

• 移植免疫临床应用专题 •

肾移植受者不同免疫诱导方案治疗后 TCR 高可变区监测结果差异分析

韩锋 豆猛 郑秉暄 王宇祥 丁晨光 丁小明 薛武军 郑瑾 田普训

西安交通大学第一附属医院肾脏病医院肾移植科 710061

通信作者:田普训,Email:yuantian@mail.xjtu.edu.cn

【摘要】 目的 观察总结不同诱导方案对亲属活体肾移植受者 T 淋巴细胞受体(TCR)高可变区监测结果的差异影响及其意义。方法 采用非干预性纵向观察,根据术后早期使用免疫诱导抗体不同,将 12 例亲属活体肾移植受者分为巴利昔单抗组(BLX 组,4 例)、抗人类胸腺免疫球蛋白组(rATG 组,4 例)和甲泼尼龙组(MP 组,4 例),建立免疫组库分析术前第 3 d(服药前)和术后 1 周、2 周、1 个月外周血 TCR-CDR3 克隆多样性、克隆频率、克隆变化模式等差异,并通过与免疫相关标志物表达的相关性,分析各组结果差异及可能存在的临床意义。结果 移植受者和移植肾均存活;术后免疫抑制方案按照受者免疫状态调整用药剂量,未出现急性排斥反应,rATG 组出现 2 例轻度感染;TCR-CDR3 克隆多样性、克隆频率、克隆变化模式及部分免疫标志物指标等在各组间及组内均发生改变,其中 rATG 组改变最明显。结论 受者外周血 TCR-CDR3 表达谱在不同免疫诱导方案应用后出现不同的表达特点,与免疫状态的改变显示出一定相关,在亲属活体肾移植受者中可能成为一种对感染或排斥有预测价值的检测方法。

【关键词】 肾移植; T 淋巴细胞受体; 基因; 免疫

基金项目: 陕西省自然科学基金(2017ZDJC-09)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.12.002

Analysis of the difference of the monitoring results of TCR high variable area in renal transplant recipients after treatment with different immune induction schemes

Han Feng, Dou Meng, Zheng Bingxuan, Wang Yuxiang, Ding Chengguang, Ding Xiaoming, Xue Wujun, Zheng jin, Tian Puxun

Department of Kidney Transplantation, Hospital of Nephropathy, First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Corresponding author: Tian Puxun, Email: yuantian@mail.xjtu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To observe and summarize the effect of different induction schemes on the highly variable region of T-lymphocyte receptor (TCR) in living relative renal transplant recipients. **Methods** According to the early use of immune-induced antibody, 12 living relative kidney transplant recipients were divided into three groups: baliximab group (BLX group, 4 cases), Rabbit anti human thymus immunoglobulin group (rATG group, 4 cases) and methylprednisolone group (MP group, 4 cases). The immune group library was established to analyze the three days before operation (before administration) and one week, two weeks and one month after operation Blood TCR-CDR3 Clone Diversity, clone frequency, clone change mode and other differences, and through the correlation with the expression of immune related markers, analyze the differences of results in each group and the possible clinical significance. **Results** There were no acute rejection and 2 cases of mild infection in rATG group. The clonal diversity, clonal frequency, clonal change mode and some immune markers of TCR-CDR3 were changed in all groups and groups, especially in rATG group. **Conclusions** The expression profile of TCR-CDR3 in the peripheral blood of recipients showed different expression characteristics after the application of different immune induction schemes, which was related to the change of immune status to a certain extent. It may become a detection method with predictive value for infection or rejection in living relative kidney transplant recipients.

【Key words】 Kidney transplantation; T cell receptor; Gene; Immune

Fund program: Major Basic Research Project of Shaanxi Province (2017ZDJC-09)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.12.002

目前普遍认为,提高肾移植受者和移植肾的长期存活率需要根据受者免疫应答状态进行个性化的免疫抑制治疗,特别需要识别可能出现急性排斥反应或移植物功能加速损害的潜在“高危风险”、以及可能需要免疫抑制强化的受者^[1-2]。临床主要依据受者体重、供受者配型情况和血药浓度等对免疫诱导及维持药物的用量进行经验性调整^[3]。肾移植受者 TCR-CDR3 表达谱的变化能够反映当前的 T 淋巴细胞活化状态^[4],理论上可以运用于肾移植术后免疫监测,增进对免疫诱导药物作用效果的认识。

方 法

一、研究对象、分组和免疫抑制方案

采用纵向观察、非干预研究,选择 2018 年 3 月至 2018 年 9 月在西安交通大学第一附属医院接受亲属活体肾移植的受者,随访时间大于 1 年,共入组 12 例受者,均经省、院人体器官移植技术临床应用与伦理委员会批准(伦理审批号:2018-291)。

1. 纳入标准:经系统评估,无禁忌证,可作为亲属活体肾移植受者的尿毒症患者,供者为其父亲或母亲。

2. 排除标准:(1)同时进行两个及两个以上脏器的器官移植;(2)术后发现肝炎、结核等传染病;(3)术后严重肺部感染;(4)其他活动性感染;(5)恶性肿瘤;(6)移植肾外科并发症;(7)免疫抑制剂用量不符合本中心标准。

3. 分组:根据诱导药物的使用种类初步将 12 例受者分为(1)甲泼尼龙组(MP 组);(2)巴利昔单抗+甲泼尼龙组(BLX 组);(3)抗人类胸腺免疫球蛋白+甲泼尼龙组(rATG 组);每组各 4 例。

4. 免疫抑制方案:术前、术后免疫抑制方案按照本中心的常规三联免疫抑制剂(早期低剂量 CNI+足量 MPA+糖皮质激素)^[5]。三组术中均使用 MP 诱导剂量为 500 mg,MP 组:术后 5 d MP 用量分别为 500 mg/d、500 mg/d、250 mg/d、250 mg/d、120 mg/d;BLX 组:术后 4 d MP 用量分别为 500 mg/d、500 mg/d、250 mg/d、250 mg/d;rATG 组术后 4 d MP 用量为 250 mg/d、120 mg/d、120 mg/d、80 mg/d。

二、研究方法

1. 取样:本研究样本均取自受者外周血,TCR-CDR3 免疫组库研究采样时间点分别为术前 3 d、术后 1 周、2 周、1 个月。

2. 多重 PCR:在 TCR 的位于 CDR3 区两端的 V、J 基因保守区域设计 PCR 引物,通过多重 PCR

扩增得到互补决定区 CDR3 区域,扩增产物用于后续高通量测序建库,实验原理见图 1。

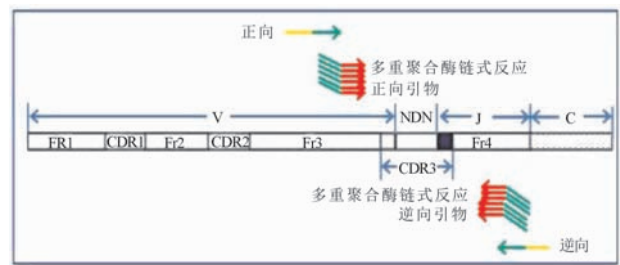


图 1 免疫组库实验流程图

3. 采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中 sCD30、HLA-G5 浓度变化,试剂盒由美国 R&D 生物公司提供。

4. RT-PCR 检测颗粒酶 B 和穿孔素的表达,穿孔素前引物为 5'-CAACTTGCAGCCAGAGACAAC-3',反向引物 5'-TGGGTGGAGGTGTGAA-3',颗粒酶正向引物为 5'-CAGGAAGATCGAAAGTGC GAAT-3',反向引物为 5'-GAGGCATGGTGTCTC-3',应用 Taqman 荧光探针试剂盒。

5. 淋巴细胞亚群及髓源性抑制细胞(MDSC)检测:应用流式细胞技术检测全血中淋巴细胞及 MDSC(CD11b⁺ CD33⁺ HLR-DR-CD14⁺)绝对数量及比例。

三、免疫组库数据分析流程

1. 对测序所得的数据进行质控,以确定测序数据是否适用于后续分析。

2. 经过滤得到的净读数比对到参考序列,将比对的读数做进一步的组装,得到 TCR-β 链的 CDR3 区域。

3. 碱基质量符合要求的克隆序列会作为核心克隆,存在一个以上质量值较差碱基的克隆会以核心克隆作参考二次比对和校正。

4. 对相差一个碱基的克隆,进行层次聚类,每个分支间仅有一个碱基差别,依次聚类下去,克隆频率低的克隆会合并到上一分支,最终保留最顶端的头序列。

5. 将上述克隆序列再次比对到 V、D、J 和 C 参考序列,最终得到的统计文件包含克隆序列、氨基酸残基序列、克隆数量、克隆频率,V/J 基因组合等信息。

四、统计学处理

采用 MiXCR^[6]免疫组库数据处理分析软件比对;SPSS 20.0 软件处理数据,多组数据应用单因素

方差分析,其中两两比较采用 LSD-*t* 检验;R 语言分析总体多样性指数、高克隆片段及克隆变化模式。正态分布计量资料以 Mean ± SD 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、三组受者预后

12 例受者、移植肾均存活,其中 1 例出现切口愈合不良,积极换药后 1 个月伤口愈合;1 例出现泌尿系统感染(肺炎克雷伯菌),给予美罗培南治疗(1500 mg/d,静脉滴注,一天 3 次)2 周后治愈;1 例术后 1 周出现轻度肺部感染(胸部 X 线检查提示右下肺炎性浸润表现,未培养出致病菌),莫西沙星治疗(400 mg/d,静脉滴注)2 周后好转出院。上述 2 例不同部位的轻度感染均出现在 rATG 组。

二、TCR-CDR3 总体多样性指数

TCR-CDR3 总体多样性指数能反映机体对环境中不同抗原免疫反应能力。三组受者术前、术后不同时间点内 TCR-CDR3 多样性指数不同,其中 MP 组和 BLX 组变化不显著,rATG 组术后较术前降低明显,而将四个时间点的数据进行单因素方差分析时并无明显统计学差异($P < 0.05$,表 1)。分析数据发现术后三个时间点该指数的差异不大,而术前与术后(即用药前与用药后)区别较大,因此我们将术前 3 d 及术后 1 周、术后 2 周、术后 1 个月三个时间点进行两两比较(表 2),发现 rATG 组用药前后 TCR-CDR3 总体多样性指数差异有统计学意义,这进一步说明了 rATG 对 TCR-CDR3 总体多样性的影响最大,对机体免疫力的抑制作用最为显著。

三、高克隆(HEC)片段的变化

当免疫系统对某一特定抗原或病原体发生免疫应答时,具有相应 TCR 的 T 淋巴细胞活化、扩增,

TCR-CDR3 克隆频率明显升高,即高克隆(HEC)。BLX1、rATG1、rATG2、rATG3 在术后 1 周时,TCR-HCE 占总体比例升高,预示其免疫多样性降低,易发感染。而其中 rATG1、rATG2 在术后 2 周和 1 个月 TCR-HCE 占总体比例仍然较高,恰好是出现泌尿系统和肺部感染症状的 2 例受者,说明 TCR-CDR3 的监测有提示和预测感染易感性的作用。

四、克隆变化模式的不同

根据不同时间点之间的克隆变化模式,可分为 4 类:新生、删除、扩增、收缩,分别反映 TCR 基因表达的不同状态,组内每例受者的模式变化情况均存在较大差异,说明 TCR 多态性的表达个体差异明显。在组间和组内的分析中我们也得到了类似的结果,rATG 对免疫系统的影响最为明显。

五、其他免疫学检测指标的变化

为了评估 TCR-CDR3 的克隆频率变化与免疫状态的关系,详细采集肾移植术后常用免疫标志物(sCD30、HLA-G5、颗粒酶 B、穿孔素、淋巴细胞亚群变化、MDSC)浓度指标,对比分析 TCR-CDR3 监测的潜在价值。在对应时间点运用 ELISA、RT-PCR 等技术检测了 sCD30、颗粒酶 B、穿孔素、淋巴细胞亚群变化相对浓度的情况,发现 sCD30、颗粒酶 B、穿孔素、自然杀伤 T 淋巴细胞数以及 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞的数量在免疫诱导治疗后变化较大,rATG 组最明显,而 HLA-G5 和 MDSC 占外周血单个核细胞(PBMC)的比例变化不显著(表 3)。

结合前述结果,TCR-CDR3 的克隆多样性可能类似 sCD30、颗粒酶 B、穿孔素、自然杀伤 T 淋巴细胞数以及 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数量等指标,可反映受者免疫状态,与早期排斥反应和感染相关,暂时未发现与免疫耐受的相关性。

表 1 不同诱导药物受者免疫学相关标志物及 T 淋巴细胞亚群多样性指数变化(Mean ± SD)

分组	例数	术前 3 d	术后 1 周	术后 2 周	术后 1 月	P 值
MP 组	4	8.44 ± 0.65	8.15 ± 1.37	7.97 ± 0.71	7.71 ± 0.70	>0.05
BLX 组	4	8.80 ± 0.27	7.89 ± 0.68	8.56 ± 0.90	8.89 ± 0.45	>0.05
rATG 组	4	8.10 ± 0.58	6.34 ± 1.37	6.39 ± 1.64	6.18 ± 1.33	>0.05

注:MP 为甲泼尼龙;BLX 为巴利昔单抗;rATG 为抗人类胸腺免疫球蛋白

表 2 不同诱导药物受者术前 3 d 与术后三个时间点 TCR-CDR3 总体多样性指数两两比较结果(Mean ± SD)

分组	例数	术前 3 天	术后 1 周	术后 2 周	术后 1 月	P 值
MP 组	4	8.44 ± 0.65	8.15 ± 1.37	7.97 ± 0.71	7.71 ± 0.70	均 >0.05
BLX 组	4	8.80 ± 0.27	7.89 ± 0.68	8.56 ± 0.90	8.89 ± 0.45	均 >0.05
rATG 组	4	8.10 ± 0.58	6.34 ± 1.37	6.39 ± 1.64	6.18 ± 1.33	均 <0.05

注:MP 为甲泼尼龙;BLX 为巴利昔单抗;rATG 为抗人类胸腺细胞免疫球蛋白

表 3 不同诱导药物受者术前、术后免疫学相关标志物及 T 淋巴细胞亚群相对浓度变化(Mean ± SD)

分组	例数	sCD30($\mu\text{g/L}$)				P 值	HLA-G5($\mu\text{g/L}$)				P 值
		术前 3 d	7 d	14 d	30 d		术前 3 d	7 d	14 d	30 d	
MP 组	4	29.20 ± 6.86	18.26 ± 7.70	15.12 ± 5.24	10.86 ± 6.70	<0.01	326 ± 72	279 ± 92	334 ± 79	372 ± 61	0.257
BLX 组	4	30.60 ± 7.06	16.18 ± 6.18	14.26 ± 6.44	8.28 ± 5.78	<0.01	289 ± 53	292 ± 81	319 ± 29	327 ± 52	0.491
rATG 组	4	29.47 ± 8.50	13.70 ± 4.92	12.52 ± 3.64	8.13 ± 5.52	<0.01	297 ± 41	261 ± 63	299 ± 38	354 ± 73	0.051
分组	例数	颗粒酶 B(mRNA)				P 值	穿孔素(mRNA)				P 值
		术前 3 d	7 d	14 d	30 d		术前 3 d	7 d	14 d	30 d	
MP 组	4	199 ± 65	156 ± 45	164 ± 51	137 ± 37	0.101	168 ± 34	157 ± 45	146 ± 39	112 ± 51	<0.01
BLX 组	4	167 ± 38	106 ± 19	86 ± 25	83 ± 31	<0.01	172 ± 24	114 ± 29	92 ± 33	88 ± 20	<0.01
rATG 组	4	174 ± 35	86 ± 29	49 ± 31	54 ± 42	<0.01	159 ± 34	68 ± 21	45 ± 15	28 ± 8	<0.01
分组	例数	CD4 ⁺ T 淋巴细胞($\times 10^6/\text{L}$)				P 值	CD8 ⁺ T 淋巴细胞($\times 10^6/\text{L}$)				P 值
		术前 3 d	7 d	14 d	30 d		术前 3 d	7 d	14 d	30 d	
MP 组	4	575 ± 43	477 ± 63	448 ± 57	354 ± 29	0.076	427 ± 81	412 ± 35	342 ± 67	337 ± 48	0.045
BLX 组	4	532 ± 52	321 ± 54	227 ± 47	263 ± 28	<0.01	382 ± 62	267 ± 49	226 ± 54	177 ± 37	<0.01
rATG 组	4	624 ± 37	98 ± 23	81 ± 33	115 ± 29	<0.01	446 ± 55	87 ± 62	89 ± 38	138 ± 68	<0.01
分组	例数	NKT 淋巴细胞($\times 10^6/\text{L}$)				P 值	MDSC(%)				P 值
		术前 3 d	7 d	14 d	30 d		术前 3 d	7 d	14 d	30 d	
MP 组	4	198 ± 44	142 ± 34	115 ± 61	98 ± 66	<0.01	1.38 ± 0.33	1.26 ± 0.47	0.93 ± 0.16	1.52 ± 0.62	0.032
BLX 组	4	154 ± 42	68 ± 19	49 ± 16	56 ± 18	<0.01	1.27 ± 0.25	1.23 ± 0.43	1.15 ± 0.51	1.49 ± 0.29	0.656
rATG 组	4	166 ± 35	42 ± 16	45 ± 13	37 ± 9	<0.01	0.94 ± 0.38	0.87 ± 0.23	1.13 ± 0.58	1.02 ± 0.19	0.593

注:MP 为甲泼尼龙;BLX 为巴利昔单抗;rATG 为抗人类胸腺细胞免疫球蛋白;HLA 为人类白细胞抗原;NKT 为自然杀伤 T 淋巴细胞;MDSC 为髓源性抑制细胞

讨 论

TCR-CDR3 基因表达谱的研究目前主要集中在基础免疫方面,在器官移植领域仅有一篇关于肝移植术前术后 CDR3 表达序列变化的报道^[4]。本研究采用纵向队列非干预的方式,监测 12 例亲属活体肾移植受者术前、术后早期 TCR-CDR3 基因表达的改变,比较其克隆多样性、克隆频率、克隆变化模式等的改变,其中 rATG 组改变最为明显,结合临床表现,可以分析得出以下结论:①总体多样性指数变化说明 rATG 的应用使 TCR-CDR3 基因多样性减少,直接的后果是免疫力降低;②HEC 的变化可能提示受者在持续接受某种抗原刺激,最有可能是病原体,说明该阶段感染易感性升高。因病例数和阳性结果有限,我们运用其它免疫标志物反映 TCR-CDR3 免疫组库测序意义,检测了目前公认与排斥、感染以及耐受有关的常见标志物,发现 sCD30、颗粒酶 B、穿孔素、自然杀伤 T 淋巴细胞数以及 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数量在免疫诱导治疗后变化较大,在 rATG 组最为明显,而 HLA-G5 和 MDSC 占外周血单个核细胞(PBMC)的比例变化不显著。不足的是,基因的克隆多样性数据暂时无法与标志物指标进行匹配对比,仅能在趋势上给予间接说明。旨在深入了解不同免疫诱导方案肾移植受者的免疫状态,是对 TCR-CDR3 表达特点的初步探索,下一步将继续观察此方法相较于传统检测方法是否具有预

测排斥反应和感染的优越性。

本研究选择亲属活体肾移植受者作为研究对象主要原因在于:供肾来源于亲属,冷缺血时间短,可以排除其它免疫相关因素的干扰^[7];研究对象无自身免疫性疾病、感染等合并症,受者在未用免疫抑制剂前 T 淋巴细胞状态仅为尿毒症影响;受者依从性强,可以严格按照制定的免疫诱导方案(MP、BLX、rATG)及本中心的三联免疫抑制常规(早期低剂量 CNI+足量 MPA+糖皮质激素)进行科学分组研究,具有较好的同质性。12 例受者无急性排斥反应和严重感染,术后移植肾存活,受者生活质量良好,说明术后免疫抑制剂的应用科学合理,而 2 例不同部位轻度感染的受者均出现在 rATG 组,也部分反映 rATG 对术后早期 T 淋巴细胞识别与激活的影响最为明显,rATG 更适合运用在免疫风险高危人群,在亲属活体肾移植受者中应减少用量或使用更安全的非清除性免疫抑制剂。

在肾移植免疫抑制治疗由经验治疗向个体化治疗转化的阶段,免疫抑制方案和药物剂量尚未能完全结合个体特性,这是受者免疫不足或免疫过度的重要原因,影响其长期存活率。T 淋巴细胞免疫标志物检测的优点在于发现免疫状态改变的时间点早于移植组织损伤和临床症状的出现,无论是 T 淋巴细胞数量、比值、代谢状态,还是分泌细胞因子、支持 DSA 的持续分泌都反映了 T 淋巴细胞状态,而导致其功能发生改变的内在因素是基因表达水平的变

化,即 TCR 基因多样性的改变,最终造成 T 淋巴细胞接受抗原刺激后反应性的差异。本研究的出发点是寻找新的评估 T 淋巴细胞功能状态的方法,而实验结果也显示出一定的潜在评估价值。限于本研究中样本较少、且缺乏排斥或感染等阳性并发症结果,因此这项技术的突破需要扩大样本数进一步收集整理。

志 谢 对本文检测数据处理分析予以帮助的西安交通大学第一附属医院生物样本信息资源中心刘宇峰博士表示感谢!

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] TMSnowsill, J Moore, RE Mujica Mota, et al. Immunosuppressive agents in adult kidney transplantation in the National Health Service: a model-based economic evaluation[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 32(7): 1251-1259. DOI: 10.1093/ndt/gfx074.
- [2] Hrick DE. Transplant immunology and immunosuppression: core curriculum 2015[J]. *Am J Kidney Dis*, 2015, 65(6): 956-966. DOI: 10.1053/j.ajkd.2015.01.026.
- [3] Colvin M, Smith JM, Hadley N, et al. OPTN/SRTR 2017 annual data report: heart [J]. *Am J Transplant*, 2019, 19 Suppl 2: 323-403. DOI: 10.1111/ajt.15278.
- [4] G Yang, M Ou, H Chen, et al. Characteristic analysis of TCR beta-chain CDR3 repertoire for pre- and post-liver transplantation[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(77): 34506-34519. DOI: 10.18632/oncotarget.26138.
- [5] 田普训, 敖建华, 李宁, 等. 器官移植免疫抑制剂临床应用技术规范(2019 版)[J]. *器官移植*, 2019, 10(3): 213-226. DOI:10.3969/j.issn.1674-7445.2019.03.001.
- [6] DA Bolotin, S Poslavsky, I Mitrophanov, et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(5): 380-381. DOI: 10.1038/nmeth.3364.
- [7] 田普训, 薛武军, 丁小明, 等. 影响肾移植受者长期存活的多因素分析——单中心 989 例经验总结[J]. *中华器官移植杂志*, 2012, 33(12): 706-709. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2012.12.002.

(收稿日期:2019-02-07)

CHINESE MEDICAL ASSOCIATION
1915
中华医学学会