基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0833-04

雷公藤多甙对冷保存坐骨神经雪旺细胞凋亡及免疫原性的影响

黄英如[1],蒋电明[2],曹文富[1],欧云生[2],安 洪[2]
(1.重庆医科大学中医药学院骨科教研室,重庆 401331;2.重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察雷公藤多甙(Tripterygium glycoside,TG)对冷保存大鼠坐骨神经雪旺细胞凋亡和主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex,MHC)表达的影响。方法:Wistar 大鼠坐骨神经在 0、200、400、800 mg/L TG 溶液(A、B、C、D 组)中,4℃保存 24 h、3 d、7 d,HE 染色光镜观察,免疫组化检测 Bcl-2 表达,TUNEL 法检测细胞凋亡。用 TG 溶液保存 24 h 的 Wistar 大鼠坐骨神经桥接对应组 SD 大鼠(A'、B'、C'、D'组)坐骨神经 10 mm 缺损,E'组为新鲜异体移植,移植后 1、2、4 周,行大体及光镜观察,免疫组化检测移植物 MHC-Ⅰ、Ⅱ分子表达。结果:冷保存不同时间,各组神经纤维结构正常。保存 24 h,各组间细胞凋亡差异无统计学意义($P>0.05$)。保存 3、7 d 时,Bcl-2 表达 B、C 组高于 A、D 组($P<0.05$),而 B 组与 C 组间、A 组与 D 组间差异无统计学意义(均 $P>0.05$);细胞凋亡 A 组高于 B、C、D 组,B、D 组高于 C 组(均 $P<0.05$),但 B、D 组间差异无统计学意义($P>0.05$)。移植术后移植物与周围组织粘连、炎症细胞入侵,B'、C'、D'组比 A'、E'组轻;移植物 MHC-Ⅰ、Ⅱ分子表达,术后第 1 周出现高峰,同一时相 B'、C'、D'组低于 A'、E'组,C'、D'组低于 B'组(均 $P<0.05$),但 A'与 E'组间、C'与 D'组间差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。结论:一定浓度的 TG 能抑制冷保存大鼠坐骨神经雪旺细胞凋亡和主要组织相容性抗原表达,降低异体移植后排斥反应。

【关键词】雷公藤多甙;异体神经移植;冷保存;雪旺细胞凋亡;移植免疫
【中国图书分类法分类号】R622.3;R651.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-01-02

Effects of tripterygium glycoside on schwann's cell apoptosis and immunogenicity of cold preserved sciatic nerve

HUANG Ying-ru, et al
(*Department of Orthopedics, the Traditional Chinese Medical College, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of Tripterygium glycoside (TG) on Schwann's cell apoptosis and major histocompatibility complex (MHC) of cold preserved sciatic nerve in rats. *Methods*: At 4℃, Wistar rat sciatic nerve segments were preserved in 0, 200, 400, 800 mg/L TG solution (groups A, B, C, D) for 24 hours, 3 days and 7 days. The sciatic nerves were observed by HE staining, the expression of Bcl-2 was detected by immunohistochemical staining, and the apoptosis of Schwann's cell by TUNEL. The Wistar rat sciatic nerve segments preserved for 24 hours were transplanted to the corresponding SD rats (groups A', B', C', D'), and group E' received fresh nerve allograft. After allograft, the gross appearance and the pathology were observed at 1, 2 and 4 weeks, and the expression of MHC-I, II of the allografts were detected by immunohistochemical staining. *Results*: The microstructure of sciatic nerves cold preserved were normal. The apoptosis of cold preserved sciatic nerves had no significant difference among the groups after preserved for 24 hours ($P>0.05$). After preserved for 3 days or 7 days, the expression of Bcl-2 in groups B and C were significantly higher than those in groups A and D ($P<0.05$), but there was no significant difference between group B and group C, between group A and group D ($P>0.05$); the apoptosis index in group A was significantly higher than those in groups B, C and D, higher in groups B and D than in group C ($P<0.05$), but there was no significant differences between group B and group D ($P>0.05$). The adhesions between allografts and connective tissue, and the inflammatory cell infiltration in groups B', C' and D' were better than those in groups A' and E'. The expression of MHC-I, II of the allografts reached the peak at the first week. At the same time, the expression of MHC-Ⅰ、Ⅱ in groups B', C' and D' were significantly lower than those in groups A' and E', lower in groups C' and D' than in group B', but there was no significant differences between group A' and group E', between group C' and group D' ($P>0.05$). *Conclusion*: Certain concentration of TG can inhibit the apoptosis of Schwann's cell and the expression of major histocompatibility antigen of cold preserved sciatic nerve in rats, and decrease rejection after nerve allograft.

作者介绍:黄英如(1966-),男,讲师,硕士,
研究方向:周围神经损伤。

基金项目:重庆市卫生局中医药科技项目(编号:2009-2-138)。

【Key words】Tripterygium glycoside; Nerve allograft; Cold preservation; Schwann's cell apoptosis; Transplantation immunity

中药雷公藤具有免疫抑制作用,能抑制同种异体器官移植排斥反应,延长异体移植器官的存活时间,抑制急性移植物抗宿主病发生[1,2]。但口服雷公藤制剂对生殖、内分泌、消化及血液系统等均有较强毒性,其药效、剂量与毒性呈量效关系[3]。以往研究发现,供体神经经雷公藤提取物(雷公藤多甙,Tripterygium glycoside,TG)短期冷保存,异体移植后排斥反应程度降低,肢体功能恢复良好,而宿主免疫抑制剂用量则减少[4,5]。本研究将大鼠坐骨神经在 4℃下,于含有不同浓度 TG 的基础细胞培养液(Minimum essential media,MEM)中保存不同时间,观察 TG 对周围神经冷保存后雪旺细胞(Schwann's cell,SC)凋亡和主要组织相容性抗原的影响,探讨中药免疫抑制剂在组织器官保存中的应用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

Wistar 大鼠 80 只为供体、SD 大鼠 75 只为受体(成年雄性清洁级,体重 200~250 g),由重庆医科大学实验动物中心提供。雷公藤多甙片(湖北黄石飞云制药有限公司);羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、谷胱甘肽(上海生工生物工程技术服务有限公司);小鼠抗大鼠 Bcl-2、免疫组化试剂盒(武汉博士德公司);小鼠抗大鼠 MHC-Ⅰ、Ⅱ(Pharmigen 公司,美国);TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(Roche 公司,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 TG 溶液配制 1 000 ml MEM 溶液中依次加入谷胱甘肽 0.31 g、HEPES 3.57 g。TG 片碾为细末溶于上述溶液中,密封 4℃冰箱中过夜,微孔滤膜(0.22 μm)抽滤,制成含 TG 0(除不含 TG 外,成分相同)、200、400 mg/L 及 800 mg/L 的保存溶液,渗透压(690.10 ± 23.03) kPa,pH 值 7.30 ± 0.10,密封置 4℃冰箱保存备用。

1.2.2 供体神经冷保存 无菌条件下,用消毒剃须刀切取供体大鼠双侧坐骨神经各 20 mm 长,生理盐水冲洗,立即置于已预冷的 TG 溶液,4℃冰箱中密闭保存 24 h、3 d、7 d(各浓度组取等量溶液浸泡相同数量神经)。

1.2.3 动物模型分组 Wistar 大鼠坐骨神经,保存在 0、200、400、800 mg/L TG 溶液中,分别为 A、B、C、D 组。SD 大鼠,采用随机数字表法分为 A'、B'、C'、D'、E'组(n=15),A'、B'、C'、D'分别对应供体 A、B、C、D 组,E'组为新鲜异体坐骨神经移植。供体神经在相应浓度 TG 溶液中保存 24 h 后移植,均选择右后肢建立动物模型。

1.2.4 神经移植手术 采用 3.5%水合氯醛(1 ml/100 g)腹腔麻醉,行右股后外侧纵行切口,沿肌间隙钝性分离,显露坐骨神经。距梨状肌下孔 5 mm 处,消毒剃须刀片整齐切除大鼠右侧坐骨神经形成 10 mm 缺损。将供体坐骨神经修成 10 mm 长,10 倍手术显微镜下,吻合受体大鼠坐骨神经 10 mm 缺损,10-0 尼龙线行神经外膜无张力间断缝合 4~6 针,逐层缝合切口。手术均单人操作完成,术后各组大鼠均未做特殊处理。于术后 1、2、4 周各组处死 5 只大鼠进行观察。

1.3 观测指标

供体坐骨神经保存 24 h、3 d 及 7 d 后,检测神经组织结构变化、细胞凋亡及 Bcl-2 表达;异体移植后 1、2、4 周,行大体及 HE 染色观察,以及移植神经 MHC-Ⅰ、Ⅱ分子表达检测。

1.3.1 冷保存神经形态学变化 HE 染色观察神经组织结构变化。

1.3.2 冷保存神经 Bcl-2 表达 用武汉博士德公司提供的一抗、二抗试剂盒。切片 5 μm 厚,60℃烤片 3 h,SABC 法免疫组化染色(即用型 SABC 试剂盒),苏木素液轻度复染,脱水,二甲苯透明,封固切片。每个标本随机取 2 张切片,光镜下每张切片随机取 5 个高倍视野,应用 Image-Pro Plus 图像处理系统分析,计算每个视野阳性染色的平均积分吸光度值(Integrated absorbance,IA)。

1.3.3 冷保存神经细胞凋亡检测 用 TUNEL 法检测,按照试剂盒说明操作,设立阳性对照(加 TdT 反应前,切片在 200 μg/L DNase Ⅰ溶液中 37℃孵育 15 min)和阴性对照(切片不加 TdT 酶)。DAB 显色、苏木素轻度复染。每个标本随机取 2 张切片,光镜下每张切片随机取 5 个高倍视野,观察阳性细胞核(棕黄色)和阴性细胞核(蓝色),计算细胞凋亡指数(Apoptotic index,AI):阳性细胞核/总细胞核 × 100%。

1.3.4 神经移植后一般情况观察 观察术后大鼠存活、伤口愈合及溃疡发生情况。术后 1、2、4 周,观察移植段神经肿胀程度、与周围组织粘连情况。

1.3.5 移植神经 HE 染色观察 切取移植神经片段中部,10%甲醛固定,石蜡包埋、切片(5 μm 厚),HE 染色观察移植神经结构及炎性细胞浸润程度。

1.3.6 移植神经 MHC-Ⅰ、Ⅱ分子表达 移植术后 1、2、4 周,用 SABC 法免疫组化染色,检测移植神经片段 MHC-Ⅰ、Ⅱ分子表达,方法同"1.3.2"。

1.4 统计学分析

数据以均数 ± 标准差表示,用统计软件 SPSS12.0 行重复测量资料的方差分析,并用 Multivariate 行组间两两比较,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 冷保存神经形态学变化

大鼠坐骨神经冷保存后不同时间,各组神经纤维结构清晰、排列整齐。

2.2 冷保存神经 Bcl-2 表达

与 24 h 相比,保存 3、7 d 时 A、D 组 Bcl-2 表达明显降低(P<0.05),而 B、C 组轻度增高。保存 24 h,各组间差异无统计学意义(P>0.05);保存 3、7 d 时,B、C 组高于 A、D 组(P<0.05),而 B 组与 C 组间、A 组与 D 组间差异无统计学意义(均 P>0.05)(表 1)。

2.3 TUNEL 观察

随冷保存时间增加,各组阳性细胞核不同程度增多:其中 A、B、D 组保存 24 h 与保存 3、7 d 时间点比较,以及保存 3 d 与保存 7 d 时间点比较,差异均有统计学意义(均 P<0.05),而 C 组阳性细胞核增幅较小。保存 24 h,各组间阳性细胞核差异无统计学意义(P>0.05);保存 3、7 d,A 组阳性细胞核明显比 B、C、D 组多(P<0.05),B、D 组比 C 组多(P<0.05),而 B、

D 组间差异无统计学意义(P>0.05)(图 1 和表 1)。

2.4 移植后大体观察

术后 1 周大鼠伤口均一期愈合,进食、饮水及活动正常,观察期间切口无感染化脓及大鼠死亡;3 周时,A'组、E'组各有 1 只大鼠患足溃疡(实验结束时溃疡未愈合),其余组未发生足底溃疡和足趾脱落。移植神经情况,术后 1 周 A'组、E'组肿胀明显,与周围组织轻度粘连,但移植神经较易游离,其余组移植神经无明显肿胀、粘连;术后 2 周,A'组、E'组移植神经与周围组织粘连更重,其余组与 1 周情况相似;术后 4 周,A'组、E'组移植神经明显结缔组织包裹,粘连严重、分离困难,吻合口明显膨大(神经瘤),其余组移植神经有轻微结缔组织包裹和粘连,吻合口未见神经瘤。

2.5 移植神经 HE 染色

术后 1 周,A'、E'组移植神经炎症细胞入侵明显,而 B'、C'、D'组入侵细胞明显减少,各组神经纤维结构排列正常(图 2);术后 2 周,A'、E'组细胞入侵仍明显,神经纤维结构欠规则,术后 4 周 A'、E'组细胞入侵减少,但神经纤维失去原有结构,神经管塌陷,而 B'、C'、D'组在术后 2 周和 4 周,入侵细胞进一步减少,神经纤维结构基本正常。

2.6 移植神经 MHC-Ⅰ、Ⅱ分子表达

移植物 MHC-Ⅰ、Ⅱ免疫组化染色,术后第 1 周染色最深,以后逐渐减弱:其中 A'、E'组术后 1 周与 2 周、4 周比较,术后 2 周与 4 周比较,差异均有统计学意义(均 P<0.05);B'、C'、D'组术后 1 周与 2 周、4 周比较,差异有统计学意义(P<0.05),但术后 2 周与 4 周比较差异无统计学意义(P>0.05)。各时相,B'、C'、D'组阳性染色比 A'、E'组浅(均 P<0.05),C'、D'组比 B'组浅(均 P<0.05),而 A'与 E'组间、C'与 D'组间无明显差异(均 P>0.05)(图 3、4 和表 2)。

3 讨 论

解决异体神经移植排斥反应措施主要包括对供体神经预处理和对宿主进行免疫抑制治疗。目前,供体神经预处理通常是灭活/清除神经组织细胞成分(包括 SC 在内),降低其免疫原性,从而预防异体移植后排斥反应发生[6-8]。但 SC 是周围神经主要结构与功能细胞,对周围神经损伤后再生过程

表 1 坐骨神经冷保存后 Bcl-2 和 AI 变化(n=6, $\bar{x}\pm s$)

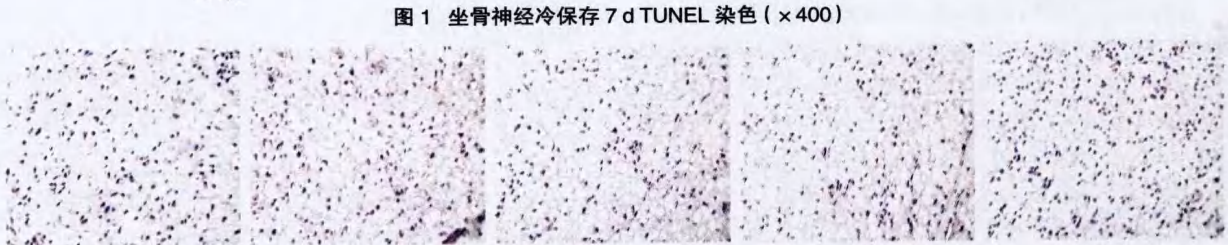
组别	Bcl-2			AI		
	24 h	3 d	7 d	24 h	3 d	7 d
A	1 326.95 ± 33.12	1 073.56 ± 29.15	1 045.13 ± 20.48	6.61 ± 0.75	16.98 ± 1.09	20.65 ± 1.2 1
B	1 356.85 ± 27.13	1 392.10 ± 39.33△	1 403.54 ± 34.46△	5.83 ± 0.53	9.83 ± 0.69▲	13.63 ± 0.97▲
C	1 381.50 ± 41.06	1 409.28 ± 32.84△	1 426.31 ± 44.37△	5.30 ± 0.61	6.08 ± 0.43▲☆	8.45 ± 0.88▲☆
D	1 394.09 ± 37.28	1 095.43 ± 28.51	950.23 ± 25.70	6.22 ± 0.49	10.37 ± 0.90▲	15.21 ± 1.06▲

注:△与 A、D 组比较 P 值 <0.05;▲与 A 组比较 P 值 <0.05;☆与 B、D 组比较 P 值 <0.05



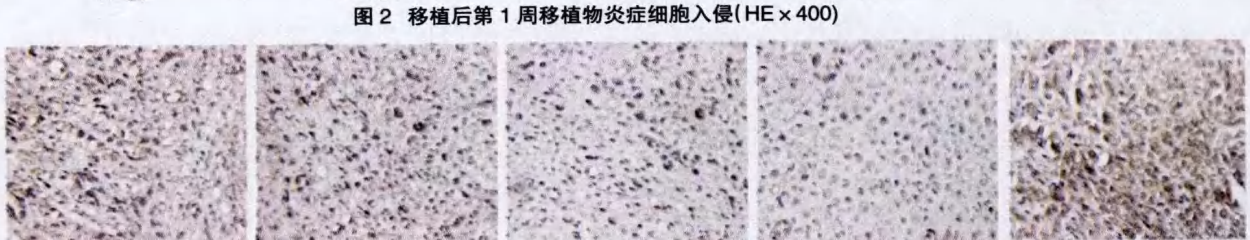
A 组　B 组　C 组　D 组

图 1 坐骨神经冷保存 7 d TUNEL 染色(×400)



A'组　B'组　C'组　D'组　E'组

图 2 移植后第 1 周移植物炎症细胞入侵(HE×400)



A'组　B'组　C'组　D'组　E'组

图 3 移植后第 1 周移植物 MHC-Ⅰ表达(免疫组化染色,×400)



A'组　B'组　C'组　D'组　E'组

图 4　移植后第 1 周移植物 MHC-Ⅱ表达（免疫组化染色，×400）

表 2　术后移植神经 MHC-Ⅰ、Ⅱ分子表达（n=5, $\bar{x} \pm s$）

组别	MHC-Ⅰ			MHC-Ⅱ		
	1 周	2 周	4 周	1 周	2 周	4 周
A'	15 223.59 ± 305.37	10 018.61 ± 286.20	7 931.07 ± 183.41	9 308.27 ± 196.25	4 905.34 ± 160.53	3 077.16 ± 145.11
B'	11 208.52 ± 313.80△	7 228.90 ± 245.64△	6 132.44 ± 170.39△	6 960.58 ± 191.20△	3 764.03 ± 175.08△	2 469.81 ± 133.51△
C'	8 780.55 ± 270.43△▲	5 711.08 ± 211.62△▲	4 695.64 ± 176.48△▲	5 083.79 ± 208.23△▲	2 814.45 ± 127.75△▲	1 958.03 ± 120.89△▲
D'	8 609.27 ± 291.06△▲	5 583.14 ± 260.75△▲	4 630.76 ± 142.09△▲	4 965.07 ± 193.07△▲	2 773.82 ± 167.48△▲	1 903.19 ± 135.10△▲
E'	15 830.72 ± 382.41	10 752.65 ± 324.56	8 165.14 ± 158.22	9 570.94 ± 265.19	5 116.07 ± 197.03	3 184.37 ± 130.72

注：△与 A'、E'比较 P 值 <0.05；▲与 B'比较 P 值 <0.05

中髓鞘形成、神经营养因子、粘附分子以及细胞外基质的合成与分泌均极为重要，SC 的缺失将严重影响周围神经缺损特别是长段缺损的修复能力。预处理方法若能降低供体神经免疫原性而保留其 SC，将大大提高周围神经缺损的修复能力。

雷公藤制剂能促进 NGF 及脑源性神经营养因子等的合成和分泌，具有神经保护作用和抗细胞凋亡作用[9,10]。本实验结果显示，保存液中未添加 TG 时（A 组），随着保存时间的增加，Bcl-2 表达明显降低，SC 凋亡增加；而在保存液中添加 200（B 组）、400 mg/L（C 组）TG 后，同一时相 Bcl-2 表达则增加，而 SC 凋亡减少。Bcl-2 是一种原癌基因产物，能抑制细胞凋亡和促进细胞存活，本实验说明坐骨神经冷保存过程中添加一定浓度的 TG，能调节 Bcl-2 表达，抑制缺血冷保存时细胞凋亡。但 TG 浓度达到 800 mg/L（D 组），Bcl-2 表达降低，这可能说明高浓度 TG 对冷保存神经组织细胞有较强毒性。

雷公藤制剂具有抗排斥反应作用，在体外能抑制 MHC 分子、共刺激分子表达，削弱 APC 抗原呈递功能和对 T 细胞的激活作用[11,12]。本实验术后移植神经与周围组织粘连、炎症细胞入侵，B'、C'、D'组均明显轻于 A'、E'组；各时相，B'、C'、D'组移植神经 MHC-Ⅰ，Ⅱ表达显著低于 A'、E'组（P<0.05），C'、D'组低于 B'组（P<0.05），而 A'组与 E'组间、C'组与 D'组间无明显差异（均 P>0.05）。说明一定浓度的 TG 冷保存供体神经，能抑制神经移植物 MHC-Ⅰ、Ⅱ分子表达，降低异体移植后急性期机体排斥反应，减少神经移植物中淋巴细胞入侵。而高浓度 TG 保存，虽能降低移植后排斥反应，但其对 SC 的毒性是必须考虑的[3]。

综上所述，一定浓度的 TG 对冷保存神经 SC 细胞凋亡具有保护作用，并能降低供体神经免疫原性，减轻异体移植后排斥反应，这对提高异体神经移植成功率具有重要意义。但 TG 保存供体神经的最佳浓度与时间，能否对深低温保存的神经组织 SC 具有保护作用，以及这种方法的安全性等问题还需进一步研究。

参 考 文 献

[1] 于艳秋，张义侠，金玉楠，等.雷公藤多甙对急性移植物抗宿主病小鼠的作用[J].中国实验血液学杂志，2006，14(5)：928-933.

[2] Chen T, Xu H, Wang H Q, et al.Prolongation of rat intestinal allograft survival by administration of triptolide-modified donor bone marrow-derived dendritic cells[J]. Transplant Proc, 2008, 40(10): 3711-3713.

[3] 张志勇，张　喆.雷公藤的毒理作用及增效减毒配伍的研究进展[J].中国药房，2008，19(9)：705-707.

[4] 蒋　华，蒋电明，黄英如，等.经雷公藤预处理大鼠异体神经移植后早期组织形态及免疫学观察[J].中国修复重建外科杂志，2008，22(11)：1378-1383.

[5] 黄英如，蒋电明，陈　路，等.供体神经雷公藤预处理对异体移植后神经再生的影响[J].中国矫形外科杂志，2009，17(4)：293-296.

[6] 孙明学，唐金树，王　鑫，等.去细胞处理对化学去细胞异体神经免疫原性的影响[J].中华外科杂志，2006，44(4)：275-278.

[7] Evans P J, MacKinnon S E, Midha R, et al. Regeneration across cold preserved peripheral nerve allografts[J]. Microsurgery, 1999, 19(3): 115-127.

[8] Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction[J]. Brain Res, 1998, 795(1-2): 44-54.

[9] Pan X D, Chen X C, Zhu Y G, et al. Neuroprotective role of tripchlorolide on inflammatory neurotoxicity induced by lipopolysaccharide-activated microglia[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 76(3): 362-372.

[10] Xue B, Jiao J, Zhang L, et al. Triptolide upregulates NGF synthesis in rat astrocyte cultures[J]. Neurochem Res, 2007, 32(7): 1113-1119.

[11] Li H, Liu Z H, Dai C S, et al. Triptolide inhibits proinflammatory factor-induced over-expression of class Ⅱ MHC and B7 molecules in renal tubular epithelial cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(9): 775-781.

[12] Liu J, Wu Q L, Feng Y H, et al. Triptolide suppresses CD80 and CD86 expressions and IL-12 production in THP-1 cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(2): 223-237.

（责任编辑：冉明会）