论著

文章编号:1000-5404(2009)09-0828-03

外周血 CXCL9 和 CXCR3 在大鼠肾移植急性排斥反应的表达及意义

李家兵,何云锋,夏 康,吴小侯 (重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨大鼠肾移植手术前后趋化因子 CXCL9 及其受体 CXCR3 mRNA 的动态变化在术后急性排斥早期诊断的作用。**方法** 以 BN 和 LEW 大鼠作为供体,LEW 大鼠作为受体,建立大鼠同种异体肾移植模型。采用 ELISA 法和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)分别动态检测大鼠术前后血清 CXCL9 和外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 的变化。同时检测血清肌酐水平。**结果** 实验组大鼠血清 CXCL9、外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 及血清肌酐表达均明显升高,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。术前实验组与对照组血清 CXCL9 和外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 表达比较无统计学差异($P>0.05$),术后第 1、3、5、7 天实验组均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。术前及术后第 1 天实验组和对照组血清肌酐表达比较无统计学差异,术后第 3、5、7 天实验组均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 血清趋化因子 CXCL9 和外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 的表达与排斥反应密切相关,可以作为早期诊断急性排斥反应的辅助敏感指标。

关键词:肾移植;急性排斥反应;趋化因子;趋化因子受体
中图法分类号:R392.4;R446.119;R692 **文献标识码**:A

Expression and significance of peripheral CXCL9 and CXCR3 in rats with acute renal allografts rejection

LI Jia-bing, HE Yun-feng, XIA Kang, WU Xiao-hou (Department of Urology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To evaluate dynamic changes of chemokine CXCL9 and chemokine receptor CXCR3 to predict the early acute rejection in rats after renal transplantation. **Methods** Renal allogeneic grafting was performed on Brown Norway or Lewis rats as donors and Lewis rats as recipients. CXCL9 in serum was measured by ELISA and CXCR3 mRNA in peripheral blood lymphocytes by RT-PCR at the time points of just before and 1, 3, 5, and 7 d after operation. Serum creatinine (Cr) was measured simultaneously. **Results** The serum contents of CXCL9 and Cr, and CXCR3 mRNA level in allograft group were significantly higher than those in isograft group ($P<0.01$). There was no significant difference on CXCL9 content and CXCR3 mRNA level in both allograft and isograft groups before operation, and the difference become significantly higher on the day 1, 3, 5 and 7 after operation in allograft group than that in isograft group ($P<0.05$). No difference was seen on the serum Cr level in allograft and isograft groups before and 1 d after operation, but the difference was observed on 3, 5 and 7 d after operation between the 2 groups ($P<0.05$). **Conclusion** Serum CXCL9 content and CXCR3 mRNA level in peripheral blood lymphocytes are sensitive predictors for the early diagnosis of acute rejection.

Key words: renal transplantation; acute rejection; chemokines; chemokine receptor

急性排斥反应是肾移植术后的主要并发症,也是导致慢性排斥反应和移植物失功的最重要的因素[1]。到目前为止肾活检仍是诊断排斥反应的金标准,但侵入性及潜在的并发症和取样误差限制了其临床的应用。许多学者都在寻求一种能够快速、准确而非侵入性的方法,希望在肾功能发生损害之前及时作出诊断和鉴别诊断。移植物进入机体后其 HLA 抗原致敏机体免疫细胞,激活的免疫细胞通过识别移植物细胞,产生多种细胞因子,引起免疫排斥反应。而细胞因子常常在排斥反应早期即被释放[2]。趋化因子是一类具有募集白细胞迁徙功能的细胞因子。趋化因子与其受体相互作用有可能成为移植免疫学界关注的热点。本实验通过观察大鼠肾移植术后血清趋化因子 CXCL9 和外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 的动态变化,研究其的动态变化与肾移植术后急性排斥的发生、发展的关

基金项目:重庆市卫生局课题(08-2-83)
Supported by Research Grant from Research Development Foundation of Health Bureau of Chongqing (08-2-83)
作者简介:李家兵,男,四川省安岳县人,博士研究生,主治医师,主要从事肾移植及泌尿系肿瘤方面的研究。E-mail:ljb309@yahoo.com.cn
通信作者:吴小侯,电话:(023)89011120
收稿日期:2008-10-21;**修回日期**:2008-12-01

系,探讨其在肾移植术后急性排斥反应早期诊断中的可能价值。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　实验动物　　近交系 Brown Norway(BN,RT1^n)和 Lewis(LEW,RT1^l)大鼠,体质量分别为 180 ~ 220 g 和 150 ~ 220 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。分别以 BN 和 LEW 大鼠作为供体,LEW 大鼠作为受体,行异体肾移植,供、受体均在术前禁食 24 h,不禁水。

1.1.2　实验器材及实验药品　　显微外科手术器械,显微手术血管夹,医用无损伤缝合线 9-0、8-0 等, 水合氯醛,肝素钠,乳酸林格液,生理盐水,抗生素(青霉素)以及碘伏消毒液等其他耗材。

1.2　实验方法

1.2.1　大鼠肾移植模型的建立　　参照 Fisher 等[3]的方法,静脉吻合技术方面上稍加改进,将供体下腔静脉内的支架管插入受体左肾静脉内,先用 9-0 无损伤血管线缝合四角,相邻两针之间分别间断缝合 2 针,最后相邻四针缝合线不打结,放松缝合线,抽去支架管, 再分别将吻合线打结。关腹前将受者的右侧肾蒂结扎,切除右肾,术后不用免疫抑制剂治疗。

1.2.2　实验分组　　分为实验组和对照组(n = 16),对照组为同基因移植组,LEW→LEW;实验组为异基因移植组,BN → LEW。另选择 8 只 LEW 分别作为对照组和实验组术前正常对照(移植 0 d)。根据移植后观察时间的不同,上述两组又各分为 4 个不同处理时间点,即 1、3、5、7 d,每组每个时间点 4 只大鼠。

1.2.3　标本获取　　2 组大鼠分别在术前(0 d),术后 1、3、5、7 d 后处死取血液及移植肾(术前对照取正常肾脏组织),血液离心,抗凝后分别待测。组织标本用 10% 的中性福尔马林固定,待行组织学检测。移植肾组织学检查:组织标本固定包埋后连续切片,分别做 HE 染色 PAS 染色、MASON 染色等。排斥强度参照 Banff 分类标准,将急性排斥反应分为:①轻度,弥漫性间质和肾小管轻度炎细胞浸润;②中度,弥漫性间质和肾小管中度炎细胞浸润;③重度,大量炎细胞浸润,动脉内膜炎,肾小管细胞坏死。趋化因子 CXCL9 检测:采用 ELISA 法检测。外周血在 4 000 r/min 离心 5 min 后取血清, -70 ℃冻存,在采集足够的样本后室温解冻,采用 ELISA 法检测大鼠外周血清中趋化因子 CXCL9(美国 R&D 公司)的含量(pg/ml)。外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 的表达:采用 RT-PCR 半定量法检测。外周血用 EDTA 抗凝后,等体积 Hanks 液稀释,密度梯度离心,分离出外周血淋巴细胞。采用 RNA 抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)严格按照说明书提取总 RNA。RT-PCR 采用一步法 RT-PCR 试剂盒(Bio Basic 公司,MMLV Single Step RT-PCR Kit)。引物序列:CXCR3 上游引物为 5′-CCAACCACAAGTGCCAAAGG-3′,下游引物为 5′- CCATAATCGTAGGGAGATGTG-3′,扩增片段为 170 bp,β-actin 引物序列:上游引物 5′-GTGGACATCCGCAAAGAC-3′, 下游引物 5′-AAAGGGTGTAACGCAATCAA-3′, 扩增片段为 302 bp。应用 Bio-Rad PCR 扩增仪,37 ℃逆转录 30 min; 94 ℃ 2 min 灭活逆转录酶,94 ℃变性 50 s, 53 ℃ 退火 30 s、72 ℃延伸 1 min 共 35 个循环,最后 72 ℃再次延伸 10 min 后降至 4 ℃结束反应。取 PCR 产物 5 μl 加 2 μl 溴酚蓝上样到 15 g/L,琼脂糖凝胶电泳。以凝胶成像分析系统测定 DNA 光密度。β-actin 作为内参照,以各实验组各电泳条带密度与相对的内参照密度之比表示相对表达量。血清肌酐采用我院生化仪统一监测,单位为 μmol/L。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 15.0 统计软件进行 t 检验及方差分析。

2　结果

2.1　移植肾组织学检查

实验组在肾移植术后 3、5、7 d 分别表现为轻、中、重度细胞免疫性损伤改变,光镜下肾间质可见炎性细胞浸润,炎细胞浸润包括淋巴细胞和单核细胞等,但以淋巴细胞为主。聚集在肾小管和毛细血管周围。肾小管上皮细胞肿胀、核固缩、坏死,小动脉管壁纤维素样坏死。对照组偶见炎性细胞,未见出血或坏死,肾间质轻度水肿,肾小管上皮细胞轻度肿胀。

2.2　实验组和对照组血清肌酐水平比较

实验组和对照组血清肌酐测定结果见表 1,实验组和对照组经多因素方差分析有统计学意义(F = 599.411,P = 0.000),术前及术后第 1 天血清肌酐水平实验组和对照组相比差异无统计学意义(P > 0.05)。实验组术后 3、5、7 d 血清肌酐水平高于对照组,2 组比较差异有统计学意义(P < 0.05)。

表 1　2 组大鼠术后不同时间血清肌酐水平比较(μmol/L,n = 4, $\bar{x} \pm s$)

组别	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
实验组	48.12 ± 4.36	60.86 ± 4.90	183.30 ± 17.75[a]	341.07 ± 47.50[a]	543.40 ± 53.88[a]
对照组	48.79 ± 4.21	55.98 ± 3.62	57.59 ± 6.63	51.09 ± 7.32	41.87 ± 4.55

a:P < 0.01,与对照组比较

2.3　2 组血清趋化因子 CXCL9 和外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 水平比较及其变化规律

实验组和对照组血清 CXCL9 和外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 水平测定结果见表 2,实验组和对照组经多因素方差分析有统计学意义(F = 62.122,P = 0.000; F = 1 735.11,P = 0.000),术前血清 CXCL9 和外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 水平实验组和对照组相比差异无统计学意义(P > 0.05),实验组术后 1、3、5、7 d 血清 CXCL9 和外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 水平高于对照组,2 组比较差异有统计学意义(P < 0.05)。

表 2　2 组大鼠术后不同时间血清 CXCL9 和 CXCR3 mRNA 表达水平比较(n = 4,$\bar{x} \pm s$)

组别	CXCL9(pg/ml)					CXCR3 mRNA				
	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
实验组	89.11 ± 13.00	320.16 ± 41.61[a]	427.02 ± 35.30[a]	416.93 ± 39.96[a]	361.07 ± 30.90[a]	0.109 ± 0.012	0.767 ± 0.088[a]	0.889 ± 0.412[a]	0.898 ± 0.053[a]	0.811 ± 0.047[a]
对照组	87.64 ± 15.32	240.17 ± 45.81	318.13 ± 16.96	312.21 ± 11.77	281.58 ± 24.02	0.116 ± 0.006	0.157 ± 0.013	0.201 ± 0.018	0.207 ± 0.021	0.177 ± 0.154

a:P < 0.01,与对照组比较

3 讨论

趋化因子及其受体对白细胞的活化，淋巴细胞的生成、游走、分化、归巢以及免疫调节均在器官移植领域中有重要意义。近年来，随着新的趋化因子及其受体的不断发现和研究其在器官移植领域中的作用越来越受到重视。目前研究表明，在移植物局部免疫微环境中，辅助性 T 细胞 Th1/Th2 免疫极化的调控作用是决定移植物最终命运的关键因素，其中 Th1 型细胞可能起主导作用[4]。Th1 细胞特征表达 CCR5、CXCR3。CXCR3 对应的配体有 CXCL9（Mig），CXCL10（IP10）和 CXCL11（I TAC），其共同特点是均可被 IFN-γ 诱生、上调[5]。CXCR3 表达于大多数外周血记忆 T 细胞表面，尤其在 Th1 细胞呈高表达，而几乎不表达于 Th2 细胞。

引起同种异体急性排斥反应的关键因素是白细胞通过内皮细胞迁移到移植物中，而白细胞进入移植物是一个依赖趋化因子的级联过程。研究表明趋化因子在此级联过程中发挥重要作用，趋化因子在器官移植早期表达异常活跃，它们特异性募集 T 细胞和抗原提呈细胞到移植组织内，激发并加剧炎症发展，致使移植物功能损害。因此动态监测趋化因子及其受体的表达状况可成为判断急、慢性排斥反应发生的重要依据，筛选出一个或多个特异性趋化因子或受体作为抗排斥治疗的新靶点对提高器官移植术后疗效有很重要的意义。甘树杰等[6]探讨了趋化因子 IP10 及其受体 CXCR3 动态变化与肝移植排斥的关系及其在早期诊断中的意义，发现血清中趋化因子 IP10 和外周血淋巴细胞 CXCR3 的表达与排斥反应密切相关，可作为诊断急性排斥反应以及观察抗排斥反应疗效的参考指标。通过研究在实验动物移植模型或者在人肾脏移植中 Mig、IP10、ITAC 等及其受体 CXCR3 的表达与急性排斥的关系，发现在急性排斥期，Mig、IP10、ITAC、CXCR3 等的表达均明显升高，预示这些趋化因子可作为预警排斥发生的参考指标[7-11]。

本研究结果显示：大鼠肾移植后各组无论急性排斥发生与否，血清中趋化因子 CXCL9 及外周血淋巴细胞趋化因子 CXCL9 的受体 CXCR3 mRNA 的表达在手术后均升高，其原因可能该阶段为抗原非特异性的免疫反应，由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引起。大鼠肾移植术后血清CXCL9 和外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 水平在实验组和对照组相比较有统计学意义，且实验组术后第 1、3、5、7 天各时间点血清 CXCL9 和外周血淋巴细胞CXCR3 mRNA 水平明显高于对照组。动态监测血清肌酐发现术前及术后第 1 天血清肌酐水平在实验组和对照组相比较无统计学意义，实验组术后第 3、5、7 天时间点明显高于对照组。研究同时发现：通过病理检查观察到对照组在术后均未发生急性排斥反应，而实验组移植后第 3 天出现了急性排斥反应的病理改变。表明大鼠肾移植术后血清中趋化因子 CXCL9 及外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 明显增强表达早于血清肌酐和组织活检证实急性排斥发生时间。提示移植术后趋化因子 CXCL9 及外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 的表达可作为急性排斥反应的参考指标。因此，监测术后血清中趋化因子 CXCL9 和外周血淋巴细胞 CXCR3 mRNA 的动态变化，对早期诊断大鼠移植肾急性排斥反应有指导意义。

参考文献：

[1] Sijpkens Y W, Doxiadis I I, Mallat M J, *et al*. Early versus late acute rejection episodes in renal transplantation[J]. Transplantation, 2003, 75(2): 204－208.

[2] 郝俊文，闵志廉. 移植肾急性排斥反应非侵入性诊断方法的研究进展[J]. 国外医学：泌尿系统分册，2004，24(1)：4－7.

[3] Fisher B, Lee S. Microvascular surgical techniques in research, with special reference to renal transplantation in the rat[J]. Surgery, 1965, 58: 904－914.

[4] Thai N L, Fu F, Qian S, *et al*. Cytokine mRNA profiles in mouse orthotopic liver transplantation. Graft rejection is associated with augmented TH1 function[J]. Transplantation, 1995, 59(2): 274－281.

[5] Cole K E, Strick C A, Paradis T J, *et al*. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3[J]. J Exp Med, 1998, 187(12): 2009－2021.

[6] 甘树杰，金 涛，丁国善，等. 趋化因子 IP10 及其受体 CXCR3 早期诊断肝移植术后急性排异[J]. 同济大学学报：医学版，2007，28(1)：44－48.

[7] Hauser I A, 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(6): 1849－1858.

[8] Burns W R, Wang Y, Tang P C, *et al*. Recruitment of CXCR3$^+$ and CCR5$^+$ T cells and production of interferon-gamma-inducible chemokines in rejecting human arteries[J]. Am J Transplant, 2005, 5(6): 1226－1236.

[9] Inston N, Drayson M, Ready A, *et al*. Serial changes in the expression of CXCR3 and CCR5 on peripheral blood lymphocytes following human renal transplantation[J]. Exp Clin Transplant, 2007, 5(2): 638－642.

[10] Panzer U, Reinking R R, Steinmetz O M, *et al*. CXCR3 and CCR5 positive T-cell recruitment in acute human renal allograft rejection[J]. Transplantation, 2004, 78(9): 1341－1350.

[11] 王书龙，张艮甫，黄赤兵. 受者外周血淋巴细胞黏附分子基因表达对肾移植急性排斥反应的预测作用[J]. 重庆医学，2006，35(16)：1441－1444.

（编辑 龙 亮）