

组织配型在心脏移植中的应用研究进展

贾克刚¹ 综述, 刘晓程² 审校

(1. 泰达国际心血管病医院检验科, 天津 300457; 2. 泰达国际心血管病医院心外科, 天津 300457)

关键词: 群体反应性抗体; 人类白细胞抗原; 淋巴毒试验

随着移植免疫学研究的深入, 在临床器官移植中, 人们对供、受者的组织配型越来越重视。除了 ABO血型相同或相配, 受体血清淋巴细胞毒试验 $<10\%$ 外, 人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 即人类主要组织相容性抗原是介导移植物排斥反应的主要抗原。群体反应性抗体 (panel reaction antibody, PRA) 代表血液循环中抗 HLA 抗体, 反映患者对 HLA 抗原致敏性程度, 是影响排斥反应发生和移植物存活的重要因素。随着组织配型与心脏移植关系研究的不断深入, 其在心脏移植中的价值日益受到重视。

一、HLA 配型与心脏移植

1. HLA 分型方法 HLA 分型方法包括血清学分型、细胞学分型、抗原单克隆抗体分型和 DNA 分型技术 4 种。血清学分型借助补体依赖的淋巴细胞毒试验或微量淋巴细胞毒试验技术, 是 HLA-Ⅱ类抗原分型的主要方法。细胞学分型因细胞来源困难及操作繁琐, 已逐渐被淘汰。但是随着对 HLA 研究的深入和对组织分型技术要求的不断提高, 显示出血清学方法也存在一些本身难以克服的缺陷, 为解决血清学分型技术中问题, 80 年代末, Terasak 等着手研制单克隆抗体代替标准抗血清。1992 年, HLA 单克隆抗体配型板试剂正式投入生产, 大大改变了 HLA 配型试剂的质量。DNA 分型技术原理是利用体外基因扩增技术——聚合酶链反应技术 (PCR) 鉴定编码抗原的基因特异性来确定 HLA 抗原, 具有可靠、灵敏、精确和自动化等优点, 近年来在研究和应用方面发展较快, 有取代其他方法的趋势^[1]。

2. HLA 配型策略 目前使用 HLA-A、B、DR 6 抗原配型标准和氨基酸残基配型标准。由于 HLA 系统具有高度多态性, 按传统的 HLA 6 抗原

配型标准, 在无关供者中找到无错配供者十分困难。美国加州大学洛杉矶分校提出了氨基酸残基配型或称交叉反应组配型。此配型大幅度的提高供受者相配的几率。对高敏的移植患者^[2-3], HLA 配型仪利用氨基酸残基相配, 为患者接受 HLA 错配的供体提供了有用的工具。

3. HLA 配型的临床意义 移植物的存活率, 在一定程度上取决于供受者之间 HLA 抗原相配的程度。HLA 配型对心脏移植的影响, 以 HLA-DR 抗原作用最大。有学者研究^[3] 113 例成人和 31 例接受心脏移植的儿童患者, 发现有 HLA 抗体存在, 特别是针对供者特异性抗体, 测定供受者 HLA-Ⅱ类和Ⅰ类抗原是和急性排斥反应出现密切相关, 易形成移植后冠状动脉疾病、降低移植物存活。HLA 抗体的存在和移植物失功有关, 建议心脏移植供受体要做 HLA 配型。国外单中心的研究^[11] 240 例心脏移植患者, 发现没有 HLA 错配、1 点、2 点错配生存率分别为 90%、79%、68.1%, 其中还发现 HLA-DR 配型对心脏移植术后生存率有明显影响, HLA-DR 匹配将提高长期存活率。

但是, 德国一心脏研究中心研究人员^[4] 观察从 1989 年至 2005 年接受原位心脏移植的 923 例供受者 HLA 配型情况, 利用单因素和多因素分析 HLA 配型和长期生存的关系。平均随访期为 6.1 ± 4.3 年 (范围 0~15 年), 依据不同错配情况, 随访的 207 位死亡患者中, 1、2、5 年和 10 年的生存率分别为 88.7%、86.2%、78.4% 和 63.9%。他们的研究证明了 HLA 配型不是心脏移植受者一个独立的长期生存危险因子。国内也有学者研究发现^[5] 心脏移植的组织配型在有效的免疫抑制剂治疗下, HLA 配型结果不影响移植物的早期存活。但这并非表明心脏移植时 HLA 配型不重要。

HLA配型中因供心耐受冷缺血的时间短, 远距离调配困难; HLA配型方法耗时较长; 有时HLA配型在术后才完成。但也可根据所了解的供受者间的HLA配型程度, 调整心内膜活检, 免疫抑制剂治疗方案, 降低机会感染和恶性肿瘤的发生率。HLA配型的时机选择有赖于开发出快速的HLA配型技术, 在冷缺血时间内完成配型, 建立完善的器官网络, 提高相配几率。

二、PRA检测在心脏移植中的应用

1. PRA检测的方法 PRA检测方法分为3类: 补体依赖的细胞毒法、酶联免疫吸附法(ELISA)和流式细胞仪法, 目前比较常用的是ELISA。常用初筛试剂是GT公司HLA抗体确定试剂盒, 只能确定有无抗体; 另一类是one lambda公司的血清学HLA分型1240板, 可定出PRA阳性所针对的HLA抗原。有文献报道^[6], ELISA测定PRA结果和流式细胞交叉配型试验(CXM)结果有显著的一致性(89.7%, $P < 0.001$)。补体依赖的细胞毒法利用淋巴细胞膜表面具有HLA抗原, 当HLA特异性抗体与淋巴细胞膜上相应的HLA抗原结合, 激活补体, 在补体的作用下, 改变了细胞膜的通透性, 细胞膜破损, 染料可以进入, 通过着色细胞死亡的数目来判断抗原抗体反应的强度, 以百分比的形式表示结果。ELISA测定是将纯化的HLA抗原按照相应的分布包被在泰萨奇板上。如果待测血清中存在HLA抗体, 相应孔将发生抗原抗体反应; 而CXM原理是使用三色光定量T淋巴细胞上抗原与抗供者的IgG抗体反应来测HLA抗体^[7]。

2. PRA升高的原因和机制 许多原因导致PRA水平升高, 反复输血, 尤其输未去除白细胞的血液。多次妊娠, 胎儿所带的来自父亲的HLA抗原可使母体致敏; 有移植史及有排斥反应者能引起高滴度的抗HLA抗体; 植入同种异体瓣膜或补体能诱导机体产生抗HLA抗体^[8~10]。有些患者PRA升高无明显原因, 可能是由于感染引起的非特异性反应, 如丙型肝炎病毒和巨细胞病毒感染等。

3. PRA检测的临床意义 PRA是检测心脏移植受者体内有无HLA抗体的重要试验。PRA的不同水平对心脏移植患者有不同的影响。国外有学者从2000年1月至2004年12月, 21日同

况。第一组受者6481例PRA为0%占79.4%; 第二组受者930例PRA为1%~10%占11.4%; 第三组受者309例PRA为11%~25%占3.8%; 第4组440例PRA>25%。利用Kaplan-Meier方法发现4组生存率显著不同, COX回归发现部分危险模式, 提示了PRA增高是一个显著的死亡预示因子($P < 0.001$)。在多因素分析中发现二、三、四组和第一组比较(PRA 0%), 只有第四组(PRA>25%)有极高的死亡率。在心脏移植后1年内的排斥反应随着PRA的增高而增高。我们认为PRA>25%的心脏移植受者有特别高的排斥危险^[12]。

在心脏移植中, PRA水平升高能增加超急性排斥反应, 加速血管排斥反应、急性排斥反应和慢性排斥反应的危险。一般认为主要是HLA抗体IgG导致上述不利影响^[13]。因IgM大多数为自身抗体, 对移植植物不造成损害。大部分学者认为非近期内输过血, 否则IgM与超急性排斥反应无关。系统地了解术前受者PRA水平, 可有效地筛选出高敏患者, 帮助临床医生选择移植供者和决定心脏移植的手术时机, 有助于降低超急性排斥反应的发生, 提高移植物的存活率。

三、ABO血型与心脏移植

1. ABO血型的配型策略 ABO血型必须相同或相容, 以防止超急性排斥反应。所谓相容或配合, 在预防宿主抗移植植物反应的情况下, 是指供者无受者没有的抗原, 但可缺少受者具有的某些抗原。故安全组合除了血型相同者外, 还包括O型移植植物给予非O型的受者或A型、B型移植植物给予AB型受者^[14]。由于器官供者的短缺, 血型的相容原则, 用于心脏移植可缩短受者移植前的等待时间, 降低死亡率。国外学者研究发现^[15]许多心力衰竭晚期的婴儿, 进行ABO非匹配的心脏移植没有超急性排斥反应。同时他们报道了2个月O型心脏肿瘤的受者, 接受供体为A型的19d婴儿的心脏移植成功的病例。

2. 血型配型的临床意义 供受者间ABO血型不合, 可造成血管吻合后数分钟至术后24h内的超急性排斥反应。ABO血型抗原与受者血清中的预存抗体结合, 激活补体, 导致血小板、中性粒细胞聚集, 并使凝血系统激活, 最终导致严重的局部缺血或移植植物坏死^[14]。有学者研究

响,发现血型 O B患者等待移植的时间较长。这种差异至少是由于一部分血型 O的心脏被用于非 O型血人群。为了处理这一不平衡,英国的心脏移植咨询组改变了既定的协定。因此,为非紧急患者 O型供体的提供,现在限制血型 O和 B的受者。

儿科 ABO非匹配心脏移植的多中心研究认为^[17],尽管新生儿和婴儿的 ABO非匹配的心脏移植,降低了等待列表上的死亡率。但是依据多伦多中心的大量系列数据,说明这项技术还不能被所有的中心采用。如上所述英国的心脏移植受者的选择标准,已不同于应用在美国和加拿大的标准。但是我们认为受体术前同源凝集素移除后,其他中心重复使用多伦多中心实现的心脏移植,结果优异。同样 Daebritz等^[18]研究显示对于新生儿和婴儿 ABO非匹配的心脏移植有长期良好的预后,是能降低等待表上死亡率的安全方式。

1例血型为 O型的患者在意外地接受了供者血型为 B型的心脏,移植近 5年后应用免疫组织学的单克隆抗体技术,监测移植心脏的血管内皮细胞表达的 ABO血型抗原,发现血型抗原逐步从 B型转变为 O型,患者由于移植物血管病变而死亡^[19]。其原因、机制和过程目前仍不十分清楚,而对免疫耐受的婴儿进行 ABO血型不合的心脏移植后,移植物血管内皮细胞的抗原没有发生任何变化^[19]。Rh(D)血型目前也有阴性受者接受 Rh(D)阳性供体的报道^[20],认为无输血史 Rh阴性受者可以接受 Rh阳性供心移植。Rh(D)血型抗原位红细胞表面,心脏组织中不存在,但存在于心脏血管中。从理论上讲,无输血史的 Rh阴性患者体内无抗 Rh阳性抗原的抗体,若 Rh阳性供心血管中的积血冲洗充分,应是可行的。

四、受体血清淋巴细胞毒试验

1. 受体血清淋巴细胞毒试验方法 方法学包括美国国立卫生研究院的标准微量淋巴细胞毒试验 (standard microcytotoxicity test Standard NH), 抗人球蛋白微量淋巴细胞毒试验 (antihuman globulin microcytotoxicity test AHG)和 FCXM。FCXM是比标准微量淋巴细胞毒试验和 AHG更敏感的方法。然而,FCXM只检测 T B淋巴细胞的 IM型抗体。AHG能检测抗供者 T B淋巴细胞的 IM和 IC抗体。此外,

不需繁琐的步骤^[21]。

2 淋巴细胞毒试验检测的临床意义 移植前如果受者血清中存在抗供者淋巴细胞的抗体,移植后 80%发生超急性排斥反应或加速性排斥反应,因此必须用供者的淋巴细胞与梯度稀释的受者血清作淋巴细胞毒交叉配合试验,以检测受者体内抗供者淋巴细胞的细胞毒性抗体。可分别用 T B淋巴细胞进行。如果受者血清中检查出针对供者 T淋巴细胞抗体,是肾移植的禁忌。但如果受者血清内存在 B淋巴细胞抗体,无论是冷抗体还是温抗体,对移植物的存活均无明显的不利影响。在检测抗供者抗体,FCXM比补体依赖性淋巴细胞毒试验更灵敏,且能同时检测 T淋巴细胞的 IM型抗体 (抗 HLA-I类抗原的抗体)和 B淋巴细胞的 IM型抗体 (HLA-I类和 I类抗原的抗体)。

Amold等^[22]研究供者不同细胞类型时对补体依赖性淋巴毒试验的影响,发现外周血淋巴细胞、分离的 T B淋巴细胞以及脾细胞与包含 HLA-I类和 I类抗体的血清反应,交叉配型结果为外周血淋巴细胞阳性率 42%,脾细胞阳性率 72%,分离的 B淋巴细胞阳性率为 81%;而与包含 HLA-I类的抗体血清反应,外周血淋巴细胞反应阳性率 1%,脾细胞反应的阳性率 30%,分离的 B淋巴细胞反应的阳性率为 31%。总之,血清与脾细胞、分离的 B淋巴细胞供体细胞配对时,鉴定大约提高 30%的阳性率。外周血淋巴细胞作为供者的靶细胞的补体依赖性淋巴毒试验,增加了假阴性的结果。

综上所述,HLA配型、PRA和淋巴细胞毒试验检测在心脏移植中的重要作用,已逐步得到公认。实现心脏移植前的 HLA配型、术前、术后 PRA的检测对进一步提高心脏移植受者的长期存活率和生活质量有重要意义。建立快速、准确的 HLA检测方法,是心脏移植实验室需要发展的工作。

参 考 文 献

- [1] 谭建明,周永昌,唐孝达.组织配型技术与临床应用[M].北京:人民卫生出版社,2002:275-363
- [2] Goodman RS, Taylor CJ, O'Rourke CM, et al. Utility of HLA-mediated and antibody-mediated HLA epitopes

- mismatches in highly sensitized patients awaiting kidney transplantation [J]. *Transplantation* 2006 81(9): 1331-1336
- [3] Stasny P, Lavin GA, Fikler DE, et al. Antibodies against donor human leukocyte antigens and the outcome of cardiac allografts in adults and children [J]. *Transplantation* 2007 84(6): 738-745
- [4] Tenderich G, Zittermann A, Prohaska W, et al. No evidence for an improvement of long-term survival by HLA matching in heart transplant recipients [J]. *Transplant Proc* 2007 39(5): 1575-1579
- [5] 王晓武, 蔡振杰, 胡军, 等. 心脏移植的组织配型与早期存活分析 [J]. *中华器官移植杂志*, 2003 24(6): 364-366
- [6] Yang CW, Oh EJ, Lee SB, et al. Detection of donor-specific anti-HLA class I and II antibodies using antibody monitoring system [J]. *Transplant Proc* 2006 38(9): 2803-2806
- [7] Bishay ES, Cook DJ, Starling RC, et al. The clinical significance of flow cytometry crossmatching in heart transplantation [J]. *Eur J of Cardiothorac Surg* 2000 17(4): 362-369
- [8] Lopez-Cepero M, Sanders CE, Bugge J, et al. Sensitization of renal transplant candidates by cryopreserved cadaveric venous or arterial allografts [J]. *Transplantation* 2002 73(5): 817-819
- [9] Shaddy RE, Fuller TC, Anderson JB, et al. Mycophenolic mofetil reduces the HLA antibody response of children to valved allograft implantation [J]. *Ann Thorac Surg* 2004 77(5): 1734-1739
- [10] Hooper DK, Hawkins JA, Fuller TC, et al. Panel-reactive antibodies late after allograft implantation in children [J]. *Ann Thorac Surg* 2005 79(2): 641-644
- [11] Kaczmarek J, Deutsch MA, Rohrer ME, et al. HLA-DR matching improves survival after heart transplantation: is it time to change allocation policies [J]. *J Heart Lung Transplant* 2006 25(9): 1057-1062
- [12] Nwakama LU, Williams JA, Weiss ES, et al. Influence of pretransplant panel-reactive antibody on outcomes in 8160 heart transplant recipients in recent era [J]. *Ann Thorac Surg* 2007 84(5): 1556-1562
- [13] Iescu S, Tung TC, Burke EM, et al. Preformed IgG antibodies against major histocompatibility complex class II antigens are major risk factors for high-grade cellular rejection in recipients of heart transplantation [J]. *Circulation* 1998 98(8): 786-793
- [14] 吕世静, 刘若英, 蒋黎华. 临床免疫学检验 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 425-430
- [15] Gambino A, Torregrossa G, Cozzi E, et al. ABO-incompatible heart transplantation: crossing the immunological barrier [J]. *J Cardiovasc Med* 2008 9(8): 854-857
- [16] Hussey JC, Parameswar J, Banner NR, et al. Influence of blood group on mortality and waiting time before heart transplantation in the United Kingdom: implications for equity of access [J]. *J Heart Lung Transplant* 2007 26(1): 30-33
- [17] Roche SL, Burch M, O'Sullivan J, et al. Multicenter experience of ABO-incompatible pediatric cardiac transplantation [J]. *Am J Transplant* 2008, 8(1): 208-215
- [18] Daebritz SH, Schmoeckel M, Mair H, et al. Blood type incompatible cardiac transplantation in young infants [J]. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007 31(3): 339-343
- [19] Koestner SC, Kappler A, Schaffner T, 等. ABO血型不合的心脏移植后移植组织血型由 B 型转变成 O 型 1 例 [J]. *国外医学输血及血液学分册*, 2005 28(4): 378
- [20] 刘宇航, 周更须, 张闻辉, 等. 原位心脏移植治疗终末期心肌病七例 [J]. *天津医药*, 2008 36(3): 176-178
- [21] Buabut B, Chiewsi P, Panapanyasat K, et al. Cross matching technique facilitating kidney transplantation [J]. *J Med Assoc Thai* 1997 80 (Suppl 1): S55-S61
- [22] Arnold ML, Ensminger SM, Doxiadis II, et al. Effect of donor cell type on complement-dependent cytotoxicity crossmatch outcome for patients immunized against HLA class II antigens [J]. *Exp Clin Transplant* 2008 6(1): 1-6
- [23] Duquesnoy RJ. Clinical usefulness of HLA matchmaker in HLA epitope matching for organ transplantation [J]. *Curr Opin Immunol* 2008 20(5): 594-601

(收稿日期: 2008-11-21)

(本文编辑: 范基农)