

移植肾急性排斥时 Fas 配体和 T 细胞内抗原 1 的表达

张万君,梅长林*,叶朝阳,赵学智,孙田美

(第二军医大学长征医院肾内科,上海 200003)

[摘要] **目的:**探讨移植肾发生急性排斥反应时肾组织 Fas 配体(Fas ligand,FasL)和 T 细胞内抗原 1(T-cell intracellular antigen-1,TIA-1)的表达及意义。**方法:**应用免疫组织化学技术分别检测 32 例移植肾标本、2 例供肾标本及 8 例肾癌周围肾组织标本 FasL 和 TIA-1 的表达,标本按 Banff 标准分为急性排斥(14 例)、慢性排斥(15 例)和无排斥改变(13 例)3 组,分析移植肾组织标本病理形态学改变与 FasL 和 TIA-1 表达的相关性。**结果:**FasL 主要在肾小管上皮细胞胞质内表达,急性排斥组表达明显强于慢性排斥组和无排斥组($P<0.05$);TIA-1 在肾小管上皮细胞和间质浸润淋巴细胞均有表达,小动脉内皮细胞亦可见阳性着色,急性排斥组阳性强度较高,与慢性排斥组和无排斥组间存在显著差异($P<0.05$);急性排斥标本 FasL 和 TIA-1 的表达强度与组织损害的严重程度呈正相关。**结论:**急性排斥时移植肾组织 FasL 和 TIA-1 表达增强是 T 细胞活化的反映,其检测可能有助于移植肾急性排斥的早期诊断。

[关键词] 肾移植;移植肾排斥;Fas 配体;T 细胞内抗原 1

[中图分类号] R 692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)04-0409-04

Expression of Fas ligand and T cell intracellular antigen-1 during acute rejection after renal transplantation

ZHANG Wan-jun, MEI Chang-lin*, YE Chao-yang, ZHAO Xue-zhi, SUN Tian-mei (Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the intrarenal expression of Fas ligand (FasL) and T cell intracellular antigen-1 (TIA-1) protein during acute rejection after renal transplantation. **Methods:** Immunohistochemical technique was used to detect FasL and TIA-1 expression in 32 transplanted renal samples, 2 living donor kidneys and 8 adjacent samples of renal cancer (including 14 acute rejection samples, 15 chronic and 13 non-rejection ones according to Banff criteria). **Results:** The positive FasL staining was observed mainly in cytoplasm of renal tubule epithelia, and the positive rate was significantly higher in acute rejection samples than in others ($P<0.01$). TIA-1 was found in both tubular epithelial cells and interstitial infiltrating lymphocytes, occasionally in small arterial endothelial cells. The positive staining rate of TIA-1 acute rejection samples was also higher than those of other samples ($P<0.05$). The expression of FasL and TIA-1 in acute rejection samples was positively correlated with the severity of tissue damages. **Conclusion:** Over expression of FasL and TIA-1 in acute rejection renal allograft tissues may indicate the activation of T cells, and its detection may be helpful for early diagnosis of acute rejection.

[KEY WORDS] kidney transplantation; graft rejection; Fas ligand; T-cell intracellular antigen-1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(4): 490-412]

T 淋巴细胞的活化和浸润是移植肾急性细胞性排斥反应的重要组织病理学特征,早期的研究已经证实了供体特异性和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)在急性排斥肾组织中的存在。但上述细胞的出现并不总是与排斥有关,临床发生的急性排斥反应在病理上常表现为中度细胞浸润(边缘改变),而类似的情况也可见于移植肾功能正常者^[1]。由于缺乏特异性,组织学检查往往难以准确判断急性排斥反应发生与否。CTL 活化后各种免疫活化标志物表达水平的变化,使人们有可能鉴别非排斥反应原因导致的细胞浸润,并为急性排斥反应的诊断提供一条新的途径。

这一设想的基础是当移植肾发生急性排斥反应时这些标志物在基因和蛋白质水平上的表达与其他

原因导致的移植肾功能丧失不同。因此,首先需要筛选合适的标志物,并判断其诊断价值。本实验采用免疫组织化学的方法对 CTL 活化标志物中的 Fas 配体(Fas ligand, FasL)和 T 细胞内抗原 1(T-cell intracellular antigen-1, TIA-1)基因产物进行检测,在蛋白质水平上分析其表达及意义。

1 材料和方法

1.1 标本材料

1.1.1 标本获取 所选标本来自第二军医大学长

[作者简介] 张万君,博士,主治医师,现在沈阳军区总医院血液净化科,沈阳 110016。E-mail:dialysis@vip.sohu.com

* Corresponding author. E-mail:chlmei@public1.sta.net.cn

征医院肾移植中心 2001 年移植肾活检标本,包括移植肾标本 32 例(穿刺标本 26 例,切除标本 6 例),供肾标本 2 例,肾癌周围肾组织标本 9 例。移植肾标本均取自住院患者(男 15 例,女 17 例),年龄 18~52 岁,平均(43.6±7.2)岁,均为首次接受肾移植[术后 3~41 个月,平均(11.5±3.3)个月],术后进行常规免疫抑制治疗(环孢素 A、霉酚酸酯或硫唑嘌呤和泼尼松),于出现发热、尿量减少和血清肌酐浓度升高等疑为临床排斥时行移植肾活检,对抗排斥治疗无效者予移植肾切除。标本取出后立即用 10% 甲醛溶液固定、石蜡包埋。

1.1.2 标本分类 组织学诊断根据 Banff 标准(1997)^[2],在分子生物学检测结果出来之前进行。32 例移植肾标本中,14 例为急性排斥,15 例为慢性排斥,3 例无排斥特征;2 例供肾标本未见异常;9 例肾癌周围肾组织标本,除 1 例见癌细胞浸润(弃用)外,其余均未见异常。急、慢性排斥以外的其他改变归入无排斥改变组。由此将标本分为急性排斥(14 例)、慢性排斥(15 例)和无排斥改变(13 例)3 组。并在此基础上对急性排斥标本组织损害的严重程度进行量化计分。

1.2 试剂 FasL 单抗和 TIA-1 单抗由 Santa Cruz 公司提供,使用时分别按 1:5 和 1:1 000 稀释;生物素化 IgG、SP 试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供;DAB 由 DAKO 公司提供。

1.3 方法 免疫组化采用链霉素抗生物素蛋白-生物素酶标(SP)法,切取 5 μm 厚石蜡切片,常规脱蜡、水化,用 0.3% H₂O₂ 溶液中和过氧化物酶,微波修复抗原,10% 山羊血清封闭,然后分别滴加单克隆抗体,4℃ 过夜,先后滴加生物素化二抗(1:200)及 SABC 复合物(1:100)。上述步骤操作前均用 PBS 充分浸洗。DAB 显色,苏木精轻度复染,逐级脱水,

透明封片。用缓冲液分别代替 FasL 单抗和 TIA-1 单抗作为阴性对照。

1.4 结果判断 FasL 和 TIA-1 抗体阳性信号均为棕黄色染色,依照抗原在移植肾小管上皮细胞的表达情况进行判断。高倍镜下随机选择 5 个视野,计数每个视野表达抗原的肾小管上皮细胞数,计算其平均值。阳性强度分 4 级:①无肾小管上皮细胞着色为阴性(-),计为 1 分;②<25% 小管上皮细胞明显着色为弱阳性(+),计为 2 分;③着色细胞在 25%~50% 为阳性(++),计为 3 分;④>50% 为强阳性(+++),计为 4 分。

1.5 统计学处理 采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 FasL 的表达 FasL 的表达主要位于肾小管上皮细胞,尤其是近曲小管,胞质内表达,间质浸润细胞表达不明显。急性排斥组所有标本均表达 FasL,其中强阳性 9 例,与慢性排斥组(强阳性 3 例)比较,差异显著($P<0.05$)。而无排斥组有 11/13 不表达,2 例表达标本仅为弱阳性,明显低于急性排斥组和慢性排斥组($P<0.05$,表 1、图 1)。此外,急性排斥组随着组织学积分的升高,阳性强度(按着色肾小管上皮细胞比例分级)亦增加(图 2A)。

2.2 TIA-1 的表达 TIA-1 除表达于肾小管上皮细胞外,肾间质浸润淋巴细胞的表达也较明显,小动脉内皮细胞也可见着色,肾实质细胞则为阴性(图 3)。急性排斥和慢性排斥标本全部表达 TIA-1,但二者差异明显($P<0.05$),慢性排斥组弱于前者,表达范围亦较局限,间质阳性者少,小动脉内皮细胞未见表达。无排斥组则多不表达 TIA-1,较慢性排斥组亦有显著差异($P<0.05$,表 1)。与 FasL 类似,急性排斥病理损害程度越严重 TIA-1 的表达越强(图 2B)。

表 1 移植肾标本 FasL/ TIA-1 的表达与病理诊断

Tab 1 Expression of FasL/ TIA-1 and histological diagnosis of renal allografts

Histological diagnosis	N	FasL expression				TIA-1 expression			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
AR	14	0	2	3	9* [△]	0	1	7	6* [△]
CR	15	1	6	5	3 [△]	0	8	4	3 [△]
NR	13	11	2	0	0	9	1	3	0

AR: Acute rejection; CR: Chronic rejection, NR: No evidence of rejection. * $P<0.05$ vs CR; [△] $P<0.05$ vs NR

(n)

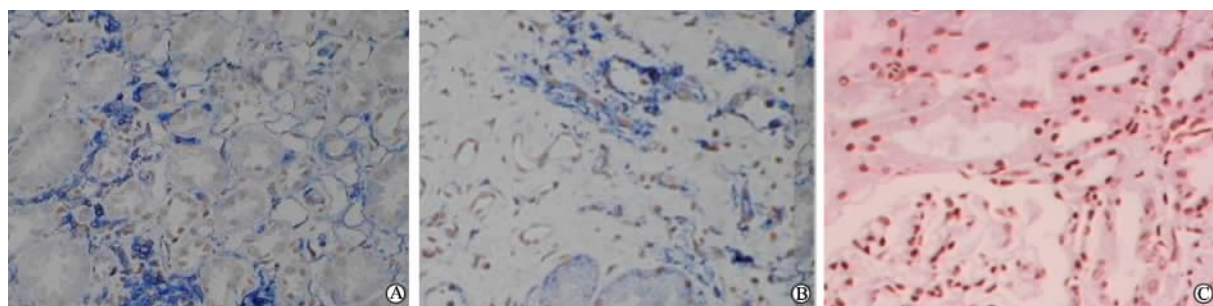


图 1 移植肾组织 FasL 免疫组化染色

Fig 1 Immunohistochemical staining of FasL in renal allograft(×200)

A: Acute rejection; B: Chronic rejection; C: No evidence of rejection. The positive rate was significantly higher in acute rejecting samples than in others.

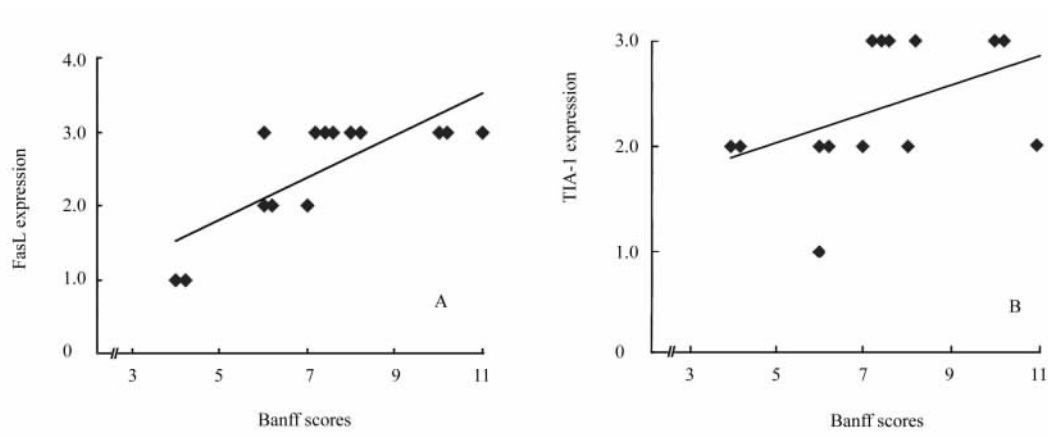


图 2 急性排斥标本 FasL(A)和 TIA-1(B)阳性强度与 Banff 积分的关系

Fig 2 Correlation between intensity of FasL(A), TIA-1(B) expression and Banff scores

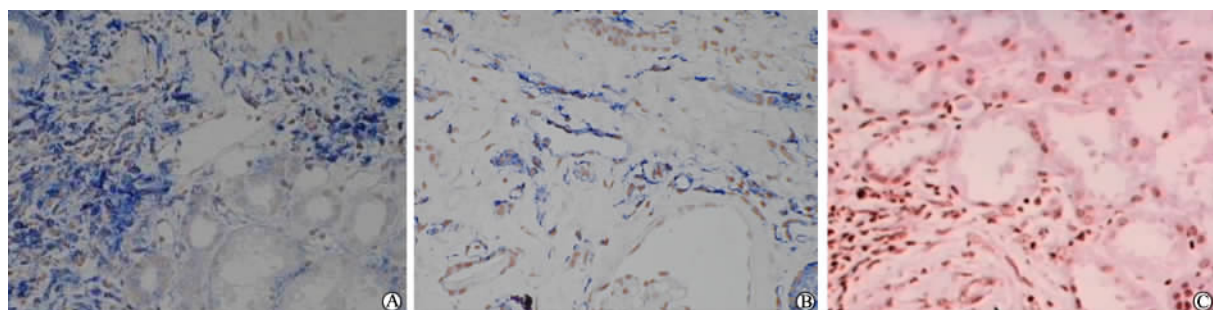


图 3 移植肾组织 TIA-1 免疫组化染色

Fig 3 Immunohistochemical staining of TIA-1 in renal allograft(×200)

A: Acute rejection, B: Chronic rejection, C: No evidence of rejection. The positive staining rate of acute rejecting samples was significantly higher than those of others

3 讨论

FasL 是 II 型跨膜蛋白,相对分子质量 4 000,与肿瘤坏死因子家族成员有显著的同源性。FasL 与 Fas 抗原的共同作用是 CTL 发挥细胞毒效应的重

要途径^[3]。TIA-1 系相对分子质量 17 000 的颗粒状膜蛋白,有 4 个跨膜区,是细胞毒性颗粒的组成部分,正常情况下人外周血中多数 CD8⁺细胞、部分 CD4⁺细胞及活化的自然杀伤细胞表达这一抗原^[4]。

细胞免疫应答是移植肾急性排斥的主要免疫学

机制,其中,CTL 作为效应细胞发挥了重要作用。本研究采用免疫组化技术观察了移植肾组织 FasL 和 TIA-1 的表达情况,结果显示,FasL 和 TIA-1 主要表达于移植肾肾小管上皮细胞,尤其是近曲小管。与慢性排斥和无排斥相比,急性排斥时 FasL 和 TIA-1 表达明显增强,且阳性强度与移植肾病理损害的严重程度有关。关于 FasL 和 TIA-1 在 CTL 溶解靶细胞过程中的作用,目前认为,CTL 激活后 FasL 的表达增加,FasL 释放到胞外与靶细胞表面的 Fas 抗原结合,此时的 CTL 具有细胞毒作用,可杀伤 Fas⁺ 细胞^[3]。而 TIA-1 存在于细胞毒性颗粒中,可能参与 FasL 介导的细胞死亡。Tian 等^[5] 观察到,Fas 与 FasL 结合后,被 Fas 激活的丝氨酸/苏氨酸激酶(FAS)快速去磷酸化,进而出现 TIA-1 的磷酸化。这一现象发生在靶细胞 DNA 裂解之前,提示 TIA-1 可能在细胞凋亡过程中发挥了信号传递作用。有研究发现,TIA-1 可通过激活一种内源性内切酶-溶核素(nucleolysin)诱导靶细胞 DNA 的降解^[6]。

Fas-FasL 系统与移植肾排斥反应的关系近年来逐渐受到重视,国内外有关报道显示,该系统与急性排斥而不是慢性排斥相关联^[1,7],FasL mRNA 水平的上调既是急性排斥反应的标志,又可判断其预后^[8,9],对于其他移植物抗宿主病同样具有诊断和监测价值^[10,11]。而 Fas 抗原的表达对于急性排斥特异性不高,移植后无论有无靶细胞凋亡存在,该抗原的表达均增加,其原因可能是移植肾再灌注损伤而非排斥^[12]。此前有实验表明,与慢性排斥和无排斥对照组相比,急性排斥时 TIA-1 表达水平显著升高;且与病理损害的严重程度呈正相关;TIA-1 检测判断急性排斥反应的敏感度和特异度分别为 90% 和 77%;与本研究不同的是,慢性排斥和无排斥标本间 TIA-1 表达无明显差异^[6]。

在此,本研究选择了 FasL 与参与 FasL 途径的另一免疫效应分子 TIA-1,应用免疫组织化学技术分析二者的表达与移植肾急性排斥的关系,研究结果为进一步探讨奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 695-700.
- [2] Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology [J]. *Kidney Int*, 1999, 55: 713-723.
- [3] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor [J]. *Science*, 1995, 267: 1449-1456.
- [4] Meehan SM, McCluskey RT, Pascual M, et al. Cytotoxicity and apoptosis in human renal allografts: identification, distribution, and quantitation of cells with a cytotoxic granule protein GMP-17 (TIA-1) and cells with fragmented nuclear DNA [J]. *Lab Invest*, 1997, 76: 639-649.
- [5] Tian Q, Taupin J, Elledge S, et al. Fas-activated serine/threonine kinase (FAS) phosphorylates TIA-1 during Fas-mediated apoptosis [J]. *J Exp Med*, 1995, 182: 865-874.
- [6] Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intragraft cytotoxic T lymphocyte gene expression in acutely rejecting renal allografts [J]. *J Immunol*, 1994, 152: 5120-5127.
- [7] Pascoe MD, Marshall SE, Welsh KI, et al. Increased accuracy of renal allograft rejection diagnosis using combined perforin, granzyme B, and fas ligand fine-needle aspiration immunocytology [J]. *Transplantation*, 2000, 69: 2547-2553.
- [8] Netto MV, Fonseca BA, Dantas M, et al. Granzyme B, FAS-ligand and perforin expression during acute cellular rejection episodes after kidney transplantation: comparison between blood and renal aspirates [J]. *Transplant Proc*, 2002, 34: 476-478.
- [9] Desvaux D, Schwarzing M, Pastural M, et al. Molecular diagnosis of renal-allograft rejection: correlation with histopathologic evaluation and antirejection-therapy resistance [J]. *Transplantation*, 2004, 78: 647-653.
- [10] Jaksch M, Remberger M, Mattsson J. Increased immune transcript levels are correlated with acute graft-versus-host disease and cytomegalovirus response after allogeneic stem cell transplantation [J]. *Transplantation*, 2004, 77: 195-200.
- [11] Han D, Xu X, Baidal D, et al. Assessment of cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood of human islet allograft recipients: elevation precedes clinical evidence of rejection [J]. *Diabetes*, 2004, 53: 2281-2290.
- [12] Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, et al. Correlation between Banff classification, acute renal rejection scores and reversal of rejection [J]. *Kidney Int*, 1996, 49: 481-487.

[收稿日期] 2005-10-15

[修回日期] 2006-03-10

[本文编辑] 孙岩