

环孢素 A 及他克莫司对移植肾受者 Th 免疫基因的调控

文 进, 纪志刚, 牛吉瑞

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院泌尿外科, 北京 100730

通信作者: 纪志刚 电话: 010-69156073, 电子邮件: wjxmc@163.com

摘要: 目的 观察环孢素 A (CsA) 和他克莫司 (FK506) 分别作用后, 移植肾受者 Th 基因的表达变化。方法 分离移植肾受者在药物作用前后 24 h 的外周血淋巴细胞, 将其总 RNA 分别逆转录并行实时定量 PCR 检测, 使用生物信息学方法对检测结果进行比较分析。结果 CsA 作用 24 h 后, Th 家族中的 TLR4、CEBPB、IL4R、IL1R1、IL18R1、IL1R2 基因显著上调, IL-2、CCL5、CD27、CCR5、CCR4、CD4、RPL13A、TGFB3、CD86、CCR3、STAT1、NFATC2IP、IL23A、IL15、IRF4、TFCP2 基因显著下调。FK506 作用 24h 后, IL18、IL7、PTPRC、TNFSF4、SPP1、GFI1、TLR4、IL13RA1、TNF、INHBA、LAG3、IL13、IL1R1、SOCS5、IL10、YY1、TBX21、FASLG、IL18R1、IL1R2 基因显著上调, CCR5、CD4、CD27、CD40LG、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL15、CCR3、CD86、CCR4、IRF4 基因显著下调。结论 CsA 及 FK506 可能通过调控以上辅助性 T 淋巴细胞免疫基因发挥药理作用。

关键词: 基因表达调控; 肾移植; 基因芯片; 环孢素 A; 他克莫司

中图分类号: R392.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2012)06-0563-04

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2012.06.005

Regulatory Effects of Cyclosporin A and Tacrolimus on Th Immunological Gene Expressions in Renal Transplant Recipients

WEN Jin, JI Zhi-gang, NIU Ji-rui

Department of Urology, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: JI Zhi-gang Tel: 010-69156073, E-mail: wjxmc@163.com

ABSTRACT: Objective To observe the change of Th immunological gene in renal transplant recipients after the treatment of cyclosporine (CsA) and tacrolimus (FK506). **Methods** The peripheral blood lymphocytes just before and 24 hours after CsA and FK506 treatment were isolated. The total RNA of them were reverse-transcribed and examined by real-time quantity PCR array. The results were analyzed by bioinformatic methods. **Results** The TLR4, CEBPB, IL4R, IL1R1, IL18R1, and IL1R2 genes were remarkably upregulated, whereas IL-2, CCL5, CD27, CCR5, CCR4, CD4, RPL13A, TGFB3, CD86, CCR3, STAT1, NFATC2IP, IL23A, IL15, IRF4, and TFCP2 were downregulated 24 hours after CsA treatment. The IL18, IL7, PTPRC, TNFSF4, SPP1, GFI1, TLR4, IL13RA1, TNF, INHBA, LAG3, IL13, IL1R1, SOCS5, IL10, YY1, TBX21, FASLG, IL18R1, and IL1R2 genes were remarkably upregulated, whereas IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, CCR5, CD4, CD27, CD40LG, IL15, CCR3, CD86, CCR4, and IRF4 were obviously downregulated 24 hours after FK506 treatment. **Conclusion** CsA and FK506 exert their therapeutic effectiveness by regulating the expressions of a series of target genes.

Key words: gene expression regulation; renal transplantation; genechip; cyclosporine; tacrolimus

Acta Acad Med Sin, 2012, 34(6):563-566

环孢素 A (cyclosporine A, CsA) 和他克莫司 (tacrolimus, FK506) 是同种异体肾移植术后主要的免疫抑制治疗药物, 同属钙调磷酸酶抑制剂 (calcineurine inhibitor, CNI) 类药物, 但其在免疫调节效应、用药剂量和不良反应等方面却各具特点。本研究采用功能分类基因芯片, 观察了 CsA 和 FK506 对移植肾受者辅助性 T 淋巴细胞 (Th) 免疫基因的影响, 以期从中筛选出差异常表达基因进行功能研究, 从而揭示二者作用靶基因, 为临床有效用药提供新的理论和实验依据。

材料和方法

标本来源 随机选取 2011 至 2012 年在北京协和医院接受同种异体肾移植术的志愿者 4 名 (手术当日及术后 48 h 内外周血白细胞数正常, 淋巴细胞计数日变化量不超过 CBC-3DL 血液自动分析仪允许误差范围, $4 \times 10^8/L$), 每人在 CsA 和 FK506 治疗前及治疗后 24 h 各提供 10 ml 全血, 经分离、纯化可得 10^7 个淋巴细胞。

主要仪器和试剂 淋巴细胞分离液购于上海试剂二厂, RNA 抽提试剂 Trizol 购自美国 GIBCO 公司, 免疫基因芯片 “Human Th1-Th2-Th3” 为上海康成生物有限公司产品。

实验分组 根据使用的 CNI 不同, 分为 CsA 组和 FK506 组, 即 CsA 和 FK506 作用 24 h 时, 外周血淋巴细胞作实验组, 药物治疗前外周血淋巴细胞作对照组。CsA 用量为 $6 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, FK506 用量为 $0.1 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。

淋巴细胞分离 采集 EDTA 抗凝外周全血标本, 在无菌条件下采用 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血淋巴细胞; 取外周血, 肝素抗凝, 全血 $2000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min; 吸白膜, 加入适量 1% 甲基纤维素除血小板, 少许羧基铁粉祛除单核细胞, 充分混匀。室温旋转培养 25 min, 立 30 min。取上清缓慢转入另一已加入 5 ml 淋巴细胞分离液的离心管中, 并使上述混合液处于淋巴细胞分离液液面之上, 保留清晰的界面, $2000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 30 min; 用移液枪小心分离出淋巴细胞层; 用已除 RNA 酶的 PBS 清洗细胞。先后以 $2000 \text{ r}/\text{min}$ 10 min, $1200 \text{ r}/\text{min}$ 6 min, $800 \text{ r}/\text{min}$

6 min 离心回收细胞, 弃去上清。

总 RNA 抽提 采用一步法抽提总 RNA。每 10 ml 全血分离出的淋巴细胞加入 2 ml 的 Trizol 试剂, 用一次性注射器进行反复抽打细胞直至看不见成团的细胞块, 使之充分溶解于 Trizol 中形成清亮不黏稠的液体; 加 0.4 ml 氯仿分离 RNA, 1 ml 异丙醇沉 RNA, 2 ml 75% 乙醇洗涤, Rnase-free 的水溶解 RNA, 紫外分光光度计检测 A260/A280 比值及浓度。RNA 样本的 OD260/OD280 应在 1.7~2.2 之间, 总 RNA 电泳图谱有清晰的 28 S、18 S 条带且 $28\text{S} = 2 \times 18\text{S}$ 为合格样品。-70℃ 冻存。

实时定量 PCR 聚合酶激活/变性, 95℃, 10 min; 扩增 40 个循环, 95℃, 15 s; 60℃, 1 min, 收集荧光。阳性结果判断: 挑选差异表达的探针函数返回一个 PC 类的对象, 包括两部分 fc 和 tt, fc 是 \log_2 fold change, 而 tt 是 t 检验的 P 值。 $\log_2(\text{FC}) > 2$ 或 < -2 为差异表达基因。

结 果

CsA 作用组差异表达基因 CsA 作用 24 h 后, Th 家族中的 TLR4、CEBPB、IL4R、IL1R1、IL18R1、IL1R2 基因显著上调, IL-2、CCL5、CD27、CCR5、CCR4、CD4、RPL13A、TGFB3、CD86、CCR3、STAT1、NFATC2IP、IL23A、IL15、IRF4、TFCP2 基因显著下调。

FK506 作用组差异表达基因 FK506 作用 24 h 后, IL18、IL7、PTPRC、TNFSF4、SPP1、GFI1、TLR4、IL13RA1、TNF、INHBA、LAG3、IL13、IL1R1、SOCS5、IL10、YY1、TBX21、FASLG、IL18R1、IL1R2 基因显著上调, IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、CCR5、CD4、CD27、CD40LG、IL15、CCR3、CD86、CCR4、IRF4 基因显著下调。

讨 论

机体对移植肾的免疫应答主要包括以下几个过程: (1) 抗原递呈细胞对移植肾人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 的识别和提取。(2) 共刺激信号诱导淋巴细胞的活化, 包括: 早期跨膜信息的传递; 各种早反应基因的转录性活化;

新的淋巴细胞表面分子的表达；T、B 淋巴细胞增殖的诱导，分化出各种效应细胞通过各种途径攻击移植肾，引起各种类型排斥反应^[1]。研究表明，CD4 + Th1 细胞主要参与急性排斥反应，CD4 + Th2 细胞则主要参与慢性排斥反应，而 CD8 + T 细胞在移植排斥反应中除具有攻击杀伤的细胞毒作用外，同时还具有免疫调节效应。迄今为止，抑制移植排斥反应的最好办法仍是应用免疫抑制剂。肾脏移植外科手术以后，免疫抑制应用及调控至关重要，不同的免疫抑制剂应用方案及免疫调控手段，可能使肾脏移植受者出现不同的结局。目前采用以 CsA 和 Fk506 为基础的免疫抑制治疗方案^[2-3]。

蛋白水平研究表明，CsA 是一种 CNI，通过与 T 细胞胞浆内的 CsA 受体结合，抑制 T 细胞的活化与增殖，产生免疫抑制。CsA 的临床应用使器官移植存活率上升到 80% ~ 90%。FK506 也是一种 CNI，主要作用于 T 细胞，但免疫抑制作用为 CsA 的 10 ~ 100 倍。FK506 进入细胞内首先与 FK506 结合蛋白 (FK506 binding protein, FKBP) 结合成复合体，该复合体抑制神经钙调磷酸酶，阻止了 T 细胞核中的活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT)^[4-5]。随着分子免疫学研究的飞速发展，人们逐渐认识到机体针对移植肾的免疫应答严格受各种基因控制。免疫抑制药物通过对各条免疫应答途径涉及的一系列基因调控，实现其药理作用。

本研究采用辅助性 T 淋巴细胞 (Th) 基因芯片分析 CsA 和 FK506 对移植肾受者 Th 免疫基因的影响，从中筛选出差异常表达基因，进而了解这两种常用的 CNI 免疫调节作用的异同，以求正确评估两药在抗排斥反应的差别，为患者预防排斥反应及为肾移植术后制订更加合理的免疫抑制方案提供实验依据。该芯片是一种功能分类基因芯片，所有入选基因几乎都与某一明确的信号通路直接相关，并且通常都可以找到论证其入选资格的科学文献。本研究通过实验设计，采用几个功能分类芯片便可以达到使用高通量表达谱芯片的同样目的，从而达到事半功倍的效果。功能分类基因芯片采用了预先经过科学验证的标准和知识为基础，这对于研究的准确可靠性是十分有益的。因此，可以把功能分类基因芯片的结果比作对基因图谱进行局部放大的分子图像。通过这一技术，基因技术革命或许会在生物医药和临床诊治研究中发挥更大的做用^[6-7]。利用功能分类基因芯片以上特性可在药物和基因之间架起一座桥

梁，能从基因水平解释药物的作用机制，不仅能为药物的应用奠定坚实的理论基础，还能为药物的进一步开发和设计提供理论指导。应用基因芯片可以平行测定几千个基因的表达变化，因而可以用来寻找有意义的药物作用靶标，监测药物治疗过程中基因表达的变化，还可以直接筛选特定的基因文库以寻找药物作用的靶点^[8]，有助于快速、准确地鉴别和确认药物靶标。

本研究结果显示，CsA 和 FK506 能通过调控一系列基因，发挥有效的免疫抑制作用。CsA 作用 24 h 后，Th 家族中的 TLR4、CEBPB、IL4R、IL1R1、IL18R1、IL1R2 基因显著上调，IL-2、IL15、CCL5、CD27、CCR5、CCR4、CD4、RPL13A、TGFB3、CD86、CCR3、STAT1、NFATC2IP、IL23A、IRF4、TFCP2 基因显著下调。FK506 作用 24 h 后，IL18、IL7、PTPRC、TNFSF4、SPP1、GFI1、TLR4、IL13RA1、TNF、INHBA、LAG3、IL13、IL1R1、SOCS5、IL10、YY1、TBX21、FASLG、IL18R1、IL1R2 基因显著上调，IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、CCR5、CD4、CD27、CD40LG、IL15、CCR3、CD86、CCR4、IRF4 基因显著下调。这表明尽管 CsA 和 FK506 免疫调节作用靶点存在差异，但二者均能不同程度抑制辅助性 T 淋巴细胞 IL-2、IL15、CCR3、CCR4、CCR5、CD4、CD86、IRF4 的表达，进而特异性抑制机体对移植肾的免疫应答。

对不同免疫抑制剂作用靶点的研究，将有助于进一步了解各种免疫抑制剂对 T 细胞活化和效应调节特点，掌握其对 T 细胞免疫耐受的诱导调节效应。本研究尽管只提示了 CsA 和 FK506 的部分药理作用，但为临床深入研究免疫抑制剂的分子药理作用提供了一个理想模式。在特异性免疫耐受的诱导尚未成功之前，免疫抑制剂仍是肾移植不可替代的治疗手段。合理搭配现有免疫抑制药物，制订个体化的免疫抑制方案，并探索从单纯免疫抑制到免疫调节的综合治疗措施，仍是一个有效途径。

参 考 文 献

- [1] Tseng SY, Dustin ML. T cell activation : a multidimensional signaling network [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, 14(5): 575-580.
- [2] Wittmann M, Killig C, Bruder M, et al. Critical involvement of IL-12 in IFN-gamma induction by calcineurin antagonists in activated human lymphocytes [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(1):75-86.

- [3] Ito T, Ueno T, Clarkson MR, et al. Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses *in vivo* [J]. *J Immunol*, 2005, 174(11):6648-6656.
- [4] Almawi WY, Melemedjian OK. Clinical and mechanistic differences between FK506 (tacrolimus) and cyclosporin A [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(12):1916-1918.
- [5] Sommerer C, Zeier M, Meuer S, et al. Individualized monitoring of nuclear factor of activated T cells-regulated geneexpression in FK506-treated kidney transplant recipients [J]. *Transplantation*, 2010, 89(11):1417-1423.
- [6] Draghici S, Khatri P, Bhavsar P, et al. Onto-Tools, the tool-kit of the modern biologist: Onto-Express, Onto-Compare, Onto-Design and Onto-Translate [J]. *Nucl Acid Res*, 2003, 31(13):3775-3781.
- [7] Nelson PJ, Werner T. Pathways and promoter networks analysis provides systems topology for systems biology approaches [J]. *Semin Nephrol*, 2010, 30(5):477-486.
- [8] Bottinger EP, Ju W, Zavadil J. Applications for microarrays in renal biology and medicine [J]. *Exp Nephrol*, 2002, 10(2):93-101.

(收稿日期: 2012-02-15)