维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)05-0676-03

共刺激阻断剂与雷帕霉素联合应用对移植肾存活的影响

黄赤兵，张银甫，范明齐，王平贤，冯嘉渝，肖 亚，贾维胜，方针强

(第三军医大学附属新桥医院泌尿外科肾移植中心，重庆 400037)

【摘 要】目的：探讨共刺激阻断剂(CTLA4Ig与雷帕霉素(Rapamycin，RPM)联合应用对大鼠移植肾存活的影响。方法：肾移植大鼠分为对照组、CTLA4Ig组、RPM组和CTLA4Ig+RPM组，观察术后血肌酐和移植肾病理改变、移植肾存活时间。结果：与对照组相比，CTLA4Ig组、RPM组、CTLA4Ig+RPM组移植肾存活时间均显著延长($P<0.01$)，其中，CTLA4Ig+RPM组移植肾存活时间最长(76.5±17.1d)，术后15天、30天该组血肌酐浓度最低；术后30天，仍然存活的CTLA4Ig组移植肾显示较多淋巴细胞浸润，CTLA4Ig+RPM组移植肾显示很少淋巴细胞浸润。结论：共刺激阻断剂与雷帕霉素联合应用可有效抑制排斥反应，显著延长大鼠移植肾存活时间。

【关键词】共刺激阻断剂；雷帕霉素；肾移植

【中国图书分类法分类号】R979.5；R692 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-04-27

Influence of CTLA4Ig combined with rapamycin on the survival of renal allografts in rats

HUANG Chibing, et al

(*Department of Urology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the influence of Costimulatory Blockade CTLA4Ig combined with rapamycin(RPM)on the survival of renal allografts in rats. *Methods*: BN→Lewis rat kidney transplantation was performed. The recipients were grouped into group1(control), group2(CTLA4Ig), group3(rapamycin, RPM) and group4(CTLA4Ig+RPM). The survival of renal allografts, serum creatinine of the recipients and the pathological changes of the allografts were observed. *Results*: Significantly prolonged allografts survival time was seen in group 2,3 and 4 compared with control, with the longest in group 4. The lowest serum creatinine and fewest lymphocytes infiltrating grafts were also seen in group4. *Conclusion*: Combined use of CTLA4Ig and rapamycin(RPM)may suppress renal allograft rejection effectively and promote further prolongation of the survival of renal allografts.

【Key words】Costimulatory Blockade; Rapamycin; Kidney transplantation

共刺激阻断剂CTLA4Ig具有诱导抗原特异性T细胞无能、凋亡的作用，在器官移植实验性研究中大大延长了移植物的存活，显示了良好的临床应用前景[1]。但一些研究发现，钙神经素抑制剂类免疫抑制剂可抑制甚至消除CTLA4Ig诱导免疫低反应的作用，可能对移植物存活产生不良影响[2]。本研究观察了非钙神经素类免疫抑制剂雷帕霉素(Rapamycin，RPM)对CTLA4Ig延长肾脏移植物存活效能的影响，探讨CTLA4Ig与常规免疫抑制剂联合应用于肾移植的可行性。

作者介绍：黄赤兵(1963-)，男，副教授，博士，主要研究方向：肾脏移植

1 材料与方法

1.1 实验药物

RPM由由华北制药集团新药研究开发有限责任公司提供，RPM批准文号2002HL0259，口服液，每ml含RPM 1mg。CTLA-4Ig由第三军医大学西南医院烧伤研究所易绍萱博士制备、纯化[3]并惠赠。

1.2 实验动物及分组

肾移植供体为近交系Brown-Norway(BN)大鼠(购自中国医学科学院实验动物繁育场)，重200g～350g；受体为近交系Lewis大鼠(购自北京医科大学实验动物学部)，重250g～350g。雌雄不拘。肾移植受体随机分为4组：组1($n=7$)，肾移植对照；组2($n=8$)，CTLA-4Ig组；组3($n=8$)RPM组；组4($n=8$)，CTLA4Ig+RPM组。

1.3 大鼠肾移植

维普资讯 http://www.cqvip.com

行 BN→Lewis 肾移植，供受体均采用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，以自行设计的方法行肾静脉吻合：将供体左肾以及与之相连的远端下腔静脉、右肾静脉一并摘取，从腔静脉远端向右肾静脉断端插入支架管并伸入受体左肾静脉内(左肾已切除)，在支架管支撑下缝合供受体肾静脉，缝合完成后拔除支架管，缝扎供肾静脉之远端腔静脉；行供受体腹主动脉端侧吻合；对端吻合供受体膀胱；为观察移植肾存活情况，以受体右侧原肾肾血管体外延迟结扎代替原肾切除以减轻手术创伤[1]；肾移植完成后，用 4-0 号丝线绕行右肾血管 1 周，用直针分别将丝线上下端紧贴肾血管上下缘穿出背侧皮肤，术后第 3 天，拉紧体外预留丝线并打结。

1.4 各组药物用法、用量

组 3、组 4 受体在麻醉清醒后即给予 RPM(4mg/kg·d×14d)，灌胃给药；术后第 2 天，向组 2、组 4 受体腹腔内注射 10ml 生理盐水稀释的 CTLA－4Ig 0.5mg，每只对照组大鼠腹腔内注射生理盐水 10ml。

1.5 指标观测

1.5.1 移植肾功能检测

所有受体分别于移植前第 4 天、移植后第 15、30 天经 1%异戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(100mg/kg 体重)后，在显微镜下经腹静脉穿刺抽血 0.5～1ml 检测血清肌酐(Scr)浓度。

1.5.2 移植肾病理学检查

术后 30 天，每组取 2 只存活大鼠移植肾进行病理检查；所有大鼠停止排尿后取移植肾行病理检查。10%福尔马林固定、石蜡包埋、切片以 HE 染色，光镜观察组织学变化。

1.5.3 移植肾存活时间

以大鼠停止排尿为观察终点，记录移植肾存活时间。

1.6 统计学处理

采用 t 检验与方差分析。

2 结 果

2.1 各组移植肾功能的比较

术后第 15 天对照组大鼠因肾功能衰竭已全部死亡，组 2～4Scr 浓度均较术前明显升高($P<0.05$)，以 CTLA－4Ig＋RPM 组升高幅度最低；术后第 30d，RPM 组大鼠亦已全部死亡，CTLA－4Ig 组 Scr 浓度明显升高，CTLA4Ig＋RPM 组 Scr 浓度仅轻度升高，结果见表 1。

表 1 肾移植术后大鼠肾功能变化

组别	不同时间 Scr 浓度(μmol/L)		
	4d	15d	30d
1	48.5±7.3▲	——	——
2	50.3±7.5	68.7±13.6	207.4±33.8
3	49.8±6.9	86.3±17.5	——
4	48.7±7.1	54.8±10.1■	65.3±14.5▼

注：与组 2～4 比较，▲$P>0.05$；与组 2,3 比较，■$P<0.05$；与组 2 比较，▼$P<0.01$。

表 2 CTLA4Ig、RPM 及其联合应用对移植肾存活的影响

组别	药物及剂量		存活时间(d)
	CTLA4Ig×1d (mg)	RPM dose×14d (mg/kg·d)	
1	0	0	8.3±0.9▲
2	0.5	0	42.6±7.4▼
3	0	4	26.1±4.3
4	0.5	4	71.8±13.6■

注：与组 2～4 比较，▲$P<0.01$；与组 1～3 比较，■$P<0.01$；与组 3 比较，▼$P<0.05$

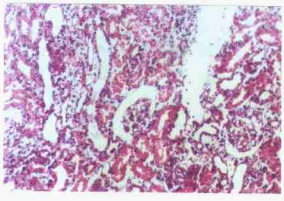


图 1 CTLA－4Ig 组移植后 30 天，移植肾间质内较多淋巴细胞浸润(10×10)

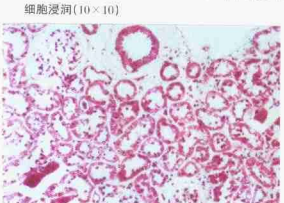


图 2 CTLA4Ig＋RPM 组移植后 30 天，移植肾间质内可见散在淋巴细胞(10×10)

2.3 移植肾存活情况

对照组大鼠在移植 5～7d 后出现烦躁、萎靡、尿量减少等排斥反应表现，随之停止排尿、死亡，而同

维普资讯 http://www.cqvip.com

时 3 个用药组大鼠饮食、活动、排尿正常；与对照组相比，3 个用药组大鼠移植肾存活时间显著延长，其中以 CTLA4Ig + RPM 组移植肾存活最长，明显长于其它组移植肾存活时间；手术 20 天以后，RPM 组大鼠陆续出现排斥反应表现，CTLA4Ig 组排斥反应表现出现在手术 35 天以后，移植肾存活时间明显长于 RPM 组，结果见表 2。实验终止时（大鼠停止排尿），组 1～4 存活大鼠数分别为 7、6、8、6。

3 讨 论

CTLA－4Ig 是细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(CTLA－4)与 IgG Fc 段的基因重组融合蛋白，可阻断抗原特异性 T 细胞活化过程中起重要作用的 B7－CD28 共刺激通路，从而导致这类 T 细胞的无能或凋亡，诱导受体对供体抗原的特异性免疫低反应，大大延长移植物存活。目前国外正在着手将 CTLA－4Ig 用于肾移植的临床试验[5]。由于 CTLA－4Ig 尚不能诱导终生免疫耐受，临床应用时与常规免疫抑制剂合用就在所难免。但一些临床前研究显示，常规免疫抑制剂中的钙神经素抑制剂类（环孢素、他克莫司）与 CTLA－4Ig 联合应用可对 CTLA－4Ig 诱导的免疫低反应产生不利影响。本实验选择非钙神经素抑制剂类新型免疫抑制剂 RPM[6]，初步观察了 CTLA－4Ig 与其联合应用对大鼠移植肾存活的影响。

RPM 具有大环内酯类结构，1989 年才发现其强大的免疫抑制作用，1999 年被美国 FDA 批准应用于临床肾移植。实验所用 RPM 为我国华北制药集团新近研发，具有完全的知识产权，本研究显示其单独应用可以使移植肾存活时间显著延长，证实国产 RPM 在控制移植肾排斥反应中的有效性。实验还发现 CTLA－4Ig 单次给药即使移植肾存活时间明显延长，其效能明显强于 RPM，显示了 CTLA－4Ig 预防、控制肾移植排斥反应的极大潜能。

CTLA－4Ig 与 RPM 均无肾毒性[7,8]，本研究中，二者单独应用后 Scr 较移植前均显著升高，主要与排斥有关，显示它们对排斥反应的控制程度是有限的。研究发现，CTLA－4Ig 通过阻断 B7/CD28 共刺激信抑制抗原特异性 T 细胞的早期激活、增殖，对控制早期排斥反应有利，而 RPM 则封闭已经产生的淋巴因子对相应的淋巴细胞受体作用，抑制所有淋巴细胞 G1－S 期[9]，作用较晚，理论上，二者联合应用对排斥反应的控制具有互补性。本研究观察到，二者联合应用后明显减轻了淋巴细胞浸润移植肾所导致的排斥反应，并大大改善了移植后肾功能，进一步显著延长了移植肾的存活，显示 RPM 对 CTLA－4Ig 延长移植肾存活的作用具有良好的协同性。因实验周期原因，本研究在 CTLA－4Ig 诱导治疗后仅短期应用 RPM，长期应用 RPM 能否获得更好结果，尚待进一实验证实。

上述结果显示，共刺激阻断剂 CTLA－4Ig 与非钙神经素抑制剂类免疫抑制剂 RPM 联合应用对控制移植肾排斥反应具有良好的协同作用，可在改善肾功能的情况下，大大延长移植肾存活时间。

参 考 文 献

[1] Magott－Procelewska M. Costimulatory pathways as a basic mechanisms of activating a tolerance signal in T cells[J]. Ann Transplant, 2004;9(3):13－18.

[2] Blaha P, Bigenzahn S, Koporc Z, et al. The influence of immunosuppressive drugs on tolerance induction through bone marrow transplantation with costimulation blockade[J]. Blood, 2003;101(7):2886－2893.

[3] 易绍萱，吴 军，王锡华，等. CTLA－4/Ig 融合蛋白在 COS－7 中的表达、纯化及鉴定[J]. 第三军医大学学报，2000;22(6):523－526.

[4] 黄赤兵，方玉华，吴 军，等. 应用新技术建立大鼠肾移植模型[J]. 中华器官移植杂志，2001;22(2):114.

[5] Izawa A, Sayegh MH, Chandraker A. The antagonism of calcineurin inhibitors and costimulatory blockers: fact or fiction? [J]. Transplant Proc, 2004;36(2 s):570s－573s.

[6] Mota A. Sirolimus: a new option in transplantation [J]. Expert Opin Pharmacother, 2005;6(3):479－487.

[7] Daikh DI, Wofsy D. Cutting edge: reversal of murine lupus nephritis with CTLA4Ig and cyclophosphamide [J]. J Immunol, 2001;166(5):2913－2916.

[8] Weber T, Abendroth D, Schelzig H. Rapamycin rescue therapy in patients after kidney transplantation: first clinical experience [J]. Transpl Int, 2005; 18(2):151－156.

[9] Kahan BD. Sirolimus－based immunosuppression: present state of the art [J]. J Nephrol, 2004;17(s 8):32－39.