

肝移植受者白介素-10 表达与急性排斥反应的关系研究

胡维昱 李勇 赫建帅 张永明 韩冰 吴力群

【摘要】 目的 探讨肝移植受者白介素 (interleukin, IL) -10 的表达与急性排斥反应之间的关系。方法 分别用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immune absorbent assay, ELISA) 和免疫组织化学方法检测 59 例肝脏移植受者外周血及肝穿刺组织中 IL-10 的表达情况。以有否发生急性排斥反应将受者分为急性排斥组和非排斥组; 并将非排斥组按肝功能情况分为肝功能正常组与肝功能异常组, 应用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析外周血 IL-10 诊断急性排斥反应的诊断临界点、敏感度和特异度。结果 急性排斥组外周血及肝组织中 IL-10 表达均显著低于非排斥组 (均为 $P < 0.05$)。非排斥组中肝功能正常组与异常组之间外周血及肝组织中的 IL-10 表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。IL-10 诊断急性排斥反应的临界值为 9.45 pg/ml , 敏感度为 0.591, 特异度为 0.676。结论 IL-10 的低表达提示肝脏移植受者发生急性排斥反应, 该指标可作为诊断急性排斥反应的辅助指标。

【关键词】 急性排斥反应; 白介素-10; 免疫耐受

Relationship between the expression of interleukin-10 and acute rejection in patients with liver transplantation HU Wei-yu, LI Yong, HE Jian-shuai, et al. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, China

Corresponding author: WU Li-qun, E-mail: wulq5810@126.com

【Abstract】 **Objective** To explore the relationship of expression of interleukin (IL) -10 and acute rejection in patients with liver transplantation. **Methods** The IL-10 expression in blood samples and liver biopsies from fifty-nine patients were assayed by the enzyme-linked immune absorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry methods. The recipients were divided into acute rejection group and non-rejection group according to whether acute rejection occurred. And non-rejection group was divided into normal group and abnormal group according to the liver function. The results were analyzed by receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** The expressions of IL-10 in serum and liver biopsies in the acute rejection group were significantly lower than that in non-rejection group (all in $P < 0.05$). In the group without rejection, there was no statistical difference between the normal liver function group and abnormal liver function group. The IL-10 level at 9.45 pg/ml was considered as cut-off point to diagnose liver acute rejection with a sensitivity of 0.591 and a specificity of 0.676. **Conclusion** Patients with low expression of the IL-10 are prone to suffer liver acute rejection and IL-10 level can be regarded as an auxiliary diagnosis index for acute rejection.

【Key words】 Rejection, acute; Interleukin-10; Immune tolerance

器官移植作为替代衰竭脏器功能、挽救患者生命和改善生活质量的一种有效手段, 近年来发展得很快, 其外科手术方式已日趋成熟。但是, 移植后排斥反应仍是影响器官移植进一步发展的重要问题。寻求一种非侵袭性或低侵袭性检测指标, 用于临床诊断或预测排斥反应成为器官移植领域的热

点。白介素 (interleukin, IL) -10 是由辅助性 T 细胞 (Th) 2 细胞分泌的一种细胞因子合成抑制因子, 是近 10 年来受广泛关注的一种具有多效应的细胞因子。我们应用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immune absorbent assay, ELISA) 及免疫组织化学 (免疫组化) 方法检测肝脏移植患者的外周

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2010.05.003

基金项目: 青岛市科技局课题 (06-2-2-6-nsh-1)

作者单位: 266003 青岛大学医学院附属医院肝胆外科

通讯作者: 吴力群, E-mail: wulq5810@126.com

血及肝组织中 IL-10 水平的表达,以探讨 IL-10 与人类肝移植排斥反应之间的关系。

资料和方法

一、一般资料

选择 2005 年 5 月至 2009 年 11 月在我院定期随访的术后 1~3 个月的 59 例肝移植受者作为研究对象。其中男性 51 例,女性 8 例,年龄 9~65 岁,中位年龄 45 岁,均因终末期肝病行同血型肝移植。根据临床表现(具有发热、烦躁、乏力等症状)、肝脏功能改变(血清胆红素、转氨酶升高)及肝穿刺结果(活组织病理检查提示急性排斥反应,排斥活动指数≥4 分)诊断排斥反应,并以是否确诊排斥反应进行分组^[1]。急性排斥组 22 例,非排斥组 37 例。根据肝脏功能情况,非排斥组再分为肝功能正常组 15 例;肝功能异常组 22 例。

二、方法

采集以上 59 例肝移植受者外周血标本及肝活组织样本待测。

1. 外周血 IL-10 的检测:采用 ELISA 检测外周血 IL-10 的表达,试剂盒购自上海西塘科技有限公司,应用 Bio-Rad Model 550 ELISA 检测仪(美国产),操作方法严格按说明书进行。

2. 肝活检组织标本 IL-10 表达的检测:采用免疫组化法检测。将石蜡包埋的肝脏穿刺标本切成 5 μm 厚的切片,常规脱腊、抗原热修复;滴加一抗 4℃ 过夜,按照免疫组化二步法说明书行 3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)显色、苏木素复染。并分别设立阳性和阴性对照。由两位工作人员分别计数每张切片中 3 个视野下阳性细胞数,取平均值。受检细胞有散在或弥漫分布的均质或颗粒状淡棕色沉淀物为弱阳性、棕色为阳性、深棕色为强阳性,分别记 1、2、3 分;同种细胞阳性表达率(阳性细胞数)≤10%、11%~30%、31%~70% 和 >70% 分别记 1、2、3 和 4 分。两种计分相加,总分 1~3 分为弱阳性(+),4~5 分为阳性(++),6~7 分为强阳性(+++)。

三、统计学方法

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差表示。两组间 IL-10 表达的比较采用 t 检验或χ² 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线,计算其诊断急性排斥反应的曲线下

面积,以约登指数最大者为最佳工作点,查出相应的 IL-10 的临界值作为本实验室条件下诊断急性排斥反应的临界点,计算相应的灵敏度和特异度^[2]。

结 果

一、外周血白介素-10 的表达情况

急性排斥组受者的外周血 IL-10 值明显低于非排斥组,分别为 (8.34 ± 4.34) pg/ml、(11.76 ± 6.48) pg/ml (P < 0.05)。在非排斥组中,肝功能正常组与异常组的外周血 IL-10 值比较差异无统计学意义,分别为 (12.25 ± 4.94) pg/ml、(11.14 ± 5.32) pg/ml (P > 0.05)。

二、肝组织中白介素-10 的表达情况

详见表 1。急性排斥组患者肝组织的 IL-10 表达显著低于非排斥组 (P < 0.05);在非排斥组受者中肝功能正常组与异常组之间无统计学意义 (P > 0.05)。肝穿刺活检肝组织标本和外周血的 IL-10 表达相一致,见图 1。

表 1 急性排斥组与非排斥组

分 组	n	肝组织中 IL-10 的表达 例 (%)		
		阳性表达		
		+	++	+++
急性排斥组	22	12 (55)	8 (36)	2 (9)
非排斥组	37	8 (22)	21 (57)	8 (21)
肝功能正常组	15	0	10 (67)	5 (33)
肝功能异常组	22	8 (36)	11 (50)	3 (14)

三、外周血 IL-10 的 ROC 曲线分析结果

应用 SPSS 13.0 统计软件绘制外周血 IL-10 的 ROC 曲线见图 2。结果表明,IL-10 的 ROC 曲线下面积为 0.679 (95% CI = 0.556 ~ 0.802)。IL-10 的临界值为 9.45 pg/ml,以此诊断急性排斥反应的临界点,灵敏度为 0.591,特异度为 0.676。

讨 论

IL-10 是一种具有多种生物学效应及免疫抑制效应的细胞因子,主要生物学活性如下:(1) IL-10 是促进 B 淋巴细胞分化与激活、介导体液免疫反应、Ig G 和 Ig E 类抗体生成的转换因子。(2) 抑制前炎症细胞因子的产生。(3) 抑制单核细胞表达主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) II 类抗原和辅助刺激分子。(4) 抑制 Th1 细胞的增殖以及 IL-2、IL-3、干扰素 (interferon, IFN) -γ、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) -α 以

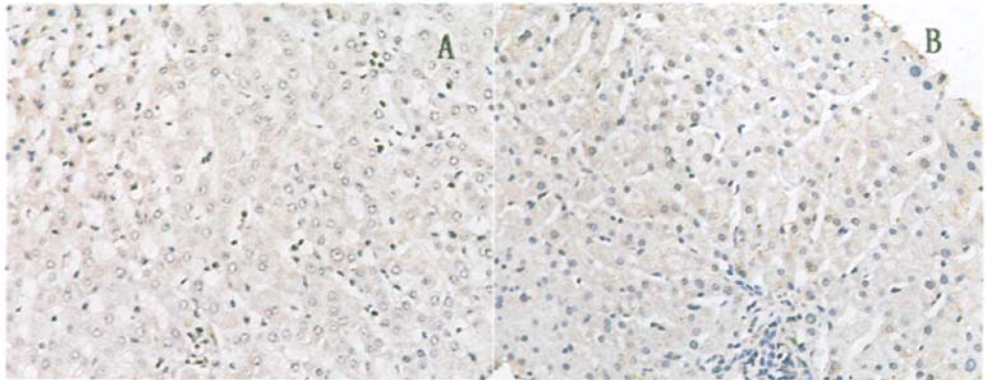


图1 肝移植受者肝组织中白介素-10的表达(免疫组化染色, ×200)

注:图1A为急性排斥组的肝组织, IL-10呈弱阳性表达;图1B为非排斥组的肝组织, IL-10呈强阳性表达

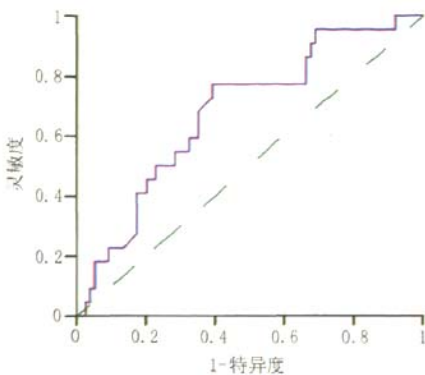


图2 外周血 IL-10 用于诊断肝移植受者急性排斥反应的 ROC 曲线

及粒-巨噬细胞集落刺激因子等细胞因子合成。(5) IL-10 还是一种负性免疫调节的细胞因子^[3,7]。

在人类移植中 IL-10 主要通过抑制 Th1 细胞的活化和 Th1 型细胞因子的产生, 诱导 Th1 向 Th2 偏移; 诱导效应性 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞表面杀伤抑制受体的表达, 上调细胞表面人类白细胞抗原 (human leucocyte antigen, HLA) -G 的表达, 从而影响活化和抑制信号的平衡^[5,6]。

众多研究证明, 在接受器官移植的患者中, 对移植物耐受良好的个体, 其 IL-10 的表达水平显著增高。为探讨 IL-10 表达与免疫耐受的关系, Shinozaki 等^[7]以携带人 IL-10 的腺病毒为载体, 通过门静脉注射到供体内, 24 ~ 48 h 后取肝进行原位肝移植, 结果移植物存活时间平均为 87 d, 而对照组仅为 11 d, 显示移植受者中 IL-10 的高表达与良好的移植耐受显著相关。

人类肝移植后急性排斥反应一般出现在移植后数日到数月内, 80% ~ 90% 出现于移植后 1 个月

内^[1]。目前关于 IL-10 的研究, 多是局限在动物实验或肾移植中。本组标本均采集于术后 3 个月内, 尽量避免了移植后时间对 IL-10 表达结果的影响。本研究结果显示, IL-10 在肝移植术后不发生急性排斥反应的受者中呈高表达, 发生急性排斥反应的受者表达相对减少, 且与受者的肝功能关系不大, 推测 IL-10 的高表达提示移植器官被受体接受。其可能机制是: IL-10 抑制炎症反应和特异性细胞免疫反应, 在获得性免疫应答中可促进诱导免疫耐受和清除功能的反应。IL-10 抑制单核细胞、巨噬细胞产生致炎介质, 导致 IL-1 β 、IL-6、IL-8、粒细胞集落刺激因子、粒-巨噬细胞集落刺激因子释放的 IFN- γ 和 TNF- β , 增强抗炎介质的产生, 如 IL-1 受体拮抗剂和可溶性 TNF- α 受体^[3,8]。IL-10 能抑制单核细胞、巨噬细胞向 T 淋巴细胞递呈抗原的能力, 这是通过下调 IFN- γ 诱导的细胞表面 MHC II 水平、共刺激分子如 CD86、黏附分子等来实现的^[9,12]。同时, IL-10 对 CD4⁺ T 淋巴细胞具有抑制效应, 能抑制其增殖及细胞因子的合成。

本研究结果支持 IL-10 的表达高低与肝移植器官急性排斥反应相关的观点, 认为 IL-10 的高表达在减轻排斥反应对移植器官的损伤中发挥作用。在本实验条件下, 外周血 IL-10 9.45 pg/ml 可以作为预测或诊断肝移植急性排斥反应的临界值。但是, 本文样本量有限, 结果还需大样本试验的进一步证实。

参 考 文 献

[1] 黄浩夫. 中国肝脏移植[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008; 631-632, 647-648.

(下转第 275 页)

测转入ICU 48 h内的TREM-1水平可对肝移植术后患者的感染情况起到预警作用,TREM-1表达水平与肝移植术后患者感染的严重性成正比,并可预测疾病转归。

参 考 文 献

- [1] Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, et al. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock[J]. *Nature*, 2001, 410 (6832): 1103-1107.
- [2] Nathan C, Ding A. TREM-1: a new regulator of innate immunity in sepsis syndrome[J]. *Nat Med*, 2001, 7 (5): 530-532.
- [3] Cohen J. TREM-1 in sepsis[J]. *Lancet*, 2001, 358 (9284): 776-778.
- [4] Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes[J]. *J Immunol*, 2000, 164 (10): 4991-4995.
- [5] Chung DH, Seaman WE, Daws MR. Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17[J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32 (1): 59-66.
- [6] Gingras MC, Lapillonne H, Margolin JF. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development[J]. *Mol Immunol*, 2002, 38 (11): 817-824.
- [7] Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, et al. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response[J]. *J Immunol*, 2003, 170 (7): 3812-3818.
- [8] Gibot S, Le Renard PE, Bollaert PE, et al. Surface triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression patterns in septic shock[J]. *Intensive Care Med*, 2005, 31 (4): 594-597.
- [9] Richeldi L, Mariani M, Losi M, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells: role in the diagnosis of lung infections[J]. *Eur Respir J*, 2004, 24 (2): 247-250.
- [10] Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Béné MC, et al. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis[J]. *Ann Intern Med*, 2004, 141 (1): 9-15.
- [11] Männel DN, Echtenacher B. TNF in the inflammatory response[J]. *Chem Immunol*, 2000, 74: 141-161.
- [12] Bishara J, Goldberg E, Ashkenazi S, et al. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 for diagnosing empyema[J]. *Ann Thorac Surg*, 2009, 87 (1): 251-254.

(收稿日期: 2010-06-06)

(本文编辑: 朱佩玲)

(上接第271页)

- [2] 刘润幸. 使用SPSS作为多变量观察值的ROC曲线分析[J]. *中国公共卫生*, 2003, 19 (9): 1151-1152.
- [3] 张栋, 高东宸. IL-10与器官移植[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2006, 12 (7): 500-502.
- [4] 陈斌, 彭荣章. IL-10与急性排斥反应[J]. *河南科技大学学报: 医学版*, 2005, 23 (3): 76-78.
- [5] 唐春华, 凌健煜. IL-10及其在器官移植中的应用[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2006, 26(6): 699-700.
- [6] 王玉亮. IL-10与肾移植排斥[J]. *透析与人工器官*, 2008, 19 (3): 35-38.
- [7] Shinozaki K, Yahata H, Tanji H, et al. Allograft transduction of IL-10 prolongs survival following orthotopic liver transplantation[J]. *Gene Ther*, 1999, 6(5): 816-822.
- [8] Zhou X, Schmidtke P, Zepp F, et al. Boosting interleukin-10 production: therapeutic effects and mechanisms[J]. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2005, 5 (4): 465-475.
- [9] Portielje JE, Lamers CH, Kruit WH, et al. Repeated administrations of interleukin (IL) -12 are associated with persistently elevated plasma levels of IL-10 and declining IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-8 responses[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (1): 76-83.
- [10] 熊德栋, 李敏. 白细胞介素10在器官移植中的作用研究进展[J]. *中国实用医刊*, 2008, 35(7): 75-77.
- [11] Karczewski M, Karczewski J, Poniedzialek B, et al. Distinct cytokine patterns in different states of kidney allograft function[J]. *Transplant Proc*, 2009, 41 (10): 4147-4149.
- [12] Oishi H, Okada Y, Kikuchi T, et al. Lipid-mediated transbronchial human interleukin-10 gene transfer decreases acute inflammation associated with allograft rejection in a rat model of lung transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2007, 39 (1): 283-285.

(收稿日期: 2010-05-26)

(本文编辑: 朱佩玲)