

抗体介导的慢性排斥反应中内皮细胞基因的变化及分子机制

李 珅¹ 董 杰² 伍会健^{1*}

(¹大连理工大学生命科学与技术学院, 大连 116024; ²东北财经大学职业技术学院, 大连 116021)

摘要 目前, 抗体介导的慢性肾移植排斥反应难以预测, 尚无有效的治疗方法。研究表明, 通过对内皮细胞相关基因的分析, 可以提高抗体介导的慢性肾移植排斥反应术前及术后的诊断特异性。该病的发病机制主要包括四个方面: (1)血小板在内皮细胞附近聚集凝固能力增强; (2)内皮细胞趋化炎性细胞作用增强; (3)干扰素- γ (IFN- γ)杀伤作用增强; (4)内皮修复再生能力降低。基因分析结合抗体分析有助于深理解抗体介导的肾移植排斥反应的发病机理、提高诊疗效果、为新药开发提供新靶点, 使肾移植成功率大幅提高成为可能。该篇综述将就上述内容作一介绍。

关键词 抗体介导的排斥反应; 内皮细胞; 基因聚类分析

Endothelial Gene Expression and Molecule Mechanism in Chronic Antibody-Mediated Rejection of Renal Allograft

Li Shen¹, Dong Jie², Wu Huijian^{1*}

(¹School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China; ²Vocational Technology College Dongbei University of Finance and Economics, Dalian 116021, China)

Abstract Currently, antibody-mediated rejection of renal allograft is highly unpredictable and lack of effective treatments. A number of studies show that the preoperative and postoperative diagnoses of renal allograft are improved by the analysis of endothelial cell associated genes. The pathogenesis of this disease mainly includes four aspects: (1) The aggregation and coagulation ability of platelet increases near in endothelial cells; (2) The chemotaxis of inflammatory cells by endothelial cells increases; (3) The effects of IFN- γ increase; (4) The ability of endothelial regeneration decreases. Gene analysis and antibody analysis contribute to deeply understanding of pathogenesis of renal allograft, provide new targets for drug development, and highly increase the successful rate of renal allograft. This paper will give a review about these contents mentioned above.

Key words antibody-mediated rejection; endothelial cell; gene cluster analysis

抗体介导的排斥反应(antibody-mediated rejection, ABMR)是现阶段移植失败的主要原因之一, 尚无有效的治疗方法^[1]。移植前, 通过交叉匹配测试和

血型匹配测试可以有效避免超急性ABMR, 但无法避免术后慢性ABMR。从蛋白层面研究慢性ABMR的发生率和发病机制已进入瓶颈阶段, 慢性ABMR

收稿日期: 2013-09-06 接受日期: 2013-10-08

国家自然科学基金(批准号: 31271500)和国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2011CB504201)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0411-84706105, E-mail: wuhj@dlut.edu.cn

Received: September 6, 2013 Accepted: October 8, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31271500) and the 973 Program of the Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2011CB504201)

*Corresponding author. Tel: +86-411-84706105, E-mail: wuhj@dlut.edu.cn

网络出版时间: 2013-12-11 15:36 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131211.1536.008.html>

预测的特异性低、发病机制不清楚^[2]。随着基因检测和分析方法的发展,基因层面的研究为解决ABMR的诊疗问题提供了新的方向^[3],本文将对近期ABMR相关基因的研究进行综述。

1 抗体介导的慢性排斥反应

导致移植失败的排斥反应分为细胞排斥和体液排斥,体液排斥反应又称ABMR。上世纪60年代初,Kissmeyer等^[4]和Jeannot等^[5]就发现了抗体介导的排斥反应,在血清中检测出供体特异性抗体(donor specific antibody, DSA),但在接下来的30年里,抗体介导的排斥反应一直未受到重视。直到90年代初,有学者将同种肾移植过程中发生的由抗人源白细胞抗原(anti-human leukocyte antigen, Anti-HLA)介导的急性排斥反应定义为新病理类型ABMR^[6-9],人们才认识到ABMR在器官移植中的重要作用。研究表明,ABMR比T细胞介导的移植排斥反应更为严重,其病理表现为微小血管炎、炎性细胞浸润和内皮细胞损伤,并且传统的抗排斥治疗对其无效。十年之后,Feucht等^[8,10]在同种移植供体的组织中发现补体C4的裂解产物C4d能够激活抗体介导的移植损伤,于是将C4d作为ABMR诊断的标志物。

最初认为,超急性和急性ABMR是主要的ABMR,但在显著降低T细胞介导的抗T细胞抑制剂问世后,ABMR的发生率仍未得到有效控制,因此认为抗体介导的慢性ABMR才是晚期肾移植失败的主要原因^[1,3,11-12]。为了降低移植后发生ABMR的风险,可以通过检测受体标志物预测慢性ABMR的发生概率,但目前慢性ABMR术前预测及术后检测的特异性较差。Terasaki等^[2]研究证明,在4 763人的肾移植失败案例中,仅有20.9%患者的移植受体病理组织Anti-HLA抗体呈阳性,其余79.1%的患者在慢性ABMR发生前都未得到有效的预测和控制;另外,Sis等^[13]在一项患者的回顾性研究中发现HLA阳性患者的肾小球病理检测中仍有48%为C4d阴性,这说明C4d对慢性ABMR的预测也不够敏感。预测结果不理想的主要原因是ABMR病理机制非常复杂,细胞、因子和抗体在排斥过程中相互作用、协同对排斥物进行微血管损伤。因此,单独从抗原角度预测ABMR的发生率特异性低,这也意味着单从蛋白层面研究ABMR引起移植损伤、功能障碍和移植失败的具体机制很难得到全面客

观的结果。

表观遗传学、基因芯片、基因功能相关聚类分析等方法为研究细胞、因子和抗原之间的相互联系提供了有效的工具,结合蛋白数据对ABMR进行全面分析,将大幅提高ABMR诊断的特异性、更全面清晰地揭示ABMR的发生机制。

2 内皮细胞相关基因与慢性ABMR

目前,筛选ABMR相关基因的主要方法是首先使用基因芯片技术发现目的基因,在通过基因文库比对筛选基因,最后使用聚类分析等相关软件分析目的基因。Mannam等^[14]将ABMR病理组织内皮细胞同脐带血内皮细胞和正常人肾小球内皮细胞进行比对,发现ABMR的病理标本中存在七类内皮细胞相关产物(*ENDAT*)基因,包括血管收缩基因、血栓调节蛋白基因、趋化因子基因、细胞因子激活基因、黏附基因、抗细胞凋亡基因和细胞周期基因等。ABMR的发病机制是抗体直接或间接激活内皮细胞,被激活的内皮细胞表达一系列因子,这些因子再通过直接和/或间接的方式反过来损伤内皮细胞自身,进而导致移植失败,所以研究*ENDAT*基因可能为解决慢性ABMR带来新的突破。

ABMR发生过程中*ENDAT*基因的表达量可用来辅助判断慢性ABMR发生的概率。在肾移植标本中,高表达*ENDAT*基因和HLA抗体的标本与单纯表达HLA抗体的标本相比,前者表现出更严重的ABMR损伤,移植失败的概率也更高。Sis等^[15]证明*ENDAT*的表达量与ABMR高度相关,而与T细胞介导的排斥反应无关;另一研究发现在DSA阳性病例中,DSA阳性伴随*ENDAT*表达上调的患者与单纯DSA阳性的患者慢性ABMR的发生率分别为97%和79%。在C4d抗体阳性的病例中,C4d阳性伴随*ENDAT*表达上调的患者与单纯C4d阳性的患者慢性ABMR的发生率分别为77%和31%^[16]。因此,根据*ENDAT*的表达和抗体的表达情况共同诊断移植过程中ABMR的发生概率会更加准确。但应该注意,单纯的*ENDAT*高表达对预后没有指示作用,在DSA阴性病例中*ENDAT*的高表达也不增加ABMR的发生概率。

抗体产生并伴随*ENDAT*表达上调大幅提高移植失败的发生率,这为ABMR的发生概率预测提供了一个新方向。同时,利用基因芯片、基因文库和

基因分析软件提供的信息加速了ABMR发病机制的研究,越来越多的*ENDAT*被发现并量化,未来有望在基因表达水平上对ABMR进行实时治疗。

3 相关基因损伤移植物的分子机制

从基因角度研究ABMR的发病机制具有高通量、速度快和信息量完整等优点。ABMR是细胞与细胞因子之间相互关联,最终损伤内皮细胞自身的过程,该病的发病机制主要包括四个方面:(1)血小板在内皮细胞附近聚集凝固能力增强;(2)内皮细胞趋化炎性细胞作用增强;(3)IFN- γ 杀伤作用增强;(4)内皮修复再生能力降低。各病理机制之间既协同作用又相互制约。

3.1 血小板在内皮细胞附近聚集凝固能力增强

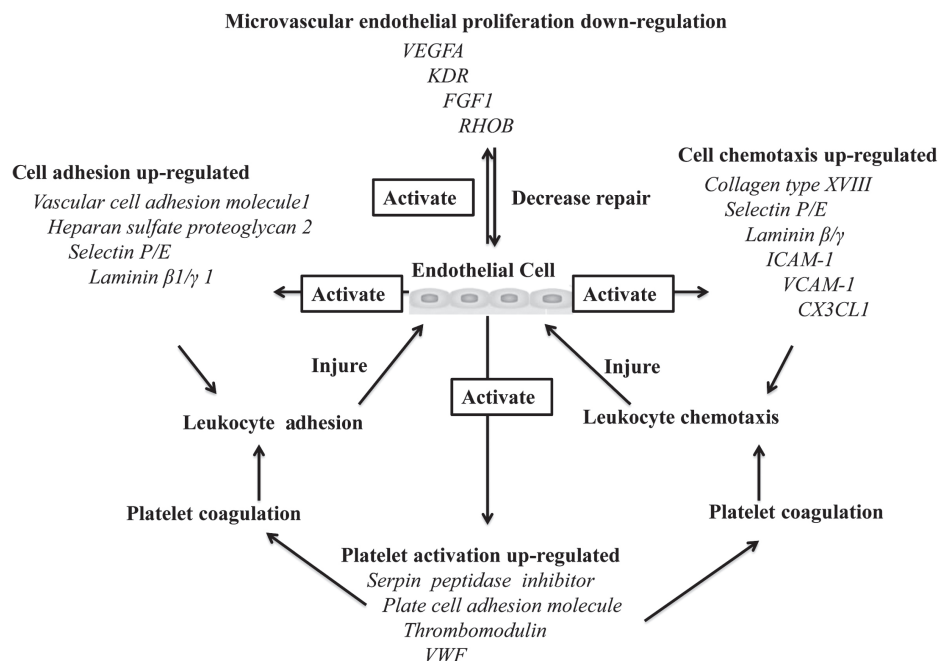
通过对ABMR病理组织中上调的*ENDAT*基因进行注释聚类分析^[3],筛选出一组与血小板聚集和凝固相关的基因(图1),主要包括血管性血友病因子基因(*VWF*)、血栓调节蛋白基因(*thrombomodulin*)、

丝氨酸蛋白酶抑制基因(*serpin peptidase inhibitor; clade E*)和血小板细胞黏附基因(*plate cell adhesion*),这一系列基因中*VWF*基因上调幅度最大。

*VWF*在止血过程中发挥重要作用,它通过携带凝血因子VIII激活血小板,使血小板黏附在发生炎症的血管内皮细胞附近。*VWF*前体蛋白与选择素P形成的聚合物储存在内皮细胞胞质的Weibel-Palade小体中^[17-19]。内皮细胞激活后,*VWF*前体蛋白-选择素P聚合物分泌到内皮细胞表面,与血小板糖蛋白Ib结合,引起血小板激活和聚集^[20-21],进一步激活炎性细胞,最终引起内皮细胞损伤^[22]。*VEF*促进内皮细胞与血小板的相互作用,并通过同种抗体-血小板-内皮细胞相互作用引起血管炎症、血栓和C4d在血管内皮沉积。

3.2 内皮细胞趋化炎性细胞作用增强

在ABMR病理组织中存在另一组上调的具有炎性细胞趋化作用的*ENDAT*基因(图1),主要负责调节细胞的迁移,促进白细胞聚集、黏附和游动。这



抗体激活的内皮细胞内,促凝基因、黏附基因和趋化基因表达上调,促血管生成基因表达下调。趋化基因促进炎性细胞向血管内皮运动;黏附基因促使炎性细胞与内皮细胞基底膜相连,破坏血管内皮细胞;促凝基因激活血小板使其在血管壁附近聚集,同时增加炎性细胞的趋化和黏附;促血管生成基因表达量降低,使内皮修复作用减弱。以上四类基因共同作用,导致内皮细胞损伤、移植物失效。

Chemotaxis genes, adhesion genes and platelet activation genes were up-regulated while microvascular endothelial proliferation genes down-regulated in antibody-activated endothelial cells. Cell chemotaxis genes facilitated leukocyte trafficking to endothelial cells; Cell adhesion genes enhanced leukocyte attachment with the basement membrane of endothelial cells and damaged the endothelial cells of blood vessel; Platelet activation genes facilitated platelet activation and aggregation near in vascular wall, meanwhile enhanced the chemotaxis and adhesion of leukocyte; Microvascular endothelial proliferation genes were down-regulated in the endothelial cells and they decreased endothelial repair responses. The interaction of the above four kinds of genes led to the further injury of endothelial cells tissue and late graft losses.

图1 ABMR分子机制

Fig.1 Molecular mechanism in antibody-mediated rejection

组基因包括内皮选择素E/P(*Selectin E/P*)、CD34、血管细胞黏附分子1(*vascular cell adhesion molecule, VCAM1*)、血管细胞黏附分子(intercellular cell adhesion molecule, *ICAM2*)、层黏连蛋白(*Laminin β/γ*)、XVIII型胶原蛋白(*collagen type XVIII*)和乙酰肝素蛋白多糖2(*heparan sulfate proteoglycan 2, HSP2*)等。

无论是否存在补体, ABMR反应中激活状态的内皮细胞都会表达并释放促炎分子(黏附分子、细胞因子和趋化因子等), 募集白细胞, 增加血管通透性^[23]。在有补体参与的排斥反应中, HLA激活补体(C3a、C5a), 补体再结合到内皮细胞表面激活内皮细胞, 活化的内皮细胞通过分泌选择素介导白细胞聚集。内皮细胞分泌的化学趋向性物质, 促进白细胞黏附到血管内皮之上, 进而破坏血管内皮, 最终导致移植物失效^[24]。在没有补体参与的排斥反应中, 一方面同种抗体直接激活内皮细胞, 活化的内皮细胞通过上调趋化基因(*Selectin E/P*、*ICAM-2*、*VCAM-1*、*CX3CL1*和*Collagen type XVIII*)和黏附基因(*Selectin E/P*、*HSP2*、*Laminin β/γ* 和*VCAM-1*)表达各种因子募集白细胞; 另一方面抗体在直接激活内皮细胞的同时, 激活单核巨噬细胞, 后者分泌细胞因子TNF- α 和IL-1间接激活内皮细胞, 并表达组织因子、黏附分子、趋化因子导致内皮细胞损伤, 进而引起移植物失效^[19]。

3.3 内皮修复再生能力降低

在血管内皮损伤的情况下, 机体具有血管内皮修复能力。ABMR的主要病理学特征是微血管内皮损伤。病理结果显示在ABMR发生过程中, 血管内皮细胞修复功能减弱, 这主要是由肾移植组织中促血管生成的一组基因表达量减少引起的。

在100个ABMR的肾脏移植病理组织和40个正常的肾移植组织中, 通过对内皮细胞周期、毛细血管密度和血管生成相关的20多个基因进行分析发现, 促血管生成的基因表达降低(图1), 主要包括血管内皮生长因子A(*vascular endothelial growth factor A, VEGFA*)、血管内皮细胞生长因子受体2(*KDR2*)、纤维母细胞生长因子1(*fibroblast growth factor, FGF1*)和RAS同系物家族B(*RAS homolog family, RHOB*)等基因。这些基因在ABMR肾移植病理组织中表达降低, 导致内皮修复减慢, 进而引起更严重的内皮损伤。血管生成相关基因和蛋白可作为ABMR

肾移植病理组织新的辅助诊断指标, 减少同种异体抗体对肾脏的损害^[25]。

3.4 IFN- γ 杀伤作用增强

ABMR的重要病理机制还包括IFN- γ 杀伤作用增强。Sis等^[16]发现在ABMR的病理组织中*ENDAT*基因表达上调的同时, 还发现*IFN- γ* 基因表达上调, *IFN- γ* 的下游产物白细胞介素11(*CXCL11*)、趋化因子9(*CXCL9*)和白细胞介素5(*CXCL5*)的表达也上调, 表面IFN- γ 在ABMR发生过程中与内皮细胞协同损伤移植物。

IFN- γ 是可溶性细胞因子, 也叫II型干扰素, 由激活的T细胞和NK细胞释放, 在ABMR过程中发挥主要作用。IFN- γ 通过增加组织相容性复合物抗原使抗体更好地结合到内皮细胞表面, 进而诱导炎症细胞损伤移植物。研究发现, 在ABMR受损的内皮细胞中, 细胞因子白细胞介素9(*CXCL9*)、白细胞介素10(*CXCL10*)、白细胞介素11(*CXCL11*)、主要组织相容性复合物Ia(*HLA-A, HLA-B*)、主要组织相容性复合物Ib(*HLA-E*)和主要组织相容性复合物II(*HLA-DP, HLA-DQ*和*HLA-DR*)表达量上调^[19,26-27], *IFN- γ* 的杀伤功能增强。无论是细胞介导的还是抗体介导的排斥反应病理组织中, 都可以检测到*IFN- γ* 及其下游产物高表达^[16], 这说明IFN- γ 在两种排斥反应中都很重要。

4 总结与展望

越来越多的研究表明, 在ABMR发生过程中, 内皮细胞相关基因可以提高慢性ABMR反应术前及术后诊断的特异性, 为临床及时预测和干预ABMR提供新的诊断方法。此外, 从基因角度深入探讨ABMR的发病机制发现, ABMR病理组织中被抗体激活的内皮细胞通过激活一系列基因, 促使局部血小板功能增强、内皮细胞趋化炎性细胞作用增强、干扰素- γ 杀伤作用增强、内皮修复再生能力降低, 最终导致了移植物的损伤。

这些研究证明了内皮细胞在ABMR发生过程中的重要性, 同时也证明将基因分析与抗体分析综合起来可有效促进对慢性ABMR发病机制的研究。对ABMR发病机制的进一步探究, 将有助于增强慢性ABMR诊断的特异性、提高排斥早期的诊疗质量、为新药开发提供新靶点, 使肾移植成功率大幅提高成为可能。

参考文献 (References)

- Gaston R, Leduc R, Cosio F, Gourishankar S, Grande J, Hunsicker L, *et al.* Antibody-mediated injury is the major cause of late kidney allograft failure. *Am J Transplant* 2013; 13: 40-1.
- Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: A prospective trial. *Am J Transplant* 2004; 4(3): 438-43.
- Sis B. Endothelial molecules decipher the mechanisms and functional pathways in antibody-mediated rejection. *Hum Immunol* 2012; 73(12): 1218-25.
- Kissmeyer F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldbor O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966; 2(7465): 662-5.
- Jeannot M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ, Russell PS. Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. *N Engl J Med* 1970; 282(3): 111-7.
- Halloran PF, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection. *Transplantation* 1990; 49(1): 85-91.
- Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class-I response. 2. Clinical and pathologic features of renal-transplants with anti-class-I-like antibody. *Transplantation* 1992; 53(3): 550-5.
- Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, *et al.* Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol* 1991; 86(3): 464-70.
- Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody, Analysis using the Banff Grading Schema. *Transplantation* 1996; 61(11): 1586-92.
- Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G, *et al.* Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993; 43(6): 1333-8.
- Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, Fieberg AM, Leduc R, Cosio FC, *et al.* Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation* 2010; 90(1): 68-74.
- Drachenberg CB, Papadimitriou JC. Endothelial injury in renal antibody-mediated allograft rejection: A schematic view based on pathogenesis. *Transplantation* 2013; 95(9): 1073-83.
- Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transpl* 2010; 15(1): 42-8.
- Mannam VKR, Lewis RE, Cruse JM. The fate of renal allografts hinges on responses of the microvascular endothelium. *Exp Mol Pathol* 2013; 94(2): 398-411.
- Sis B, Jhangri GS, Riopel J, Chang J, de Freitas DG, Hidalgo L, *et al.* A New Diagnostic Algorithm for Antibody-Mediated Microcirculation Inflammation in Kidney Transplants. *Am J Transplant* 2012; 12(5): 1168-79.
- Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009; 9(10): 2312-23.
- Wasowska BA. Mechanisms involved in antibody- and complement-mediated allograft rejection. *Immunol Res* 2010; 47(1/3): 25-44.
- Yamaguchi Y. Reviews on mysterious vascular endothelial cells in renal allografts. *Clin Transplant* 2012; 26: 13-9.
- Valenzuela NM, Mulder A, Reed EF. HLA class I antibodies trigger increased adherence of monocytes to endothelial cells by eliciting an increase in endothelial p-selectin and, depending on subclass, by engaging Fc gamma Rs. *J Immunol* 2013; 190(12): 6635-50.
- Sheriff J, Soares JS, Xenos M, Jesty J, Bluestein D. Evaluation of shear-induced platelet activation models under constant and dynamic shear stress loading conditions relevant to devices. *Ann Biomed Eng* 2013; 41(6): 1279-96.
- Dayananda KM, Singh I, Mondal N, Neelamegham S. von Willebrand factor self-association on platelet GpIb alpha under hydrodynamic shear: Effect on shear-induced platelet activation. *Blood* 2010; 116(19): 3990-8.
- Schonberger T, Ziegler M, Borst O, Konrad I, Nieswandt B, Massberg S, *et al.* The dimeric platelet collagen receptor GPVI-Fc reduces platelet adhesion to activated endothelium and preserves myocardial function after transient ischemia in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 303(7): C757-66.
- Vasko R, Ratliff BB, Bohr S, Nadel E, Chen J, Xavier S, *et al.* Endothelial peroxisomal dysfunction and impaired pexophagy promotes oxidative damage in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19(3): 211-30.
- van Gils JM, Ramkhalawon B, Fernandes L, Stewart MC, Guo L, Seibert T, *et al.* Endothelial expression of guidance cues in vessel wall homeostasis dysregulation under proatherosclerotic conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33(5): 911-9.
- Sis B, Hussain S, Chang J, Hidalgo L, Halloran P, Osasan S. Impaired angiogenesis despite specifically increased microvascular endothelial proliferation in antibody-mediated human kidney transplant rejection. *Am J Transplant* 2012; 12: 189.
- Jiang XF, Zhu L, Cui ZM, Guo DW, Sun WY, Lin L, *et al.* Transplant long-surviving induced by CD40-CD40 ligand costimulation blockade is dependent on IFN-gamma through its effect on CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Transpl Immunol* 2011; 24(2): 113-8.
- Antonelli A, Fallahi P, Ferrari SM, Corrado A, Sebastiani M, Manfredi A, *et al.* Chemokine (CXC motif) ligand 9 serum levels in mixed cryoglobulinaemia are associated with circulating levels of IFN-gamma and TNF-alpha. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30(6): 864-70.