

· 临床研究 ·

HLA 氨基酸残基配型在免疫致敏受者肾移植中的应用探讨

王长希¹, 张白玉², 陈立中¹, 毕颖¹, 费继光¹, 朱兰英², 郑克立³

(中山大学 1. 附属第一医院器官移植外科; 2. 肾内科 广东 广州 510080;

3. 附属第五医院器官移植外科 广东 珠海 519000)

摘要:【目的】探讨人类白细胞抗原(HLA)氨基酸残基配型(Res M)在免疫致敏尤其是高敏受者肾脏移植中的临床意义。【方法】对47例致敏受者采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测体内预存的群体反应性抗体-IgG(PRA-IgG)的水平及特异性;采用一步法单克隆抗体技术和微量序列特异性引物聚合酶链反应(Micro-PCR-SSP)技术进行HLA I类和II类分型。【结果】47例致敏受者的PRA-IgG水平为8.3%~96.4%,平均为38.8%,供受者间按传统的HLA抗原错配(MM)原则,0-1错配(MM)、2 MM的患者分别为5例(10.6%)、9例(19.1%),而按Res M的原则,0-1 MM、2 MM患者分别提高到22例(46.8%)、17例(36.1%)($P < 0.001$);其中PRA $\geq 50\%$ 的18例高敏受者中,0-1MM 13例(72.2%),而PRA < 50%的29例受者中,0-1MM 9例(31%),两者间差异有统计学意义($P < 0.001$);47致敏受者肾移植术后3个月内排斥反应的发生率为35%,在18例PRA $\geq 50\%$ 的高敏受者中,仅有4例(22.2%)发生排斥反应,29例PRA < 50%的受者中,11例(37.9%)发生排斥反应($P > 0.05$)。【结论】HLA氨基酸残基配型可显著提高供受者的相配率,良好的HLA配型对减少高敏受者肾移植的排斥反应、提高移植物的存活率具有重要意义。

关键词: 肾移植; HLA 抗原; 组织相容性试验; 氨基酸残基; 配型

中图分类号:R617

文献标识码:A

文章编号:1643-3554(2004)01-0070-04

A Study of HLA Amino Acid Residue Matching in Sensitized Recipients of Renal Transplantation

WANG Chang-xi¹, ZHANG Bai-yu², CHEN Li-zhong¹, BI Ying¹, FEI Ji-guang¹,
ZHU Lan-ying², ZHEN Ke-li³(1. Department of Organ Transplantation; 2. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital,
SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Organ Transplantation,
The Fifth Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Zhuhai 519000, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the clinical implication of human leucocyte antigen(HLA) matching in sensitized recipients of renal transplantation. 【Methods】 47 sensitized recipients' preexisting panel reactive antibody IgG(PRA-IgG) was detected by enzymed-linked immunosorbent assay (ELISA) with Lambda Antigen Tray. Donor and recipients HLA class I and II typing was performed by one-step monoclonal antibody and micro polymerase chain reaction with sequence-specific primers (Micro-PCR-SSP). 【Results】 PRA-IgG positive rate in 47 sensitized recipients was between 8.3%~96.4% with an average of 38.8%. Patients with 0-1, 2 mismatch (MM) of HLA-A, B, DR antigen were 5(10.6%), 9(19.1%) respectively according to the standard of conventional HLA antigen matching. Whereas patients with 0-1, 2 mismatch of HLA amino acid residue were 22(46.8%), 17(36.1%) respectively by the rule of HLA amino acid residue matching and the cases of 0-1MM increased 36.2% ($P < 0.001$). In the 18 highly sensitized (PRA $\geq 50\%$) recipients, patients with 0-1MM were 13(72.2%), whereas patients with 0-1MM were 9(31%) in the mild sensitized (PRA <

收稿日期:2003-07-15

基金项目:广东省科技青年基金资助项目(960131); 广东省重点攻关基金资助项目(97011)

作者简介:王长希(1963-),男,湖南长沙人,博士,副教授,主要从事肾移植及移植免疫研究. E-mail:wcx21@21cn.com

50%) recipients, there are significant difference in the two groups ($P < 0.001$). The rejection rate was 35% of the 47 sensitized patients in 3 months after renal transplantation. In the 18 highly sensitized patients (PRA $\geq 50\%$), 4 (22.2%) patients occurred rejection, as a control in the 29 mild sensitized (PRA $< 50\%$) recipients, 11 (37.9%) patients occurred rejection ($P > 0.05$). 【Conclusion】 The allocation based on HLA amino acid residue matching should result in a significantly higher percentage of well-matched between donors and recipients. Good HLA matching plays an important role in reducing the incidence of rejection and improving the survival of grafts in highly sensitized patients.

Key words: kidney transplantation; HLA antigens; histocompatibility testing; amino acid residue; matching

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(1):70-73]

人类白细胞抗原 (HLA) 是介导肾脏移植排斥的主要分子, HLA 免疫致敏, 严重影响移植物的存活率^[1]。我们通过术前检测受者群体反应抗体 (PRA), 准确了解其致敏程度和特异性, 按照 Take-moto 和 Terasaki^[2] 提出的氨基酸残基配型 (HLA-ResM) 原则, 进行供受者配型, 避开致敏抗体所对应的 HLA 抗原, 对致敏受者尤其是高敏受者进行肾移植取得了良好的效果。

1 材料与方 法

1.1 临床资料

1.1.1 病历选择 2001年1月至2003年1月在本院行肾移植的致敏受者47例, 男20例, 女27例, 年龄24~66岁, 初次移植40例, 再次移植7例, 淋巴细胞毒试验均为阴性, PRA IgG水平8.3%~96.4%。

1.1.2 免疫抑制方案 受者术前行1~2次血浆置换, 术中滴入甲基泼尼松龙 (MP) 500 mg 及静脉注入赛尼派 (Zenapax) 50 mg。术后前2 d 静滴 MP 500 mg, 第3 d 始改为口服强的松 (Pred) 30 mg/d, 1 月后改为 20 mg/d, 术后 MMF 用量为 1.0~2.0 g/d, CsA 按 5 mg/(kg·d) 口服, FK506 按 0.15 mg/(kg·d) 口服, 并根据移植肾功能恢复情况调整激素、MMF、CsA 或 FK506 剂量。

1.1.3 配型根据 Takemoto 和 Terasaki^[2] 提出的氨基酸残基配型原则进行供受者配型。

1.2 方 法

1.2.1 PRA 的检测 (ELISA 法) ①试剂: 莱姆德混合抗原板 (LAT-M)、抗原板 (LAT) 购自美国 one Lambda 公司, LAT 板包括 21 种 HLA-A 抗原、42 种 B 抗原、13 种 Cw 抗原、18 种 DR 抗原和 17 种 DQ

抗原, 共包被 40 个孔。②方法: 在包被了已知 HLA 抗原的 Terasaki 微板孔中分别加入 1:3 稀释的受者血清或阳性对照血清 10 μ L, 加盖后室温孵育 1 h, 甩干血清, 缓冲液洗涤 2 次。每孔中加入 1:100 稀释的酶联抗人 IgG 抗体 10 μ L, 加盖后室温孵育 40 min, 洗涤同上。每孔加入 10 μ L 底物, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10~15 min。每孔加入 5 μ L 中止液, 1 h 内在 BIOTEK 酶标仪读板^[2]。

1.2.2 HLA 分型 ①试剂: HLA-I 类单克隆抗体分型板购自美国 One lambda 公司, 包括 A 座位 25 个, B 座位 42 个。HLA-II 类抗原基因分型采用序列特异性引物聚合酶链反应技术 (PCR-SSP), 所需 HLA-DRB1、DRB3、DRB4、DRB5、DQB1 特异性序列引物由美国 One Lambda 公司合成, Taq 多聚酶购自美国 PE 公司, DNA 抽提试剂盒购自德国 QIA-GEN 公司。②方法: HLA-I 类抗原检测: 采用一步法单克隆抗体技术, 主要步骤包括: ACD-B 抗凝血 10 mL, 免疫磁珠分离淋巴细胞 \rightarrow 调整悬液淋巴细胞计数 (2 000 个/mL) \rightarrow 加入单抗板 \rightarrow 22~25 $^{\circ}$ C 孵育 1 h \rightarrow 曙红染色、福尔马林固定 \rightarrow 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 0.5 h \rightarrow 观察分析结果。③ HLA-II 类抗原检测^[3]: DNA 提取: 取 500 μ L 全血, 先后加入 1 000 μ L 裂解液充分裂解红细胞 3 min, 100g/L SDS 裂解白细胞 3 min, 使用 EDTA-NaCl 缓冲液调整 pH 值, 5 mol/L NaCl 盐析杂蛋白 3 min, 经酚氯仿 2 次抽提 10 min 再加入无水乙醇析出 DNA, Heto-DNA-MINI 干燥离心机处理, 加灭菌双蒸水 100~200 μ L, 并用旋涡混匀器溶解 DNA, 使用 Pharmacia Gene Quat II 型紫外分光光度计测定模板 DNA 浓度和纯度。② DNA 扩增: 每一扩增管中含有待测基因组 DNA 6~120 ng, Taq 酶 0.5 U, dNTP (dATP、dCTP、dTTP、dGTP) 60 pmol, 序列特异引物 (SSP) 2 pmol, 在

PE-9600 机上进行 PCR, 预变性 94 °C 5 min, 变性 94 °C 30 秒, 退火 65 °C 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 次循环。在 15 V/cm 条件下电泳 20 min, 经紫外自动成像拍照结果, 应用分析软件分析电泳带格局, 确定等位基因。

1.3 统计学方法 采用统计软件 SAS8.1 进行数据的统计处理, 两组计数资料的比较用多分类列联表概率分布检验方法^[4], 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 肾移植受者 PRA 水平及特异性

本组 47 例患者 PRA 8.3-96.4%, 平均为 38.8%, 其中 18 例 PRA $\geq 50\%$, 反映受者肾移植前处于致敏状态, 9 例同时具有抗 HLA-I 类和 II 类抗体, 27 例仅含有抗 HLA-I 类抗体, 11 例仅含有 HLA-II 类抗体。

2.2 受者 HLA 配型结果

2.2.1 致敏受者的配型结果 由表 1 可以看出: 按 HLA-Res M 原则可显著提高供受者的相配率, 其中 0-1MM 增加了 36.2%, 两组差异在统计学有意义 ($P = 0.000\ 000\ 495 < 0.05$)。

表 1 47 例致敏受者按照两种方法配型结果比较

Table 1 Comparing between two methods of HLA match in 47 patients

Res M	Ag M		
	0-1 MM	2 MM	3-6 MM
0-1 MM	5	5	12
2 MM	0	4	13
3-6 MM	0	0	8

MM: mismatch; $\chi^2 = 29.037, P = 0.000\ 000\ 254$

2.2.2 高敏受者 (PRA $\geq 50\%$) 与低敏受者 (PRA $< 50\%$) 的配型结果 从表 2 可以发现高敏与低敏受者组两组间匹配的差异有统计学意义 ($P = 0.005\ 9 < 0.05$), 即高敏组 HLA-ResM 匹配程度高。

表 2 高敏受者与低敏受者 HLA-ResM 结果比较

Table 2 Comparison of HLA-ResM in the two groups of the high sensitized and the mild sensitized patients n (%)

Groups	Total	0-1MM	2-6 MM
PRA $\geq 50\%$	18	13(72.2)	5(27.78)
PRA $< 50\%$	29	9(31.0)	20(69.0)

PRA: penal reactive antibody; $\chi^2 = 7.567\ 3, P = 0.005\ 9$

2.3 免疫致敏受者的肾移植效果

本组 47 例致敏受者中, 3 个月内发生排斥反应 15 例, 总排斥率为 31.9%; 其中 3 例为超排, 切除移植肾恢复血透; 2 例为加速性排斥, 予 MP + OKT3 后逆转, 肾功能逐渐恢复正常; 10 例为急性排斥, 予 MP 后逆转, 肾功能恢复正常。值得注意的是, 在 PRA $\geq 50\%$ 的高敏受者 18 例中, 只有 4 例 (22.2%) 发生排斥反应, PRA $< 50\%$ 的 29 例受者中, 11 例 (37.9%) 发生排斥反应, 两者间无明显差异 ($P > 0.05$)。

除 3 例移植肾切除, 余 44 例致敏受者随访至今, 移植肾功能仍维持正常范围, 其中 19 例已存活 1 年以上, 最长存活已达 27 个月, 最短存活已 3 个月。

3 讨论

3.1 PRA 检测对筛选合适供者的重要意义

移植术前检测受者的 PRA 水平, 能准确了解其致敏程度和抗体特异性, 对选择能避开受者预致敏抗体的供肾, 有效避免不可逆的排斥反应, 提高移植肾的存活率具有重要意义。

目前, 检测 PRA 的方法主要有 3 种: ①微量淋巴细胞毒试验 (CDC 法); ②流式细胞仪技术; ③ ELISA 法。传统的 CDC 法由于无法检测 HLA-II 类 IgG 抗体和非补体结合性抗体, 同时又容易受到与排斥反应无关的 IgM 型抗体和用于抗排斥治疗的单克隆抗体 (OKT3) 或抗胸腺球蛋白 (ATG) 的干扰, 容易出现假阳性和假阴性的结果。此外 CDC-PRA 检测需要活的淋巴细胞, 运输和保存非常不便, 不利于在临床器官移植中推广应用。而 ELISA 法可特异性检测与器官移植密切相关的 HLA-I 类和 II 类 IgG 抗体而不受其他抗体的干扰, 因而能够准确判断受者的预致敏状态和分辨出抗体特异性。而且方法稳定, 可重复性好, 不需要活的淋巴细胞, 敏感度高, 结果准确, 操作方便, 值得临床推广应用^[5]。

3.2 HLA 氨基酸残基配型 (Res M) 可提高供受者 HLA 的相配率

人类白细胞抗原 (HLA) 是目前所知的最高度多态性的遗传系统, 要在无关人群中找到两个 HLA 表现型完全相同的个体的概率非常低, 因此要为肾移植受者, 尤其是高敏受者找到 HLA 相合的供肾非常困难。随着 HLA 配型技术的发展和交

又反应组配型 (CREG M)、氨基酸残基配型 (Res M) 原则的制定,人们逐渐认识到 Res M 在肾移植配型中的作用。Takemoto 等^[6]通过大宗高敏受者 (PRA > 50%) 的病例分析表明:A、B、DR 抗原错配但氨基酸残基无错配的移植物 4 年存活率与 A、B、DR 抗原 0 错配的移植物完全相同,这些结果提示,在高敏受者中采用 CREG 配型或氨基酸残基配型有助于避开抗体,提高供受者的相配率,改善致敏受者肾移植的效果。本组 47 例受者按传统抗原配型原则,其 0-1MM、2MM 的相配率分别为 10.6%、19.1%,而按 Res M 的原则,则 0-MM、2MM 相配率分别提高到 46.8%、36.1% ($P < 0.001$),其临床意义显著。

3.3 良好的 HLA-ResM 可改善致敏受者尤其是高敏受者的移植效果

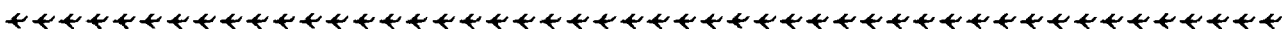
高致敏或高 PRA 受者术后超急排斥和急性排斥发生率高,在早年的临床实践中,其超急排斥的发生率可高达 100%,尽管后来采用血浆置换和新型强力免疫抑制剂,降低了超急排斥发生率,但急性排斥发生率仍较高,是影响肾移植术后疗效最主要的因素之一。因此,一些地区如美国采用计算机全国联网,根据 HLA 配型合理分配供体,以便为高 PRA 受者找到 HLA 零错配的供体,增加其接受肾移植的机会^[7-9]。本组 PRA $\geq 50\%$ 的 18 例高敏受者中,0-1MM 13 例 (72.2%),而 PRA < 50% 的 29 例低敏受者中,0-1MM 9 例 (31%)。结果前者只有 4 例 (22.2%) 发生排斥,而后者有 11 例 (37.9%) 发生排斥,表明高度致敏并非移植禁忌征,只要严格按照 HLA 配型原则,供者尽量避免受者体内预存的 HLA 抗体所对应的抗原,HLA-ResM 相配程度

越高,排斥发生率越低,甚至可达到非致敏受者相同的移植效果。

参考文献:

- [1] Katznelson S, Bhaduris, Cecka J M. Clinical aspects of sensitization[J]. Clin Transpl, 1997; 285-96.
- [2] Takemoto S, Terasaki P I. HLA compatibility can be predicted by matching only three residues with outward oriented sidechains[J]. Transplant Proc, 1996, 28 (3): 1264-6.
- [3] 肖露露, 陈洪涛, 王长希, 等. 多重等位基因特异性 PCR-HLA- II DNA 分型[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(3): 179-81.
- [4] 马燕, 康晓平. 配对设计下两组频数分布的 χ^2 检验[A]. 见: 方积乾. 卫生统计学[M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 108-26.
- [5] Schonemann C, Groth J, Leverenz S, et al. HLA class I and class II antibodies: monitoring before and after kidney transplantation and their clinical relevance[J]. Transplantation, 1998, 65 (11): 1519-23.
- [6] Takemoto S. Sensitization and crossmatch[J]. Clin Transpl, 1995; 417-32.
- [7] Thompson J S, Thacker L, Byrne J. Prospective trial of a predictive algorithm to transplant cadaver kidneys into highly sensitized patients[J]. Transplantation, 2002, 73 (8): 1274-80.
- [8] 肖露露, 张升, 叶欣. PRA 在肾脏移植中的作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 1997, 18(6): 337-40.
- [9] Arias M. Impact of the delayed graft function in hyper-sensitized kidney transplant patients[J]. Transplant Proc, 2003, 35(5): 1655-7.

(编辑 张敏瑞)



· 简 讯 ·

计亮年教授当选中科院院士

日前,中国科学院公布了 2003 年新增院士名单,我校化学与化学工程学院计亮年教授当选。学校有关部门负责人向计亮年院士转达了李延保书记和黄达人校长对他的祝贺。计亮年教授 1956 年毕业于山东大学化学系,毕业后曾先后在北京大学和南京大学进修,后在核工业部、衡阳工学院和广东工业大学工作。1975 年至今一直在中山大学工作,曾任化学与化学工程学院院长等职务。1982-1983 年在美国西北大学 F. Basolo 院士研究组任访问学者,现任广东省化学会理事长。他长期从事配位化学及生物无机化学研究,取得了突出的学术成就。计教授系统地研究了钌等小分子配合物的组成、结构与 DNA 的作用及其机理。在合成大量小分子配合物的基础上,用热力学、动力学及理论计算(DFT 法)等,总结了这些配合物的不同组成、结构与 DNA 作用的规律。计教授在具有酶功能的新型配合物的合成及金属模拟酶的结构、性能及应用的研究方面取得了显著成果。计亮年教授在配位化学和生物无机化学领域的国内外核心期刊共发表 358 篇论文,其中 236 篇论文被 SCI 收录,论文至今被他人引用 800 多篇次。1978 年获全国科学大会奖,1993 年以来曾获省部级科技奖一等奖 2 项,二等奖 5 项,2000 年获得中国发明专利 3 项。在国际会议上作邀请报告共 20 次,近几年他 10 次担任国际生物无机化学会议的国际组织委员会委员或国际顾问委员会委员等,在国际 3 种刊物和国内四种刊物担任编委、争议论文国际评审小组成员或国际顾问委员会委员等职务,1989 年起至今任英国皇家化学会 Fellow,多次主持中国-希腊、中国-瑞士政府间国际合作项目,在国内组织过 3 次大型国际会议,并任秘书长。计亮年教授曾讲授过无机化学第十门课程,主编著作 3 部。计亮年教授 2000 年被国务院授予“全国先进工作者”荣誉称号,2001 年被国家科协授予“全国优秀科技工作者”称号。

来源:中山大学校报,2003-11-26