

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.23.015

肾移植后恶性肿瘤患者调节性免疫细胞的变化研究

董 成 卢恒志 白 剑 毕丽丽 王文桥[△]

(解放军总医院第八医学中心 北京 100091)

摘要 目的:探讨肾移植后发生恶性肿瘤患者调节性免疫细胞的变化。**方法:**收集 2010 年 5 月-2018 年 3 月来我院进行肾移植手术的患者,肿瘤组共 20 例患者,病理诊断为肾脏及输尿管恶性肿瘤,对照组共 20 例患者,移植肾功能稳定;分离各组患者外周血淋巴细胞,流式细胞术检测调节性 T 细胞(Treg 细胞)、调节性 B 细胞(Breg 细胞)和滤泡调节性 T 细胞(Tfr 细胞)的比例。**结果:**流式细胞学检测的结果发现,淋巴细胞中 CD4⁺T 细胞比例在对照组和肿瘤组之间没有显著的差别 ($P>0.05$),肿瘤组中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例显著的高于对照组,增加了 1.29 倍($P<0.05$);CD19⁺B 细胞比例在对照组和肿瘤组之间没有显著的差别($P>0.05$),肿瘤组中 CD19⁺TGF- β +Breg 细胞比例显著的高于对照组,增加了 2.69 倍($P<0.05$);肿瘤组中 CD4⁺CXCR5⁺Foxp3⁺Tfr 细胞比例显著的高于对照组,增加了 2.74 倍($P<0.05$)。**结论:**肾移植后发生恶性肿瘤患者外周血中 Treg 细胞、Tfr 细胞和 Breg 细胞比例均显著升高,我们的研究为肾移植后临床用药和免疫状态的检测提供了一定的理论依据。

关键词:肾移植;调节性免疫细胞;恶性肿瘤

中图分类号:R692.5;R617;R730.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)23-4466-04

Changes of Regulatory Immune Cells in Patients with Malignant Tumor after Renal Transplantation

DONG Cheng, LU Heng-zhi, BAI Jian, Bi Li-li, WANG Wen-qiao[△]

(The 8th medical center of Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100091, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the changes of regulatory immune cells in patients with malignant tumor after renal transplantation. **Methods:** The patients who underwent renal transplantation in our hospital from May 2010 to March 2018 were collected. A total of 20 patients in the tumor group were diagnosed as malignant tumors of the kidney and ureter. Peripheral blood lymphocytes were isolated from each group, and regulated T cells (Treg cells), regulatory B cells (Breg cells) and follicular regulatory T cells (Tfr cells) were detected by flow cytometry. **Results:** The results of flow cytometry showed that there was no significant difference in the proportion of CD4⁺T cells between the control group and the tumor group ($P>0.05$). The proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells in the tumor group was significantly higher than that in the control group, which increased by 1.29 times ($P<0.05$). There was no significant difference in the proportion of CD19⁺B cells between the control group and the tumor group ($P>0.05$). The proportion of CD19⁺TGF- β +Breg cells in the tumor group was significantly higher than that in the control group, and increased by 2.69 times ($P<0.05$). The proportion of CD4⁺CXCR5⁺Foxp3⁺Tfr cells in the tumor group was significantly higher than that in the control group, which was 2.74 times higher than that in the control group ($P<0.05$). **Conclusion:** The proportion of Treg cells, Tfr cells and Breg cells in peripheral blood of patients with malignant tumor after renal transplantation is significantly increased. Our study provides a certain theoretical basis for the detection of clinical medication and immune status after renal transplantation.

Key words: Kidney transplantation; Regulatory immune cells; Malignant tumor

Chinese Library Classification(CLC): R692.5; R617; R730.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)23-4466-04

前言

肾移植是治疗终末期肾病最有效的治疗方法,近几年显微外科手术技术的提高和免疫抑制药物的使用使得移植肾的长期存活率显著提高^[1]。免疫抑制药物抑制了机体的免疫系统,降低了免疫细胞的免疫监视,使得肾移植患者恶性肿瘤的发病率

显著的高于正常人群,因此监测机体免疫状态对于恶性肿瘤的预测具有十分重要的意义^[2-4]。调节性免疫细胞是机体内存在的一类具有免疫抑制功能的 T 细胞或者 B 细胞,主要包括滤泡调节性 T 细胞(Follicular regulatory T cells, Tfr 细胞)、调节性 B 细胞(Regulatory B cells, Breg 细胞)和调节性 T 细胞(Regulatory T cells, Treg 细胞)^[5]。许多研究发现免疫抑制药物等可以促进 Treg 细胞增殖,进而发挥免疫抑制作用,而对 Tfr 细胞的影响目前的研究还很少^[6]。本文拟研究肾移植后恶性肿瘤患者调节性免疫细胞的变化,以期对器官移植的临床用药提供理论指导。

1 材料与方法

作者简介:董成(1972-),硕士,副主任医师,研究方向:泌尿外科,电话:010-66775011, E-mail: xzdongcheng@163.com

[△] 通讯作者:王文桥, E-mail: wangwenqiao1978@163.com

(收稿日期:2018-06-10 接受日期:2018-07-06)

1.1 患者资料及分组

我们选择 2010 年 5 月-2018 年 3 月来解放军第 309 医院进行肾脏移植手术的患者。病例纳入标准如下:受者的年龄为 18-70 岁;排除合并艾滋病、梅毒和乙肝病毒等感染患者;排除合并高血压、全身代谢性疾病和自身免疫性疾病等慢性疾病患者;排除长期酗酒和吸烟患者。肿瘤组共 20 例患者,病理诊断为肾脏及输尿管恶性肿瘤;对照组共 20 例患者,移植肾功能稳定,未检测恶性肿瘤的发生。

1.2 Treg 细胞的检测

采用人淋巴细胞分离液分离对照组和肿瘤组患者外周血淋巴细胞。分离的淋巴细胞重悬后,加入 CD4 和 CD25 的流式细胞学检测抗体(美国 BD 公司),室温脱色摇床上孵育 15 min 后,PBS 清洗。之后加入细胞内染色的破膜试剂,4 度冰箱中孵育 3 h。PBS 清洗 3 次后,加入 Foxp3 流式细胞学染色抗体(美国 BD 公司),室温避光孵育 15 min,PBS 清洗 3 次后进行流式细胞学检测。

1.3 Breg 细胞的检测

分离的淋巴细胞重悬后,加入 CD19 抗体(美国 BD 公司),室温脱色摇床上孵育 15 min 后,PBS 清洗 3 次。之后加入细胞内染色的破膜试剂,4 度冰箱中孵育 3 h。PBS 清洗,加入转化生长因子- β (TGF- β)流式细胞学染色抗体(美国 BD 公司),室温避光孵育 15 min,PBS 清洗 3 次后进行流式细胞学检测。

1.4 Tfr 细胞的检测

分离的淋巴细胞重悬后,加入 CD4 和 CXCR5 的流式细胞

学检测抗体(美国 BD 公司),室温脱色摇床上孵育 15 min 后,PBS 清洗。之后加入细胞内染色的破膜试剂,4 度冰箱中孵育 3 h。PBS 清洗 3 次后,加入 Foxp3 流式细胞学染色抗体(美国 BD 公司),室温避光孵育 15 min,PBS 清洗 3 次后进行流式细胞学检测。

1.5 统计学分析

实验数据以 $\text{Mean} \pm \text{SE}$ 表示。SPSS19.0 软件被用来进行数据的统计分析,采用 t 检验进行两个组之间的统计学比较, $P < 0.05$ 被认为结果有统计学差异。

2 结果

2.1 患者的一般资料

对照组共有 20 例肾移植患者,患者的年龄在 26 岁至 67 岁之间,平均年龄为 (45.3 ± 10.1) 岁;肿瘤组包括 20 名肾移植后发生恶性肿瘤患者,年龄在 29 岁至 69 岁之间,平均为 (49.6 ± 13.4) 岁。通过对比年龄、性别、药物的类型、血药浓度和肾移植术后时间等基本资料,经过统计学分析,两者之间差异均没有统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 肿瘤组患者 Treg 细胞的比例显著升高

CD4+T 的辅助性 T 细胞比例在对照组和肿瘤组之间差异没有显著的统计学差异 ($P > 0.05$);肿瘤组中 CD4+CD25+Foxp3+ 的 Treg 细胞比例显著的高于对照组,增加了 1.29 倍,结果具有统计学差异($P < 0.05$)。(图 1)

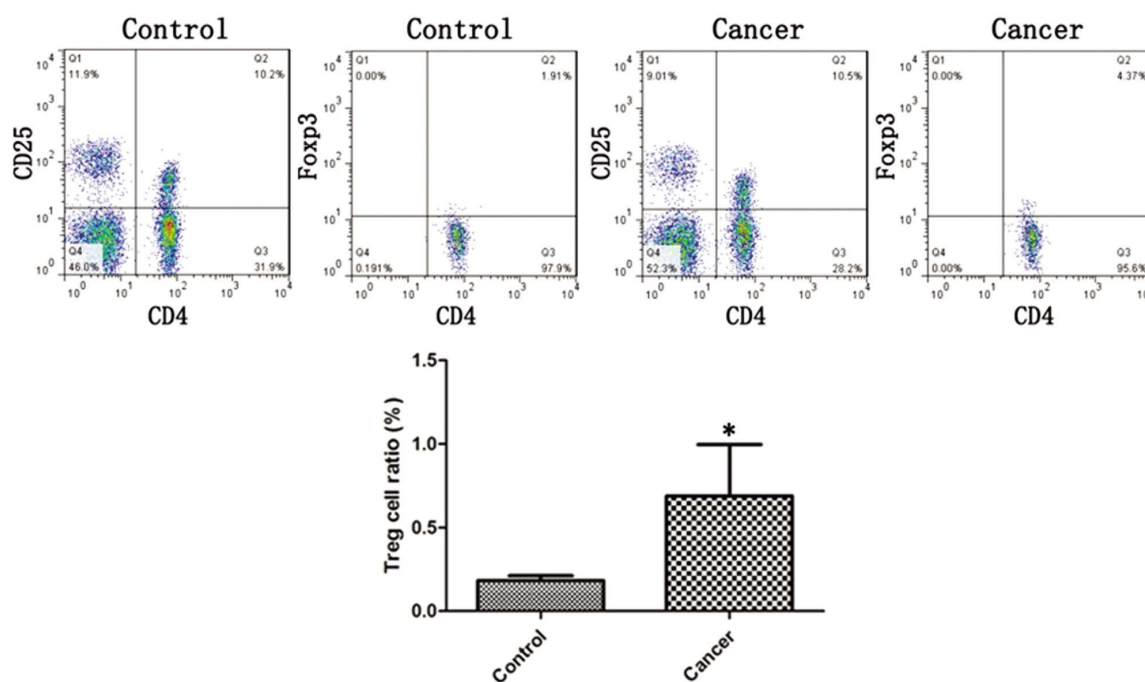


图 1 肿瘤组患者 Treg 细胞的比例显著升高 (* VS Control, $P < 0.05$)

Fig.1 The proportion of Treg cells in tumor group was significantly increased (* VS Control, $P < 0.05$)

2.3 肿瘤组患者 Breg 细胞的比例显著升高

流式细胞学检测的结果发现,CD19+B 细胞比例在对照组和肿瘤组之间差异没有显著的统计学差异 ($P > 0.05$);肿瘤组中 CD19+TGF- β +Breg 细胞比例明显高于对照组,增加了 2.69

倍,差异明显($P < 0.05$)。(图 2)。

2.4 肿瘤组患者 Tfr 细胞的比例显著升高

肿瘤组中 CD4+CXCR5+Foxp3+Tfr 细胞比例显著升高,相对于对照组,增加了 2.74 倍,两组之间差异明显($P < 0.05$)。(图 3)。

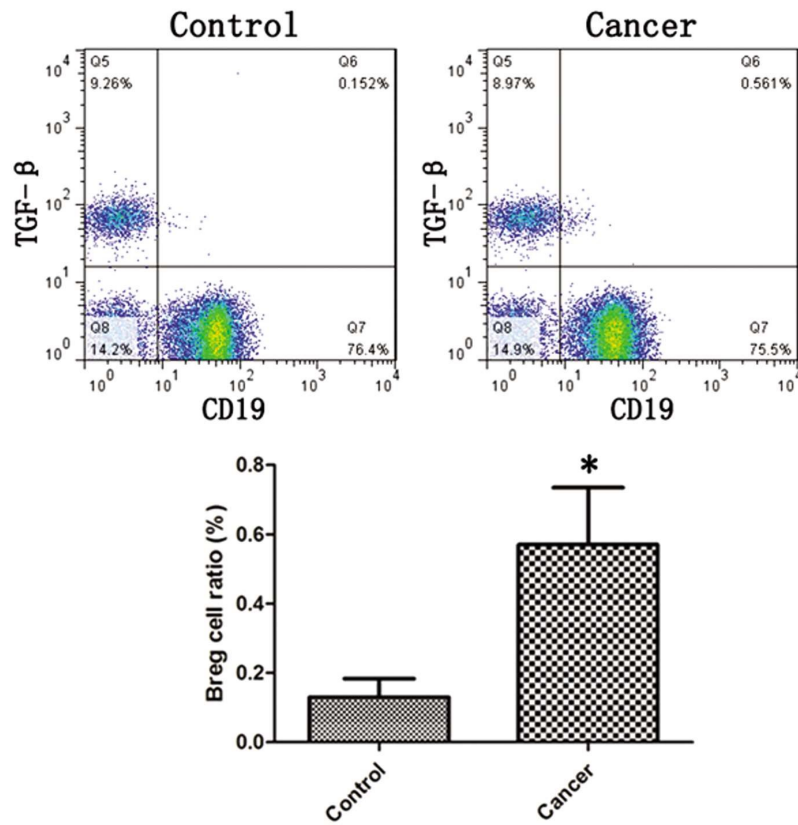


图2 肿瘤组患者 Breg 细胞的比例显著升高 (* VS Control, P<0.05)

Fig.2 The proportion of Breg cells in tumor group was significantly increased (* VS Control, P < 0.05)

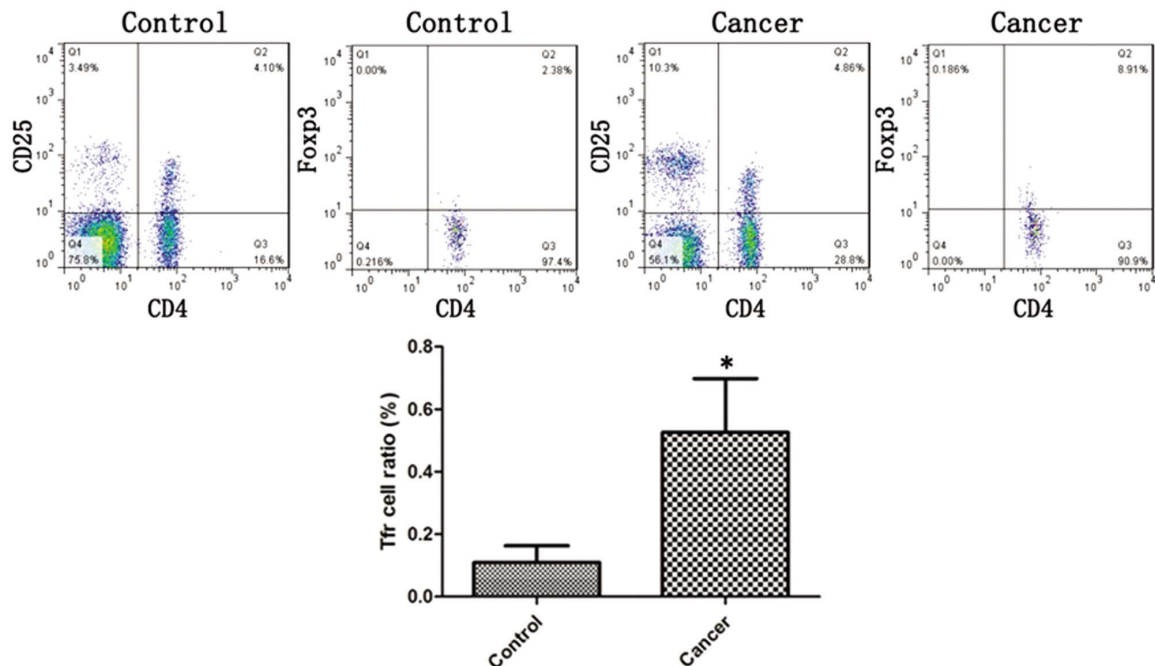


图3 肿瘤组患者 Tfr 细胞的比例显著升高 (* VS Control, P<0.05)

Fig.3 The proportion of Tfr cells in tumor group was significantly increased (* VS Control, P < 0.05)

3 讨论

器官移植是治疗各种终末期器官疾病最为有效的手段。新型免疫抑制剂的使用显著降低了急性排斥反应的发生,使得肾脏移植患者的长期存活率显著提高。然而随着肾脏移植时间的延长,移植后肿瘤发生的风险也显著增加^[7]。肾脏移植后免疫抑

制剂的使用显著的增加了恶性肿瘤的发生风险。同时肾移植前的基础疾病如尿毒症等,能够严重影响患者的细胞免疫和体液免疫,也是恶性肿瘤的高发人群^[8]。统计发现肾移植后恶性肿瘤的发病率约为普通人群的 3-5 倍,因此寻找肾移植后恶性肿瘤的检测指标对于指导临床用药和免疫监测具有十分重要的意义^[9]。

Treg 细胞是介导细胞免疫的主要负性细胞,能够通过直接

细胞接触和分泌免疫抑制分子,诱导移植肾的免疫耐受。Treg 细胞的联合移植能够有效的延长移植物的生存时间和减少免疫抑制药物的使用剂量^[10-13]。然而 Treg 细胞抑制了 T 细胞免疫,帮助肿瘤细胞逃脱免疫监视,促进肿瘤的发生发展和转移。尿路上皮癌和肝癌等患者外周血中 Treg 细胞的比例显著增加,这说明 Treg 细胞与恶性肿瘤细胞的发生紧密相关^[14,15]。我们的结果显示肾移植后恶性肿瘤发生的患者外周血中的 Treg 细胞比例明显升高。Treg 细胞比例的增加一方面可以更好的诱导移植物的免疫耐受,但是却增加了患者感染和发生恶性肿瘤的风险,因此监控外周血中 Treg 细胞比例对于预测肾移植后恶性肿瘤的发生具有十分重要的意义。

抗体介导的排斥反应是影响移植肾长期存活的重要原因,滤泡辅助性 T 细胞和 B 细胞在这个过程中发挥着至关重要的作用。滤泡辅助性 T 细胞能够通过分泌 IL-21 促进 B 细胞增殖分化为浆细胞^[16-19]。Tfr 细胞和 Breg 细胞是体液免疫的主要负性调节细胞,Breg 细胞能够分泌 IL-10 和 TGF- β 等免疫耐受因子,通过分泌的形式抑制 B 细胞增殖和分化。Tfr 细胞具有负向调节体液免疫的作用,通过细胞间直接接触或者分泌免疫耐受因子方式抑制 Tfh 细胞的分化,进而调控 B 细胞的增殖分化。Tfr 细胞和 Breg 细胞比例的增加能够显著的抑制肾移植后抗体介导排斥反应。体液免疫与恶性肿瘤的发生紧密相关^[20-23]。我们的研究发现肾移植发生恶性肿瘤患者外周血中的 Tfr 细胞和 Breg 细胞比例显著的高于对照组。一方面可以诱导移植肾的长期存活,降低抗体介导的排斥反应的发生率,另一方面却能促进肿瘤的发生发展和转移,因此进行实时监测维持机体免疫系统的平衡有利于预防肾移植后恶性肿瘤的发生。

综上,肾移植后发生恶性肿瘤患者外周血中 Treg 细胞、Tfr 细胞和 Breg 细胞比例均显著升高,我们的研究为肾移植后临床用药和免疫状态的检测提供了一定的理论依据。

参考文献(References)

- [1] Webster P, Lightstone L, McKay D B, et al. Pregnancy in chronic kidney disease and kidney transplantation[J]. *Kidney International*, 2017, 91(5): 1047
- [2] Dharnidharka V R, Naik A S, Axelrod D, et al. Clinical and Economic Consequences of Early Cancer after Kidney Transplantation in Contemporary Practice[J]. *Transplantation*, 2017, 101(4): 858-866
- [3] Opelz G, Döhler B. Influence of Current and Previous Smoking on Cancer and Mortality After Kidney Transplantation [J]. *Transplantation*, 2016, 100(1): 227
- [4] Lim W H, Russ G R, Wong G, et al. The risk of cancer in kidney transplant recipients may be reduced in those maintained on everolimus and reduced cyclosporine [J]. *Kidney International*, 2017, 91 (4): 954-963
- [5] 石炳毅. 调节性免疫细胞网络在移植免疫中的作用[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(44): 3154-3157
- [6] Shi Bing-yi. Role of regulatory immune cell network in transplantation immunology [J]. *National Medical Journal of China*, 2011, 91 (44): 3154-3157
- [7] Miroux C, Morales O, Ghazal K, et al. In vitro effects of cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function[J]. *Transplantation*, 2013, 94(2): 123-131
- [8] Couzi L, Levaillant Y, Jamai A, et al. Cytomegalovirus-induced gamma-delta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2010, 21(1): 181-188
- [9] Euvrard S, Morelon E, Rostaing L, et al. Sirolimus and secondary skin-cancer prevention in kidney transplantation [J]. *New England Journal of Medicine*, 2012, 367(4): 329
- [10] Kyoung Woon Kim, Byung Ha Chung, Kim B M, et al. The effect of mTOR inhibition on Th17 and Treg differentiation in vitro, and in vivo, in kidney transplant recipients[J]. *Immunology*, 2014, 144(1): 68-78
- [11] Li J, Lai X, Liao W, et al. The dynamic changes of Th17/Treg cytokines in rat liver transplant rejection and tolerance [J]. *International Immunopharmacology*, 2011, 11(8): 962-967
- [12] Qin Q, Luo D, Shi Y, et al. CD25 siRNA induces Treg/Th1 cytokine expression in rat corneal transplantation models[J]. *Experimental Eye Research*, 2016, 151: 134-141
- [13] Miyairi S, Hirai T, Ishii R, et al. Donor bone marrow cells are essential for iNKT cell-mediated Foxp3+ Treg cell expansion in a murine model of transplantation tolerance[J]. *European Journal of Immunology*, 2017, 47(4): 734
- [14] Samid M A A, Chaudhary B, Khaled Y S, et al. Combining FoxP3 and Helios with GARP/LAP markers can identify expanded Treg subsets in cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12): 14083-14094
- [15] Wu M, Chen X, Lou J, et al. TGF- β 1 contributes to CD8+ Treg induction through p38 MAPK signaling in ovarian cancer microenvironment[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 44534-44544
- [16] Vinuesa C G, Linterman M A, Yu D, et al. Follicular Helper T Cells [J]. *Annual Review of Immunology*, 2016, 34(1): 335
- [17] Banga R, Procopio F A, Noto A, et al. PD-1+ and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals[J]. *Nature Medicine*, 2016, 22(7): 754-761
- [18] Wu H, Chen Y, Liu H, et al. Follicular regulatory T cells repress cytokine production by follicular helper T cells and optimize IgG responses in mice [J]. *European Journal of Immunology*, 2016, 46(5): 1152-1161
- [19] Chevalier N, Macia L, Tan J K, et al. The Role of Follicular Helper T Cell Molecules and Environmental Influences in Autoantibody Production and Progression to Inflammatory Arthritis in Mice[J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2016, 68(4): 1026-1038
- [20] Chung Y, Tanaka S, Chu F, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions [J]. *Nature Medicine*, 2015, 17(8): 983-988
- [21] Linterman M A, Pierson W, Lee S K, et al. Foxp3 follicular regulatory T cells control T follicular helper cells and the germinal center response[J]. *Nature Medicine*, 2012, 17(8): 975-982
- [22] Liu C, Wang D, Song Y, et al. Increased circulating CD4+CXCR5+FoxP3+ follicular regulatory T cells correlated with severity of systemic lupus erythematosus patients[J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 56: 261
- [23] Mavropoulos A, Simopoulou T, Varna A, et al. Breg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients With Systemic Sclerosis[J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2016, 68(2): 494-504