

# 心脏移植急性排斥反应的免疫学检测

周永列 严志焜

心脏移植是终末期心脏病唯一有效的治疗手段,但排斥反应仍然是心脏移植后影响心脏功能正常发挥和受者长期存活的主要因素之一。国际心脏与肺移植协会(ISHLT)1999年报告,急性排斥反应在心脏移植中的发生率约50%,在心脏移植第1年死亡率中占20%。1981年Billingham提倡利用心内膜、心肌活检(EMB)作为急性排斥反应分级标准。目前,EMB已成为诊断心脏移植排斥反应的“金标准”。ISHLT根据EMB形态学改变,将心脏移植的排斥反应分为0~4级。心脏移植是EMB公认的适应证。但EMB是一种有创性检查,有时可导致心脏传导系统损伤,并发心律失常,偶尔可并发心脏穿孔。心脏移植后3个月为排斥高峰期,要求作频繁的检查,而EMB由于上述原因受到限制。Kuhn等<sup>[1]</sup>随访1108例长期生存的心脏移植患者,发现10年后仍有8%~10%的患者存在中度排斥反应。为此寻找无创伤性的监测心脏移植后急性排斥反应的检查指标已受到临床的高度关注。排斥反应是细胞免疫和体液免疫共同介导的一种复杂的免疫病理损伤。因此,免疫学检查指标就成为关注的焦点。

## 1 细胞介导的免疫排斥反应检测

1.1 活化的淋巴细胞亚群 移植排斥的本质是宿主主要组织相容性复合物(MHC)系统与供体MHC(allo-MHC)系统的不相容,受体启动免疫系统对供体细胞表面的allo-MHC发起攻击反应。 $CD_4^+$ 的T淋巴细胞通过识别抗原递呈细胞(APC)表面MHC II类抗原多肽复合物而介导细胞和体液免疫排斥。 $CD_8^+$ 的T淋巴细胞则通过识别与靶细胞表面的MHC I类分子复合物,并在一系列的辅助分子参与下,转化成活化的细胞毒性T细胞,通过释放细胞毒素和穿孔蛋白攻击靶细胞,使靶细胞溶解性坏死或凋亡。供心一旦植入受体内将被视为异己,通过供受体间MHC系统的不相容,产生免疫应答

而将其排除,在免疫排斥过程中,静止的淋巴细胞通过MHC的识别而转变成活化的淋巴细胞。 $CD_3^+$ 或 $CD_4^+$ 细胞同时表达MHC II类分子(通常以HLA-DR作为标志)即成为活化的淋巴细胞。辅助性T细胞( $Th$ )和细胞毒性T细胞( $Tc$ )表面的IL-2R( $CD_{25}$ )受到自分泌的IL-2刺激后,迅速分化增殖而产生免疫应答。因此,T淋巴细胞上 $CD_{25}$ 的表达也可作为活化标志。利用淋巴细胞的活化标志结合分群标志,采用双色或多色标记荧光,借助流式细胞仪,可以方便地检测活化淋巴细胞的不同亚群。定期观察心脏移植受体的活化淋巴细胞亚群,从而预测排斥反应的发生。

1.2 T细胞受体(TCR) TCR存在于 $Th$ 和 $Tc$ 细胞表面,识别抗原时受MHC限制。TCR与 $CD_3$ 形成TCR- $CD_3$ 复合物,识别抗原后由 $CD_3$ 将抗原信息转入T细胞而使之活化。外周血的大多数T细胞(>95%)受体是 $TCR\alpha/\beta$ ,是最主要的T细胞功能性受体。当 $TCR\alpha/\beta$ 与APC细胞递呈来的抗原复合物识别和结合时,TCR的 $\alpha$ 、 $\beta$ 链的可变区识别异种抗原并与之结合,同时由TCR邻近的 $CD_4$ 或 $CD_8$ 分别识别该抗原复合物连同MHC II类或I类抗原进行双识别,形成完整的TCR- $CD_3$ 复合体,共同参与对抗原刺激的免疫应答。Heidecke等<sup>[2]</sup>对心脏移植大鼠进行 $TCR\alpha/\beta$ 检测,发现 $TCR\alpha/\beta$ 与移植心脏的存活时间呈负相关,急性排斥反应的大鼠外周血 $TCR\alpha/\beta$ 明显升高。宋光民等<sup>[3]</sup>观察颈部异位心脏移植大鼠,发现移植后未作任何处理的大鼠和先输注供体脾细胞再行移植的大鼠外周血 $TCR\alpha/\beta$ 明显高于移植后行环孢霉素处理的大鼠。对输注脾细胞的大鼠在行移植前用环磷酰胺处理,选择性破坏被供体抗原激活的T细胞,使受体对移植植物产生免疫耐受,心脏移植后不但存活时间长,而且外周血 $TCR\alpha/\beta$ 也接近未作移植的正常大鼠。可见外周血 $TCR\alpha/\beta$ 是判断心脏移植排斥反应的一个敏感指标。

1.3 淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)及其配体细胞间粘附分子-1(ICAM-1) LFA-1又称 $CD_{11b}$

作者单位:310014 杭州,浙江省人民医院;浙江省器官移植重点研究实验室(心脏移植分室)

CD<sub>18</sub>,是由  $\alpha$  亚单位( CD<sub>11a</sub>) 和  $\beta$  亚单位( CD<sub>18</sub>) 通过共价键结合的异二聚体,表达于淋巴细胞和其他白细胞表面,其配体为 ICAM-1。ICAM-1 与 ICAM-1 在器官移植排斥反应中的作用主要表现在:免疫识别阶段介导 APC 与 Th 细胞间的粘附,并作为复合刺激信号;调节 T 淋巴细胞向移植物内皮细胞粘附,并被各种细胞因子上调。免疫效应阶段参与 T 淋巴细胞和靶细胞之间的粘附,并使 T 淋巴细胞活化,对带有移植物抗原的靶细胞进行攻击。LFA-1 和 ICAM-1 在移植排斥反应中发挥了重要的作用。龙刚等<sup>[4]</sup>用多媒体彩色图文分析系统对移植心肌组织 ICAM-1 的表达进行定量检测,发现在排斥反应期间移植心脏毛细血管内皮细胞 ICAM-1 表达强度和数量明显增加,比普通组织病理学检查提早 2~3d 发现排斥反应。用霉酚酸酯治疗的移植心脏和未移植心脏仅微弱表达 ICAM-1。心肌组织 ICAM-1 的表达水平与排斥反应的发生和发展有关。

1.4 B7:CD<sub>28</sub>/T 淋巴细胞相关抗原 4( B7:CD<sub>28</sub>/CTLA4) 共刺激信号系统 在器官移植的排斥反应中,T 细胞的激活必须接受 APC 递呈的双重信号。第一信号是由 APC 上 MHC 多肽复合物与 TCR/CD<sub>3</sub> 结合所产生,具有抗原特异性。第二信号是由 APC 上一组粘附分子所组成的协同刺激分子 B7 与 T 细胞上相应的受体结合所产生的非抗原特异的、非 MHC 限制的共刺激信号。第二信号为 T 细胞抗原特异性激活所必需,决定了 T 细胞增殖分化为效应细胞还是非反应状态或凋亡细胞。B7:CD<sub>28</sub>/CTLA4 是目前最主要的共刺激信号系统<sup>[5]</sup>。B7 分子包括 B7-1 ( CD<sub>80</sub>) 和 B7-2 ( CD<sub>86</sub>) ,均属于免疫球蛋白超家族成员,以单体形式表达于 APC 上。CD<sub>28</sub> 是 B7 的受体,主要表达在活化的 T 淋巴细胞上。B7 与 CD<sub>28</sub> 传递兴奋信号,而与 CTLA4 ( CD<sub>152</sub>) 结合则传递抑制信号<sup>[6]</sup>。B7 与 CD<sub>28</sub> 结合后,增加 IL-2 mRNA 的转录,使 IL-2 分泌增加,T 细胞大量增殖活化。阻断 B7 分子诱导受体免疫耐受,已成为降低心脏和其它血管移植排斥反应的一个新策略<sup>[7,8]</sup>。心脏移植后,受体的 APC 表达大量的 B7 并迁移至移植物的淋巴组织而参与排斥反应,检测心脏移植后受体外周血 B7 分子的变化可反映有无排斥反应及其程度。

1.5 CD<sub>40</sub>/CD<sub>40L</sub> CD<sub>40</sub>/CD<sub>40L</sub> 也是移植物特异性免疫应答过程中的另一对共刺激信号分子。CD<sub>40</sub> 表达在 APC 细胞上,而 CD<sub>40L</sub> ( 亦称 CD<sub>154</sub>) 则表达在活化的 T 细胞上。CD<sub>40</sub>/CD<sub>40L</sub> 在参与移植免疫排斥反

应中的作用机制与 B7:CD<sub>28</sub>/CTLA4 不同<sup>[9]</sup>,主要通过增殖 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 细胞而不是抑制 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T 细胞参与移植免疫排斥<sup>[10]</sup>。在异体心脏移植实验中,阻断 CD<sub>40</sub>/CD<sub>40L</sub> 通路,亦表现出良好的抗排斥反应效果<sup>[11]</sup>。因此检测外周血细胞中 CD<sub>40</sub> 和 CD<sub>40L</sub> 的表达,也可间接反映异体心脏移植排斥反应的程度。

## 2 体液介导的免疫排斥反应检测

2.1 白细胞介素( IL) Th<sub>1</sub> 分泌 IL-2、肿瘤坏死因子- $\alpha$  ( TNF- $\alpha$  ) 和  $\gamma$  -干扰素( IFN- $\gamma$  )、等促炎类因子,主要参与细胞免疫;Th<sub>2</sub> 细胞分泌 IL-4、5、6、9、10、13 等,主要参与体液免疫。正常情况下,Th<sub>1</sub> 和 Th<sub>2</sub> 细胞功能处于动态平衡之中。在同种异体移植中,Th<sub>1</sub> 细胞通过移植物抗原特异性的细胞毒性 T 细胞和迟发型超敏反应 T 细胞而上调,同时使 Th<sub>2</sub> 细胞功能下调,从而启动排斥反应<sup>[12]</sup>。因此,许多学者提出用 Th<sub>1</sub> 和 Th<sub>2</sub> 克隆分泌的细胞因子监测排斥反应。不论心脏移植或其他器官移植,移植后发生急性排斥反应者血浆 IL-2 和 sIL-2R 显著高于无急性排斥反应者。IL-4、5、6、10 等细胞因子在心脏移植急性排斥反应中的变化与其它器官移植有所不同。杨尚琪等<sup>[13]</sup>用 ELISA 法检测了大鼠异位心脏移植不同时间外周血 IL-4 和 IL-10 的变化,发现 IL-4、IL-10 的变化与排斥反应的进程有关。移植术后 5d,此时排斥反应为 2~3 级,IL-4、IL-10 升高达高峰,且 IL-10 升高更明显。当移植术后 7~11d,排斥反应加重达到 4 级,此时 IL-4、IL-10 水平显著下降。应用环孢菌素 A ( CsA ) 后,延缓了排斥反应的发生及 IL-4、IL-10 的升高。推测 IL-4、IL-10 可能在排斥反应的较早阶段发挥重要作用。移植早期 IL-10 高表达抑制了 Th<sub>1</sub> 类细胞因子的表达,CTL 所致的细胞破坏作用也被抑制,减轻了排斥反应<sup>[13]</sup>,后期由于 IL-10 消耗致使排斥反应加重。Mottram 等<sup>[14]</sup>用 IL-4 转基因小鼠做异体心脏移植,由于移植物中 IL-4 表达增多,而 IL-2、IFN- $\gamma$  表达下调,从而使移植心脏存活时间延长。故用 Th<sub>2</sub> 细胞克隆分泌的因子动态监测心脏排斥反应时,应结合术后时间考虑。

2.2 其它细胞因子 活化 T 细胞调节因子 ( RANTES) 和单核细胞趋化蛋白( MCP-1) 是  $\beta$  家属趋化因子成员,不仅具有趋化效应,还具有一系列调节单核和淋巴细胞生物学活性的免疫学特性,参与机体的免疫应答。血清 RANTES 浓度的动态变化与急性排斥反应的进程相关,峰值出现于排

斥反应早期。应用 CsA 后,峰值出现时间推迟,浓度显著下降。MCP-1 在术后 6h 及严重排斥反应时 2 次升高,应用 CsA 后第一峰出现推迟,但不影响其峰浓度,动态观察这两项指标,对诊断急性排斥反应及判断严重程度有帮助。TNF 是一类具有免疫调节功能的细胞因子,对机体免疫功能的影响是多方面的。有强烈排斥反应的大鼠血清 TNF $\alpha$  浓度明显升高,经 CsA 维持的轻、中度排斥反应者,TNF $\alpha$  浓度维持在相对低水平。因此,TNF $\alpha$  可作为监测排斥反应的一个有效指标。

### 3 免疫活化基因的检测

免疫活化基因是近年来器官移植领域提出的一个新概念。一般是指一些重要的细胞因子基因、T 细胞和 B 细胞活化和产生效应时所表达的特征性基因以及与免疫细胞生长调节和诱导凋亡有关的一些重要基因。在免疫细胞活化增殖和发挥效应的过程中,这些基因可同时或相继表达并介导重要的生理功能,可在一定程度上预示免疫反应的程度和转归。Xia 等<sup>[15]</sup>用实时 PCR 技术检测大鼠心脏移植后心肌组织 IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 及 TGF $\beta$  的 mRNA 表达。正常心肌组织这些细胞因子 mRNA 的表达量的顺序为 TGF $\beta$  > IFN- $\gamma$  = IL-10 > IL-2 > IL-4。发生排斥反应时,上述细胞因子 mRNA 的表达发生变化,移植后 7d 无排斥反应者 IL-10mRNA 表达增强而 IFN- $\gamma$  mRNA 降低;60d 后 IL-10mRNA 降低而 IFN- $\gamma$  增加。供体抗原发生迟发性超敏反应者所致的排斥可引起多种细胞因子 mRNA 的变化,无反应者仅有 IL-4mRNA 的升高。Shulzhemko 等<sup>[16]</sup>用 RT-PCR 定量检测了 11 个心脏移植病人共 29 次心内膜活检标本的穿孔蛋白、颗粒酶 B 和 FasL 等细胞毒性 T 细胞效应分子的 mRNA,有排斥反应者这些效应分子的 mRNA 分别为 0.53、0.34 和 0.57,显著高于无排斥反应者(依次为 0.09、0 和 0.36)。在发生排斥反应前上述效应分子 mRNA 的表达也显著高于无排斥反应者。以 3 个效应分子中有 2 个升高为诊断标准,则有排斥反应者阳性率 100%,排斥反应前期为 92%。无排斥反应者为 36%。穿孔蛋白、颗粒酶 B 和 FasL 的检测可诊断排斥反应和预报即将发生的排斥反应。FasL 的上调引起细胞凋亡也可能是人心脏移植排斥反应的机制之一<sup>[17]</sup>。血红素氧合酶(HO)是血红素降解的起始酶和限速酶,体内存在三种形式,其中 HO-1 为诱

导型。HO-1 具有抗氧化损伤的作用,被认为是器官移植存活的关键性“保护基因”。Chok 等<sup>[18]</sup>发现人心脏移植活检标本中,有排斥反应者 HO-1mRNA 表达增加。在小鼠同种心脏移植模型中,发现 HO-1 主要表达在浸润的炎性细胞中,随排斥反应加重而表达增强。其机制可能为巨噬细胞吞噬破坏的红细胞和心肌细胞,诱导 HO-1 的表达,促进血红素代谢,产生具有生理活性的抗氧化代谢产物的同时,促使巨噬细胞凋亡,从而发挥其细胞保护作用。一氧化氮是由体内多种组织和细胞产生的免疫调节分子和生物信使分子,可以抑制 T 淋巴细胞的增殖,与移植急性排斥反应密切相关。Yu 等<sup>[19]</sup>以大鼠同种异位心脏移植为模型,发现急性排斥反应中移植心肌诱导型一氧化氮合酶基因 mRNA 表达早且表达水平显著升高,可作为心脏移植急性排斥反应早期的一个监测指标。

### 4 止血、凝血标志物的检测

心脏移植后,血液中的止血、凝血标志物会发生变化,如纤维蛋白原、抗凝血酶 III 升高,纤溶活性降低等。循环血液中处于静止状态下的血小板在各种理化因素作用下,使血小板内的颗粒膜糖蛋白和质膜糖蛋白迅速发生重排和构型变化而激活成为活化血小板。评价血小板活化最敏感的指标为 CD<sub>62</sub> $\alpha$  (亦称 P 选择素)和 CD<sub>63</sub>。Segal 等<sup>[20]</sup>对 35 例心脏移植病人 132 份血浆检测 P 选择素、纤维蛋白原、凝血酶片段 1、2(PF1、2)和 D-二聚体,并与心内膜、心肌活检对比。有排斥反应者 P 选择素和 PF1、2 也随之升高。P 选择素以 65ng/ml 为 Cut off 值,诊断排斥反应的灵敏度 82%,特异性 87%,阴性预期性 88%,诊断准确性 91%,P 选择素和 PF1、2 检测可诊断排斥反应及预测排斥程度,也可作为治疗排斥反应疗效的指标。

### 5 参考文献

- [1] Kuhn MA, Deming DD, Cephus CE, et al. Moderate acute rejection detected during annual catheterization in pediatric heart transplant recipients. J Heart Lung Transplant, 2003, 22: 276.
- [2] Heidecke CD, Hancock WW, Westerholt S, et al.  $\alpha\beta$ -T cell receptor-directed therapy in rat allograft recipient. Transplantation, 1996, 61: 948.
- [3] 宋光民, 宋惠民, 李德才, 等. 心脏移植大鼠外周血 T 细胞受



- (上接第960页)
- 体的研究. 中华实验外科杂志, 2000, 17(1): 86.
- [4] 龙刚, 王西墨, 陈实, 等. 大鼠心脏移植排斥反应时细胞间粘附分子-2的表达及霉酚酸酯对其的抑制作用. 中华器官移植杂志, 2001, 22(1): 33.
- [5] Im SH, Barcham D, Souroujon MC, et al. Role of tolergen conformation in induction of oral tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis. J Immunol, 2000, 165: 3599.
- [6] Masteler EL, Chuang E, Muller AC, et al. Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. J Immunol, 2000, 164: 5319.
- [7] Guillot C, Mathieu P, Coathalem H, et al. Tolerance to Cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA-4-Ig expression. J Immunol, 2000, 164: 5258.
- [8] Kirk AD, Tadaki DK, Celniker A, et al. Induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80 and CD86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non-human primates. Transplantation, 2001, 72: 377.
- [9] Bingaman AW, Ha J, Durham MM, et al. Analysis of the CD40 and CD28 Pathways on alloimmune responses by CD4<sup>+</sup> T cells in vivo. Transplantation, 2001, 72: 1256.
- [10] Guo Z, Meng L, Kim O, et al. CD8<sup>+</sup> T cell-Mediated rejection of intestinal allograft is resistant to inhibition of the CD40/CD134 Costimulatory pathway. Transplantation, 2001, 71: 1351.
- [11] Shimizu K, Schonbeck U, Mach F, et al. Host CD40 ligand deficiency induces long-term allograft survival and donor-specific tolerance in mouse cardiac transplantation but does not prevent graft arteriosclerosis. J Immunol, 2000, 165: 3506.
- [12] Ishido N, Matsuoka J, Matsuoka T, et al. Induction of donor specific hyporesponsiveness and prolongation of cardiac allograft survival by jejunal administration of donor splenocytes. Transplantation, 1999, 68: 1377.
- [13] 杨尚琪, 唐孝达, 顾晓, 等. Th<sub>2</sub>细胞因子在大鼠心脏移植排斥反应的变化. 中华血管移植杂志, 2001, 22: 351.
- [14] Mottram P, Murray LJ, Li YQ, et al. Effect of IL-4 deletion on cardiac allograft survival in the BALB/c to 129SvxC57BL/6 strain combination. Immunol Cell Biol, 1998, 76:563.
- [15] Xia D, Sanders A, Shan M, et al. Real-time polymerase chain reaction analysis reveals an evolution of cytokin mRNA production in allograft acceptor mice. Transplantation, 2001, 72: 907.
- [16] Shulzhenko N, Morgun A, Zheng XX, et al. Intragraft activation of genes encoding cytotoxic T lymphocyte effector molecules precedes the histological evidence of rejection in human cardiac transplantation. Transplantation, 2001, 72:1705.
- [17] Oh SI, Kim IW, Jung HC, et al. Correlation of FasL ligand expression with rejection status of transplanted heart in human. Transplantation, 2001, 71:906.
- [18] Chok MK, Senechal M, Dorent R, et al. Apoptosis and expression of heme oxygenase-1 in heart transplant recipients during acute rejection episodes. Transplant Proc, 2002, 34: 3239.
- [19] Yu CH, Shi R, Li TF, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase gene mRNA in acute allograft rejection of cardiac transplantation. China J Modern Med, 2004, 14:19.
- [20] Segal JB, Kasper EK, Rohde C, et al. Coagulation Markers predict cardiac Transplant rejection. Transplantation, 2001, 72:233.
- (收稿日期:2002-08-13)

## 前进中的宁波市鄞州区疾病预防控制中心

宁波市鄞州区疾病预防控制中心是在原鄞州区卫生防疫站基础上组建起来的,是集疾病预防与控制、卫生检测与评价、健康教育与促进、业务培训与指导、技术咨询与服务为一体的新型疾病预防控制中心。中心现有职工77人,专业技术人员60余人,其中中高级专业人员40余人。内设疾病防治科、卫生检测科、结核病防治科、健康教育科、检验科、中心办公室和医疗预防门诊部等五科一室一部。经过长期努力,疾病预防控制工作取得了显著的成绩。在本地区1984年消灭血吸虫病,1987年基本消灭疟疾,1995年消灭丝虫病和消除碘缺乏病,并获得全国县级一等站称号。1997年通过省计量认证,1998年通过档案管理国家二级认证,1999年通过卫生部九五寄生虫病防治规划评估,2000年通过国家实现消除碘缺乏病阶段目标评估。1986年起曾荣获省级文明防疫站、全国文明建设先进集体等多种荣誉称号。2001年又被评为市级文明单位。2004年通过了省职业卫生技术服务机构资质评审。

近年来中心不断深化改革,重点实施了科技兴防、可持续发展战略。先后购置和更新了气相色谱仪、原子吸收仪、液相色谱仪、全自动细菌鉴定仪、酶标分析仪等高精尖检测仪器。多次获省、市科技进步奖。2000年建立了卫生防疫信息网站。

中心认真贯彻“预防为主”方针,坚持“团结、务实、开拓、奋进”的精神,为全区人民健康、社会发展及经济建设服务。

中心主任:徐来荣 电话:0574-87338291 地址:宁波市江东区盘孟北路84弄12号 邮编:315100