

- 13-acetate [J]. Skin Pharmacol, 1991, 4(4): 262-271.
- [16] 邹国英, 蒋洪敏. 髓过氧化物酶与颅脑损伤[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(9): 977-979.
- [17] Kumar G, Dhamotharan R, Kulkarni NM, et al. Embelin reduces cutaneous TNF- α level and ameliorates skin edema in acute and chronic model of skin inflammation in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 662(1/3): 63-69.
- [18] Kadoshima-yamaoka K, Goto M, Murakawa M, et al. ASB16165, a phosphodiesterase 7A inhibitor, reduces cutaneous TNF- α level and ameliorates skin edema in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation model in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 613(1/3): 163-166.
- [19] Rodrigues Silva D, Baroni S, Svidzinski AE, et al. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of Piper ovatum Vahl (Piperaceae) [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 116(3): 569-573.
- [20] Giner RM, Villalba ML, Recio MC, et al. Anti-inflammatory glycoterpenoids from Scrophularia auriculata [J]. Eur J Pharmacol, 2000, 389(2/3): 243-252.
- [21] Lee do Y, Choo BK, Yoon T, et al. Anti-inflammatory effects of Asparagus cochinchinensis extract in acute and chronic cutaneous inflammation [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 121(1): 28-34.
- [22] Qian C, Hwang SB, Libertine-Garahan L, et al. Anti-inflammatory activities of LDP-392, a Dual PAF receptor antagonist and 5-Lipoxygenase inhibitor [J]. Pharmacol Res, 2001, 44(3): 214-220.
- [23] Garrido G, Gonzalez D, Lemus Y, et al. Protective effects of a standard extract of Mangifera indica L. (VIMANG) against mouse ear edemas and its inhibition of eicosanoid production in J774 murine macrophages [J]. Phytomedicine, 2006, 13(6): 412-418.
- [24] Young JM, Spire DA, Bedord CJ, et al. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid [J]. J Invest Dermatol, 1984, 82(4): 367-371.
- [25] Cho YS, Kim CH, Surh JH, et al. Identification of 4-[4-(4-fluorophenyl)-thiazol-2-ylamino]-2, 6-dimethyl-phenol (KR-33749) as an inhibitor of 5-lipoxygenase with potent antiinflammatory activity [J]. Pharmacology, 2010, 86(2): 65-72.
- [26] Nonato FR, Nogueira TM, Barros TA, et al. Antinociceptive and antiinflammatory activities of Adiantum latifolium Lam; Evidence for a role of IL-1 β inhibition [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(3): 518-524.
- [27] Rauh LK, Horinouchi CD, Loddi AM, et al. Effectiveness of Veronia scorpioides ethanolic extract against skin inflammatory processes [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138(2): 390-397.
- [28] Bveon SE, Chung JY, Lee YG, et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of Tabebuia avellanedae [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 119(1): 145-152.
- [29] Saraiva RA, Araruna MK, Oliveira RC, et al. Topical anti-inflammatory effect of Caryocar coriaceum Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritants [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(3): 504-510.
- [30] Gerlania OL, Laura HIL, Renata SS, et al. Modulation of topical inflammation and visceral nociception by Vanillosmopsis arborea essential oil in mice [J]. Biomed & Preventive Nutrition, 2011, 1(3): 216-222.
- [31] Clough GF, Bennett AR, Church MK. Effects of H1 antagonists on the cutaneous vascular response to histamine and bradykinin: a study using scanning laser Doppler imaging [J]. Br J Dermatol, 1998, 138(5): 806-814.
- [32] Qing TY, Ping KJ, Zhou LL, et al. Anti-inflammatory effects of aqueous extract from Radix Liriope muscari and its major active fraction and component [J]. Chin J Natural Med, 2011, 9(3): 222-226.
- [33] Marinho DG, Alviano DS, Matheus ME, et al. The latex obtained from Hancornia speciosa Gomes possesses anti-inflammatory activity [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135(2): 530-537.

(收稿日期: 2012-04-24)

• 综 述 •

肾移植急性排斥反应尿液中标志物的研究进展*

林建敏¹, 王开宇²综述, 赵 猛², 兰小鹏^{2△}审校

(1. 福建医科大学福总临床医学院, 福建福州 350001; 2. 中国人民解放军南京军区福州总医院检验科, 福建福州 350025)

关键词: 肾移植; 移移植排斥; 尿; 生物学标记; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 17. 027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)17-2104-03

虽然过去十几年间肾移植患者的生存率和移植肾脏的存活率都有显著提高, 但是相对肾移植的短期存活率, 长期存活率并没有得到明显改善, 主要由于移植后患者长期接受免疫抑制剂治疗。目前诊断急性排斥反应(AR)的金标准是肾穿刺活检^[1], 可这有一定的局限性: 费用高、侵入性穿刺、并发症风险和抽样误差等; 而且肾穿刺活检并不能完全正确反映肾功能变化^[2]。因此需要找到非侵入性的、能早期诊断 AR 的标志物, 帮助临床医生诊断患者是否发生同种免疫排斥反应, 以减少甚

至直接取消免疫抑制剂的使用, 为患者提供个性化治疗^[3]。本文将对该方面的研究进展进行综述。

1 尿液用于检测标志物

1.1 尿液的优势 体液(血液或尿液)中的小分子代谢物可作为检测肾功能和 AR 标志物的来源, 但作为一种检测 AR 的标志物的来源, 血液存在一些局限性。最近研究认为尿液是寻找非侵入性、早期诊断肾移植 AR 的有效标志物的理想来源^[4], 相对于血液, 尿液更稳定, 分析前处理更简便, 这对于减少样本

* 基金项目: 南京军区医学科学技术研究“十一五”计划课题项目(06Z47)。△ 通讯作者, E-mail: lanxp@sina.com。

的可变性非常重要,有助于标志物的发现。尿液流经肾小管上皮细胞,可携带部分脱落细胞和各种蛋白,能够很好地即时反映移植肾的情况。因此尿液可作为筛选反应肾脏生理状态和功能水平的标志物的来源。

1.2 尿液中可用指标 早期诊断对 AR 的治疗极为关键,能避免慢性排斥反应(CR)的发生和移植器官的损伤,所以找到反映 AR 早期变化的标志物非常重要。血肌酐是第一个被发现的反映移植肾功能紊乱的有效指标,但血肌酐浓度的升高只出现在排斥反应的晚期阶段,而且不能反映肾组织损伤^[5]。经多元分析已发现肾移植 AR 不同阶段的尿液蛋白存在着微妙的变化,这种蛋白组学信号有望用于 AR 的早期诊断。Quintana 等^[6]发现了 3~5 种与 AR 相关的尿液中蛋白可用于诊断肾移植 AR,且具有较高的敏感性和特异性。不少实验室也证实尿细胞中多种物质与肾移植 AR 有着直接关系^[7],其中包括尿细胞 mRNA、miRNA、人类白细胞抗原(HLA-DR)、穿孔素、颗粒酶 B、 γ -干扰素(IFN- γ)、趋化因子等。这些尿液蛋白与细胞 mRNA 均可用于 AR 的诊断。

2 尿液来源的急性排斥反应相关标志物

2.1 尿液可溶性人类白细胞抗原 HLA-DR 属于 II 型主要组织相容性复合物(MHC)糖蛋白。在 AR 时,尿液中可溶性 HLA-DR 由细胞因子诱导肾小管上皮细胞产生,并且在抗原提呈及 T 细胞识别抗原过程中起着关键的作用,主要参与 CD4⁺ T 细胞的免疫反应。有关研究发现,ELISA 检测 AR 患者尿液可溶性 HLA-DR 水平显著高于健康对照组或者与移植肾功能稳定者;并且尿液可溶性 HLA-DR 可以在 AR 临床症状发生前 5 d 即可被检出,其用于预测移植肾发生 AR 的灵敏性达 80%、特异性高达 98%^[8]。因此,尿液可溶性 HLA-DR 可以作为一种早期诊断肾移植 AR 的标志物。

2.2 特异性尿多肽 过去几年由于质谱技术的进步使得尿蛋白组学的研究成为可能。各种质谱技术都可以用于尿蛋白的研究,包括双向电泳质谱法(2DE-MS)、液相色谱质谱法(LC-MS)、毛细管电泳质谱法(CE-MS)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)、表面增强激光解吸离子飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)等。Schaub 等^[9]利用 SELDI-TOF-MS 分析 AR 患者尿液蛋白发现,质荷比(m/z)在 5 270~5 550、7 050~7 360 以及 10 530~11 100 处有明显的波峰。另外,在这些波峰处发现存在 β 2 微球蛋白的裂解产物,随即对这些裂解产物排序获得了整个 β 2 微球蛋白的蛋白序列。Johnston 等^[10]利用 SELDI-TOF-MS 技术发现 CR 患者尿液中出现相对分子质量大小为 11.7×10^3 的蛋白的峰,并被证实为 β 2 微球蛋白。提示 β 2 微球蛋白与肾移植排除反应有密切关系,值得进一步研究与 AR 的关系。运用 LC-MS 对 50 例发生肾移植 AR 患者的尿液进行检测,还发现一些特异性多肽与排斥反应相关,这些多肽分别属于胶原蛋白家族和尿调节素(UMOD)^[11]。Sigdel 等^[12]运用 LC-MS 将发现的多肽与国际蛋白数据库(IPI)比对,其中就包括尿调节素,经 ELISA 对其检测发现 AR 患者尿液中尿调节素较健康对照组明显降低。而三种胶原蛋白的基因表达在发生 AR 的患者与未发生者相比则显著升高^[11]。提示选择性尿多肽分析具有诊断 AR 价值,而且尿多肽分析比其他样本更容易,等量的尿多肽能够比其他标本提供更多的寻找标志物的信息^[13]。

2.3 辅助性 T 细胞 1(Th1)相关的黏蛋白结构域蛋白 3(TIM-3)和 IFN- γ TIM-3 是一种选择性表达在分化的 Th1 细胞表面的 I 型膜蛋白,由 T 细胞免疫球蛋白可变区结构域和黏蛋

白结构域组成^[14]。TIM-3 与自身免疫病、诱导免疫耐受和 Th1 细胞对免疫反应的调节相关^[15]。IFN- γ 生物学活性包括促进 Th0 细胞分化为 Th1 细胞,并抑制 Th2 细胞增殖等。利用 RT-PCR 检测 30 例肾移植 AR 患者、30 例肾移植后无 AR 及 12 例肾功能稳定患者尿细胞中 TIM-3 和 IFN- γ mRNA 发现,AR 组、TLM-3 和 IFN- γ mRNA 水平相比其他两组有显著升高^[16],提示 TIM-3 和 IFN- γ mRNA 检测作为检测 AR 标志物具有一定价值。

2.4 趋化因子 趋化因子参与肾移植 AR 的机制与其受体募集淋巴细胞和单核细胞到达感染部位相关,目前已有 CF 及其受体的功能多态性与 AR 高敏感性相关的报道^[17]。依赖 IFN- γ 诱导的 CF 包括 IFN- γ 诱导蛋白-10(IP-10 或 CXCL10)和 IFN- γ 诱导的单核细胞因子(MIG 或 CXCL9)的受体都是 CXCR3,而 CXCR3 也是介导 Th1 细胞募集的受体,其中 CXCR3A 主要分布在 Th1 效应 T 细胞、细胞毒性 CD8⁺ T 细胞、活化的 B 细胞和自然杀伤(NK)细胞上,介导单核细胞和淋巴细胞的趋化运动。CXCL 9 和 CXCL10 通过募集表达 CXCR3 的活化 T 细胞与受体 CXCR3 结合能引发和促进 Th1 型免疫反应,故 CXCL 9 和 CXCL10 能有效地趋化并活化表达 CXCR3 的免疫效应细胞。移植肾穿刺免疫组化样本分析表明 CXCR3 阳性细胞出现与 AR 密切相关^[18]。尿液中的 CXCL9 和 CXCL10 在肾穿刺发现 AR 前 5 d 就明显升高,并且在 AR 治疗后降低^[19-20]。同时尿细胞趋化因子与趋化因子受体 mRNA 水平也和肾移植 AR 相关^[21],提示 CXCL9 和 CXCL10 及其趋化因子受体 CXCR3 的 mRNA 检测也可用于预测 AR。

2.5 尿细胞中 Foxp3 mRNA 叉头状/翅膀状螺旋转录因子(Foxp3)是调节性 T 细胞(Treg)特异性表达的转录因子,是 Treg 的独特标志之一。新的研究还发现,Foxp3⁺ Treg 可以下调抗原递呈细胞递呈能力,使它们不能激活效应性 T 细胞^[22]。另外,Foxp3⁺ Treg 经过 T 细胞受体(TCR)介导信号刺激活化过程中,还分泌 IL-10 和 TGF- β 细胞因子,以抗原非依赖性方式抑制 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 细胞来发挥抑制作用。

Bozulic 等^[23]利用 Foxp3 和 CD4 的荧光标记的单克隆抗体在激光共聚焦显微镜下计数 Foxp3⁺ Treg,发现在混合组织移植的嵌合鼠中,免疫耐受的小鼠移植组织 Foxp3⁺ Treg 浸润明显,而发生 AR 的小鼠则没有浸润。另一实验也表明 Foxp3⁺ Treg 在阻止移植损伤,诱导免疫耐受和免疫反应的终止起重要作用^[24]。同时移植功能研究分析发现存在 Foxp3⁺ Treg 的患者移植后 2~3 年移植肾功能明显比不存在 Foxp3⁺ Treg 的要好^[25]。Martin 等^[26]发现在 AR 的移植肾组织中,Foxp3⁺ Treg 数量增多提示预后良好。由此可推测肾移植 AR 患者尿液中细胞 Foxp3⁺ mRNA 表达水平将存在改变,将是很好的检测肾移植 AR 的标志物,有研究指出它的敏感性和特异性都高达 100%^[21]。

2.6 miRNA miRNA 是一种短小的非编码 RNA,大约 20~22 个核苷酸大小,由 miRNA 前体经 Dicer 酶(一种 RNase III)加工而成。在 AR 发生时,miRNA 能调控大量基因的表达,其中就包括免疫耐受基因,所以移植肾在 AR 时表达 miRNA 的量将发生显著改变^[27]。Lorenzen 等^[28]利用 RT-PCR 对 62 例 AR 患者尿液中相关 miRNA 进行定量检测,发现 miR-10b 和 miR-210 在 AR 发生时降低,miR-10a 升高。进一步研究发现只有 miR-210 表达量在 AR 和对照组以及同一患者移植前后有差别,所有 miR-210 可能成为一种新的诊断肾移植 AR 的标志物。

3 结 语

近年来,随着细胞生物学和分子生物学技术的进步,免疫应答研究提高到了分子水平,使得肾移植 AR 标志物研究突飞猛进;蛋白质组学、mRNA 和 miRNA 检测技术的应用为寻找肾移植 AR 标志物开辟了新途径。文中提到的 $\beta 2$ 微球蛋白、尿液细胞中 CXCR3 和 Foxp3⁺ mRNA、miR-210 等就是这些研究的初步成果,有望成为诊断肾移植 AR 的理想标志物。不过这些标志物用于诊断肾移植 AR 的有效性仍需大量的临床实验验证,有待研究人员的不懈努力。

参考文献

[1] Freue GV, Sasaki M, Meredith A, et al. Proteomic signatures in plasma during early acute renal allograft rejection[J]. Mol Cell Proteomics, 2010, 9(9):1954-1967.

[2] Sui W, Huang L, Dai Y, et al. Proteomic profiling of renal allograft rejection in serum using magnetic bead-based sample fractionation and MALDI-TOF MS[J]. Clin Exp Med, 2010, 10(4):259-268.

[3] Bestard O, Cruzado JM, la Franquesa M, et al. Biomarkers in renal transplantatio[J]. Curr Opin Organ Transplant, 2010, 15(4):467-473.

[4] Caubet C, Lacroix C, Decramer S, et al. Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery in pediatric renal disease [J]. Pediatr Nephrol, 2010, 25(1):27-35.

[5] Liang SL, Clarke W. Urine proteomic profiling for biomarkers of acute renal transplant rejection[J]. Methods Mol Biol, 2010, 641:185-191.

[6] Quintana LF, Banon-Maneus E, Solé-Gonzalez A, et al. Urine proteomics biomarkers in renal transplantation: an overview [J]. Transplantation, 2009, 88(3):S45-49.

[7] Anglicheau D, Suthanthiran M. Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns[J]. Transplantation, 2008, 86(2):192-199.

[8] Christiaans MH, Nieman F, van Hooff JP, et al. Detection of HLA class I and II antibodies by ELISA and complement-dependent cytotoxicity before and after transplantation[J]. Transplantation, 2000, 69(5):917-927.

[9] Schaub S, Wilkins JA, Antonovici M, et al. Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts [J]. Am J Transplant, 2005, 5(4):729-738.

[10] Johnston O, Cassidy H, O'Connell S, et al. Identification of $\beta 2$ -microglobulin as a urinary biomarker for chronic allograft nephropathy using proteomic methods[J]. Proteomics Clin Appl, 2011, 5(7/8):422-431.

[11] Ling XB, Sigdel TK, Lau K, et al. Integrative urinary peptidomics in renal transplantation identifies biomarkers for acute rejection [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(4):646-653.

[12] Sigdel TK, Kaushal A, Gritsenko M, et al. Shotgun proteomics identifies proteins specific for acute renal transplant rejection[J]. Proteomics Clin Appl, 2010, 4(1):32-47.

[13] Sigdel TK, Ling XB, Lau K, et al. Urinary peptidomic analysis identifies potential biomarkers for acute rejection of renal[J]. Clin Proteom, 2009, 5(2):103-113.

[14] Manfro RC, Aquino-Dias EC, Joelsons G, et al. Noninvasive Tim-3

messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction [J]. Transplantation, 2008, 86(12):1869-1874.

[15] Khademi M, Illes Z, Gielen AW, et al. T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3(TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis[J]. Immunol, 2004, 172(11):7169-7176.

[16] Renesto PG, Ponciano VC, Cenedeze MA, et al. High expression of Tim-3 mRNA in urinary cells from kidney transplant recipients with acute rejection [J]. Am J Transplant, 2007, 7(6):1661-1665.

[17] Gorgi Y, Sfar I, Jendoubi-Ayed S, et al. Allograft renal rejection and chemokine polymorphism[J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2011, 22(1):18-23.

[18] Hauser IA, 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.

[19] Hu H, Kwun J, Aizenstein BD, et al. Noninvasive detection of acute and chronic injuries in human renal transplant by elevation of multiple cytokines/chemokines in urine [J]. Transplantation, 2009, 87(12):1814-1820.

[20] Jackson JA, Kim EJ, Begley B, et al. Urinary chemokines CXCL9 and CXCL10 are noninvasive markers of renal allograft rejection and BK viral infection[J]. Am J Transplant, 2011, 11(10):2228-2234.

[21] Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M, et al. Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts[J]. Curr Opin Organ Transplant, 2010, 15(1):35-41.

[22] Paust S, Lu L, McCarty N, et al. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(28):10398-10403.

[23] Bozulic LD, Wen Y, Xu H, et al. Evidence that FoxP3⁺ regulatory T cells may play a role in promoting long-term acceptance of composite tissue allotransplants[J]. Transplantation, 2011, 91(8):908-915.

[24] de Boer OJ, Teeling P, Jansen M, et al. Spatial differences in the presence of FOXP3⁺ and GranzymeB⁺ T cells between the intra- and extravascular compartments in renal allograft vasculopathy [J]. PLoS One, 2011, 6(4):e18656.

[25] Bestard O, Cruzado JM, Rama I, et al. Presence of FoxP3⁺ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(10):2020-2026.

[26] Martin L, Funes de la Vega M, Bocrine O, et al. Detection of Foxp3⁺ cells on biopsies of kidney transplants with early acute rejection[J]. Transplant Proc, 2007, 39(8):2586-2588.

[27] Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(13):5330-5335.

[28] Lorenzen JM, Volkmann I, Fiedler J, et al. Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients[J]. Am J Transplant, 2011, 11(10):2221-2227.