

# 雷公藤多苷对移植心冠状动脉硬化的抑制效果

张希龙<sup>1</sup>, 殷凯生<sup>1</sup>, 张石<sup>2</sup> (1. 南京医科大学第一附属医院呼吸科, 江苏 南京 210029; 2. 南京军区南京总医院胸外科, 江苏 南京 210029)

**摘要:**目的 探讨雷公藤多苷(MT)对心移植后冠状动脉硬化及血小板衍生生长因子A(PDGF-A)表达的影响。方法 于大鼠腹腔内异位心脏移植术后分别应用MT(30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)(MT组=7例)或环孢素A(10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)(对照组=7例)。心移植后60d时观察比较组间移植心的冠状动脉硬化病变率及程度,排异反应及PDGF-A的表达程度。结果 MT组的移植心冠状动脉硬化发生率和内膜增厚程度以及PDGF-A的表达程度均显著低于对照组( $P < 0.01$ ),而心肌排斥反应程度两组间无明显差异( $P > 0.05$ )。结论 MT可抑制移植心冠状动脉硬化病变,该效果可能与MT对移植心PDGF-A表达的抑制作用有关。

**关键词:**雷公藤多苷;免疫抑制剂;心脏移植;移植心冠状动脉硬化;血小板衍生生长因子

中图分类号:R286;R541.4 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2003)05-0346-04

## Inhibitory effect of multiglycosidorum tripterygium on coronary arteriosclerosis in transplanted heart

ZHANG Xi-long, YIN Kai-sheng, ZHANG Shi (First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**ABSTRACT:OBJECTIVE** To investigate the effect of multiglycosidorum tripterygium (MT) on cardiac graft coronary arteriosclerosis (GCA) and expression of platelet-derived growth factor A (PDGF-A) mRNA. **METHOD** Two groups of rats ( $n = 7$  each group) underwent heterotopic heart transplantation and were treated with either MT (30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) (MT group) or cyclosporine A (10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) (control group). Histological evaluations of rejection and coronary arteriosclerosis, as well as graft PDGF-A mRNA expression were made on the sixtieth day (60th) after transplantation. **RESULTS** The incidence of diseased coronary arteries and the degree of coronary arterial intimal thickening in the MT group were significantly less than that seen in the control group ( $P < 0.01$  respectively). Moreover, the degree of PDGF-A mRNA expression of graft myocardium were significantly lower in the MT group when compared with the control group ( $P < 0.01$ ). However, no significant difference in the degree of rejection was found between the two groups. **CONCLUSION** MT is effective in inhibition of GCA, and this efficacy was probably associated with the depressed expression of graft PDGF-A in the MT group.

**KEY WORDS:** multiglycosidorum tripterygium; immunosuppressant; heart transplantation; graft coronary arteriosclerosis; platelet-derived growth factor

移植心冠状动脉硬化(GCA)是心脏移植后的主要晚期并发症及死亡原因之一。虽然自环孢素A(CsA)问世以来,心脏移植后的总体生存率已明显改善,但GCA的发生率并无显著降低,且长期应用CsA似乎已成为发生GCA的危险因素<sup>[1]</sup>。近来研究提示雷公藤多苷(MT)不仅可有效地抑制移植后的排斥反应,而且具有抑制GCA的潜力<sup>[2,3]</sup>。由于GCA的发生机制及MT的详尽免疫抑制机制均尚不够明确,有待于该领域的进一步研究。

近年来,血小板衍生生长因子A(PDGF-A)可能与GCA的发生有关已受关注<sup>[2,4]</sup>。本研究在大鼠异位心脏移植模型中,于移植后以环孢素A常規治疗为对照,观察了MT对移植心的冠状动脉硬化及血小板衍生生长因子A(PDGF-A)mRNA表达的影响。

### 1 材料及方法

#### 1.1 动物模型

实验大鼠购自南京军区南京总医院动物实验中心。均为雄性大鼠,7~8周龄,体重200~240g, Wistar King大鼠作为供体, Lewis大鼠作为受体,术中是将供体主动脉与受体的腹主动脉行端侧吻合。术后将受体鼠随意分为对照组及MT组,每组7只。对照组以环孢素A 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, ip, 实验组则将MT(江苏泰州制药厂)粉剂与生理盐水制成4 mg·mL<sup>-1</sup>浓度的悬液,按30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, ig。于术后60d摘取移植心观测冠状动脉病变,心肌排异反应及血小板衍生生长因子A mRNA的表达程度。

#### 1.2 标本处理及观察

移植心摘取后即予10%甲醛固定,再将标本以石蜡包埋。判断排异反应的程度标本切片应用H.E染色,判断冠状动脉内膜厚度应用elastica Masson染色。按照Lurie等<sup>[5]</sup>的分度标准,将排异反应分为0~3度,冠状动脉内膜厚度分为0~4度。对切片中所有>50μm血管内径的冠状动脉均

进行了观察,根据以下公式确定移植冠状动脉的发生及发展程度<sup>[4]</sup>。

$$\text{冠状动脉内膜增厚度} = \frac{1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4}{N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4}$$

上式中  $N_n$  即指内膜增厚达到  $n$  度的冠状动脉数目

$$\text{病变的冠状动脉发生率} = \frac{\text{达1-4度内膜增厚的冠状动脉数}}{\text{所观察的冠状动脉总数}} \times 100\%$$

此外,按照 Saiki, Onana 等<sup>[6,7]</sup>应用的 PCR 及 Northern 印迹技术检测移植心及受体自身心心肌的 PDGF-A mRNA 表达。

### 1.3 RNA 分离

将移植心及受体自身心摘取后立即以液氮冷冻并于  $-80^\circ\text{C}$  保存至 RNA 分离。分离及提纯 RNA 按照 RNAzol 试剂提取法的(Biotex lab, Houston, TX)操作步骤。

### 1.4 PCR 及 cDNA 探针

为了检测 PDGF-A mRNA,用 2 个寡核苷酸引物从豚鼠心脏移植物的总 RNA 中逆转录成 1 个 826bp 的 cDNA 片段。引物基于豚鼠 PDGF-A 序列:

1(前导链) 5'- GACCGCGCCTCGCCTCCCTGCCGAGC-TTCC-3'

2(后导链) 5'- GACCGCGGTCTCGAGTGCTACAGTAG-TGC-3'

用 Amersham cDNA 合成试剂盒,将 10mg 的总 RNA 用于双股 cDNA 合成。PCR 反应条件:10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mmol/L dNTPs 及 20 单位 Taq 多聚酶。用 DNA 热循环仪,扩增的 PCR 产物,参数为变性  $94^\circ\text{C}$ , 45s, 退火  $55^\circ\text{C}$ , 1 min 及延伸  $72^\circ\text{C}$ , 90s, 共 35 个循环。获得的 826bp cDNA 片段亚克隆到 pBluescript II SK(+) 的聚环区。核苷酸顺序用双脱氧测序法,分析用 Genetics 公司的基因分析系统软件。

### 1.5 Northern 杂交

总 RNAs 10  $\mu\text{g}$  在  $65^\circ\text{C}$  变性 2 min,在含甲醛的 1% 琼脂糖中电泳分离,再转移到尼龙膜上。杂交条件: $65^\circ\text{C}$  下,杂交液含 0.5% SDS,  $5 \times$  Denhardt's 溶液,10% 葡聚糖硫酸盐,  $5 \times$  SSC 和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  硅鱼精 DNA,随后在  $55^\circ\text{C}$  下用  $0.1 \times$  SSC/1% SDS 多次冲洗,探针用 [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]dCTP 标记,用显影分析仪通过光刺激发光确定杂交信号强度。

### 1.6 统计学处理

所得数据均以均数  $\pm$  标准差表示,两组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  被认为有统计学显著性差异

表 1 MT 组及对照组移植心标本形态学观测数据

Tab 1 Morphometric parameters of heart graft samples in MT and control groups

	MT 组	对照组
心肌排斥反应(度)	1.2 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.2
病变的冠状动脉发生率(%)	32.7 $\pm$ 8.3 <sup>1)</sup>	66.2 $\pm$ 9.0
冠状动脉内膜增厚度	1.14 $\pm$ 0.27 <sup>1)</sup>	1.69 $\pm$ 0.24

注:1)与对照组相比,差异非常显著  $P < 0.01$

## 2 结果

两组大鼠的移植后生存率均为 100%。移植心排斥反应的程度组间无显著差异( $P > 0.05$ )。在移植心中存在不同程度的冠状动脉内膜增厚,与对照组相比,病变的冠状动脉发生率在 MT 组显著降低( $P < 0.01$ )。而且,MT 组的冠状动脉内膜增厚度亦明显低于对照组( $P < 0.01$ ),见表 1。

对照组移植心标本切片镜下可见由于内膜及内膜肌层增殖而致的明显冠状动脉管腔狭窄,即典型的移植心冠状动脉病变(图 1A)。相比之下,在 MT 组却未见显著增加的冠状动脉内膜增殖样改变,内腔闭塞明显减少(图 1B)。

两组中 PDGF-A mRNA 的表达在移植心标本中均为阳性,在受体自身心标本中均为阴性。Northern 杂交法定量检测结果示 MT 组的移植心标本的 PDGF-A mRNA 表达程度明显低于对照组( $P < 0.01$ )。

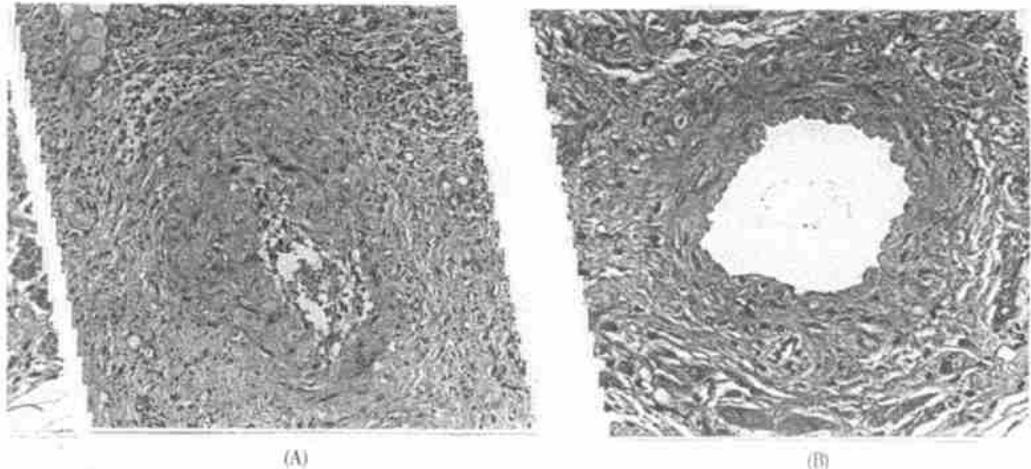


图 1 两组间移植心冠状动脉切片镜下比较

Fig 1 Comparison of the sections of graft coronary arteries between MT and control groups

A: 对照组心肌内冠状动脉切片可见明显的血管内膜及平滑肌层增生造成管腔狭窄。B: MT 组心肌内冠状动脉切片仅可见轻度的血管内膜及平滑肌层增生,无显著的内膜增厚及管腔狭窄。

A: Section of intra myocardial coronary artery in the CYA treated group showing marked myointimal proliferation causing luminal narrowing. B: Section

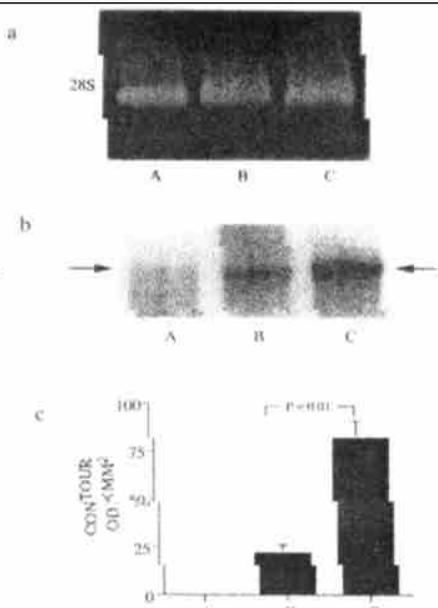


图2 Northern杂交法分析三类不同样本的心肌PDGF-A mRNA表达

Fig 2 The results of PDGF-A mRNA expression in three different kinds of myocardial samples assayed by Northern blot analysis A列:非移植的自体心;B列:MT组的移植心;C列:对照组的移植心。

将10mg心肌总RNA在1%琼脂糖中电泳分离(a行);再转移到尼龙膜过滤器上,杂交至 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 标记的探针(b行)。箭头所指为PDGF-A mRNA的位置。以Imaging Master显影仪(Pharmacia)将通过28S核糖体RNA光密度的校正后测得的杂交信号的强度结果(C行)显示:MT组的移植心标本的PDGF-A mRNA表达程度( $23.1 \pm 3.9$ )显著低于对照组( $80.4 \pm 9.1$ ) ( $P < 0.01$ )。

Northern blot analysis of myocardial PDGF-A mRNA on post-transplantation day 60 from three kinds of samples. (lane A: untransplanted native hearts; lane B: heart grafts from the MT treated group; lane C: heart grafts from the CYA treated group)

Ten micrograms of total RNA from myocardium were size-fractionated on 0.8% denaturing agarose gel (a), transferred to a nylon membrane filter, and hybridized to a  $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{-dCTP}$  labeled cDNA probe (b). The arrows indicate the position of PDGF-A mRNA. The intensities of the hybridization signals (b) were adjusted by estimate the O.D. of the 28S ribosomal RNA (a) using an Image Master (Pharmacia) (c). The adjusted result showed a significant decrease of PDGF-A mRNA expression in the MT-treated group in comparison to the CYA-treated group ( $22.3 \pm 4.8$  versus  $82.1 \pm 8.7$ ,  $P < 0.01$ ).

### 3 讨论

CsA及MT均已被证实能有效抑制移植后的排异反应。初步研究表明MT的免疫抑制作用主要通过影响细胞应答反应,可抑制有丝分裂原诱导的淋巴细胞增殖反应,抑制T细胞产生IL-2及IL-2受体的表达,其抑制作用的部位可能发生在阻止有关DNA复制的水平<sup>[8,9]</sup>;MT对NK细胞和巨噬细胞亦有一定抑制作用。针对MT延长移植排斥反应的机理研究提示,MT在体内外均可通过激活抑制性T细胞发挥免疫

抑制作用,从而延长移植存活时间<sup>[9]</sup>。但由于MT含有多种复合物,其对移植及GCA产生抑制效应确切有效成分及机理尚需进一步研究。此外MT与CsA在免疫抑制机制上的区别亦有待进一步研究阐明。

MT的免疫抑制作用已被发现呈浓度依赖性。在鼠异位心脏移植后,石益民等<sup>[10]</sup>曾使用MT  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,未发现明显不良反应,并提倡可适当增加剂量。故该实验采用了  $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的MT用量,结果在移植后排排斥及抗GCA上均取得较理想效果。

血小板衍生生长因子(PDGF)最有特征性的血管壁细胞分裂素之一,由血小板、单核巨噬细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞等产生,在动脉硬化及慢性炎症组织重构的病理生理过程中作为一种重要的生长因子。但由于GCA的发生机制尚不完全明确且病理及形态学特征有别于正常发生的冠状动脉硬化,GCA呈弥漫性及向心性,累及往往整段血管但不一定是所有的冠状动脉,血管内膜弹力层依旧完整,钙化罕见,病变发展迅速<sup>[4]</sup>。因而PDGF在产生GCA上的作用仍不明确。移植心PDGF表达增强是如何作用的尚不明了,但一些学者根据GCA的组织学特征,提出了以下的学说:在移植体内,内皮细胞的免疫损伤引起了造成单核/巨噬细胞及T淋巴细胞黏附的黏附因子表达增强,导致淋巴素被活化的瀑布反应并使包括PDGF在内的生长因子释放。这些生长因子也在平滑肌细胞及内皮细胞中进行表达,起到自主分泌或旁分泌生长调节因子的作用,加速平滑肌细胞的增殖因此产生动脉硬化<sup>[4]</sup>。由于MT的详细免疫抑制机理尚未阐明,MT的免疫抑制特征与减弱的GCA程度及PDGF-A mRNA表达之间的相互作用环节的有无及如何作用尚有待于进一步研究。此外,MT对其它生长因子如PDGF-B,类胰岛素生长因子-I,纤维母细胞生长因子等的影响亦需进一步探讨。

本研究表明,与CsA治疗的对照组相比,在MT组中不仅GCA的发生及程度减低,且移植心的PDGF-A mRNA表达减弱。支持PDGF-A在GCA的发病中可能起到重要作用的观点。

### 4 小结

国产免疫抑制剂MT在缓解GCA的发生及发展上要优于CsA,此可能与MT对移植心PDGF-A mRNA的抑制作用有关。

### 参考文献

- [1] Haverich A, Costard-Jackle A, Cremer J, et al. Cyclosporin A and transplant coronary disease after heart transplantation: facts and fiction[J]. Transplant Proc, 1994, 26:2713.
- [2] Hachida M, Zhang XL, Hualu, et al. Effects of immunosuppressants on platelet-derived growth factor A chain mRNA expression and coronary arteriosclerosis in rat cardiac allograft[J]. Jpn Circ J, 1999, 63:303.
- [3] Hachida M, Zhang XL, Lu H, et al. Inhibitory effect of multiply-

- cosidorum tripterygium on coronary arteriosclerosis after heart transplantation[ J]. Transplantation, 1999, 65 :1446 .
- [ 4 ] Hachida M, Zhang XL, Lu Hua, *et al.* Association between the degree of platelet derived growth factor A chain mRNA expression and coronary arteriosclerosis in the transplanted heart[ J]. Heart Vessel, 1998, 13(1) :24 .
- [ 5 ] Lurie KG, Billingham ME, Jamieson SW, *et al.* Pathogenesis and prevention of graft arteriosclerosis in an experimental heart transplantation model[ J]. Transplantation, 1981, 31 :41 .
- [ 6 ] Oana S, Matsuoka R, Nakajima H, *et al.* Molecular characterization of a novel atrial-specific myosin heavy chain gene expression in the chick embryo[ J]. Eur J Cell Biol 1995, 61 :42 .
- [ 7 ] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, *et al.* Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase [ J]. Science, 1988, 239 :487 .
- [ 8 ] Li XW, Weir M: Radix Tripterygium wilfordii A Chinese herbal medicine with potent immunosuppressive properties[ J]. Transplantation, 1990, 50 :82 .
- [ 9 ] 雷万军、王建军、王宏运,等.雷公藤抑制免疫排斥反应的实验研究[ J].中国实验免疫学杂志, 1997, 9(2) :58 .
- [ 10 ] 石益民、李炎唐、肖序仁,等.雷公藤多甙在大鼠异位心脏移植中的应用[ J].中华器官移植杂志, 1992, 13(2) :81 .

收稿日期 :2002-10-26