

# FK506 对肾移植患者 Th 细胞亚群分化的影响

高 勇,于卫建,安石新,王 旻,范亚欣,段 莹,潘凌子  
(辽宁省大连市血液中心 116001)

**摘 要:**目的 研究抗排斥药物 FK506 对肾移植患者 Th<sub>1</sub> 细胞和 Th<sub>2</sub> 细胞分化的影响。方法 大连市友谊医院 92 例肾移植 3 年以上患者服用 FK506 前及服用 FK506 2 h 后抽血,运用流式细胞仪进行 Th<sub>1</sub> 细胞和 Th<sub>2</sub> 细胞的检测。计算均值并进行统计学分析。结果 服用 FK506 后, Th<sub>1</sub> 细胞百分率 $[(8.45 \pm 1.57)\%]$ 明显低于服用 FK506 前 $[(13.66 \pm 2.41)\%]$ ,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。服用 FK506 前, Th<sub>2</sub> 百分率 $[(1.19 \pm 0.36)\%]$ 与服用 FK506 后 Th<sub>2</sub> 百分率 $[(1.21 \pm 0.29)\%]$ 相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 服用 FK506 2 h 后,对肾移植患者的 Th<sub>1</sub> 细胞有明显的抑制作用。Th<sub>2</sub> 细胞分化可能不受 FK506 的影响。

**关键词:**他克莫司结合蛋白质类; 肾移植; Th<sub>1</sub> 细胞; Th<sub>2</sub> 细胞; 流式细胞术

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.062

**文献标识码:**B

**文章编号:**1673-4130(2011)01-0121-02

1986 年 Mosmann 等<sup>[1]</sup>研究发现,T 辅助细胞(Th)经刺激可分化成两种亚群,即 Th<sub>1</sub> 和 Th<sub>2</sub> 亚群,其中 Th<sub>1</sub> 主要产生  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )、白细胞介素 2(IL-2)等细胞因子,介导细胞免疫反应<sup>[2]</sup>;Th<sub>2</sub> 主要分泌白细胞介素 4(interleukin-4,IL-4)、白细胞介素 6(interleukin-6,IL-6)等细胞因子,介导体液免疫反应<sup>[3]</sup>。近年来,对他克莫司(FK506)与诸多细胞因子之间的关系已进行多方探讨与实验,但与 Th 细胞之间关系的研究比较少。因此,本实验通过检测 FK506 用药前、后的 Th 细胞,观察 FK506 对 IFN- $\gamma$  和 IL-4 分泌的影响,了解这种免疫抑制剂免疫调节机制,以正确评估 FK506 对 Th 亚群的作用。

## 1 材料与与方法

**1.1 仪器与试剂** FACSCalibur 流式细胞分析仪购自 BD 公司;DK-600A 电热恒温水箱购自上海一恒科学仪器有限公司;抗小鼠 CD3、抗小鼠 CD8、抗小鼠 CD69、抗 IL-4、CD69 和 IL-4 的同型对照 Mouse IgG<sub>1</sub>、抗 IFN- $\gamma$  及同型对照 Mouse IgG<sub>2b</sub>、溶血剂 FACS Lysing Solution(10 $\times$ )与通透剂 FACS Permeabilizing Solution(10 $\times$ ),以上试剂均购自美国 BD 公司;佛波酯(PMA,PBS 配制成 25 ng/mL 工作浓度)、离子霉素(Ionomycin,PBS 配制成 1  $\mu$ g/mL 工作浓度)和莫能霉素(Monensin,PBS 配制成 1.7  $\mu$ g/mL 工作浓度)均购自 Sigma 公司。

**1.2 受检对象** 大连市友谊医院身体状态稳定的肾移植患者 92 例,男 45 例,女 47 例;年龄 22~55 岁,中位年龄 37.2 岁。移植年限大于 3 年;血压小于 140 mm Hg/90 mm Hg;血清肌酐小于 2.0 mg/dL;蛋白尿小于 2+。

**1.3 标本采集** 用肝素钠抗凝管采集静脉血(不可用肝素锂、EDTA 或枸橼酸钠),血液室温放置,8 h 内进行检测。肾移植患者清晨空腹采血 2 mL(药前),抽血后即刻服 FK506 并记录时间,2 h 后进行第 2 次抽血(药后)。

**1.4 刺激、染色和取血** 加 PMA、Ionomycin、Monensin 混匀,37  $^{\circ}$ C 恒温水箱培养 4 h;分成 a、b、c、d、e、f、g 共 7 管,每管加刺激过的全血及 CD3-FITC,在 a 管中加 Mouse IgG<sub>1</sub>-PE,b 管中加 CD69-PE,c、e、f、g 4 支管中各加入 CD8-PerCP,室温混匀,避光孵育 15 min;向各管中加入 1 $\times$ Lysing Solution,避光孵育 15 min;300 $\times$ g 室温离心 5 min,弃除上清;a、b 2 管加入 PBS,

300 $\times$ g 离心洗涤细胞 2 次,去除上清液,每管加 PBS 重悬细胞,上机检测;向 c、d、e、f、g 管中加 1 $\times$ Permeabilizing Solution,混匀避光,500 $\times$ g 离心洗涤细胞 2 次,弃掉上清液;c 管加入 Mouse IgG<sub>1</sub>-PE,d 管加入 CD69-PE,e 管加入 IL-4-PE,f 管加入 Mouse IgG<sub>2b</sub>-PE,g 管加入 IFN- $\gamma$ -PE,避光孵育 30 min;c、d、e、f、g 管加入 PBS,500 $\times$ g 离心洗涤细胞 2 次,去除上清液,每管加入 PBS 重悬细胞,上机检测。

**1.5 质控** 在检测 Th<sub>1</sub> 和 Th<sub>2</sub> 时,质控极其重要,因为刺激的效果及破膜染色的操作如何,均会影响结果的稳定性。如果 PMA+Ionomycin 的刺激效果较好,则 CD69<sup>+</sup> 在 CD3<sup>+</sup> T 细胞中的表达率应大于 90%,而破膜后观察 CD69<sup>+</sup> 所占 CD3<sup>+</sup> T 细胞的百分率,其值也应大于 90%。任何一步的质控结果不理想,均需查找原因,暂停正式实验。

**1.6 建立直方图** 以 CD3<sup>+</sup> 淋巴细胞设门,门内用 CD8 与 IFN- $\gamma$  或 CD8 与 IL-4 分别建立双参数直方图,找出 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 细胞(Th<sub>1</sub>)和 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>/IL-4<sup>+</sup> 细胞(Th<sub>2</sub>)。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS10.0 统计分析软件,结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示,Th<sub>1</sub> 用药前、后比较及 Th<sub>2</sub> 用药前、后比较都采用配对  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

服用 FK506 后,Th<sub>1</sub> 细胞百分率为 $(8.45 \pm 1.57)\%$ ,明显低于服用 FK506 前的 $(13.66 \pm 2.41)\%$ ,差异有统计学意义, $(t = 16.12, P < 0.05)$ 。服用 FK506 前 Th<sub>2</sub> 百分率为 $(1.19 \pm 0.36)\%$ ,与服用 FK506 后 Th<sub>2</sub> 百分率 $(1.21 \pm 0.29)\%$ 相比,差异无统计学意义( $t = 0.83, P > 0.05$ )。

## 3 讨 论

FK506 商品名普乐可复,分子式为 C<sub>44</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>12</sub>·H<sub>2</sub>O,相对分子质量  $0.822\ 05 \times 10^3$ ,是抑制排斥反应的一线药物,属于大环内酯类药物,被证明是 1 种新型强力的 T 细胞导向免疫抑制剂<sup>[4]</sup>。FK506 能抑制原始及已接触抗原的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的产生,抑制 IL-1、IFN- $\gamma$ 、IL-9、IL-10 等细胞因子的表达<sup>[5]</sup>。分子水平的研究表明,FK506 可以和 FK 结合蛋白 12(FKBP12)相结合,形成 FKBP12-TRL 复合物,后者会抑制钙离子的活性,进而抑制 T 细胞所产生钙离子依赖型信息

传导通路,抑制细胞毒性 T 淋巴细胞生成,减少移植排斥反应发生率,降低排斥反应的强度<sup>[6-7]</sup>。其免疫抑制作用约是环孢素 A(CsA)的 10~100 倍,对挽救激素等不敏感的难治性排斥反应也有一定的效果,且其肝毒性明显低于 CsA。

本实验中,FK506 用药后的 Th<sub>1</sub> 比 FK506 用药前的 Th<sub>1</sub> 有非常明显的下降,说明这种免疫抑制剂对 Th<sub>1</sub> 细胞有强大的抑制作用,抑制了 Th<sub>1</sub> 细胞的分化及相应细胞因子的分泌。但 FK506 的使用对 Th<sub>2</sub> 的分化没有明显作用,与 Ke 等<sup>[8]</sup>所报道的 FK506 没有抑制 IL-4、IL-10 mRNA 的表达有相通性,但与 Saggi 等<sup>[9]</sup>报道的患者正常状态下 IL-4 局部表达增高不符。原因可能有以下 2 点:经过几年的临床用药,IL-4 这种介导免疫耐受的细胞因子可能已对免疫抑制剂有了一定的耐受能力,即使在血药浓度较大时,IL-4 也不会有太大变化;IL-4 在刺激剂作用几小时后,其表达不会有显著升高(一般不超过 2%,本实验中 IL-4 最高时也达 2.65%),造成所圈出的 IL-4 百分率可能会有一定的偏差,FK506 对 IL-4 几乎无影响。

研究表明,转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )参与肾小球纤维化,是移植肾丧失功能的主要原因之一<sup>[10]</sup>。很多免疫抑制剂(如 CsA 等)可诱导 TGF- $\beta$  产生并促进其与 TGF- $\beta$  受体结合,加重肾小球纤维化。FK506 与 CsA 虽同属钙调素抑制剂,但 FK506 没有诱导 TGF- $\beta$  过度表达的作用,并且与 TGF- $\beta$  受体有同样的结合部位,通过竞争性结合来干预 TGF- $\beta$  的表达,可以延缓肾小球纤维化的进程。所以,FK506 既有很强的抑制效果且不良反应较小,最终可能导致移植肾更为长期地存活。

## 参考文献

- [1] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone[J]. Immunol, 1986, 136(7): 2348-2357.
- [2] Athanassopoulos P, Vaessen LM, Maat AP, et al. Peripheral blood dendritic cells in human end-stage heart failure and the early post-transplant period: evidence for systemic Th1 immune responses [J]. Cardiothorac Surg, 2004, 25(4): 619-626.
- [3] 姚新生. Th<sub>1</sub> 和 Th<sub>2</sub> 研究概况[J]. 国外医学免疫学分册, 2002, 25(6): 290-293.
- [4] Bernard C, Lionel R, Francois B, et al. A three-arm study comparing immediate tacrolimus therapy with Anti thymocyte globulin induction therapy followed by Tacrolimus or Cyclosporine A in adult Renal transplant recipients[J]. Transplantation, 2003, 75(6): 844-885.
- [5] Briggs D, Dudley C, Pattison J, et al. Effects of immediate switch from cyclosporine microemulsion to tacrolimus at first acute rejection in renal allograft recipients[J]. Transplantation, 2003, 75(12): 2058-2063.
- [6] Raimund M. Efficacy and safety of tacrolimus compared with Cyclosporin microemulsion in renal transplantation; a randomised multi centre study[J]. Lancet, 2002, 359(9308): 741-746.
- [7] Richard T, Guido F, Nicholas JA, et al. Randomized trial of tacrolimus versus cyclosporine microemulsion in renal transplantation[J]. Pediatr Nephrol, 2002, 17(3): 141-149.
- [8] Ke B, Ritter T, Kato H, et al. Regulatory cells potentiate the efficacy of IL-4 gene transfer by up-regulating Th<sub>2</sub>-dependent expression of protective molecules in the infectious tolerance pathway in transplant recipients[J]. Immunol, 2000, 164(11): 5739-5745.
- [9] Saggi BH, Fisher RA, Bu D, et al. Intra-graft cytokine expression and tolerance induction in rat renal allografts[J]. Transplantation, 1999, 67(2): 206-210.
- [10] Bakker RC, Hollander AA, Mallat MJ, et al. Conversion from cyclosporine to azathioprine at three months reduces the incidence of chronic allograft nephropathy[J]. Kidney Int, 2003, 64(3): 1027-1034.