论著

文章编号:1000-5404(2005)09-0892-03

PD-L1及其受体PD-1在急性肾移植排斥患者肾组织中的表达及意义

丁涵露,吴雄飞 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心肾内科,重庆 400038)

提 要:目的 了解急性肾移植排斥患者肾组织中PD-L1、PD-1的表达及PD-L1与PD-1、肾小管-间质病理损害程度的关系。**方法** 二步法免疫组化观察正常肾和急性肾移植排斥患者肾组织PD-L1、PD-1的表达,以及PD-L1阳性强度与小管-间质PD-1阳性细胞数、小管-间质病理损害程度的关系。**结果** 急性肾移植排斥肾组织表达PD-L1、PD-1较正常组增多、增强;其小管PD-L1阳性强度与肾间质PD-1阳性细胞数呈正相关,与小管-间质病理损害程度呈负相关。**结论** PD-L1-PD-1信号通路在急性肾移植排斥肾小管-间质病理损害中起重要作用。

关键词:急性肾移植排斥;PD-L1;PD-1

中图法分类号:R392.13;R617;R692.02 **文献标识码**:A

Expression and significance of programmed death ligand-1 and programmed death-1 in the renal tissues following acute rejection after kidney transplantation

DING Han-lu, WU Xiong-fei (Department of Kidney, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of PD-L1 in the pathogenesis of acute allograft rejection (AR) and its correlation with PD-1 and the degree of tubulointerstitial lesions. **Methods** A total of 20 patients admitted by our hospital and Daping hospital from 1999 to 2003 were included, 12 male and 8 female, aged 18 – 40 years old (average 32.2 ± 4.5). All of them were diagnosed as acute rejection by renal biopsy. Fifteen specimens from the mismatched donor kidney and the normal tissues from the resected kidney served as normal control. Immunohistochemistry was used to detect the expression of PD-L1 and PD-1 in renal tissues of AR and normal control. **Results** Both PD-L1 and PD-1 expression were significantly higher in AR than that in normal control. The intensity of PD-L1 positive in renal tissues of AR showed a positive correlation with PD-1 expression and a negative correlation with the degree of tubulointerstitial lesions. **Conclusion** Increased expression of PD-L1 and PD-1 in renal tissues of AR has an important effect on the degree of tubulointerstitial lesions.

Key words: acut allograft rejection; PD-L1; PD-1

急性肾移植排斥反应(acute allograft rejection, AR)是影响肾移植患者术后生存的重要原因之一,其主要的病理特点是肾小管-间质水肿、充血、出血,T、B淋巴细胞、单核细胞浸润。T细胞在肾小管-间质的浸润是肾移植急性排斥反应的共同病理表现,活化的T细胞通过释放多种细胞因子参与肾间质损害,因此明确抑制T细胞的激活机制对进一步了解AR肾间质损害的发病机制和治疗有重要意义。已知抗原特异性T细胞的活化需要两个不同的信号,第一信号来自抗原肽-MHC分子组成的复合物与T细胞受体(TCR)的相互作用;第二信号由抗原递呈细胞(APC)表面表达的协同刺激分子传递给T细胞[1]。近端肾小管上皮细胞既是T细胞作用的靶细胞,也是调控T细胞活性的一种非经典的抗原递呈细胞,在一定条件下可表达MHC Ⅱ分子[2],但表达协同刺激分子的研究尚少。

新近报道,在众多的共刺激信号中,共刺激分子PD-L1(programmed death ligand-1)与其受体PD-1(programmed death-1)结合后,通过PD-1胞质区的两个酪氨酸残基与下游的信号分子作用而发挥对初次免疫应答和记忆性、效应性T细胞功能的负性调控[3],但PD-1-PD-L1在AR肾组织中的表达目前尚少见国内外报道,故本研究拟观察AR肾组织中PD-1-PD-L1的表达,以探讨AR肾小管-间质损伤与PD-L1-PD-1信号通路的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 试验组 20例患者均为1999 – 2003年我院和大坪医

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400214)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400214)

作者简介:丁涵露(1970 –),女,山东省日照市人,硕士,主治医师,主要从事慢性肾小球肾炎的发病机制及治疗方面的研究,发表论文6篇。现在大坪医院野战外科研究所肾内科。电话:(023)68757446
通讯作者:吴雄飞,电话:(023)68754188

收稿日期:2004-09-02;修回日期:2005-03-22

院住院患者，男性 12 例，女性 8 例，平均年龄(32.2 ± 4.5)岁，均经肾活检组织病理检查，以 Banff 分类法确诊为 AR。

1.1.2　对照组　　15 例，来自我院和大坪医院肾移植配型不合的供肾以及肾肿瘤做肾切术但远离肿瘤部位的肾组织，均经光镜证实肾组织正常。

1.2　材料与方法

1.2.1　材料　　小鼠抗人 PD-L1 单克隆抗体和小鼠抗人 PD-1 单克隆抗体，深圳达科为公司代理美国 Ebioscience 公司产品；PV9000 Immuno-Bridge$^+$ 二步法免疫组化试剂盒，美国 GBI 公司；DAB 显色试剂盒，北京中山公司。

1.2.2　PD-L1、PD-1 免疫组织化学染色　　石蜡切片 4 μm，行二步法免疫组化染色，常规脱蜡、水洗后，3% H_2O_2 室温 15 min，PD-L1 行胃酶修复，PD-1 行枸橼酸盐微波修复，分别滴加一抗：小鼠抗人 PD-L1 单克隆抗体和小鼠抗人 PD-1 单克隆抗(稀释比例均为 1∶50)，4 ℃过夜。次日 0.01 mol/L PBS 洗 5 min × 3 次后，即按照 PV9000 Immuno-Bridge$^+$ 二步法免疫组化试剂盒说明书进行操作，依次滴加增敏剂 37 ℃ 30 min，滴加二抗 37 ℃ 30 min，DAB 显色，苏木精复染细胞核。阴性对照以小鼠正常 IgG 代替一抗，同法操作。

1.2.3　肾小管-间质病理损害程度的判定[4]　　根据肾小管扩张程度、肾小管萎缩程度、肾小管上皮细胞空泡变性程度、肾小管上皮细胞坏死程度、间质纤维化程度及肾间质炎症细胞浸润程度的无、轻、中、重分别计 0、1、2、3，结果以每例样本的相加总和表示。

1.2.4　结果判断　　PD-L1、PD-1 免疫组化表达采用半定量法分析，由 3 人同时进行。根据它们在皮质肾组织中的染色强度分为 0～3 分，即 0 分：无染色；1 分：弱阳性；2 分：中度阳性；3 分：强阳性。

PD-1 表达观察：每例标本选取皮质肾小管-间质 10 个高倍视野(× 400)计数阳性细胞数。

1.3　统计学处理

PD-1 阳性细胞数以 $\bar{x} \pm s$ 表示，其余数据以等级资料表示，正常组与 AR 组的 PD-L1 阳性表达强度的比较，及正常组与 AR 组小管-间质病理损害程度的比较均采用非参数检验中两样本等级资料的 Mann-Whitney Test 方法。PD-L1 阳性表达强度与 PD-1 阳性细胞数、小管-间质病理损害程度的相关分析用 Spearman 等级相关分析。以 SPSS 10.0 统计软件处理数据。

2　结果

2.1　PD-L1 和 PD-1 在正常肾组织中的表达

正常肾组织中，近端肾小管上皮细胞、远端肾小管上皮细胞及集合管上皮细胞表达弱的 PD-L1(图 1、表 1)；肾小球及阴性对照未见 PD-L1 阳性染色。正常肾组织，未见 PD-1 表达。

2.2　PD-L1 和 PD-1 在 AR 肾组织中的表达

AR 肾组织，近端肾小管上皮细胞表达 PD-L1 较正常肾组织增高、增强(图 2、表 1)。免疫组化阳性染色颗粒位于肾小管上皮细胞胞质中，在远端肾小管上皮细胞、集合管上皮细胞亦有 PD-L1 的表达。肾小球及阴性对照未见 PD-L1 表达。

AR 肾组织中，在 PD-L1 表达阳性的近端肾小管上皮细胞周围，小管-间质淋巴细胞 PD-1 表达增高、增强(表 1、图 3)。肾小球及阴性对照未见 PD-1 阳性染色。

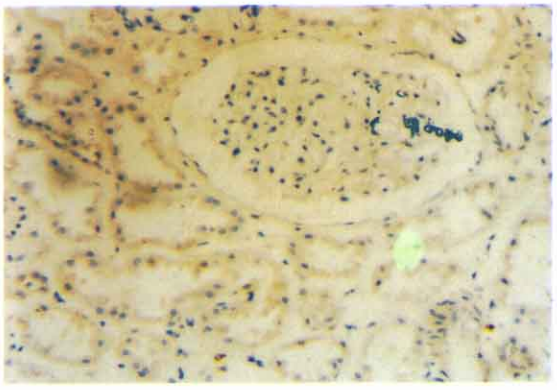


图 1　PD-L1 在正常肾组织中的表达　(免疫组化 × 200)

Fig 1　PD-L1 expression in normal kidney tissue　(Immunohistochemical staining × 200)

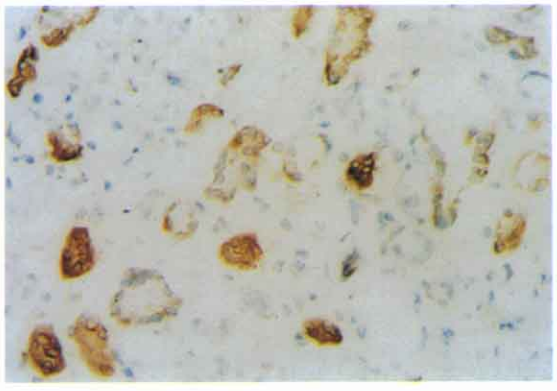


图 2　PD-L1 在 AR 肾组织中的表达增强　(免疫组化 × 200)

Fig 2　The enhanced PD-L1 expression in AR　(Immunohistochemical staining × 200)

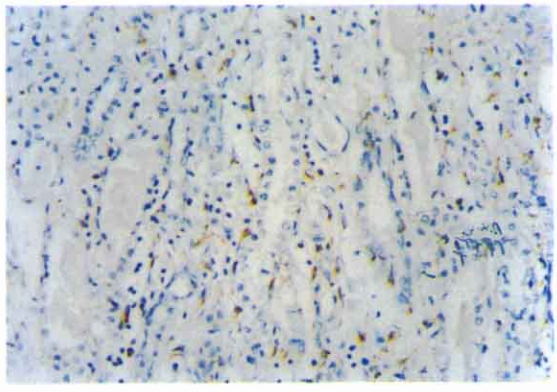


图 3　PD-1 在 AR 肾组织中的表达增强　(免疫组化 × 200)

Fig 3　The enhanced PD-1 expression in AR　(Immunohistochemical staining × 400)

2.3　PD-L1 表达与 AR 间质 PD-1$^+$ 细胞数、小管-间质病理损害程度相关分析

20 例 AR 患者肾小管-间质中均有不同程度 PD-1$^+$ 细胞浸润，近端肾小管上皮细胞 PD-L1 阳性表达强度与肾间质中

PD-1$^+$ 细胞的浸润量呈正相关($r = 0.723$, $P < 0.01$),与小管-间质病理损害程度呈负相关($r = -0.676$, $P < 0.01$)。

表1 皮质肾组织 PD-L1、PD-1 表达和小管-间质病理损害程度总积分

Tab 1 PD-L1 and PD-1 expression in renal tissues and degree of renal tubule interstitial lesions

Group	PD-L1$^+$ intensity tubule interstitial lesion		Degree of renal tubule interstitial lesion		PD-1$^+$
	Rank	n	Rank	n	
Normal ($n = 15$)					—
	0	2	0	2	
	1	10	1	10	
	2	2	2	3	
	3	1	3	0	
AR ($n = 20$)					5.37 ± 0.32
	1	2	5	5	
	2	5	6	7	
	3	13	7	8	

$P = 0.000$, PD-L1$^+$ intensity in AR group *vs* that in normal group; degree of renal tubule interstitial lesion in AR group *vs* that in normal group

3 讨论

在肾移植排斥反应发生过程中,当移植器官的血管接通后,供者及宿主的抗原递呈细胞携带抗原迁移到宿主的外周淋巴器官,通过直接或间接抗原呈递刺激启动 T 细胞活化和扩增。活化的效应 T 细胞在趋化因子作用下,又迁移到移植物局部,其在宿主体内的持续存在及活化,导致急性和慢性排斥反应。因此探讨效应性 T 细胞的活化机制对如何有效地抑制其在外周组织的应答、下调其介导的炎症和细胞效应,诱导和维持移植耐受,保护移植肾功能具有重要意义。

PD-L1 是 B7 家族的一员[5],其受体 PD-1 分子是免疫球蛋白超家族激活诱导的抑制性受体,PD-1 分子表达在激活的 T 细胞等淋巴细胞上。PD-1 通过其胞质区的两个酪氨酸残基与下游的信号分子作用而发挥对初次免疫应答和记忆性、效应性 T 淋巴细胞功能的负性调控[6],记忆性、效应性 T 淋巴细胞在 AR 肾小管-间质损害的发病中具有重要意义。

本研究首次表明 AR 的肾小管上皮细胞表达 PD-L1 较正常肾组织高,随着小管-间质损害的加重,其表达量下降,但仍较正常肾组织高, PD-1 作为 PD-L1 的受体,表达在病变组织 PD-L1 阳性的肾小管周围的间质淋巴细胞上,推测近端肾小管上皮细胞上的 PD-L1 有可能和 PD-1 相互结合,调控淋巴细胞的活性,正常肾组织中无 PD-1 表达,提示 PD-L1 可能有其他的受体存在。

在本研究中,病变肾组织中 PD-L1 表达的阳性强度和肾皮质小管-间质 PD-1 阳性细胞数成正相关,和小管-间质病理损害程度呈负性关系,推测在 AR 中 PD-L1-PD-1 表达增强,以抑制淋巴细胞的过度激活,维持 AR 的移植耐受,随着小管-间质损害的加重,PD-L1-PD-1 表达量下降,机制不明确。目前研究表明[7], PD-L1 对淋巴细胞激活的抑制作用依赖于 CD28、T 细胞受体(TCR)的强度,当高水平的 CD28 或 TCR 信号占优势时,可消除 PD-L1-PD-1 的抑制效应。因此,进一步明确近端肾小管上皮细胞上的 PD-L1 与表达 PD-1 的淋巴细胞的相互作用结果,以及上调 AR 近端肾小管上皮细胞 PD-L1 表达,可能有助于 AR 的治疗。

大多数体内外的研究表明,近端肾小管上皮细胞不表达经典的协同刺激分子 B7.1、B7.2[8],少数研究认为近端肾小管上皮细胞有 B7.1 的表达[9],最近表明近端肾小管上皮细胞可表达 CD40、B7RP-1 协同刺激分子,并在体外研究中显示,CD40、B7RP-1 分子可抑制 T 细胞的活性[10]。本研究显示,PD-L1-PD-1 信号通路在 AR 肾小管-间质病理损害中起重要作用,但人体内 T 细胞共刺激途径是多样化的,或许存在多条备选共刺激通路,进一步研究 PD-L1-PD-1 通路在 AR 发病中的作用及其作用机制,以及其它还未知共刺激通路的研究,将进一步深化我们对肾小管上皮细胞-淋巴细胞免疫应答的认识,为 AR 小管-间质损伤的治疗提供更好的策略。

参考文献:

[1] June C H, Bluestone J A, Nadler L M, *et al*. Thompson CB: The B7 and CD28 receptor families[J]. Immunol Today, 1994, 15(7): 321 - 331.

[2] Hagerty D T, Allen P M. Processing and presentation of self and foreign antigens by the renal proximal tubule[J]. J Immunol, 1992, 148(8): 2324 - 2330.

[3] Carreno B M, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20(1): 29 - 53.

[4] Austin H, Muenz L, Joyce K M, *et al*. Diffues proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome[J]. Kidney Int, 1984, 25(4): 689 - 695.

[5] Coyle A J, Gutierrez-Ramos J C. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function[J]. Nat Immonol, 2001, 2(3): 203 - 209.

[6] Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, *et al*. Expression of programmed death 1ligands by murine T cells and APC[J]. J Immunol, 2002, 169(10): 5538 - 5545.

[7] Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, *et al*. Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic interstinal inflammation[J]. J Immunol, 2003, 171(8): 4156 - 4163.

[8] Kinoshita K, Tesch G, Schwarting A, *et al*. Costimulation by B7-1 and B7-2 is required for autoimmune disease in MRL-Faslpr mice[J]. J Immunol, 2000, 164(11): 6046 - 6056.

[9] Banu N, Meyers C M. TGF-β1 down-regulates induced expression of both class Ⅱ MHC and B7-1 on primary murine renal tubular epithelial cells [J]. Kidney Int, 1999, 56(3): 985 - 994.

[10] Wahl P, Schoop R, Bilic G, *et al*. Renal tubular epithelial expression of the costimulatory molecule B7RP-1 (inducible costimulator ligand)[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(6): 1517 - 1526.

(编辑 张大春)