

导致肾间质纤维化和肾小球硬化^[2,5]。而 FK506 对 TGF- β 的影响偶见报道。Rao 用 FK506 处理肝细胞 3~6 d 后,可诱导 TGF- β 的基因表达^[6]。我们在以往的动物实验中也证实 FK506 促进肾组织 TGF- β 基因表达。

本研究表明了 FK506 以浓度依赖方式抑制肾小管细胞的增殖,细胞生长率在 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 时为对照组的 95%,而在 10 $\mu\text{mol/L}$ 时仅为 20%。Blaehr 等^[7]曾报道 FK506 为 1 mg/L (1.2 $\mu\text{mol/L}$) 时肾小管细胞生长受抑制 50%,但 FK506 并不直接杀死细胞。McCauley 等^[8]也有类似发现。这说明 FK506 所致的急慢性肾功能不全可能与肾小管细胞增殖受抑制有关。

本研究还发现 FK506 能明显促进肾小管细胞 TGF- β 的产生。在 FK506 处理组,肾小管细胞的 TGF- β 产生量明显高于对照组,但在 1 $\mu\text{mol/L}$ 及 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组间差异不显著。这可能是因为在 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时肾小管细胞生长被抑制更明显,以致 TGF- β 的产生减少所致。此外,在实验中加入外源性 TGF- β 能抑制肾小管细胞的生长,在 5 $\mu\text{g/L}$ 浓度时,细胞生长降至对照组的 32%,达到最大抑制。其最大抑制强度要比 FK506 弱。这些结果提示了 FK506 抑制细胞生长除直接作用外尚可能部分受 TGF- β 的调节。

TGF- β 抑制多种细胞的增殖,如肝细胞、胸腺细胞、T/B 淋巴细胞、造血干细胞和 LAK 细胞等,提示 TGF- β 可以用作免疫抑制剂。实际上,TGF- β 对 T 淋巴细胞的抑制作用较 Cs A 强 10 万倍^[9]。FK506 能促进 TGF- β 的产生,有利的是可产生免疫抑制,不利的是通过增加胞外基质的积聚、抑制近曲小管细胞的生长、增加内皮素的合成引起高血压^[10]等而造成肾毒性,因此 FK506 应用的利与弊是密切

相关的。

本研究表明 FK506 促进肾小管细胞产生 TGF- β ,抑制肾小管细胞增殖,可能是其肾毒性机制之一。

参考文献:

[1] Kumano K, He N, Ma P, et al. Role of the transforming growth factor and monocyte chemoattractant protein in FK506-induced nephropathy in the rat[J]. Transplant Proc, 1997, 29(3): 1250-1252.

[2] Shehata M, Cope GH, Johnson TS, et al. Cyclosporine enhances the expression of TGF in the juxtaglomerular cells of the rat kidney[J]. Kidney Int, 1995, 49(3): 1487-1489.

[3] Wolf G, Thaiss F, Stahl RAK. Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor- β in renal cells[J]. Transplantation, 1995, 60(3): 237-240.

[4] Prashar Y, Khanna A, Sehajpal P, et al. Stimulation of transforming growth factor- β transcription by cyclosporine[J]. FEBS Letters, 1995, 358(1): 109-113.

[5] Shamma VK, Bologa RM, Xu GP, et al. Intra-graft TGF- β mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy[J]. Kidney Int, 1996, 4(3): 1297-1300.

[6] Rao P, Sun H, Snyder J, et al. Effect of FK506 on FK-binding protein and transforming factor beta gene expression[J]. Transplant Proc, 1991, 23(6): 2873-2874.

[7] Blaehr H, Andersen CB, Ladefoged J. Acute effects of FK506 and cyclosporine A on cultured human proximal tubular cells[J]. Eur J Pharmacol, 1993, 228(2): 283-288.

[8] McCauley J, Farkas Z, Prasad SJ, et al. Cyclosporine and FK506 induced inhibition of renal epithelial cell proliferation[J]. Transplant Proc, 1991, 23(6): 2829-2830.

[9] Kumar S, Ziyadeh FN. The transforming growth factor- β system and the kidney[J]. Semin Nephrol, 1993, 13(1): 116-128.

[10] Moutabarrik A, Ishibashi M, Fukunaga M, et al. FK506 mechanism of nephrotoxicity: stimulatory effect on endothelin secretion by cultured kidney cells and tubular cell toxicity in vitro[J]. Transplant Proc, 1991, 23(6): 3133-3136.

收稿日期: 2000-06-23 修回日期: 2000-12-27

本文编辑: 程春开

鼠抗人 CD3 单克隆抗体免疫抑制机制探讨*

郑骏年, 谢叔良, 孙晓青, 陈家存

(徐州医学院附属医院泌尿外科, 江苏 徐州 221002)

摘要: 目的 探讨鼠抗人 CD3 单克隆抗体(OKT3)抗排斥作用机制。方法 使用 OKT3 诱导人外周血淋巴细胞凋亡。使用电镜、DNA 电泳及原位切口末端标记技术(TUNEL)检测凋亡,同时检测 CD95 的表达。结果 电镜及 DNA 电泳发现 OKT3 处理组外周血淋巴细胞(PBL)发生凋亡。TUNEL 检测发现处理组凋亡发生率 39.8%,显著

* 作者简介: 郑骏年(1966-),男,江苏徐州人,主治医师,硕士。
(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

高于对照组 10.2% ($P < 0.01$)。处理组 PBL CD95 表达率 48.7%, 显著高于对照组 34.9% ($P < 0.05$)。结论上调 PBL 表面 CD95 表达, 诱导其凋亡是 OKT3 抗排斥作用的机制。

关键词: OKT3; 淋巴细胞; 凋亡; CD95

中图分类号: R392.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2001)01-0026-04

Study on the immunosuppressive mechanism of OKT3

ZHENG Jun-nian, XIE Shu-liang, SUN Xiao-qing, et al

(Department of Urology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To investigate the immunosuppressive mechanism of OKT3. **Methods** Apoptosis was induced in human peripheral blood lymphocytes (PBL). Electron microscopy and DNA electrophoresis were used to examine apoptosis. Flow cytometry (FCM) with TUNEL assay was used to determine apoptotic percentage and CD95 expression. **Results** Electron microscopy and DNA electrophoresis showed characteristic features of apoptosis in OKT3-treated cells. FCM with TUNEL assay showed the apoptotic percentage of OKT3-treated group (39.8%) was significantly higher than that of control group (10.2%). The positive rate of CD95 expression in OKT3-treated PBL was 48.7%, significantly higher than that in control group (34.9%). **Conclusion** The induction of apoptosis via up-regulating the CD95 expression of PBL is one of the immunosuppressive mechanisms of OKT3.

Key words: OKT3; lymphocyte; apoptosis; CD95

鼠抗人 CD3 单克隆抗体 (OKT3) 是治疗移植器官急性排斥反应的有效药物。目前认为其抗排斥机制主要与淋巴细胞清除有关, 但淋巴细胞是如何被清除的则莫衷一是。近年来免疫学研究表明, 淋巴细胞凋亡有抑制免疫应答作用^[1]。OKT3 是否通过直接诱导人成熟淋巴细胞凋亡从而清除淋巴细胞, 国内尚未见报道。我们对人外周血淋巴细胞 (PBL) 使用 OKT3 诱导凋亡, 并研究 CD95 表达在凋亡诱导中的作用。报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 OKT3: 北京邦定生物医学公司。RPMI 1640 培养基: GIBCO。异硫氰酸荧光素标记的鼠抗人 CD95 单抗 (FITC-CD95): 美国 B·D 公司。TUNEL 凋亡检测试剂盒: 德国 Boehringer Mannheim 公司。仪器为日本 H600 透射电子显微镜和美国 B·D 公司 FACS Calibur 型流式细胞分析仪。

1.2 方法

1.2.1 PBL 制备与培养 淋巴细胞分离液密度梯度离心, 分离健康成人 PBL, 用 RPMI 1640 完全培养液 (RPMI 1640, 10% NBS, 20 mmol/L, Hepes, 10^5 U/L 青、链霉素, 20 mmol/L 谷氨酰胺) 调成 3×10^6 /L 细胞悬液。锥虫蓝鉴定细胞成活率大于 95%。取 1 ml 细胞悬液加入 24 孔培养板, 每孔加入 OKT3, 终体积 1.5 ml, 终浓度 5 mg/L。将培养板置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。20 h 收取细胞检测凋亡, 24 h 检测 CD95。

1.2.2 透射电镜细胞形态学观察 10^7 个细胞以

3% 的戊二醛于 40 °C 固定 4 h, 磷酸盐缓冲液清洗, 1% 锇酸后固定 1 h, 树脂包埋, 超薄切片, 醋酸铀、枸橼酸铅染色。观察、照相。

1.2.3 DNA 提取和电泳 采用 Wesselborg 法^[1]。

1.2.4 流式细胞仪凋亡定量检测 用 TdT 介导的原位切口末端标记技术 (TUNEL) 测定^[2]。

1.2.5 流式细胞仪 CD95 检测 2×10^6 个细胞 PBS 洗 2 遍后分成 2 管, 其中 1 管加 20 μ l FITC-CD95 单抗, 另一管加入 20 μ l 羊抗鼠 FITC-IgG1 作为阴性对照。室温避光放置 20 min, 2 000 r/min 离心 5 min, 去上清, PBS 液洗 2 遍, 每管加入 PBS 0.5 ml 待测。

1.2.6 流式细胞仪检测 光源为 488 nm 氩离子激光器, FITC 激光后发绿色荧光。上机后收集 10^5 个细胞, 以 FSC/SSC 二维散色光图确定淋巴细胞群体, 统一进行标准化设门, 荧光强度以对数放大, 光散射数据存盘。测试完后以 Cell Quest Plot 软件分析数据。

1.3 统计学处理 采用配对 t 检验。每组例数 $n = 4$ 。

2 结果

电镜显示 OKT3 可诱导淋巴细胞凋亡。凋亡细胞出现细胞变小, 胞质浓缩, 染色质固缩、裂解后被胞膜包裹形成“凋亡小体”, 胞质内可见小泡 (图 1A)。对照组未见类似改变 (图 1B)。

使用流式细胞仪用 TUNEL 法行凋亡定量检测, 根据 FITC-dUTP 掺入 DNA 裂点的多少计算凋亡百

分比, OKT3 检测图示明显荧光标记高峰(图 2)。OKT3 处理组凋亡发生率($39.8\% \pm 3.2\%$)显著高于对照组($10.2\% \pm 2.2\%$), $P < 0.01$ 。

DNA 电泳可见 OKT3 处理细胞出现典型的凋亡“阶梯状”条带,与标准相对分子质量 DNA 参照物比较,为多倍的 180~200 bp DNA 片段(图 3)。

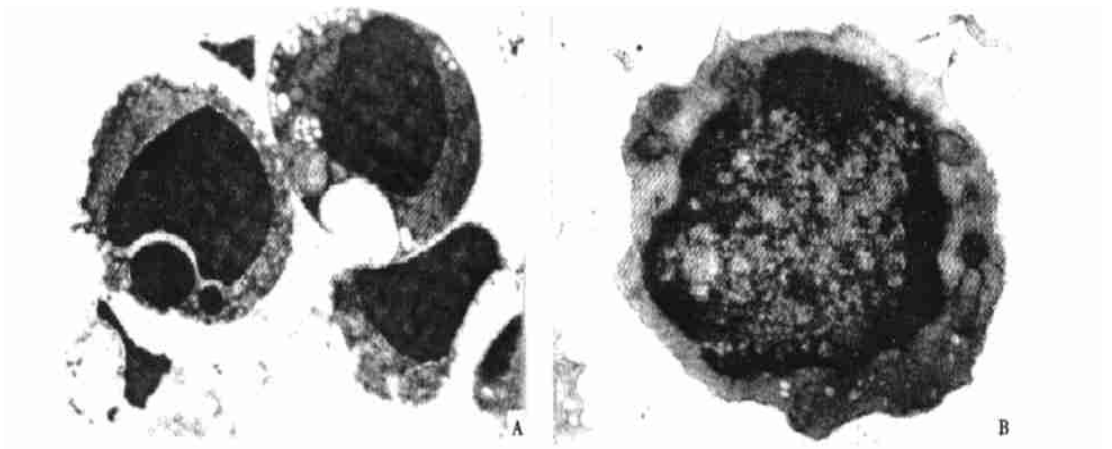


图 1 对照组及 OKT3 处理组 PBL 电镜照片

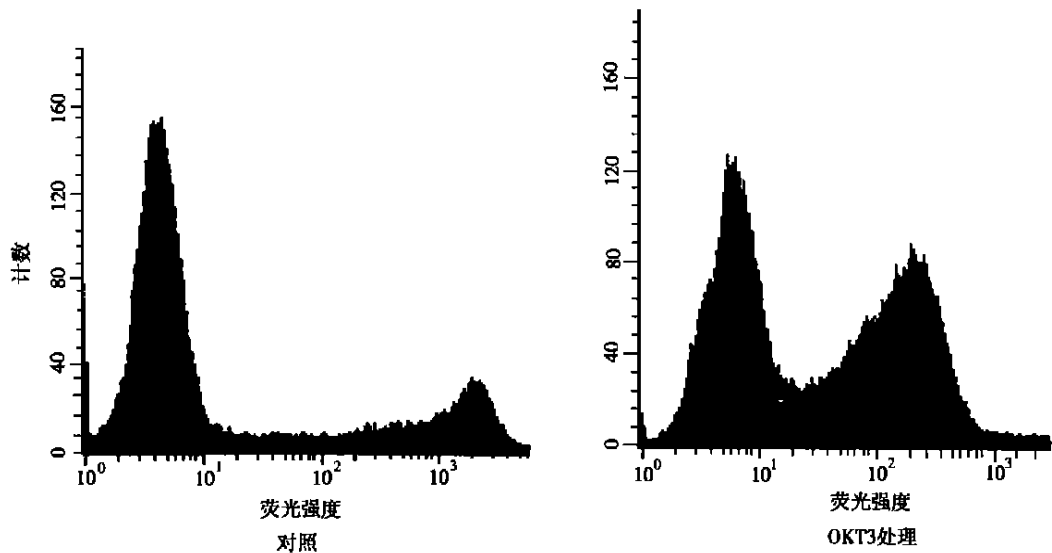


图 2 对照组及 OKT3 处理组 PBL 的流式细胞 TUNEL 凋亡检测图



图 3 对照组及 OKT3 处理组 PBL DNA 电泳照片
OKT3 处理组 CD95 表达阳性率($48.7\% \pm 3.2\%$)显著高于对照组($34.9\% \pm 2.3\%$), $P < 0.05$ 。

3 讨论

OKT3 是治疗肾移植急性排斥反应的有效药物,其对移植肾难治性排斥反应逆转率超过 90%^[3]。而其作用机制尚不完全清楚。目前认为 OKT3 通过抗原调变和淋巴细胞清除发挥作用,但以淋巴细胞清除作用为主,而淋巴细胞是如何被清除的尚不清楚^[4]。现已肯定抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)及补体依赖性细胞毒作用(CDC)均非其主要作用机制^[3]。而淋巴细胞被 OKT3 免疫调理后被肝脏网状内皮系统清除这一机制也不大可能是其主要机制,因为肝脏衰竭的肝移植患者移植前使用 OKT3,仍能

够达到免疫抑制作用^[5]。近年来免疫学研究发现,外周成熟淋巴细胞凋亡有抑制淋巴细胞增殖、控制过强免疫反应的作用^[1]。OKT3 是否通过诱导淋巴细胞凋亡达到清除淋巴细胞作用已引起国外学者的注意。Tucek—Szabo 等^[6]报道小鼠体内注射 OKT3 可诱导淋巴细胞凋亡。Wesselborg^[1]报道 OKT3 可诱导体外培养 3 周的人外周血 T 细胞凋亡,但对新鲜分离的 T 细胞未诱导出凋亡。

细胞死亡分为坏死(necrosis)和凋亡(apoptosis)二种形式。二者在形态学及生化改变上截然不同。凋亡细胞形态学表现为胞质浓缩,核染色质固缩、断裂,胞质膜包裹核碎片形成“凋亡小体”^[7];而坏死细胞表现为细胞肿胀、胞膜破裂、细胞崩解。凋亡细胞的生化改变为核酸内切酶被激活,核染色质从核小体之间裂解成规则的 180~200 bp 的 DNA 片段,因此凋亡细胞 DNA 电泳,出现特征性“阶梯状”条带^[8]。由于大量 DNA 断点的形成,在 TdT 酶作用下可将荧光素标记的 dUTP 掺入裂点之中,流式细胞仪 TUNEL 检查通过测定荧光值的高低来计算细胞凋亡发生的百分率。本研究用 OKT3 处理新鲜分离的人 PBL, 20 h 采用经典的电泳及 DNA 电泳检查证实发生了凋亡。采用先进的 TUNEL 技术检测发现 OKT3 处理细胞凋亡发生率(39.8%)显著高于对照组(10.2%)。证实 OKT3 可通过诱导淋巴细胞凋亡从而清除淋巴细胞。

凋亡亦称“程序性细胞死亡”,是由特异信号有序激活细胞本身固有死亡机制所诱发的细胞主动死亡,可被特定基因调控。研究表明,OKT3 诱导的凋亡与淋巴细胞表面 CD95 分子有关。CD95 分子又称 Fas 分子,属于肿瘤坏死因子/神经生长因子受体(TNFR/NGFR)超家族^[9]。Brunner 等^[10]用 OKT3 诱导 T 细胞杂交瘤凋亡,2 h 后检测到 Fas mRNA 转录,4 h 后 Fas 分子出现在细胞表面,用抗 Fas—Fc 嵌合抗体可阻止凋亡发生。本研究发现 OKT3 可增加淋巴细胞表面 CD95 的表达。文献报道 OKT3 在上调 CD95 表达的同时,还可诱导淋巴细胞表达 Fas 的配

体。配体与 Fas 结合并激活 Fas,进而导致细胞内一系列蛋白酶被激活,从而实现细胞凋亡^[11]。

本研究表明,OKT3 通过与淋巴细胞表面 CD3 受体结合,上调淋巴细胞表面 CD95 的表达,进而诱导淋巴细胞凋亡。诱导淋巴细胞凋亡是 OKT3 清除淋巴细胞、发挥抗排斥作用的又一机制。

参考文献:

- [1] Wesselborg S, Janssen O, Kabelitz D. Induction of activation—driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cell [J]. *J Immunol*, 1993, 150(10): 4338—4345.
- [2] Gorczyca, Gong J, Darzynkiewicz Z, et al. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick transferase and nick translation assay [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(8): 1945—1951.
- [3] 杨俊伟. 激活诱导的细胞死亡: 对单克隆抗体 OKT3 免疫抑制作用的再认识[J]. *肾脏病与透析移植杂志*, 1997, 6(5): 481—486.
- [4] Janssen O, Wesselborg S, Kabelitz D. Immunosuppression by OKT3—induction of programmed cell death (apoptosis) as a possible mechanism of action [J]. *Transplantation*, 1992, 53(1): 233—234.
- [5] Millis JM, McDiarmid SV, Hiatt JR, et al. Randomized prospective trial of OKT3 for early prophylaxis of rejection after liver transplantation [J]. *Transplantation*, 1989, 47(1): 82—88.
- [6] Tucek—Szabo CL, Jelic S, Lacy E, et al. Surface T cell Fas receptor/CD95 regulation, in vivo activation, and apoptosis activation—induced death can occur without Fas receptor [J]. *J Immunol*, 1996, 156(1): 192—200.
- [7] Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, et al. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis [J]. *J Pathol*, 1984, 142(1): 67—77.
- [8] Wyllie AH. Glucocorticoid—induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation [J]. *Nature*, 1980, 284(5756): 555—556.
- [9] 陈俊, 郭坤元. APO—1/Fas (CD95) 分子研究进展 [J]. *国外医学·免疫学分册*, 1996, 19(2): 61—65.
- [10] Brunner T, Mogil RJ, Ware CF, et al. Cell—autonomous Fas (CD95)/Fas—ligand interaction mediates activation—induced apoptosis in T—cell hybridomas [J]. *Nature*, 1995, 373(6513): 441—441.
- [11] Vignaux F, Vivier E, Malissen B, et al. TCR/cd3 coupling to Fas—based cytotoxicity [J]. *J Exp Med*, 1995, 181(2): 781—786.

收稿日期: 2000—06—22 修回日期: 2000—12—18

本文编辑: 孙立杰

标引关键词须知

标引关键词应针对文章的重点内容, 请尽量使用最新版美国国立医学图书馆编辑的《Index Medicus》中的医学主题词表(MeSH)内所列的词。如果最新的 MeSH 中尚无相应的词, 处理办法有: ①可选用直接相关的几个关键词组配。②如果无法组配, 可选用最直接的上位关键词。关键词中的缩写词应按 MeSH 还原为全称, 如“HBsAg”应标引为乙型肝炎表面抗原。