52±0.33) to (0.96±0.25). No side effects were noted in all patients who had

作者简介:王平贤(1964-),男,湖南省双峰县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事器官移植方面的研究,发表论文24篇。电话:(023)68774617,E-mail:wpx8@21cn.com

通讯作者:范明齐,电话:(023)68755141,E-mail:FMQ@medmail.com.cn

收稿日期:2005-02-02;修回日期:2005-12-15

taken Losartan. **Conclusion** Losartan can prevent chronic allograft nephropathy in renal transplant recipients through reducing TGF-β_1 secretion in the kidney.

Key words: kidney transplantation; nephropathy; TGF-β_1; Losartan

由于环孢素 A(cyclosporine A, CsA)等应用于临床，肾移植近期效果得到了显著改善，然而，远期效果却未能得以相应的提高，这主要是因为慢性移植物肾病(chronic allograft nephropathy, CAN)导致了不少患者于肾移植数月，特别是 1 年或数年后，肾功能进行性减退，最终移植肾功能衰竭，患者恢复透析。CAN 最基本的病理改变为肾间质纤维化。转化生因子 β_1(transforming growth factor β_1, TGF-β_1)是一个关键的纤维发生因子。有研究显示，CAN 患者尿 TGF-β_1 排出量明显增多[1]，并认为 TGF-β_1 在 CAN 的发生过程中可能起着重要作用[2]。另有研究提示[3]，肾内 TGF-β_1 的分泌受肾内肾素-血管紧张素Ⅱ系统的调节(血管紧张素Ⅱ促进肾内 TGF-β_1 的产生)。本研究通过对尿 TGF-β_1 排出量高、但肾功能尚正常的部分肾移植患者，在应用血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂氯沙坦(Losartan)后，检测肾组织中 TGF-β_1 mRNA 表达量，并进行肾功能前瞻性观察和比较，旨在探讨血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂对移植肾的保护作用及其机制，为临床改善同种异体肾移植远期效果提供依据。

1　资料与方法

1.1　研究对象与分组

我院自 2000 年 1 月至 2001 年 10 月期间，同种异体肾移植术后时间达 1 年、移植肾功能正常、尿 TGF-β_1 相对浓度≥250 pg/mg 的 75 例患者(按病案号的奇、偶数)分为 A 组($n=39$)和 B 组($n=36$)。上述 75 例患者中男性 40 例，女性 35 例，年龄为 17～67(36.7±17.8)岁。

1.2　免疫抑制剂使用方案

上述 75 例患者正在使用的免疫抑制剂为：CsA 3～5 mg·kg^{-1}·d^{-1}或普乐可复(FK506)0.05～0.10 mg·kg^{-1}·d^{-1}，均分为 2 次口服，以后根据血药浓度逐渐减量；霉酚酸酯(MMF)1.0 g/d；泼尼松(Pred)10～15 mg/d。

1.3　CAN 的诊断标准

对血清肌酐(Cr)异常升高(Cr>114 μmol/L)的患者，通过以下步骤明确是否为 CAN：① 临床表现：血 Cr 异常升高发生在肾移植至少 6 个月以后，以甲基强的松龙等激素冲击治疗和调整免疫抑制剂等处理后肾功无好转，并且以后移植肾功能呈现出进行性减退的趋势。② 辅助检查：通过移植肾 B 超、CsA 或 FK506 血药浓度检测等，初步排除急性排斥反应、急性 CsA 中毒、梗阻/返流、肾血管狭窄、感染等可导致肾功能慢性损害的有着明确原因的疾患。③移植肾穿刺与组织学检查：对上述患者作移植肾穿刺活检，在组织学上移植肾没有急性排斥反应、急性 CsA 中毒、肾小球肾炎复发等特征性的病理改变，而是呈现出以间质纤维化、肾小管萎缩等为特点的各种非特异性病理改变。根据“Banff 97”标准，间质纤维化和肾小管萎缩是 CAN 的主要标志，并依其严重程度将 CAN 分为Ⅰ～Ⅲ级。

1.4　研究方法

1.4.1　氯沙坦的使用方法　　A 组连续服用氯沙坦(由杭州默沙东制药有限公司生产，其商品名为：科素亚)1 年以上，使用剂量从 25 mg/d 开始，1 周后增至 50 mg/d。A 组除服用氯沙坦外免疫抑制剂使用方案与 B 组相同。

1.4.2　检测肌酐清除率(creatinine clearance rate, Ccr)、血 TGF-β_1 浓度和尿 TGF-β_1 的相对浓度　A、B 组于实验开始时检测 1 次血、尿肌酐和 TGF-β_1 浓度；以后每 1～3 个月复查 1 次肾功能(Cr)等；3 年后再检测 1 次血、尿肌酐和 TGF-β_1 浓度。计算出 Ccr 和尿 TGF-β_1 的相对浓度。比较两组在 3 年随访期内的肾功能变化。

尿 TGF-β_1 的相对浓度 = 尿 TGF-β_1/尿肌酐，故其单位为 pg/mg。

人 TGF-β_1 ELISA 试剂盒购自晶美生物工程(北京)有限公司。

1.4.3　肾功能评价　　① 肾功不全：血肌酐持续≥114 μmol/L。② 肾功损失量：肾功损失量 = 进入实验时的 Ccr - 1 年后的 Ccr (ml/min)。③ 对 A、B 两组中肾功不全者，通过 1.3 介绍方法明确是否为 CAN。

1.4.4　比较 A 组患者服用氯沙坦前、后肾组织中 TGF-β_1 mRNA 的表达　　使用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)，检测和比较 A 组患者服用氯沙坦前及 1 年后移植肾穿刺活检组织中 TGF-β_1 mRNA 的相对含量(即 TGF-β_1 mRNA/β-actin mRNA 之比值)。引物由上海生工生物工程公司设计合成，TGF-β_1 上游引物 5′-TCCTGTGACAGCAGGGATAA-3′；下游引物 5′-GGCAGAAGTTGGCATGGTAG-3′扩增片段长度 298 bp。β-actin 上游引物 5′-AACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3′；下游引物 5′-TCATGAGGTAGTCTGTCAGGT-3′扩增片段长度 240 bp。

通用逆转录聚合酶链反应试剂盒由美国 Promega 公司生产。

1.4.5　可能影响远期肾功能的多种因素比较　　比较两组患者在年龄、性别、供肾年龄、冷缺血时间、组织配型、服用免疫抑制剂种类、进入实验时的 Ccr 和血、尿 TGF-β_1 浓度等方面有无明显差异。

1.4.6　比较两组肾功能、血和尿 TGF-β_1 浓度　　3 年后，比较 A、B 两组肾功不全的病例数、血和尿 TGF-β_1 浓度及肾功损失量(即 Ccr 减少量)有无差异。

1.4.7　观察使用氯沙坦后出现的不良反应　　记录 A 组患者在服用氯沙坦期间有无低血压等不良反应。

1.5　统计学处理

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示；采用 SPSS 10.0 软件行 χ^2 检验、t 检验。

2　结果

2.1　A、B 两组随访情况及发生 CAN 的各危险因素比较

3 年后，A 组 39 例患者中有 36 例连续服用氯沙坦 1 年以上、并完成了全程随访，B 组 36 例患者中有 31 例完成了全程随

访。两组患者在年龄、性别、供肾年龄、冷缺血时间、组织配型、服用免疫抑制剂种类(FK506/CsA)、进入实验时的血压、Ccr和血、尿TGF-β_1浓度、24 h尿蛋白定量、甘油三酯、胆固醇等方面均无明显差异($P>0.05$),见表1。

表1 两组发生CAN的各危险因素比较

组别	例数(n)	年龄(岁)	性别(女/男)	供者年龄(岁)	冷缺血时间(h)	HLA-A,B错配(位点)	HLA-Dr错配(位点)	免疫抑制剂(FK506/CsA)	进入实验时血压(mmHg)	进入实验时Ccr(ml/min)	血TGF-β_1(ng/ml)	尿TGF-β_1(pg/mg)	尿蛋白(mg/24 h)	甘油三酯(mmol/L)	胆固醇(mmol/L)
A组	36	39.2±13.7	20/16	28.8±7.2	9.1±4.7	2.4±0.9	1.3±0.6	8/28	(125±15)/(80±10)	92.3±7.2	38.5±10.6	432.4±120.3	99.8±42.3	1.32±5.17	3.71±2.13
B组	31	39.7±14.0	17/14	28.5±7.0	9.0±5.2	2.3±0.8	1.2±0.6	7/24	(120±20)/(85±10)	92.9±6.9	38.9±11.4	429.0±120.7	102.2±49.4	1.35±5.09	3.75±2.30

2.2 A、B两组随访期内肾功能比较

在3年随访期内A组肾功能基本稳定,B组肾功能呈现出进行性减退,随访满1、2、3年时,A、B两组Ccr分别为:92.5、92.3、92.0 ml/min和91.8、88.1、85.9 ml/min,约从随访2年后开始,B组Ccr明显低于A组($P<0.01$)。

2.3 两组在3年内肾功不全病例数、Ccr损失量及血和尿TGF-β_1相对浓度比较

结果显示,3年随访期内,B组Ccr减损量、肾功不全病例数均明显高于A组($P<0.01$, $P<0.05$);3年后,B组尿TGF-β_1浓度明显高于A组($P<0.01$),而两组血TGF-β_1浓度没有明显差异($P>0.05$)(表2)。

表2 3年后A、B两组各参数比较

组别	病例数(n)	肾功不全(%)	Ccr减损量(ml/min)	血TGF-β_1浓度(ng/ml)	尿TGF-β_1浓度(pg/mg)
A组	36	3(8.3%)	5.1±4.6	39.7±11.0	327.0±45.6
B组	31	11(35.5%)[a]	13.2±9.7[b]	40.3±11.5	511.9±50.8[b]

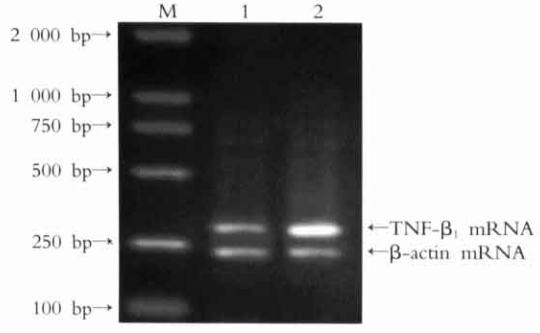
a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与A组比较

2.4 两组在3年随访内,肾功异常者移植肾活检结果

上述14例肾功不全的患者均进行了移植肾穿刺活检,各标本经石蜡切片、HE染色,在普通光镜下观察,且均未发现有急性排斥反应、CsA中毒等特殊原因导致Cr异常升高的特征性改变,而是呈现出以间质纤维化、肾小管萎缩等非特异性改变为特点的CAN的组织学改变。

2.5 A组服用氯沙坦前、后肾组织中TGF-β_1 mRNA表达量比较

在A组有7例患者于服用氯沙坦前和1年后进行了先后2次移植肾穿活检。活检组织中TGF-β_1 mRNA表达量由(1.52±0.33)降为(0.96±0.25),呈现出显著降低($P<0.01$),见图1。



M: 标准; 1:氯沙坦治疗1年后;2:氯沙坦治疗前

图1 服用氯沙坦前和1年后肾组织中TGF-β_1 mRNA表达量比较

2.6 不良反应

A组患者对氯沙坦耐受良好,部分血压较高的患者,服用氯沙坦后高血压均得到了良好的控制。无1例发生心慌、头晕等低血压并发症。

3 讨论

CNA是指同种异体肾移植数月,特别是1年或数年后,移植肾功能进行性减退,最终肾功能衰竭,恢复透析,在组织学上移植肾呈世面现出以间质纤维化、肾小管萎缩等为特点的各种非特异性病理改变,这些非特异性病理改变还包括肾小球硬化、肾小球基底膜增厚、皱缩、系膜基质增多、动脉硬化、小动脉透明变性、动脉血管纤维性内膜增厚、毛细血管基底膜分层、断裂等,根据"Banff 97"标准,间质纤维化和肾小管萎缩是CAN的主要标志,依其严重程度分为Ⅰ~Ⅲ级,并认为CAN可以伴有或不伴有血管的改变[6]。CAN患者常伴有不同程度的高血压和蛋白尿。CAN一般在肾移植6个月后才发生。这种移植物功能衰竭已往叫做慢性排斥反应,鉴于其发病原因涉及到免疫和非免疫因素,故更适宜用"慢性移植物肾病"这一包容性更大的术语[7]。CAN是现今影响移植肾远期功能的主要障碍。

导致CAN的具体原因目前尚不清楚[8],这也是它有别于其他特殊因素导致的移植肾损害之处,这些特殊原因包括:急性CsA中毒、急性排斥反应、梗阻/返流、肾血管狭窄、移植肾感染等[9]。因此,在诊断CAN时,需与上述特殊原因导致的移植肾进行性损害作鉴别[5]。目前发现许多免疫(移植抗原依赖)或/和非免疫(移植抗原非依赖)的因素都可能是导致CAN的危险因素[10]。CAN的诊断主要包括3个方面:临床表现、排除导致慢性肾功能损害有着明确原因的疾患和移植肾穿刺活检,后者在组织学上没有急性排斥反应、急性CsA中毒、肾小球肾炎复发等特异的病理改变,而是呈现出以间质纤维化、肾小管萎缩等为特点的各种非特异性病理改变。

鉴于TGF-β_1的产生受肾内肾素血管紧张素Ⅱ系统的调节,肾素血管紧张素Ⅱ诱导肾小球系膜细胞等

产生和分泌 TGF-β_1[11,12]，因此，从理论上讲应用血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂将有利于延缓 CAN 的发展。

在正常情况下，尿量的多少会随机体水量摄入的多少而改变，而尿中各物质（如 TGF-β_1）的含量也会因此而发生改变，为了克服这一不稳定因素，本试验参照尿中其他物质测定时所常采用的惯例，即以尿 Cr 含量为参照对其进行校正，以此计算出尿中 TGF-β_1 的相对含量，即 TGF-β_1/尿 Cr。本研究曾在预试验中检测了 67 例肾移植达 1 年肾功能正常的受者，其尿 TGF-β_1 的相对浓度为 74.5～332.1 pg/mg，根据上述情况，我们将尿 TGF-β_1 相对浓度≥250.0 pg/mg 定为本研究的入选标准。

本研究患者在入选时虽然为随机分组，但 3 年后 A 组 39 例患者中只有 36 例完成了全程随访、B 组 36 例患者中只有 31 例完成了全程随访，为了排除人为因素的影响，故研究中对可能影响移植肾远期功能的多种因素在两组间进行了分析、比较。

本研究结果显示，尿 TGF-β_1 排出量增多，但肾功能尚正常的肾移植患者，在应用血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂后（A 组），移植肾功能稳定，3 年内肾功能的损失量和肾功不良者（穿刺活检证实为 CAN）的病例数显著少于对照组（B 组），B 组肾功能呈现出进行性减退，可见氯沙坦对移植肾具有保护作用；在 A 组使用氯沙坦前，两组患者血、尿 TGF-β_1 浓度都没有明显差异，3 年后，A 组尿 TGF-β_1 浓度明显低于 B 组，而二者血 TGF-β_1 浓度仍然没有差异。血 TGF-β_1 浓度没有差异意味着在两组患者通过肾小管基底膜的 TGF-β_1 量是相同的，因此尿中减少的 TGF-β_1 应该是由于肾脏分泌减少所致。从氯沙坦作用机制来看，这种尿中 TGF-β_1 排出减少很可能是氯沙坦作用的结果。事实上从基因表达来看，A 组服用氯沙坦 1 年后，TGF-β_1 mRNA 表达量显著降低。如前所述，TGF-β_1 是一个关键的纤维发生因子，而纤维化则是 CAN 的基本特点，由此推断，尿 TGF-β_1 浓度较高的患者（A 组）在使用血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂氯沙坦 1 年以上后，肾功能不全的发生率明显小于 B 组、肾功损失量（即 Ccr 减少量）明显少于 B 组可能是氯沙坦导致肾脏 TGF-β_1 分泌减少所致。

患者对氯沙坦耐受良好，这类患者通常伴有不同程度的高血压，服用氯沙坦后高血压患者症状明显好转，故患者对服氯沙坦普遍有较好的顺应性。虽然 A 组肾功能稳定可能与氯沙坦的降压作用有关，但从这些患者血压下降的情况以及使用氯沙坦后尿 TGF-β_1 的变化来看，氯沙坦对肾功能的影响显然不仅仅是其降血压作用所能解释的。

根据本研究结果，作者认为在临床上有必要定期检测肾移植患者的尿 TGF-β_1 相对浓度，对明显升高的患者应引起重视，因为这类患者有可能会出现进行性肾功能损害。试用血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂则可能避免这一现象。

参考文献：

[1] MORALES J M, ANDRES A, RENGEL M, *et al*. Influence of cyclosporin, tacrolimus and rapamycin on renal function and arterial hypertension after renal transplantation[J]. Nephrol Dial Transplant, 2001, 16(Suppl 1): 121－124.

[2] ISHIMURA T, FUJISAWA M, ISOTANI S, *et al*. Transforming growth factor-beta1 expression in early biopsy specimen predicts long-term graft function following pediatric renal transplantation[J]. Clin Transplant, 2001, 15(3): 185－191.

[3] CAMPISTOL J M, INIGO P, JIMENEZ W, *et al*. Losartan decreases plasma levels of TGF-beta1 in transplant patients with chronic allograft nephropathy[J]. Kidney Int, 1999, 56(2): 714－719.

[4] DENSEM C G, MUTLAK A S, PRAVICA V, *et al*. A novel polymorphism of the gene encoding furin, a TGF-beta1 activator, and the influence on cardiac allograft vasculopathy formation? [J]. Transplant Immunol, 2004, 13(3): 185－190.

[5] CITTERIO F, POZZETTO U, ROMAGNOLI J, *et al*. Plasma levels of transforming growth factor-beta1 in renal transplant recipients receiving different immunosuppressive regimens[J]. Transplant Proc, 2004, 36(3): 698－699.

[6] FREESE P, SVALANDER C T, MOLNE J, *et al*. Chronic allograft nephropathy--biopsy findings and outcome[J]. Nephrol Dial Transplant, 2001, 16(12): 2401－2406.

[7] PAUL L C. Chronic allograft nephropathy: an update[J]. Kidney Int, 1999, 56(3): 783－793.

[8] 黄云剑，梅煜明，王沂芹，等. Smad7 基因转染拮抗 TGF-β_1 对培养肾小管细胞的影响[J]. 第三军医大学学报，2003，25(12)：1049－1452.

[9] 许长宝，夏熙正，郝　斌，等. 肾移植术后不明病原体肺部感染糖皮质激素治疗体会[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(5)：939－940.

[10] VAZQUEZ M A. Chronic rejection of renal transplants: new clinical insights[J]. Am J Med Sci, 2000, 320(1): 43－58.

[11] 周　强，石国华，杨　柳，等. BMP 及 TGF-β 复合生物材料治疗股骨头坏死的组织学观察[J]. 第三军医大学学报，2002，24(5)：567－570.

[12] YANG C W, AHN H J, KIM W Y, *et al*. Synergistic effects of mycophenolate mofetil and losartan in a model of chronic cyclosporine nephropathy[J]. Transplantation, 2003, 75(3): 309－315.

（编辑　周　芳）