

尚未有用作商品生产进展到临床应用的资料,其中表达系统的优化,使之更实用、更经济、更适于批量生产是关键。

pBAD 是原核表达系统中较理想的表达载体,本室经系列 PCR、克隆后,将原 pComb3 中的抗-HBs Fab 中的 Fd 与 Lc 基因移入 pBAD 载体中,重新形成双启动表达方式。初步实验结果表明,Fab 的表达量及活性都有明显提高,经济性也大大优于 pComb3 表达系统,已具备批量制备的条件。

在 pBAHBs-Fab 的克隆过程中,涉及 3 次 PCR、3 步克隆、3 次筛选,在理论上,PCR 过程中会有碱基的错配,重新克隆的 Fab 会有结构与活性上的差别,借助亲和力和筛选可作为选择更高亲和力和力株的手段。本研究制备的 pBAHBs-Fab 的活性优于 pComb3 表达产品,是否与此有关尚待比较测序加以证实。

双启动表达 Fd 和 Lc 肽链, Poly-His 亲和纯化标签可置任一条链的末端, Fab 组装后经离子螯合柱纯化。鉴于 Poly-His 是连接在 Lc 基因 C1 段的 C 末端,对 Fv 的结构与功能应不会造成影响。至于亲和标签置于哪一条链后效果最佳也待进一步研究。本研究应用 pBAD 载体克隆表达人源抗-HBs Fab 并获理想结果,小批量发酵表达量约每升数十毫克,初步亲和力和估测提示该系统表达的抗体片段有极佳活性^[6],上述研究均为临床应用与开发奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Samuel D. Management of hepatitis B in liver transplantation patients[J]. *Semin Liver Dis*, 2004, 24(Suppl):1:55-62.
 - [2] Di Paolo D, Tisone G, Piccolo P, et al. Low-dose hepatitis B immunoglobulin given "on demand" in combination with lamivudine; a highly cost-effective approach to prevent recurrent hepatitis B virus infection in the long-term follow-up after liver transplantation[J]. *Transplantation*, 2004, 77(8):1203-1208.
 - [3] Yan JP, Ko JH, Qi YP. Generation and characterization of a novel single-chain antibody fragment specific against human fibrin clots from phage display antibody library[J]. *Thromb Res*, 2004, 114(3):205-211.
 - [4] 韩焕兴, Burioni R, Plaisant P, 等. 人抗 HBs Ag 单克隆抗体组合文库的建立[J]. *中国免疫学杂志*, 1996, 12(5):299-302.
 - [5] 范列英, 韩焕兴, 胡东平, 等. 人源性抗 HBsAg 单克隆抗体 Fab 片段的制备及其纯化[J]. *第二军医大学学报*, 1997, 18(4):334-336.
 - [6] 韩焕兴, 陆慧琦, 安峰, 等. 生物工程人源抗-HBs Fab 的抗原特异亲和力简易测定[J]. *免疫学杂志*, 2003, 19(3):221-223.
- [收稿日期] 2004-07-23 [修回日期] 2004-10-15
[本文编辑] 曹静

• 临床研究 •

肾移植术后 110 例淋巴细胞表型的检测及其临床意义

Clinical significance of determining lymphocyte phenotype in patients received renal transplantation

李莉^{1*}, 齐隽², 李先兴³, 张明², 张玲珍¹, 刘玉杉², 孔宪涛¹

(1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003; 2. 长征医院泌尿外科; 3. 长征医院器官移植中心)

[摘要] 目的: 探讨监测肾移植患者淋巴细胞亚群变化的临床意义。方法: 110 例选自首次尸肾移植, 肾功能在术后 1 周内恢复, 免疫抑制剂使用统一方案。抗凝外周血以 CD3/CD25、CD4/CD45RA、CD8/CD28 和 CD95/CD95L 单克隆抗体标记, 流式细胞术 (FCM) 分析它们在淋巴细胞中表达的变化与患者移植后时间、环孢素谷值 (CsA-LT) 浓度、肌酐 (Cr) 浓度、患者年龄、性别和排斥发生等的关系。结果: 肾功能稳定的受者 CD4⁺/CD45RA⁺、CD8⁺/CD28⁺、CD28、CD25 和 CD95L 随术后时间延长、年龄增加和 CsA-LT 增高而减低。术后 3.5 年以上、年龄大于 55 岁和 CsA-LT 大于 400 ng/ml 者与术后 1.5 年以内、年龄 30 岁以下和 CsA-LT 200 ng/ml 以下者相比差异显著 ($P < 0.05$)。CD95 表达随年龄的增加、术后时间的延长逐渐增多, 随 CsA-LT 的增加逐渐下降 ($P < 0.05$)。结论: CD4⁺/CD45RA⁺、CD8⁺/CD28⁺、CD28、CD25 和 CD95L 表达降低, CD95 表达增加是肾移植患者免疫系统稳定的表现, 结合患者年龄、术后时间、CsA-LT 和肾功能检查可以作为免疫抑制剂应用和排斥监测的简便、可靠指标。

[关键词] 肾移植; 淋巴细胞表型; 环孢素; 肌酐; 移植排斥

[中图分类号] R 692

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)12-1340-03

移植后个体化的合理用药是移植界一直期盼的梦想, 遗憾的是至今没有成熟、合理、可行的公式或使用原则在临床推广。国内外目前在免疫抑制剂的使用方面仍存在相当大的盲目性, 患者免疫功能的变化是免疫抑制剂与宿主免疫反应综合作用的最终结果, 它准确地反映移植排斥发生的可能性、免疫抑制剂应用的有效性、是否需要、是否过量和能否长期使用。因此, 患者的免疫功能状态应当是免疫抑制剂应用最理想的监测“窗口”。为了从复杂的免疫反应和免疫调节网

络中寻找并确立准确可行的依据标准, 本研究测定了 110 例肾移植患者的部分外周血淋巴细胞 (PBL) 表型, 并分析了与之相关的因素, 希望能够得到一些对个体化用药具有指导意义的免疫学指标。

[基金项目] 国家自然科学基金 (30371360)。

[作者简介] 李莉 (1960-), 女 (汉族), 博士, 副研究员。

*Corresponding author. E-mail: annyli38@hotmail.com

1 对象和方法

1.1 对象 (1)选取1994~1999年在我院首次接受尸肾移植者,供肾者年龄均小于40岁,受者年龄16~68岁,平均(43.5±11.1)岁。移植前组织配型ABO血型相符;淋巴细胞毒试验小于10%,肾功能在术后1周内恢复。排除需在术后透析过渡或透析治疗已恢复者以及移植后发生超急性排斥、急性加速排斥、急性肾小管坏死、恶性肿瘤、二次肾移植、孕妇及哺乳期妇女。(2)移植后免疫抑制剂方案:均采用Neoral(环孢素,CsA)+Aza(MMF)+Pred(P)三联免疫抑制诱导和维持方案。手术当日至术后第2天用MP 0.5~1.0 g/d;第3天起Neoral(CsA)自8 mg/(kg·d)起,以后根据CsA-TL调整。Pred 80 mg/d,每天递减10 mg至20 mg/d维持。1年后降至10 mg/d维持。术后第3天起用Aza 50 mg/d或MMF 1.0~2.0 g/d。(3)随访110例符合以上条件的患者,男性74例,女性36例。

1.2 淋巴细胞表型标记及分析 患者外周静脉血,肝素抗凝,分6管,每管加100 μl全血和相应抗体,抗体量依据说明书。所用抗体均为小鼠抗人IgG,异硫氰荧光素(FITC)和藻红蛋白(PE)直接标记。CD4-FITC/CD45RA-PE、CD3-FITC/CD25-PE、CD95-PE(Beckman-Coulter, USA), CD8-FITC/CD28-PE、CD95L-PE(B-D, USA),同型对照IgG-FITC/IgG-PE 40C 15 min, Q-PRIP 仪(Beckman-Coulter, USA)溶解红细胞、固定,流式细胞仪(EPICS-XL, Beckman-Coulter, USA)检测。根据前向光散射和侧向光散射收集的细胞分布图,自动圈定淋巴细胞群,并对其表型进行检测、分析^[1]。

1.3 血清肌酐(Cr)检查 常规生化方法检测Cr浓度,正常参考值57~140 μmol/L。

1.4 统计学处理 将有关数据和检查结果输入SPSS 10.0统计软件数据库。对所测各数值依据患者年龄、性别、术后时间、Cr浓度、CsA-LT和有无排斥反应分组,分别与PBL表型进行总体方差分析(ANOVA),再两两比较(Student-Newman-Keuls 检验)。

2 结果

2.1 术后时间与细胞表型的关系 110例患者中术后时间资料完整的有86例,分为3组,如图1所示,随术后时间延长CD4⁺/CD45RA⁺、CD25、CD28、CD8⁺/CD28⁺和CD95L逐渐降低,CD95增加,各组间CD3、CD4、CD8无明显差异。2组与1、3组比虽有变化但在统计学上无显著性差异,1、3组间有显著性差异($P<0.05$)。

2.2 细胞表型与患者年龄的关系 110例患者中年龄资料完整的有82例,分为3组,如图2A所示,CD3、CD4、CD4⁺/CD45RA⁺、CD28、CD8⁺/CD28⁺和CD95L随年龄增加而降低,CD95逐渐增加,1、3组间差异有显著性($P<0.05$)。

2.3 细胞表型与CsA-LT的关系 110例患者中血浆CsA-LT资料完整的有90例,分4组,如图2B所示,各亚群细胞比例随CsA-LT增加而明显改变,随着CsA-LT逐渐增加

CD4⁺/CD45RA⁺呈增加趋势,其余呈降低趋势。1、4组间5种表型有统计学差异($P<0.05$)。

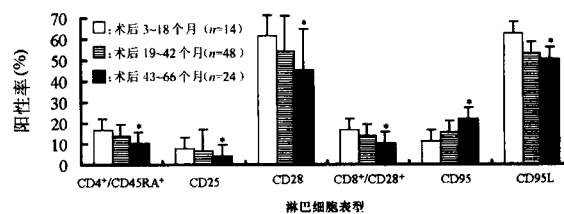


图1 肾移植患者术后不同外周血淋巴细胞的表型变化

* $P<0.05$ 与术后3~18个月组比较

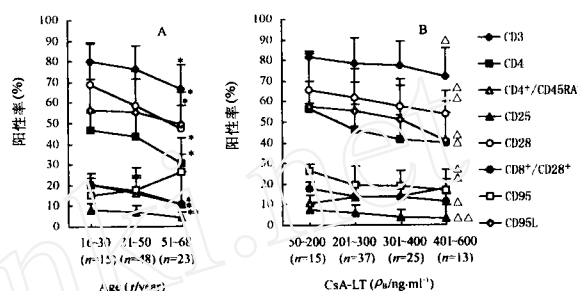


图2 不同年龄(A)和血CsA-LT浓度(B)

肾移植患者外周血淋巴细胞表型变化

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与16~30岁组比较;

△ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ 与50~200 ng/ml组比较

2.4 淋巴细胞表型与排斥反应的关系 110例患者中资料完整的共82例,无排斥组63例,曾经发生排斥反应组19例。无排斥反应组CD8细胞阳性率显著高于排斥反应组[两组分别为(27.6±7.3)%和(31.9±8.2)%, $P<0.05$];CD95和CD95L表达阳性率在两组间均无显著性差异。

3 讨论

3.1 CD95/CD95L及其相关因素分析 全部肾移植患者CD95和CD95L均显著高于正常人^[1,2]。根据相关报道分析,这与患者移植前疾病和疾病状态有关。有研究发现狼疮性肾炎患者血中可溶性Fas升高,一些系统性红斑狼疮中有分泌型Fas mRNA的点突变。一些肾炎患者肾小球系膜细胞和炎症细胞Fas表达增加,电镜见系膜增生区和毛细血管内存在凋亡细胞和凋亡小体,并证实Fas的过度表达与系膜细胞的增殖和凋亡相关^[3~6]。由此表明肾脏疾病与Fas和FasL的改变密切相关,患者移植前CD95和CD95L就已高水平表达,移植后Fas和FasL的改变又与CTL对异体靶细胞的杀伤有关^[7,8]。

随着手术时间延长CD95逐渐增加而CD95L下降,表明淋巴细胞凋亡敏感性增加,对靶细胞Fas/FasL途径的主动杀伤减低,二者的协调作用减低了免疫排斥反应,是患者长期存活的原因之一。与之一致的患者年龄与CD95和CD95L的变化也反映了相似的机制,即淋巴细胞凋亡增加和致凋亡能力降低,形成了机体免疫系统的内稳态。

患者 PBL 中 CD95 和 CD95L 表达随 CsA-LT 增加而降低,CD95L 降幅更大。由 CsA 诱导的淋巴细胞 Fas/FasL 途径的凋亡可能是 CsA 发挥免疫抑制效应的机制之一,由此,也证实 CsA-LT 对抑制排斥是非常重要的。

3.2 其他表型变化及其相关因素分析 CD25 表现为随移植后时间增加、患者年龄增加和 CsA-LT 浓度的升高其表达逐渐减少。一方面,免疫抑制剂直接抑制了 IL-2 的合成、分泌,对 IL-2 受体合成、表达也有抑制,另一方面,CD25 因 IL-2 表达细胞的逐渐凋亡而减少。55 岁以上患者免疫力开始下降,加上免疫抑制剂使用,IL-2 分泌减少,对 IL-2 的应答以及表达 CD25 的免疫细胞数量都下降,使 CD25 明显降低^[5]。Game 等^[10]也认为移植后长期稳定的患者 CD4⁺/CD25⁺ 在免疫反应中的作用很弱,因此,一旦 CD25 升高即表明机体免疫活性增强,预示着感染、排斥反应、免疫抑制剂耐药或剂量不足等。

移植早期 CD8⁺/CD28⁺、CD28 细胞均高于正常人,说明异体抗原对 CTL 的刺激和杀伤信号的活化^[9]。移植早期 CD25、CD8⁺/CD28⁺ 和 CD28 表达的增加是对异体抗原免疫应答的正常反应。随着移植时间的延长患者的免疫调节已经处于较稳定状态,微嵌合体的形成诱导了免疫耐受,使免疫排斥的应答处于低水平稳定状态,因此,除 CD25 阳性细胞以外,其他的免疫活性细胞如 CTL 细胞 CD8⁺/CD28⁺、CTL 活化信号 CD28 都逐渐下降,表明机体免疫应答水平的下降和异种抗原对受者免疫刺激的减弱。

研究数据显示 CD4⁺/CD45RA⁺ 细胞随患者年龄增加而减低,随 CsA-LT 增加而增加。有研究报道^[11] Fas 增加对 CD4 细胞有诱导凋亡和促进增殖两方面作用,移植后患者 CD4⁺/CD45RA⁺ 细胞减少可能与 Fas 表达增加有关,也与患者免疫应答降低有关。CsA 浓度与 CD4⁺/CD45RA⁺ 细胞的关系未见报道,CsA-LT 增加 CD4⁺/CD45RA⁺ 细胞也随之增加的原因也不明确。推测可能是由于 Th 细胞明显降低,导致反馈性 CD4⁺/CD45RA⁺ 增加,以诱导 Th,维持免疫功能正常。总结实验结果,肾功能稳定的受者 CD4⁺/CD45RA⁺、CD8⁺/CD28⁺、CD28、CD25 和 CD95L 随术后时间延长、年龄增加和 CsA-LT 增高而减低。CD95 表达随年龄的增加、术后时间的延长逐渐增多,随 CsA-LT 的增加逐渐下降($P < 0.05$)。这表明监测 CD4/CD45RA、CD8/CD28、CD25 和 CD95/CD95L 4 组抗体组合对于判断移植排斥反应和机体的免疫功能状态是很有帮助的。CsA-LT 是目前临床上调整药物剂量的重要参考依据。Cr 浓度是肾功能的直接反应,在无其他参考标准可取的情况下只能以此为依据来调整 CsA 用量,但是难以了解患者免疫功能的真实状态。根据本研究,选择性监测患者的 PBL 免疫表型 CD4⁺/CD45RA⁺、CD8⁺/CD28⁺、CD25、CD8 和 CD95/CD95L 变

化,结合 Cr 浓度、临床表现以及患者年龄和术后时间,作为临床免疫抑制剂应用和剂量调整的依据,将会使临床用药更加科学、合理,剂量更加准确,也更接近个体化。这不仅能减低患者的用药花费,更能减低由于免疫抑制剂不合理使用带来的不良反应,进而延长存活时间,提高患者生存质量。由于其方法简便、可靠、无需活组织病理检查和分子生物学分析,出报告时间短,因此适于作为临床免疫移植治疗和监测的指标。

[参考文献]

- [1] 李莉,张玲珍,陈育贵,等. 中国人外周血淋巴细胞 37 种表型正常值的测定[J]. 上海免疫学杂志,1998,18(5):267-270.
- [2] Kawakami A, Eguchi K, Matsuo K, et al. Expression and function of Fas and Fas ligand on peripheral blood lymphocytes in normal subjects[J]. *J Lab Clin Med*, 1998,132(5):404-413.
- [3] Gandolfo MT, Verzola D, Salvatore F, et al. Gender and the progression of chronic renal diseases: does apoptosis make the difference[J]. *Minerva Urol Nefrol*, 2004,56(1):1-14.
- [4] Li-Weber M, Krammer PH. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system [J]. *Semin Immunol*, 2003,15(3):145-157.
- [5] Xiao S, Sung SS, Fu SM, et al. Combining Fas mutation with Interleukin-2 deficiency prevents Colitis and Lupus: Implicating interleukin-2 for auto-reactive T cell expansion and Fas ligand for colon epithelial cell death [J]. *J Biol Chem*, 2003,278(52):52730-52738.
- [6] Bohm I, Schild H. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death [J]. *Mol Imaging Bio*, 2003,5(1):2-14.
- [7] Nakajima H, Oka T. Functional Fas and Fas-ligand activities in activated T cells of kidney transplant recipients [J]. *Transplant Proc*, 1997,29(6):2533-2534.
- [8] Sharma VK, Bologa RM, Li B, et al. Intrarenal display of cytotoxic attack molecules during rejection [J]. *Transplant Proc*, 1997,29(1-2):1090-1091.
- [9] Mathew JM, Blomberg B, Fuller L, et al. A novel micro-cell-mediated lympholytic assay for the evaluation of regulatory cells in human alloreactive CTL responses [J]. *J Immunol Methods*, 2003,272(1-2):67-80.
- [10] Game DS, Hernandez-Fuentes MP, Chaudhry AN, et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells do not significantly contribute to direct pathway hypo responsiveness in stable renal transplant patients [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003,14(6):1652-1661.
- [11] Desbarats J, Wade T, Wade WF, et al. Dichotomy between naive and memory CD4⁺ T cell responses to Fas engagement [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999,96(14):8104-8109.

[收稿日期] 2004-07-14

[修回日期] 2004-10-08

[本文编辑] 贾泽军,邓晓群