

## 肝移植术后趋化因子Mig、IP10、ITAC的变化对早期诊断急性排斥反应的意义

丁国善\*, 甘树杰, 傅宏, 叶寒青, 王海梁, 倪之嘉, 郭闻渊, 王正昕, 施晓敏, 傅志仁

(第二军医大学长征医院器官移植研究所, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:**观察趋化因子 Mig、IP10、ITAC 在肝移植术后的变化,探讨其对肝移植术后急性排斥早期诊断的意义。**方法:**2005 年 4~9 月 30 例肝移植患者,根据临床表现及病理学检查分为急性排斥组(AR,  $n=9$ )(排除 3 例术后感染患者),非急性排斥组(NAR,  $n=18$ )。检测患者术前 1 d 及术后 1、3、5、7 d 血清中趋化因子 Mig、IP10、ITAC 的表达,并与同期住院的肝硬化或肝癌患者(肝癌肝硬化组,  $n=16$ )以及健康体检者(正常对照组,  $n=16$ )进行比较。AR 组患者分别于确诊当天以及经激素冲击治疗后 3、7 d 检测血清中 3 种趋化因子的表达,并分析确诊当天 3 种趋化因子表达与肝脏穿刺活检 Banff 排斥活动指数(RAI)的相关性。**结果:**肝移植术前 1 d AR 组、NAR 组患者血清 Mig、IP10、ITAC 表达与肝癌肝硬化组无明显差异,但高于正常对照组( $P<0.01$ )。肝移植术后 3 d, AR 和 NAR 组 Mig、IP10、ITAC 的表达水平均有上升,高于术前 1 d 的表达( $P<0.05$ )。AR 组 9 例患者分别在术后 11、12 和 14 d 确诊 AR 发生,术后各时间点患者血清 Mig、IP10、ITAC 表达明显高于 NAR 组( $P<0.01$ );确诊 AR 当天 Mig、IP10、ITAC 的表达与 RAI 呈正相关( $r=0.88, 0.94, 0.80$ )。与确诊 AR 当天相比,经冲击治疗逆转后,3 种趋化因子的表达也相应下降( $P<0.01$ )。**结论:**肝移植术后血清中趋化因子 Mig、IP10、ITAC 的表达可作为早期诊断急性排斥反应辅助特异、敏感的指标。

**[关键词]** 趋化因子类; 肝移植; 移植排斥; 早期诊断**[中图分类号]** R 657.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)05-0470-04

## Dynamic changes of chemokines Mig, IP10, and ITAC in early diagnosis of acute rejection after liver transplantation

DING Guo-shan\*, GAN Shu-jie, FU Hong, YE Han-qing, WANG Hai-liang, NI Zhi-jia, GUO Wen-yuan, WANG Zheng-xin, SHI Xiao-min, FU Zhi-ren (Institute of Organ Transplantation, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the dynamic expression of chemokines Mig, IP10, and ITAC after liver transplantation and to study its role in early diagnosis of acute rejection in humans. **Methods:** Thirty patients receiving liver transplantation (April 2005 to September 2005) were divided into acute rejection (AR) group ( $n=9$ ) and non-acute rejection (NAR) group ( $n=18$ ) based on the clinical symptoms and pathological examination. Three patients were excluded due to post-operation infection. The chemokines expression was determined in all patients 1 day before and day 1, 3, 5, 7 after transplantation. Sixteen patients with liver cirrhosis (cancer) and 16 normal adults were also examined as control in this study. Patients in AR group received pulse glucocorticoid treatment from the onset of AR and the expression of chemokines was determined on the day of AR diagnosis and day 3, 7 after glucocorticoid treatment. The relationship between Banff rejection activity index (RAI) and 3 chemokines expression on the day of AR onset was analyzed. **Results:** Chemokines expression was not significantly different between transplantation group and liver cirrhosis (cancer) group one day before transplantation; however, it was significantly higher than that of the normal control group ( $P<0.01$ ). The expression of Mig, IP10 and ITAC was increased markedly in AR and NAR group day 3 after transplantation ( $P<0.05$ ). AR was confirmed in 9 patients on day 11, 12 and 14 after transplantation. The serum contents of Mig, IP10 and ITAC in AR group were higher than those in NAR group at all defined time points after transplantation. There was a positive relationship between RAI and the expression of Mig, IP10 and ITAC on the day of AR onset ( $r=0.88, 0.94, 0.80$ , respectively). In AR patients, the expression of Mig, IP10 and ITAC decreased after pulse treatment with glucocorticoid ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Serum level of Mig, IP10 and ITAC can serve as a sensitive, specific marker for early predication of AR in liver transplant patients.

**[KEY WORDS]** chemokines; liver transplantation; graft rejection; early diagnosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(5):470-473]

FK506 等高效免疫抑制剂的应用明显提高了肝移植患者的移植生存率,但急性排斥反应(acute rejection, AR)仍然是肝移植术后最严重的并发症之一,其发生率仍然较高<sup>[1,2]</sup>,常发生于术后 7~14 d,并有 5%~10%发展为慢性排异。AR 的早期诊断、

**[基金项目]** 上海市科委自然科学基金重点项目(044119614)。Supported by Key Program of the Natural Science Foundation of Shanghai Municipal Government(044119614)。

**[作者简介]** 丁国善,博士,副教授、副主任医师,硕士生导师。

\* Corresponding author. E-mail: ading1964@126.com

及时治疗是保证移植肝存活的关键。目前临床对肝移植术后 AR 的确诊仍需肝穿刺活检组织学检查,但肝穿刺活检引起的并发症一直为临床医生所顾忌,因此,寻找和建立非侵袭性早期诊断指标具有重要的临床实用价值。Mig、IP10、ITAC 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,因此,趋化因子与移植排斥反应密切相关<sup>[3-6]</sup>。本研究通过观察趋化因子 Mig、IP10、ITAC 在肝移植术后的动态变化,研究它们的动态变化与肝移植术后急性排斥的发生、发展以及治疗的关系,探讨其在肝移植术后急性排斥反应早期诊断中的可能价值。

## 1 资料和方法

1.1 一般资料及实验分组 选取 2005 年 4 月至 2005 年 9 月在我院因终末期肝病行原位肝移植术的住院患者 30 例,男 26 例,女 4 例,平均年龄  $41.7 \pm 3.62(30 \sim 51)$  岁。受者原发疾病:肝炎后肝硬化 16 例,原发性肝癌 9 例,急性肝功能衰竭 3 例,酒精性肝硬化 1 例,原发性胆汁性肝硬化 2 例。供、受者血型相同 24 例,血型不同但符合输血原则 6 例。手术采用经典式肝移植术 28 例,同种异体背驮式原位肝移植术 2 例。根据术后临床表现、肝脏生化检查及肝脏穿刺活检组织病理学检查结果,排除 3 例感染患者后,分为 AR 组 9 例, NAR 组 18 例。另选择我院肝癌肝硬化患者 16 例,男性 11 例,女性 5 例,平均年龄  $(41.56 \pm 2.63)$  岁,作为肝癌肝硬化组;本院体检中心健康体检者 16 例,男性 12 例,女性 4 例,平均年龄  $(40.8 \pm 3.61)$  岁,作为正常对照组。

1.2 免疫抑制剂治疗方案 所有手术患者术后均采用 FK506 (acrolimus) + 骁悉 (MMF) + 甲泼尼龙的三联疗法,FK506 剂量为  $0.05 \sim 0.10$  mg/kg,口服,12 h 1 次,术中无肝期甲基强的松龙 (MP) 500 mg 静脉滴注,术后第 1 天 MP 200 mg 静脉滴注,以后每天减量 40 mg,术后第 7 天开始口服强的松,骁悉 0.5 g,口服,每天 2 次。

1.3 血清 Mig、IP10、ITAC 的检测 于术前 1 d 及术后 1、3、5、7 d 分别抽取所有研究对象静脉血 2 ml,置于 4℃,上清中趋化因子的检测采用双抗体夹心 ELISA 方法,试剂盒购自美国 R&D 公司,按说明书操作。AR 组患者分别于确诊当天以及经激素

冲击治疗后 3、7 d 抽血检测血清中 3 种趋化因子的表达,方法同前。

1.4 肝脏穿刺活组织病理学检查 根据肝移植患者移植排斥的临床表现,于移植后不同时间进行肝脏穿刺,活检组织送病理学检查,病理结果按照肝小叶结构、肝细胞水肿、小胆管炎性损伤、内皮细胞肿胀、中央静脉淤血以及汇管区炎细胞浸润程度,判断 Banff 排斥活动指数 (RAI),并分析确诊 AR 当天 3 种趋化因子表达与 RAI 的相关性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 9.0 软件对数据进行统计学处理,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间比较用  $t$  检验,排斥前后比较用配对  $t$  检验进行显著性分析, $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

2.1 各研究对象外周血 Mig、IP10、ITAC 表达的变化 肝移植术前 1 d AR 组患者血清 Mig、IP10 及 ITAC 表达与 NAR 组、肝癌肝硬化组相比均无明显差异,但与正常对照组相比有显著差异 ( $P < 0.01$ )。AR、NAR 组术后 1 d Mig、IP 及 ITAC 的表达水平均有上升,术后 3 d 血清表达水平明显高于术前 1 d 的表达水平 ( $P < 0.05$ )。NAR 组中 Mig、IP10、ITAC 的表达水平在术后 5 d 达到高峰,7 d 后呈下降趋势,但发生急性排斥的 AR 组 Mig、IP 及 ITAC 的表达水平始终高于 NAR 组 ( $P < 0.01$ , 表 1)。

2.2 AR 确诊患者激素冲击治疗后 Mig、IP10、ITAC 表达的变化 AR 组 9 例患者中,5 例在术后 11 d 确诊排斥发生,1 例、3 例分别在术后 12、14 d 确诊排斥发生,Mig、IP10 及 ITAC 表达均明显升高;9 例 AR 患者在排斥确诊当天检测 Mig、IP10 及 ITAC 的表达均显著高于 NAR 组 ( $P < 0.01$ )。当排斥反应经激素冲击治疗后,AR 组 9 例患者外周血 Mig、IP10 及 ITAC 的表达均受到抑制而不同程度的下降,激素冲击治疗后 7 d 时与确诊当天相比,显著降低 ( $P < 0.01$ , 图 1)。上述数据提示:肝移植术后血清 Mig、IP10 及 ITAC 表达水平均有上升,NAR 组在常规的免疫抑制治疗后 5~7 d 内下降至术前水平,但 AR 组术后 1 周 Mig、IP10 及 ITAC 表达始终高于 NAR 组,并在 NAR 组 Mig 表达降低至术前水平 6 d 后确诊排斥的产生,因此,术后持续升高的 Mig、IP10 及 ITAC 表达较敏感地预示移植排斥发生的可能性,也可作为免疫抑制剂剂量调整的提示指标。

表1 肝移植前后各组血清趋化因子表达的变化

Tab 1 Serum levels of chemokines in acute rejection and non-acute rejection patients after liver transplantation

( $\bar{x} \pm s, \rho_B / \text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

Index	Pre-transplantation				Time of post-transplantation(t/d)							
	Control (n=16)	Cirrhosis (n=16)	AR (n=9)	NAR (n=18)	1		3		5		7	
					AR	NAR	AR	NAR	AR	NAR	AR	NAR
MIG	100.82±35.66	276.14±67.20△△	261.72±38.14△△	239.82±41.65△△	353.52±52.08**	263.74±69.96	362.78±69.88**	275.91±37.1	372.62±50.81**	306.91±40.34	319.96±39.37**	254.78±42.89
IP10	85.10±23.32	243.15±49.26△△	241.60±47.30△△	233.85±34.42△△	321.38±61.76**	249.55±35.20	336.67±45.93**	274.00±39.64	387.00±77.63**	268.98±59.48	336.23±46.78**	245.43±39.68
ITAC	106.86±23.63	214.73±40.04△△	210.68±46.65△△	199.06±50.78△△	273.04±33.56**	213.64±48.51	346.71±45.83**	260.91±65.25	379.97±68.76**	300.12±39.83	316.19±45.64**	248.49±49.83

△△P<0.01 vs control group; \*\*P<0.01 vs NAR at the same time points

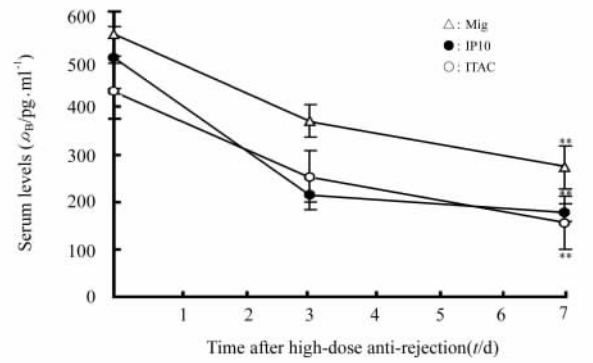


图1 AR组 Mig、IP10、ITAC 在排斥发生时及冲击治疗后的表达

Fig 1 Serum levels of Mig, IP10 and ITAC in response to anti-rejection therapy in patients with acute rejection after liver transplantation

\*\* P<0.01 vs rejection day; n=9,  $\bar{x} \pm s$

2.3 血清 Mig、IP10、ITAC 表达与 RAI 的关系  
AR 组均在术后 8~14 d 发生急性排异,经肝穿活检,其中 RA 积分 3~5 分 2 例,5~7 分有 6 例,7~9 分 1 例。AR 组排斥当天血清 Mig 表达水平 (pg/ml) 明显高于术前 1 d 的水平 (553.97±47.23 vs 261.72±38.14, P<0.01), 且与 RAI 呈正相关 (r=0.88)。AR 组排斥当天血清 IP10 表达 (pg/ml) 明显高于术前 1 d 的水平 (508.67±65.05 vs 241.60±47.30, P<0.01), 与 RAI 呈正相关 (r=0.94)。AR 组排斥当天血清 ITAC 表达 (pg/ml) 也明显高于术前 1 d 的水平 (432.78±58.09 vs 210.68±46.65, P<0.01), 也与 RAI 呈正相关 (r=0.80)。上述结果提示, 术后持续高表达的 Mig、IP10、ITAC 与 RAI 呈正相关, 较敏感地预示移植排斥发生的可能性, 同时提示 IP10、Mig 的表达更敏感地反应排斥的发生。

### 3 讨论

器官移植后急性排斥的发生与淋巴细胞的激活、趋化迁移以及移植物局部发挥效应有关。有研究指出白细胞通过多步骤航行模式 (multistep navigation mode) 定向迁移到靶组织或器官, 包括四个步骤, 即细胞随体液的流动、细胞被稳定黏附在血管内皮上、细胞穿过血管内皮细胞间隙、细胞迁徙到特定的组织中, 每个阶段都有赖于趋化因子及其受体的相互作用。趋化因子 CXC 家族包括 16 名成员, 大部分作用于中性粒细胞, 但其中 CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP10), CXCL11 (ITAC) 等因子与其他 CXC 类趋化因子不同, 作用于 Th1 细胞以及自然杀伤细胞 (NK), 巨噬细胞和树突状细胞 [7~9], 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。IP-10 是 CXC 家族的重要成员, 由于它是抗原特异性 T 细胞的主要趋化剂, 所以也被认为是排斥反应进入特异性反应阶段的标志。在动物心脏移植和小肠移植免疫中的作用已得到证实, 但其在肝移植方面的研究相对较少 [5,10]。通过研究 Mig、IP10、ITAC 等在实验动物移植模型或者在人肾脏移植中的表达与急性排斥的关系, 发现 Mig、IP10、ITAC 等在急性排斥期的表达均明显升高, 预示这些趋化因子可作为预警排斥发生的参考指标 [11~14]。

研究结果表明, 肝移植后各组无论急性排斥发生与否, 血清中趋化因子 Mig、IP10、ITAC 在手术后均升高, 术后第 5 天达到高峰, 其原因可能与移植术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, 且与各类炎性细胞浸润达到高峰时间相一致。在常规的免疫抑制治疗后 5~7 d NAR 组的

Mig、IP10、ITAC 等趋化因子下降至术前水平,但 AR 组手术 1 周后趋化因子表达始终高于 NAR 组,并在 NAR 组表达降低至术前水平 6 d 后也即在手术后 11、12、14 d 分别确诊排斥的发生。分析 Mig、IP10、ITAC 等趋化因子的表达与 RAI 的关系,发现 Mig 高表达与 RAI 呈正相关,相关系数( $r$ )为 0.88;ITPC 高表达也与 RAI 呈正相关, $r$  为 0.80;而 IP10 高表达与 RAI 呈正相关最明显, $r$  为 0.94,表明 IP10 与排斥有更密切的关系。统计学分析表明,术后持续升高的 IP10、Mig、ITAC 等趋化因子表达较敏感地预示移植排斥发生的可能性。特别是肝移植手术经过常规免疫抑制治疗 1 周后 Mig、IP10、ITAC 等趋化因子持续升高也可作为免疫抑制剂剂量调整的提示指标。这些诊断为排斥的病例经过经激素冲击治疗后得以逆转,AR 组 9 例患者外周血 Mig、IP10、ITAC 等趋化因子的表达均受到抑制而显著降低。因此,对于发生于术后 7~14 d 的急性排异,监测术后 2 周血清中趋化因子趋化因子 Mig、IP10、ITAC 的动态变化,对于早期诊断急性排异有指导意义。

我们也观察了 30 例肝移植后患者血清胆红素及肝脏酶系(丙氨酸转氨酶、血清碱性磷酸酶、血清转氨酶等)在急性排斥时的变化(结果另文报道),发现血清胆红素和 ALT 在排斥时可明显升高,反映了移植排斥后肝功能的相关变化,因此,肝脏移植后血清胆红素和 ALT 升高与排斥的发生密切相关,但血清胆红素和 ALT 的升高影响因素较复杂。由于移植免疫应答过程中有众多的趋化因子参与,不同的趋化因子其作用又有所重叠,单一抑制或阻断某一信号可能达不到理想的效果,因此从趋化因子体系发现具有独特免疫学作用的趋化因子及受体显得尤为重要,在肝移植急性排斥反应的早期,血清 Mig、IP10、ITAC 就表现为高表达,且随着排斥反应程度的加重而进一步升高,表明血清 Mig、IP10、ITAC 高表达与肝移植术后急性排斥反应有密切关系,观测其变化,有助于鉴别、监测肝移植急性排斥反应的发生及严重程度,有望成为肝移植急性排斥反应的新的无创检查检测方法。

## [参考文献]

- [1] Volpin R, Angeli P, Galio A, et al. Comparison between two high-dose methylprednisolone schedules in the treatment of acute hepatic cellular rejection in liver transplant recipients: a controlled clinical trial[J]. *Liver Transpl*, 2002, 8:527-534.
- [2] Andreu H, Rimola A, Bruguera M, et al. Acute cellular rejection in liver transplant recipients under cyclosporine immunosuppression: predictive factors of response to antirejection therapy[J]. *Transplantation*, 2002, 73:1936-1943.
- [3] Colvin RA, Campanella GS, Sun J, et al. Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:30219-30227.
- [4] Fahmy NM, Yamani MH, Starling RC, et al. Chemokine and receptor-gene expression during early and late acute rejection episodes in human cardiac allografts [J]. *Transplantation*, 2003, 75:2044-2047.
- [5] Kanmaz T, Feng P, Torrealba J, et al. Surveillance of acute rejection in baboon renal transplantation by elevation of interferon-gamma inducible protein-10 and monokine induced by interferon-gamma in urine[J]. *Transplantation*, 2004, 78:1002-1007.
- [6] Kao J, Kobashigawa J, Fishbein MC, et al. Elevated serum levels of the CXCR3 chemokine ITAC are associated with the development of transplant coronary artery disease[J]. *Circulation*, 2003, 107:1958-1961.
- [7] Meyer M, Hensbergen PJ, van der Raaij-Helmer EM, et al. Cross reactivity of three T cell attracting murine chemokines stimulating the CXC chemokine receptor CXCR3 and their induction in cultured cells and during allograft rejection[J]. *Eur J Immunol*, 2001, 31:2521-2527.
- [8] Solomon MF, Kuziel WA, Simeonovic CJ. The contribution of chemokines and chemokine receptors to the rejection of fetal proislet allografts[J]. *Cell Transplant*, 2004, 13:503-514.
- [9] Hu H, Aizenstein BD, Puchalski A, et al. Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction[J]. *Am J Transplant*, 2004, 4:432-437.
- [10] Zhao DX, Hu Y, Miller GG, et al. Differential expression of the IFN-gamma-inducible CXCR3-binding chemokines, IFN-inducible protein 10, monokine induced by IFN, and IFN-inducible T cell alpha chemoattractant in human cardiac allografts; association with cardiac allograft vasculopathy and acute rejection[J]. *J Immunol*, 2002, 169:1556-1560.
- [11] Hauser IA, Spiegler S, Kiss E, et al. Prediction of acute renal allograft rejection by urinary monokine induced by IFN-gamma (MIG)[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16:1849-1858.
- [12] Burns WR, Wang Y, Tang PC, et al. Recruitment of CXCR3<sup>+</sup> and CCR5<sup>+</sup> T cells and production of interferon-gamma-inducible chemokines in rejecting human arteries[J]. *Am J Transplant*, 2005, 5:1226-1236.
- [13] Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, et al. Role of CXCL9/CXCR3 chemokine biology during pathogenesis of acute lung allograft rejection[J]. *J Immunol*, 2003, 171: 4844-4852.
- [14] Panzer U, Reinking RR, Steinmetz OM, et al. CXCR3 and CCR5 positive T-cell recruitment in acute human renal allograft rejection[J]. *Transplantation*, 2004, 78:1341-1350.

[收稿日期] 2006-02-17

[修回日期] 2006-04-26

[本文编辑] 贾泽军,邓晓群