

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.36.007

肝移植急性排斥反应时外周血 Th17 细胞的特征及意义 *

王 英¹ 石彦超¹ 施 明^{1△} 张 敏¹ 王洪波¹孙艳玲¹ 苏海滨¹ 金 磊² 刘振文¹ 王福生²

(1 北京大学医学部解放军第 302 医院肝移植研究中心 北京 100039;

2 解放军第 302 医院肝病生物治疗中心 北京 100039)

摘要 目的:观测肝移植患者术前及术后急性排斥时外周血中 Th17 细胞频率变化特征,探讨其与肝移植术后急性排斥发生的关系。**方法:**对 18 例于我院进行肝移植手术的患者进行随访研究,应用流式细胞仪检测各随访点外周血中 Th17 细胞频率。随访期间发生急性排斥反应的患者为急排组(n=7,男女比为 5/2),未发生急性排斥反应者为非急排组(n=11,男女比为 8/3),比较两组患者肝移植前后外周血中 Th17 细胞频率的变化规律。**结果:**急排组与非急排组患者肝移植术前外周血中 Th17 细胞频率无统计学差异(P=0.672),而急排组患者发生急性排斥反应时与非急排组患者相比 Th17 细胞频率明显升高(P=0.002)。在随访研究中,急排组患者在发生急性排斥反应时外周血中 Th17 细胞频率较未发生急性排斥反应时增高,且 Th17 细胞频率与 ALT 变化趋势一致,呈明显正性相关。而非急排组患者术后随访期间外周血中 Th17 细胞频率无统计学差异。**结论:**肝移植患者术后发生急性排斥反应时外周血中 Th17 细胞频率明显升高,变化趋势与 ALT 水平一致,呈正性相关,可能成为诊断急性排斥反应的潜在指标。

关键词:肝移植;Th17 细胞;急性排斥反应

中图分类号:R657.3;R392.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)36-7030-04

Characteristics of Th17 Cells in Peripheral Blood in Liver Allograft Recipients with Acute Rejection*

WANG Ying¹, SHI Yan-chao¹, SHI Ming^{1△}, ZHANG Min¹, WANG Hong-bo¹,SUN Yan-ling¹, SU Hai-bin¹, JIN Le², LIU Zhen-wen¹, WANG Fu-sheng²

(1 Liver Transplantation Research Center, 302 Hospital of PLA, teaching hospital of Peking University Health Science Center, Beijing, 100039, China; 2 The Institute of Translational Hepatology, 302 Hospital of PLA, Beijing, 100039, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the characteristics of Th17 cells in peripheral blood in liver transplant patients, and its association with acute rejection (AR). **Methods:** 18 patients who underwent liver transplantation in our hospital were enrolled for this study. Peripheral blood was obtained from these participants longitudinally: pretransplantation, posttransplantation within 1 year's follow up, and at the time of an episode of AR to measure the frequencies of circulating Th17 cells by flow cytometry. All participants were divided into two groups: acute rejection group who suffered an AR (n=7, male/female is 5/2) during 1 year's follow up after liver transplantation, and non-rejection group who were in stable liver function (n=11, male/female is 8/3). The characteristics of circulating Th17 cells between the 2 groups were analyzed. **Results:** There were no significant difference in the levels of circulating Th17 cells in pretransplantation (P=0.672). However, the frequency of circulating Th17 cells were significantly higher in acute rejection group as compared with the non-rejection group (P=0.002). Also, the longitudinal analysis revealed that the frequency of circulating Th17 cells dramatically increased at the time in acute rejection occurrence as compared with pretransplantation (P=0.007). In addition, we found that the variation tendency of frequency of circulating Th17 cells was similar with the level of ALT. The frequency of Th17 cells was maintained stable level in non-rejection group during the follow up period. **Conclusion:** The frequency of Th17 cells in peripheral blood significantly increased in AR with a similar variation tendency for the ALT level. It would be potentially acting as a marker for AR diagnosis in liver transplantation.

Key words: liver transplantation; Th17 cells; Acute rejection

Chinese Library Classification (CLC): R657.3; R392.4 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)36-7030-04

前言

肝移植是治疗终末期肝病最有效的方法。虽然肝脏是“免

* 基金项目:国家“863”课题(2013AA020102);全军医学科技“十二五”科研项目重点课题(BWS11J075(11-15));

首都临床特色应用研究课题(Z111107058811069)

作者简介:王英(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向:肝脏移植免疫,E-mail:benbenyingwin@163.com

△通讯作者:施明,E-mail:shiming302@sina.com

(收稿日期:2014-06-18 接受日期:2014-07-12)

疫特惠器官",但仍有 30%患者术后发生急性排斥反应。急性排斥反应主要是细胞介导的免疫反应,有多种细胞参与。近年来发现,Th17 细胞为 CD4⁺T 细胞的一个新亚群,分泌细胞因子 IL-17A,在炎症应答中发挥重要作用^[1]。大量实验表明 Th17 细胞在同种异体排斥反应中发挥重要作用^[2,3]。在小鼠同种异体角膜移植早期,移植物及引流淋巴结内 Th17 细胞大量增加^[4]。而在小鼠心脏移植模型中发现,应用药物抑制 IL-17 信号通路,可以降低移植物内炎症细胞因子的产生,延长移植物存活时间^[5,6]。另外,在人类肺移植中发现,排斥反应与细胞因子 IL-17 升高有关^[7]。然而,肝移植患者术后发生急性排斥反应时外周血中 Th17 细胞的特征及意义还知之甚少。本研究主要探讨肝移植患者发生急性排斥反应时外周血中 Th17 细胞的特征及临床意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择 2010 年 4 月至 2012 年 12 月期间因终末期肝病于我院行肝移植手术患者 18 例,男女比为 13/5,平均年龄 53 ± 9 岁(41-64 岁)。入选者的血液标本采集时间为术前、术后 1-12 个月(1 次/月)以及急性排斥反应发生时。所有患者于标本采集时均没有发生感染、肝炎复发和肿瘤。入选者均签订知情同意书。此研究中,7/18 患者在随访 12 个月内(3.4 ± 2.5 月)发生急性排斥反应(急排组),11/18 患者随访期间没发生急性排斥反应(非急排组)。急性排斥反应通过临床表现结合肝组织活检病理确诊。Banff 评分为肝组织活检诊断标准。如图 1 所示,可见急性排斥反应时肝脏组织汇管区内有大量炎性细胞浸润并伴有胆管破坏。肝移植患者术后使用相同的免疫抑制剂。对于发生急性排斥反应的患者通过调整基础免疫抑制剂的强度或静脉应用糖皮质激素等,可得到满意的控制。

1.2 研究方法

所有患者于随访点时采集清晨空腹静脉血,肝素锂抗凝。随后取全血 250 μ L,依次加入 RPMI-1640(含 10%胎牛血清),终浓度为 300 ng/mL 的 PMA 和终浓度为 1 μ L/mL 的离子霉素,终体积 1 mL,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 细胞培养箱内孵育 6 小时。在孵育 1 小时后,添加 1 μ L GolgiStop 阻断蛋白质分泌。孵育完毕后 PBS 洗涤去上清,依次加入荧光抗体:CD3-APC 3 μ L,CD8-PerCP 6 μ L,避光孵育 20 min 后加入 10 倍稀释的溶血素(BD FACS Lysing Solution)2 mL,室温避光 5 min,PBS 洗涤后加入 300 μ L BD Fixation/Permeabilization,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 40 min,随后加入 1 mL 1 $\times$ BD Perm/Wash Buffer 洗涤,然后加入 IL17-PE 5 μ L 和 IFN- γ -FITC 8 μ L,避光 20 min,再用 1 mL 1 $\times$ BD Perm/Wash Buffer 洗涤后用 150 μ L 4%多聚甲醛固定,4 $^{\circ}$ C 保存,24 h 内上机检测。

1.3 统计学分析

用 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析。实验数据以平均值 $\pm$ 标准差表示,急排组与非急排组之间比较采用 Mann-Whitney U 检验,各组内患者前后点比较采用 Wilcoxon signed-rank 检验。显著性检验标准为双侧 $P < 0.05$ 。

2 结果

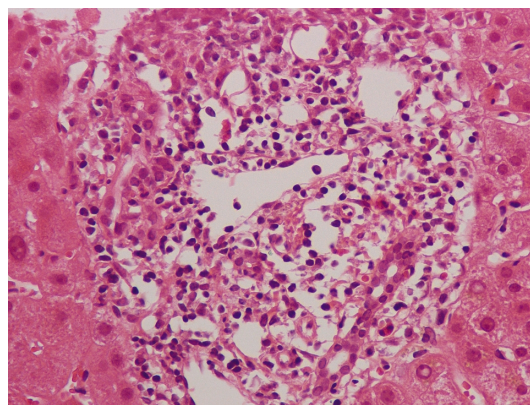


图 1 急性排斥患者肝组织病理改变示意图(HE $\times$ 40)

Fig.1 Pathological changes of liver tissues in acute rejection patients (HE $\times$ 40)

2.1 术前及术后两组 Th17 细胞频率特点

我们对入组患者术前的 Th17 细胞的频率应用流式细胞仪进行检测,急排组与非急排组术前 Th17 细胞频率分别为 $2.6 \pm 1.2\%$ 和 $2.3 \pm 1.4\%$,两组间没有统计学差异($P=0.672$,图 2A)。我们对患者术后随访的不同时间点的 Th17 细胞的频率进行检测分析,发现急性排斥反应发生时 Th17 细胞频率明显升高,急排组显著高于非急排组($P=0.002$,图 2B),且也明显高于术前的水平,随着排斥反应的消失,Th17 细胞的频率也降至术前水平(图 2C),而非急排组 Th17 细胞的频率在随访期间维持在较为稳定水平(图 2D)。

2.2 急排发生时 Th17 细胞频率与 ALT 水平的关系

我们对随访期间发生急性排斥反应患者的 Th17 细胞的频率与肝功能指标之间的关系进行了分析,结果见图 3,可见 Th17 细胞频率与肝脏功能指标 ALT 之间存在明显的相关性。图 4A 为一患者发生急性排斥反应时与急性排斥反应消失后 Th17 检测的流式图。图 4B 为急性排斥反应发生患者 Th17 细胞的频率与 ALT 水平的趋势变化图,由图可见 Th17 细胞频率在患者发生急性排斥反应时及急性排斥反应消失后,Th17 细胞频率与肝功指标 ALT 变化趋势一致,说明 Th17 细胞频率与肝脏损伤之间存在明显的相关性。

3 讨论

急性排斥反应是移植肝脏功能丧失的常见原因之一。急性排斥反应主要是受者体内幼稚 T 淋巴细胞识别移植肝内同一种异体抗原,幼稚 T 淋巴细胞成熟、增殖、分化,进而引发一系列免疫反应及效应机制,最终破坏移植肝功能的过程。急性排斥反应有多种细胞参与,包括 T 淋巴细胞、单核巨噬细胞、NK 细胞等。Th17 是一种分泌 IL-17 的 CD4⁺T 细胞,在触发炎症反应和组织损伤中发挥重要作用^[8]。近年来,Th17 细胞在移植免疫中的作用倍受关注,大量动物和临床试验表明移植排斥反应与 Th17 细胞有关^[9-11]。本研究主要观察肝移植患者发生急性排斥反应时外周血中 Th17 细胞的特征及意义。

为了研究 Th17 细胞是否与肝移植患者发生急性排斥反应具有临床相关性,我们随访分析了肝移植患者术前及术后外周

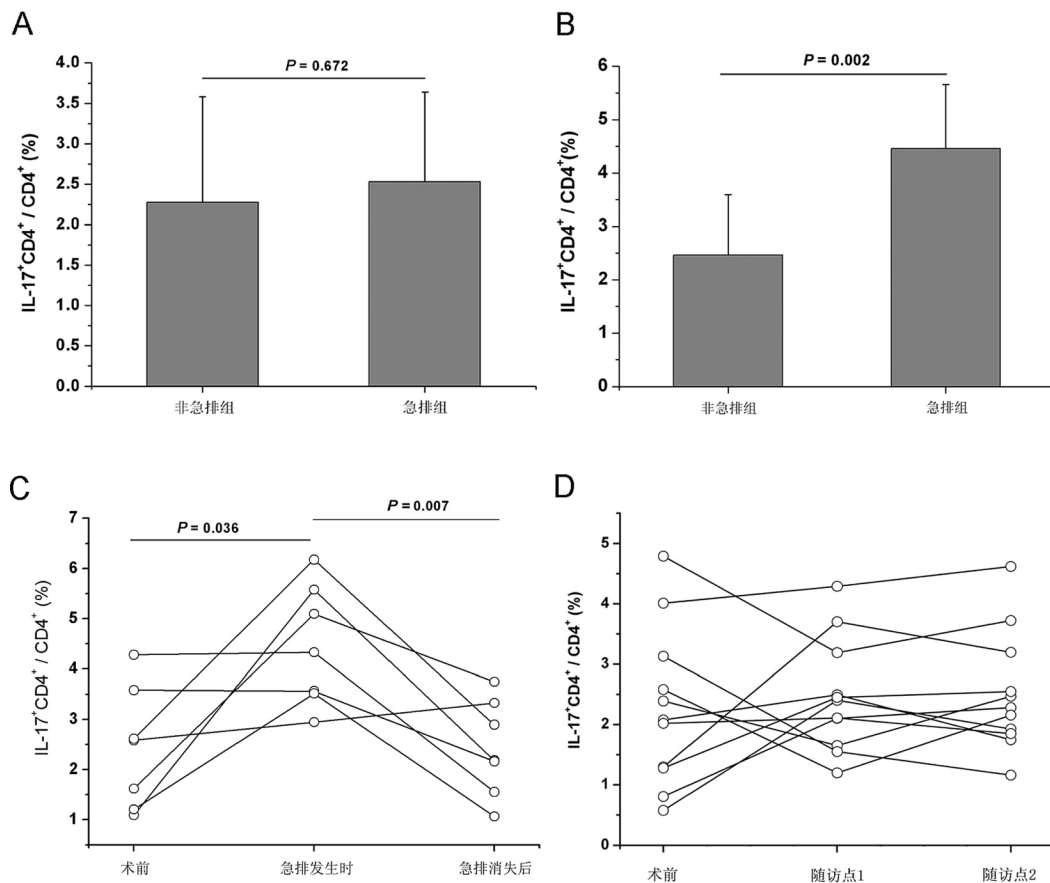


图 2 急排组与非急排组术前及术后 Th17 细胞频率

Fig.2 Th17 cells frequencies of pretransplantation and posttransplantation in acute rejection group and no rejection group

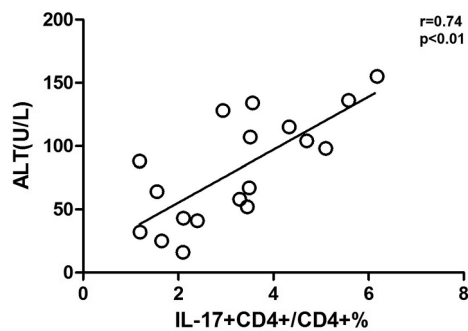
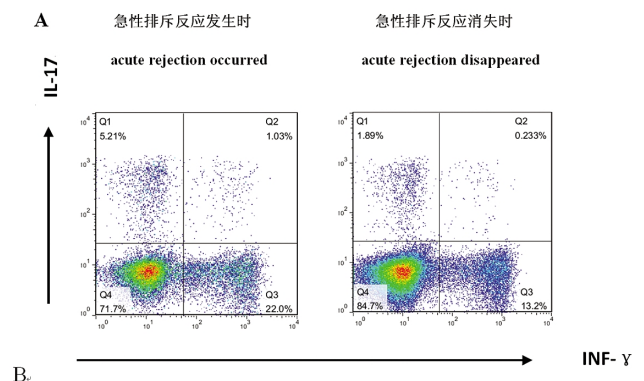


图 3 Th17 细胞频率与肝功指标 ALT 的相关性

Fig. 3 The correlation of Th17 cells frequency and ALT

血中 Th17 细胞频率的变化。肝移植术前急排组与非急排组之间患者外周血中的 Th17 细胞频率没有统计学差异, 排除了由于术前 Th17 细胞频率不同产生的影响, 术后急排组患者发生急性排斥反应时 Th17 细胞频率明显高于非急排组患者。在对两组患者进行随访研究时也发现, 急排组患者发生急性排斥反应时 Th17 细胞频率明显升高, 而非急排组患者 Th17 细胞频率一直维持在较低水平。已有研究发现同种异体肝移植的大鼠与同系肝移植大鼠相比, 外周血和肝内 Th17 细胞明显增多^[12], 可见 Th17 细胞在介导同种异体排斥反应中发挥重要作用。此外, 当其他细胞或因子诱导 Th17 细胞分化后, 可导致肝移植后急性排斥反应^[13]。另一大鼠肝移植模型中发现^[14], 发生排斥反应



B.

图 4 急排组患者随访期间 Th17 细胞频率与 ALT 水平的趋势变化

Fig.4 The longitudinal change of Th17 cells frequency and ALT in acute rejection group

的大鼠中 Th17 细胞和调节性 T 细胞之间功能失衡。Fabrega^[15]发现,肝移植患者术后发生急性排斥反应时血浆中 IL-17 水平升高。这些研究都表明 Th17 细胞可能介导肝移植后急性排斥反应的发生。在对患者进行随访中我们发现,患者术后发生急性排斥反应时 Th17 细胞频率明显升高,并与肝功指标 ALT 正相关。这提示,外周血中 Th17 细胞频率有可能作为诊断急性排斥反应的免疫学指标。由于本研究入组样本量有限,因此,以上结论尚需进一步通过多中心大样本的研究进行验证。Th17 细胞导致急性排斥反应发生的机制还不十分清楚。目前认为 Th17 细胞通过分泌大量效应性细胞因子导致组织损伤,如 TNF- α 、IL-6、IL-9、IL-21、IL-22、IL-23、IL-26 等^[16,17]。而 IL-17 为 Th17 细胞分泌的主要效应性细胞因子,不仅可以调动和激活中性粒细胞,还可以诱导表达一些炎症相关基因^[18]及分泌某些中性粒细胞趋化因子,如 CXCL1、CXCL2 和 CXCL8^[19],从而导致炎症反应发生。Itoh 等^[20]发现,当受体缺失 IL-17 时,招募的同种异体炎症性细胞明显降低。总之,之前的研究与我们的研究提示,肝移植急性排斥反应的发生可能与 Th17 细胞有关, Th17 细胞有可能作为诊断急性排斥反应发生的免疫学指标。

参考文献(References)

- [1] Miura M, El-Sawy T, Fairchild R L. Neutrophils mediate parenchymal tissue necrosis and accelerate the rejection of complete major histocompatibility complex-disparate cardiac allografts in the absence of interferon-gamma[J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(2): 509-519
- [2] Abadja F, Sarraj B, Ansari M J. Significance of T helper 17 immunity in transplantation[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2012, 17(1): 8-14
- [3] Serody J S, Hill G R. The IL-17 differentiation pathway and its role in transplant outcome [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012, 18(1 Suppl): S56-S61
- [4] Chen H, Wang W, Xie H, et al. A pathogenic role of IL-17 at the early stage of corneal allograft rejection[J]. *Transpl Immunol*, 2009, 21(3): 155-161
- [5] Yuan X, Paez-Cortez J, Schmitt-Knosalla I, et al. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(13): 3133-3144
- [6] Yuan X, Ansari M J, D'Addio F, et al. Targeting Tim-1 to overcome resistance to transplantation tolerance mediated by CD8 T17 cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(26): 10734-10739
- [7] Vanaudenaerde B M, De Vleeschauwer S I, Vos R, et al. The role of the IL23/IL17 axis in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2008, 8(9): 1911-1920
- [8] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 Cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 485-517
- [9] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 Cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 485-517
- [10] Loverre A, Divella C, Castellano G, et al. T helper 1, 2 and 17 cell subsets in renal transplant patients with delayed graft function [J]. *Transpl Int*, 2011, 24(3): 233-242
- [11] Yang J J, Feng F, Hong L, et al. Interleukin-17 plays a critical role in the acute rejection of intestinal transplantation [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(5): 682-691
- [12] Xie X J, Ye Y F, Zhou L, et al. Th17 promotes acute rejection following liver transplantation in rats[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2010, 11(11): 819-827
- [13] Xie X, Ye Y, Zhou L, et al. Kupffer cells promote acute rejection via induction of Th17 differentiation in rat liver allografts [J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(9): 3784-3792
- [14] Li J, Lai X, Liao W, et al. The dynamic changes of Th17/Treg cytokines in rat liver transplant rejection and tolerance [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(8): 962-967
- [15] Fabrega E, Lopez-Hoyos M, San S D, et al. Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation[J]. *Liver Transpl*, 2009, 15(6): 629-633
- [16] Bettelli E, Korn T, Kuchroo V K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(6): 652-657
- [17] Wilson N J, Boniface K, Chan J R, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(9): 950-957
- [18] Sparna T, Retey J, Schmich K, et al. Genome-wide comparison between IL-17 and combined TNF- α /IL-17 induced genes in primary murine hepatocytes[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 226
- [19] Ye P, Rodriguez F H, Kanaly S, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense[J]. *J Exp Med*, 2001, 194(4): 519-527
- [20] Itoh S, Nakae S, Axtell R C, et al. IL-17 contributes to the development of chronic rejection in a murine heart transplant model [J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(2): 235-240

(上接第 7014 页)

- [16] Mace LC, Yermalitskaya LV, Yi Y, et al. Transcriptional remodeling of rapidly stimulated HL-1 atrial myocytes exhibits concordance with human atrial fibrillation[J]. *Mol Cell Cardiol*, 2009, 47(4): 85-92
- [17] Sossalla S, Kallmeyer B, Wagner S, et al. Altered Na⁺ currents in atrial fibrillation effects of ranolazine on arrhythmias and contractility in human atrial myocardium[J]. *Am Coll Cardiol*, 2010, 55(21): 2330-2342
- [18] Voigt N, Li N, Wang Q, et al. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation [J]. *Circulation*, 2012, 125(17): 2059-2070
- [19] Oh S, Kim KB, Ahn H, et al. Remodeling of ion channel expression in patients with chronic atrial fibrillation and mitral valvular heart disease[J]. *Intern Med*, 2010, 25(4): 377-385
- [20] Lipworth L, Okafor H, Mumma MT, et al. Race-specific impact of atrial fibrillation risk factors in blacks and whites in the southern community cohort study[J]. *Cardiol*, 2012, 110(11): 1637-1642
- [21] Mahida S, Ellinor PT. New advances in the genetic basis of atrial fibrillation[J]. *Cardiovasc Electrophysiol*, 2012, 23(12): 1400-1406