

血管化复合同种异体移植物的免疫细胞亚群变化及基因谱表达

王晨羽 丁文蕴 龙 笑 王晓军

摘 要 血管复合同种异体移植物 (vascular composite allotransplant, VCA) 可以对大面积组织缺损进行修复重建, 但移植后存在着严重的免疫排斥问题, 限制了其在临床上的广泛应用。VCA 移植后外周血及移植物中免疫细胞亚群的变化及相关基因谱的表达, 对于理解 VCA 排斥反应发生的免疫机制、寻找非侵袭性临床检查方法具有重要意义。

关键词 血管化复合同种异体移植物 免疫细胞 基因谱表达

中图分类号 R6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.08.006

在过去的 20 年中, 逐渐开始尝试使用由异体的皮肤、肌肉、肌腱、脂肪、血管、神经以及骨骼等多种组织组成的血管复合同种异体移植物 (vascular composite allotransplant, VCA) 对截肢、严重烧伤、颅面缺损、褥疮等原因导致的手部、面部和臀部等部位的大面积组织缺损进行移植修复重建^[1]。相较于传统的修复重建手术, VCA 可以有效改善局部和整体形态功能, 患者术后的满意度和生活质量明显提高。然而, VCA 移植术后存在着严重的免疫排斥问题, 其复合组织的耐受性, 特别是皮肤成分, 极具挑战性, 需要患者终身使用免疫抑制剂, 但仍常出现急性或慢性排斥反应 (上肢移植急性排斥率为 88%, 面部移植急性排斥率为 73%, 实体器官移植急性排斥率为 10% ~ 30%), 导致移植物死亡^[2,3]。有关 VCA 移植的免疫学机制是近年来研究的热点, 其中免疫细胞亚群的变化及相关基因谱表达的研究, 对于理解 VCA 排斥反应发生的免疫机制和研究相关非侵袭性检查具有重要意义。

一、VCA 免疫排斥机制

在 VCA 移植早期, 主要引起的是细胞介导的急性排斥反应, 亦是最常见、最主要的排斥反应, 其依赖于通过抗原的直接和间接途径来启动 T 细胞识别。最常见的形式为不匹配的 MHC 分子反应, 以 CD8⁺ 细胞释放诱导移植细胞凋亡的细胞毒素攻击移植细胞^[4]。随着淋巴组织中抗原的初始暴露, 抗体介导的免疫反应被激活。通过补体固定以及通过抗体

依赖性细胞毒性的发生, 以及自然杀伤细胞和巨噬细胞受体结合的抗体 Fc 区以诱导移植物细胞死亡^[5]。当移植物进入慢性反应期间, 炎症持续诱导内皮损伤, 继而产生慢性平滑肌细胞重塑机化, 形成外膜增厚、血管周围炎症和胶原蛋白过量沉积等病理改变^[6]。

二、免疫细胞亚群变化

目前来看, 对免疫细胞亚群进行定量分析可以借以评估移植后的机体免疫状态并有利于预防机会感染和恶性肿瘤。在肾脏和心脏移植的相关研究中发现, 外周循环中的记忆 T 细胞数量与急性排斥反应的发生风险密切相关^[7,8]。外周血中活化的 T 细胞裂解的细胞产物的浓度水平可以预测移植后患者出现严重移植排斥反应的概率^[9]。因此利用 VCA 的免疫细胞亚群的定量分析被认为是无创性临床检查技术发展的一个重要方向^[10]。

1. 外周血中的免疫细胞亚群: 由于 VCA 急性排斥反应主要依赖于具有细胞毒性的 T 细胞, 因此其亚群变化是首要的研究方向。有研究对 6 例接受全脸移植患者外周血中的淋巴细胞进行了表征, 发现效应记忆 T 细胞是 VCA 移植后淋巴细胞的主要亚群。CD4 效应记忆 T 细胞 (CD45RA⁺CCR7⁻) 是 CD4⁺ T 细胞中的主要表型, 而 CD8⁺ T 细胞中则由效应记忆 T 细胞 (CD45RA⁺CCR7⁻) 和 RA 效应记忆 T 细胞主导。在大多数患者中, 外周循环中主要的 T 辅助细胞 (T helper, Th) 类型是 Th2 细胞, 其次是 Th17 和 Th1 细胞。发生排斥反应前后外周血液中的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞数量没有显著变化, 效应记忆 T 细胞亦无明显减少 (CD45RA⁺CCR7⁻), 但 CD4⁺ 和 CD8⁺ 效

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFA0101003)

作者单位: 100073 中国医学科学院北京协和医院整形外科

通讯作者: 王晓军, 主任医师, 博士生导师, 电子信箱: pumchwxj@

yahoo.com

应记忆 RA T 细胞 ($CD45RA^+CCR7^-$) 均增加。排斥反应期间,调节性 T 细胞 ($CD4^+Foxp3^+$) 在移植中大量积累,导致外周循环中的调节性 T 细胞的数量减少^[11]。

抗体介导的排斥反应与 T 细胞介导的排斥反应的免疫学特征有所不同,在 T 细胞介导的排斥反应中, $CD8^+$ 群体中的 T 效应细胞数量增加,但是调节性 T 细胞数量没有变化。而在抗体介导的排斥反应中,外周循环中的 Th 细胞 ($CD4^+PD1^+CXCR5^+$) 和记忆 B 细胞 ($CD19^+CD27^+$) 数量均增加^[12]。

此外关于 VCA 和实体器官移植之间淋巴细胞亚群的差异也成为重要的研究方向。有研究比较了稳定的手部移植受者和稳定的肾脏移植受者外周血中的淋巴细胞亚群^[13]。稳定的肾脏移植受者的外周血中 B 细胞数量较健康人减少了 4 倍,而稳定的手移植受者的 B 细胞数量与健康人比较则变化不大。手移植受者外周血中的调节性 T 细胞 ($CD4^+CD25^+CD127^-$) 数量也与健康对照相似,但肾移植受者的调节性 T 细胞数量则显著减少。此外,手移植受者外周血中 $CD8^+$ 与 $CD28^-$ T 细胞数量亦显著增加。

2. 移植中的免疫细胞亚群:移植中与外周血中的免疫细胞亚群非常不同。与周围循环比较,VCA 移植物的皮肤中存在着更多的 T 细胞,特别是有更多的效应记忆 T 细胞,以及分布有多种 T 细胞受体,并具有特征性的 Th1 表型。VCA 移植物的皮肤中还有大量 $CD8^+$ 记忆 T 细胞^[14]。排斥移植物的供体 T 细胞中,超过 90% 是组织定居记忆性 T 细胞 (tissue-resident memory T cells, TRM) 表型 ($CD69^+CD103^+CLA^+$)^[15]。起初,当发生轻度排斥反应时,主要由 $CD3^+$ T 细胞浸润,并且 $CD8^+$ 细胞比 $CD4^+$ 细胞更为突出。真皮层内的 $CD3^+$ T 细胞的百分比和 $CD4/CD8$ 的比率会随时间而增加,而 $CD20^+$ B 细胞则较为稀少^[16]。转变为急性排斥反应时,大多数淋巴细胞是供体来源的 $CD8^+$ 记忆 T 细胞,并进一步表现为移植中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 和 $CD14^+$ 细胞的大量积聚^[11,15]。

移植体内与受者体内其他部位的免疫细胞亚群亦有所不同。以手部移植为例,与患者自身皮肤比较,移植物的皮肤具有更多的 $CD8^+$ 淋巴细胞和 $CD68^+$ 巨噬细胞,但没有 $CD4^+$ 细胞。不论是否发生排斥反应,均在 VCA 移植物的皮肤中发现了 $CD20^+$ B 细胞,却未在自身皮肤中发现这一现象^[17]。此外,VCA 移植物的真皮和表皮中的树突状细胞均增加。

班夫分级 (Banff grade) 1 级反应的患者移植真皮中的 $CD1a$ 细胞数量亦增加。在面部移植中,移植物的表皮中仅有树突状 $CD8^+$ T 细胞作为供体细胞,而在皮脂腺和血管周围则存在着 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞作为混合供体和受体。

三、基因谱表达

通过鉴定细胞或组织中信使 RNA 的全部或部分基因的表达情况,可以估计大量基因之间的关联性,并探寻调控基因。基因谱表达在诊断疾病或探索机体对治疗的反应机制中起着重要作用。基于基因谱表达的临床及临床前研究可以进一步加深对 VCA 分子免疫学机制的认识^[18]。

1. 排斥相关基因:在出现排斥反应的面部移植患者体内, γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 信号通路 (包括 IRF1 和 STAT1) 被激活,然后通过 CXCR3/CCR5 通路 (包括 CXCL9 和 CCL5) 产生趋化因子配体,继而上调负责募集细胞毒性细胞的基因的表达,激活由 $CD8^+$ 细胞毒性 T 细胞和自然杀伤细胞的基因表达 (包括 GZMB),实现免疫效应功能^[12]。在人和动物模型中,IFN- γ 已经被证明是同种异体移植排斥反应过程中促进炎症的关键因子,可以与肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 协同发挥作用,诱导 CXCR3 配体 (CXCL9、CXCL10、CXCL11) 和 CCR5 配体 (CCL3、CCL4、CCL5) 的表达。后两种配体是同种异体移植急性排斥反应中最常见的上调趋化因子。这些由树突状细胞、活化的巨噬细胞、内皮细胞和 NK 细胞分泌的趋化因子,又可促进 IFN- γ 的产生增加,从而进一步促进炎性刺激的放大和趋化因子分子的释放^[19]。

抗体介导的排斥 (antibody-mediated rejection, AMR) 和 T 细胞介导的排斥反应 (T cell-mediated rejection, TCMR) 的相关基因有所不同。AMR 与血管内皮基因如细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule, ICAM-1)、VCAM1 和 SELE 的过度表达有关,而 TCMR 的特征是与细胞毒性相关基因 GZMB 的表达上调有关^[12,20]。

基因谱表达显示,炎性皮肤病模型 (接触性超敏反应) 与急性皮肤排斥反应的发病机制有各自特征。皮肤中 CCL7、IL-1 β 、IL-18 和 TNF 的基因表达谱,在排斥反应模型与炎性皮肤病模型间存在明显差异。IL-12B、IL-17A 和 IL-1 β 基因表达水平在两种疾病模型之间比较,差异有统计学意义,并且表达水平与皮肤类型无关^[21]。

VCA 与实体器官移植的排斥反应基因谱也有所差异。与健康人比较,在手移植组中,排斥相关基因(CD8、IL-10、NOTCH1、PDCD1 和 TNF)明显上调。而肾脏移植组中,此类基因表达与健康人没有差异。此外,与肾脏移植组患者比较,手移植组中与排斥相关的基因(CD8、NOTCH、TNF)的表达水平也更高^[13]。

2. 耐受相关基因:叉头转录因子 3 (factor fork-head box 3, FOXP3) 的表达可影响调节性 T 细胞的功能,例如 CD25⁺FOXP3⁺T 调节细胞在人自身免疫疾病发病机制中起重要作用。在 VCA 相关研究中,发现 FOXP3 与吲哚胺 2,3-二加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)的表达水平与 VCA 排斥反应的严重程度密切相关^[22]。IDO 的表达在移植后 3 个月~1 年最强,随后出现 FOXP3⁺表达增多的趋势,表明 FOXP3 mRNA 水平与移植后的时间直接相关^[16,23]。Jindal 等^[24]对接受 hIL-2/Fc(一种持久的人白介素-2 融合蛋白)处理的大鼠出现急性排斥反应时进行了皮肤活检,并比较了调节基因 FOXP3 和效应基因 GZMB、IFN- γ 和 Prf1 的表达情况。结果显示,这些基因的表达情况与 VCA 的长期耐受情况完全相关,即在长期存活的可逆性排斥情况下具有更高的调节/效应基因比。但是,目前仍不清楚 FOXP3 是否可以通过未知的独立途径来调节免疫反应,对此尚需进一步研究。

糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor, GITR)是一种参与抑制调节 T 细胞的活性并延长 T 效应细胞的存活表面分子^[25]。与稳定的肾脏移植接受者以及健康人比较,稳定的手移植接受者体内 GITR 明显上调^[13]。与正常大鼠皮肤或同系移植植物比较,大鼠同种异体移植植物中白介素-18、TNF- α 、CCL7、CCL17、CX3CL1、CXCL9、CXCL10 和 CXCL11 的表达均显著上调,表明它们参与了适应性免疫反应^[26]。

3. 内皮黏附分子:目前研究显示,许多以内皮黏附分子可以作为 VCA 免疫反应中的炎症相关基因。ICAM-1 可以在白介素-1 和 TNF 诱导下由血管内皮、巨噬细胞和淋巴细胞表达,继而激活涉及多种激酶的级联信号转导来产生炎症趋化作用。E-选择素、P-选择素和 L-选择素可以起凝集素的作用,识别白细胞或内皮细胞表面的结构^[27]。Hautz 等^[16]发现,在出现轻度排斥反应的手移植患者体内,黏附分子如淋巴球功能性抗原 1(lymphocyte function -

associated antigen 1, LFA-1)、ICAM-1、E-选择素、P-选择素和 VE-钙黏着蛋白的表达上调,而对于 P-选择素,其表达随移植时间的延长而增加。此外,Win 等^[12]也发现,出现抗体介导的急性面部移植排斥反应的患者移植植物内表达增幅最大的是内皮黏附分子 ICAM-1。

四、展 望

实体器官移植的大量研究提示了外周循环中的记忆 T 细胞数量与急性排斥反应的发生风险密切相关。而 VCA 移植后,外周循环中效应记忆 T 细胞是淋巴细胞的主要亚群,Th2 细胞是主要的 T 辅助细胞类型。VCA 由于其自身免疫特性,与周围循环比较,VCA 移植物的皮肤中存在着数量更多的 T 细胞,具有更多样的效应记忆 T 细胞表型和 T 细胞受体,以及分布有特征性的 Th1 表型。基因谱表达方面,排斥相关基因主要包括 IFN- γ 通路、CXCR3 (CXCL9、CXCL10、CXCL11) 与 CCR5 (CCL3、CCL4、CCL5) 通路的相关基因,耐受相关基因主要为 FOXP3 和 GITR。内皮黏附分子在炎症趋化反应中发挥重要作用,代表是 ICAM-1、E-选择素、P-选择素和 L-选择素。

VCA 的免疫细胞亚群的变化及相关基因谱表达的临床研究对于理解 VCA 排斥反应发生的免疫机制和研究相关无创性检查具有重要意义。外周血中细胞产物的浓度水平、免疫细胞数量与表型的改变,相关排斥、耐受调节基因谱的表达变化,可以探索机体免疫反应的状态、预测移植后患者出现严重移植排斥反应的概率,研究个体对免疫治疗的反应机制,选择个性化免疫抑制方案。特别是在今后可据此开发非侵袭性的临床检测方式,实现在组织病理学检查前就可提示即将发生或已经发生排斥反应的目的。

参考文献

- 1 Wang HD, Fidler SJ, Miller DT, *et al.* Desensitization and prevention of antibody-mediated rejection in vascularized composite allotransplantation by syngeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Transplantation*, 2018, 102(4): 593-600
- 2 Thunat O, Badet L, Dubois V, *et al.* Immunopathology of rejection: do the rules of solid organ apply to vascularized composite allotransplantation? [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2015, 20(6): 596-601
- 3 Kadono K, Gruszynski M, Azari K, *et al.* Vascularized composite allotransplantation versus solid organ transplantation: innate-adaptive immune interphase [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2019, 24(6): 714-720
- 4 Li Z, Czechowicz A, Scheck A, *et al.* Hematopoietic chimerism and donor-specific skin allograft tolerance after non-genotoxic CD117

- antibody – drug – conjugate conditioning in MHC – mismatched allotransplantation[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 616
 - 5 Pan H, Zhao K, Wang L, *et al.* Mesenchymal stem cells enhance the induction of mixed chimerism and tolerance to rat hind – limb allografts after bone marrow transplantation[J]. J Surg Res, 2010, 160(2): 315 – 324
 - 6 Etra JW, Raimondi G, Brandacher G. Mechanisms of rejection in vascular composite allotransplantation [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2018, 23(1): 28 – 33
 - 7 Heidt S, San Segundo D, Shankar S, *et al.* Peripheral blood sampling for the detection of allograft rejection: biomarker identification and validation[J]. Transplantation, 2011, 92(1): 1 – 9
 - 8 Haskova Z, Izawa A, Contreras AG, *et al.* Organ – specific differences in the function of MCP – 1 and CXCR3 during cardiac and skin allograft rejection[J]. Transplantation, 2007, 83(12): 1595 – 1601
 - 9 Posselt AM, Vincenti F, Bedolli M, *et al.* CD69 expression on peripheral CD8 T cells correlates with acute rejection in renal transplant recipients[J]. Transplantation, 2003, 76(1): 190 – 195
 - 10 Zheng XF, Pei GX, Qiu YR, *et al.* Early monitoring of lymphocyte subsets in patients with hand allotransplantation[J]. Transplant Proc, 2002, 34(8): 3401 – 3404
 - 11 Borges TJ, O'malley JT, Wo L, *et al.* Codominant role of interferon – gamma – and interleukin – 17 – producing T cells during rejection in full facial transplant recipients[J]. Am J Transplant, 2016, 16(7): 2158 – 2171
 - 12 Win TS, Murakami N, Borges TJ, *et al.* Longitudinal immunological characterization of the first presensitized recipient of a face transplant [J]. JCI Insight, 2017, 2(13): e93894
 - 13 Kaminska D, Koscielska – Kasprzak K, Krajewska M, *et al.* Immune activation – and regulation – related patterns in stable hand transplant recipients[J]. Transpl Int, 2017, 30(2): 144 – 152
 - 14 Iske J, Nian Y, Maenosono R, *et al.* Composite tissue allotransplantation: opportunities and challenges[J]. Cell Mol Immunol, 2019, 16(4): 343 – 349
 - 15 Lian CG, Bueno EM, Granter SR, *et al.* Biomarker evaluation of face transplant rejection: association of donor T cells with target cell injury [J]. Mod Pathol, 2014, 27(6): 788 – 799
 - 16 Hautz T, Zelger B, Brandacher G, *et al.* Histopathologic characterization of mild rejection (grade I) in skin biopsies of human hand allografts[J]. Transpl Int, 2012, 25(1): 56 – 63
 - 17 Baran W, Koziol M, Wozniak Z, *et al.* Increased numbers of 6 – sulfo LacNAc (slan) dendritic cells in hand transplant recipients[J]. Ann Transplant, 2015, 20: 649 – 654
 - 18 Sicard A, Kanitakis J, Dubois V, *et al.* An integrated view of immune monitoring in vascularized composite allotransplantation [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2016, 21(5): 516 – 522
 - 19 Spivey TL, Uccellini L, Ascierto ML, *et al.* Gene expression profiling in acute allograft rejection: challenging the immunologic constant of rejection hypothesis[J]. J Transl Med, 2011, 9: 174
 - 20 Kollar B, Pomahac B, Riella LV. Novel immunological and clinical insights in vascularized composite allotransplantation[J]. Curr Opin Organ Transplant, 2019, 24(1): 42 – 48
 - 21 Wolfram D, Morandi EM, Eberhart N, *et al.* Differentiation between acute skin rejection in allotransplantation and T – cell mediated skin inflammation based on gene expression analysis[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 259160
 - 22 Hautz T, Brandacher G, Zelger B, *et al.* Indoleamine 2,3 – dioxygenase and foxp3 expression in skin rejection of human hand allografts [J]. Transplant Proc, 2009, 41(2): 509 – 512
 - 23 Eljaafari A, Badet L, Kanitakis J, *et al.* Isolation of regulatory T cells in the skin of a human hand – allograft, up to six years posttransplantation[J]. Transplantation, 2006, 82(12): 1764 – 1768
 - 24 Jindal R, Unadkat J, Zhang W, *et al.* Spontaneous resolution of acute rejection and tolerance induction with IL – 2 fusion protein in vascularized composite allotransplantation[J]. Am J Transplant, 2015, 15(5): 1231 – 1240
 - 25 Kaufman CL, Cascalho M, Ozyurekolu T, *et al.* The role of B cell immunity in VCA graft rejection and acceptance[J]. Hum Immunol, 2019, 80(6): 385 – 392
 - 26 Friedman O, Carmel N, Sela M, *et al.* Immunological and inflammatory mapping of vascularized composite allograft rejection processes in a rat model[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181507
 - 27 Moser B, Wolf M, Walz A, *et al.* Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control [J]. Trends Immunol, 2004, 25(2): 75 – 84
- (收稿日期:2020 – 04 – 01)
- (修回日期:2020 – 04 – 21)
-
- (接第 37 页)
- 20 石红霞, 马月玲, 尹璐, 等. 围绝经期女性高血压患者心脏结构、功能和血管功能状况及影响因素[J]. 中华高血压杂志, 2019, 27(6): 543 – 549
 - 21 Gerds E, Okin PM, de Simone G, *et al.* Gender differences in left ventricular structure and function during antihypertensive treatment: the losartan intervention for endpoint reduction in Hypertension Study [J]. Hypertension, 2008, 51(4): 1109 – 1114
 - 22 谭学瑞, 李玉光, 潘红星. 绝经后高血压患者超声心动图特征 [J]. 中国综合临床, 2005, 21(10): 873 – 875
 - 23 许维娜, 郭君萍. 围绝经期女性腹型肥胖与心血管疾病危险因素相关性研究[J]. 中国预防医学杂志, 2018, 19(2): 129 – 132
 - 24 De Simone G, Devereux RB, Chinali M, *et al.* Sex differences in obesity – related changes in left ventricular morphology: the Strong Heart Study[J]. J Hypertens, 2011, 29(7): 1431 – 1438
 - 25 Groban L, Tran QK, Ferrario CM, *et al.* Female heart health: is GPER the missing link? [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 919
- (收稿日期:2020 – 03 – 05)
- (修回日期:2020 – 03 – 06)