论著

文章编号:1000-5404(2012)22-2306-05

T淋巴细胞亚群在肝移植术后长期生存患者外周血中的变化

谢 炜[1,2],杨占宇[1],刘翔德[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所[1];400013 重庆,重庆市中山医院肝胆外科[2])

[摘要] **目的** 分析肝移植术后长期生存患者外周血中Th1细胞和$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞(Ts)及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg水平的变化及其临床意义。**方法** 研究对象为肝移植术后长期生存患者的外周血,血清学检测肝功能生化指标与FK506的含量,采用荧光标记单克隆抗体和流式细胞术检测Th1细胞、$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg含量变化,分析表达变化特点及与免疫抑制药物FK506(他克莫司)的相关性。**结果** 通过对肝移植术后存活2~3、8~10年患者及健康人外周血中Th1细胞、$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg的含量检测显示三者水平呈逐渐下降趋势,最终接近至健康人的水平;肝移植术后生存2~3年组外周血中3种细胞百分比计数水平均显著高于健康对照组($P<0.05$);生存8~10年患者$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞百分比计数水平显著高于健康人组($P<0.05$),而Th1及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg细胞百分比计数较2~3年组的水平显著降低($P<0.05$);生存8~10年组患者中$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞较生存2~3年组的水平虽然也降低,但无显著性差异($P>0.05$);肝移植术后长期存活患者血清FK506浓度与三者水平呈直线正相关。**结论** 肝移植术后患者产生免疫耐受一定程度上取决于Th1细胞、$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg的平衡。

[关键词] 肝移植;免疫耐受;Th1细胞;$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞

[中图法分类号] R392.12;R446.11;R657.3 [文献标志码] A

Proportion of T lymphocytes subgroup in peripheral blood of long-term survival patients after liver transplantation

Xie Wei[1,2], Yang Zhanyu[1], Liu Xiangde[1] ([1]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, [2]Department of Hepatobiliary Surgery, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing, 400013, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the levels of Th1 cells, $CD3^+CD8^{low}$ suppressor T cells and $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg in the peripheral blood of long-term survival patients underwent liver transplantation. **Methods** A total of 40 patients who underwent liver transplantation in our institute during January 2001 to December 2009 were enrolled and followed up till January 2012. They were 23 males and 17 females, with an age ranging form 45 to 58, and further divided into 2 – 3 year survival group ($n=20$) and 8 – 10 year survival group ($n=20$). Another 20 sex- and age-matched health individuals served as normal control. The serum levels of AST, ALT, GGT and FK506 (tacrolimus) was detected by serological analysis. The proportions of Th1 cells, $CD3^+CD8^{low}$ suppressor T cells and $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg were detected by fluorescence labeling monoclonal antibodies and flow cytometry. The correlation of these changes with serum level of FK506 was analyzed. **Results** The proportions of the Th1 cells, $CD3^+CD8^{low}$ suppressor T cells and $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg were gradually decreased in the patients undergoing liver transplantation after 2 – 3 and 8 – 10 years, were approached to those of healthy control. The percentages of Th1 cells, $CD3^+CD8^{low}$ suppressor T cells and $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg were significantly larger in 2 – 3 year survival group than in healthy people ($P<0.05$). Furthermore, the expressions of Th1 cells and $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg in 8 – 10 year survival group were

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81070376)

[通信作者] 杨占宇,电话:(023)68765402,E-mail:yangzhanyu@medmail.com.cn

decreased significantly than in 2 – 3 year survival group ($P < 0.05$), but there were not significant change in $CD3^+CD8^{low}$ suppressor T cells between 2 – 3 year and 8 – 10 year survival group ($P > 0.05$). All of them were positively correlated with the serum level of K506. **Conclusion** Formation of immune tolerance in patients after liver transplantation may be, to some extent, resulted from the balance of Th1 cells, $CD3^+CD8^{low}$ suppressor T cells, and $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg.

[**Key words**] liver transplantation; immune tolerance; Th1 cells, $CD3^+CD8^{low}$ suppressor T cells; $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg; FK506

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81070376). Corresponding author: Yang Zhanyu, Tel: 86-23-68765402, E-mail: yangzhanyu@medmail.com.cn

肝移植是目前治疗终末期肝脏疾病的一种有效方法。与其他器官移植相比,肝移植的优越性主要表现在排斥反应较易控制,特别是在肝肾、肝胰等多器官联合移植中,肝移植可有效诱导受体对肾、胰形成免疫耐受,从而对其他器官的形成和存活发挥保护作用[1]。近年来,辅助性T细胞和抑制性T细胞在肝移植术后免疫反应中的作用研究越来越受到重视。T细胞是参与移植排斥反应和诱导免疫耐受的免疫细胞之一,在机体内发挥着极其重要的调节和效应作用。

肝移植术后患者机体免疫功能的改变,主要表现在T淋巴细胞亚群及细胞因子水平改变,各亚群及其因子的水平在排斥反应和免疫耐受患者的外周血中存在不同表现,其最终达到某一平衡是使患者产生持续性免疫耐受的保证。现有研究[2-4]表明,调节性T细胞能够对多种免疫细胞发挥调节作用;在动物实验中已证实该细胞具有明显减少移植物抗宿主病发生的作用[5-7];也有学者应用体外扩增的$CD4^+CD25^+$T细胞来降低小鼠移植后发生的移植物抗宿主病发生的概率[8-10],并取得一定进展。FK506(tacrolimus,他克莫司)是大环内酯类抗生素,为强效免疫抑制剂,是目前肝移植术后免疫排斥反应的一线和常规用药。本课题以肝移植术后长期生存(即产生免疫耐受)患者的外周血为研究对象,检测血中T细胞亚群,包括Th1细胞、$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞(Ts)及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg的表达水平,探讨肝移植术后产生免疫耐受患者外周血中三者的表达特点及其与FK506之间的相关性,旨在为肝移植术后患者产生免疫耐受和用药指标提供指示性依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2001年1月至2009年12月在重庆某医院肝移植术后持续治疗患者40例:男性23例,女性17例;年龄45~58岁,患者肝移植术后未发生排斥反应,最后随访时间为2012年1月。将肝移植组分为存活2~3年组(距离随访时间2~3年,目前仍然存活患者),20例;存活8~10年组(距离随访时间8~10年组,目前仍然存活患者),20例;健康对照组20例,体检各项指标均在正常范围内。集中采集所选对象静脉外周血,肝素抗凝,编号备用。

1.2 主要实验材料和仪器

细胞因子刺激剂(PMA),离子霉素(ionomycin)细胞孵育箱,Anti-Human IL-2/PE, Anti-Human CD4/PerCP-Cy5.5, Anti-Human CD3/PE, Anti-Human CD8/FITC, Anti-Human CD25/PE, Anti-Human Foxp3/APC,流式细胞仪等。

1.3 方法

取肝移植术后生存2~3年(20例)和8~10年(20例)患者的外周血,肝素抗凝。血清学检测ALT、AST、ALB、GGT及其FK506的含量;分离出单核细胞,PMA刺激培养,收集细胞。分3组:A组,Th1细胞(IL-2)检测组;B组,$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞检测组;C组,$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg检测组。A组加入Anti-Human IL-2/PE 10 μl;B组加入Anti-Human CD3/PE、Anti-Human CD8/FITC各10 μl;C组加入Anti-Human CD4/PerCP-Cy5.5、Anti-Human CD25/PE以及Anti-Human Foxp3/APC各10 μl;4 ℃避光孵育1 h,PBS重悬细胞,3 000 r/min,离心3 min,PBS洗涤细胞2次。然后用150 μl PBS重悬细胞;4 ℃避光孵育1 h,PBS重悬细胞,3 000 r/min,离心3 min,洗涤细胞2次;用150 μl PBS重悬细胞,上机检测。

1.4 统计学分析

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行方差分析和t检验处理,并行Pearson相关性分析。

2 结果

2.1 移植术后患者组和健康对照组外周血中肝功能生化指标及FK506检测

通过对20例健康人、20例肝移植术后生存2~3年患者以及20例肝移植术后生存8~10年患者肝功能的变化结果见表1。肝移植术后生存2~3年患者以及肝移植术后生存8~10年患者肝功能与健康对照组AST、ALT和ALB 3项指标都无显著性差异($P > 0.05$),而GGT在肝移植术后患者中相对于健

康对照组显著增高($P<0.01$)。术后血药浓度情况:肝移植术后生存2~3年患者血清中FK506为(7.58±0.47)ng/ml;8~10年患者,血清中FK506为(4.21±0.33)ng/ml,显著高于健康对照组中的血药浓度($P<0.05$);同时,肝移植后生存8~10年患者血清中FK506浓度显著低于生存2~3年患者($P<0.05$,表1)。

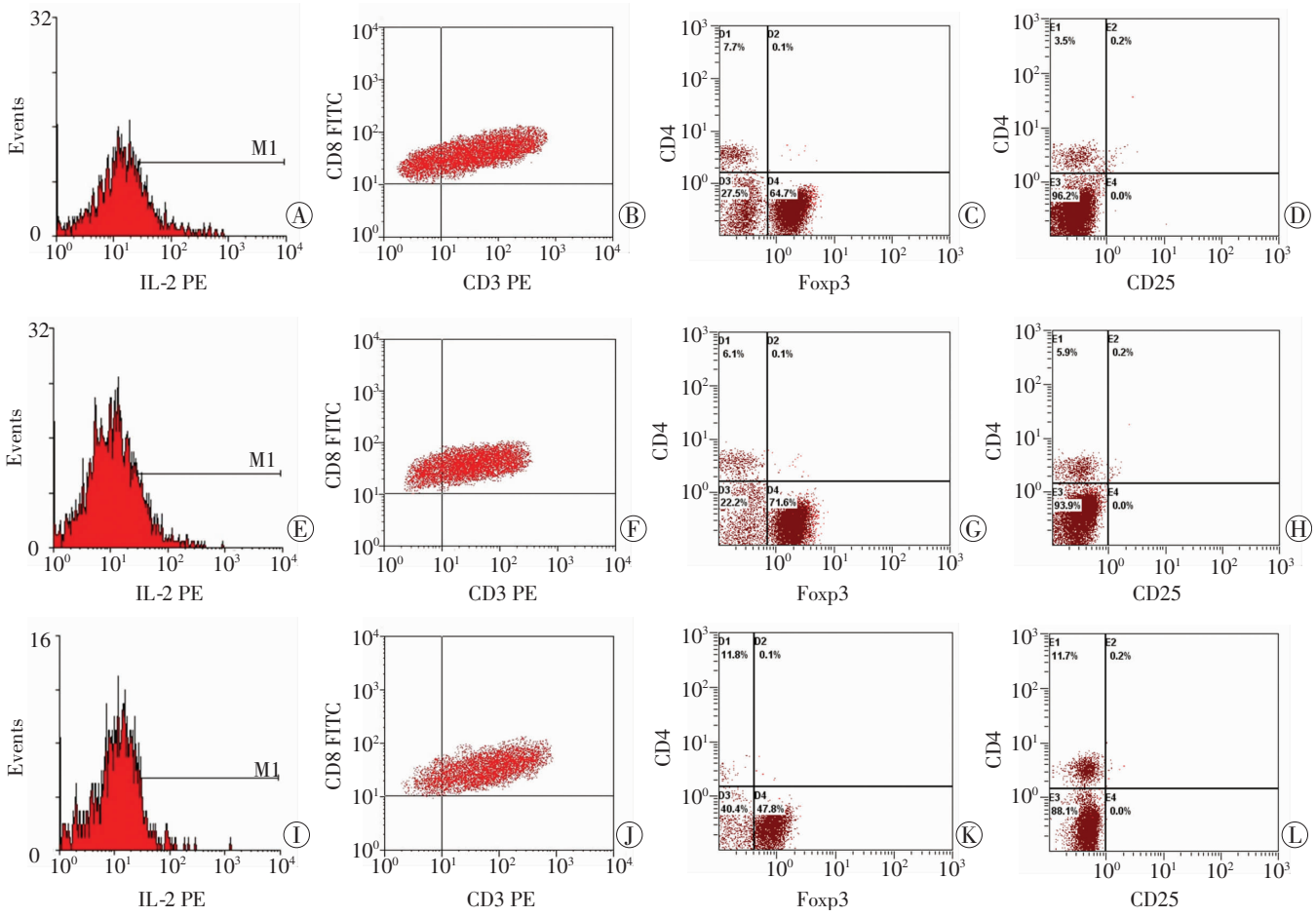
2.2 T细胞亚群在肝移植术后患者组和健康人对照组外周血中的表达

通过流式细胞技术检测20例健康人、20例肝移植术后生存2~3年患者以及20例肝移植术后生存8~10年患者外周血中T细胞亚群结果显示(图1,表2):肝移植术后患者2~3、8~10年及健康人外周血中Th1细胞和$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg的含量水平呈逐渐下降趋势,三者最终接近至健康人的水平;与健康对照组比较,肝移植术后生存2~3年患者组外周血中Th1(IL-2)细胞、$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg细胞百分比计数水平均显著高于健康对照组水平($P<0.05$);存活8~10年组患者$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞百分比计数水平显著高于健康对照组水平($P<0.05$);而Th1细胞及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg细胞百分比计数较生存2~3年患者中的水平显著降低($P<0.05$);生存8~10年患者中$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞较生存2~3年患者中的水平虽然也降低,但无显著性差异($P>0.05$)。此外,生存8~10年患者中这些T细胞亚群检测结果较2~3年患者更接近健康对照组的水平。

表1 各组肝功能AST、ALT、ALB、GGT变化及其FK506检测($n=20$, $\bar{x}\pm s$)

组别	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	ALB(g/L)	GGT(U/L)	FK506(Ng/ml)
健康对照组	28.2±5.6	33.1±7.3	43.4±6.5	13.7±2.3	1.85±0.25
肝移植术后2~3年组	33.7±6.3	36.4±9.5	46.5±4.3	89.6±9.8[a]	7.58±0.47[a]
肝移植术后8~10年组	30.9±6.1	29.3±5.4	40.8±5.1	78.4±7.6[a]	4.21±0.33[ab]

a:$P<0.01$,与健康对照组比较; b:$P<0.05$,与肝移植术后2~3年组比较



A-D:肝移植生存2~3年患者Th1细胞、$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg水平; E-H:肝移植生存8~10年患者Th1细胞、$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg水平;I-L:健康对照组Th1细胞、$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg水平

图1 流式细胞技术检测3组T细胞亚群表达水平

表 2 各组 Th1 细胞、$CD3^+CD8^{low}$抑制性 T 细胞及 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 的比较（$n=20, \bar{x}\pm s$）

组别	Th1(IL-2)	$CD3^+CD8^{low}$	$CD4^+CD25^+Foxp3^+$
健康对照组	12.26±2.35	10.74±3.21	6.43±1.12
肝移植术后 2~3 年组	32.15±3.95[a]	23.34±2.87[a]	17.87±3.22[a]
肝移植术后 8~10 年组	18.71±2.97[b]	18.32±2.54[a]	10.76±2.21[b]

a: $P<0.05$，与健康对照组比较；b: $P<0.05$，与肝移植术后 2~3 年组比较

2.3 植术后 T 细胞亚群水平变化与 FK506 相关性分析

通过对 40 例肝移植术后长期生存患者外周血中 FK506 与 Th1(IL-2)、$CD3^+CD8^{low}$抑制性 T 细胞及 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 表达作散点图分析，可知 FK506 浓度与 Th1、$CD3^+CD8^{low}$抑制性 T 细胞及 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg 呈直线相关。通过 Pearson 相关性检验，确定 FK506 浓度分别与 Th1（$r=0.721$, $P<0.01$）、$CD3^+CD8^{low}$抑制性 T 细胞（$r=0.845$, $P<0.01$）及 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg（$r=0.934$, $P<0.01$）的表达呈显著正相关。

3 讨论

肝脏移植是一种肝脏病变的根治性手术，是肝功能代偿或失代偿的替代治疗，具有良好的效果，多应用于肝癌、肝硬化以及 HBV 感染引起的肝功能衰竭等肝脏疾病。然而，肝移植术后的高复发率及其严重的排斥反应限制了肝移植在患者中的推广。在肝癌中，按照 Milan 标准[11]筛选的肝癌肝移植患者其术后复发率高达 25% ~67%[12]。因此，严格控制肝移植的适应证以及加强术后检测是提高疗效、减少各种副反应发生的重要环节。

肝移植最常见的并发症是肝移植物的排斥反应，包括急性和慢性排斥。排斥反应的发生是由于受体和供体之间的个体基因差异引起的机体非感染性炎症反应，主要是受者的 T 淋巴细胞识别了供体的同种异型抗原，活化 T 淋巴细胞引起免疫反应攻击供体肝脏，最终导致移植物排斥。肝移植后最重要的治疗就是减少机体的免疫排斥加强免疫耐受，其中的机制非常复杂。尽管目前有大量的基础研究和动物实验，形成很多设想和假说，但并没有达成较为一致的结论。可以想象，这种同种异体相互接纳、和平相处的状态必然是多因素、多通路相互平衡、抑制与反馈的结果。

活化的 T 细胞是诱发原发性免疫反应的细胞，也是参与移植物抗宿主的主要效应细胞。其平衡是机体免疫排斥和免疫耐受的基础，因此，其表达水平与移植后排斥以及免疫耐受息息相关。本研究就是利用流式细胞技术对肝移植术后存活 2~3 年以及 8~10 年及健康对照人外周血中 Th1 细胞和 $CD3^+CD8^{low}$抑制性 T 细胞(Ts)及 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg 的含量检测，寻找其中表达差异。肝移植术后存活 2~3 年以及8~10 年说明患者已经具有免疫耐受能力，因此这种差异表达有助于我们进一步评估治疗效果，并最终为免疫耐受达到获得临床资料。从检测结果看出，肝移植术后患者同健康人比较，其外周血中 Th1 细胞含量、$CD3^+CD8^{low}$抑制性 T 细胞及 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg 水平均高于健康对照组水平。但长期生存患者特别是生存时间为 8~10 年患者，其外周血中 Th1 细胞和 $CD3^+CD8^{low}$抑制性 T 细胞及 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg 的表达水平最终接近至健康人的水平，提示 T 细胞亚群在肝移植术后患者中还具有相当的功能，而长期生存患者已经与健康人群具有相似的 T 细胞表达。其次，本次实验还可以看到 Th1 细胞的水平呈逐渐下降趋势，$CD3^+CD8^{low}$抑制性 T 细胞及 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg 水平有下降趋势，但比较平缓。结合这些 T 细胞亚群的功能分析很可能是由于 $CD3^+CD8^{low}$抑制性 T 细胞及 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg 对 Th1 细胞具有一定负调控作用，从而使肝移植术后患者产生免疫耐受所致，当然机制需要进一步实验证实。

肝移植手术后常规要给予各种抗免疫排斥的药物，并检测血药浓度，其中包括了免疫抑制剂 FK506 等。FK506 的作用机制是抑制免疫应答过程中 T 淋巴细胞的活化和增殖，最终促进效应 T 细胞减少而发挥抗排斥反应，因此，FK506 可通过对细胞免疫功能的影响而使机体的免疫力下降，更容易引起病毒、细菌等的感染。特别是肝移植很多由于 HBV 等感染引起，应用 FK506 潜在的增加 HBV 增殖的可能性，而如何确定其用量达到最小 FK506 浓度窗即不引起排斥反应，也能增强机体免疫系统对病毒的抗感染力也是目前临床研究的重点。肝移植患者术后生存率高低绝大部分取决于术后长期免疫抑制治疗的效果，患者根据自身免疫状态需要长期服用 FK506，一般术后开始口服，至术后 1 个月左右口服剂量达到最高值，此后用药剂量逐渐降低。同时，为了消除口服剂量不同而产生的影响，临床上常采用 FK506 浓度/剂量比值（即 FK506 血药浓度除以每日每公斤体质量的 FK506 剂量）反映其在患者体内的利用率[13]，一般肝移植术后 7 d 至 1 个月该值逐渐升高，并达到高峰，而随着时间延长其又呈曲线

下降,术后半年至1年左右可达到一定的稳态,随后根据患者个体情况定时血清学监测其血药浓度并进行剂量微调,一般都需要小剂量长期维持甚至终生服药。本研究中,肝移植术后生存2~3年及其8~10年患者血清中的FK506浓度显著高于正常人,这与肝移植术后患者长期服用该药物有关;但是8~10年患者血清中的FK506浓度要显著低于2~3年组,这可能是8~10年患者用药剂量要低于2~3年患者且生存8~10年患者对移植物的免疫耐受提高有关,当然每个人的用药量最终还是根据其自身情况而决定。此外,监测肝移植术后患者血中肝生化变化也是评估患者肝功能的重要指标,本研究中肝移植长期生存患者血清中GGT量显著高于健康群体,这可能与服用FK506以及原发性的肝脏疾病有关;同时,GGT变化与FK506浓度之间似乎有一定的相关性,可能可以作为一种FK506浓度的监测指标,当然这需要进一步的大样本检测数据支持。

肝移植术后患者外周血中T细胞亚群根据自身免疫情况(包括肿瘤复发、各种其他系统疾病等)以及外在各种因素的作用(包括感染、食物等诱导以及免疫抑制剂的应用等)发生数量和分布等变化,是机体免疫状态的体现,因此,临床上常用肝移植受体的外周血中T细胞亚群的T细胞数量及其比值来反映术后患者的免疫状态,这些指标的检测对我们评估免疫疗效具有重要的意义。本课题进一步研究了长期生存患者肝移植术后Th1细胞、$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg的水平与FK506相关性,通过将检测结果与临床资料比对发现它们的水平与FK506的浓度呈正相关。而将Th1细胞、$CD3^+CD8^{low}$抑制性T细胞及$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg在肝移植术后长期生存患者变化规律并同时与生化指标及肝活检比较,很可能成为评价抗排斥反应药物的指标之一,而具体量化指标目前尚不能得出,还需要进一步的大样本资料收集分析。总之,本研究中T细胞亚群在肝移植术后患者血清中的变化及其与FK506之间的相关性对肝移植术后的临床用药有着重要的指导意义,为监控肝移植术后产生免疫耐受患者提供了可能的检测指标,并对今后针对不同基因状态的预防免疫排斥反应的个体化治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] Sawada T, Asanuma Y, Furuya T, *et al*. Induction of systemic tolerance in islet allograft by liver transplantation[J]. Transplant Proc, 2001, 33(6): 2995-2999.

[2] Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, *et al*. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation[J]. J Exp Med, 2002, 196(3): 389-399.

[3] Xia G, Truitt R L, Johnson B D. Graft-versus-leukemia and graft-versus-host reactions after donor lymphocyte infusion are initiated by host-type antigen-presenting cells and regulated by regulatory T cells in early and long-term chimeras[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2006, 12(4): 397-407.

[4] Nguyen V H, Zeiser R, Negrin R S. Role of naturally arising regulatory T cells in hematopoietic cell transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2006, 12(10): 995-1009.

[5] Trenado A, Sudres M, Tang Q, *et al*. *Ex vivo*-expanded $CD4^+CD25^+$ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells[J]. J Immunol, 2006, 176(2): 1266-1273.

[6] Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, *et al*. Only the CD62L+ subpopulation of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD[J]. Blood, 2005, 105(5): 2220-2226.

[7] Cohen J L, Trenado A, Vasey D, *et al*. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft-versus-host disease[J]. J Exp Med, 2002, 196(3): 401-406.

[8] June C H, Blazar B R. Clinical application of expanded CD4+25+ cells[J]. Semi Immunol, 2006, 18(2): 78-88.

[9] Bluestone J A. Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic?[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(4): 343-349.

[10] Xia G, Kovochich M, Truitt R L, *et al*. Tracking *ex vivo*-expanded $CD4^+CD25^+$ and $CD8^+CD25^+$ regulatory T cells after infusion to prevent donor lymphocyte infusion-induced lethal acute graft-versus-host disease[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2004, 10(11): 748-760.

[11] Felga G, Evangelista A S, Salvalaggio P R, *et al*. Hepatocellular carcinoma recurrence among liver transplant recipients within the milan criteria[J]. Transplant Proc, 2012, 44(8): 2459-2461.

[12] Ferreira M V, Chaib E, Nascimento M U, *et al*. Liver transplantation and expanded Milan criteria: does it really work?[J]. Arq Gastroenterol, 2012, 49(3): 189-194.

[13] Pou L, Brunet M, Andres I, *et al*. Influence of posttransplant time on dose and concentration of tacrolimus in liver transplant patients[J]. Transplant Int, 1998, 11(Suppl 1): S270-S271.

(**收稿**:2012-10-09;**修回**:2012-10-29)

(编辑 邓强庭)