

· 临床研究 ·

围术期叉头翼状螺旋转录因子 3 mRNA 检测与慢性移植肾肾病的关系研究^{*}江海霞¹, 裘宇容¹, 孙德华¹, 王春艳¹, 李伟模², 李川江^{2△}

(南方医科大学南方医院:1. 检验医学科;2. 器官移植科, 广州 510515)

摘要:目的 探讨肾移植患者围术期外周血单核细胞(PBMC)中叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)表达水平与慢性移植肾肾病(CAN)的关系。方法 选取该院经临床表现及病理确诊为 CAN 的 35 例患者作为 CAN 组,同时选取 35 例移植肾功正常患者作为对照组。应用实时荧光定量 PCR 技术对患者围术期外周血 PBMC 中 Foxp3 mRNA 进行检测比较,为剔除研究 Foxp3 表达水平对 CAN 的影响时的干扰因素,对 CAN 的相关临床影响因素进行了分析。结果 CAN 组围术期 Foxp3 mRNA 表达低于正常对照组,两组相比差异具有统计学意义($P<0.01$)。对 CAN 影响因素筛选显示,两组急性排斥反应(AR)比较,差异具有统计学意义,进行再次分组比较显示,有无 AR 对 CAN 组及对照组中 Foxp3 水平无影响。结论 肾移植患者围术期外周血 PBMC 中 Foxp3 mRNA 水平与远期慢性移植肾肾病具有相关性,可以作为预测移植后慢性移植肾肾病发生危险程度的一个指标,指导个体化治疗。

关键词:肾移植;肾功能衰竭,慢性;叉头翼状螺旋转录因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.35.009

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)35-4255-02

A study on the relationship between perioperative detection of Foxp3 mRNA level and chronic allograft nephropathy^{*}Jiang Haixia¹, Qiu Yurong¹, Sun Dehua¹, Wang Chunyan¹, Li Weimo², Li Chuanjiang^{2△}

(1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Organ Transplantation, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: Objective To study the relationship between perioperative detection of forkhead box protein P3(Foxp3) mRNA level in peripheral blood mononuclear cell(PBMC) of patients with kidney transplantation and chronic allograft nephropathy(CAN). Methods 35 cases of renal allografts completed in this hospital defined clinically and confirmed histopathologically were observed as CAN group, simultaneously a retrospective case-control study was performed on 35 renal transplant recipients with normal graft function observed(control group). Foxp3 levels of PBMC in perioperative period were dynamically determined in two groups. Real time PCR was applied to detect the expression of Foxp3 mRNA. In order to find out other risk factors influencing chronic allograft nephropathy and eliminate disturbance. The related clinic factors were compared between the CAN group and the control group. Results The Foxp3 mRNA level was lower in the CAN group than the control group [$(24.1 \pm 16.2) \times 10^{-4}$ vs. $(52.3 \pm 27.4) \times 10^{-4}$, $P<0.01$]. Among risk factors influencing chronic allograft nephropathy, only acute rejection(AR) was probably different in two groups. In order to avoid disturbance, further classification was done according to AR. The statistical results show that the Foxp3 mRNA level in two groups was not be affected by AR. Conclusion The Foxp3 mRNA level in perioperative period is associated with CAN which maybe a risk factor for CAN. Foxp3 may be an index to predict the occurrence risk of chronic allograft nephropathy after kidney transplantation and guide individual treatment.

Key words: kidney transplantation; kidney failure, chronic; Foxp3

慢性移植肾肾病(chronic allograft nephropathy, CAN)是指肾移植术后 3 个月开始的移植肾功能逐渐减退的病理过程^[1-3]。CAN 病因复杂,包括免疫因素和非免疫因素两个方面。肾移植术后正确预估患者的免疫状态、选择合适的个体化免疫抑制治疗方案是有效延缓 CAN 的重要手段。调节性 T 细胞对免疫反应具有抑制效应,在免疫病理、移植耐受、阻止自身免疫反应和维持机体免疫平衡方面有着作用。其中调节性 T 细胞 Treg、CD4⁺、CD25⁺、叉头翼状螺旋转录因子(forkhead box protein P3, Foxp3⁺)亚群发挥着重要功能^[4-5]。Foxp3 基因调控此亚群细胞的发育及维持其功能, Foxp3 mRNA 的表达水平反映了该群细胞的功能状况,一定程度上代表了个体的免疫功能^[6]。本文旨在对肾移植患者围术期外周血

单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)表达水平与 CAN 的关系进行探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院经临床表现及依照 Banff'05 病理标准确诊为 CAN 的 35 例患者作为 CAN 组,同时相应选取 35 例肾移植术后移植肾功正常患者作为对照组。肾移植患者临床上表现为无其他原因解释的、与动脉舒张压增高和蛋白尿增加相关的血清肌酐水平的缓慢增高,提示慢性移植肾肾病的诊断。通过对切除的移植肾病理标本重新切片染色,请有经验的病理医师阅片,按照 Banff'05 移植肾病理诊断分类标准予以诊断。两组病例在年龄、性别、原发疾病方面差异均无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 外周血标本的采集 两组患者围术期外周抗凝静脉血标本(4 mL)分别在术前 1 d、术后 7、14、21 d 采集,然后使用淋巴细胞分离液分离 PBMC。

1.2.2 RNA 提取 按广州杰顺生物科技有限公司提供的细胞总 RNA 快速提取试剂盒的说明书进行操作。提取的总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳后,可见 28S、18S、5S 3 条清晰的 RNA 条带,其中 28S 条带的亮度约为 18S 条带的 2 倍,显示 RNA 完整性良好。通过紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。样本编号-80 ℃ 保存。

1.2.3 荧光定量 PCR 使用 Primer express 3.0 生物软件设计引物,Foxp3 正向引物 5'-CTG ACC AAG GCT TCA TCT GT-3',反向引物 5'-AAC TCT GGG AAT GTG CTG TT-3'; β -actin 作为内参,正向引物 5'-CAT CTC TTG CTC GAA CA-3',反向引物 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3'。RNA 逆转录合成 cDNA,逆转录反应条件:30 ℃ 10 min,50 ℃ 20 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5min,1 个循环。采用荧光染料法(SYBR Green)实时监测 PCR 产物量。通过构建标准品(已知拷贝数)标准曲线对样品进行定量检测。荧光定量 PCR 检测 Foxp3 mRNA 水平,预变性 95 ℃ 10 min;然后 95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,循环 40 次。以 Foxp3 / β -actin 比值作为相对定量。逆转录及定量 PCR 试剂盒购自 Takara 公司。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行数据统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料采用率表示,率间比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组患者围术期 Foxp3 mRNA 水平 CAN 组为 $(24.1 \pm 16.2) \times 10^{-4}$,对照组为 $(52.3 \pm 27.4) \times 10^{-4}$,两组相比差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 发生慢性移植肾肾病可能影响因素的比较 为在研究 Foxp3 mRNA 水平与慢性移植肾肾病的关系时剔除干扰因素。本研究对两组患者的人类白细胞抗原(human leukocyte antigen,HLA),移植肾功能延迟恢复,急性排斥反应(acute rejection,AR),免疫抑制方案,巨细胞病毒感染,高血压,高血脂等进行了比较,结果见表 1。仅有 AR 在两组间差异有统计学意义,CAN 组为 31.4%(11/35),对照组为 17.1%(6/35),见表 1。

表 1 发生慢性移植肾肾病可能影响因素的比较(n)

	CAN 组	对照组	P
HLA 相配位数(2/3/4/5)	7/18/6/4	5/20/7/3	>0.05
免疫诱导药物(有/无)	29/6	27/8	>0.05
移植肾功能延迟恢复(有/无)	3/32	4/31	>0.05
免疫抑制维持方案(环孢霉素 A/他克莫司)	10/25	6/29	>0.05
急性排斥(有/无)	11/24	6/29	<0.05
巨细胞病毒感染(有/无)	3/32	3/32	>0.05
高血压(有/无)	22/13	21/14	>0.05
高血脂症(有/无)	24/11	22/13	>0.05

2.3 依据有无急性排斥分类后两组 Foxp3 mRNA 水平 为了避免 AR 干扰 Foxp3 mRNA 水平对 CAN 发生影响的结果,依据有无 AR 再次分组,分析 CAN 组及对照组中 Foxp3 mRNA

水平。有 AR 时,CAN 组中 Foxp3 mRNA 水平为 $(22.2 \pm 14.1) \times 10^{-4}$,对照组为 $(46.4 \pm 26.4) \times 10^{-4}$;无 AR 时,CAN 组中 Foxp3 mRNA 水平为 $(26.3 \pm 17.3) \times 10^{-4}$,对照组为 $(57.8 \pm 28.7) \times 10^{-4}$ 。统计分析显示有无 AR 对围术期 CAN 组及对照组中 Foxp3 mRNA 水平无影响($P>0.05$)。CAN 组 Foxp3 mRNA 水平明显低于对照组。

3 讨 论

CAN 是移植肾功能减退,继而导致移植肾功能衰竭的主要原因,其起病隐匿,根据长期大批量计划活检标本结果统计,发现术后 6 个月时,临床移植肾功能正常的患者 CAN 发病率已达 25%^[7]。个体化的免疫治疗方案以最轻的药物毒副作用换取最有效的免疫抑制效果,可有效预防和治疗 CAN。评估患者的免疫反应状况是个体化治疗的基础。用于移植后免疫监测的方法较多,这些方法从不同的侧面检测受者体内的某一免疫指标,如:补体系统评估、体外淋巴细胞增殖、端粒酶、穿孔素等。这些检测有助于临床医师从目前的经验性调整免疫抑制药物治疗转向有理论依据的个体化治疗。

CD4⁺、CD25⁺、Foxp3⁺、Treg 是一群具有重要免疫抑制活性的细胞,对效应性 T 细胞的活化和增殖起负调控作用,同时在移植免疫耐受的诱导和维持中起着关键作用。Foxp3 是其分子标志。有研究显示 Foxp3 mRNA 有可能作为一种有效的生物学标记来早期诊断急性排斥^[8-9]。作者推理 Foxp3 mRNA 有可能和 CAN 具有一定的相关性。为了验证这一假设,本研究选取 35 例 CAN 患者作为 CAN 组,同时选取 35 例移植肾功能正常患者作为对照组。应用实时荧光定量 PCR 技术对患者围术期外周血 PBMC 中 Foxp3 mRNA 进行检测比较,为了在研究 Foxp3 表达水平对 CAN 的影响时剔除干扰因素,同时对 CAN 的相关临床影响因素进行了分析。统计结果显示,CAN 组 Foxp3 mRNA 水平明显低于对照组。围术期外周血 PBMC 中 Foxp3 mRNA 低表达水平是移植术后远期 CAN 发生的独立危险因素。Foxp3 可反映移植受者的免疫功能状态,预测受者对移植物的反应情况,从而更加合理地指导使用不同的免疫抑制剂方案。外周血 Foxp3 mRNA 表达水平高的患者,免疫系统反应性较低,可减少钙调神经蛋白抑制剂,降低药物毒性,延缓 CAN 的发展。

Foxp3 与慢性移植肾肾病的关系,有一些研究进行过探讨,主要集中于移植肾活检标本内 Foxp3 的转录表达^[10-11]。但肾活检技术的娴熟并未消除肾穿刺相关的并发症,需要经验丰富的病理医生和多个穿刺样本提高诊断的准确性,且这些实验取样的时间点单一。由于尿毒症疾病本身受肾移植手术、术后各种药物的影响,在肾移植围术期患者内环境发生了剧烈的变化,相应地免疫系统形成新的动态平衡,这个过程中调节性 T 细胞的构成和表达也是波动的^[12-13]。因此应用单一测量值来反映个体 CD4⁺、CD25⁺、Foxp3⁺、Treg 的功能具有一定局限性,本实验采用围术期术前、术后多个时间点的 Foxp3 mRNA 的测定取平均值,其反映了机体在移植等应激时的免疫调节能力,具有更好的代表性,能更准确反映机体的基础免疫状态。这使得,肾移植患者围术期外周血 PBMC 中 Foxp3 mRNA 水平与远期慢性移植肾肾病具有相关性这一结论更可靠。实时荧光定量 PCR 检测无创、简便省时,灵敏度和特异性高,可作为常规检测项目^[14]。

本研究探讨围术期外周血 PBMC 中 Foxp3 mRNA 水平对慢性移植肾肾病的影响,为临床采用 Foxp3(下转第 4259 页)

- state of minimally invasive spine surgery[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2011, 93(6):582-596.
- [3] 张恭逊, 邓勇, 费勤勇, 等. MED 椎间盘镜治疗腰椎间盘突出症远期随访报告[J]. *中国矫形外科杂志*, 2010, 18(22):1933.
 - [4] Lawton CD, Smith ZA, Barnawi A, et al. The surgical technique of minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion[J]. *J Neurosurg Sci*, 2011, 55(3):259-264.
 - [5] Lee CK, Park JY, Zhang HY. Minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion using a single interbody cage and a tubular retraction system: technical tips, and perioperative, radiologic and clinical outcomes[J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2010, 48(3):219-224.
 - [6] 张功林, 葛宝丰. 腰椎管狭窄症中手术治疗中应注意的几个问题[J]. *中国骨伤*, 2009, 22(10):725-726.
 - [7] 郭强. 全椎板切除脊柱内固定治疗老年退行性腰椎管狭窄症的疗效[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(21):4792-4793.
 - [8] Karikari IO, Isaacs RE. Minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion: a review of techniques and outcomes[J]. *Spine*, 2010, 35(26 Suppl):294-301.
 - [9] Adogwa O, Parker SL, Bydon A, et al. Comparative effectiveness of minimally invasive versus open transforaminal lumbar interbody fusion: 2-year assessment of narcotic use, return to work, disability, and quality of life[J]. *J Spinal Disord Tech*, 2011, 24(8):479-484.
 - [10] 黎庆初, 谭斌, 刘雄文, 等. 显微内窥镜下应用改良器械减压治疗腰椎管狭窄症[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2008, 18(5):341-344.
 - [11] 祁全, 毕郑钢, 赵承斌, 等. 显微腰间盘切除术与椎间盘镜治疗单节段腰椎间盘突出症对比体会[J]. *中国矫形外科杂志*, 2006, 14(5):328-330.
 - [12] Anjarwalla NK, Brown LC, McGregor AH. The outcome of spinal decompression surgery 5 years on[J]. *Eur Spine J*, 2007, 16(11):1842.
 - [13] 胡小晓, 徐志文, 沈晓震. 后路椎间盘镜手术治疗退变性腰椎管狭窄症[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2011, 26(1):50-51.
 - [14] Parker SL, Adogwa O, Witham TF, et al. Post-operative infection after minimally invasive versus open transforaminal lumbar interbody fusion(TLIF): literature review and cost analysis[J]. *Minim Invasive Neurosurg*, 2011, 54(1):33-37.
 - [15] 马超, 吴继彬, 赵猛, 等. 不同手术方法治疗老年退变性腰椎滑脱合并腰椎管狭窄症疗效的比较[J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(9):620-623.

(收稿日期:2013-07-13 修回日期:2013-08-20)

(上接第 4256 页)

mRNA 来评估移植受体免疫功能状态提供了实验依据。但由于 CAN 免疫学和非免疫学因素的发病机制复杂性, Foxp3 mRNA 来指导临床实践的具体数值需要进行多移植中心联合统一地深入研究。

参考文献:

- [1] Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, et al. The natural history of chronic allograft nephropathy[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(24):2326-2333.
- [2] Manfro RC. Management of chronic allograft nephropathy[J]. *J Bras Nefrol*, 2011, 33(4):485-492.
- [3] Grinyo JM, Saval N, Campistol JM, et al. Clinical assessment and determinants of chronic allograft nephropathy in maintenance renal transplant patients[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(11):3750-3755.
- [4] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, et al. CD4⁺ CD25⁺ high regulatory cells in human peripheral blood[J]. *J Immunol*, 2001, 167(3):1245-1253.
- [5] Arandi N, Mirshafiey A, Jeddi-Tehrani M, et al. Evaluation of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells function in patients with common variable immunodeficiency[J]. *Cell Immunol*, 2013, 281(2):129-133.
- [6] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. *Science*, 2003, 299(5609):1057-1061.
- [7] Serón D, Arns W, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy-clinical guidance for early detection and early intervention strategies[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(8):2467-2473.
- [8] Muthukumar T, Dadhania D, Dinq R, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(22):2342-2351.
- [9] Sakamoto R, Asonuma K, Zeledon Ramirez ME, et al. Inomata Y. Forkhead box P3(FOXP3) mRNA expression immediately after living-donor liver transplant[J]. *Exp Clin Transplant*, 2009, 7(1):8-12.
- [10] Kollins D, Stoelcker B, Hoffmann U, et al. FOXP3⁺ regulatory T-cells in renal allografts: correlation with long-term graft function and acute rejection[J]. *Clin Nephrol*, 2011, 75(2):91-100.
- [11] Yapici U, Bemelman FJ, Scheepstra CG, et al. Intragraft FOXP3 protein or mRNA during acute renal allograft rejection correlates with inflammation, fibrosis, and poor renal outcome[J]. *Transplantation*, 2009, 87(9):1377-1380.
- [12] Rao DA, Pober JS. Endothelial injury, alarmins, and allograft rejection[J]. *Crit Rev Immunol*, 2008, 28(3):229-248.
- [13] Karczewski M, Karczewski J, Kostrzewa A, et al. The role of Foxp3⁺ regulatory T cells in kidney transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(5):1527-1529.
- [14] 张轶庠, 张朝霞, 杨江根, 等. 实时荧光定量 PCR 检测 CD258 在前列腺癌组织中的表达[J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20(2):188-191.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-10-22)