

· 综述 ·

肝脏移植的免疫耐受

谢学羿 何晓顺 陈规划 黄洁夫

(中山医科大学附属第一医院器官移植科; 广州, 510080)

摘要 肝脏移植的免疫耐受具有其独特性。在耐受的诱导形成中, 中枢机制的重要性次于外周机制, 供肝源性白细胞和树突状细胞起着重要作用。耐受的形成可能有微嵌合态和受体淋巴细胞活化相关的耐受两种机制参与, 并具有剂量效应关系。因此, 综合各种措施的方案或许能获得普遍耐受。

主题词 肝移植; 免疫耐受

中图分类号 R 617; R 392.4

肝脏移植的免疫耐受具有其独特性。20多年前人们就认识到移植肝常常越过主要组织相容性的障碍而被自发地耐受。这种耐受为肝脏所独有, 在同样条件下其它移植器官如肾脏和心脏往往被排斥。在临床上, 人们也观察到, 部分肝移植受者完全撤除免疫抑制剂后可获得长期存活^[1]。因此研究肝移植的免疫耐受机制, 将有助于寻找新的诱导耐受的方法。

1 中枢耐受还是外周耐受

胸腺是中枢耐受的原始部位。胸腺内注射供体细胞是诱导耐受的直接方法。胸腺注射细胞无须移行而直接定居于此, 胸腺也是免疫特惠部位, 亦许供体细胞植入。但成年动物胸腺萎缩, 很难准确定位, 也不易判断它是否有功能。同时抗胸腺球蛋白(ATG)也不足以消除大动物的成熟的供体反应性T细胞。胸腺内注射在鼠类能诱导耐受, 但并未有大动物试验的报告。ATG加骨髓输注也不肯定有中枢机制起作用, 因为并未发现细胞的胸腺移行导致供体反应性细胞的去除。在人也不能完全停用免疫抑制剂, 提示并未完全获得胸腺去除耐受。因此, 对于器官移植而言, 中枢耐受的重要性不如外周耐受。

肝脏移植的耐受是典型的外周耐受。被受体接受的移植肝迅速导致随后与肝供体来源相同的其它移植物的特异耐受, 包括一些大鼠和小鼠各品系间的皮肤移植; 而且, 肝脏移植能逆转同一品系供体来源的移植心脏正在发生的排斥反应; 在一些预致敏的受体在无免疫抑制剂、MHC完全不匹配

的情况下肝脏可能被自发地耐受。这些都说明移植肝的耐受是外周耐受。肝移植后白细胞移行至受体淋巴组织, 但却很少移行到受体胸腺^{2,3}, 胸腺切除也不能阻止肝脏耐受的形成⁴, 说明中枢耐受机制对诱导肝移植的耐受不起作用。

2 耐受原是体液因子还是细胞

可溶性I类抗原(sHLA-I)长期被认为是肝移植的可能耐受原。因为sHLA-I主要产生于肝脏, 肝移植受体血清中有大量的供体源性的sHLA-I。从理论上讲, sHLA-I通过中和针对移植物特异的抗体, 或者抑制针对移植物的细胞毒T细胞而阻止排斥反应。然而用sHLA-I治疗来阻止排斥反应的发生却鲜有成功, 研究的结果显示仅有轻微延长甚至不能延长生存时间。而且MHC-I类抗原缺乏的供体肝脏的移植也可形成耐受⁵。

供肝源性白细胞被认为在肝移植耐受中起着重要作用⁶。含受体源性的过客白细胞和供肝源性的实质细胞的嵌合移植肝, 并不能诱导其后移植皮肤的耐受。而且, 在移植前1周, 通过射线照射以减少供体源性白细胞的数量, 导致排斥反应的发生。在这些实验中, 将肝脏短暂地留置于正常供体、或向肝脏或脾脏注射白细胞以恢复供体白细胞的数量, 恢复了受体对移植肝的耐受⁷。因此, 供肝源性白细胞可能是肝移植的耐受原。

3 树突状细胞

诱导耐受的白细胞究竟是哪一亚群呢? 如果

知道是哪一亚群,就可将这一群细胞来用于诱导或促进特异性耐受的形成。供体树突状细胞(dendritic cell, DC)被认为是移植物中主要的同种刺激细胞群。在小鼠模型中,供者特异性的天然耐受可能与移植肝中的DC有关。体外研究发现,经GM-CSF作用的脾DC高度表达MHC-II,具有强烈的激活静息同种T细胞的活性,而经GM-CSF刺激的肝DC,其MHC表达仍低,不能激活静息同种T细胞^[8]。将这种具有诱导T细胞低反应性的未成熟DC用于同种异系小鼠心脏移植,发现这种供体源性B7-2阴性的DC能显著延长小鼠移植心脏的存活时间。未成熟肝DC也可明显延长同种系胰岛移植物的存活时间。也有相反结果的报道,供体用造血干细胞生长因子fit3配体预处理以提高肝脏和心脏DC的数量,加剧了同种排斥反应的发生^[9]。这可能是由于同种刺激太强烈,消除了本有的自发耐受。

4 有限的移植物抗宿主反应(GVHR)导致微嵌合态

1992年,Starzl等^[6]用分子生物学的方法检测到肝移植后器官存活达30年之久的患者体内存在着供体的基因片段,并描述了一种低水平的供体白细胞的微嵌合态。多系白细胞微嵌合态的发现意味着供体细胞和/或干细胞在受体组织中的移行和存活。因此推测:在免疫抑制状态下,供体白细胞建立一种有限的移植物抗宿主反应(GVHR)以对抗排斥反应(宿主抗移植物反应HVGR)。两种共存的供、受体白细胞的相互反应导致受体细胞对供体同种抗原的无反应。供体过客白细胞移行到受体组织,特别是脾脏,支持了这一机制的假说。进一步研究嵌合态的动态变化发现^[10]:活体供肝的肝移植受体,移植后几天内出现微嵌合态的第1个波峰,供体DNA在随后几星期检测不到。而后又出现于大多数患者的血液中及一些患者的组织中。因此,提示早期的嵌合态是由于从移植物释放已分化的造血干细胞进入循环中,这些细胞短暂存活随后被清除。而第2个供体细胞波峰可能来源于移植的供体肝脏的多能干细胞。

根据这一理论,增加供体白细胞或输注含白细胞的骨髓,应该能促进耐受形成。骨髓输注确实能提高受体供体细胞的嵌合态的发生,但骨髓输注能否促进耐受形成,减少排斥反应的发生呢?在动

物实验中已获肯定结果。但在临床移植中,得出的结论却不一致。临床肾移植中,骨髓输注联合应用免疫抑制剂能明显延长移植肾存活。但Rolls等^[11]报告25例肝移植,输与不输骨髓,两组排斥反应的发生频率无差异,另外,嵌合态是否是形成耐受所必须也遭到怀疑。有排斥反应的患者也能检测到嵌合态,而无嵌合态的患者也能形成耐受,两者无明显的因果关系。单从结果看,嵌合态理论遭到怀疑,但分析其形成过程,无论如何,移植后供体细胞移行到受体淋巴组织中却是不争的事实。

5 受体淋巴组织中活化相关的耐受

供体细胞移行到受体淋巴组织,伴有这些部位细胞因子IL-2和IFN- γ 的mRNA的迅速上调。耐受品系组合如PVG \rightarrow DA或LEW \rightarrow DA比排斥品系组合如PVG \rightarrow LEW或DA \rightarrow LEW mRNA的增加更为显著^[3]。在对移植肝产生耐受的过程中,动物淋巴组织内的细胞因子上调迅速而短暂,在24h达到高峰,而后迅速消失。在耐受诱导期间,有与脾动脉周围淋巴鞘的供体细胞密切相关的受体细胞的增殖^[2]。因此,供体白细胞移行到受体淋巴组织、受体T细胞活化及这些组织中IL-2和IFN- γ 的上调,与随后移植肝的耐受密切相关。移植皮肤、心脏、射线照射过的肝脏,因含极少的过客白细胞,导致低水平的细胞移行到受体淋巴组织,这些移植物被排斥。耐DA \rightarrow LEW和PVG \rightarrow LEW品系组合的移植肝,尽管有大量的供体白细胞移行到受体淋巴组织,却很少或没有IL-2和IFN- γ 的上调,这些移植物也被排斥。因此,耐受的形成功必需有供体白细胞移行到受体淋巴组织,在那里诱导受体细胞表达高水平的细胞因子mRNA,诱导受体的供体反应性T细胞的迅速流产。供体白细胞移行到受体淋巴组织中,受体淋巴细胞活化并产生大量细胞因子,从而导致随后的耗竭反应,这就是活化相关的耐受理论^[12]。

在移植后最初两天,用与人类移植相似的剂量,治疗大鼠移植受体,显著减少了随后供肝源性皮肤移植的耐受形成。早期的大剂量皮质激素治疗可能干扰人类可能形成的肝脏耐受,而控制排斥反应又必须使用免疫抑制治疗。这使得患者的早期管理处于两难境地。比较排斥与耐受细胞因子上调的时间,发现淋巴组织中耐受相关的细胞因子

高峰出现时间早,在移植后第1天,而排斥反应细胞因子似乎出现时间晚,大约在5d左右^[12]。这之间的时间段被称为耐受窗。肝移植后短时间延迟给予免疫抑制,可能避免对耐受形成的抑制,而仍能抑制较后出现的排斥反应相关的细胞因子的上调。

6 耐受的剂量效应关系

用小剂量的病毒感染小鼠导致细胞毒T细胞的持续形成从而清除病毒;大剂量的病毒导致特异的T细胞迅速活化而随之被去除,使病毒持续存在。这个现象被称为“耗竭耐受”^[13]。耗竭耐受的一项共同特征是反应性T细胞的活化进而被去除或反应性克隆的失活。机体对低水平的刺激无或很少反应,表现为免疫漠视;增加抗原的剂量,机体免疫反应加强,对于同种移植物而言,排斥反应是这种反应的高峰;在高水平的刺激下,免疫反应的发生被耗竭,导致同种反应性T细胞被去除,从而形成耐受。随着刺激量的增大,受体反应由左至右呈现一抛物线型变化。

肝实质细胞本身不足以诱导大剂量免疫耐受。供体过客白细胞起着增加刺激剂量的作用。当去除移植肝的过客白细胞,排斥反应发生。肝脏供体射线照射后导致过客白细胞下降到正常的30%,因此减少了抗原刺激,免疫反应左移而导致排斥反应。相反,恢复照射过的肝脏的过客白细胞,增加移植物的抗原量,使反应曲线右移,恢复了肝脏的自发耐受。

正常大鼠肝约9g,而心脏和肾脏各重约1g。由于大小的差别导致抗原量多寡的差别,免疫反应也不一样。正常的肝脏能被耐受,而心、肾却被排斥;射线照射过的肝脏被排斥,而照射过的心、肾却被耐受。这也符合上述的剂量效应关系。增加移植器官的数量,也能延长移植器官的生存时间^[14]。

排斥的本质是由于移植器官与受体的基因不同,免疫系统为清除异己而作的努力。这有中枢机制、外周机制的参与。中枢机制的重要性次于外周机制。外周诱导耐受的机制有克隆清除、克隆失活、克隆无能、抑制细胞。各种机制如何协调作用,尚未有完整概念。综合各种措施,可能会有更高的成功率达成耐受。肝脏由于其体积巨大,所含抗原量巨大,肝移植具有比其它器官移植更高的远期成功率。因此大器官的耐受更有希望在肝移植上获

得突破。或许这样一个方案能获得普遍耐受:输注骨髓、未成熟树突状细胞→抗淋巴细胞球蛋白、抗胸腺球蛋白→耐受窗→小剂量短期免疫抑制→完全耐受。然而,各项措施实施的时机、剂量、疗程尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Ramos H C, Reyes J, Abuelmagd K, *et al*. Weaning of immunosuppression in long-term liver transplant recipients. *Transplantation*, 1995, 59(2): 212
- 2 Demetris A J, Murace N, Fujjisak S, *et al*. Hematolymphoid cell trafficking, microchimerism and GVH reactions after liver, bone marrow, and heart transplantation. *Transplant Proc*, 1993, 25(6): 3337
- 3 Bishop G A, Sun J, De Cruz D J, *et al*. Tolerance to rat liver allografts III. Donor cell migration and tolerance-associated cytokine production in peripheral lymphoid tissues. *J Immunol*, 1996, 156(12): 4925
- 4 Kobayashi E, Kamada N, Deliviere L, *et al*. Migration of donor cells into the thymus is not essential for induction and maintenance of systemic tolerance after liver transplantation in the rat. *Immunology*, 1995, 84(2): 333
- 5 Qian S, Fu F, Li Y, *et al*. Impact of donor MHC class I or class II antigen deficiency on first- and second-set rejection of mouse heart or liver allografts. *Immunology*, 1996, 88(1): 124
- 6 Starzl T E, Demetris A J, Murase N, *et al*. Cell migration, chimerism and graft acceptance. *Lancet*, 1992, 339(8809): 1579
- 7 Sun J, Sheil A G, Wang C, *et al*. Tolerance to rat liver allografts IV. Tolerance depends on the quantity of donor tissue and on donor leukocytes. *Transplantation*, 1996, 62(12): 177
- 8 Thomson A W, Lu L, Murase N, *et al*. Microchimerism, dendritic cell progenitors and transplantation tolerance. *Stem Cells Day*, 1995, 13(6): 622
- 9 Steptoe R J, Fu F, Li W, *et al*. Augmentation of dendritic cells in murine organ donors by Flts ligand alters the balance between transplant tolerance and immunity. *J Immunol*, 1997, 159(11): 5483
- 10 Ueda M, Hundrieser J, Hisanaga M, *et al*. Development of microchimerism in pediatric patients after living-related liver transplantation. *Clin Transplant*, 1997, 11(3): 193
- 11 Rolles K, Burroughs A K, Davidson B R, *et al*. Donor-specific bone-marrow infusion after orthotopic liver transplantation. *Lancet*, 1994, 343(8892): 263

(下转第96页)

- Res, 1994, 54(11): 3021
- 9 Popescu N C, Zimonjic D B, Levintov-kriess S, *et al*. Deletion and translocation involving chromosome 3(p14) in two tumorigenic kaposi sarcoma cell lines. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(7): 450
 - 10 Kraus M H, Popescu N C, Amshaugh S C, *et al*. Over-expression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell line by different molecular mechanisms. *EMBO*, 1987, 6(3): 605
 - 11 Janocko L E, Lucke J F, Groft D W, *et al*. Assessing sequential oncogene amplification in human breast cancer. *Cytometry*, 1995, 21(1): 18
 - 12 Hori T, Takahashi E, Tanigami A, *et al*. A high-resolution cytogenetic map of 168 cosmid DNA markers for human chromosome 11. *Genomics*, 1992, 13(1): 129
 - 13 Gallego M I, Zimonjic D, Popescu N C, *et al*. Integration site of human papillomavirus type-18 DNA in chromosome 6 and 8q22.1 of C4-1 cervical carcinoma; DNase I hypersensitivity and methylation of cellular flank sequences. *Gene Chromosome Cancer*, 1994, 9(1): 29
 - 14 Kallioniemi A, Kallioniemi O P, Sudar D, *et al*. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumor. *Science*, 1992, 258(5083): 818
 - 15 郭颖, 方 嫵, 梁启万, 等. 47 例鼻咽癌遗传变异的研究. *癌症*, 1999, 18(1): 5
 - 16 Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, *et al*. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughput fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res*, 1999, 59(4): 803
 - 17 Khan J, Saal L H, Bittner M L, *et al*. Expression profiling in cancer using cDNA microarrays. *Electrophoresis*, 1999, 20(2): 223
 - 18 Zhao L, Kantarjian H M, Van Oort J, *et al*. Detection of residual proliferating leukemic cells by fluorescence in situ hybridization in CML patients in complete remission after interferon treatment. *Leukemia*, 1993, 7(2): 168
 - 19 Taniwaki M, Speicher M R, Lengauer C, *et al*. Characterization of two marker chromosomes in a patient with acute non-lymphocytic leukemia by two-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 1993, 70(2): 99
 - 20 Chen Z, Morgan R, Berger C S, *et al*. Application of fluorescence in situ hybridization in hematological disorders. *Cancer Genet Cytogenet*, 1992, 63(1): 62

(1999-06-16 收稿 1999-08-23 修回)

(上接第 91 页)

- 12 Bishop G A, Sun J, Sheil A G, *et al*. High-dose/ activation-associated-tolerance, a mechanism for allograft tolerance. *Transplantation*, 1997, 64(10): 1377
- 13 Von Boehmer H. Immunology: tolerance by exhaustion. *Nature*, 1993, 362(6422): 696
- 14 Sun J, Bishop G, Wang C, *et al*. Quantity of donor tissue and rat allograft survival. *Transplant Proc*, 1997, 29(1-2): 1143

(1999-06-17 收稿)