

[文章编号] 1000- 4718(2005)02- 0285- 04

# CD158 分子表达在他克莫司、霉酚酸酯联合甲基强的松龙治疗顽固性慢性移植物抗宿主病中的追踪观察\*

陈 纯<sup>1</sup>△, 方建培<sup>1</sup>, 段连宁<sup>2</sup>, 魏 菁<sup>3</sup>, 黄绍良<sup>1</sup><sup>1</sup>中山大学附属二院儿科造血干细胞移植中心, 广东 广州 510120; <sup>2</sup>北京空军总医院血液科, 北京 100030;<sup>3</sup>中山大学附属二院医学研究中心, 广东 广州 510120)

**[摘要]** 目的: 探讨慢性移植物抗宿主病(graft- versus- host disease, GVHD) 症状期及缓解期 CD158 分子的表达变化。方法: 观察异基因造血干细胞移植后发生广泛性慢性 GVHD 的儿童患者, 应用他克莫司(FK506), 霉酚酸酯(MMF) 和甲基强的松龙(MP) 联合治疗的毒副作用和疗效; 同时采用流式细胞仪检测外周血中 CD158 在 NK 细胞和 T 细胞的表达, 比较治疗前后 CD158 的表达。结果: 移植前、慢性 GVHD 症状期和治疗后 CD4<sup>+</sup> CD158a<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> 表达水平极其低下, 但无明显差异。5 例急性 GVHD 患者 CD3<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> 的表达水平分别为 4.97% ± 2.36% 和 4.58% ± 2.90%, 与移植前相比差异显著( $P < 0.05$ ), CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> 的表达也明显高于移植前( $P < 0.05$ )。6 例慢性 GVHD 患者症状期, CD3<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> 的表达均高于移植前的水平( $P < 0.05$ ); 在缓解期, CD3<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> 和 CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> 的表达水平逐渐下降, 与慢性 GVHD 症状期相比差异显著( $P < 0.05$ ), 与移植前无明显差异。移植后 6- 12 个月 CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> 表达水平与移植前无明显差异。结论: CD158b 分子在 T 细胞表达水平增加与慢性 GVHD 的发生有关, FK506, MMF 和 MP 联合有效治疗慢性 GVHD 的作用机制之一可能是下调 T 细胞 CD158b<sup>+</sup> 的表达, 从而抑制 cGVHD。

**[关键词]** CD158; T 淋巴细胞; 移植物抗宿主病; 他克莫司; 霉酚酸; 甲泼尼龙**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

杀伤性抑制性受体(killer cell inhibitory receptor, KIR) (CD158) 是免疫球蛋白超家族成员, 属 I 型跨膜蛋白分子, 主要表达在 NK 细胞和部分 T 淋巴细胞。其配体为人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)- I 类分子。KIR 可以通过调节 NK 细胞的功能而影响异基因造血干细胞移植后移植物抗宿主病(graft- versus- host disease, GVHD) 和移植物抗白血病(graft- versus- leukemia, GVL) 效应。通过“丢失自我机制”(missing self- hypothesis), 表达在 NK 细胞上的 KIR 可以传递抑制信号而阻止靶细胞与主要组织相容性抗原(major histocompatibility complex, MHC) I 类抗原结合, 而失去其细胞毒作用<sup>[1]</sup>。表达在 T 细胞的 KIR 目前认为与通过 T 受体(T cell receptor, TCR) 与 T 细胞结合而识别 HLA I 类抗原, 在介导外周免疫中起作用<sup>[2]</sup>, 但是对其在 GVHD 和 GVL 的影

响并不十分清楚。最近有报道在异基因骨髓移植后发生慢性 GVHD 的患者 CD158 分子在 T 细胞的表达明显升高, 认为可能与慢性刺激有关<sup>[3]</sup>。我们曾报道了 CD158 分子在 T 细胞的表达增高可能与在脐血移植和异基因外周血干细胞移植后 GVHD 的发生有关<sup>[4]</sup>。本研究进一步追踪观察临床控制 cGVHD 前后 CD158 表达的变化, 以探讨 CD158 的表达在异基因造血干细胞移植后 cGVHD 发生中的临床意义。

## 材 料 和 方 法

### 1 临床资料

**1.1 一般资料** 重型 β- 地中海贫血患者 5 例, 特发性遗传性溶血性贫血 1 例。平均年龄 5.5 岁, 其中男 4 例, 女 2 例。接受 HLA 全相合同胞间异基因外周血干细胞移植(peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT) 4 例, 全相合同胞间脐血(umbilical cord blood, UCB) 和新生儿外周血(neonatal peripheral blood, NPB) 混合移植 1 例。无关供者脐血移植 1 例。预处理采用马利兰(14- 20 mg/kg) + 环磷酰胺(150- 200 mg/kg) 和抗胸腺球蛋白(90- 100 mg/kg) 为基础的方案, 其中 1 例加噻替哌(6 mg/kg), 和氟达拉滨(150

[收稿日期] 2003- 07- 10 [修回日期] 2003- 10- 30

\* [基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(No. 010722);

广东省卫生厅基金资助项目(No. B2001029)

△现在法国巴黎圣- 路易医院移植免疫实验室

Tel: 020- 81332003; E- mail: chenchun2002@hotmail.com

mg/kg·m<sup>2</sup>), 3 例加马法兰(90 mg/kg)。所有患者均成功植入。

**1.2 急性 GVHD 预防和治疗** 5 例患者单用环孢素 A(cyclosporine A, CsA) 每日 3 mg/kg(自-1 d 始), 1 例采用 CsA 和甲基强的松龙(methylprednisolone, MP) 每日 0.25 mg/kg(自+7 d 始) 联合方案。4 例发生 I-II 度急性 GVHD, 经 MP 每日 1.5-3 mg/kg 后控制; 1 例皮肤 I 度急性 GVHD 被 MP 控制, 在 MP 减量过程中发生肠道 IV 度 GVHD, 再予 MP(每日 2 mg/kg) 等治疗 10 d 后控制。1 例无 aGVHD。

**1.3 慢性 GVHD 的诊断和治疗** 按文献标准<sup>[5]</sup>, 6 例患者在 CsA 或 FK506 和 MP 维持期间, 均诊断为广泛性慢性 GVHD, 其中 1 例伴血小板(34-45)  $\leq 100 \times 10^9/L$ 。均出现口腔粘膜和全身皮肤受累, 3 例伴转氨酶升高, 活检证实肝脏慢性 GVHD, 2 例伴肠道受累。发生慢性 GVHD 后更改为“三联”方案: 他克莫司(tacrolimus, FK506) 每日 0.03-0.05 mg/kg, 静脉点滴, 症状好转后改口服, 待症状控制 2 周以上逐渐减量, 每 2 周减 1 次, 并以小剂量维持。霉酚酸酯(mycophenolate mofetil, MMF) 30 mg/kg, 每日分 3 次口服, 症状消失后减量。MP 每日 15-20 mg/kg(其中 1 例剂量为每日 50 mg/kg), 静脉点滴, 2 d 后症状明显好转, 将剂量减半, 5 d 后改口服。MP 口服剂量每日 1 mg/kg, 长期维持。

## 2 CD158 表达的检测

**2.1 标本采集** 在移植前后发生急性和慢性 GVHD 时, 以及“三联”治疗有效至少 1 周以后, 以及维持治疗期间经外周静脉抽取 2 mL 血, 用 50  $\mu$ L EDTA 抗凝待测。

**2.2 试剂** 所有单克隆抗体均为美国 PharMingen 公司产品。均为直接标记抗体, 包括异硫氰酸荧光标记抗体 CD4、CD8 和 CD16; 藻红蛋白荧光标记抗体 CD158a 和 CD158b; 叶绿素蛋白荧光标记抗体 CD3。对照抗体为藻红蛋白 IgG1 和异硫氰酸 IgG1。以上抗体均为小鼠抗 IgG 型抗体。

**2.3 流式细胞术分析** 所有样品在 6 h 内完成标定, 均采用双色和三色直接免疫荧光标记法。EDTA 抗凝外周血, 取 50  $\mu$ L 待测样本并加相应的单克隆抗体 10  $\mu$ L, 摇匀, 避光 4  $^{\circ}$ C 冰箱放置 30 min。加 0.38% 氯化铵裂解液 2 mL, 避光室温放置 10 min, 待红细胞完全溶解后, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次, 加 4% 多聚甲醛固定液 450

$\mu$ L 固定, 待上机检测。以流式细胞仪的配套软件(CELL QUEST) 分析样本中的相应标记阳性细胞表达率。每样品均用藻红蛋白和异硫氰酸同型 IgG 作为相应的阴性对照。双标记抗体藻红蛋白 CD14/CD45 异硫氰酸双抗作为辅助。常规标记单抗, 用 FACS(Becton-Dickenson 公司) 检测 NK 细胞和 T 淋巴细胞 CD158 表达。

## 3 统计学处理

计量资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。组间比较采用非参数秩和检验。所有统计学分析过程应用 SPSS 8.0 统计学软件。

## 结 果

### 1 慢性 GVHD 治疗的疗效及副作用

6 例患者在“三联”用药后 2-4 d 症状均明显好转, 在 1-2 周左右症状消失。3 例在 FK506 使用的 2 周内均出现血尿素氮明显升高, 将 FK506 减量后逐渐恢复正常。1 例出现双侧髋关节炎, 经减量及牵引固定治疗后治愈。2 例出现皮肤瘙痒, 抗过敏治疗后好转。所有患者均出现轻微的恶心, 无中性粒细胞下降, 高血压等不良反应。随访至 2003 年 4 月, 所有患者均脱贫血状态, 存活中位时间为 54 个月。

### 2 移植前后以及“三联”方案治疗后 CD158 表达

所有患者在移植前检测的 CD158 的表型均在我们曾经报道的正常儿童范围内<sup>[6]</sup>。所有患者均追踪检测至联合治疗后 1 年。从表 1 可以看出, 移植前, 发生 cGVHD 期和治疗后 CD4<sup>+</sup>CD158a<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup>CD158b<sup>+</sup> 表达水平极其低下, 但无明显差异。5 例发生急性 GVHD 患者 CD3<sup>+</sup>CD158b<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD158b<sup>+</sup> 的表达水平分别为 4.97%  $\pm$  2.36% 和 4.58%  $\pm$  2.90%, 与移植前相比差异显著( $P < 0.05$ ), 而 CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD158b<sup>+</sup> 的表达为 16.1%  $\pm$  9.37%, 也明显高于移植前( $P < 0.05$ )。6 例慢性 GVHD 症状期患者, CD3<sup>+</sup>CD158b<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD158b<sup>+</sup> 表达均高于移植前的水平( $P < 0.05$ ), 在控制症状后, 其表达水平逐渐下降, 与慢性 GVHD 症状期相比差异显著( $P < 0.05$ ), 与移植前相比, 差异不显著( $P > 0.05$ )。

## 讨 论

人的 KIR 大部分属于 Ig 超家族成员。CD158 作为 KIR 分子成员之一, 可以特异性地与靶细胞表面 HLA-C 分子相应功能域结合, 如 CD158a 与 HLA-

表 1 慢性移植抗宿主病患者 CD158 在 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞上的表达

Tab 1 The expressions of CD158 on T lymphocytes and NK cells in the patients with cGVHD ( $\bar{x} \pm s$ )

Phenotype	Before transplant	aGVHD	cGVHD	After treatment	
	(n = 6)	(n = 6)	(n = 8)	1- 3 months(n = 12)	6- 12 months(n = 16)
CD3 <sup>+</sup> CD158a <sup>+</sup>	0.89 ± 0.37	2.22 ± 2.07	1.45 ± 0.74	1.58 ± 1.02	1.02 ± 0.80
CD3 <sup>+</sup> CD158b <sup>+</sup>	2.34 ± 1.30	4.97 ± 2.36 <sup>#</sup>	5.86 ± 4.42 <sup>#</sup>	5.11 ± 6.02 <sup># *</sup>	3.45 ± 2.78 <sup># *</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD158a <sup>+</sup>	0.59 ± 0.27	0.51 ± 0.34	0.78 ± 0.60	0.64 ± 0.39	0.68 ± 0.44
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD158b <sup>+</sup>	0.29 ± 0.12	0.58 ± 0.48	0.48 ± 0.47	0.38 ± 0.43	0.42 ± 0.38
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD158a <sup>+</sup>	3.40 ± 1.47	2.87 ± 2.45	3.16 ± 2.78	3.47 ± 3.48	2.90 ± 2.60
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD158b <sup>+</sup>	2.34 ± 0.84	4.58 ± 2.90 <sup>#</sup>	8.47 ± 7.45 <sup>#</sup>	4.70 ± 7.70 <sup># *</sup>	3.46 ± 1.15 <sup># *</sup>
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD158a <sup>+</sup>	7.11 ± 4.38	6.29 ± 3.24	5.37 ± 2.45	4.78 ± 2.08	5.42 ± 2.75
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD158b <sup>+</sup>	7.91 ± 3.85	16.10 ± 9.37 <sup>#</sup>	9.10 ± 5.64 <sup>#</sup>	8.67 ± 5.12 <sup>#</sup>	7.66 ± 4.10 <sup>#</sup>

<sup>#</sup>  $P < 0.05$  vs before transplant; \*  $P < 0.05$  vs cGVHD.

Cw2 4 5 6 识别, CD158b 与 HLA-Cw1 3 7 8 识别。当 KIR 所识别的 MHC 配体缺失时,表现出对靶细胞的杀伤作用(所谓丢失自我“missing self”机制)。已证实, NK 细胞和 T 细胞的 KIR 分子与靶细胞的 MHC 分子特异性的识别机制参与 GVHD 的发生, KIR 的存在可能是免疫活性细胞不攻击自身组织的主要机制<sup>[2]</sup>。KIR 最早是在 NK 细胞发现的,当发现在 T 细胞也表达时,对其意义并不清楚。在接受 HLA 部分相合骨髓移植治疗的慢性粒细胞白血病患者发现,供者高表达 CD158b 的 CTL 可以抑制 GVHD 而不丧失 GVL 效应<sup>[7]</sup>。有报道在异基因骨髓移植患者,表达在 NK 细胞的 CD158b 分子(CD3<sup>-</sup> CD158b<sup>+</sup>)的表达水平在移植早期升高,而这些患者只有轻度的急性 GVHD,提示 CD3<sup>-</sup> CD158b<sup>+</sup> 细胞可能在控制急性 GVHD 的发生起作用。而在移植后 3 个月内以及发生慢性 GVHD 的患者 CD3<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> 表达水平平均增加,而且主要是属于 CD8<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> 细胞,提示 CD158b 在 T 细胞的表达增加与 cGVHD 的发生时慢性刺激有关<sup>[3]</sup>。本文报道的 6 例异基因造血干细胞移植患者,发生慢性 GVHD 时 CD158b<sup>+</sup> 的 T 细胞比例也明显高于移植前,所有患者在治疗后 CD158b 在 T 细胞的表达均表现为逐渐下降,但在维持治疗的 6 个月到 1 年内仍高于正常儿童水平,提示慢性 GVHD 发生过程中供者免疫细胞受慢性抗原刺激慢性刺激增强了 CD158b<sup>+</sup> T 细胞的扩增,这些扩增的 T 细胞可能在慢性 GVHD 的异基因反应中发挥一定的作用。

慢性 GVHD 的发病机制目前并未完全十分清楚,一般认为主要仍是因为植入的正常供者免疫活性细胞对受者的免疫攻击,根本原因在于供受者的主要或次要组织相容性抗原的差异。此外,可能存在自身免疫的因素参与。目前慢性 GVHD 治疗首选

激素或激素联合免疫抑制剂。FK506 和 MMF 是近年来用于治疗慢性 GVHD 的新的免疫抑制剂。FK506 是从筑波菌群链霉菌属的培养物中提取的大环内酯类物,能可逆地特异作用于淋巴细胞,抑制其介导的免疫反应和 IL-2 的合成与释放。在密切监测血药浓度情况下发现其对肝脏慢性 GVHD 的治疗效果明显。MMF 是一种活性免疫抑制剂霉酚酸的脂类产物,选择性抑制 T、B 淋巴细胞,抑制抗体形成及下调淋巴细胞表面粘附分子表达。MMF 可增强 FK506 的活性,已有报道 MMF 与 FK506 联合治疗顽固性慢性 GVHD 取得了较好的疗效<sup>[8]</sup>。对于肝脏本来有不同程度纤维化的重型地中海贫血患者,在异基因造血干细胞移植后发生肝脏慢性 GVHD 的可能性明显增加。本文 6 例患者均为对皮质激素和/或 CsA 治疗无效或耐药的顽固性慢性 GVHD 病例,其中 3 例经肝活检证实为肝脏慢性 GVHD,经选择 FK506、MMF 和 MP 联合方案治疗均有效,尤其是肝慢性 GVHD 明显好转,肝功能明显好转。从我们追踪观察 CD158 分子的表达水平来看,该联合方案治疗慢性 GVHD 有效的机制之一可能是下调 CD158b 分子在 T 细胞的表达,从而调节免疫反应。

#### [参 考 文 献]

- [1] Ljunggren HG, Kärre K. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition[J]. Immunol Today, 1990, 11: 237-244.
- [2] 段连宁,李树浓. 表达在 T 细胞的杀伤性抑制性受体的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 18(7): 767-770.
- [3] Tanaka J, Tutumi Y, Mori A, et al. Sequential analysis of HLA-C-specific killer cell inhibitory receptor (CD158b)

- expressing peripheral blood mononuclear cells during chronic graft- versus- host disease [ J ]. Bone Marrow Transplant, 2000, 26(3): 287- 290.
- [ 4 ] 段连宁, 陈 纯, 黄绍良, 等. 造血干细胞移植后 GVHD 患者 CD158 表达情况的观察 [ J ]. 中华血液学杂志, 2002, 23(10): 544- 545.
- [ 5 ] 陈 纯, 黄绍良, 魏 菁, 等. 人脐血 T.B 淋巴细胞和 NK 细胞的免疫学表达特性 [ J ]. 中华儿科杂志, 2002, 40(6): 328- 332.
- [ 6 ] 曹履先 主编. 临床骨髓移植 [ M ]. 北京: 军事医学科学出版社, 1999. 115.
- [ 7 ] Albi N, Ruggeri L, Aversa F, et al. Natural killer- cell function and antileukemic activity of expressing NK receptor for major histocompatibility complex class I after “three- loci” HLA incompatible bone marrow transplantation [ J ]. Blood, 1996, 87(10): 3993- 4000.
- [ 8 ] Mookerjee B, Altomone V, Vogelsang G. Salvage therapy for refractory chronic graft- versus- host disease with mycophenolate mofetil and tacrolimus [ J ]. Bone marrow Transplant, 1999, 24(8): 517- 520.

## Expression of CD158 in refractory chronic graft- versus- host diseases treated with tacrolimus, mycophenolate mofetil combined with methylprednisone

CHEN Chun<sup>1</sup>, FANG Jian- pei<sup>1</sup>, DUAN Lian- ning<sup>2</sup>, WEI Jing<sup>3</sup>, HUANG Shao- liang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, Zhongshan University, Guangzhou 510120, China;

<sup>2</sup>Department of Hematology, The General Hospital of Air Force, Beijing, 100030, China;

<sup>3</sup>Medical Research Center, The Second Affiliated Hospital, Zhongshan University, Guangzhou 510120, China)

[ **ABSTRACT** ] **AIM:** To investigate the sequence expression of CD158 molecule after tacrolimus (FK506), mycophenolate mofetil (MMF) combined with methylprednisone (MP) treatment for refractory chronic graft- versus- host diseases (cGVHD). **METHODS:** The efficacy and the side effect were observed in 6 child patients with extensive cGVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation treated with the combination of FK506, MMF and MP, meanwhile the changes of the CD158 expressions on T lymphocytes and NK cells in peripheral blood before and after treatment were observed. **RESULTS:** The expression of CD4<sup>+</sup> CD158a<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> were very low before and after transplantation and treatment, there was no statistical significance. The expression of CD3<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> were 4.97% ±2.36% and 4.58% ±2.90% respectively in five patients with acute GVHD, and there was statistical significance compared with that of before- transplantation (P < 0.05). The expression of CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> was also higher than that of before transplantation (P < 0.05). In the six patients with chronic GVHD, the expressions of CD3<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> were higher than those of before transplantation (P < 0.05), and decreased gradually after the effective combined treatment, there was statistical significance (P < 0.05) compared with those during the time of cGVHD, but were still higher than that before transplantation. The expression of CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> decreased at the late stage after transplantation and was closed to the level of before- transplantation. **CONCLUSIONS:** The increase in expression of CD158b on T cells might be related to cGVHD. The combined immunosuppression with FK506, MMF and MP is feasible for the treatment of cGVHD. The possible mechanism of the combined immunosuppression with FK506, MMF and MP may be the down- regulation of CD158 expression on T lymphocytes and NK cells.

[ **KEY WORDS** ] CD158; T- lymphocytes; Graft vs host disease; Tacrolimus; Mycophenolic acid; Methylprednisolone