论著

文章编号:1000-5404(2008)14-1322-05

Kupffer 细胞 Fas 配体的表达及其对移植肝内淋巴细胞的杀伤作用

涂 兵[1],梁绍勇[1],陈 勇[1],龙飞伍[1],彭 勇[1],刘作金[1],徐明清[2],严律南[2],龚建平[1] ([1]重庆医科大学附属第二医院肝胆外科,重庆 400010;[2]四川大学华西医院肝移植中心,成都 610065)

摘 要:目的 观察移植肝脏中 Kupffer 细胞(KCs)和 T 淋巴细胞(T lymphocytes,TLCs)中 Fas、FasL 基因和蛋白的表达,以及 KCs 对侵入肝脏内的淋巴细胞的细胞毒性作用。**方法** 肝移植后 0、48 h 分离肝移植组、氯化钆($GdCl_3$)组动物肝脏的 KCs 和 TLCs,并对 TLCs 进一步分类;用 RT-PCR 法测定 KCs 和 TLCs 中 Fas、FasL 基因表达,用免疫组化、激光扫描共聚焦显微镜和 Western blot 蛋白印迹等方法测定 KCs 和 TLCs 中 Fas、FasL 蛋白质表达;观察不同培养条件下淋巴细胞凋亡与 KCs 的相互作用。**结果** $GdCl_3$组分离出的 KCs 显著少于肝移植组,淋巴细胞数量及 $CD8^+$ T 细胞显著多于肝移植组($P<0.05$),免疫组化和激光共聚焦显微镜显示 $GdCl_3$组 FasL 阳性 KCs 显著少于肝移植组($P<0.05$),2 组 Fas 阳性淋巴细胞无显著差异($P>0.05$);RT-PCR 和 Western blot 显示 KCs 中 FasL mRNA 及蛋白表达 $GdCl_3$组较弱($P<0.05$),2 组淋巴细胞中 Fas、FasL mRNA 无显著差异($P>0.05$)。$GdCl_3$组中分离出的 KCs 对 TLCs 杀伤率明显低于肝移植组($P<0.05$),抗 FasL 抗体对 KCs 杀伤力有抑制作用。**结论** KCs 能表达 FasL 蛋白,并通过 Fas、FasL 途径杀伤移植肝脏中的淋巴细胞,诱导移植肝脏产生免疫耐受。$GdCl_3$能阻止 KCs 中 FasL 基因和蛋白表达,抑制肝移植中免疫耐受的产生。

关键词: 肝移植; Kupffer 细胞; Fas、Fas 配体;免疫耐受; 淋巴细胞

中图法分类号: R392.4;R394.4;R657.3 **文献标识码:** A

Expression of Fas ligand protein in Kupffer cells and its role in inducing T cells apoptosis in rat liver graft

TU Bing[1], LIANG Shao-yong[1], CHEN Yong[1], LONG Fei-wu[1], PENG Yong[1], LIU Zuo-jin[1], XU Ming-qing[2], YAN Lu-nan[2], GONG Jian-ping[1] ([1] Department of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010; [2]Department of Hepatobiliary Surgery, West China Medical School, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: Objective To detect the expressions of Fas/FasL in Kupffer cells(KCs) and graft-infiltrating T lymphocytes (TLCs), and explore the role of KCs in induced-T cells apoptosis through Fas/FasL pathway. **Methods** Totally 112 male SD rats were randomized into 4 groups, that is, live transplantation group (28 donors and 28 recipients), and $GdCl_3$ pretreatment group (28 donors and 28 recipients). The donors of pretreatment group received intravenous injection of $GdCl_3$ at 10 mg/kg, and the donors of the other group was injected with the same volume of normal saline. Then liver transplantation was carried out with the modified two-step perfusion method. The recipients were killed immediately or 48 h after the operation. Isolated KCs and TLCs were counted and TLCs were classified using flow cytometry (FCM). Expression of FasL protein in KCs and TLCs was evaluated with immunocytochemical staining and laser scanning confocal microscopy (LSCM). mRNA and protein expression of Fas and FasL in KCs and TLCs were detected with RT-PCR and Western blot. The cytotoxicity of KCs against TLCs *via* Fas/FasL system and the effect of anti-FasL antibody in this process was assessed using ^3H thymidine release assays. **Results** Compared with the liver transplantation group, the counts of isolated KCs in $GdCl_3$ group were lower while the number of TLCs and $CD8^+$ T cell were significantly increased ($P<0.05$), and less FasL-positive KCs and more Fas-positive TLCs were detected ($P<0.05$). Expression of FasL mRNA and its protein in KCs was decreased ($P<0.05$), but expression of Fas mRNA and

基金项目: 国家自然科学基金(30471696,30500473)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30471696,30500473)

作者简介: 涂 兵,男,重庆市人,博士,副教授,主要从事肝胆疾病及肝移植的临床与研究方面的研究。电话:(023)63784175,E-mail:bing_tu@163.com

通信作者: 龚建平,E-mail:gongjianping11@hotmail.com

收稿日期: 2007-10-23;**修回日期:** 2007-12-17

its protein in TLCs had no significant difference. An 18-hour ^{3}H thymidine release assay showed that in 48 h after transplantation, KCs isolated from the liver transplantation group induced more TLCs than those from $GdCl_3$ group. The KCs-mediated killing of TLCs was significantly inhibited by treatment of anti-fasL antibody. **Conclusion** KCs-mediated TLCs killing induces liver transplantation tolerance *via* the Fas/FasL pathway. $GdCl_3$ suppresses expression of FasL in KCs and blocks the induction of liver graft tolerance.

Key words: orthotopic liver transplantation; Kupffer cell; Fas/Fas ligand; immune tolerance; lymphocyte

既往研究表明大鼠移植肝脏中有大量凋亡的淋巴细胞存在[1],作为抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APCs),Kupffer 细胞(KCs)对移植肝内的淋巴细胞具有杀伤能力,在肝脏内免疫抑制和免疫耐受诱导中可能起重要作用。然而,目前尚不清楚肝脏移植后,供肝 KCs 与受体淋巴细胞中 Fas、FasL 的表达及其相互作用关系。本研究在建立肝移植动物模型基础上,分离出 KCs 和 T 淋巴细胞(T lymphocytes,TLCs),观察 KCs、TLCs 上 Fas、FasL 的表达,探讨 KCs 诱导 TLCs 凋亡的机制[2]。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

Ⅳ型胶原酶、Percoll(Sigma,美国),RPMI1640 培养基和 D-Hanks 液(HyClone 公司),兔抗大鼠 Fas 和 FasL 多克隆抗体、羊抗大鼠 CD14 多克隆抗体(Santa Cruz, 美国),兔抗羊 S-P 试剂盒、FITC 标记羊抗兔 IgG(北京中山公司),*In Vivo* Gene SHUTTLE™(深圳晶美公司),AMV 逆转录酶、Oligo(dT15)引物、Tripure™分离试剂、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、RNase Inhibitor(Promega,美国);腹部外科手术器械,显微外科手术器械(SSW-3 型,上海手术器件厂),8/0 医用无损伤缝合线(上海医用缝合针厂);超净工作台(苏州净化设备厂),CO_2 孵箱(Forma,美国),TGL-16G 台式高速离心机(上海),JZ-21 高速冷冻离心机(Beckman,美国)。

1.2　SD 大鼠肝移植动物模型的建立

按 Kapatma[3]改良二袖套法进行,略作改良。供、受体均为健康雄性 SD 大鼠,10 ~ 12 周龄,体质量 220 ~ 250 g,均购自重庆医科大学实验动物中心。将 112 只雄性健康大鼠按随机数字表法分为 4 组:肝移植组(28 只)和氯化钆($GdCl_3$)预处理组(28 只)以及肝移植组供体组(28 只)和 $GdCl_3$ 预处理供体组(28 只)。对肝移植组和 $GdCl_3$ 预处理分别于术后 0 h 和 48 h 活杀并取肝脏进行各项指标检测。$GdCl_3$ 供体组:术前 24 h 将 $GdCl_3$ 1 g 放入 0.9% 的生理盐水 100 ml 配置 1% $GdCl_3$ 溶液(pH = 7.4),并按 10 mg/kg 在乙醚麻醉下经大鼠尾静脉注入:肝移植组供体组则以相同的方式接受相同数量的生理盐水。

1.3　肝脏非实质细胞(liver nonparenchymal cell, NPC)的分离和培养

参照文献[4]方法分离肝 NPC 悬液:大鼠分别于肝移植术后 0 h 和 48 h,乙醚吸入麻醉后固定,胸腹部皮肤消毒,打开腹腔后更换器件,用 2 ml 0.05% Ⅳ型胶原酶灌注肝脏后,切下肝脏移入玻璃皿中,经门静脉插管循环灌入 20 ml 0.05% Ⅳ型胶原酶 20 min,待肝脏韧性消失,压迫肝组织下陷至不易恢复时,剪开肝包膜释放出肝细胞悬液,Hanks 液终止消化。200 目过滤网过滤,加入 20 ml RPMI1640 培养基液制成混合肝脏细胞悬液,50 × *g* 离心 2 min 后将成团的肝实质细胞(hepatocytes, HC)与 NPC 分开。获得的含 NPC 的细胞悬液 300 × *g* 离心 10 min,取 NPC 悬液放入 80% Percoll 液中 600 × *g* 离心 10 min,收集不同层的细胞,其中 25% ~50% 层为 KCs,50% ~70% 层为 TLCs。RPMI1640 洗涤 3 次,用台盼蓝染色确定 KCs 和 TLCs 的活力分别是 98% 和 95%,2 种细胞的纯度分别为 92% 和 90%。

1.4　分离细胞的计数

用抗 CD14、抗 CD4 和抗 CD8 抗体分别对 KCs 和 TLCs 进行染色,用流式细胞仪(flow cytometry,FCM)对各种细胞进行计数,计算 10 000 个细胞中阳性细胞数。

1.5　TUNEL 分析 TLCs 凋亡

用 TUNEL 法对分离的 TLCs 进行染色。磷酸盐缓冲液冲洗细胞 2 次后,在常温下用 4% paraformaldehyde 固定 30 min,再用磷酸盐缓冲液冲洗 5 min,然后按细胞凋亡试剂盒说明进行染色,用 FCM 测定阳性细胞核的数目并判断凋亡细胞所占的百分比。

1.6　免疫组化测定 KCs 中 FasL 蛋白的表达

用免疫组化法(S-P 法)对 KCs 进行染色,具体方法参照试剂盒说明书进行,用光镜观察 FasL 阳性细胞。

1.7　激光扫描共聚焦显微镜测定 KCs 和 TLCs 中 Fas、FasL 蛋白的表达

分离、培养和处理细胞,使其贴附于盖载玻片上;4% 多聚甲醛固定细胞;用 0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次;将盖玻片放入含一抗(1∶250)的玻璃培养皿中,37℃放置 1 h;取出盖玻片,用 PBS 洗涤 3 次,每次 2 min;再将盖玻片放入含 FITC 标记的 IgG 二抗(1∶100)的玻璃培养皿中,37 ℃放置 30 min;取出盖玻片,再用 PBS 洗涤 3 次,每次 2 min;上机测试,分析结果。

1.8　RT-PCR 检测 KCs 和 TLCs 中 Fas、FasL 基因表达

为了测定 KCs 和 TLCs 中 Fas、FasL mRNA 的表达,分别从不同细胞中提取总 RNA。总 RNA 提取和 cDNA 合成按试剂盒标准步骤操作,PCR 扩增:cDNA 10 μl,10 mmol/L dNTP 2 μl,引物混合物 1 μl,10 × PCR 缓冲液 2.5 μl,Mg^{2+} 2.5 μl,DEPC 双蒸水 7 μl,*Taq* 酶 1 μl。PCR 循环:94 ℃变性 40 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共循环 32 次,最后 72℃延伸 10 min。用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物,EB 染色,将电泳凝胶置于 Gel Doc 2000 凝胶图像分析系统,采用 Version 4.0 软件分析处理,测定扩增片断产物含量,PCR 产物量以光密度 × 面积表示。

1.9 Western blot 测定 KCs 和 TLCs 中 Fas、FasL 蛋白的表达

取分离的细胞在裂解液中溶解;聚丙烯酰胺凝胶电脉后取下凝胶进行电转印;用抗 Fas、FasL 抗体染色和显色;结果用 Gel Doc 2000 凝胶成像系统对目的条带进行密度分析,蛋白含量以相对光密度(ROD)×面积(mm^2)表示。

1.10 KCs 杀伤淋巴细胞能力测定

按 Sun 等[5]介绍的方法,通过测定^{3}H-胸腺嘧啶脱氧核苷(胸苷)释放确定 KCs 对淋巴细胞的杀伤能力。主要步骤为将 TLCs(细胞数 5×10^6 ml^{-1})与^{3}H-胸苷在 RPMI 中共同孵育 12 h,清洗 3 次后,将^{3}H-胸苷标记的 TCLs(作为靶细胞,细胞数 2×10^5 ml^{-1})与 KCs(效应细胞)在 96 孔培养板中共同培养 18 h,效应细胞(E)与靶细胞(T)的比例分别为 1∶1、5∶1和 10∶1。收集细胞,清洗 3 次,用 β 液体闪烁计数仪测定其放射性强度,并根据下列公式计算出胸苷释放的百分率(即细胞杀伤率)。

胸苷释放率(%)=[cpm(无效应细胞)-cpm(有效应细胞)]/cpm(无效应细胞)×100%

1.11 抗 FasL 抗体对 KCs 杀伤力的抑制作用

为了观察抗 FasL 抗体对 KCs 杀伤 TLCs 能力的抑制作用,将抗 FasL 抗体浓度按 0、1、10、100 μg/ml 分别加入 KCs 与 TLCs 的共同培养液中,KCs 与 TLCs 细胞数分别为 2×10^6 ml^{-1} 和 2×10^5 ml^{-1}(E∶T 为10∶1)。共同培养 18 h 后,通过测定^{3}H-胸苷释放率确定抗 FasL 抗体对 KCs 杀伤力的抑制作用。

1.12 统计学处理

采用统计学软件 SPSS 10.0 对 2 组间均数的比较进行独立样本 t 检验,等级资料采用非参数检验进行分析。

2 结果

2.1 移植肝内 KCs 和 TLCs 数量统计

在 0 h, KCs 和 TLCs 的数量分别为 1.5×10^7/g 和 2.3×10^7/g。在肝移植组术后 48 h,2 种细胞的数量分别为 4.9×10^7/g 和 5.2×10^7/g,各增加了约 3.3 倍和 2.3 倍。$GdCl_3$组术后 48 h,2 种细胞的数量分别为 2.1×10^7/g 和 6.5×10^7/g,各自增加了 1.4 倍和 2.8 倍。48 h 肝移植组 KCs 数量明显大于 $GdCl_3$组($P<0.05$),而 $GdCl_3$组 TLCs 的数量显著大于肝移植组($P<0.05$)。

进一步将淋巴细胞用 FCM 分型发现肝移植组 TLCs 中 53% 为 $CD4^+$T 细胞,25.5% 为 $CD8^+$T 细胞,($CD4^+$T 细胞)/($CD8^+$T 细胞)=2.08。$GdCl_3$组 TLCs 中 45% 为 $CD4^+$T 细胞,42.5% 为 $CD8^+$T 细胞,($CD4^+$T 细胞)/($CD8^+$T 细胞)=1.06。提示肝移植组肝脏内 T 细胞以 $CD4^+$细胞为主,而 $GdCl_3$组肝脏内 T 细胞中 $CD8^+$细胞占的百分比明显增多($P<0.05$)。

2.2 KCs 中 FasL 蛋白免疫组化染色

细胞免疫组化染色显示,在 0 h,2 组 KCs 中 FasL 免疫组化染色为阴性,但肝移植组手术 48 h 后绝大多数 KCs 中 FasL 染色为阳性,而 $GdCl_3$组仅部分 KCs 的 FasL 染色呈弱阳性。提示肝移植 48 h 能诱导 KCs 的 FasL 蛋白表达,$GdCl_3$可部分阻断 KCs 中 FasL 蛋白表达。

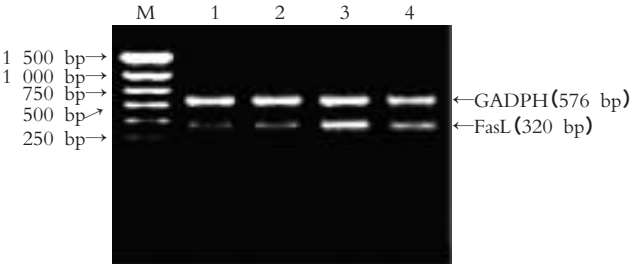
2.3 激光扫描共聚焦显微镜观察结果

用激光扫描共聚焦显微镜测定 KCs 中 FasL 的表达,发现 0 h,2 组 KCs 几乎为阴性,肝移植组 48 h KCs 中 FasL 染色为强阳性,表现为细胞膜、细胞质和细胞核着色;$GdCl_3$组 48 h 部分 KCs 染色弱阳性。

用激光扫描共聚焦显微镜测定 TLCs 中 Fas 的表达,发现 0 h,2 组 TLCs 为阴性,48 h,2 组 TLCs 中 Fas 染色为强阳性,表现为胞膜着色。

2.4 KCs 中 Fas、FasL 基因表达

用 RT-PCR 技术测定 2 组 KCs 中 FasL mRNA 的表达,发现 0 h,2 组少量表达 FasL mRNA,肝移植组和 $GdCl_3$组含量分别为 2.71 和 2.39。48 h 肝移植组 KCs 中 FasL mRNA 含量为 9.78,而 $GdCl_3$组为 5.01,肝移植组表达明显高于 $GdCl_3$组($P<0.05$,图 1);2 组 KCs 中均不表达 Fas mRNA。

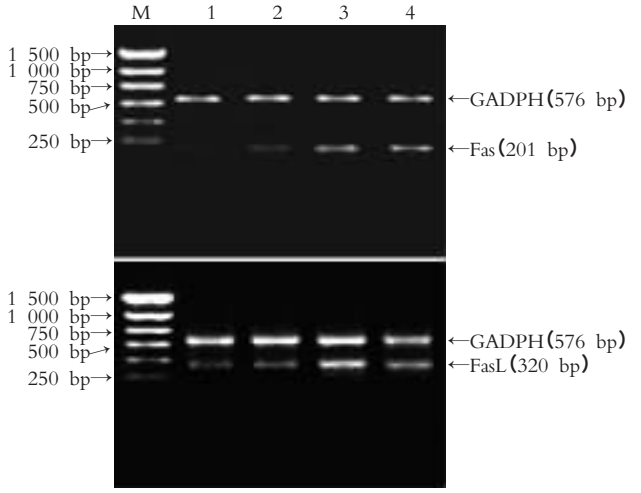


M:DNA 标准;1:0 h 肝移植组;2: 0 h $GdCl_3$组;3:48 h 肝移植组;4: 48 h $GdCl_3$组

图 1 RT-PCR 测定 KCs 中 FasL mRNA 的表达

2.5 TLCs 中 Fas、FasL 基因表达

用 RT-PCR 测定 2 组 TLCs 中 Fas、FasL mRNA 的表达,发现 0 h,2 组少量表达 Fas mRNA 和 FasL mRNA。48 h 肝移植组和 $GdCl_3$组 TLCs 中 Fas mRNA 的表达均明显增强,分别为 7.93 和 7.81,2 组 TLCs 中 FasL mRNA 均有表达,分别为 3.92 和 4.01,但 2 组比较无显著差异($P>0.05$,图 2)。提示 $GdCl_3$不影响 TLCs 中 Fas、FasL 基因的表达。

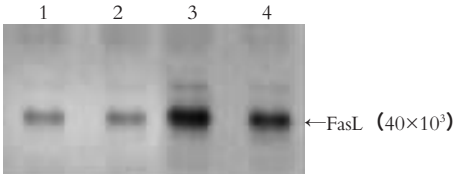


M:DNA 标准;1: 0 h 肝移植组;2: 0 h $GdCl_3$组;3: 48 h 肝移植组;4: 48 h $GdCl_3$组

图 2 RT-PCR 检测 TLCs 中 Fas、FasL mRNA 表达

2.6　KCs 中 FasL 蛋白的表达

用 Western blot 测定 2 组 KCs 中 FasL 蛋白的表达,发现 0 h,2 组少量表达 FasL 蛋白,48 h 肝移植组 KCs 中 FasL 蛋白比 0 h 增高至 5 倍,为 23.59,$GdCl_3$ 组中有一定量 FasL 蛋白表达,其含量为 13.78,48 h 2 组比较有显著差异($P<0.05$,图 3)。

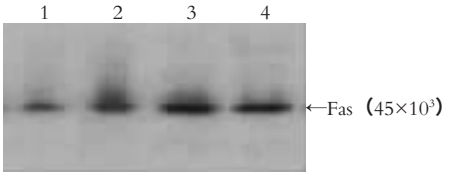


1:0 h 肝移植组;2:0 h $GdCl_3$ 组;3:48 h 肝移植组;4:48 h $GdCl_3$ 组

图 3　Western blot 测定 KCs 中 FasL 蛋白的表达

2.7　TLCs 中 Fas 蛋白的表达

用 Western blot 测定 2 组 TLCs 中 Fas 蛋白的表达,发现 0 h,2 组少量表达 Fas 蛋白,肝移植组和 $GdCl_3$ 组分别为 6.72 和 6.91;48 h 肝移植组和 $GdCl_3$ 组 TLCs 中 Fas 蛋白的表达均有明显增强,分别为 20.13 和 19.74,较 0 h 增加 2.5 ~ 3.5 倍,与 0 h 比较 2 组均有显著差异($P<0.05$,图 4)。



1:0 h 肝移植组; 2:0 h $GdCl_3$ 组 ; 3:48 h 肝移植组; 4:48 h $GdCl_3$ 组

图 4　Western blot 测定 TLCs 中 Fas 蛋白的表达

2.8　KCs 杀伤淋巴细胞能力测定

肝移植 48 h 后获得的 KCs 和 TLCs 按不同 E∶T 比例培养 18 h,测定 ^{3}H-胸苷释放率,发现肝移植组 KCs 对 TLCs 杀伤率明显高于 $GdCl_3$ 组($P<0.05$)。

2.9　抗 FasL 抗体对 KCs 杀伤力的抑制作用

观察抗 FasL 抗体不同浓度对 KCs 杀伤 TLCs 能力的抑制作用,在 KCs 与 TLCs 细胞数分别为 2×10^6 ml^{-1} 和 2×10^5 ml^{-1} (E∶T 为10∶1)的条件下,测定 ^{3}H-胸苷释放率,确定抗 FasL 抗体对 KCs 杀伤力的抑制作用。发现随着抗 FasL 抗体浓度增加,对 KCs 杀伤力的抑制作用也明显增加 ($P<0.05$),表明 KCs 通过 Fas、FasL 途径杀伤 TLCs。

3　讨论

Fas(Apo-1/CD95)是肿瘤坏死因子(TNF)受体家族成员之一,通过 Fas 配体(FasL)诱导表达 Fas 的细胞发生凋亡,对调节免疫反应、清除恶性肿瘤及细胞凋亡起重要作用[4,5]。FasL 主要存在于细胞表面,可以转导 TLCs 的共刺激信号,是活化 TLCs 发生凋亡的有效诱导剂,能诱导局部组织或器官产生免疫特惠现象。除眼前房和睾丸 Sertoli 细胞外,FasL 也能在肝血窦诱导免疫特惠现象发生[6-10]。

近年来,有关 TLCs 中 Fas、FasL 的研究成为移植免疫学研究的热点。现已证实,在免疫反应时,Fas、FasL 对活化 TLCs 外周耗竭起重要作用。Fas、FasL 不仅赋予 TLCs 细胞毒性作用,也可作用于 TLCs 本身,下调其免疫反应。其主要机制是通过激活诱导的细胞死亡来维持活性与非活性 TLCs 的平衡。本研究显示在同种异体肝移植免疫耐受中,移植肝脏内浸润 TLCs 既能表达 Fas,又能表达 FasL,$GdCl_3$ 对 TLCs 中 Fas、FasL 的表达不产生影响。我们认为,TLCs 作为免疫活性细胞,既能表达 Fas 受体,又能表达 FasL,并通过 Fas、FasL 系统保持 TLCs 各亚型之间的平衡。

除 Fas 和 FasL 的自分泌作用能导致活化 T 细胞凋亡、维持肝外 TLCs 耐受外,FasL 与淋巴细胞的旁分泌作用在维持机体耐受中也起重要作用。由于 FasL 能通过诱导 TLCs 凋亡防止移植器官中发生排斥反应,产生局部免疫耐受,Zhang 等[11] 用表达 FasL 的 APC 细胞处理 H-2k 小鼠,能诱导特异性 T 细胞对同种异体抗原的无反应性,用表达 FasL 的 H-2Db/H-Y APC 处理 H-2Db/H-Y TCR 转基因小鼠,也能诱导 T 对 H-Y 抗原特异性无反应。诱导 T 细胞耐受需要 APC 表达 FasL 和 T 细胞表达 Fas,但这种耐受限于对 APC 提呈的抗原,其机制是表达 FasL 的 APC 介导抗原特异性 T 细胞克隆缺失所致。我们认为,KCs 作为 APC,能表达 FasL 并将抗原提呈给 T 细胞时促使 T 细胞凋亡,诱导肝脏免疫耐受。本研究显示,肝移植能诱导 KCs 表达具有生理功能的 FasL($GdCl_3$ 能抑制 KCs 的 FasL 基因和蛋白的表达),同时又能诱导 TLCs 表达相应受体,促使 TLCs 凋亡,而这一诱导作用能被相应抗 FasL 抗体阻断,提示 KCs 介导 TLCs 的凋亡可通过 Fas/FasL 途径完成。

尽管 KCs 表达 FasL 在诱导死亡信号中的作用尚不完全清楚,已有的资料显示 KCs 可能通过以下途径介导 TLCs 凋亡:①KCs 与 TLCs 之间的直接作用能影响抗原特异性免疫反应。②TLCs 特异性反应需要抗原递呈细胞参加,而 KCs 刚好具有此种功能。KCs 具有处理和递呈 Ⅱ 类 MHC-抗原复合体的能力,促使 TLCs 活化和凋亡。③T 细胞受体-MHC 交链(cross-linking)能诱导 TLCs 激活并过度表达 Fas,这使 TLCs 对 Fas、FasL 介导的凋亡更加敏感,这种现象被称为激活诱导的细胞死亡(activation-induced cell death, AICD)。KCs 既可参与特异性 T 细胞的克隆,又可诱导其凋亡而将其清除。

目前,不同亚型 TLCs、特别是 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞在肝移植免疫反应中的作用已受到人们的普遍关注。已证实,Th1 细胞能产生 IFN-γ 和 IL-2,而 Th2 细胞分泌 IL-4,而后者能下调免疫反应、诱导免疫耐受。

$CD4^+T$ 辅助细胞在免疫反应期间具有多种调节功能，主要分泌 Th2 型细胞因子诱导免疫耐受。本研究显示，肝移植组（$CD4^+T$ 细胞）/（$CD8^+T$ 细胞）的比值明显较 $GdCl_3$ 组增高，表明 $CD4^+T$ 细胞增多和（或）$CD8^+T$ 细胞相对或绝对数减少。耐受肝脏中大多数 TLCs 可能为 $CD4^+T$ 细胞，表明 $CD4^+T$ 细胞与免疫耐受有关。但是 $CD4^+T$ 细胞增多是肝脏免疫耐受的原因还是结果尚不清楚，有待进一步研究。

总之，本研究从移植肝脏中分离出 KCs 和 TLCs，测定 2 种细胞中 Fas、FasL 基因和相应蛋白质的表达，并观察 2 种细胞的相互作用，发现移植肝脏中 KCs 和 TLCs 数量明显增多，TLCs 中以 $CD4^+T$ 细胞增多为主。KCs 能表达 FasL 蛋白，并通过 Fas、FasL 途径杀伤移植肝脏中的淋巴细胞，诱导移植肝脏产生免疫耐受。$GdCl_3$ 能阻止 KCs FasL 基因和蛋白表达，抑制肝移植中免疫耐受的产生。因此，通过不同方法诱导 KCs 表达 FasL、调节肝脏中归巢的 TLCs 的不同亚型的比例，可能是促使移植肝脏产生免疫耐受的一种新的治疗策略。

参考文献：

[1] Sharland A, Shastry S, Wang C, *et al*. Kinetics of intragraft cytokine expression, cellular infiltration, and cell death in rejection of renal allografts compared with acceptance of liver allografts in a rat model: early activation and apoptosis is associated with liver graft acceptance[J]. Transplantation, 1998, 65(10): 1370 - 1377.

[2] 丁 雄，王梦远，刘作金，等. Kupffer 细胞在原发性肝细胞癌患者肝脏中的分布及意义[J]. 第三军医大学学报，2007，29(11)：1076 - 1078.

[3] Kamada N, Calne R Y. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage [J]. Transplantation, 1979, 28(1): 47 - 50.

[4] Gong J P, Wu C X, Liu C A, *et al*. Intestinal damage mediated by Kupffer cells in rats with endotoxemia[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(5): 923 - 927.

[5] Sun Z L, Wada T, Uchikura K, *et al*. Role of Fas/Fasl in Kupffer cell-dependent deletion of alloantigen activated T cells following liver transplantation[J]. Transplant Proc, 2001, 33(1 - 2): 279 - 282.

[6] Whiteside T L. The role of death receptor ligands in shaping tumor microenvironment[J]. Immunol Invest, 2007, 36(1): 25 - 46.

[7] Wada A, Tada Y, Kawamura K, *et al*. The effects of FasL on inflammation and tumor survival are dependent on its expression levels[J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14(3): 262 - 267.

[8] Onoe T, Ohdan H, Tokita D, *et al*. Liver sinusoidal endothelial cells have a capacity for inducing nonresponsiveness of T cells across major histocompatibility complex barriers[J]. Transpl Int, 2005, 18(2): 206 - 214.

[9] Onoe T, Ohdan H, Tokita D, *et al*. Liver sinusoidal endothelial cells tolerize T cells across MHC barriers in mice[J]. J Immunol, 2005, 175 (1): 139 - 146.

[10] Mita A, Hashikura Y, Tagawa Y, *et al*. Expression of Fas ligand by hepatic macrophages in patients with fulminant hepatic failure[J]. Am J Gastroenterol, 2005, 100 (11): 2551 - 2559.

[11] Zhang H G, Su X, Liu D, *et al*. Induction of specific T cell tolerance by Fas ligand-expressing antigen-presenting cells[J]. J Immunol, 1999, 162(3): 1423 - 1430.

（编辑 张 维）

医学科技论文中“渗透浓度”和“渗透压”的正确表述

半透膜隔开的有浓度差别的溶液，其溶剂通过半透膜由低浓度溶液向高浓度溶液扩散的现象称为渗透（osmose）；为维持溶液与纯溶剂之间的渗透平衡而需要的超额压力称为渗透压（osmotic pressure），其量的符号为 π。国际纯粹化学和应用化学联合会（IUPAC）临床化学部和国际临床化学联合会推荐，在临床化学中使用渗透质量摩尔浓度和渗透体积摩尔浓度两个量，单位分别是 mol/kg 和 mol/L。过去常用的单位（mOsm/L、mOsm/kg、mOsm/kg H_2O 等）尽管沿用已久，影响深远，但均属于非法定单位，应予以废除。法定单位与习用单位之间换算系数均为 1，即 1 mOsm/L = 1 mol/L；1 mOsm/kg = 1 mmol/L；1 mOsm/kg H_2O = 1 mmol/L。

渗透压是一种特殊形式的压强，所以其国际单位（SI）与压强相同——“帕斯卡”（pascal），国际符号为 Pa，中文符号为“帕”，实用单位为“千帕”（kPa）、“兆帕”（MPa）。渗透压的本质是压强，而渗透浓度的本质是浓度。根据范特荷甫公式溶液的渗透压不仅和溶液的渗透浓度相关，还和溶液的温度有关。虽然临床上渗透压和渗透浓度呈正比，用渗透浓度来表示渗透压有很强的直观性和实用性，且为临床医生所熟悉。但是按照国家标准规定：人体体液的渗透压只能用“Pa”或“kPa”为单位，不能用 mol/L、mmol/L，也不能用 Osmol/L 为单位。

本刊编辑部