

心脏移植后 PBMC 表面蛋白分子的表达与组织病理学改变的比较

顾云¹, 黄益民¹, 孟旭², 白涛², 李玉梅³, 辛毅¹ (¹北京市心肺血管疾病研究所分子生物学研究室, ²首都医科大学附属北京安贞医院心脏外科, 北京 100029 ³中国中医研究院基础理论研究所, 北京 100009)

[摘要] 目的: 比较心脏移植前后, 外周血单个核细胞(PBMC)表面蛋白分子的表达与组织病理学改变时相间的差别, 探讨免疫分子的活性变化与移植器官排斥反应时间进程间的关系。方法: 6例心脏移植患者于术前、术后不同时间点取外周血, 用不同荧光单克隆抗体(mAb)标记 PBMC 表面的蛋白分子后, 用流式细胞仪检测 MHC II CD3 CD4 CD8 HLA-DR 和 ICAM-1 的表达。常规移植术后供心组织病理检查, 根据国际器官移植排斥反应的病理诊断标准分级。结果: (1) 6例实施心脏移植的患者中, 有 3 例在不同时间发生不同程度的急性排斥反应。(2) 发生排斥反应的病例在整个 30 d 的观测期内, CD3 CD4 及 CD8 的表达水平, 均高于未发生排斥反应的病例。(3) 发生移植排斥反应的患者, 其 PBMC 上 HLA-DR 的表达于移植术后 72 h 出现高峰, 出现高峰的时间较用活组织检查诊断排斥反应的时间早 4~7 d。(4) 发生排斥反应的患者 PBMC 上 MHC II 及 ICAM-1 的表达, 分别于术后 3 d 及 2 d 出现高于术前的表达峰, 于术后 15 d 达峰值, 峰值的出现时间与病理改变基本同步。结论: (1) 心脏移植患者术前的免疫功能状况, 与移植术后排斥反应的发生率及严重性有一定的相关性。(2) 监测 PBMC 表面 HLA-DR、MHC II 及 ICAM-1 分子的表达, 对临床早期发现心脏移植排斥反应具有一定的指导意义。

[关键词] 心脏移植; 急性排斥反应; 外周血单个核细胞; 免疫分子表达

[中图分类号] R654.2 **[文献标识码]** B

移植器官的活组织病理学检查, 被公认为临床监测排斥反应的金方法。利用活检可在移植后的 3~7 d 发现器官移植急性排斥反应的病理学变化^[1,2], 并对移植器官的组织细胞损伤程度进行病理学分级^[3-6]。尽管最轻度的 I A 级排斥反应的病理变化只表现为淋巴细胞浸润, 但此时免疫排斥反应的进程, 实际上已完成抗原识别、提呈、淋巴细胞活化, 进入效应阶段。因此, 仅通过病理学诊断不能判定免疫排斥反应进程的早、中期阶段, 而活检操作又复杂、损伤大, 不能做到动态、适时监测。

近年来, 国内外一些学者致力于通过外周血建立监测器官移植急性排斥反应的简便方法, 迄今研究结果仍然缺乏免疫特异性。我们利用流式细胞术, 动态观察了发生和未发生排斥反应的心脏移植患者, 术后心肌活组织病理检查的结果与相应时间点的外周血单个核细胞(PBMC)表面蛋白分子表达水平的变化, 并对其时相进行平行及纵向比较, 综合分析了心脏移植患者术前及术后不同时间 PBMC 上免疫分子表达的时相与供心组织病理学改变的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 接受心脏移植手术的患者, 均为本院 2001~2003 年期间心脏外科收治的患者。抗人 CD3 CD4 CD8 ICAM-1 MHC II HLA-DR 和 CD45 单克隆抗体(mAb), 均购于苏州基因公司, 为 Immuno Tech 公司产品。XL A 27153 型流式细胞仪, 为美国 Culti 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 移植心脏活组织的病理学检查 6例心脏移植患者分别于移植术后不同时间, 常规经心导管取移植心脏流入道、心尖部、室间隔和流出道等部位的心内膜和心肌组织。移植心肌活组织经冰冻切片、HE 染色后, 根据国际器官移植排斥反应病理诊断分级的标准, 即 0 级: 无排斥变化; IA 级: 有灶状炎性细胞浸润、无组织坏死; IB 级: 有弥漫性轻度炎性细胞浸润、无组织坏死; II 级: 炎性细胞浸润集中于有损伤的心肌处; IIIA 级: 有多灶状炎性细胞浸润及心肌细胞损伤; IIIB 级: 有弥漫性炎性细胞浸润及心肌组织坏死; IV 级: 有弥漫性炎性细胞浸润及心肌组织坏死和水肿、血管炎等多种变化出现。以上均用光学显微镜对心肌组织切片进行观察, 并对排斥反应的程度进行分级。其中 IA 级为早期排斥反应; IB 级与 II 级为中度排斥反应; IIIA 级、IIIB 级与 IV 级为严重排斥反应。

1.2.2 PBMC 表面蛋白分子的标记及测定 患者分别于心脏移植术前 1 d 及移植术后 1、2、3、5、10、15、20、30 d 经肘静脉取空腹血, 20 g/L 的 EDTA 抗凝后, 将 PE 标记的抗人 CD8 和 MHC II mAb, FITC 标记的抗人 CD4、ICAM-1 和 HLA-DR mAb, PC5 标记的抗人 CD3 mAb 各 10 μ L, 分别与上述各时间点采集的 100 μ L 抗凝血于 4 $^{\circ}$ C 暗箱中共孵育 30 min 后, 用含 20 mL/L 小牛血清的 0.01 mol/L PBS 洗涤 PBMC 1 遍, 除多余的 mAb。在所有各管中, 再加入 ECD 荧光标记的抗人 CD45 mAb。同时设 PBMC 中单加抗人 CD45 mAb 的管作为空白对照, 4 $^{\circ}$ C 暗箱中共孵育 30 min。用细胞裂解液裂解红细胞后, 以 1:500 倍稀释于 2% 多聚甲醛中, 在相同离心条件下

收稿日期: 2004-11-08 修回日期: 2005-03-28

基金项目: 北京市科委心血管病研究实验室支持项目 (No 953850700);

首都医学发展科研基金(重点学科)资助项目 (No ZB199814)

作者简介: 顾云 (1960-), 女, 北京人, 副研究员。

Tel: (010) 64456652, Email: guyun15@sina.com

下, 用含 20 mL/L 小牛血清的 0.01 mol/L PBS 洗涤 PBMC 2 遍, 加 PBS 至 0.5 mL, 即为 PBMC 悬液。过滤后, 以流式细胞术将 CD45⁺ 的细胞纳入测试范围, 以去除未完全裂解的红色细胞的干扰。同时以 900 偏向角散射, 将 PBMC 分为淋巴细胞群、单核细胞群及中性粒细胞群。在淋巴细胞群中, 分别测定 CD3、CD4、CD8 表达的百分率; 在单核及淋巴细胞群中, 测定 MHG-II 类分子表达的百分率; 在中性粒细胞群中, 分别测定 ICAM-1 和 HLA-DR 表达的百分率。

1.2.3 统计学处理 利用 SPSS 统计软件分析心脏移植术前及术后各时间点, 各种指标参数的 $\bar{x} \pm s$; 各参数间显著性的

比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表明具有显著性差异。

2 结果

2.1 移植心脏活组织病理学检查 在移植术后的 30 d 观察期内, 6 例心脏移植的患者中, 有 3 例患者分别于移植后 10、11、12 d 进行常规心肌活组织检查, 未发现排斥反应的病理学改变; 其余 3 例患者分别于移植后的 7、10、11 d 常规做心肌活组织检查, 发现分别有 II 级、I A 级和 I A ~ III A 级急性排斥反应的病理变化 (图 1)。

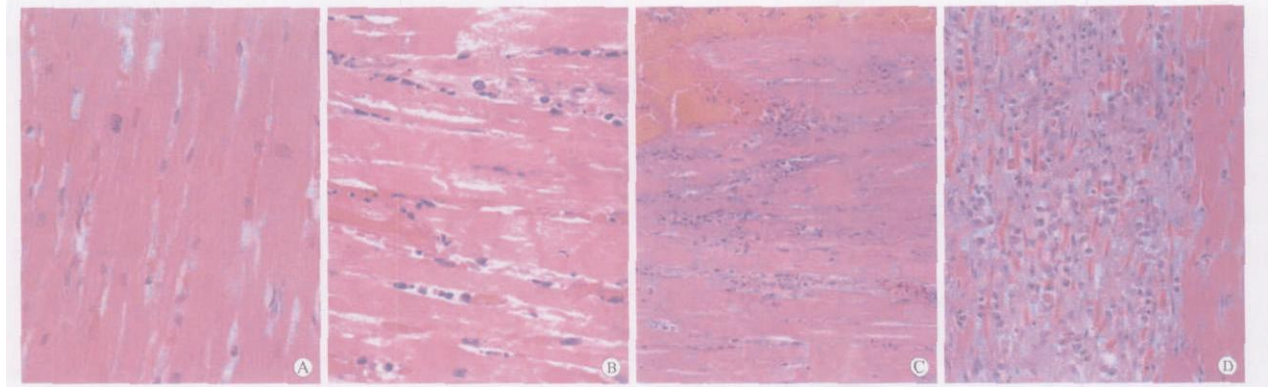


图 1 移植心脏的病理变化

A: 正常心肌细胞; B~D: IA 级、II 级和 IIIA 级急性排斥反应的病理变化。

2.2 发生与未发生排斥反应患者 CD3、CD4 和 CD8 表达量的变化 心脏移植术后, 所有患者 PBMC 表面 CD3、CD4 和 CD8 的表达水平, 除发生排斥反应的患者于术后 24 h CD8 的表达稍有升高外, CD3 及 CD4 分别于 24~72 h 降至最低值, 此后回升至正常水平, 与未发生排斥反应的患者相比较, 发

生排斥反应的患者 CD3 和 CD4 在术前及术后的表达水平以及术后 CD8 的表达水平, 在 30 d 的观察期内均较高。其中发生排斥反应的患者在术后多个时间点, CD3 的表达水平与未发生排斥反应的患者相比较均有显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (表 1)。

表 1 发生与未发生排斥反应的患者移植术前及术后免疫分子的表达 ($\bar{x} \pm s, \%$)

免疫分子	术前	术后 24 h	术后 48 h	术后 72 h	术后 5 d	术后 10 d	术后 15 d	术后 20 d	术后 30 d
未发生排斥反应者:									
CD3	76.8 ± 13.3	43.5 ± 10.2	52.2 ± 20.9	50.6 ± 19.1	59.2 ± 7.0	68.8 ± 2.9	65.8 ± 4.1	73.3 ± 12.5	65.8 ± 6.8
CD4	51.3 ± 20.3	23.9 ± 2.3	25.9 ± 5.7	28.8 ± 9.4	34.2 ± 7.2	38.9 ± 5.4	36.6 ± 3.4	46.0 ± 13.9	34.1 ± 2.1
CD8	19.5 ± 9.8	14.8 ± 9.6	10.6 ± 10.0	12.2 ± 4.3	13.8 ± 9.9	20.4 ± 6.9	18.2 ± 11.1	19.8 ± 8.3	21.6 ± 10.2
HLA-DR	2.3 ± 3.9	0.6 ± 0.2	1.4 ± 1.2	2.0 ± 2.3	3.5 ± 3.4	2.5 ± 2.8	2.9 ± 1.7	2.2 ± 2.4	5.7 ± 5.6
ICAM-1	12.5 ± 10.8	8.5 ± 6.3	3.1 ± 1.2	6.3 ± 5.8	4.2 ± 4.5	5.6 ± 7.2	3.2 ± 2.9	1.0 ± 1.1	5.4 ± 0.5
发生排斥反应者:									
CD3	88.7 ± 3.3	78.3 ± 4.6 ^a	72.7 ± 6.0	71.8 ± 3.2	77.5 ± 5.9 ^a	81.4 ± 2.6 ^a	76.7 ± 1.4 ^a	74.5 ± 6.9	78.2 ± 3.6 ^a
CD4	49.2 ± 7.5	35.7 ± 7.6	41.4 ± 6.5	45.8 ± 7.0	47.5 ± 4.7	45.8 ± 5.5	42.4 ± 5.8	43.3 ± 1.6	40.7 ± 3.8
CD8	35.3 ± 7.6	36.3 ± 3.4 ^a	26.3 ± 2.9	22.4 ± 4.9	26.7 ± 0.4	29.0 ± 3.5	30.2 ± 7.3	28.0 ± 5.4	30.8 ± 3.5
HLA-DR	14.4 ± 9.6	17.1 ± 26.2	5.7 ± 9.7	24.8 ± 36.8	7.9 ± 6.9	4.2 ± 3.8	3.3 ± 2.9	1.0 ± 1.7	3.5 ± 5.6
ICAM-1	7.2 ± 4.5	1.8 ± 1.4	7.4 ± 5.2	9.6 ± 6.9	3.8 ± 4.4	9.0 ± 8.4	28.9 ± 18.8	2.4 ± 1.6	11.1 ± 5.3

^a $P < 0.05$ ^b $P < 0.01$ vs 对应的术前的表达。

2.3 发生与未发生排斥反应的患者 HLA-DR 表达水平的变化 发生排斥反应的患者 PBMC 表面 HLA-DR 的表达水平于移植后 24 h 开始升高, 出现术后的第 1 个高峰, 移植后 72 h 出现第 2 个表达高峰, 峰值分别为 17.1 ± 26.2 和 24.8 ± 36.8。未发生排斥反应的患者, 术后 HLA-DR 的表达量出现波动, 在

术后的 30 d 为 5.7 ± 5.6。未发生排斥反应的患者, HLA-DR 术前的表达量较发生排斥反应的患者术前的表达量低, 分别为 2.3 ± 3.9 及 14.4 ± 9.6。未发生排斥反应的患者, HLA-DR 的表达在术前 ~ 术后 30 d 其变化在小范围内波动。出现排斥反应的患者, 术后 HLA-DR 表达高峰出现的时间较病理学

变提早 4~7 d (表 1)。

2.4 发生及未发生排斥反应的患者 ICAM-1 表达量的变化

心脏移植患者 PBMC 表面 ICAM-1 的表达水平, 无论是发生排斥反应还是未发生排斥反应, 于术后 24 h 均有所下降。发生排斥反应的患者, 于术后 24 h 后开始升高, 术后 72 h 出现第 1 个高峰, 术后 5 d 后再次升高至 15 d 出现第 2 个高峰; 而未发生排斥反应的病例, 其表达水平只在小范围内波动, 但均不高于术前的水平。发生排斥反应的患者, 术后 ICAM-1 的表达出现第 1 高峰的时间较病理改变早 5~7 d, 但最高峰值出现的时间与病理改变基本同步 (表 1)。

3 讨论

本研究结果发现, 心脏移植术后前 3 d 内, 无论是发生还是未发生排斥反应的患者, CD3、CD4 及 CD8 的表达水平与术前相比较均有所下降, 以后在不同时间逐渐增加, 表现为免疫反应的一过性抑制, 提示心脏移植术后 1~3 d 为 Th 细胞的活化和增殖期。

Culizia 等^[7]对 76 例健康个体与患活动性风湿性心脏患者进行了比较研究。活动性风湿性心脏患者外周血 T 细胞的数明显高于正常人 ($P < 0.05$)。患者 $CD4^+ CD8^+$ T 细胞的比值为 5.5%; 而正常人仅为 2.7%。而且, 患有活动性风湿热并伴有较强免疫反应的患者, 心脏移植后的死亡率高, 说明心脏移植术前, 患者的免疫功能状态与移植术后发生排斥反应的比例及程度密切相关。本实验观察到, 在整个 30 d 的观测期内, 发生排斥反应的病例 CD3、CD4 及 CD8 的表达水平均较未发生排斥反应的病例高, 提示免疫分子和/或免疫细胞水平较高的患者, 心脏移植术后似乎更易发生排斥反应, 即心脏移植术前患者的免疫功能状态与排斥反应的发生率及严重程度有一定的关联。

HLA-DR 与 T 细胞的活化相关。T 细胞活化后, 其 mRNA 最早可检出的时间为 3~5 d。我们的实验结果发现, 心脏移植术后 24~48 h, PBMC 表面 ICAM-1 和 MHC-II 的表达水平升高, 提示此时的细胞已开始翻译并合成上述免疫分子。发生排斥反应的病例, PBMC 表面 ICAM-1 及 HLA-DR 的表达水平, 分别于术后 2 d 和 3 d 出现表达高峰; 而术后 7~12 d 进行常规移植心脏活组织病理检查时, 可发现具有 IA 级~IIIA 级的急性移植免疫排斥反应的病理改变, 即 ICAM-1 及 HLA-DR 表达出现第 1 高峰的时间, 较病理改变至少早 1~5 d。对大鼠心脏移植后 7 d 进行心肌组织活检时, 发现具有 IIIA 级以上病理改变的大鼠的移植心脏存活率陡降^[8], 于术后 3~7 d 主要为免疫排斥反应的效应期。在这个反应中, B 淋巴细胞、辅助 T 淋巴细胞、被激活的巨噬细胞, 以及由这些细胞产

生的各种生物活性物质, 可共同对移植植物进行攻击。以上结果提示, 监测 PBMC 表面 ICAM-1 和 HLA-DR 的表达, 对于临床早期发现移植排斥反应的发生及免疫抑制剂的应用具有一定的实际意义。

在采用流式细胞术分析时, 为去除未完全裂解的红细胞及裂解的红细胞碎片对检测的干扰, 我们采用了红色荧光素 ECD 标记的抗单个核细胞表面抗原 CD45 的 mAb, 因此, 可首先将显示此荧光的细胞纳入检测的范围, 根据实验所需检测的 MHC-II、CD3、CD4、CD8、HLA-DR 和 ICAM-1 免疫分子在不同细胞群中表达的分布, 同时以 90° 偏向角散射, 便可将 PBMC 分为淋巴细胞群、单核细胞及中性粒细胞群。然后, 再分别检测不同的细胞群表面表达的上述免疫分子, 可更准确地反映器官移植后 30 d 观察期内免疫分子表达的状况。

参考文献:

- [1] Coito AJ, Brown LE, Peters JH, *et al*. Expression of fibronectin splicing variants in organ transplantation: a differential pattern between rat cardiac allografts and isografts [J]. *Am J Pathol* 1997; 150(5): 1757-1772.
- [2] Nikolova Z, Hof A, Baumlin Y, *et al*. Efficacy of SDZ RAD compared with CsA monotherapy and combined Rad/FTY720 treatment in a murine cardiac allotransplantation model [J]. *Transpl Immunol* 2001; 9(1): 43-49.
- [3] Demers R, Elkouri S, Sirois MG, *et al*. Coronary artery endothelial dysfunction after ischemia-reperfusion and acute untreated rejection in a canine heterotopic heart transplantation model [J]. *Transplantation* 2001; 71(1): 26-32.
- [4] Bouchard D, Despatis MA, BuLuran J, *et al*. Vascular effects of cyclosporin A and acute rejection in canine heart transplantation [J]. *Ann Thorac Surg* 1997; 64(5): 1325-1330.
- [5] PernaUti LR, Bilouard JP, Janiak R, *et al*. Time course of coronary endothelial dysfunction in acute untreated rejection after heterotopic heart transplantation [J]. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16(6): 643-657.
- [6] Bouchard D, Cartier R, Despatis MA, *et al*. Receptor-specific effects of acute rejection after heart transplantation on endothelium-dependent coronary relaxation in dogs [J]. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15(4): 404-408.
- [7] Gulizia M, Engel PJ, Mamas BM. Acute rheumatic carditis: diagnostic and therapeutic challenges in the era of heart transplantation [J]. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12(3): 372-380.
- [8] 顾云, 黄益民, 张永科, 等. 大鼠心脏移植后淋巴细胞 5 种免疫分子表达的变化 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003; 19(5): 431-433.