

Fas 系统与肝移植免疫

黄 陈 综述, 刘金新, 高 涌 审校

[关键词] 肝移植; 免疫; 细胞; Fas 系统

[中国图书资料分类法分类号] R 657.3 [文献标识码] A

Fas 系统介导的细胞程序性死亡在肝移植免疫中起着十分重要的作用, 它参与了肝移植过程中免疫耐受的形成、免疫排斥的发生等诸多免疫过程。本文就 Fas 系统与 T 淋巴细胞凋亡、肝脏移植排斥和移植耐受的研究进展作一综述。

1 Fas, FasL 的分子生物学特点

Fas 又名 APO-1, 属于肿瘤坏死因子受体超家族, 在第五届人白细胞分型国际会议上被正式命名为 CD95。其分子结构由三部分组成: 膜外的 N 末端区、跨膜区和膜内的 C 末端区。膜外区相对保守, 具有膜受体特性, 膜内区有一段 67~70 个氨基酸序列, 与细胞凋亡信号传递密切相关, 被称为死亡域(death domain, DD)。人 Fas 基因定位于 10q24.1 染色体上, 全长为 25 kb, 可编码含 319 个氨基酸、分子量为 45U 的 I 型跨膜蛋白, 即 Fas 分子。鼠 Fas 基因定位于 19 号染色体上, 其 Fas 与人的同源度达到 49.3%。人 FasL 基因定位于 1q23 基因长度约 8 kb, 其编码的 FasL 分子为一 40U 的 II 型跨膜蛋白, 属于肿瘤坏死因子家族成员, 由 281 个氨基酸残基组成。鼠 FasL 基因位于 1 号染色体, 其 FasL 分子与人的同源性达 76.9%。Fas 广泛表达于人体组织中, 但主要表达于免疫细胞。各亚群胸腺细胞均可表达 Fas 其中 CD4⁺、CD8⁺ 细胞表达量明显高于其它亚群。FasL 分布相当有限, 主要表达于活化的 T 淋巴细胞以及免疫豁免区域, 如睾丸基质细胞、角膜等。Fas 和 FasL 均可分泌或脱落至细胞外, 成为可溶性功能活动分子, 即 sFas 和 sFasL。Fas, FasL, sFas 和 sFasL 共同组成 Fas 系统。

2 Fas 系统诱导细胞凋亡的机制

目前研究表明, 天然表达或转染表达的 Fas 基因对细胞凋亡均有促进作用, 而 Fas 抗体也可诱导细胞凋亡。Fas 抗原作为细胞表面受体, 其天然配体可能是某种刺激信号, 通过信号传导最终诱导细胞凋亡, 而 Fas 抗体正是模拟了配体的这种作用; 另外, Fas 抗原也可能是某种生长因子受体, 而 Fas 抗体与之结合能阻断其生长因子的作用, 因而发生凋亡。曾经认为, 细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)释放的穿孔素和颗粒酶是促使靶细胞死亡的绝对机制。近年来发现, Fas 途径亦是细胞毒效应的重要机制。CTL 表面的 FasL 与靶细胞表面的 Fas 结合, 可激活 Caspases 而诱导表达 Fas 的靶细胞凋亡。由于 Fas 及其配体在体内许多组织中都有广泛表达, 因此可能通过调节细胞凋亡的方式, 在其他的组织细胞转化及组织

平衡中发挥重要作用。

Fas 系统诱导细胞凋亡的作用方式有: (1) 相邻细胞的 Fas 和 FasL 相互作用导致彼此杀伤, 即细胞间凋亡; (2) 细胞自身的 Fas 和 FasL 相互作用引起自身细胞凋亡; (3) sFasL 杀伤相邻 Fas 阳性细胞, 即旁分泌杀伤; (4) sFasL 杀伤自身细胞, 即自分泌杀伤。

Fas 基因介导的细胞凋亡机制尚未完全阐明, 可能有以下三种机制: (1) FasL 是死亡因子, Fas 则是它的受体。FasL 与 Fas 膜外区结合后, 将信号传递到膜内, 诱导 Fas 死亡域与含 Fas 死亡域的 Fas 关联蛋白(FADD)结合, FADD 以其死亡效应域结合 Caspases (一群含半胱氨酸蛋白酶), 从而激活一系列级联反应, 导致细胞凋亡^[1]。(2) Fas 介导的细胞凋亡还可能以神经酰胺作为第二信使传递信号, 通过激活一系列蛋白激酶和转录因子最终激活共同信号传递通路, 引起细胞凋亡, 这一过程被称为神经鞘磷脂循环^[2]。(3) 另外有丝分裂原蛋白激酶(MAPK)的两个亚类 JNK 和 EPK 可以传递 Fas 的凋亡信号^[3]。sFas 与 FasL 有很高的亲和力, 可同膜型 Fas 竞争结合 FasL, 但不引起凋亡, 起间接抑制凋亡的作用。sFas 和 sFasL 的这种作用方式可能是体内细胞凋亡的一种调节方式。

3 Fas 系统与肝移植排斥反应

3.1 Fas 系统介导的肝移植排斥反应的机制 许多研究表明, 细胞凋亡广泛存在于器官移植排斥反应中, 包括同种移植及异种移植的超急性排斥、急性排斥和慢性排斥。无论是动物实验还是临床移植活体标本的检测, 均可见发生排斥反应时移植细胞凋亡数显著高于未发生排斥者。肝移植排斥时凋亡发生的机制尚不清楚。Qian 等^[4]研究发现发生大鼠肝移植排斥时移植植物内肝细胞凋亡增多, FasL 表达增多, CTL 活性增强, 而在自发性肝移植接受时则出现 T 细胞功能的部分缺失, 说明 Fas/FasL 相互作用诱发的细胞凋亡在肝移植中发挥重要作用。Shintaku 等^[5]发现大鼠肝移植排斥发生时, 促进凋亡的基因如 Bax, bcl-xs 及 FasL 表达增多, 而抑制凋亡的基因如 bcl-2, bcl-x1 的表达无明显改变, 说明其机制可能是上调促凋亡基因的表达引起。Tannapfel 等^[6]对临床肝移植患者术后肝活检资料加以研究, 发现急性排斥时, Fas 及 FasL 表达明显增高, 说明 Fas/FasL 相互作用诱发的肝细胞凋亡是移植排斥后发生肝损伤的重要机制之一。

3.2 Fas 系统在肝移植排斥反应防治中的应用 细胞凋亡是器官移植组织损伤的一种机制, FasL 和 FasLmRNA 的检测有可能成为监测排斥反应的指标。预防移植细胞的凋亡能减少移植损伤而延长其存活时间; 促进移植抗原特异

[收稿日期] 2003-05-23

[作者单位] 蚌埠医学院附属医院 肝胆外科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 黄 陈 (1978-), 男, 安徽滁州人, 硕士研究生。

的淋巴细胞凋亡则有利于移植耐受。这些策略有可能成为抗排斥治疗的新手段。利用特异性抗 Fas/ FasL 抗体或药物的中和/ 抑制作用, 可以消除或减弱 Fas 途径对组织细胞产生的损伤, 抗 Fas/ FasL 的中和抗体或 Fas 途径的抑制物将可能是潜在的治疗药物。而可溶性 Fas 特异性阻断 Fas 介导的凋亡这一特性也有可能应用于肝移植后肝细胞保护方面。此外, 有学者最近指出^[7], 血红素加氧酶 1 的转基因治疗可以通过 CO 信号途径防止 Fas 途径介导的凋亡, 从而提高移植肝生存时间。

4 Fas 系统与肝移植耐受

4.1 Fas 系统诱导肝移植耐受的机制 近来发现, 移植器官内浸润的淋巴细胞可发生凋亡, 这些细胞的凋亡有利于移植耐受的建立和维持。移植局部 FasL 的表达能够通过 Fas 途径有效地清除移植体内浸润的淋巴细胞而诱导移植耐受。大鼠同种异体肝移植后, 肝细胞 FasL 与汇管区淋巴细胞的凋亡指数成正相关, 自发耐受组肝细胞 FasL 表达显著高于急性排斥组, 推测可能是表达 FasL 的肝细胞与浸润淋巴细胞结合后, 通过激活 Fas 通路, 使后者发生凋亡, 从而诱导免疫耐受; 而急性排斥组肝细胞表达 FasL 少, 表达 Fas 增多, 这就使肝细胞与浸润淋巴细胞结合后, 导致肝细胞发生凋亡, 最终导致急性排斥反应的发生。因此, 刘玉兰等^[8]指出大鼠肝移植后不同部位细胞的凋亡与其 Fas/ FasL 的不同表达有关, 而 Fas/ FasL 的不同表达将部分决定移植肝脏是发生免疫耐受还是免疫排斥。

4.2 Fas 系统诱导肝移植耐受的应用 鉴于 FasL 可与 Fas 作用诱导 Fas⁺ 的 T 细胞凋亡, 如果能提高移植肝 FasL 的表达, 则会具有诱导移植耐受作用。Li 等^[9]将 FasL 基因克隆到哺乳动物表达载体 PCAAGGS 中, 与日本凝集素病毒(HVJ)脂质体混合, 在大鼠肝移植术前 3 天注入供体门静脉内, 将供肝移植入受体后移植体存活时间明显延长, 移植体 FasL 表达明显增高, 用末端标记法检测发现移植体内浸润的淋巴细胞发生明显的细胞凋亡。

近年来, 有些学者基于免疫特赦原理提出: 利用基因工程技术使移植体表达 FasL 或与 FasL 表达细胞共移植, 可能导致移植体产生耐受。关于免疫特赦, 最先认为是通过阻止自身反应性 T 淋巴细胞进入免疫特赦部位而维持的, 近年来提出了另外一个全新观点^[10]: 免疫特赦作用不是一个被动的通过机械屏障防止免疫及炎症细胞进入的过程, 而是通过诱导凋亡而产生免疫耐受的主动过程即 FasL 大量存在于这些特赦区, 与进入该区的活化淋巴细胞上高度表达的 Fas 抗原结合, 导致淋巴细胞的凋亡从而维持这些区域的免疫特赦。

Lau 等将异源胰岛细胞和人工构建的由 FasL 基因转染的同源成肌细胞混合植于小鼠肾包囊中, 其存活时间较单纯胰岛细胞移植对照组有明显延长, 并能使糖尿病小鼠模型保持长达 80 天之久的正常血糖水平, 证实转 FasL 基因治疗能给移植的胰岛细胞提供特异性的免疫保护作用。王学浩等^[11]对行异基因肝移植的受体 Wistar 大鼠腹腔注射转 FasL 基因的树突状细胞(DC), 手术后 7 天用原位末端标记法(TUNEL)及透射电镜观察移植肝细胞及肝脏内淋巴细胞凋

亡, 结果发现对照组大鼠在 9~15 天迅速死亡, TUNEL 及电镜观察发现肝细胞变性坏死明显; 而转 FasL 基因治疗组免疫排斥反应轻微, 移植后大鼠可存活超过 6 个月, 原位末端标记法及透射电镜均发现 FasL 基因治疗组肝脏内浸润淋巴细胞凋亡明显, 证实转 FasL 基因 DC 细胞治疗能有效地诱导肝移植免疫耐受, 其机制是诱导了肝脏内浸润淋巴细胞凋亡。

4.3 Fas 系统诱导移植免疫耐受的兩重性 尽管 Fas 转基因技术转移植物表达 FasL 在保护移植体免疫排斥方面有一定的作用, 但也有不支持这一观察的报道。蔡世荣等^[12]报道, 在转染 FasL 基因的胰岛细胞移植后并未出现浸润淋巴细胞凋亡, 反而由于胰岛细胞直接表达 FasL, 使其自身细胞凋亡, 加速排斥反应。对于 FasL 基因转染的移植体有两种截然不同的效果: 表达 FasL 的携带细胞与胰岛共移植会保护 FasL 表达阴性的胰岛移植体, 而胰岛移植体自身表达 FasL 则引起排斥加速, 其原因尚待进一步研究。FasL 如果能适量地表达, 对维持机体内环境的稳定具有重要作用, 而一旦其过量或过低地表达, 将带来危害。FasL 表达过低会引起淋巴细胞增殖, 易患白血病、淋巴瘤; 而当 FasL 过高表达时会出现明显的组织损伤。Muruve 等^[13]将小鼠 FasL 基因亚克隆到受巨细胞病毒(CMV)启动子调控的腺病毒载体中, 构成 adCMV-FasL, 体外转染 Jurkat 细胞可致其凋亡; 体内注射 adCMV-FasL 后可导致 Wistar 大鼠和 DBA/2 小鼠广泛的肝细胞凋亡和坏死。故转 FasL 基因时必须考虑其表达产物的浓度, 过量表达将导致移植体的损伤。Li 等^[14]将含 FasL 基因的质粒(pFasL)与 HVJ 脂质混合后, 以不同剂量经门静脉注射, 结果发现 180 μg 的 pFasL 剂量有较好的免疫保护作用, 可使移植体生存时间明显延长, 而 270 μg 及 360 μg 剂量组的大鼠则因急性肝炎在 48 h 内死亡, 90 μg 组则不能使移植体生存时间延长, 亦不引起肝炎。以上兩重性提示在应用 FasL 诱导移植免疫耐受时要注意 FasL 的可控性; 在转基因治疗中要严格掌握转染的方式及剂量。在诱导肝脏移植免疫耐受可使用肝脏靶向性载体, 如脂质体 HVJ 等; 若使用逆转录病毒或腺病毒作为载体, 最好使用体外转染法, 通过门静脉途径给药。

5 结语及展望

Fas 系统虽然在肝移植后浸润淋巴细胞以及肝细胞凋亡等方面具有重要调控作用, 但对其调控机制的许多深层次问题还不清楚, 特别是对细胞凋亡调控分子机制的研究还有待探讨, 深入研究细胞凋亡的 Fas 基因调控机制必将为肝移植免疫机制的阐明提供理论依据。Fas/ FasL 相互作用在诱导肝移植免疫耐受中具有重要地位, 合理使用转 FasL 基因治疗是建立移植耐受的方法, 必将给肝移植术后抗移植排斥治疗开辟新的途径。但目前转 FasL 基因治疗诱导移植耐受仅有动物实验研究, 如何合理的使用转 FasL 基因治疗诱导肝移植免疫耐受还有待于临床进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Gerhing S, Rottmann S, Menkel AR, et al. Inhibition of proliferation and apoptosis by the transcriptional repressor Mad1. Repression of Fas-induced caspase-8 activation[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275

(14): 10 413~10 420.

- [2] Konopleva M, Zhao S, Xie Z, *et al.* Apoptosis. Molecules and mechanisms[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1999, 457: 217~236.
- [3] Sabapathy K, Hu Y, Kallunki T, *et al.* JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development[J]. *Curr Biol*, 1999, 9(3): 116~125.
- [4] Qian S, Lu L, Fu F, *et al.* Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts [J]. *J Immunol*, 1997, 158(10): 4 654~4 661.
- [5] Shintaku S, Ohdan H, Yamamoto H, *et al.* Expression of bcl-2 homologue mRNA in rat liver allograft; Rejection-induced cell apoptosis is associated with upregulation of bax and bcl-2 expression[J]. *Transpl Int*, 1998, 11(Suppl 1): 284~288.
- [6] Tannapfel A, Kohlhaw K, Ebel J, *et al.* Apoptosis and the expression of Fas and Fas ligand(FasL) antigen in rejection and reinfection in liver allograft specimens[J]. *Transplantation*, 1999, 67(7): 1 079~1 083.
- [7] Ke B, Buehw R, Shen XD, *et al.* Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(10): 1 189~1 199.

- [8] 刘玉兰, 刘 峰, 孙君泓. Fas/FasL 表达和细胞凋亡在大鼠同种异体肝移植免疫中的作用[J]. *中华普通外科杂志*, 2003, 18(2): 99~101.
- [9] Li XK, Okuyama T, Tamura A, *et al.* Prolonged survival of recipient rats with Fas ligand-transfected liver allografts by using HVJ-liposome[J]. *Transplant Proc* 1998, 30(4): 943.
- [10] Griffith TS, Ferguson TA. The role of FasL induced apoptosis in immune privilege[J]. *Immunol Today*, 1997, 18(5): 240~244.
- [11] 王学浩, 孙倍成, 钱建民, 等. 转 FasL 基因的树突状细胞诱导大鼠肝移植免疫耐受的实验研究[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2002, 8(5): 294~296.
- [12] 蔡世荣, 詹文华, 何裕隆, 等. 胰岛 FasL 基因转染对大鼠胰岛移植的影响[J]. *中华器官移植杂志*, 2002, 23(4): 222~224.
- [13] Muruve DA, Nicolson AG, Manfro RC, *et al.* Adenovirus mediated expression of Fas ligand induces hepatic apoptosis after systemic administration and apoptosis of ex vivo-infected pancreatic islet allografts and isografts[J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(8): 955~963.
- [14] Li XK, Okuyama T, Tamura A, *et al.* Prolonged survival of rat liver allografts transfected with Fas ligand-expressing plasmid [J]. *Transplantation*, 1998, 66(11): 1 416~1 423.

[文章编号] 1000-2200(2004)02-0188-02

· 综 述 ·

骨髓间充质干细胞和心肌梗死

周德存¹ 综述, 严中亚¹, 翟志敏² 审校

[关键词] 心肌梗死; 骨髓间充质干细胞; 移植

[中国图书资料分类法分类号] R 542. 22; R 329. 24

[文献标识码] A

近年来冠心病的发病率和死亡率居高不下, 探求新的更为理想的治疗心肌梗死的方法, 也一直是研究的热门课题。虽然成果显著, 但现有的治疗方法, 如药物、溶栓、经皮冠脉内成形和支架植入术(PTCA+S)以及外科手术等, 都有一定的局限性和并发症。尤其对大面积严重的心肌梗死, 心脏移植存在供体严重不足、免疫排斥等问题。因此, 骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells, MMSC)移植无疑为人们带来了新的希望。

1 MMSC 生物学特性

MMSC 具有较强的自我复制能力和多向分化潜能。早期分离培养时, 发现其形状呈成纤维细胞样而称其为“成纤维细胞集落形成单位(colony-forming unit/fibroblastic, CFU-F)”或“骨髓基质成纤维细胞(marrow stromal fibroblasts, MSF)”。随着研究的深入, 人们发现其对骨髓血系细胞起支持诱导作用, 又因其来自于骨髓基质, 因而称其为“骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCS)”。近年来因发现在

不同的诱导条件下, 具有向中胚层组织细胞分化的能力, 如向成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞等分化能力, 又称其为“间充质干细胞(mesenchymal stem cells)”、“间充质祖细胞(mesenchymal progenitor cells)”或“骨源性干细胞(osteogenic stem cells)”^[1]。

MMSC 形态成纤维样, 可聚集成均匀集落, 细胞表面蛋白 SH2、SH3、CD29、CD44、CD71、CD90、CD106、CD124 等呈阳性, 但 CD14、CD34 和 CD45 造血谱系标记则呈阴性^[2]。因此这些细胞明显不同于其它 CD34 表面抗原阳性的骨髓成纤维细胞。

目前获得 MMSC 的方法可分为三步: (1)初筛, 分离出可能含 MMSC 的细胞群体; (2)培养、扩增; (3)鉴定。一般将骨髓分离后在特定的条件下培养, 然后, 根据细胞形态学及表面标志物的检测进行判断。对 MMSC 的特征描述及其分离方法都是以一个细胞群体的形式进行的。对 CD14、CD34 和 CD45 的阴性反应在筛选时可作为一定的参考依据。

一般认为, MMSC 只存在于骨髓中, 但最近的研究发现, 从人的骨骼肌中也可以分离出 MMSC, 它同样可以分化为骨骼肌管、平滑肌、骨、软骨及脂肪。此外也有学者分别从骨外膜和骨小梁分离出 MMSC。目前用于初筛分离 MMSC 的方法主要有三种: (1)密度梯度离心法; 根据 MMSC 与其他细

[收稿日期] 2003-07-14

[作者单位] 安徽省立医院 1. 心脏外科, 2. 中心实验室, 安徽 合肥 230001

[作者简介] 周德存(1970—), 男, 安徽寿县人, 住院医师, 硕士。