

## 补体 C5a 对肾移植排斥反应中 IL-17 产生的调节作用\*

李蜀婧, 郑权友, 袁刚, 霍文谦, 张克勤<sup>△</sup>

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科, 重庆 400042)

**摘要:**目的 探讨肾移植排斥反应中促炎性细胞因子白细胞介素 17(IL-17)和补体活化产物 C5a 的表达情况,以及 C5a 对 IL-17 表达的可能调节作用。方法 流式细胞术(FCM)检测肾移植患者外周血中 IL-17<sup>+</sup>T 细胞的频率和 C5a 刺激后人肾小管上皮细胞系中的 HK2 细胞 IL-17 的表达情况;ELISA 检测肾移植患者血清 C5a 水平的变化;免疫组织化学检测并比较正常肾组织和发生排斥反应移植肾组织中 IL-17 的表达和补体 C5b-9 的沉积;免疫细胞化学检测 HK2 细胞在重组 C5a 刺激前、后 IL-17 表达的差异。结果 同种异基因肾移植术后,肾移植患者外周血中 IL-17<sup>+</sup>T 细胞百分率明显升高,患者血清 C5a 水平较术前显著增加( $P < 0.01$ );发生排斥反应的肾组织中 IL-17 表达与 C5b-9 的沉积较正常肾脏组织均有明显的上调,二者呈正相关;加入重组的 C5a 刺激后,HK2 细胞 IL-17 的表达水平显著上调。结论 肾移植排斥反应中补体活化产物 C5a 可能对 IL-17 的产生起正向调节作用。

**关键词:**补体 C5a;白细胞介素 17;肾移植;移植排斥

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.11.018

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)11-1331-04

## Regulation effect of complement C5a on interleukin-17 during renal allograft rejection\*

Li Shujing, Zheng Quanyou, Yuan Gang, Huo Wenqian, Zhang Keqin<sup>△</sup>

(Department of Urology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of proinflammatory cytokine interleukin-17(IL-17) and complement cleavage fragment C5a and the regulation effect of C5a on the expression of IL-17 during renal allograft rejection. **Methods** The frequency of IL-17<sup>+</sup>T cell in peripheral blood and the expression of IL-17 in renal tubular epithelial cells(HK2) after C5a stimulation in renal transplant recipients were measured by flow cytometry and the changes of serum C5a level was detected by ELISA, respectively. Immunohistochemistry was applied to detect and compare the expression of IL-17 and the deposition of C5b-9 in normal renal tissues and renal tissues with allograft rejection. The difference of IL-17 expression in HK2 cells before and after the recombinant C5a stimulation was detected by immunocytochemistry. **Results** Both the percentage of IL-17<sup>+</sup>T cells and serum C5a levels were significantly increased after the allogeneic renal transplantation. Compared with normal renal tissues, both the deposition of C5b-9 and the IL-17 expression in renal tissues with allograft rejection was remarkably up-regulated, which showed the positive correlation between them. The expression of IL-17 in HK2 was obviously up-regulated by the recombinant C5a stimulation. **Conclusion** C5a may positively regulate the expression of IL-17 by tubular epithelial cells during the renal allograft rejection.

**Key words:** complement C5a; interleukin-17; kidney transplantation; graft rejection

白细胞介素 17(interleukin-17, IL-17)是一种重要的促炎性细胞因子<sup>[1-2]</sup>,除了 CD4<sup>+</sup>T 亚群外,其他许多细胞亚群如: CD8<sup>+</sup>T 亚群, 细胞和中性粒细胞等均可分泌 IL-17<sup>[3]</sup>。有研究显示,IL-17 在器官移植术后急、慢性排斥反应中有着重要的作用<sup>[4-6]</sup>。同时,在移植排斥反应中,移植抗原与抗体结合可激活补体系统。作为补体系统的枢纽分子,C5 被激活后可裂解形成 C5a 和 C5b。C5a 是一种重要的炎症介质和趋化因子,通过与靶细胞表面 C5aR 的结合,发挥其生物学效应<sup>[7]</sup>。尽管补体在移植排斥中的重要作用已有不少报道<sup>[8-9]</sup>,但对于小分子 C5a 在临床移植排斥中的作用机制并不清楚。本研究检测了同种异基因肾移植术前、后外周血以及发生移植排斥反应肾组织中 IL-17 和 C5a 的表达变化,并探讨 C5a 对肾小管上皮细胞 IL-17 表达的调节作用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2012 年 1 月至 2013 年 12 月在本院泌尿外科接受同种异基因肾移植手术的患者 20 例,其中男 11 例,女 9 例;年龄 24~58 岁,平均(40.61±2.21)岁。移植肾组织标本来源于同期临床诊断为排斥反应的肾组织标本 10 份及无排斥反应的正常肾组织标本 5 份。

## 1.2 方法

**1.2.1 流式细胞术(FCM)检测** FCM 检测接受同种异体肾移植患者外周血中 IL-17<sup>+</sup>T 细胞的比例和 C5a 刺激后人肾小管上皮细胞系中的 HK2 细胞 IL-17 的表达情况。外周血中 IL-17<sup>+</sup>T 细胞的检测:分别在肾移植手术前(即 0 h)及术后 3、7 d,抽取患者静脉血 4 mL,EDTA-Na 抗凝处理。将抗凝血用 PBS 倍比稀释后,缓慢加入预加有 2 mL 人外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋生物)的离心管中,2 000 r/min 离心 20 min,收集单个核细胞层。在含乙酰肉豆蔻佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)50 ng/mL、蛋白转运阻断剂(brefeldin A, BFA)10 g/mL 和离子霉素(ionomycin)500 ng/mL 的 RPMI1640 完全培养基中培养 4 h 后,收集细胞,加入别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)-抗人 CD3(Biolegend)进行表面染色,然后依次用 4%多聚甲醛固定细胞 15 min,0.1%的皂素通透破膜 20 min,再加入藻红蛋白(phycoerythrin, PE)-抗人 IL-17A(Biolegend)冰上避光反应 30 min,FCM 检测各样品 CD3<sup>+</sup>亚群中 IL-17<sup>+</sup>T 细胞的百分率。C5a 刺激后 HK2 细胞 IL-17 的表达检测:HK2 细胞以 8×10<sup>3</sup> 个/孔接种于 24 孔细胞培养板中,贴壁 6~8 h;无血清培养基饥饿 24 h 后,加入 200 ng/mL 重组

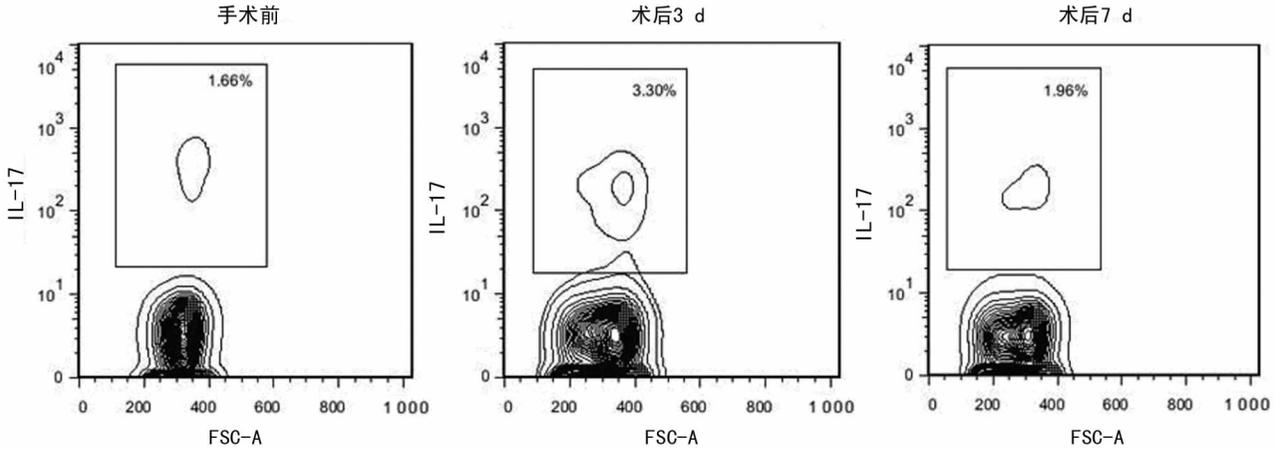


图1 同种异基因肾移植手术前、后患者外周血中 IL-17<sup>+</sup> T 细胞百分率比较

人 C5a(Hycult biotech)刺激 48 h;收集细胞,按照上述方法进行染色,FCM 检测各处理组细胞 IL-17 的表达情况。

1.2.2 ELISA 技术检测接受同种异体肾移植患者血清 C5a 的水平 采用 BD 公司的人 C5a ELISA 检测试剂盒,按照说明书测定血清 C5a 水平。

1.2.3 免疫组织化学和免疫细胞化学分别检测组织及细胞中 IL-17、C5b-9 及 C5aR 的表达 免疫组织化学:肾脏组织标本常规方法进行石蜡包埋、切片;组织切片脱蜡水化后,0.01 mol/L 柠檬酸钠微波法抗原修复,然后用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去除内源性过氧化物酶;加入兔抗人 IL-17 多克隆抗体(SANTA CRUZ)和兔抗人 C5b-9 多克隆抗体(Abcam);第二步法免疫组织化学检测试剂盒(抗兔)PV-9000(中杉金桥)进行后续染色;DAB 试剂盒(中杉金桥)显色后苏木素复染;脱水透明后中性树胶封片,拍片。免疫细胞化学:HK2 细胞以 8×10<sup>3</sup> 个/孔接种于放有盖玻片的 24 孔细胞培养板中,贴壁 6~8 h;无血清培养基饥饿 24 h 后,加入 200 ng/mL 重组人 C5a(Hycult biotech)刺激 48 h;取出细胞爬片,4%多聚甲醛固定,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去除内源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭;加入兔抗人 IL-17 多克隆抗体(SANTA CRUZ)和兔抗人 C5aR 单克隆抗体(Abcam);即用型免疫组织化学超敏(UltraSensitive™)SP(抗兔)试剂盒(福州迈新)进行后续染色;DAB 试剂盒(中杉金桥)显色后苏木素复染;中性树胶封片后拍片。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,统计分析采用非配对的 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

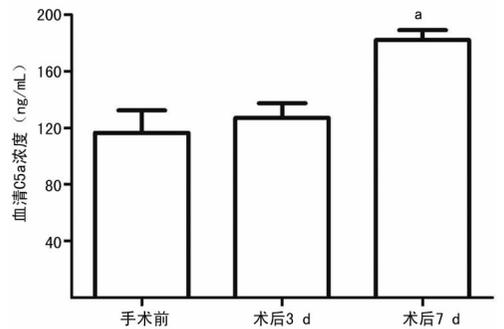
2 结 果

2.1 同种异体肾移植手术前、后患者外周血细胞中 IL-17<sup>+</sup> T 细胞百分率比较 对患者外周血淋巴细胞进行 FCM 的检测,结果表明,接受同种异体肾移植患者外周血标本中,部分患者术后 3 d IL-17<sup>+</sup> T 细胞百分率较术前升高了约 2 倍(3.30%

vs. 1.66%),但术后 7 d 时其频率则下降到与手术前相当水平(1.96% vs. 1.66%),见图 1。

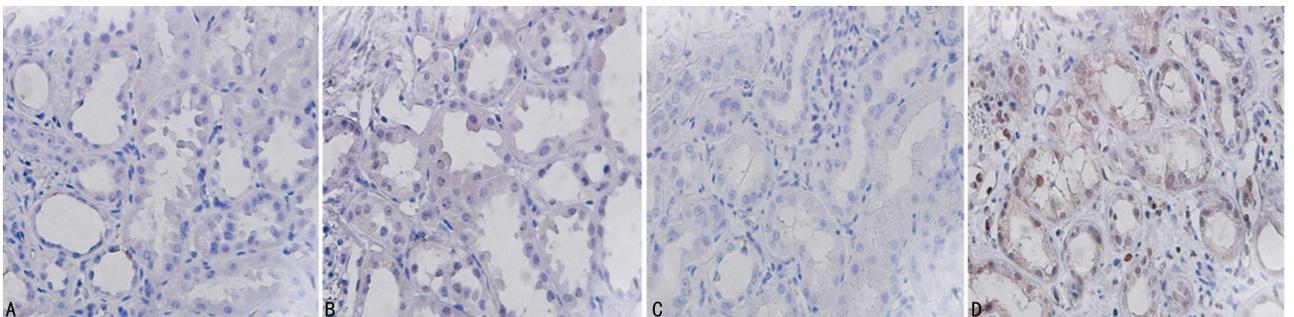
2.2 同种异体肾移植手术前、后患者血清 C5a 水平比较 对同种异体肾移植患者不同时相点血清中 C5a 水平进行 ELISA 检测,发现接受同种异体肾移植术后 3 d 与手术前差异无统计学意义(*P* > 0.05);术后 7 d 患者血清 C5a 水平较术前(即 0 h)显著上升[(182.00±7.08) ng/mL vs. (116.50±15.95) ng/mL, *P* < 0.01],见图 2。表明移植术后补体 C5 被激活裂解形成了 C5a。

2.3 不同肾脏组织中 IL-17 的表达与补体 C5b-9 沉积的比较 正常肾组织和发生排斥反应肾组织的免疫组织化学染色结果表明,发生排斥反应移植肾组织中 IL-17 的表达(图 3)和 C5b-9 的沉积(图 4)较正常肾组织中明显增加;10 例有排斥反应的患者肾组织 IL-17 表达均呈弱阳性,C5b-9 的表达均呈强阳性;而 5 例无排斥反应的正常肾组织中 IL-17 表达则为阴性,C5b-9 的表达则为弱阳性。且二者表达方式相似,均主要表达于 HK2 细胞。



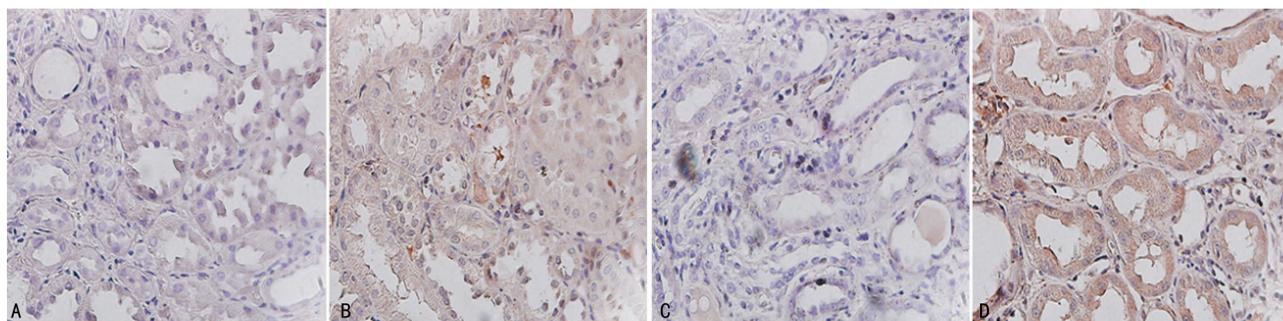
<sup>a</sup>: *P* < 0.01, 与手术前比较。

图2 肾移植患者手术前、后血清 C5a 水平比较



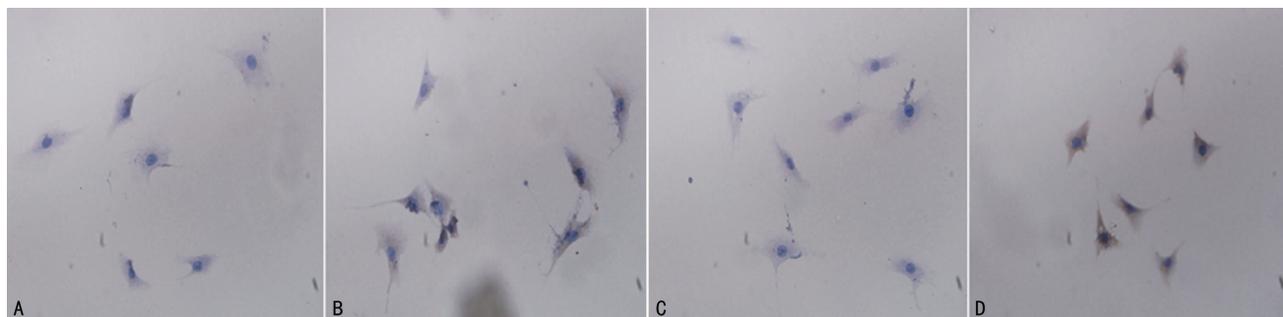
A: 正常肾组织阴性对照;B: 正常肾组织中 IL-17 的表达;C: 排斥反应肾组织阴性对照;D: 排斥反应肾组织中 IL-17 的表达。

图3 不同肾组织中 IL-17 的表达比较(×400)



A:正常肾组织阴性对照;B:正常肾组织中 C5b-9 的表达;C:排斥反应肾组织阴性对照;D:排斥反应肾组织中 C5b-9 的表达。

图 4 不同肾组织中 C5b-9 沉积的比较(×400)



A:未刺激 HK2 细胞阴性对照;B:未刺激 HK2 细胞 IL-17 的表达;C:C5a 刺激 48 h HK2 细胞阴性对照;D:C5a 刺激 48 h HK2 细胞 IL-17 的表达。

图 5 免疫细胞化学检测 HK2 细胞 IL-17 表达

**2.4 重组 C5a 对 HK2 细胞 IL-17 表达的诱导作用** 对 HK2 细胞进行 C5a 受体(C5aR)的细胞化学染色,结果证实该细胞可组成性地表达 C5aR;再加入重组的 C5a 对 HK2 细胞进行培养,48 h 后收集细胞,通过免疫细胞化学和 FCM 分析 IL-17 的表达,结果发现 C5a 刺激后,HK2 表达 IL-17 的水平明显上调(图 5、6),表明 C5a 可通过与 C5aR 结合,直接作用于 HK2 细胞调节其 IL-17 的产生。

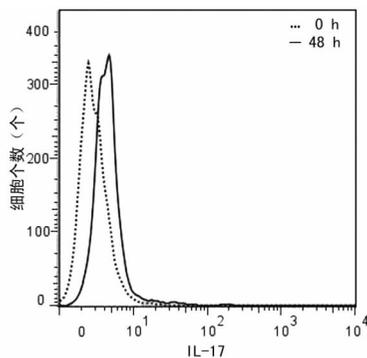


图 6 FCM 检测 C5a 对 HK2 细胞 IL-17 表达的上调作用

### 3 讨论

近年来,中国每年由于各种原因导致的肾衰竭新增患者约 200 万人,虽然肾移植是治疗终末期肾衰竭最理想的方法,但是,术后移植排斥已成为维持移植肾长期存活的主要障碍。目前,针对器官移植术后的排斥反应,临床上采用的环孢素 A 和 FK506 等免疫抑制剂均是通过抑制整个 T 细胞群的活化和增殖来发挥作用,缺乏选择性,不良反应大<sup>[10]</sup>。因此,进一步探讨移植排斥的发生机制以发展新的治疗方案已经迫在眉睫。

移植排斥是一种炎症反应,促炎性细胞因子 IL-17 在加速移植排斥中的重要作用也已得到越来越多实验数据的支持。Fábrega 等<sup>[11]</sup>在同种异体肝移植模型中发现,发生急性排斥反应的小鼠血清中 IL-17 和 IL-23 显著升高;Crispim 等<sup>[12]</sup>在针对肾移植患者的研究发现,移植后发生移植排斥的患者血清 IL-17 的水平显著高于未发生排斥反应的个体;IL-17 在肾小

管区可以通过细胞分裂素活化蛋白酶途径诱导 IL-6、IL-8 和单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1),介导排斥反应<sup>[13]</sup>。本研究发现,接受同种异体肾移植的患者,部分在接受移植术后,IL-17<sup>+</sup> T 细胞的百分率较术前明显升高(图 1),这可能是由于每对供体与受体主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子的相容性程度不一,因此临床手术前普适剂量的免疫抑制剂会导致个体的排斥程度在早期出现差异。随着临床免疫剂量和方案的调整,大多数患者 IL-17<sup>+</sup> T 细胞在术后 7 d 恢复到手术前水平(图 1)。与之一致的是,在临床上通过病理学诊断已确定发生排斥反应的移植肾组织中 HK2 细胞 IL-17 的表达水平较正常肾组织有明显的增强,见图 3。

C5a 与 C5b 均为补体 C5 活化后的裂解片段,但 C5a 存在于液相,不易在组织局部检测到,而 C5b 形成后会依次与补体 C6、C7、C8、C9 结合,形成终产物 C5b-9 沉积于细胞表面,所以检测 C5b-9 也可以间接反映 C5a 的产生。这在炎症反应的启动和调节中起着关键作用。在同种异基因移植术中,补体的激活主要发生在以下两种情况:(1)超急性排斥反应阶段,由于受者体内预先存在的抗移植抗原的抗体与移植抗原结合,激活了补体,一般发生在移植术后数分钟至数小时;(2)在急性排斥阶段,受者体内产生的抗体与移植抗原结合,导致补体激活,一般在移植术后 7 d 左右出现。由于现在已具备成熟的受者体内预存抗体的筛选手段,故前者在目前的临床中基本可以避免,因此,移植排斥导致的补体激活主要发生在急性排斥反应中。本研究也发现,接受同种异体肾移植患者血清 C5a 水平在术后 3 d 与术前差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但术后 7 d 时显著升高(图 2)。此外,与移植排斥肾组织中 HK2 细胞 IL-17 水平的高表达类似,补体 C5 的另一裂解片段 C5b-9 沉积的主要部位也是在移植排斥肾组织的 HK2 细胞(图 4),表明该部位为移植排斥导致补体活化的主要部位。肾移植排斥反应中 HK2 细胞 IL-17 的产生与补体裂解片段 C5a 是否有着某种关联;有文献报道 C5aR 组成性表达于原代肾上管上皮细胞以及包括 HK2 在内的肾上管上皮细胞系<sup>[14-15]</sup>。本研究的体外细胞培养

实验发现, HK2 细胞在接受重组 C5a 刺激后 IL-17 表达明显上调(图 5、6), 表明补体活化产物 C5a 可直接作用于 HK2 细胞诱导 IL-17 的产生, 促进排斥反应。

该研究为补体 C5a 在移植肾损伤中的作用有了新的见解, 为补体抑制剂治疗移植相关疾病的使用提供了进一步的理论依据。本研究的不足之处在于临床总样本量偏少, 体外细胞实验中关于 C5a/C5aR 介导 HK2 细胞 IL-17 产生的信号通路有待进一步的探讨。

#### 参考文献:

- [1] Yan JW, Wang YJ, Peng WJ, et al. Therapeutic potential of interleukin-17 in inflammation and autoimmune diseases [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(1):29-41.
- [2] Xue Y, Yang Y, Su Z, et al. Local delivery of T-bet shRNA reduces inflammation in collagen II-induced arthritis via downregulation of IFN- $\gamma$  and IL-17[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(3):899-903.
- [3] Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(7):479-489.
- [4] Gor bacheva V, Fan R, Li X, et al. Interleukin-17 promotes early allograft inflammation [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(3):1265-1273.
- [5] Vanaudenaerde BM, De Vleeschauwer SI, 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.
- [6] Ruttens D, Wauters E, Kicinski M, et al. Genetic variation in interleukin-17 receptor A is functionally associated with chronic rejection after lung transplantation [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2013, 32(12):1233-1240.
- [7] Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, et al. The role of the

anaphylatoxins in health and disease [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(14):2753-2766.

- [8] Farrar CA, Sacks SH. Mechanisms of rejection; role of complement [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2014, 19(1):8-13.
- [9] Farrar CA, Kupiec-Weglinski JW, Sacks SH. The innate immune system and transplantation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013, 3(10):a015479.
- [10] Ho S, Clipstone N, Timmermann L, et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506 [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1996, 80(3):40-45.
- [11] Fábrega E, López-Hoyos M, San Segundo 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.
- [12] Crispim JC, Grespan R, Martelli-Palomino G, et al. Interleukin-17 and kidney allograft outcome [J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(5):1562-1564.
- [13] Loverre A, Tataranni T, Castellano G, et al. IL-17 expression by tubular epithelial cells in renal transplant recipients with acute antibody-mediated rejection [J]. *Am J Transplantat*, 2011, 11(6):1248-1259.
- [14] Zahedi R, Braun M, Wetsel RA, et al. The C5a receptor is expressed by human renal proximal tubular epithelial cells [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 121(2):226-233.
- [15] Fayyazi A, Scheel O, Werfel T, et al. The C5a receptor is expressed in normal renal proximal tubular but not in normal pulmonary or hepatic epithelial cells [J]. *Immunology*, 2000, 99(1):38-45.

(收稿日期:2013-11-28 修回日期:2014-01-22)

(上接第 1330 页)

发生风险增加, 并且各代谢组分呈加重趋势; 而随着 MS 各分组的严重程度的增加, SUA 的水平也逐渐增高, 提示 SUA 与 MS 各组分之间的作用可能互为因果。

#### 参考文献:

- [1] 朱双根, 朱幼玲, 黄治飞, 等. 代谢综合征对症状性颅内动脉粥样硬化性多支病变的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(21):1622-1625.
- [2] 秦映芬, 黄迪迪, 周嘉, 等. 炎症因子与 2 型糖尿病合并代谢综合征患者亚临床动脉粥样硬化的关系 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2013, 29(7):592-594.
- [3] Lee SH, Heo SH, Kim JH, et al. Effects of uric acid levels on outcome in severe ischemic stroke patients treated with intravenous recombinant tissue plasminogen activator [J]. *Eur Neurol*, 2013, 71(3/4):132-139.
- [4] 焦喆, 高菡璐, 李航, 等. 糖尿病前期受高尿酸血症影响的相关因素分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2013, 34(7):725-727.
- [5] Yu MA, Sanchez-Lozada LG, Johnson RJ, et al. Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction [J]. *J Hypertens*, 2010, 28(6):1234-1242.

- [6] 苗志敏, 王灿, 孟冬梅, 等. 罗格列酮对尿酸代谢的影响及机制探讨 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2010, 26(9):792-796.
- [7] 李丽. 成人高血压与高尿酸血症患病相关性分析 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2013, 11(9):1057-1058.
- [8] 杨松, 赵彦平, 赵祥海, 等. 农村人群尿酸与血压变化及高血压关系的流行病学分析 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2012, 16(7):564-566.
- [9] Hairong N, Zengchang P, Shaojie W, et al. Serum uric acid, plasma glucose and diabetes [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2010, 7(1):40-46.
- [10] 温天杨, 许樟荣, 史琳涛, 等. 不同年龄和性别中老年 2 型糖尿病合并高尿酸血症的特点 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2013, 5(6):351-357.
- [11] 巴怡平, 靳雅丽, 徐琳, 等. 广州生物库队列人群中老年人血尿酸与血脂各组分的相关性研究 [J]. *中华全科医师杂志*, 2013, 12(7):564-567.
- [12] Ito H, Abe M, Mifune M, et al. Hyperuricemia is independently associated with coronary heart disease and renal dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11):e27817.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-12-25)