

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.13.011

长期肾移植受者外周血 B 淋巴细胞亚群分布特征 *

王 泳^{1#} 张汝霖^{2#} 康 玫³ 王 杨^{4,5} 邱建新^{1Δ}

(1 上海市第一人民医院泌尿外科 上海 200080; 2 上海市第一人民医院检验科 上海 200080;

3 上海市第一人民医院 临床研究中心 上海 200080; 4 上海交通大学数学科学学院 上海 201109;

5 上海交通大学与耶鲁大学联合生物统计中心 上海 201109)

摘要 目的:观察移植肾功能稳定的长期受者(>10 年)外周血 B 细胞亚群分布特征及其相关因素。**方法:**54 名肾移植受者接受流式细胞仪检查,测算外周血总 B 细胞、未转化记忆 B 细胞、转化记忆 B 细胞、双阴性 B 细胞(CD19⁺CD27IgD⁻)比例及数量(个/微升)。患者均服用包括环孢霉素的免疫抑制治疗。术后时间 16.33±5.98 年,GFR:91.63±11.28 mL/min/1.73 m²。**结果:**1 长期肾移植患者外周血 B 细胞中幼稚 B 细胞最多(37.92%±22.06%),未转化记忆 B 细胞最少(16.23%±11.10%)。B 细胞亚群数量与白细胞总数、中性粒细胞比例等相关。2 以上述条件为控制因素行相关分析,转化记忆 B 细胞比例和 GFR 相关($r=-0.279, P=0.045$),双阴性 B 细胞数量和环孢霉素浓度相关($r=-0.300, P=0.029$)。线性回归显示双阴性 B 细胞数目与环孢霉素浓度相关($R^2=0.123, P=0.049$)。3 按 GFR 将患者分为肾功能减退组(GFR<90 mL/min/1.73 m², n=19)和肾功能正常组(GFR≥90 mL/min/1.73 m², n=35)。前者转化记忆 B 细胞比例显著升高(23.61%±10.96% vs. 17.48%±8.91%, $P=0.030$)。按环孢霉素谷浓度将患者分为低浓度组(<64 mmol/L, n=28)和高浓度组(≥64 mmol/L, n=26),前者双阴性 B 细胞数量显著升高(13.74±10.70 vs. 8.14±6.72/μL, $P=0.027$)。转化记忆 B 细胞比例与 GFR 分组相关($r=-0.326, P=0.018$),双阴性 B 细胞数量和环孢霉素浓度分组相关($r=-0.350, P=0.01$)。**结论:**移植肾功能稳定的长期存活受者(>10 年)外周血幼稚 B 细胞较多。转化记忆 B 细胞增多与移植肾功能减退相关,增多的双阴性 B 细胞和低环孢霉素浓度治疗相关。

关键词:肾移植;长期存活受者;B 淋巴细胞亚群

中图分类号:R617;R692 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)13-2451-09

Peripheral B Lymphocyte Phenotype Analysis in Long-term Survival Allograft Kidney Transplant Recipients*

WANG Yong^{1#}, ZHANG Ru-lin^{2#}, KANG Mei³, WANG Yang^{4,5}, QIU Jian-xin^{1Δ}

(1 Department of Urology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai, 200080, China;

2 Department of Examination, Shanghai First People's Hospital, Shanghai, 200080, China;

3 Clinical Research Center of Shanghai First People's Hospital, Shanghai, 200080, China;

4 School of Mathematics, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 201109, China;

5 Department of Statistics, SJTU-Yale Joint Centre for Biostatistics, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 201109, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the peripheral B lymphocyte phenotype in long-term survival allograft kidney transplant recipients. **Methods:** Peripheral B lymphocyte phenotype was detected in 54 Allograft kidney transplant recipients. The number (/ μ L) and percentage of total B cell, unswitched memory B cell, switched B cell, double negative B cell (CD19⁺CD27IgD⁻) were recorded, respectively. The average estimated Glomerular Filtration Rate (GFR) was 91.63±11.28 mL/min/1.73 m². The average time(years) after kidney transplant was 16.33±5.98 years. All patients had the same immunosuppressant treatment including cyclosporine. **Results:** 1 Naïve B cells predominated in the peripheral B lymphocytes(37.92%±22.06%), while unswitched B cells were the least(16.23%±11.10%). The number of B lymphocytes subtypes correlated with the number of peripheral leukocytes and the percentage of neutrophils. 2 Correlation analysis indicated that, the percentage of switched B cells related to GFR ($r=-0.279, P=0.045$). Besides, the number of double negative B cells related to the trough level of cyclosporine ($r=-0.300, P=0.029$). Linear regression analysis indicated that the number of double negative B cells correlated with cyclosporine($R^2=0.123, P=0.049$). 3 Patients in the impaired allograft function team(GFR<90 mL/min/1.73 m²,

* 基金项目:上海市卫生健康委员会面上项目(20114245);上海交通大学 STAR 计划项目(Trans-med Awards Research)

为共同第一作者

作者简介:王泳(1976-),男,博士,主治医师,研究方向:泌尿外科肿瘤,肾移植,电话:13818228434, E-mail: yong.wang@shsmu.edu.cn;

张汝霖(1986-),男,硕士,主管技师,研究方向:肿瘤复发基因的相关研究,电话:13585604544

Δ 通讯作者:邱建新,男,博士,主任医师,主要研究方向:泌尿外科肿瘤,肾移植, E-mail: jasonqiu@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2020-12-28 接受日期:2021-01-23)

n=19) had higher percentage of switched memory B cells($23.61\% \pm 10.96\%$ vs. $17.48\% \pm 8.91\%$, $P=0.030$) than the normal allograft function team (GFR ≥ 90 mL/min/1.73 m², n=35). Patients with lower cyclosporine trough level (<64 mmol/L, n=28) had more double negative B cells (13.74 ± 10.70 vs. $8.14 \pm 6.72/\mu\text{L}$, $P=0.027$) than the higher cyclosporine trough level patients(≥ 64 mmol/L, n=26). The percentage of switched memory B cells correlated with the normal/impaired allograft function team($r=-0.326$, $P=0.018$). The number of double negative B cells correlated with the higher/lower cyclosporine team($r=-0.350$, $P=0.01$). **Conclusions:** In the long-term survival kidney transplant patients with stable allograft function, naive B cells predominated in the peripheral B lymphocytes. Switched memory B cells correlate with impaired allograft kidney function. Increased double negative B cells correlate with low cyclosporine trough level.

Key words: Allograft kidney transplant; Long term survival; B lymphocyte phenotype

Chinese Library Classification(CLC): R617; R692 **Document cod:** A

Article ID: 1673-6273(2021)13-2451-09

前言

抗体介导排斥 (Antibody Mediated Rejection, AMR) 是影响肾移植预后的重要因素^[1-3]。B 细胞及供体特异性抗体 (Donor Specific Antibody, DSA) 是 AMR 的核心要素。针对 B 细胞分化和功能的各种新型药物 (Rituximab、Bortezomib、Eculizumab 等) 不断开发应用于临床, 是肾移植临床研究非常活跃的领域之一^[4]。

B 细胞具有抗原递呈、免疫调节等多种功能^[4,5]。B 细胞功能多样性体现于各个分化亚群的不同功能, 而各分化亚群又有不同的淋巴细胞表型特征 (CD19 之外 CD27、IgG、IgM、IgD 等表达不同)。观察并分析外周血 B 细胞表型分布, 可以从侧面观察各个 B 细胞亚群参与疾病的特征, 为研究病因和治疗提供参考。

B 细胞参与多种自身免疫性疾病^[6], 外周血 B 细胞亚群分布与病情变化相关。转化记忆 B 细胞通过分泌炎症因子、合成自身免疫性抗体等方式参与类风湿性关节炎致病^[7], 表现为患者转化记忆 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺IgD⁺) 增多, 而未转化记忆 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺IgD⁺) 数量减少, 且功能受限^[8]。系统性红斑狼疮患者也有未转化记忆 B 细胞减少现象^[9]。与上述两种疾病不同, IgA 肾病患者中未转化记忆 B 细胞增多, 伴有 IL-6 和浆母细胞 (Plasmablast) 增多^[10]。

肾移植患者外周血 B 细胞亚群分布与急性排斥反应及移植肾存活相关。过渡性 B 细胞 (Transitional B cell) 中 T1/T2 细胞比例是移植肾失功的独立风险因素, T1/T2 比例高的患者移植肾存活明显优于低比例患者^[11]。而术后三个月外周血过渡性 B 细胞数量和急性排斥反应风险负相关^[12]。

为了进一步研究肾移植患者外周血 B 淋巴细胞亚群的分布特征, 及其与移植肾功能、免疫抑制治疗的关系, 我们设计并完成了目前研究。

1 材料与方法

1.1 临床资料

在上海市第一人民医院接受同种异体肾移植, 门诊稳定随访超过 10 年的患者 54 人。患者接受检测前三个月内血肌酐升高不大于前一次检查水平的 15%; 三个月内未更换免疫抑制剂治疗方案, 三个月内无急性排斥反应诊断及治疗记录; 纳入研究时无活动性感染。

54 名患者均服用霉酚酸制剂 (mycophenolic acid, MPA)、环孢霉素胶囊 (新山地明)、激素 (强的松或甲泼尼龙) 三联药物

治疗对象。霉酚酸制剂包括包括吗替麦考酚酯胶囊 (骁悉) 和麦考酚钠肠溶片 (米芙)。

1.2 样品处理和检测

收集外周血, 用 Ficoll-Paque 法分离外周血单个核细胞行荧光试剂标记。荧光试剂配色方案: CD4-FITC、CD8-ECD、CD25-PC5、CD127-PE、CD19-PC5、CD45-PC7、IgM-FITC、IgD-PE (Beckman Coulter Life Science), CD27-Percp/cy5.5 (BioLegend)。按照献报道方法^[3,9,10]标记淋巴细胞: CD45⁺ 细胞里 CD19⁺ 细胞为 B 细胞、CD3⁺ 细胞为 T 细胞。CD45⁺CD19⁺ 细胞内计数下列细胞: 幼稚 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺IgD⁺)、未转化记忆 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺IgD⁺)、转化记忆 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺IgD⁺)、双阴性 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺IgD⁺)。CD45⁺CD3⁺ 细胞内计数 Treg 细胞 (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low})、CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞。以 BD (FACS Canto II) 流式细胞仪检测样品中上述细胞比例, 同时添加荧光计数微球, 计算每单位 (μL) 样品内各细胞数量。

1.3 临床资料分析和整理

取样当日检测患者肾功能和环孢霉素谷浓度 (C0)。根据性别、年龄、血肌酐, 以 EPI 公式计算肾小球滤过率。纳入研究者均服用环孢霉素、霉酚酸制剂 (吗替麦考酚酯胶囊或麦考酚钠肠溶片)、激素 (甲强龙和甲泼尼龙) 三联药物。为便于比较分析, 将麦考酚钠肠溶片和吗替麦考酚酯胶囊等量换算为 "MPA", 将强的松和甲泼尼龙等量换算为 "激素"。

1.4 统计学方法

描述性分析时, 计量资料以均值 $\pm$ 标准差进行描述, 计数资料采用频数、百分比进行描述。单因素分析中, 计量资料先行正态性检验, 符合正态分布的使用 t 检验, 不符合正态性分布的使用非参数检验。相关性分析采用 pearson 法 /spearman 法。可能影响检查结果的因素 (年龄、性别、GFR、环孢霉素浓度、白细胞计数、中性粒细胞比例等) 列入控制因素行偏相关分析。使用 SPSS 19.0 进行统计学分析。

2 结果

2.1 入组受者基本情况

共有 54 名肾移植受者 (男 =28, 女 =26) 纳入研究, 其基本情况如表 1 和图 1 所示。受者年龄 31~74 岁 (55.33 ± 9.54), 术后时间 5-32 年 (16.33 ± 5.98)。54 名患者中 9 人接受术前诱导治疗, 4 人术后早期 (术后第 4 日~21 日) 出现排斥反应并接受抗排斥治疗。4 人术后 (第 2 个月~4 个月) 曾因肺部感染入院

治疗,治愈后出院。

所有受者均服用环孢霉素、MPA 制剂(麦考酚钠肠溶片或吗替麦考酚酯胶囊)和激素治疗。环孢霉素谷浓度:10.50~125.40 ng/mL (64.28 ± 24.27 ng/mL)。患者每日 MPA 剂量 2-8 粒 (5.87 ± 1.55 粒),每日激素剂量 1-4 粒 (1.76 ± 0.59 粒)。以 EPI 公式计算患者 GFR: $62.77 \sim 115.61$ mL/min/1.73 m² (91.63 ± 11.28)。

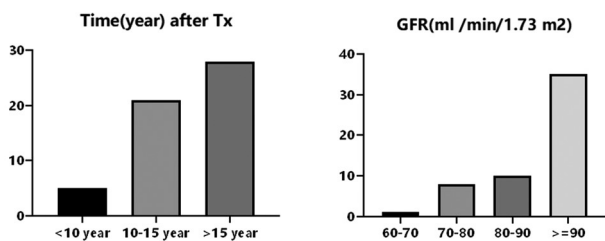


图 1 长期存活肾移植患者背景资料(n=54)

Fig.1 Background of long-term survival kidney transplant recipients (n=54)

Tx: kidney transplant

2.2 外周血淋巴细胞亚群基本特征

流式细胞仪检测图样如图 2 所示。如表 1 所示,54 名长期肾移植患者外周血 B 细胞中幼稚 B 细胞最多 ($37.92\% \pm 22.06\%$),而未转化记忆 B 细胞最少($16.23\% \pm 11.10\%$)。转化记忆 B 细胞 ($19.63\% \pm 10.02\%$) 和双阴性 B 细胞 ($18.01\% \pm 7.96\%$)比例类似。T 淋巴细胞方面,CD4⁺T 细胞略多于 CD8⁺T 细胞,Treg 细胞比例 $0.27\% \sim 9.46\%$ ($4.19\% \pm 1.75\%$)。由图 3 可见,研究个体之间幼稚 B 细胞和未转化记忆 B 细胞比例波动较大,而转化记忆 B 细胞和双阴性 B 细胞比例分布相对稳定。

2.3 外周血 B 细胞亚群的相关因素分析

2.3.1 两两相关分析 将淋巴细胞亚群比例/绝对值与患者背景资料(性别、年龄、术后时间、白细胞计数、中性粒细胞计数)及药物治疗信息(环孢霉素谷浓度、MPA 剂量换算、激素剂量换算)行两两相关分析,结果如表 2 所示。淋巴细胞计数绝大多数都与白细胞计数和中性粒细胞比例有关联。患者性别与转化记忆 B 细胞比例/数目、双阴性 B 细胞比例相关,环孢霉素浓度与双阴性 B 细胞数量相关。

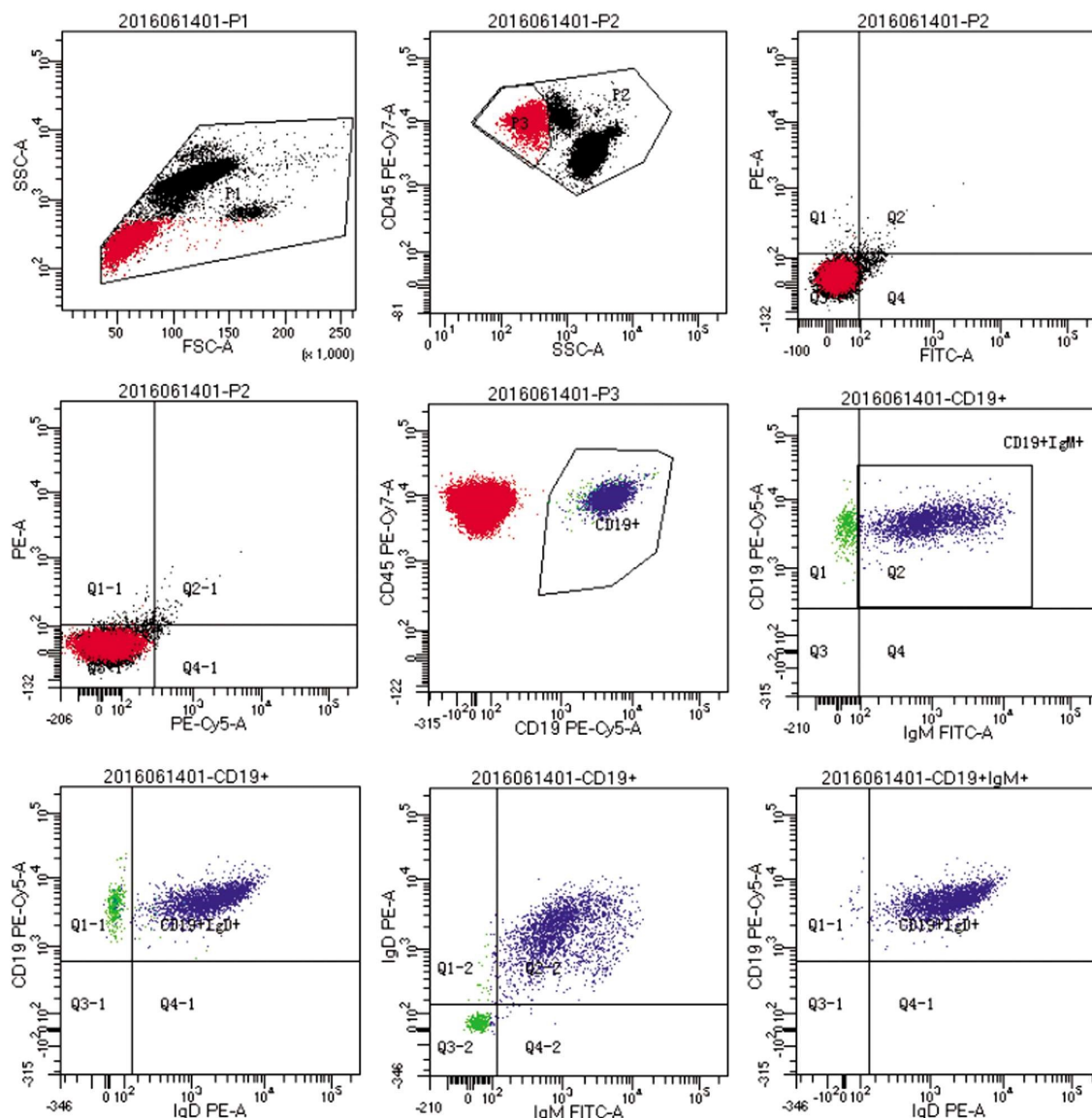


图 2 流式细胞仪检测样图

Fig.2 Flow cytometry example

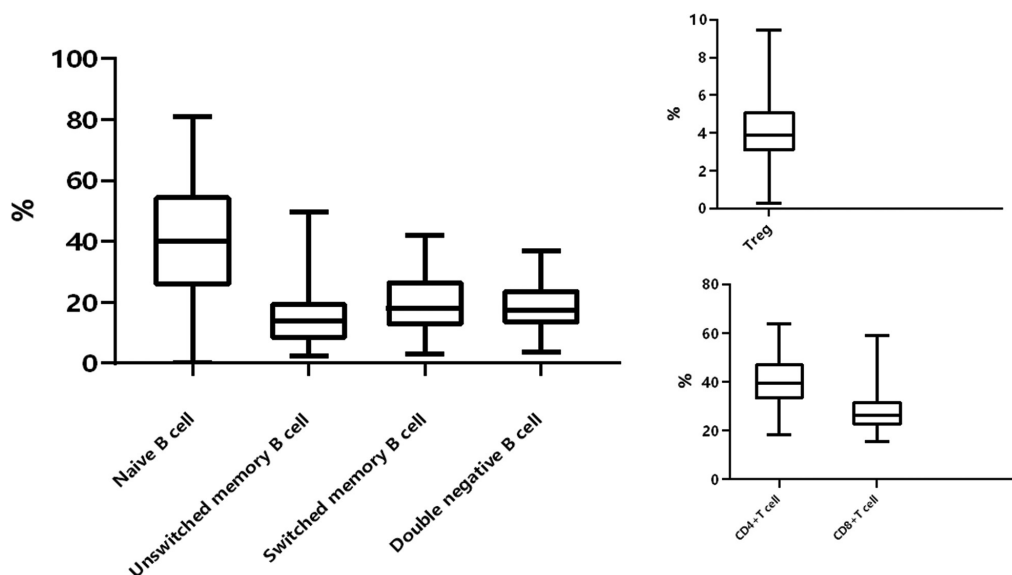


图3 长期存活肾移植受者外周血B细胞亚群特征

Fig.3 Peripheral lymphocyte phenotype of long-term survival kidney transplant recipients

2.3.2 偏相关分析 将白细胞计数、中性粒细胞比例、性别等作为控制因素行偏相关分析,再次观察各淋巴细胞亚群比例/绝对值的相关因素。得到以下结果:患者GFR和转化记忆B细胞比例相关($r=-0.279, P=0.045$),双阴性B细胞数目与环孢霉素浓度相关($r=-0.300, P=0.029$),CD4⁺T细胞比例和GFR相关($r=-0.285, P=0.039$)。

2.3.3 线性回归 以双阴性B细胞数目为自变量,环孢霉素浓度为因变量行线性回归分析,双阴性B细胞数目与环孢霉素浓度之间的关联有显著性($R^2=0.123, P=0.049$)。以转化记忆B细胞比例为自变量,GFR为因变量行线性回归分析,二者之间关联不显著($R^2=0.055, P=0.085$)。

2.4 肾功能分组对照研究

如图1所示,研究对象中35人肾功能达到或超过GFR正常值($90\text{ mL/min/1.73 m}^2$),另有19人GFR小于 $90\text{ mL/min/1.73 m}^2$ 。同时,两两相关和偏相关分析都提示GFR与转化记忆B细胞比例相关。为进一步研究转化记忆B细胞与移植肾功能的关系,以GFR正常值水平($90\text{ mL/min/1.73 m}^2$)为界,将研究对象分为肾功能正常组($\text{GFR} \geq 90\text{ mL/min/1.73 m}^2, n=35$)和肾功能减退组($\text{GFR} < 90\text{ mL/min/1.73 m}^2, n=19$)。

如表3所示,两组患者在男女比例、术后时间、年龄等方面无显著差异,MPA及激素剂量、环孢霉素浓度类似。虽然两组患者B细胞比例类似($4.18\% \pm 2.57\%$ vs. $4.15\% \pm 2.31\%$),肾功能正常组幼稚B细胞比例偏高($40.91\% \pm 20.13\%$ vs. $32.41\% \pm 24.87\%, P=0.18$),而转化记忆B细胞比例较低($17.48\% \pm 8.91\%$ vs. $23.61\% \pm 10.96\%, P=0.03$)。以性别和白细胞计数为控制因素行偏相关分析,转化记忆B细胞比例与肾功能分组(肾功能正常 vs. 肾功能减退)相关($r=-0.326, P=0.018$)。

2.5 环孢霉素分组对照研究

如研究结果2.3部分中两两相关分析所示,环孢霉素浓度和双阴性B细胞数目相关。偏相关($r=-0.300, P=0.029$)和回归分析($R^2=0.123, P=0.049$)都提示环孢霉素浓度与双阴性B细胞绝对值有关联。为进一步研究双阴性B细胞与环孢霉素浓度

的关系。根据环孢霉素浓度均值($64.28 \pm 24.27\text{ ng/mL}$),将受者分为环孢霉素低浓度组($<64\text{ ng/mL}, n=28$)和高浓度组($\geq 64\text{ ng/mL}, n=26$)。两组受者资料如表4所示。两组患者总B细胞比例类似($4.36\% \pm 2.37\%$ vs. $3.95\% \pm 2.42\%$),低浓度组未转化B细胞比例较低($13.61\% \pm 7.83\%$ vs. $19.04\% \pm 13.37\%, P=0.08$)而双阴性B细胞比例($19.95\% \pm 7.11\%$ vs. $15.93\% \pm 8.44\%, P=0.06$)和计数(13.74 ± 0.70 vs. $8.14 \pm 6.72, P=0.03$)较高。以年龄和中性粒细胞计数为控制因素行偏相关分析,双阴性B细胞数量与环孢霉素浓度分组(低浓度 vs. 高浓度)相关($r=-0.334, P=0.016$)。

3 讨论

B细胞参与多种自身免疫性疾病的发病,而B细胞及浆细胞合成的供体特异性抗体更是器官移植术后重要的风险因素^[13,14]。幼稚B细胞、记忆B细胞(转化和未转化记忆B细胞)、浆母细胞、过渡性B细胞都是外周血中主要的B细胞分化亚群,具有不同CD分子表型特征,参与抗体合成、免疫递呈、免疫调节等多种功能^[4]。与之相应,自身免疫性疾病和器官移植患者都有不同的外周血B细胞亚群分布变化。

本研究显示,移植肾功能稳定的长期存活患者中,外周血转化记忆B细胞增加和移植肾功能减退有关。记忆B细胞根据分化程度不同,可分为未转化记忆B细胞($\text{CD}19^+\text{CD}27^+\text{IgM}^+\text{IgD}^+$)和转化记忆B细胞($\text{CD}19^+\text{CD}27^+\text{IgM}^-\text{IgD}^+$)。未转化记忆B细胞以T细胞非依赖的方式,合成高特异性抗体(IgM为主)。转化记忆B细胞则以T细胞依赖的方式,在T细胞共刺激因子的协助下合成高亲和力的IgG抗体^[15]。转化记忆B细胞有促进免疫功能,强化针对异体/异种抗原检测和清除的功能特征。心脏移植患者转化记忆B细胞比例增高的同时,术后感染发生率降低^[16]。而造血干细胞移植患者转化记忆B细胞减少会伴有细菌感染增加^[17]。活检确诊的肾移植术后急性排斥反应患者中转化记忆B细胞显著增加^[18]。另一方面,未转化B细胞与免疫调节和免疫耐受现

象有关。体外研究显示幼稚 B 细胞^[19,20]、过渡性 B 细胞^[21]和未转化记忆 B 细胞^[19,20,22]都参与了调节性细胞因子 IL-10 的合成和分泌。临床观察也发现,免疫耐受的肾移植患者外周血未转化记忆 B 细胞增多^[23]。

表 1 病人背景资料和外周血淋巴细胞表型 (n=54)

Table 1 Background and peripheral lymphocyte phenotype of patients (n=54)

	mean± SD
Gender(female/male)	26/28
Current age	55.33± 9.54 (31~74)
Time after transplant(year)	16.33± 5.975 (5~32)
GFR(ml /min/1.73 m ²)	91.63± 11.28(62.77~115.61)
CsA trough level (umol/L)	64.2± 24.27 (10.50~125.40)
MPA dosage (tablet)	5.87± 1.55 (2~8)
GC dosage (tablet)	1.76 ± 0.59 (1~4)
WBC count(× 10 ⁹ /L)	8.06± 2.09(4.10~13.40)
Neutrophil (%)	63.32± 9.04(48.80~81.00)
Total B cell (%)	4.16± 2.38 (1.10~12.51)
Naïve B cell (%)	37.92± 22.06 (0.00~80.90)
Unswitched B cell (%)	16.23± 11.10 (2.37~49.81)
Switched B cell (%)	19.63± 10.02 (2.99~41.94)
Double negative B cell (%)	18.01± 7.96 (3.77~37.00)
Total T cell (%)	74.21± 10.97 (50.28~92.03)
CD4 ⁺ T cell (%)	40.09± 10.28 (18.32~63.75)
CD8 ⁺ T cell (%)	28.45± 8.88 (15.71~58.81)
Treg (%)	4.19± 1.75 (0.27~9.46)
Total B cell (/μL)	63.75± 44.46 (7.39~189.50)
Naïve B cell (/μL)	25.89± 27.73 (0~113.36)
Unswitched B cell (/μL)	8.56± 6.25 (1.04~27.29)
Switched B cell (/μL)	12.22± 11.71 (0.65~66.07)
Double negative B cell (/μL)	11.04± 9.36 (0.54~50.77)
Total T cell (/μL)	1154.77± 705.67 (153.47~4124.00)
CD4 ⁺ T cell (/μL)	634.35± 448.35 (96.47~2672.00)
CD8 ⁺ T cell (/μL)	436.43± 291.39 (48.16~1661.71)
Treg (/μL)	24.61± 16.72 (1.77~89.00)

Note: GFR: estimated glomerular filtration rate. CsA: Cyclosporine. WBC white blood cell. MPA: mycophenolic acid products, including mycophenolate mofetil (MMF) and mycophenolate sodium enteric-coated tablets (Myfortic). GC: Glucocorticoid, including prednisone and methylprednisolone.

外周血 B 细胞亚群分布与年龄、白细胞总数等因素相关^[24-26]。如图 2 所示,本研究也发现类似的现象。控制这些影响因素后再行偏相关分析,我们发现转化记忆 B 细胞比例与患者 GFR 呈负相关, ($r=-0.279, P=0.045$)。以 GFR 正常值(90 mL/min/1.73

m²)为界行分组对照时,可见肾功能减退组转化记忆 B 细胞比例 ($23.61\% \pm 10.96\%$ vs. $17.48\% \pm 8.91\%$, $P=0.03$) 和数量 (16.29 ± 15.12 vs. 10.01 ± 8.85 , $P=0.06$)都有升高。这一结果显示,肾功能稳定的长期存活患者中,增多的转化记忆 B 可能参与了移植肾功能损害。转化记忆 B 细胞增多的肾移植患者需要更加密切的临床随访和观察。肾功能分组对照研究的另一个发现是,肾功能减退组患者幼稚 B 细胞比例较低 ($32.41\% \pm 24.87\%$ vs. $40.91\% \pm 20.13\%$, $P=0.18$)。在 B 细胞各个亚群中,幼稚 B 细胞分化程度较低,功能不完善。耐受患者外周血幼稚 B 细胞增多,显示其有利于耐受现象的产生和维持^[27,28]。心脏移植患者中幼稚 B 细胞比例较高的患者急性排斥反应发生率显著降低,更提示其可能参与免疫调节功能^[16]。本研究中肾功能减退组幼稚 B 细胞减少的现象,以及肾功能减退组患者转化记忆 B 细胞增多的现象,提示移植肾功能减退患者体内存在调节性免疫功能(幼稚 B 细胞)减弱,和效应性免疫功能(转化记忆 B 细胞)增强两种免疫学现象。但如表 2 所示,目前样本相关分析未提示幼稚 B 细胞与移植肾功能之间存在关联。可能的原因包括:目前研究对象之间幼稚 B 细胞比例差异过大(图 1),以及目前研究对象仍在服用免疫抑制剂,其 B 细胞分化特征与前述完全耐受患者不同。

幼稚 B 细胞 (CD19⁺CD27IgD⁺IgD⁺) 通过获得细胞表面 CD27 表达而发育成为记忆 B 细胞。部分 CD27 阳性的记忆 B 细胞会丢失 IgM 和 IgD 表达,被称为双阴性 B 细胞(Double Negative B cell)^[29,30]。双阴性 B 细胞无法被 IL-4、PMA、Ionomycin 激活^[29],同时表达更多的抑制性受体,抗原递呈和增殖能力降低^[31]。有观点认为,双阴性 B 细胞是一种处于功能 "耗竭 (Exhaustion)" 状态的 B 细胞^[30,32]。除了其具体功能,双阴性 B 细胞可能来源也有不同观点。接受抗原持续刺激,但因为某种原因无法继续分化的转化记忆 B 细胞(CD27⁺IgD⁺)可能转化为双阴性 B 细胞^[31]。而生发中心内的记忆 B 细胞不能和 T 细胞正常接触并接受分化信号,也可能和双阴性 B 细胞的产生有关^[29]。

如表 2 相关分析显示,外周血双阴性 B 细胞数目和环孢霉素浓度负相关($r=-0.300, P=0.029$)。偏相关和线性回归分析均提示二者的关联存在。为了进一步研究二者之间的关系,我们以目前样本中所有患者的环孢霉素均值为界,将患者分为环孢霉素低浓度和高浓度组(表 4)。在肾功能水平相近的情况下 (91.01 ± 13.56 vs. 92.30 ± 8.38),低浓度环孢霉素治疗受者外周血总 B 细胞增多 (71.47 ± 48.08 vs. 55.43 ± 39.44 , $P=0.54$),双阴性 B 细胞比例 ($19.95\% \pm 7.11\%$ vs. $15.93\% \pm 8.44\%$, $P=0.06$)和数目 (13.74 ± 10.70 vs. 8.14 ± 6.72 , $P=0.03$)增加,双阴性 B 细胞的增加是低环孢霉素浓度组 B 细胞总数增多的主要原因。以性别和白细胞计数为控制因素行相关分析,环孢霉素浓度分组(低浓度 vs. 高浓度)与双阴性 B 细胞计数相关($r=-0.286, P=0.040$)。长期存活患者中低浓度环孢霉素治疗伴随着双阴性 B 细胞增多为主的外周血 B 细胞扩增。如表 4 所示,低浓度和高浓度组患者在基本背景、MPA 和激素剂量等方面均无显著差异。低浓度组患者在环孢霉素浓度显著减少(较高浓度组)的情况下,如何维持移植肾功能稳定,和增多的双阴性 B 细胞有何关系,还有待进一步研究。

表 2 两两相关分析结果
Table 2 Single factor correlation analysis

		Gender	Age	CsA trough level	Time after Tx	GFR	MPA dosage	GC dosage	Neutrophil (%)	WBC (10 ⁹ /L)
Total B cell (%)	r	0.183	0.026	-0.013	-0.072	-0.008	0.062	0.031	0.113	0.169
	P	0.185	0.854	0.927	0.605	0.954	0.656	0.824	0.414	0.221
Narve B cell (%)	r	-0.088	0.054	-0.177	0.069	0.142	-0.015	-0.071	0.135	-0.038
	P	0.527	0.700	0.201	0.622	0.306	0.914	0.611	0.330	0.785
Unswitched B cell (%)	r	0.052	-0.197	0.110	-0.041	0.136	0.122	0.150	-0.095	0.026
	P	0.707	0.154	0.428	0.769	0.325	0.379	0.279	0.496	0.850
Switched B cell (%)	r	0.316*	-0.017	0.093	-0.173	-0.236	0.031	0.225	-0.199	0.294*
	P	0.020	0.901	0.504	0.211	0.085	0.826	0.102	0.149	0.031
Double negative B cell (%)	r	-0.285*	0.166	-0.257	-0.003	-0.125	-0.106	0.030	0.057	-0.088
	P	0.036	0.232	0.061	0.980	0.367	0.447	0.831	0.681	0.527
Total T cell (%)	r	-0.209	-0.086	0.088	-0.061	-0.203	-0.011	0.196	-0.322*	-0.110
	P	0.129	0.537	0.525	0.661	0.142	0.939	0.155	0.018	0.427
CD4 ⁺ T cell (%)	r	-0.097	0.151	0.147	-0.089	-0.308*	0.037	0.190	-0.290*	0.008
	P	0.483	0.276	0.289	0.521	0.024	0.790	0.170	0.033	0.952
CD8 ⁺ T cell (%)	r	0.014	-0.368**	0.059	-0.138	-0.049	-0.041	0.038	-0.028	-0.123
	P	0.918	0.006	0.672	0.321	0.723	0.767	0.787	0.842	0.375
Treg (%)	r	0.168	-0.065	-0.218	0.151	-0.021	0.318*	0.082	0.107	0.024
	P	0.226	0.641	0.113	0.277	0.878	0.019	0.556	0.439	0.863
Total B cell (/μL)	r	0.180	0.093	-0.164	0.136	-0.147	0.231	0.156	0.338*	-0.188
	P	0.193	0.503	0.237	0.326	0.289	0.093	0.260	0.012	0.173
Narve B cell (/μL)	r	0.004	-0.035	-0.161	0.119	0.012	0.149	0.027	0.036	-0.078
	P	0.975	0.806	0.250	0.397	0.934	0.288	0.847	0.799	0.579
Unswitched B cell (/μL)	r	0.250	-0.072	-0.032	0.075	-0.014	0.327	0.296	0.305*	-0.273*
	P	0.069	0.603	0.817	0.591	0.918	0.016	0.030	0.025	0.046
Switched B cell (/μL)	r	0.342*	0.123	-0.143	-0.003	-0.227	0.209	0.266	0.475**	-0.234
	P	0.011	0.377	0.304	0.983	0.099	0.129	0.052	0.000	0.088
Double negative B cell (/μL)	r	-0.001	0.157	-0.297*	0.086	-0.136	0.124	0.125	0.279*	-0.154
	P	0.994	0.258	0.029	0.536	0.327	0.370	0.369	0.041	0.267
Total T cell (/μL)	r	0.062	-0.010	0.014	0.099	-0.149	0.152	0.244	0.362**	-0.315*
	P	0.656	0.944	0.917	0.475	0.282	0.272	0.076	0.007	0.020
CD4 ⁺ T cell (/μL)	r	0.084	0.052	0.062	0.115	-0.203	0.168	0.273	0.376**	-0.346*
	P	0.544	0.707	0.656	0.407	0.142	0.225	0.046	0.005	0.010
CD8 ⁺ T cell (/μL)	r	0.110	-0.153	-0.001	0.049	-0.095	0.146	0.217	0.282*	-0.244
	P	0.430	0.269	0.993	0.722	0.494	0.291	0.116	0.039	0.075
Treg (/μL)	r	0.121	-0.022	-0.060	0.158	-0.202	0.222	0.230	0.273*	-0.270*
	P	0.383	0.874	0.666	0.255	0.142	0.107	0.094	0.046	0.048

Note: **: $P < 0.01$ *: $P < 0.05$ GFR: estimated glomerular filtration rate. CsA: Cyclosporine. WBC white blood cell. MPA: mycophenolic acid products, including mycophenolate mofetil (MMF) and mycophenolate sodium enteric-coated tablets (Myforite). GC:Glucocorticoid, including prednisone and methylprednisolone. Tx: allograft kidney transplant.

表 3 肾功能减退 / 肾功能正常组比较

Table 3 Comparison between deteriorated/ normal allograft function group

	Deteriorated allograft function group (n=19)	Normal allograft function group(n=35)	P
GFR	80.11± 7.88	97.88± 7.13	0.00
Male/Female	10/9	18/17	0.93
Time after Tx (year)	17.37± 5.40	15.77± 6.27	0.35
Age	55.11 ± 9.54	55.46± 9.68	0.90
WBC(10 ⁹ /L)	7.96 ± 2.45	8.11± 1.91	0.81
Neutrophil(%)	60.31% ± 7.59%	64.95%± 9.44%	0.56
MPA dosage (tablet)	5.84± 1.74	5.89± 1.47	0.92
GC dosage (tablet)	1.86± 0.56	1.71± 0.61	0.41
CsA trough level (μmol/L)	59.01± 27.35	67.14± 22.32	0.24
Total B cell (%)	4.18%± 2.57%	4.15%± 2.31%	0.97
Naïve B cell (%)	32.41%± 24.87%	40.91%± 20.13%	0.18
Unswitched B cell (%)	14.66%± 9.41%	17.08%± 11.96%	0.45
Switched B cell (%)	23.61%± 10.96%	17.48%± 8.91%	0.03
Double negative B cell (%)	18.19%± 9.46%	17.91%± 7.17%	0.90
Total T cell (%)	75.40%± 11.06%	73.56%± 11.02%	0.56
CD4 ⁺ T cell (%)	42.62%± 10.97%	38.72%± 9.78%	0.19
CD8 ⁺ T cell (%)	28.53%± 9.10%	28.41%± 8.89%	0.96
Treg (%)	4.49%± 1.45%	4.03%± 1.89%	0.36
Total B cell (/μL)	70.78± 51.73	59.93± 40.27	0.40
Naïve B cell (/μL)	26.38± 31.98	25.63± 25.63	0.93
Unswitched B cell (/μL)	8.19± 5.88	8.76± 6.51	0.75
Switched B cell (/μL)	16.29± 15.12	10.01± 8.85	0.06
Double negative B cell (/μL)	12.73± 12.92	10.13± 6.76	0.42
Total T cell (/μL)	1217.80± 606.34	1120.55± 760.38	0.63
CD4 ⁺ T cell (/μL)	696.77± 393.06	600.46± 477.70	0.46
CD8 ⁺ T cell (/μL)	457.77± 251.58	424.84± 313.78	0.70
Treg (/μL)	29.50± 16.36	21.96 ± 16.53	0.11

Note: GFR: estimated glomerular filtration rate. CsA: Cyclosporine. WBC white blood cell. MPA: mycophenolic acid products, including mycophenolate mofetil (MMF) and mycophenolate sodium enteric-coated tablets (Myforite). GC:Glucocorticoid, including prednisone and methylprednisolone

本研究中所有患者都服用环孢霉素,而环孢霉素对 B 细胞^[33,34]和 T 细胞^[35]都有抑制作用,也抑制幼稚 B 细胞的分化^[36]。因此,本研究同时观察了多个 B 细胞、T 细胞分类亚群。环孢霉素低浓度组除了双阴性 B 细胞数量之外,调节性 T 细胞 (Treg) 比例略多于高浓度组 ($4.52\% \pm 2.05\%$ vs. $3.84\% \pm 1.30\%$, $P=0.15$),而未转化记忆 B 细胞比例降低 ($13.61\% \pm 7.83\%$ vs. $19.04\% \pm 13.37\%$, $P=0.08$)。幼稚 B 细胞的比例和数量都没有显著差异。

本研究通过流式细胞仪检测,观察肾移植术后长期存活患者外周血 B 淋巴细胞亚群的分布规律。肾功能轻度减退患者 (<90 mL/min/1.73 m²)受者转化记忆 B 细胞增多,增多的转化

记忆 B 细胞与移植肾功能轻度减退相关。低浓度环孢霉素患者 (<64 ng/mL) 出现以双阴性 B 细胞增多为主的总 B 细胞增多现象。本研究存在以下不足:除了包含年龄、性别参数(EPI 公式)的估算 GFR,缺乏移植肾组织学对照,也缺乏对 B 细胞分化相关淋巴因子和 B 细胞各亚群的功能观察。B 细胞亚群和移植肾功能、低浓度环孢霉素治疗的关系,尚有待于后续研究进一步阐明。

参考文献(References)

- [1] Süsal C, Fichtner A, Tönshoff B, et al. Clinical Relevance of HLA Antibodies in Kidney Transplantation: Recent Data from the Heidelberg Transplant Center and the Collaborative Transplant Study [J]. J Im-

表 4 环孢霉素低浓度组和高浓度组比较
Table 4 Comparison between low/high CsA trough level group

	Low CsA trough level group (<64 ng/mL, n=28)	High CsA trough level group (≥ 64 ng/mL, n=26)	P
CsA trough level	44.97± 11.67	85.08± 15.29	0.00
GFR	91.01± 13.56	92.30± 8.38	0.67
Male/Female	13/15	15/11	0.41
Age	56.32± 8.59	54.27± 10.54	0.44
Time after Tx (year)	17.57± 4.57	15.00± 7.04	0.12
WBC count(× 10 ⁹ /L)	8.27± 2.46	7.83± 1.61	0.44
Neutrophil (%)	61.32%± 8.46%	65.47%± 9.31%	0.09
MPA dosage (tablet)	6.21± 1.32	5.50± 1.73	0.09
GC dosage (tablet)	1.84± 0.49	1.68± 0.68	0.34
Total B cell (%)	4.36%± 2.37%	3.95%± 2.42%	0.54
Naïve B cell (%)	37.88%± 22.49%	37.96%± 22.05%	0.99
Unswitched B cell (%)	13.61%± 7.83%	19.04%± 13.37%	0.08
Switched B cell (%)	19.20%± 8.75%	20.10%± 11.39%	0.75
Double negative B cell (%)	19.95%± 7.11%	15.93%± 8.44%	0.06
Total T cell (%)	72.79%± 11.65%	75.74%± 10.18%	0.33
CD4 ⁺ T cell (%)	38.52%± 11.39%	41.80%± 8.85%	0.25
CD8 ⁺ T cell (%)	28.30%± 10.26%	28.62%± 7.32%	0.90
Treg (%)	4.52%± 2.05%	3.84%± 1.30%	0.15
Total B cell (/μL)	71.47± 48.08	55.43± 39.44	0.19
Naïve B cell (/μL)	28.60± 31.27	22.98± 23.61	0.46
Unswitched B cell (/μL)	8.38± 6.00	8.76± 6.61	0.83
Switched B cell (/μL)	13.29± 12.68	11.07± 10.69	0.49
Double negative B cell (/μL)	13.74± 10.70	8.14± 6.72	0.03*
Total T cell (/μL)	1139.51± 629.33	1171.20± 792.09	0.87
CD4 ⁺ T cell (/μL)	606.43± 375.88	664.41± 521.30	0.64
CD8 ⁺ T cell (/μL)	443.61± 318.64	428.69± 265.02	0.85
Treg (/μL)	24.65± 14.70	24.57± 18.95	0.99

Note: GFR: estimated glomerular filtration rate. CsA: Cyclosporine. WBC white blood cell. MPA: mycophenolic acid products, including mycophenolate mofetil (MMF) and mycophenolate sodium enteric-coated tablets (Myfortic). GC:Glucocorticoid, including prednisone and methylprednisolone.

- munol Res, 2017, 2017: 5619402
- [2] Aubert O, Loupy A, Hidalgo L, et al. Antibody-Mediated Rejection Due to Preexisting versus De Novo Donor-Specific Antibodies in Kidney Allograft Recipients [J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28 (6): 1912-1923
 - [3] Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts [J]. New England Journal of Medicine, 2018, 379 (12): 1150-1160
 - [4] Karahan GE, Claas FHJ, Heidt S. B Cell Immunity in Solid Organ Transplantation[J]. Front Immunol, 2016, 7: 686
 - [5] Shimabukuro-Vornhagen A, Hallek MJ, Storb RF, et al. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease[J]. Blood, 2009, 114(24): 4919-4927
 - [6] Iwata S, Tanaka Y. B-cell subsets, signaling and their roles in secretion of autoantibodies[J]. Lupus, 2016, 25(8): 850-856
 - [7] Nakken B, Munthe LA, Konttinen YT, et al. B-cells and their targeting in rheumatoid arthritis--current concepts and future perspectives[J]. Autoimmun Rev, 2011, 11(1): 28-34
 - [8] Hu F, Zhang W, Shi L, et al. Impaired CD27+IgD+ B Cells With Altered Gene Signature in Rheumatoid Arthritis [J]. Front Immunol, 2018, 9: 626
 - [9] Rodríguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, Pérez-Venegas JJ, et al. Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(3): R108
 - [10] Si R, Zhao P, Yu Z, et al. Increased Non-switched Memory B Cells

- are Associated with Plasmablasts, Serum IL-6 Levels and Renal Functional Impairments in IgAN Patients [J]. *Immunol Invest*, 2020, 49 (1-2): 178-190
- [11] Cherukuri A, Salama AD, Carter CR, et al. Reduced human transitional B cell T1/T2 ratio is associated with subsequent deterioration in renal allograft function[J]. *Kidney Int*, 2017, 91(1): 183-195
- [12] Svachova V, Sekerkova A, Hrubá P, et al. Dynamic changes of B-cell compartments in kidney transplantation: lack of transitional B cells is associated with allograft rejection [J]. *Transpl Int*, 2016, 29 (5): 540-548
- [13] Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts[J]. *Transplantation*, 2009, 87(10): 1505-1513
- [14] Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, et al. Outcome of Subclinical Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplant Recipients with Preformed Donor-Specific Antibodies [J]. *American Journal of Transplantation*, 2009, 9(11): 2561-2570
- [15] Zinkernagel RM, Hengartner H. Protective "immunity" by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called "immunological memory" [J]. *Immunol Rev*, 2006, 211: 310-319
- [16] Lanio N, Sarmiento E, Gallego A, et al. Alterations of naïve and memory B-cell subsets are associated with risk of rejection and infection in heart recipients[J]. *Transpl Int*, 2013, 26(8): 800-812
- [17] Hilgendorf I, Mueller-Hilke B, Kundt G, et al. The lack of memory B cells including T cell independent IgM+ IgD+ memory B cells in chronic graft-versus host disease is associated with susceptibility to infection[J]. *Transpl Int*, 2012, 25(1): 87-96
- [18] Zarkhin V, Lovelace PA, Li L, Hsieh S-C, et al. Phenotypic evaluation of B-cell subsets after rituximab for treatment of acute renal allograft rejection in pediatric recipients[J]. *Transplantation*, 2011, 91(9): 1010-1018
- [19] Bouaziz J-D, Calbo S, Maho-Vaillant M, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4 (+) T-cell activation in vitro[J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(10): 2686-2691
- [20] Buffa S, Bulati M, Pellicanò M, et al. B cell immunosenescence: different features of naïve and memory B cells in elderly [J]. *Biogerontology*, 2011, 12(5): 473-483
- [21] Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, et al. CD19 (+)CD24(hi)CD38 (hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients[J]. *Immunity*, 2010, 32(1): 129-140
- [22] Amu S, Tarkowski A, Dörner T, et al. The human immunomodulatory CD25+ B cell population belongs to the memory B cell pool [J]. *Scand J Immunol*, 2007, 66(1): 77-86
- [23] Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(6): 1836-1847
- [24] Berrón-Ruiz L, López-Herrera G, Ávalos-Martínez CE, et al. Variations of B cell subpopulations in peripheral blood of healthy Mexican population according to age: Relevance for diagnosis of primary immunodeficiencies [J]. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2016, 44(6): 571-579
- [25] Kokuina E, Breff-Fonseca MC, Villegas-Valverde CA, et al. Normal Values of T, B and NK Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood of Healthy Cuban Adults [J]. *MEDICC Rev*, 2019, 21 (2-3): 16-21
- [26] Macallan DC, Wallace DL, Zhang Y, et al. B-cell kinetics in humans: rapid turnover of peripheral blood memory cells[J]. *Blood*, 2005, 105 (9): 3633-3640
- [27] Chesneau M, Pallier A, Braza F, et al. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients [J]. *Am J Transplant*, 2014, 14(1): 144-155
- [28] Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(6): 1848-1861
- [29] Fecteau JF, Côté G, Neron S. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation[J]. *J Immunol*, 2006, 177(6): 3728-3736
- [30] Wei C, Anolik J, Cappione A, et al. A New Population of Cells Lacking Expression of CD27 Represents a Notable Component of the B Cell Memory Compartment in Systemic Lupus Erythematosus [J]. *J Immunol*, 2007, 178(10): 6624-6633
- [31] Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, et al. A double-negative (IgD-CD27-) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people[J]. *Mech Ageing Dev*, 2009, 130(10): 681-690
- [32] Khoder A, Alsuliman A, Basar R, et al. Evidence for B Cell Exhaustion in Chronic Graft-versus-Host Disease [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1937
- [33] Mosbach-Ozmen L, Humez S, Koponen M, et al. Cyclosporine facilitates B-cell membrane immunoglobulin capping [J]. *Immunology*, 1986, 57(4): 573-577
- [34] Klaus GG, Hawrylowicz CM. Activation and proliferation signals in mouse B cells. II. Evidence for activation (G0 to G1) signals differing in sensitivity to cyclosporine[J]. *Eur J Immunol*, 1984, 14(3): 250-254
- [35] Lum CT, Wanner FJ, Tilberg AF, et al. Cyclosporine-induced adenosine triphosphate depletion in murine T and B lymphocytes [J]. *Surgery*, 1984, 96(2): 256-263
- [36] De Bruyne R, Bogaert D, De Ruyck N, et al. Calcineurin inhibitors dampen humoral immunity by acting directly on naïve B cells[J]. *Clin Exp Immunol*, 2015, 180(3): 542-550