

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00655

胆汁中趋化因子 IP-10 及其可溶性受体 CXCR3 与移植肝急性排斥反应的相关性

肖亮¹, 王全兴², 丁国善^{1*}, 傅宏¹, 倪之嘉¹, 施晓敏¹, 郭闻渊¹, 王正昕¹, 傅志仁¹

1. 第二军医大学长征医院器官移植科, 上海 200003

2. 第二军医大学基础部免疫学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:** 观察胆汁中趋化因子 IP-10 及其可溶性受体 CXCR3(sCXCR3) 的动态变化, 探讨其与移植肝急性排斥反应(AR) 的关系。**方法:** 以 2007 年 10 月~2008 年 3 月在本院行肝移植术的 28 例患者为研究对象, 按急性排斥反应发生与否分为 AR 组($n=8$)和 NAR 组($n=20$); 另选本院消化科因胆石症行鼻胆管引流(ENBD) 的患者 10 例作为对照。采用双抗体夹心 ELISA 方法检测患者移植术后第 1、3、5、7 天和激素冲击治疗第 1、3、7 天胆汁中趋化因子 IP-10 及 sCXCR3 的表达变化, 分析其与肝穿刺活检 Banff 排斥活动指数(RAI) 的相关性, 评价其对 AR 的诊断价值。**结果:** 肝移植患者术后胆汁中趋化因子 IP-10 及 sCXCR3 的表达水平逐渐升高, 术后第 5 天达到高峰, 且从第 5 天开始, AR 组患者的表达水平显著高于 NAR 组和 ENBD 组($P<0.05$); 经激素冲击治疗后, IP-10 及 sCXCR3 的表达水平明显下降($P<0.05$)。AR 确诊当日, 胆汁中趋化因子 IP-10 及 sCXCR3 的表达水平与 RAI 具有良好相关性($P<0.05$)。术后第 5 天, 截断值为 964.45 pg/ml 时, IP-10 诊断 AR 的敏感性为 87.5%, 特异性为 100%; 术后第 7 天, 截断值为 819.35 pg/ml 时, sCXCR3 诊断 AR 的敏感性为 87.5%, 特异性为 80%。**结论:** 肝移植术后早期, 胆汁中趋化因子 IP-10 及 sCXCR3 的动态变化与移植肝急性排斥反应密切相关, 有望成为 AR 早期诊断及抗排斥治疗效果的无创监测指标。

[关键词] 肝移植; 排斥反应; 趋化因子; IP-10; CXCR3

[中图分类号] R 657.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0655-04

Relationship of chemokine IP-10 and its soluble CXCR3 in bile with acute graft rejection after liver transplantation

XIAO Liang¹, WANG Quan-xing², DING Guo-shan^{1*}, FU Hong¹, NI Zhi-jia¹, SHI Xiao-min¹, GUO Wen-yuan¹, WANG Zheng-xin¹, FU Zhi-ren¹

1. Department of Liver Transplantation, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Institute of Immunology, College of Basic Medicine Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the dynamic changes of chemokine IP-10 and its soluble receptor CXCR3 in bile, and to explore its relationship with acute graft rejection (AR) after liver transplantation. **Methods:** A total of 28 patients who underwent orthotopic liver transplantation in our hospital between October 2007 and March 2008 were included in the present study. They were divided into 2 groups according to the presence of AR: AR($n=8$) and NAR($n=20$). Another 10 patients who underwent endoscopic nasobiliary drainage (ENBD) for cholelithiasis in our hospital served as controls. The levels of chemokine IP-10 and sCXCR3 in the bile were determined by ELISA assay on 1, 3, 5, and 7 days after transplantation in all the patients and on 1, 3, and 7 days after the anti-rejection therapy with glucocorticoid in patients of AR group; the relationship between their levels and the rejection active index (RAI) obtained by Banff criteria were evaluated; and its diagnostic value for AR was assessed. **Results:** The levels of IP-10 and sCXCR3 in bile gradually increased after liver transplantation and reached the peak on the 5th day after transplantation, and starting from day 5 after transplantation, their levels were significantly higher in the AR group than in the NAR group and ENBD group ($P<0.05$). Besides, the levels of IP-10 and sCXCR3 in bile were significantly decreased after treatment with glucocorticoid ($P<0.05$). On the day of AR diagnosis, the the levels of IP-10 and sCXCR3 in bile were significantly correlated with RAI ($P<0.05$). On the 5th day after transplantation, the diagnostic sensitivity and specificity of IP-10 level for AR were 87.5% and 100%, respectively (cut-off point = 964.45 pg/ml); on the 7th day after transplantation, the diagnostic sensitivity and specificity of sCXCR3 were 87.5% and 80%, respectively (cut-off point = 819.35 pg/ml). **Conclusion:** The levels of IP-10 and sCXCR3 in bile are closed related with early graft acute rejection, and their levels may serve as a non-invasive diagnostic indicator for AR and outcome of anti-rejection therapy.

[收稿日期] 2008-12-21 **[接受日期]** 2009-03-26

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目(044119614). Supported by Shanghai Committee of Science and Technology (044119614).

[作者简介] 肖亮, 博士生. E-mail: erjunda163@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873305, E-mail: dingguoshan@medmail.com

[KEY WORDS] liver transplantation; rejection; chemokine; IP-10; sCXCR3

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6): 655-658]

急性排斥反应(acute rejection, AR)是目前困扰移植界的一个难题,它常发生于术后7~14 d,其中5%~10%可能发展为慢性排斥^[1-2],而一旦确诊慢性排斥,再次移植难以避免。Tippner等^[3]发现,经有效治疗的AR患者其长期生存率甚至优于未发生AR者。故AR的早期诊治是提高移植长期存活的关键。目前临床上确诊移植肝AR仍有赖于肝穿刺活检,但该法存在很多潜在的并发症。因此,寻找和建立一种非侵袭性早期AR诊断指标具有重要的临床价值。IP-10是与免疫活化和免疫效应密切相关的趋化因子,其可溶性受体CXCR3(sCXCR3)表达于多种炎症细胞,对这些细胞的迁移、浸润、活化和效应发生起重要作用。本研究通过观察胆汁中趋化因子IP-10及sCXCR3在肝移植术后的动态变化,研究其与肝移植术后AR的发生、发展及治疗的关系,探讨其在AR早期诊断及抗排斥治疗疗效观察中的价值。

1 资料和方法

1.1 一般资料 选取2007年10月至2008年3月在我院因终末期肝病行经典原位肝移植术的住院患者30例,男25例,女5例,34~64岁,平均(42.7±3.62)岁。受体原发疾病:原发性肝癌17例,乙型肝炎后肝硬化12例,原发性胆汁性肝硬化1例。供、受体血型相同。所有肝移植患者均留置T管。根据术后临床表现、肝功能检查及肝穿刺活组织病理学检查结果,排除2例感染患者后,28例患者分为AR组8例,NAR组20例。另选择我院消化科因胆石症行鼻胆管引流(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)患者10例作为非手术对照组,其中男性8例,女性2例,平均年龄(40.56±2.03)岁。

1.2 免疫抑制治疗方案 移植患者术后均采用FK506(tacrolimus)+霉酚酸酯(MMF)+甲泼尼龙

(MP)的三联疗法。FK506剂量为0.05~0.10 mg/kg,口服,每12 h 1次,术中无肝期MP 500 mg 静脉滴注,术后第1天MP 240 mg 静脉滴注,以后每天减量40 mg,术后第7天开始口服泼尼松20 mg,肝癌患者1个月内停用激素,非肝癌患者3个月内停用激素。MMF 0.5 g,口服,每天2次。

1.3 胆汁中IP-10、sCXCR3的检测 留取所有患者肝移植术后第1、3、5、7天的胆汁2 ml,采用双抗体夹心ELISA法检测IP-10、sCXCR3的表达,试剂盒购自上海西唐生物技术有限公司,按说明书操作。AR组患者加测激素冲击治疗后第1、3、7天胆汁中上述趋化因子及受体的表达,方法同前。

1.4 肝脏穿刺活组织病理学检查 对于术后黄疸、转氨酶升高、可疑排斥的患者,行B超引导下肝穿刺活检术。标本经H-E染色镜检,根据肝小叶结构、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)^[4]。

1.5 统计学处理 采用SPSS 11.0软件对数据进行统计学处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用重复测量的方差分析法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。分析患者胆汁中IP-10、sCXCR3表达的变化与RAI的相关性;评价胆汁中IP-10、sCXCR3表达对AR的诊断价值。

2 结果

2.1 胆汁中IP-10、sCXCR3表达的变化 术后1周内,各组患者胆汁中趋化因子IP-10、sCXCR3的表达水平均明显升高,于术后第5天达到高峰,且从术后第5天开始AR组患者的表达水平与NAR组、ENBD组差异有统计学意义($P < 0.05$,图1A、图1B);AR组患者经激素冲击治疗逆转后,上述趋化因子及受体的表达均显著下降($P < 0.05$),并维持较低水平(图1C)。

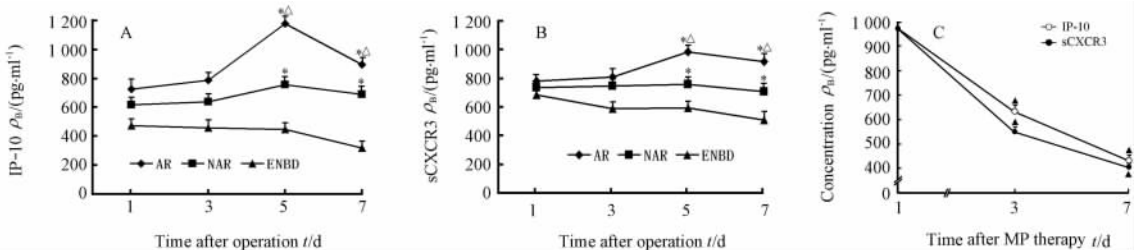


图1 移植术后各组患者胆汁中IP-10、sCXCR3表达的变化

Fig 1 Dynamic expression of IP-10 and sCXCR3 expression in bile after transplantation

A: IP-10; B: sCXCR3; C: The levels of IP-10 and sCXCR3 in the bile in AR after steroid impulse therapy AR. * $P < 0.05$ vs ENBD group; $\Delta P < 0.05$ vs NAR group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs 1 day after MP therapy. AR (n=8), NAR (n=20), ENBD (n=10); $\bar{x} \pm s$

2.2 胆汁中IP-10、sCXCR3表达与RAI的相关性 AR组患者排斥当天胆汁中趋化因子IP-10、sCXCR3的表达水平与排斥活动指数(RAI)呈正相关($r=0.892, 0.835, P<0.05$,图2)。

2.3 胆汁中IP-10、sCXCR3表达对AR的诊断价值 术后1周内,胆汁中IP-10、sCXCR3的表达水

平对诊断AR具有较好的敏感性和特异度。术后第5天,截断值为964.45 pg/ml时,IP-10诊断AR的敏感性为87.5%,特异度为100%;术后第7天,截断值为819.35 pg/ml时,sCXCR3诊断AR的敏感性为87.5%,特异度为80%(图3,表1)。

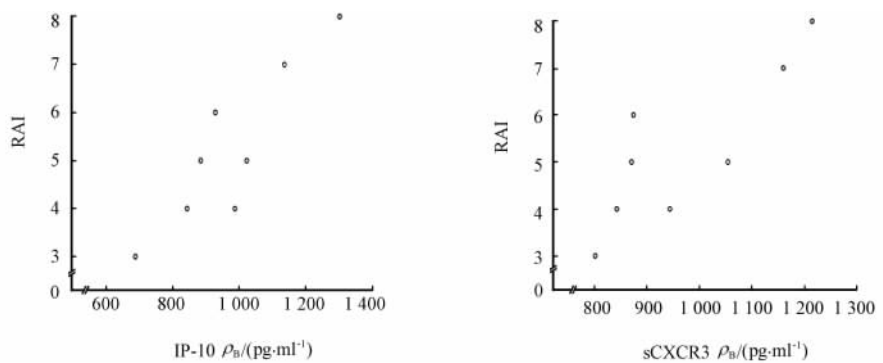


图2 AR组排斥反应发生当天胆汁中IP-10、sCXCR3的表达与RAI的相关性

Fig 2 Relationship between IP-10/sCXCR3 and RAI on the day of rejection (scatter plot)

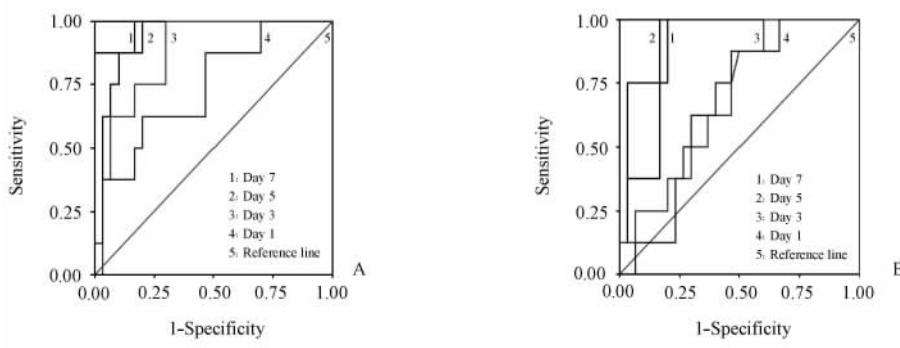


图3 胆汁中IP-10、sCXCR3表达对AR诊断价值的ROC曲线图

Fig 3 Diagnostic value of IP-10 and sCXCR3 expression in bile after transplantation(ROC curve)

A: ROC curve of IP-10 in the diagnosis of AR during the first week after transplantation; B: ROC curve of sCXCR3 in the diagnosis of AR during the first week after transplantation

表1 胆汁中IP10、sCXCR3表达诊断AR的敏感性与特异度

Tab 1 Sensitivity and specificity of IP-10 and sCXCR3 expression in the bile for diagnosis of AR

Chemokine	Time point	Diagnostic value			
		AUC(%)	Cut-off point($\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Sensitivity(%)	Specificity(%)
IP-10	d5 after transplantation	97.5	964.45	87.5	100.0
sCXCR3	d7 after transplantation	92.9	819.35	87.5	80.0

3 讨论

器官移植后急性排斥反应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。Foxman等^[5]认为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,每个阶段都有赖于趋化因子及其受体的相互作用。趋

化因子是由内皮细胞、上皮细胞和基质细胞等多种细胞分泌的单链小分子蛋白(8 000~10 000),目前分为4个家族,即CXC(或 α)、CC(或 β)、C和CX3C家族,不同的家族具有各自的结构和功能特点^[6-7]。

一系列的实验和临床研究发现,阻断趋化因子受体CXCR3(配体为IP-10、Mig、I-TAC)能减弱或阻止急性排斥反应进程,表明其在移植排斥反应机

制中具有重要作用^[8]。Panzer 等^[9]研究认为,在发生急性排斥过程中,IP-10、I-TAC 及 RANTES 可能通过结合表达在 Th1 细胞上的受体 CXCR3、CCR5 等从而诱发 T 细胞对移植物的浸润。另外,IP-10 和 CXCR3 在心脏移植免疫中的作用也得到证实^[10-11]。Hancock 等^[11]利用 IP-10 基因敲除小鼠作为同种异体心脏移植的供者或受者,发现供者心脏不表达 IP-10 能显著延长移植物的存活,而缺乏 IP-10 的受者不仅排斥供者的心脏,而且不延长移植物存活时间,这提示同种异体移植物分泌的炎性趋化因子可以直接导致急性排斥。但是,肝移植方面的相关研究相对较少。丁国善等^[12]研究认为肝移植术后血清趋化因子 Mig、IP-10、I-TAC 的表达可作为早期诊断 AR、判断疗效的潜在参考指标。

本研究结果进一步表明,肝移植后无论急性排斥发生与否,胆汁中 IP-10 及其受体 CXCR3 在手术后均升高,远高于血清中水平,且于术后第 5 天达到高峰,与各类炎性细胞浸润高峰的时间一致。这可能与术后早期移植物缺血再灌注损伤以及手术创伤等因素有关。在常规的免疫抑制治疗后 5~7 d, NAR 组 IP-10、sCXCR3 的表达下降至术前水平,但 AR 组手术 1 周后趋化因子表达始终高于 NAR 组,并在术后第 7、12、14 天分别确诊排斥的发生。通过分析胆汁中 IP-10、sCXCR3 与 RAI 的关系,发现它们呈正相关($r=0.892, 0.835, P<0.05$),即排斥反应越严重,胆汁中 IP-10、sCXCR3 表达水平越高。进一步经 ROC 曲线分析发现,两者对诊断 AR 均有很高的敏感性与特异性,有望成为 AR 的早期无创诊断指标。

另外,本研究还发现胆汁中 IP-10、sCXCR3 的持续升高也可作为免疫抑制剂剂量调整的参考指标。本研究中 AR 组 8 例患者经过激素冲击治疗后 AR 均得以逆转,胆汁中 IP-10、sCXCR3 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 的急性排斥,监测术后 1 周内胆汁中 IP-10、sCXCR3 的动态变化,对于早期诊断 AR 及判断治疗效果有一定的指导意义。

对趋化因子及其受体在移植免疫中作用机制的研究,使人们有理由相信基于趋化因子的预防、治疗排斥反应将是有效的方法之一^[13]。通过调控趋化因子及其受体的表达来阻止免疫应答的激活,也许可以达到抑制白细胞趋化、减少淋巴细胞浸润、提高排斥反应的疗效、延长移植物的存活、提高患者生活质量的目的。值得一提的是,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,因此寻找具有独特免疫学作用的趋化因子及受体显得尤为重要。

[参考文献]

- [1] Volpin R, Angeli P, Galio A, Fasolato S, Neri D, Barbazza F, 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, Navasa M, Cirera I, Grande L, et al. Acute cellular rejection in liver transplant recipients under cyclosporine immunosuppression: predictive factors of response to anti-rejection therapy[J]. *Transplantation*, 2002, 73: 1936-1943.
- [3] Tippner C, Nashan B, Hoshino K, Schmidt-Sandte E, Akimaru K, Böker K H, et al. Clinical and subclinical acute rejection early after liver transplantation: contributing factors and relevance for the long-term course[J]. *Transplantation*, 2001, 72: 1122-1128.
- [4] An International Panel. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document[J]. *Hepatology*, 1997, 25: 658-663.
- [5] Foxman E F, Campbell J J, Butcher E C. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis[J]. *J Cell Biol*, 1997, 139: 1349-1360.
- [6] Carvalho-Gaspar M, Billing J S, Spriewald B M, Wood K J. Chemokine gene expression during allograft rejection: comparison of two quantitative PCR techniques[J]. *J Immunol Methods*, 2005, 301(1-2): 41-52.
- [7] 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: 659-661. Xiao L, Fu H, Ding G S. Expression of chemokines and chemokine receptors in organ-graft rejection: recent progress[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2007, 28: 659-661.
- [8] 陈实. 移植学前沿[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 111-112.
- [9] Panzer U, Reinking R R, Steinmetz O M, Zahner G, Sudbeck U, Fehr S, et al. CXCR3 and CCR5 positive T-cell recruitment in acute human renal allograft rejection[J]. *Transplantation*, 2004, 78: 1341-1350.
- [10] Zhao D X, Hu Y, Miller G G, Luster A D, Mitchell R N, Libby P. 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] Hancock W W, Gao W, Csizmadia V, Faia K L, Shemmeri N, Luster A D. Donor-derived IP-10 initiates development of acute allograft rejection[J]. *J Exp Med*, 2001, 193: 975-980.
- [12] 丁国善, 甘树杰, 傅宏, 叶寒青, 王海梁, 倪之嘉, 等. 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[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27: 470-473. Ding G S, Gan S J, Fu H, Ye H Q, Wang H L, Ni Z J, et al. Dynamic changes of chemokines Mig, IP10, and ITAC in early diagnosis of acute rejection after liver transplantation[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2006, 27: 470-473.
- [13] Lazzeri E, Romagnani P. CXCR3-binding chemokines: novel multifunctional therapeutic targets[J]. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2005, 5: 109-118.