



三色和双色荧光标记流式细胞术对肾移植免疫反应新指标TLR4的监测

To11样受体4(TLR4)是存在于树突状细胞、单核细胞等抗原提呈细胞膜上的天然免疫受体。新近研究显示,TLR4在天然免疫和移植免疫间起着重要的桥梁作用:单核细胞表面TLR4及其下游分子CD80的表达情况与心脏移植、肺移植和肾脏移植排斥反应密切相关[1][2][3]。TLR4将可能成为反映器官移植受者免疫状态,排斥反应发展进程的新指标。本研究分别应用三色和双色荧光抗体标记的流式细胞术(FCM)检测肾移植术后患者外周血CD14阳性单核细胞TLR4及其下游分子CD80的表达情况,并将两种方法的检测结果进行比较,旨在探讨三色和双色FCM在监测移植免疫新指标中的优缺点。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取我科2005年2至3月肾移植术后门诊复查病例10例为研究对象,男7例、女3例,平均年龄31.5岁(23岁~52岁)。所有病例均为手术后1~5年内,均为第一次行肾移植术。早晨空腹抽取外周血1 ml,肝素抗凝,制作流式细胞仪检测标本。

1.2 主要试剂及仪器

主要试剂:单克隆抗体,包括PE-anti-human-TLR4、FITC-anti-human-CD80、APC-anti-human-CD14、PE-mouse-IgG2a Isotype Control、FITC-mouse-IgG1 Isotype Control、APC-mouse-IgG1- κ Isotype Control,均购自美国eBioscience公司。红细胞裂解液购自深圳晶美生物技术公司,流式细胞仪常用工作液自行配制。主要仪器:美国BD公司FACS Calibur流式细胞仪、Eppendorf微量加样器等。

1.3 方法

三色荧光标记标本制作:取肝素抗凝全血100 μ l,依次加入荧光标记单克隆抗体PE-anti-human-TLR4、FITC-anti-human-CD80,APC-anti-human-CD14各20 μ l,充分混匀,室温避光染色20分钟,加入红细胞裂解液2 ml,避光15 min,离心弃上清,(1 000 r/min, 5 min),洗涤液洗2遍,将红细胞碎片和未结合的单抗去除,加入固定液500 μ l,上流式细胞仪检测。阴性对照标本不加荧光标记单克隆抗体,而加入荧光标记的同类免疫球蛋白PE-mouse-IgG2a Isotype Control、FITC-mouse-IgG1 Isotype Control、APC-mouse-IgG1 κ Isotype Control,其余操作相同。

双色荧光标记标本制作:基本过程同上,只是需要取100 μ l血标本两份,分别加入PE-anti-human-TLR4、APC-anti-human-CD14和FITC-anti-human-CD80、APC-anti-human-CD14,阴性对照则加入相应的荧光标记同类免疫球蛋白。

所作标本上流式细胞仪检测,计数10 000个单核细胞中TLR4、CD80和CD14阳性表达百分率。

1.4 统计学处理

将三色和双色FCM检测的同一份标本所得结果配对,应用SPSS10.0统计分析软件对数据进行分析,采用配对t检验,分析配对结果的差异和相关性。

2 结果

2.1 肾移植术后外周血CD14⁺单核细胞中TLR4的表达情况

分别应用三色和双色FCM检测同一患者同一份血标本中CD14⁺、TLR4⁺、CD80⁺细胞百分数，并计算出CD14阳性单核细胞中TLR4⁺细胞百分率(表1)。

将三色和双色FCM检测同一份血标本的结果配对，进行配对t检验和相关分析，结果得出积矩相关系数 $r=1$ ($+0.000$)，两种方法的检测结果呈完全正相关， $t=-1.391$ ($P=0.198$)，说明两种检测方法所得结果无显著性差异，两种检测方法差值的95%可信区间为-5.25到1.252，包括0，同样说明两种检测方法所得结果无显著性差异。

表 1 CD14 阳性单核细胞中 TLR4 阳性百分率

Tab.1 Expression of TLR4 in CD14-positive monocytes (%)

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Three-color flow cytometry	4.61	8.23	7.36	1.30	0.62	1.50	1.97	0.74	1.96	3.41
Two-color flow cytometry	4.58	8.25	7.40	1.40	0.59	1.51	1.96	0.73	1.98	3.50

TLR-4: Toll-like receptor 4

2.2 肾移植术后外周血CD14⁺单核细胞中CD80的表达情况

分别应用三色和双色FCM检测同一患者同一份血标本中CD14⁺、TLR4⁺、CD80⁺细胞百分数，并计算出CD14⁺单核细胞中CD80⁺细胞百分率(表2)。

表 2 CD14 阳性单核细胞中 CD80 阳性百分率

Tab.2 Expression of CD80 in CD14-positive monocytes (%)

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Three-color flow cytometry	0.24	1.19	1.06	0.68	0.85	0.92	0.16	0.06	0.12	0.35
Two-color flow cytometry	0.25	1.20	1.04	0.65	0.88	0.94	0.16	0.06	0.13	0.33

将三色和双色FCM的检测结果进行配对t检验和相关分析，结果表明，积矩相关系数 $r=0.999$ ($P=0.000$)，说明两种方法的检测结果接近完全正相关， $t=-0.165$ ($P=0.872$)，说明两种检测方法所得结果无显著性差异，两种检测方法的差值的95%可信区间未-1.47到1.268，包括0，同样说明两种检测方法所得结果无显著性差异。

2.3 肾移植术后外周血单核细胞中TLR4和CD80双阳性的表达情况

除了TLR4⁺/CD14⁺和CD80⁺/CD14⁺的表达情况外，三色FCM还可同时测定TLR4⁺/CD80⁺双阳性细胞的表达情况(表3)，了解TLR4阳性的单核细胞中CD80的表达百分率。

3 讨论

近年来，由于多种单克隆抗体的制备成功以及多种荧光素的应用，FCM在临床移植免疫学的研究中发挥着

越来越重要的作用。比如进行移植后活化的淋巴细胞亚群测定，外周血特定表型细胞的增多与移植肾慢性排斥反应的关系等[4][5]。人们建立了许多新的FCM方法应用于移植临床，取得了极大的成功。由于受荧光抗体标记技术、荧光检测通道等因素的限制，最初人们多应用单色标记的流式细胞术对细胞表面的一种抗原进行描述性研究，但单参数的流式细胞术误差大，准确性和可靠性欠佳，提供信息量有限，在20世纪90年代初期逐渐被双色标记流式细胞术取代，中后期又渐渐出现了三色、四色甚至更多色标记流式细胞术[6][7][8]。

表3 单核细胞中 TLR4 和 CD80 双阳性表达百分率

Tab.3 Expression of CD80 and TLR4 in monocytes (%)

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Three-color flow cytometry	1.43	1.86	1.14	0.56	0.59	1.39	0.94	0.74	1.84	2.88

TLR4是1997年发现的天然抗感染免疫的重要模式识别受体，早期关于TLR4的研究主要集中在抗感染免疫方面，国外关于TLR4与临床器官移植免疫关系的研究刚刚起步。我们课题组在国内首先研究并发现，肾脏移植术后，TLR4通过调控抗原提呈细胞第二信号分子CD80的表达参与移植免疫过程[4]，国内目前尚未见应用FCM对移植免疫新指标TLR4进行检测的其他报道。

本研究中应用三色和双色FCM均属多参数检测。Methe[1]等应用双色荧光标记流式细胞术检测了38例心脏移植术后患者CD14阳性单核细胞中TLR4及CD80的表达情况，发现慢性排斥反应患者的TLR4表达水平显著高于无排斥者。本研究分别采用三色和双色FCM检测了肾移植术后患者CD14阳性单核细胞中TLR4及CD80的表达情况，发现两种检测方法所得结果无显著性差异，对同一份标本而言，两种检测方法所得结果呈完全正相关关系，也就是说，三色FCM可以替代双色FCM检测CD14阳性单核细胞中TLR4及CD80的表达情况。

我们研究发现[4]，TLR4/CD80双阳性细胞表达情况在移植肾功能异常组患者高于正常对照组($P < 0.05$)，也高于移植肾功能正常组。因此，三色FCM在同一份标本中除了可以检测CD14阳性单核细胞中TLR4单阳性和CD80单阳性细胞表达情况外，还可同时检测出TLR4/CD80双阳性细胞表达情况，这对揭示TLR4通过调控CD80的表达参与移植免疫反应机制具有重要意义。双色FCM由于未同时加入荧光标记的TLR4和CD80单克隆抗体，则不能检测出TLR4/CD80双阳性细胞表达情况，因此，三色FCM与双色法相比，可以获得更多的有价值的信息。

在本研究中，三色FCM在100 μ l即一份血标本中加入抗CD14、抗TLR4和抗CD80三种荧光标记的单克隆抗体各20 μ l，即可同时检测出CD14阳性单核细胞中TLR4及CD80的表达情况。双色FCM则需要100 μ l血标本两份，需分别加入抗CD14和抗TLR4各20 μ l，抗CD14和抗CD80单克隆抗体各20 μ l，相比之下，三色荧光标记法比双色荧光标记法节约了一份血标本和一份荧光标记的抗CD14单克隆抗体。对于血标本量较少，比如在小鼠或大鼠的动物实验中，由于采血量受限时，尤其重要，节约单克隆抗体的用量还可节约实验经费。

综上所述，我们认为，在对肾移植术后新型免疫指标TLR4的检测中，三色FCM检测结果精确、稳定、误差小、可重复性强，与双色FCM相比具有血标本用量少，节约单克隆抗体，可以获得更多有价值的信息等优点。

参考文献:

[1] Methe H, Zimmer E, Grimm C, et al. Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation[J].

Transplantation, 2004, 78(9):1 324-31.

[2] Palmer SM, Burch LH, Trindade AJ, et al. Innate immunity influences long-term outcomes after human lung transplant[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(7): 780-5.

[3] Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, et al. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation[J]. Kidney Int, 2005, 67(6): 2454-61.

[4] 余玉明, 于立新, 邓文锋, 等. 肾移植术后患者Toll样受体4的表达及意义[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2005, 14(10): 441-2.

Yu YM, Yu LX, Deng WF, et al. Expression and implication of toll like receptor 4 after renal transplantation[J]. J Nephrol Dialy Transplant, 2005, 14(10): 441-2.

[5] Yu DS, Sun GH, Lee SS, et al. Flow-cytometric measurement of cellular changes in urine: a simple and rapid method for perioperatively monitoring patients after kidney transplantation[J]. Urol Int, 1999, 62(3): 143-6.

[6] Zella D, Riva A, Weichold FF, et al. A novel sensitive assay to define immune status using short-term peripheral blood derived cell culture and dual-color flow cytometry[J]. Immunol Lett, 1998, 62(1): 45-9.

[7] Bradford JA, Buller G, Suter M, et al. Fluorescence-intensity multiplexing: simultaneous seven-marker, two-color immunophenotyping using flow cytometry[J]. Cytometry A, 2004, 61(2): 142-52.

[8] Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping[J]. J Immunol Methods, 2000, 243(1-2): 77-97.

[回结果列表](#)