

# Luminex 技术检测肾移植患者血清 IL-17 预测急性排斥反应的回顾性研究\*

徐翠香<sup>1a</sup>, 靳占奎<sup>1b</sup>, 王 曦<sup>2</sup>, 杨 乐<sup>3</sup>, 韩 峰<sup>4</sup>, 段万里<sup>1c</sup>, 田普训<sup>4</sup>

(1. 陕西省人民医院 a. 陕西省临床检验中心; b. 骨科; c. 泌尿外科, 西安 710068;

2. 西安市红会医院, 西安 710054; 3. 西安市儿童医院, 西安 710003;

4. 西安交通大学第一附属医院肾脏病医院肾移植科, 西安 710061)

**摘要:**目的 应用 Luminex 液相芯片技术检测肾移植患者血清 IL-17 的表达水平, 探讨其与移植肾早期急性排斥反应的关系。方法 选取 2009 年 1 月~2011 年 10 月期间 38 例肾移植患者和 20 例健康对照者; 根据预后将肾移植患者分为急性排斥组(18 例)和非排斥组(20 例), 分别检测两组肾移植患者及健康对照者血清 IL-17 的表达情况, 分析血清 IL-17 与移植肾患者发生急性排斥反应的相关性。结果 肾移植患者术前血清 IL-17 的平均水平为  $1.3 \pm 1.9$  pg/ml, 显著低于健康对照组( $6.9 \pm 8.5$  pg/ml), 差异有统计学意义( $t=3.968, P<0.001$ ); 肾移植患者急性排斥组血清在术后第 7 天 IL-17 水平为  $3.4 \pm 5.8$  pg/ml, 高于非排斥组( $0.5 \pm 0.4$  pg/ml), 差异有统计学意义( $t=2.242, P=0.031$ )。Kaplan-Meier 法生存分析显示肾移植术后非排斥反应患者血清 IL-17 高值水平的生存率显著低于低值水平( $P<0.001$ )。ROC 曲线显示, 将肾移植患者术后第 4 天与第 7 天血清 IL-17 水平联合分析, 预测其急性排斥反应的灵敏度和特异度分别为 66.67% 和 100%。结论 肾移植患者术后 4~7 天血清 IL-17 水平的动态升高趋势可预测其早期急性排斥反应发生的可能性。

**关键词:**肾移植; IL-17; 急性排斥反应

**中图分类号:**R699.2; R392.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2017)04-087-04

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2017.04.024

## Retrospective Study of Detection of Serum IL-17 for Predicting Early Acute Renal Allograft Rejection by Luminex Technique

XU Cui-xiang<sup>1a</sup>, JIN Zhan-kui<sup>1b</sup>, WANG Xi<sup>2</sup>, YANG Le<sup>3</sup>, HAN Feng<sup>4</sup>, DUAN Wan-li<sup>1c</sup>, TIAN Pu-xun<sup>4</sup>

(1a. Shaanxi Provincial Center for Clinical Laboratory; 1b. Department of Orthopedics;

1c. Department of Urology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China;

2. Xi'an Honghui Hospital, Xi'an 710054, China; 3. Xi'an Children's Hospital,

Xi'an 710003, China; 4. Department of Kidney Transplantation, Hospital of Nephropathy,

First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**Abstract:** **Objective** To detect the expression of IL-17 in renal transplant recipients by Luminex and evaluate the relationship between the level of serum IL-17 and early acute renal allograft rejection. **Methods** 38 kidney transplant recipients and healthy controls (HC, healthy volunteers,  $n=20$ ) were selected in this study from January 2009 to October 2011. All patients were divided into two groups according to their allograft outcome as acute rejection group (ARG,  $n=18$ ) and non-rejection group (NRG,  $n=20$ ). The expression of serum IL-17 was detected by Luminex technique in two groups of kidney transplant recipients and HC. To evaluate the correlation between the level of serum IL-17 and early acute renal allograft rejection. **Results** The mean level of IL-17 in all renal transplant recipients  $1.3 \pm 1.9$  pg/ml at the pre-transplantation was significantly lower than that in HC ( $6.9 \pm 8.5$  pg/ml,  $t=3.968, P<0.001$ ). The results highlighted that the level of serum IL-17 in ARG  $3.4 \pm 5.8$  pg/ml was significantly higher than that in NRG ( $0.5 \pm 0.4$  pg/ml) on the 7th days post Kidney transplantation (post-KTx,  $t=2.242, P=0.031$ ). Kaplan-Meier survival analysis showed that the probability of rejection-free survival in the higher levels group of IL-17 on the 7th days post-KTx was significant lower than that in the lower levels group ( $P<0.001$ ). The results of receiver operating characteristic curve showed that the sensitivity and specificity of the combined IL-17 to predict acute rejection were 66.67% and 100%, respectively. **Conclusion** The serum IL-17 levels in renal transplant recipients on the 4th and 7th post-KTx days can predict early renal transplant rejection.

**Keywords:** kidney transplantation; IL-17; acute rejection

器官移植领域移植物排斥反应的早期诊断十分重要, 直接关系到移植的成败, 因此学者们正积

极寻求特异、敏感的生物标记分子来预测器官移植术后的免疫状态, 生物标记分子是指可供客观测定

\* 作者简介: 徐翠香(1980—), 女, 在读博士, 主治医师, 主要从事移植免疫学研究, E-mail: xucuixiang1129@163.com。

通讯作者: 靳占奎(1982—), 男, 博士, 主治医师, E-mail: zhankui999@163.com。

和评价的一个普通生理、病理或治疗过程中的某种特征性的生化指标<sup>[1]</sup>,通过对它的测定可以获得机体当前所处的生物学过程或状态。近年来血清 IL-17 与移植物排斥反应的相关性已得到学术界的普遍认可,特别是其与急性排斥反应密切相关<sup>[2,3]</sup>。本研究再次观察了 38 例接受同种异体肾移植患者动态血清 IL-17 的水平,进一步探讨肾移植患者血清 IL-17 水平与急性排斥反应发生的关系,现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2009 年 1 月~2011 年 10 月期间在西安交通大学第一附属医院肾脏病医院肾移植科接受同种异体肾移植的 38 例患者(免疫抑制剂血药浓度在正常范围内),根据其在肾移植术后 30 天内出现移植肾排斥反应的临床表现、实验室及影像学检查、病理活检等<sup>[4]</sup>,将其分为急性排斥组(18 例,男性 10 例,女性 8 例,平均年龄  $31.9 \pm 9.0$  岁)和非排斥组 20 例(男性 11 例,女性 9 例,平均年龄  $31.5 \pm 9.8$  岁),同期健康对照组 20 例(男性 10 例,女性 10 例,平均年龄  $36.8 \pm 8.74$  岁),三组性别与年龄之间差异均无统计学意义。

1.2 试剂及仪器 MILLIPLEX<sup>®</sup>MAG 人类细胞因子和趋化因子磁珠检测试剂盒(美国密理博公司),生物安全柜(HFsafe-1200 香港 HEAL FORCE 公司),低温离心机(3K30 德国 Sigma 公司),Luminex MAGPIX<sup>®</sup>平台(美国 Luminex 公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 标本采集:分别采集晨起空腹状态下肾移植患者术前及术后 1,4,7 天和健康对照组的外周静脉血血清标本 2 ml,置于无菌管中,2 000 r/10 min 分离血清,存储于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中,避免反复冻融与强光照射。

1.3.2 Luminex 技术检测血清 IL-17 的含量:应用 MILLIPLEX<sup>®</sup>MAG 人类细胞因子和趋化因子磁珠检测试剂盒在 Luminex MAGPIX<sup>®</sup>平台(美国 Luminex 公司)检测分离血清中 IL-17 水平。按照试剂盒操作说明书及标准化程序操作。

1.4 统计学分析 采用 SPSS17.0 Windows 系统版本进行统计学分析。结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )或绝对数值表示。分析前各组数据均以 Kolmogorov-Smirnov 检验其分布特性,用 Student's *t* 检验进行两组之间的差异性检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义;采用 Kaplan-Meier 法生存分析计算肾移植患者均值并预测其非排斥反应生存率与时间的关系;用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线来分析计算肾移植

患者术后急性排斥反应发生的灵敏度与特异度,且  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 肾移植患者血清 IL-17 水平动态变化 肾移植患者(急性排斥组和非排斥组)术前 IL-17 平均水平  $1.3 \pm 1.9$  pg/ml 显著低于健康对照组( $6.9 \pm 8.5$  pg/ml),差异有统计学意义( $t = 3.968$ ,  $P < 0.001$ );急性排斥组和非排斥组的患者在肾移植术前的血清 IL-17 水平差异无统计学意义( $t = 1.824$ ,  $P > 0.05$ );同时监测肾移植患者术前末天及术后 1,4,7 天血清 IL-17 的表达水平,分别将两组间血清 IL-17 水平进行比较,见表 1。

表 1 急性排斥组与非排斥组血清 IL-17 水平的比较(pg/ml)

| 时间      | 非排斥组          | 急性排斥组         | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|---------|---------------|---------------|------------|------------|
| 术前      | $0.7 \pm 0.6$ | $1.8 \pm 2.6$ | 1.824      | 0.076      |
| 术后第 1 天 | $0.8 \pm 1.3$ | $1.6 \pm 3.5$ | 0.992      | 0.328      |
| 术后第 4 天 | $1.0 \pm 2.1$ | $1.8 \pm 3.9$ | 0.758      | 0.453      |
| 术后第 7 天 | $0.5 \pm 0.4$ | $3.4 \pm 5.8$ | 2.242      | 0.031      |

注:肾移植患者在术后第 7 天,急性排斥组与非排斥组比较,差异有统计学意义  $P < 0.05$ 。

2.2 Kaplan-Meier 法生存分析 用 Kaplan-Meier 法生存分析计算肾移植患者血清 IL-17 平均值并评价其非排斥反应生存率与时间的关系。计算所有肾移植患者在术前末天(day 0)以及术后第 1(day 1),4(day 4),7(day 7)天的血清 IL-17 平均水平,将其分为两组,血清 IL-17 水平高于平均值者为高值组,低于平均值者为低值组,比较两组在肾移植术后 30 天内非排斥生存率的差异,结果表明术后第 7 天 IL-17 高值组的非排斥反应生存率显著低于低值组( $P < 0.001$ ,见图 1)。

2.3 肾移植患者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, 简称 ROC 曲线)的统计分析 ROC 曲线评价肾移植患者术前、术后 1,4 和 7 天的血清 IL-17 水平,预测其移植术后 30 天内发生急性排斥反应的概率及意义。结果表明肾移植患者血清 IL-17 在术后第 7 天(day 7)的曲线下面积(area under curve, AUC)为 0.706,最佳临界值是  $0.98$  pg/ml,该临界值区分急性排斥反应和非排斥反应的灵敏度和特异度分别为 50.0% 和 90.0%,预测急性排斥反应差异具有统计学意义( $P = 0.007$ );其术后第 4 天(day 4)的 AUC 最大( $0.711$ , 95% CI:  $0.568 \sim 0.855$ ;  $P = 0.004$ ),最佳临界值是  $0.35$  pg/ml,该临界值区分急性排斥反应和非排斥反应的灵敏度和特异度分别为 55.6% 和 90.0%,阳性似然比为 5.56,阴性似然比为 0.49,阳性预测值为 83.3%,阴性预测值为

69.2%;其在术前(day 0)及术后第1天(day 1)预测急性排斥反应差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图2。

ROC曲线结果表明肾移植患者血清IL-17水平在术后第4天及第7天预测急性排斥反应差异

具有统计学意义,因此将其第4天与第7天的数据联合起来建立二元logistic回归模型,联合数据预测其排斥反应的AUC均大于各自单独的AUC,灵敏度和特异度分别为66.67%和100%,详见图3。

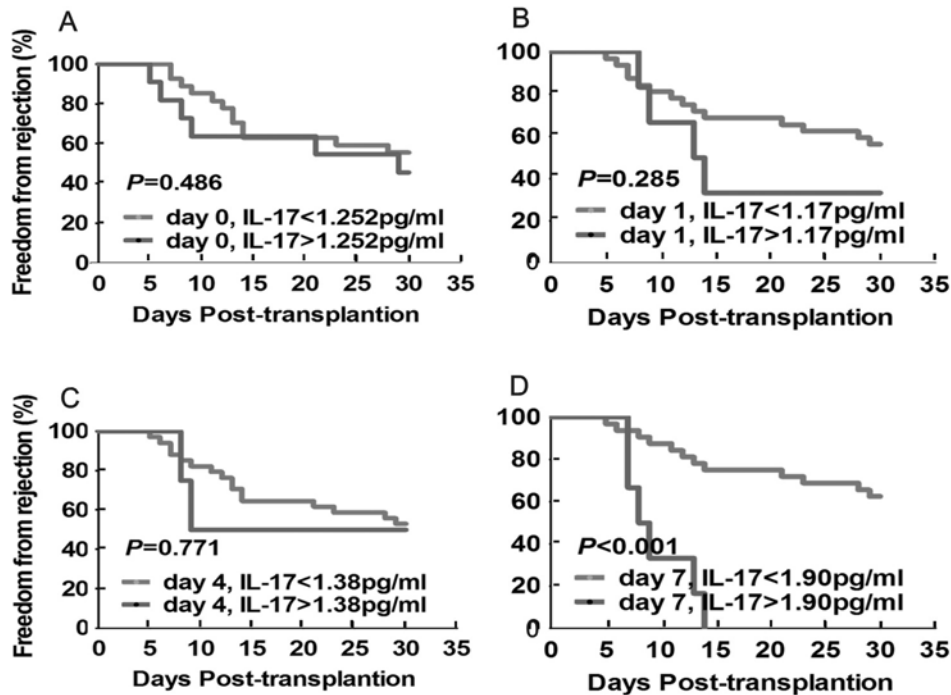


图1 Kaplan-Meier生存分析评价IL-17平均值与非排斥反应生存率的关系

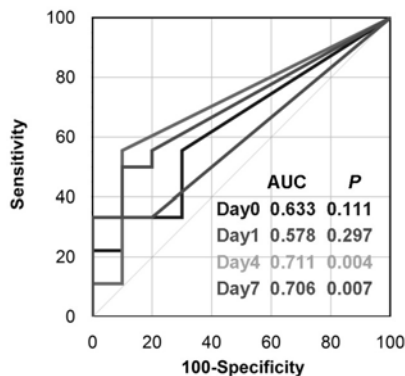


图2 ROC曲线评价IL-17预测急性排斥反应的概率及意义

3 讨论 影响肾移植成败的因素很多,术后的免疫性排斥反应是移植成功最关键和最难以控制的因素;排斥反应可发生于移植后任何时期,因此早期诊断和预防显得尤为重要<sup>[2]</sup>。近20年来,同种异基因排斥反应的免疫机制有很多研究探索,同时发现了许多具有潜在预测排斥反应功能的生物标记分子<sup>[5]</sup>。

近年来许多文献显示IL-17与移植后急性排斥反应有关<sup>[6,7]</sup>。1998年研究证明IL-17与肾同种异体移植植物急性排斥相关;阻断IL-17可以在小鼠模型中延长心脏同种异体移植植物存活<sup>[8]</sup>,IL-17可促进树突状细胞成熟,导致加速排斥<sup>[9]</sup>;在心脏同种异体移植植物中,IL-17被认为是TGF- $\beta$ 驱动同

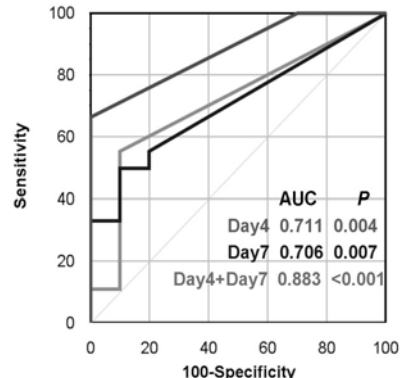


图3 肾移植患者术后第4天和第7天血清IL-17数据联合分析结果

种异体移植植物纤维化中的关键因素<sup>[3]</sup>;Duan等<sup>[10]</sup>研究表明早期高水平的IL-17通过调节树突状细胞功能介导同种异体移植排斥反应;Kimura等<sup>[11]</sup>研究认为 $\gamma\delta$ T细胞促进急性心脏同种异体移植排斥反应的机制可能是通过产生IL-17来介导的;在大鼠肾脏移植模型中发现,IL-17 mRNA在术后第2天开始升高,在术后第5天达高峰,之后逐渐下降,直至第9天达到不能检测的程度<sup>[12]</sup>;抗IL-17的融合蛋白可延长心脏移植植物的存活时间<sup>[13]</sup>;在异体皮肤移植物的急性排斥模型中<sup>[14]</sup>,以及人类的肾移植急性排斥反应尿液中和肺移植急性排斥反应的支气管肺泡灌洗液中IL-17表达均显著增高<sup>[13~15]</sup>;Tesar等<sup>[16]</sup>实验结果显示,移植实验中大

龄供受小鼠受者体内 IL-17 水平显著高于幼龄供受小鼠受者水平,其排斥反应的程度也强于幼龄小鼠,而抗 IL-17 抗体可延迟和延长移植排斥反应与移植物的存活时间;Kim 等<sup>[6]</sup>对来自肝移植患者的血清中选择的细胞因子和趋化因子作为急性排斥反应的潜在生物标志物进行了评估,发现术后 1~2 周时 IL-10, IL-17 和 CXCL10 的联合检测可预测成人肝移植急性排斥反应,具有 97% 的特异度和 94% 的敏感度;王朝晖等<sup>[17]</sup>通过研究 28 例肝移植患者,发现 IL-17 可能在肝移植后发生急性排斥反应中发挥重要作用。从这些研究可以显示 IL-17 有可能成为预测同种异体移植排斥反应潜在的最有价值的指标之一,但目前 Lindemann 等<sup>[18]</sup>在肾移植受者中进行 IL-17A ELISpot 测定,结果显示血清 IL-17A 水平在发生移植肾急性排斥反应的患者和未发生移植肾排斥反应的患者之间没有统计学差异。

本研究使用了目前移植领域用来测定生物标记分子最灵敏的 Luminex 平台<sup>[19,20]</sup>,动态观察了肾移植患者术后 30 天内血清 IL-17 水平,仅发现其术后 4~7 天血清 IL-17 水平增高趋势与急性排斥反应有一定关系。没有对患者长期随访追踪,且观察例数较少,因此还需进行多中心、大样本、长时间的研究进一步明确血清 IL-17 水平与急慢性移植排斥反应的关系。

#### 参考文献:

- [1] Buyse M, Sargent DJ, Grothey A, et al. Biomarkers and surrogate end points—the challenge of statistical validation[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2010, 7(6): 309-317.
- [2] Jafari A, Khatami MR, Dashti-Khavidaki S, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker for prediction of 3-month graft survival after kidney transplantation[J]. *Int J Organ Transplant Med*, 2017, 8(1): 17-27.
- [3] Faust SM, Lu G, Marini BL, et al. Role of T cell TGF beta signaling and IL-17 in allograft acceptance and fibrosis associated with chronic rejection[J]. *J Immunol*, 2009, 183(11): 7297-7306.
- [4] 黎磊石. 排斥反应的诊断和治疗[M]. //朱同玉. 中国肾移植手册, 香港: 华夏科学出版社, 2009: 195.
- [5] Heidt S, San Segundo D, Shankar S, et al. Peripheral blood sampling for the detection of allograft rejection: biomarker identification and validation [J]. *Transplantation*, 2011, 92(1): 1-9.
- [6] Kim N, Yoon YI, Yoo HJ, et al. Combined detection of serum IL-10, IL-17, and CXCL10 predicts acute rejection following adult liver transplantation[J]. *Mol Cells*, 2016, 39(8): 639-644.
- [7] Li T, Si Z, Qi H, et al. IL-17 in the early diagnosis of acute renal allograft rejection in mice[J]. *Journal of Central South University Medical Sciences*, 2011, 36(12): 1147-1152.
- [8] Van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME, et al. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1998, 9(8): 1526-1534.
- [9] Antonysamy MA, Fanslow WC, Fu F, et al. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection; IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors[J]. *J Immunol*, 1999, 162(1): 577-584.
- [10] Duan L, Chen J, Xia Q, et al. IL-17 promotes Type 1 T cell response through modulating dendritic cell function in acute allograft rejection[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20(2): 290-297.
- [11] Kimura N, Nakae S, Itoh S, et al. Potential role of gamma delta T cell-derived IL-17 in acute cardiac allograft rejection[J]. *Ann Thorac Surg*, 2012, 94(2): 542-548.
- [12] Witowski J, Ksiazek K, Jorres A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(5): 567-579.
- [13] Loong CC, Hsieh HG, Lui WY, et al. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection[J]. *J Pathol*, 2012, 228(2): 260.
- [14] Zheng HL, Shi BY, Du GS, et al. Changes in Th17 and IL-17 levels during acute rejection after mouse skin transplantation[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(18): 2720-2786.
- [15] Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, Wuyts WA, et al. The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation[J]. *Eur Respir J*, 2006, 27(4): 779-787.
- [16] Tesar BM, Du W, Shirali AC, et al. Aging augments IL-17 T-cell alloimmune responses[J]. *Am J Transplant*, 2009, 9(1): 54-63.
- [17] 王朝晖, 李玉中, 王增凯. Th17 细胞及白细胞介素-17 在肝移植急性排斥反应中的意义[J]. *中国微生物学杂志*, 2014, 26(5): 567-570.  
Wang ZH, Li YZ, Wang ZK. Significance of Th17 and IL-17 to acute rejection following liver transplantation [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2014, 26(5): 567-570.
- [18] Lindemann M, Konemann J, Horn PA, et al. IL-17 ELISpot as predictor for kidney allograft rejection? [J]. *Clin Lab*, 2016, 62(5): 963-965.
- [19] Mehrotra S, Sharma RK, Mayya M, et al. Luminex solid-phase crossmatch for de novo donor-specific antibodies in living-donor related transplants [J]. *Exp Clin Transplant*, 2017.
- [20] Ducreux S, Guillaud O, Bosch A, et al. Monitoring efficiency of humoral rejection episode therapy in liver transplantation: any role for complement binding Luminex Single Antigen assays? [J]. *Transpl Immunol*, 2016(35): 23-28.