

• 学术交流 •

心脏移植术后采用无创分子技术实时监测免疫排斥反应的现状

张海波 孟旭

在监测心脏移植术后免疫排斥反应的方法中,心肌活检自从 19 世纪 70 年代起一直作为公认的金标准在全世界广泛采用。但是心肌活检所带来的创伤大、费用高等问题一直困扰着心脏外科医师。尽管全世界统计所有心肌活检结果中有 75 % 是阴性的,但是鉴于没有其他理想的替代技术,因此患者在以后的免疫状态评估时心肌活检还得要常规进行^[1]。因此心脏移植术后无创性的免疫检测技术一直是全世界的研究热点,但是目前尚没有理想的无创检测方法。近年来获得重大技术突破的外周血无创实时的分子生物学检测技术是最有希望获得临床推广应用的方法之一,已经引起全世界越来越多的器官移植专家的重视。在 2006 年 4 月的国际心肺移植年会上,综合采用最新分子生物学技术的异体器官移植基因图谱检测技术(AlloMap)被设为一个独立的大会专题。

一、分子生物学 AlloMap 技术简介

分子生物学技术监测免疫排斥反应在心脏移植领域的应用是一个崭新的重要课题,其原理为使用定量实时逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术,利用对血液中单核粒细胞等免疫细胞的成千上百种信使核糖核酸(mRNA)基因表达状态的筛选分析,来评估机体免疫排斥系统的实时状态,从而迅速及时地监测机体对移植物的排斥反应程度。但是具体哪一种或者哪几种基因的相关性最好?对于大样本的临床观察结果会如何?种种类似的问题一直没有得到较好的回答。直到研究协作组的 AlloMap 技术在美国几家先进移植中心的初步研究获得了令人满意的结果,才预示着在此领域的无创实时监测研究真正走向了临床应用阶段。

AlloMap 技术是最新的基因检测系统,最早是在 2005 年由总部位于美国南加州旧金山市美国 XDx 研究中心发展出来的,主要在全美国最顶尖的心脏移植中心使用,在美国外只有欧洲少数几个研究中心在进行使用和研究。AlloMap 系统在心脏移植领域已经获得了成功,目前该研究已经扩展到其他脏器移植后排斥反应的监测和自身免疫系统疾病的分析等领域。AlloMap 技术所获得的初步临床结果预示着将来其临床推广应用的广阔前景。这项研究成果问世之后立即受到专业人士的好评和期待。这种无创免疫检测技术的优点包括:(1)创伤小:只采用周围血样本;(2)安全:完全避免了心肌活检带来的心肌穿孔、出血等风险;(3)高度敏感:这种分子监测技术针对免疫反应高度特异性和敏感性的多种基因表达进行分析;(4)经济:每次监测耗材和费用少;

(5)实时提供信息:能够提供机体免疫排斥反应的实时信息。

在研制开发 AlloMap 技术时, XDx 公司花费数年时间组织了一批分子生物学专家和器官移植专家,测试了与移植物排斥反应相关的 25 000 个基因的表达,从中来筛选出高度特异性的基因组共 68 种基因,并与世界顶尖心脏移植中心组成的异体心脏移植物排斥反应基因表达观察研究小组(CARGO)合作,对其检测系统进行了数百例心脏移植患者的几千个样本的临床验证,其初步研究结果已经在近 1~2 年的美国移植协会、美国心脏协会、国际儿童移植协会和国际心肺移植协会、美国器官移植杂志以及循环杂志等国际最顶尖学术会议和杂志上发表。CARGO 研究协作小组包括了美国 8 家最大的心脏移植中心,覆盖了全美国 20 % 的心脏移植患者,包括克里夫兰医学中心、加州大学、斯坦福大学、佛罗里达大学、匹兹堡大学、哥伦比亚大学等。在这项研究中使用双盲对比检验的统计学方法对 600 多例心脏移植患者的心肌活检结果、移植物功能和 AlloMap 评分的结果进行了严格的监测。结果显示,在心脏移植术后发生免疫排斥和没有发生免疫排斥反应的患者外周血样本所监测的 AlloMap 评分差异均有统计学意义。其分析内容包括涉及到机体免疫排斥反应各个环节的 68 种基因的实时定量分析。后来经过把协变基因分组以及筛选最特异基因的大量工作,最后采用了 20 个基因的表达结果,从而定型为 AlloMap 分析系统。其中最重要的有血小板因子 4(PF4)等 11 种基因。在检测内容中还包括 9 种质量控制基因,其中 6 种是正常表达基因,这样可以对检测过程中每一步相关内容的质量进行检测。具体包括:(1)核糖核酸(RNA)的定性和定量。样本必须要有足量的抽提和纯化的 RNA 来进行定量 RT-PCR 检测;样本必须进行检测可能存在的基因组核酸等污染,使得样本 RNA 必须符合可接受的纯度标准。(2)确定分析的质量范围。每一个质量控制基因的定量分析结果必须在预制的一定范围内。(3)定量 RT-PCR 有效性。通过质量监测技术等来保证 PCR 的产量和质量。(4)确保检测结果可重复性。20 种基因每 1 个都会作 3 遍检测,这 3 个结果必须在一定的范围内以确保检测的准确性和可重复性。

XDx 公司和 CARGO 研究小组合作建立了 AlloMap 技术监测心脏移植术后机体免疫排斥的的数据库,对使用 AlloMap 技术进行免疫监测患者的药物治疗、免疫监测结果和临床结果等进行分析总结,以利于对于今后免疫监测工作的指导。AlloMap 技术分析 20 种基因的表达情况,最后经过数据整合分析,归纳为一个 AlloMap 的评分,其范围为 0~40。在评分小于 34 的时候,对于移植术后 6~12 个月和

超过 1 年的患者来说,其阴性预测准确度分别为 $>98.2\%$ 和 $>99.2\%$ 。随着移植术后时间的延长,AlloMap 评分的准确度也在不断增加。AlloMap 评分报告还包括最近 1 年内的该患者 AlloMap 评分的变化情况,以利于临床医师更好地分析患者的免疫排斥状态。

美国使用 AlloMap 监测技术的医学中心的操作流程包括:患者周围血标本的采集、包装运输到 XDx 实验室、进行基因表达的分析、转换成临床信息进行 AlloMap 评分、信息反馈到临床医师、告知患者结果和相应的治疗调整。整个过程仅用数天即可完成。应该指出的是,目前 AlloMap 技术在临床监测心脏移植患者的应用指征包括:移植术后超过半年的、15 岁以上的移植患者。对于儿童心脏移植患者的分析评分标准和成人有所不同,具体标准还要等待进一步的研究结果。另外在分析结果时,对于以下一些特殊情况应该引起临床医师的注意:使用的激素 $>20\text{ mg/d}$;近 30 d 内接受过输血;近 21 d 内接受过针对免疫排斥反应治疗的患者。上述情况可能会对 AlloMap 的结果产生一定的干扰。

二、AlloMap 技术的临床应用结果

Deng^[2]在 2003 年报道的 304 例心脏移植患者中,11.3% 的心肌活检没有发现细胞浸润,但是却发生了移植物的功能衰竭,但是外周血的基因表达结果却全部阳性,没有一例是阴性的结果。提示了在非细胞性排斥反应的检测上,外周血细胞的基因表达可以起重要的作用。Schoels 等^[3]2004 年报告了 44 例心脏移植患者使用无创外周血 RT-PCR 免疫检测研究结果,尝试了 39 个免疫排斥相关基因,结果显示有 9 种基因包括穿孔素、转化生长因子 β 等在心肌活检 ≥ 2 级和 < 2 级的患者有明显不同的表达,敏感性 84%,特异性 82%。Phillip^[4]在 2004 年对 189 例心脏移植患者在心肌活检的同时取外周血标本,经 PCR 测基因表达的结果显示,在不同的心肌活检结果中,超氧化物歧化酶 2 (SOD2) 等外周血粒细胞中的基因表达会有显著性的差异。证实了外周血标本基因表达和移植术后免疫排斥反应具有一定的相关性。Bernstein 在 2005 年国际心肺移植大会上报告了 8 个中心 650 例成人和 105 例儿童的研究结果,显示 AlloMap 评分趋向于随着心肌活检排斥反应程度增加而增加,0 级 ($n=240$) 和 1A 级排斥 ($n=108$) 的评分几乎相同 (25.3 和 23.3);1B 级排斥 ($n=16$) 平均评分为 29.8,比 0 级和 1A 级有显著增加 ($P<0.001$);而 ≥ 3 A 级 ($n=21$) 评分为 28.3,二者没有统计学差异。Deng 等^[5]在 2006 年报道了 Cargo 研究小组的研究结果,在 170 例心脏移植患者的外周血粒细胞中进行了 252 种基因的筛选,其评分结果在心肌活检 ≥ 3 A 级时符合率为 84%。患者心脏移植术后 1 年时,评分小于 30 分者,几乎不会发生明显的心肌活检 ≥ 3 A 级的排斥反应。提示使用这种分子生物学评分系统,可以明显地减少不必要的心肌活检次数。

Yamani 2005 年报道了利用 AlloMap 技术对 69 例心脏移植患者进行实时免疫排斥反应监测的研究,结果显示心脏移植术后血管增殖性疾病患者的 AlloMap 评分远高于冠脉正常的移植患者 (32.2 ± 3.9 vs 26.1 ± 6.5 , $P<0.001$)。2006 年国际心肺移植年会上,哥德比来大学心脏移植研究中

心主任 Deng 报告了使用 AlloMap 来监测和预测心脏移植术后慢性冠脉增殖性疾病的初步结果,这些研究检测了与慢性冠脉增殖性疾病相关的基因表达,提示心脏移植术后早期不同的基因表达形式可以预测将来发展慢性冠脉增殖性疾病的风险。

Evans^[6]2005 年总结了美国 5 家使用无创外周血分子生物学检测和心肌活检的经济学费用的对比,心肌活检至少花费 3297 美元,而使用无创外周血分子生物学技术则可以明显减少其费用,全美国每年至少可以节省 1200 万美元。

在 2006 年 4 月刚刚结束的国际心肺移植大会上,维也纳大学心脏外科 Zwkermann 博士报告了 AlloMap 在临床应用的结果,并分析了将来可能推广的应用方案。他指出 AlloMap 检测自从 2005 年出现以来很快被一些移植中心采用,并被越来越多的机构用作心肌活检外的临床免疫排斥反应监测方法,还将继续评估所有的数据结果。这种分子学监测是心脏移植领域巨大的进展,是一种移植患者很容易接受的免疫监测方法。多伦多大学心胸外科主任 Keshavjee 讨论了肺移植应用 AlloMap 进行免疫监测的结果,提示 AlloMap 也可以成功地用于心脏外其它器官移植的监测。

总之,这种无创实时的免疫监测技术已经在国际上一些先进移植中心得到成功应用,而且从 2005 年 4 月开始进行的 CARGO II 研究已经把范围扩展到欧、美、澳三大洲 19 个心脏移植中心,有计划地在国际范围内进行深入的研究。其目标包括:(1)在国际范围内鉴别诊断患者有无免疫排斥反应;(2)预测将来的急性细胞性排斥反应和移植物的功能衰竭;(3)指导免疫抑制药物的应用;(4)诊断和预测体液性排斥反应;(5)对心脏移植患者慢性冠脉血管性疾病的危险分级。

参 考 文 献

- [1] Baumgartner, Reitz, Kasper. Heart and Lung Transplantation. Second ed. New York: Saunders Publishing Company, 2002. 122-123.
- [2] Deng MC, Mehra HD, Eisen JM, et al. Cardiac allograft monitoring using a novel clinical algorithm based on peripheral leukocyte gene expression profiling. Los Angeles: American Heart Association Scientific Sessions Abstracts, 2003. 176-177.
- [3] Schoels M, Dengler TJ, Richter R, et al. Detection of cardiac allograft rejection by real-time PCR analysis of circulating mononuclear cells. Clin Transplant, 2004, 18(5):513-517.
- [4] Phillip AH, Emily JT, Mary EP, et al. Detection of cardiac allograft rejection and response to immunosuppressive therapy with peripheral blood gene expression. Circulation, 2004, 110(25):3815-3821.
- [5] Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, et al. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. Am J Transplant, 2006, 6(1):150-160.
- [6] Evans RW, Williams GE, Baron HM, et al. The economic implications of noninvasive molecular testing for cardiac allograft rejection. Am J Transplant, 2005, 6(6): 1553-1558.

(收稿日期:2006-08-16)