

肾移植受者早期外周血 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞、Th17 细胞表达变化

朱贞贞 殷欣 张茜 徐晓玲

摘要 目的 观察肾移植受者术后 3~6 个月外周血单个核细胞(PBMC)中调节性 T 细胞(CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞或 Treg 细胞)、辅助性 Th 细胞 17(Th17 细胞)及 T 细胞亚群的表达百分比的变化情况。分析并探讨上述指标的变化特征及意义。方法 收集 56 例研究对象,分为术前组(15 例)、术后 3~6 个月组(20 例)、对照组(21 例)。运用流式细胞术检测 PBMC 中 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞和 Th17 细胞的表达以及 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞的表达。结果 与术前组比较,术后 3~6 个月组 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞的表达低($P < 0.01$)、CD8⁺ T 细胞表达较低($P < 0.05$);与对照组比较,术后 3~6 个月组 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞的表达降低($P < 0.001$)。结论 肾移植术后 3~6 个月受者外周血中 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞均明显降低。

关键词 肾移植受者; CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞; Th17 细胞; 肺孢子菌肺炎

中图分类号 R 563.19

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1828-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.025

肾移植术可显著提高终末期肾脏疾病患者的生存率,改善生活质量,目前已经成为终末期肾脏疾病的规范治疗方法^[1],但肾移植术后相关并发症如感染等也越来越多,国外研究^[2]报道肺孢子菌肺炎(*Pneumocystis jirovecii* pneumonia, PJP)已成为影响肾移植受者预后的日益突出的问题,超过 25% 的移植患者在术后 6 个月内患 PJP。PJP 的发生与宿主因素有关,肾移植受者术后需长期给予免疫抑制治疗从而导致免疫功能下降。该研究对术后随访 3~6 个月的肾移植受者人群进行细胞免疫状况研究,了解该时期肾移植受者细胞免疫状态的变化情况,为

寻找一些指标来预测发生 PJP 风险较高的肾移植受者提供线索和思路。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2015 年 8 月~2016 年 1 月于安徽医科大学附属省立医院肾移植专科门诊随访且随访时间在肾移植手术后 3~6 个月的肾移植受者及在肾移植病房住院等待手术的患者。分为术前组(15 例);术后 3~6 个月随访组(20 例);对照组(21 例)。纳入标准:受者均为首次行活体异体肾移植手术,受者采用的免疫抑制剂方案相同,受者的肾功能均良好。排除标准: HIV 感染及自身免疫性疾病、移植肾功能不良、二次肾移植、肾移植后有排斥反应病史等。均知情并签署知情同意书。

1.2 主要仪器与试剂 流式细胞仪(美国 BD 公司);超净工作台(上海智诚分析仪器制造有限公司);高速冷冻离心机(德国 Hettich 科学仪器公司);CO₂ 培养箱(赛默飞世尔科技有限公司);淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限公司);抗人 CD3-PE 单克隆抗体、抗人 CD4-FITC 单克隆抗体、抗人 IL-17-APC 单克隆抗体、抗人 CD25-PE 单克隆抗体、抗人 Foxp3-APC 单克隆抗体、抗人 CD8a-PerCP-Cyanine5.5 单克隆抗体、固定破膜剂 Foxp3 Staining Buffer Set(美国 eBioscience 公司);佛波酯/离子霉素(PMA/Ionomycin)混合液、蛋白质转运抑制剂布雷杆氏菌素 A/莫能霉素(BFA/Monensin)混合液(美国 Sigma 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本收集和外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的制备 受试者清晨空腹时留取静脉血 4 ml 于肝素抗凝管中。生理盐水与血液等比稀释后平铺于淋巴分离液上,离心后,提取白膜层至离心管中,洗涤收集 PBMC,用热灭活的含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 重悬细胞,使显微镜下计数细胞浓度在 $1 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ /ml 之间。

1.3.2 流式细胞术检测 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细

2016-06-15 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1608085MH216)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院呼吸内科,合肥 230001

作者简介:朱贞贞,女,硕士研究生;

徐晓玲,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-

mail: xxlahh08@163.com

胞、Th17 细胞及 T 细胞亚群 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞: 取 200 μl PBMC 悬液, 加入 CD4-FITC、CD25-PE 抗体, 避光孵育 30 min, 预冷 PBS 洗涤, 收集细胞, 重悬, 加入固定破膜剂 4 °C 避光孵育 1 h, 洗涤, 弃上清液, 重悬加入小鼠血清, 孵育 30 min, 加入 Foxp3-APC 抗体 4 °C 避光孵育过夜, 24 h 内洗涤, 重悬细胞上流式机检测。Th17 细胞: 取 500 μl 体积的 PBMC 于 48 孔细胞培养板上, 加入 PMA、ionomy-cin、BFA、Monensin 混匀后置 37 °C 的 CO₂ 培养箱中刺激培养 5 h, 收集细胞 200 μl PBS 重悬后加入 CD4-FITC、CD3-PE、CD8a-PerCP-Cyanine5.5 抗体, 混匀室温避光孵育 30 min, 洗涤, 重悬加入固定破膜剂 4 °C 避光孵育 1 h, 洗涤, 弃上清液, 加入 IL-17-PE 抗体 4 °C 避光孵育过夜, 24 h 内上流式机检测。T 细胞亚群: 取 50 μl PBMC, 加入 CD3-PE、CD4-FITC、CD8a-PerCP-Cyanine5.5 抗体混匀避光孵育 30 min 后洗涤上流式机检测。分析软件为 FlowJo7.6, 应用散点图, 设门, 分析 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞

和 Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分比及 T 细胞亚群表达百分比。

1.4 统计学处理 全部数据录入 Excel 软件, 利用 SPSS 17.0 软件进行分析, 定量资料的比较采用 *t* 检验和方差分析, 定性资料比较采用 χ^2 检验以及相关统计描述方法。选择 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准, 得到的概率值均表示双侧概率。

2 结果

2.1 一般资料 术后 3~6 个月组随访时间为(123 ± 29) d。三组之间年龄、性别差异均无统计学意义。见表 1。

2.2 外周血 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞、Th17 细胞的表达及 Th17/Treg 比值变化 外周血 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞、Th17 细胞的表达及 Th17/Treg 比值见表 2。与术前组及对照组比较, 术后 3~6 个月组 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞的表达百分比明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2、图 1。

表 1 各组研究对象一般资料

项目	术前组 (n=15)	术后 3~6 个月组 (n=20)	对照组 (n=21)	F/ χ^2 值	P 值
年龄 (岁 $\bar{x} \pm s$)	31 ± 9	33 ± 9	35 ± 7	1.305	0.280
性别 (女/男 n)	2/13	2/18	3/18	0.185	0.912

表 2 各组 Treg、Th17 及 T 淋巴细胞亚群的表达 ($\bar{x} \pm s$)

项目	术前组 (n=15)	术后 3~6 个月组 (n=20)	对照组 (n=21)	F 值	P 值
Treg (%)	7.546 ± 3.769	4.954 ± 1.986 ^{**##}	7.039 ± 1.594	5.718	0.006
Th17 (%)	2.241 ± 1.649	1.947 ± 1.318	1.665 ± 0.834	0.912	0.408
Th17/Treg	0.559 ± 0.876	0.448 ± 0.338 ^{##}	0.251 ± 0.147	1.781	0.178
CD4 (%)	52.647 ± 8.692	57.685 ± 10.475	54.110 ± 11.220	1.142	0.327
CD8 (%)	41.693 ± 8.260	33.635 ± 6.948 ^{**}	37.976 ± 10.165	3.814	0.028
CD8/CD4	0.836 ± 0.294	0.615 ± 0.201	0.752 ± 0.291	3.161	0.050

与术前组比较: ^{**} $P < 0.05$; 与对照组比较: ^{##} $P < 0.05$

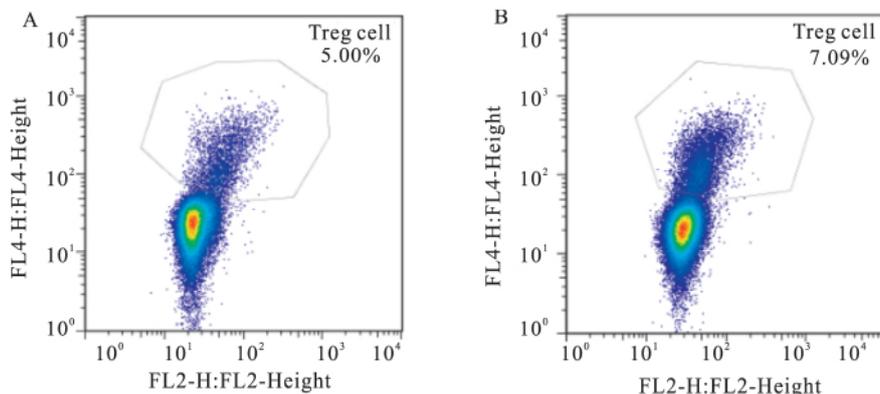


图 1 外周血 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 细胞的表达百分比

A: 术后 3~6 个月组; B: 对照组; FL2-H: CD25-PE; FL4-H: Foxp3-APC

2.3 外周血 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞的表达及 CD8/CD4 比值变化 外周血 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞的表达及 CD8/CD4 比值见表 2。与术前组比较 术后 3~6 个月组的 CD8⁺T 细胞表达降低($P < 0.05$)。

3 讨论

肾移植受者发生肺部感染并不罕见,术后 1 个月的肺部感染目前认为是医院获得性肺炎感染为主,术后 1~6 个月是机会性感染的好发时间,尤其是 PJP,国外报道其发生率为 5%~15%^[3]。本研究对我院 2008 年~2015 年间共 323 例活体肾移植受者的临床研究^[4]显示术后 PJP 发生率为 8%,PJP 多发生在术后 1 年内,62.5% 的患者发生在术后 3~6 个月之间。机会性肺孢子菌感染的诊断较困难,死亡率也较高,因而对于肾移植术受者的预后十分重要^[5]。且长期预防性口服甲氧苄啶-磺胺甲恶唑对移植肾的功能有一定的影响^[6]。如能及时发现肾移植受者中发生 PJP 高风险的患者,并针对性预防用药,将会对肾移植受者的预后有非常重要的意义。机会性肺孢子菌感染的主要宿主因素是肾移植受者服用的免疫抑制剂导致机体免疫力降低。对肾移植受者进行细胞免疫学的相关研究可以发现其中的变化从而为下一步的研究提供线索。

Treg 细胞是调控移植排斥反应的重要 T 细胞亚群,在免疫耐受中的作用研究已成为热点。在肾移植受者术后感染炎症反应中 Treg 细胞有重要免疫调节作用,也越来越受到广大研究学者的重视。其通过分泌抑制性细胞因子如 IL-10 和 TGF- β 抑制各种免疫效应细胞(如 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、巨噬细胞及树突状细胞)的激活,抑制一系列炎症反应。Th17 细胞以可选择性高分泌 IL-17 而得名,此外还可以分泌 IL-6、IL-21、TNF- α 等炎症细胞因子,促进炎症反应,在慢性感染和自身免疫疾病发生、发展中起重要作用。国内外很多研究都描述了肾移植受者外周血中 Treg 细胞、Th17 细胞表达的变化。研究^[7]表明肾移植受者循环血 CD25⁺CD127^{low} CD4⁺T 调节性细胞表达百分比在移植后 6 个月下降,2 年时升高,5 年时与健康对照组几乎相等;研究^[8]表明 CD4⁺CD25^{bright}+T 调节性细胞的绝对数目和百分比在肾移植术后 1 年内下降;研究^[9]报道 Treg 细胞平均数目在移植后 2 周下降,在移植后数

月后渐渐达到移植前的水平,研究结果强调了第 3 个月时 Treg 细胞的水平可以预测其在第 6 个月时的表达水平。但大多数文献^[7-10]报道并未重视术后 3~6 个月这个特殊时期的免疫功能变化及其重要的意义。

本研究报道了术后 3~6 个月时外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞的表达明显降低。动物研究^[11-12]已证明 Treg 细胞减少与肺孢子菌引起的致死性的肺部炎症有关。因此推测 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞在术后 3~6 个月时表达下降可能是 PJP 发生的易感因素,但尚需进一步的前瞻性队列研究证明。

国外关于肾移植受者术后发生机会性感染情况的相关研究^[13]显示,术后第 6 个月时总淋巴细胞、CD3⁺T 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 淋巴细胞数目明显降低,术后第 1 个月时 CD4⁺T 淋巴细胞数目是随后发生机会性感染(尤其是巨细胞病毒)的最有预测价值的参数。而本研究显示术后 3~6 个月组 CD4⁺T 淋巴细胞、Th17 细胞的表达与对照组和术前组比较无区别,由于本研究仅限于表达百分比的研究,因此不能排除这两种细胞的功能是否发生改变。本研究显示术后 3~6 个月时 CD8⁺T 淋巴细胞的表达是降低的。研究^[14]表明 CD8⁺T 淋巴细胞数目的降低与机会性感染的发生有关,但 CD8⁺T 细胞在肺孢子菌感染中发挥的作用与细胞因子的类型及 CD8⁺T 细胞的亚型有一定关系^[15]。CD8⁺T 细胞与肾移植受者发生 PJP 的关系非常复杂,其在肾移植术后发生变化的意义需要进一步研究和探讨。

综上所述,肾移植受者术后 3~6 个月为 PJP 的高发时期,此时间段稳定的肾移植受者外周血中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞的表达百分比均明显下降。这为下一阶段的研究提供了一些假设,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞的表达变化是否可以作为预测肾移植受者发生 PJP 的指标,从而进一步为针对性的个体化预防措施提供可靠的依据。

参考文献

- [1] Kidney Disease: Improving Global Outcomes(KDIGO) transplant work group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients[J]. *Am J Transplant* 2009, 9 Suppl 3: S1-155.
- [2] Maruschke M, Riebold D, Holtfreter M C, et al. *Pneumocystis pneu-*

- monia (PCP) and *Pneumocystis jirovecii* carriage in renal transplantation patients: a single-centre experience [J]. Wien Klin Wochenschr 2014, 126(23-24): 762-6.
- [3] Struijk G H, Gijzen A F, Yong S L, et al. Risk of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients long after renal transplantation [J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(10): 3391-8.
- [4] 王素芳. 24例肾移植受者并发卡氏肺囊虫肺炎临床特点分析 [D]. 安徽医科大学, 2015.
- [5] Hoyo I, Sanclemente G, Cervera C, et al. Opportunistic pulmonary infections in solid organ transplant recipients [J]. Transplant Proc, 2012, 44(9): 2673-5.
- [6] Morris A. Is there anything new in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia? Changes in *P. jirovecii* pneumonia over the course of the AIDS epidemic [J]. Clin Infect Dis 2008, 46(4): 634-6.
- [7] van de Berg P J, Hoevenaars E C, Yong S L, et al. Circulating lymphocyte subsets in different clinical situations after renal transplantation [J]. Immunology 2012, 136(2): 198-207.
- [8] Hendriks T K, van Gurp E A, Sewgobind V D, et al. Generation of donor-specific regulatory T-cell function in kidney transplantation patients [J]. Transplantation, 2009, 87(3): 376-83.
- [9] Nikouinejad H, Amirzargar A, Sarrafnejad A, et al. Dynamic changes of regulatory T cell and dendritic cell subsets in stable kidney transplant patients [J]. Iran J Kidney Dis 2014, 8(2): 130-8.
- [10] Braudeau C, Racape M, Giral M, et al. Variation in numbers of CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺ T cells with normal immunoregulatory properties in long-term graft outcome [J]. Transpl Int, 2007, 20(10): 845-55.
- [11] McKinley L, Logar A J, McAllister F, et al. Regulatory T cells dampen pulmonary inflammation and lung injury in an animal model of pneumocystis pneumonia [J]. J Immunol, 2006, 177(9): 6215-26.
- [12] Hori S, Carvalho T L, Demengeot J. CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by pneumocystis carinii in immunodeficient mice [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(5): 1282-91.
- [13] Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Allende L M, et al. Kinetics of peripheral blood lymphocyte subpopulations predicts the occurrence of opportunistic infection after kidney transplantation [J]. Transpl Int, 2014, 27(7): 674-85.
- [14] Calarota S A, Zelini P, De Silvestri A, et al. Kinetics of T-lymphocyte subsets and posttransplant opportunistic infections in heart and kidney transplant recipients [J]. Transplantation, 2012, 93(1): 112-9.
- [15] McAllister F, Steele C, Zheng M, et al. *In vitro* effector activity of pneumocystis murina-specific T-cytotoxic-1 CD8 T cells: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [J]. Infect Immun, 2005, 73(11): 7450-7.

Expression of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T cells and Th17 cells in renal transplantation recipients during 3 to 6 months after transplantation

Zhu Zhenzhen, Ou Xin, Zhang Qian, et al

(Dept of Respiratory Medicine, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the expression of T regulatory cell (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T cell or Treg cell), T help cell 17 (Th17 cell) and T cell subsets in renal transplantation recipients during 3 to 6 months after transplantation. To analyze the characteristic and significance of these changes. **Methods** 56 subjects were chosen in this study and they were divided into three groups: group of before kidney transplantation, 15 cases; group of 3 to 6 months after transplantation, 20 cases; and the normal group, 21 cases. The expression percentages of Th17 cell, CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T cell and T cell subsets in PBMC were determined with flow cytometry. **Results** When compared with the group of before kidney transplantation, the group of 3 to 6 months after transplantation had lower expression percentages of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T cell ($P < 0.01$) and CD8⁺ T cell ($P < 0.05$). When compared with the normal group, the group of 3 to 6 months after transplantation had lower expression percentage of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T cell ($P < 0.001$). **Conclusion** In the group of 3 to 6 months after transplantation, the expression percentages of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T cell and CD8⁺ T cell descend.

Key words renal transplant recipients; CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T cell; Th17 cell; *Pneumocystis jirovecii* pneumonia