

尿趋化因子IP-10和Fractalkine在移植肾急性排斥反应早期诊断中的应用**

王敏, 田普训, 丁晨光, 靳占奎, 葛冠群, 贾利宁, 阮东丽, 郝建军

Application of urine IP-10 and Fractalkine in early diagnosis of acute rejection following renal transplantation

Wang Min, Tian Pu-xun, Ding Chen-guang, Jin Zhan-kui, Ge Guan-qun, Jia Li-ning, Ruan Dong-li, Hao Jun-jun

Abstract

BACKGROUND: Studies have confirmed that urine IP-10 and Fractalkine play an important role in acute rejection following organ transplantation.

OBJECTIVE: To investigate early diagnosis and post-treatment expression of urine IP-10 and Fractalkine in the acute rejection after renal transplantation, through detecting the association of the urine IP-10 and Fractalkine variation according to some cases of nephridial tissue biopsy.

METHODS: According to the postoperative clinical manifestation, laboratory examination and renal biopsy histopathological examination results, we divided 106 patients with renal transplantation allograft patients into acute rejection group ($n = 16$) and the stable group ($n = 90$). Healthy volunteers were chosen as normal control group ($n = 10$). IP-10 and Fractalkine concentration changes were measured by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent adsorption.

RESULTS AND CONCLUSION: The urine level of IP-10 and Fractalkine in patients with renal transplantation post-operation was significantly higher than pre-operation group. But one week post-operative, the urine level of IP-10 and Fractalkine was declined in the stable group and to preoperative level after 11 days, and acute rejection group continued high expression. IP-10 with first day postoperative and Fractalkine with third day postoperative compared with stable group showed significant difference ($P < 0.05$). It is confirmed that to detect the urine levels of IP-10 and Fractalkine in patients with renal transplantation pre-operation and post-operation has certain clinical significance to early diagnose and treat acute rejection.

Wang M, Tian PX, Ding CG, Jin ZK, Ge GQ, Jia LN, Ruan DL, Hao JJ. Application of urine IP-10 and Fractalkine in early diagnosis of acute rejection following renal transplantation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(31): 5765-5768. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 相关研究已证实, 趋化因子 IP-10、Fractalkine 在器官移植后急性排斥反应过程中发挥着重要的作用。

目的: 检测尿液中 IP-10 和 Fractalkine 水平变化, 并结合肾组织活检病理, 探讨尿液中 IP-10 和 Fractalkine 在移植肾急性排斥反应早期诊断中的意义。

方法: 106 例同种异体肾移植患者, 根据移植后临床表现、实验室检查及肾穿刺组织病理学检查结果, 分为急性排斥反应组($n=16$)和非急性排斥反应组($n=90$); 另选择健康志愿者作为正常对照组。用双抗体夹心酶联免疫吸附试验检测尿 IP-10 和 Fractalkine 浓度变化。

结果与结论: 急性和非急性排斥反应组患者在移植后的尿 IP-10 及 Fractalkine 的表达水平均较移植前明显升高, 但非急性排斥反应组在移植后 7 d 呈下降趋势, 至第 11 天降至移植前水平, 而急性排斥反应组则持续高表达, IP-10 在移植后第 1 天和 Fractalkine 在移植后第 3 天即与急性排斥反应组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。提示, 肾移植后尿液中 IP-10 和 Fractalkine 水平的检测对于急性排斥反应发生的早期诊断和早期治疗具有重要意义。

关键词: 趋化因子 IP-10; Fractalkine; 肾移植; 急性排斥反应; 尿

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.31.015

王敏, 田普训, 丁晨光, 靳占奎, 葛冠群, 贾利宁, 阮东丽, 郝建军. 尿趋化因子 IP-10 和 Fractalkine 在移植肾急性排斥反应早期诊断中的应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(31):5765-5768.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

在同种异体肾移植中, 急性排斥反应 (acute rejection, AR) 是移植后最常见的并发症, 它的早期诊治是保证移植肾存活的关键^[1]。尽管目前 AR 诊断的“金标准”仍是移植活体及组织病理学检查, 但是寻找到早期提示其发生的无创性检测指标对于 AR 的预防和治疗具有重要意义。

研究证实趋化因子家族成员在 AR 的

发展中起到关键作用^[2-3]。Fractalkine 为趋化因子 CX3C 亚族成员^[4], 同时具有趋化及黏附分子的作用, 对白细胞介素 2、NK 细胞和 CD8 细胞有黏附与趋化作用^[5]。IP-10 作为趋化因子 CXC 亚族的成员之一^[6], 主要作用于 Th1 细胞、NK 细胞、巨噬细胞和树突状细胞。由于 T 细胞的活化是移植免疫进入特异性反应阶段的前提, 这些特性提示它们可能与移植排斥的发生、发展具有更密切的关系。

实验通过检测同种异体肾移植患者尿液中 Fractalkine 及 IP-10 表达在术后的动态变化, 研

Department of Renal Transplantation, Center of Nephropathy, the First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Wang Min★, Studying for master's degree, Department of Renal Transplantation, Center of Nephropathy, the First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China
minwang229@126.com

Correspondence to: Tian Pu-xun, Doctor, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Renal Transplantation, Center of Nephropathy, the First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China
yuantian@mail.xjtu.edu.cn

Supported by: the National Key Technology R&D Program of China during the Eleventh Five-year Plan, No. 2008BA160B04*

Received: 2011-01-10
Accepted: 2011-04-20

西安交通大学医学院第一附属医院肾移植科, 陕西省西安市 710061

王敏★, 女, 1983年生, 陕西省西安市人, 汉族, 西安交通大学在读硕士, 主要从事肾移植方面的研究。minwang229@126.com

通讯作者: 田普训, 博士, 主任医师, 博士生导师, 主任, 西安交通大学医学院第一附属医院肾移植科, 陕西省西安市 710061 yuantian@mail.xjtu.edu.cn

中图分类号: R617
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)31-05765-04

收稿日期: 2011-01-10
修回日期: 2011-04-20
(20100609014/D·W)

究它们与AR的相关性, 探讨其在移植肾AR早期诊断中的价值。

1 对象和方法

设计: 临床对照, 病例回顾性分析。

时间及地点: 于2009-01/2010-12在西安交通大学医学院第一附属医院肾移植科完成。

对象: 纳入同种异体肾移植的患者106例, 原发病均为慢性肾炎、慢性肾功能不全(尿毒症期), 根据移植后临床表现、实验室检查及肾穿刺病理学检查结果, 分为2组: AR组($n=16$): 男11例, 女5例, 年龄(37.5 ± 16.7)岁, 均发生在移植后1个月内, 全部患者均行移植活体及组织病理学检查, 并根据急性排斥反应Banff 97标准^[7], 按小管间质肾炎的严重程度分为轻、中、重度三级。非AR组($n=90$): 男62例, 女28例, 年龄(33.7 ± 17.2)岁。另选择健康志愿者作为正常对照组($n=10$), 男7例, 女3例, 年龄(35.6 ± 16.5)岁。3组患者的年龄和性别比较, 差异无显著性意义。

纳入标准: ①同种异体肾脏移植患者。②免疫抑制剂用量符合本移植中心。③无影响本研究的肾脏移植后外科并发症。④向患者及家属讲明后, 同意接受本临床研究, 全部患者签署知情同意书, 手术均经医院医学伦理委员会批准。

排除标准: ①同时进行2个及2个以上脏器的器官移植。②患有肝炎的患者。③伴随有其他感染疾病。④具有恶性肿瘤病史。

病例入选条件: 肾移植后AR发生的诊断标准: ①临床表现: 有尿量减少、体质量增加、发热、血压升高、肾区肿大和压痛等。②实验室检查: 尿素氮和肌酐持续升高, 肾功能进行性下降。③彩色多普勒: 血管阻力指数升高。④肾脏病理检查: 间质有单核细胞等炎性细胞浸润, 肾小管周围淋巴细胞聚积及血管内膜炎表现。⑤排除免疫抑制剂药物中毒。

正常对照组: 纳入10例健康供者, 经检查血、尿常规、肝、肾功、肝炎系列、HIV、梅毒、凝血系列、CMV-IgG、-IgM、胸、腹片、心电图、肝、胆、胰、脾、双肾B超、双肾肾动态显像、GFR等均正常。

主要药品、仪器及来源: 采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)检测尿液IP-10及Fractalkine的水平变化。采用美国GBI生物公司提供的酶联免疫检测试剂盒, 按照试剂盒要求的操作步骤测定尿液中IP-10及Fractalkine的

质量浓度。纳入患者所用免疫抑制剂他克莫司主要由爱尔兰阿斯泰来制药公司生产的产品, 环孢素A由德国诺华公司生产的产品, 吗替麦考酚酯由意大利罗氏公司生产的产品, 抗排斥反应应用的抗淋巴细胞免疫球蛋白针由法国赛达制药公司生产, 甲泼尼龙以及泼尼松是辉瑞制药公司生产的产品。

方法:

常规方案: 所用肾移植受者均于移植前4 h口服吗替麦考酚酯1.5 g; 移植过程中应用甲泼尼龙500 mg+抗淋巴细胞免疫球蛋白针100 mg。移植后1~4 d分别应用甲泼尼龙(500, 500, 250, 80 mg)+抗淋巴细胞免疫球蛋白针100 mg静脉滴注, 第5天改为泼尼松片维持。移植后第2天加吗替麦考酚酯1.5 g/d; 肾功能降至正常后, 加用环孢素A 4.5~5.0 mg/(kg·d)或他克莫司0.1 mg/(kg·d), 1周后根据化验所得血药浓度高低调整环孢素A或他克莫司剂量。

强化治疗: 确诊为AR的患者给予“甲泼尼龙500 mg+抗淋巴细胞免疫球蛋白针100 mg”冲击治疗至少5 d。治疗后疗效判定: ①治愈: 移植肾急性排斥反应逆转, 排斥反应临床表现(发热、尿少、移植肾区胀痛等)消失和实验室检查(肾功能、尿脱落细胞等)降至正常和/或移植肾彩超改善和/或移植肾活检病理改变有所好转。②无效: 上述指标无改善。

标本采集: 所有肾移植患者均于移植前1 d和移植后第1, 3, 5, 7, 11和14天采样, 对于AR患者, 于确诊后第0, 1, 3, 5和7天。留取晨起空腹中段尿50 mL, 2 000 r/min离心机离心10 min后取上清液, 置于Eppendorf管中, -80 °C保存, 避免反复冻融。

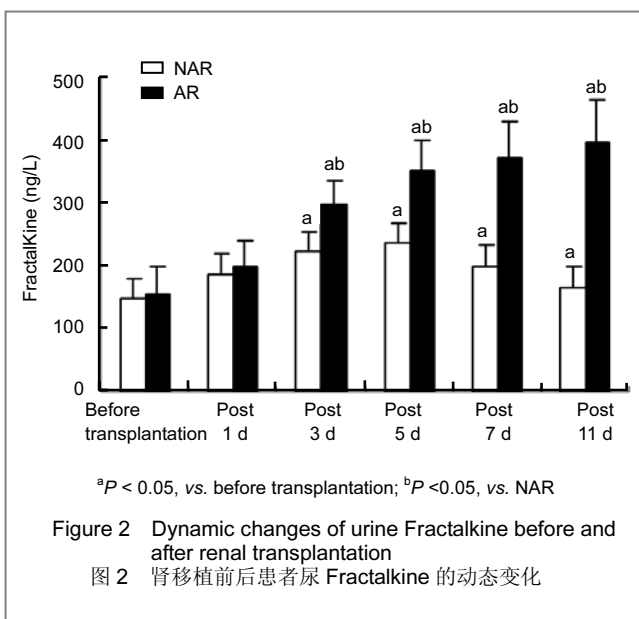
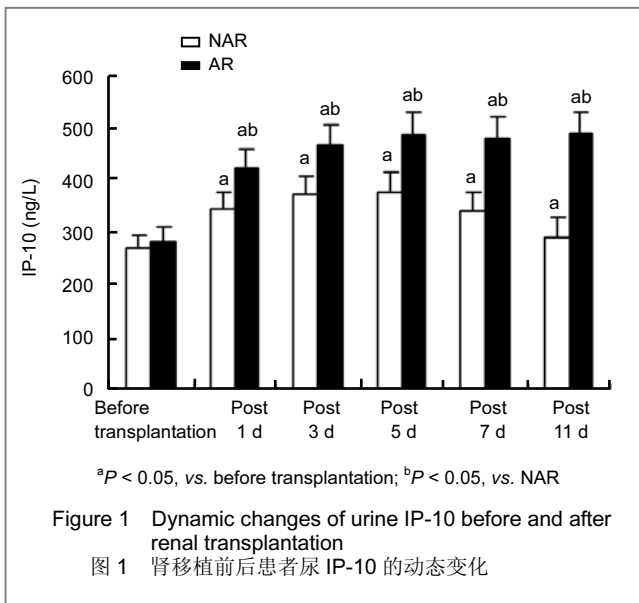
主要观察指标: 监测肾移植后尿液中趋化因子IP-10以及Fractalkine的表达并研究其与排斥反应的相关性。

统计学分析: 由第一作者数据采用SPSS 13.0 for Windows 软件进行统计学处理, 所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析法(One Way ANOVA), 结果有差异时, 各组与对照组比较采用Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果

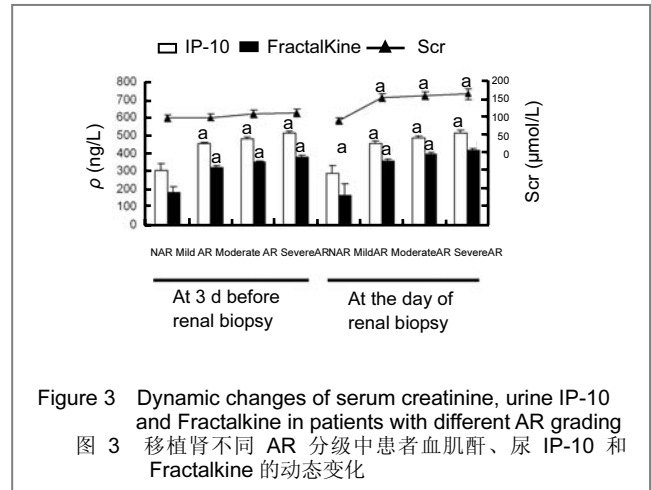
2.1 AR和非AR组患者尿中IP-10及Fractalkine表达的比较 正常人尿中IP-10和Fractalkine的质量浓度分别为(90.34 ± 21.4) ng/L和($89.2\pm$

12.5) ng/L。肾移植前1 d尿液中IP-10及Fractalkine的表达在AR和非AR组患者之间未见明显差异,但实验结果显示均明显高于正常对照组($P < 0.05$)。AR和非AR组患者在移植后IP-10及Fractalkine的表达水平均有上升,IP-10于移植后第1天和Fractalkine于移植后第3天即明显高于移植前1 d的表达水平($P < 0.05$)。非AR组中IP-10及Fractalkine的表达水平在移植后第3~5天达到高峰,7 d后呈下降趋势,至移植后第11天降至移植前水平。但是,AR组IP-10及Fractalkine的表达持续表达在高水平,IP-10于移植后第1天和Fractalkine于移植后第3天即与非AR组相比较存在显著性差异($P < 0.05$)。见图1和图2。

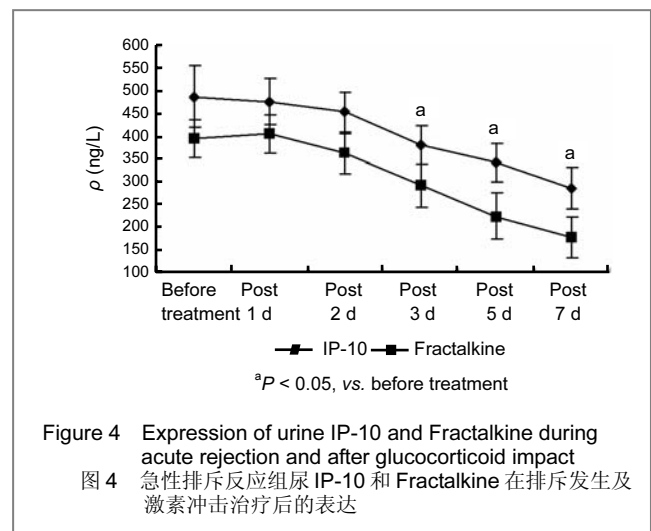


2.2 AR患者尿IP-10及Fractalkine表达与病理分级的相关性 16例AR患者在临床症状和实验室检查疑似AR时,立即行移植活体活检及组织病理学检查进一步明确诊断。根据Banff 97的小管间质肾炎的严重分级标

准^[7],9例发生IA级的轻度排斥反应,4例发生IIA级的中度排斥反应,3例发生III级重度排斥反应。在肾穿刺当天,AR组的血肌酐、尿IP-10及Fractalkine表达明显高于非AR组,而且其排斥反应越重,尿IP-10及Fractalkine表达水平越高($P < 0.05$),见图3。值得注意的是,在肾穿前3 d,尽管AR组的血肌酐并未明显升高,但是尿液中IP-10及Fractalkine表达却明显的高于非AR组。



2.3 激素冲击治疗对尿中IP-10及Fractalkine表达的影响 激素冲击治疗后,AR组患者尿中IP-10及Fractalkine的表达均不同程度的下降,激素冲击治疗后第3天与确诊当天相比显著降低($P < 0.05$),至第7天基本恢复与非AR组比较,差异无显著性意义,见图4。



3 讨论

移植肾急性排斥反应是影响肾脏移植成功与否的关键,是导致慢性排斥反应和移植植物功能损伤的危险因素,其发生与淋巴细胞的激活、趋化迁移以及移植植物局部发挥效应有关^[8-13]。趋化因子根据氨基端半胱氨酸的排列方式不同,分为C、CC、CXC和CX3C亚家族,它

们通过与7次跨膜的、G蛋白偶联的趋化因子受体相结合而发挥生物效应^[14-16]。IP-10是趋化因子CXC家族的重要成员,是与免疫活化和免疫效应密切相关的趋化因子,是表达于Th1细胞的趋化因子受体的功能激动剂,在淋巴细胞的免疫活化、炎症浸润、细胞迁移和发生效应中发挥重要作用,也被认为是排斥反应进入特异性反应阶段的标志^[17]。Fractalkine是新近发现的CX3C家族趋化因子的唯一成员^[18],不仅能够诱导淋巴细胞的活化与定向迁移,还能介导T细胞、单核细胞和NK细胞与血管内皮细胞的紧密黏附^[19]。

实验发现,尿液中趋化因子IP-10和Fractalkine的表达在肾移植后升高,在移植后第3~5天达到高峰,其原因可能与移植后早期移植物缺血再灌注损伤以及手术的创伤等因素有关。在常规的免疫抑制治疗7 d后,非AR组的IP-10和Fractalkine趋化因子降至和术前相同的水平,但是AR组则表达在高水平直至手术后第11天仍未下降。由此可见,肾移植患者移植后1周如果尿液仍持续高表达IP-10和Fractalkine,则AR发生的可能性较大。更重要的是,本实验证明了在移植物活检及组织病理学检查确诊为AR发生的前3 d,即使在血肌酐未见明显异常升高的情况下,尿液中IP-10和Fractalkine的表达已经明显升高,并且其表达的水平与病理排斥反应的严重程度呈正相关。提示了尿液中趋化因子IP-10和Fractalkine的检测对于AR早期诊断的具有重要的意义。AR组患者经激素冲击治疗后肾功能降至正常,而尿液中趋化因子IP-10和Fractalkine的表达也均受到抑制而降低,提示了IP-10和Fractalkine的表达与AR的相关性。

受试者工作特征曲线(ROC曲线)主要用于二分类判别效果的分析与评价,通过诊断点的移动,获得多对灵敏度与误诊率。本实验结果尿液中IP-10联合Fractalkine的ROC曲线下面积(Area Under the Curve, AUC)为0.918,IP-10单独预测术后急性排斥反应发生的ROC曲线下面积为0.914,Fractalkine单独预测肾移植术后排斥反应发生的ROC曲线下面积为0.869,由以上可见IP-10联合Fractalkine评价肾移植术后排斥反应发生的AUC大于Fractalkine以及IP-10单独预测肾移植术后排斥反应发生的ROC曲线下面积AUC,联合评价肾移植术后急性排斥反应发生价值较高。

综上所述,本实验证实尿中IP-10和Fractalkine检测可以预测移植肾AR的发生,肾移植术1周后如果仍存在着高表达,即使血肌酐处于正常范围,也提示AR发生的可能性较大,对于肾移植AR的早期诊断具有重要意义。

4 参考文献

[1] Gjertson DW, Cecka JM. Determinants of long-term survival of pediatric kidney grafts reported to the United Network for Organ Sharing kidney transplant registry. *Pediatr Transplant*. 2001;5(1):5-15.

[2] Zhou G. Guowaiyixue(Mianyixue Fence). 2004;27(4):185-189. 周钢. 趋化因子与移植免疫[J]. 国外医学免疫学分册. 2004,27(4):185-189.

[3] Wells TN, Power CA, Shaw JP, et al. Chemokine blockers--therapeutics in the making? *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(1):41-47.

[4] Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med*. 1998;188(8):1413-1419.

[5] Nadeau KC, Azuma H, Tilney NL. Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts: roles for cytokines RANTES and MCP-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(19):8729-8733.

[6] Xiao L, Fu H, Ding GS. Dier Junyi Daxue Xuebao. 2007;28(6):659-661. 肖亮,傅宏,丁国善. 移植排斥反应中趋化因子及其受体表达的研究进展[J]. 第二军医大学学报,2007,28(6):659-661.

[7] Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*. 1999;55(2):713-723.

[8] Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997;385(6617):640-644.

[9] Geleff S, Draganovici D, Jaksch P, et al. The role of chemokine receptors in acute lung allograft rejection. *Eur Respir J*. 2010;35(1):167-175.

[10] Gorgi Y, Sfar I, Jendoubi-Ayed S, et al. Allograft renal rejection and chemokine polymorphism. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2011;22(1):18-23.

[11] Mao Y, Wang M, Zhou Q, et al. CXCL10 and CXCL13 Expression were Highly Up-regulated in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Acute Rejection and Poor Response to Anti-Rejection Therapy. *J Clin Immunol*. 2010 Dec 30.

[12] Hoffmann U, Bergler T, Segerer S, et al. Impact of chemokine receptor CX3CR1 in human renal allograft rejection. *Transpl Immunol*. 2010;23(4):204-208.

[13] Guo JQ, Huang YL, Wu WZ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(5):862-864. 郭君其,黄一亮,吴卫真,等. 细胞间黏附分子1与移植肾急性排斥反应[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(5):862-864.

[14] Neusser MA, Kraus AK, Regele H, et al. The chemokine receptor CXCR7 is expressed on lymphatic endothelial cells during renal allograft rejection. *Kidney Int*. 2010;77(9):801-808.

[15] Carvalho-Gaspar M, Billing JS, Spriewald BM, et al. Chemokine gene expression during allograft rejection: comparison of two quantitative PCR techniques. *J Immunol Methods*. 2005;301(1-2):41-52.

[16] Eteshola E. Isolation of scFv fragments specific for monokine induced by interferon-gamma (MIG) using phage display. *J Immunol Methods*. 2010;358(1-2):104-110.

[17] Krukemeyer MG, Moeller J, Morawietz L, et al. Description of B lymphocytes and plasma cells, complement, and chemokines/receptors in acute liver allograft rejection. *Transplantation*. 2004;78(1):65-70.

[18] Dikow R, Becker LE, Schaefer M, et al. In renal transplants with delayed graft function chemokines and chemokine receptor expression predict long-term allograft function. *Transplantation*. 2010;90(7):771-776.

[19] Meng K, Song Z, Zhou X. The significance and expression of fractalkine in acute rejection after rat orthotopic liver transplantation. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2007;21(5):528-531.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 国家“十一五支撑计划”项目(2008BAI60B04), 课题名称: 基于流式微载体技术的免疫监测研究和应用。

作者贡献: 第一作者进行实验设计,第三、四、五、六、七作者进行资料收集,第二作者进行实验评估,第一作者成文,第二作者审核,第一、二作者对文章负责。

致谢: 感谢西安交大医学院一附院病理科提供的病理资料以及切片,使得本实验在原基础上更加完善。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。