

• 临床检验研究论著 •

再次肾移植患者 HLA 与 PRA 的关系研究^{*}

贾保祥, 马威然, 田野

(首都医科大学附属北京友谊医院泌尿科, 北京 100050)

摘要:目的 研究再次肾移植患者人类白细胞抗原(HLA)与群体反应性抗体(PRA)的关系。方法 选择行再次肾移植手术的患者 30 例检测 PRA。PRA 检测采用 ELISA 法筛选 HLA-Ⅰ类、Ⅱ类混合抗原板和鉴定板。结果 根据肾移植手术时间分为 3 组:移植肾存活 8 年以上组患者 3 例,HLA 错配 2 个抗原者 1 例,错配 4 个抗原者 2 例,无 PRA 生成;移植肾存活 5 年以上组患者 10 例,HLA 错配 4 个抗原者 6 例和错配 2 个抗原者 3 例,肾功能正常,PRA 阴性,错配 3 个抗原者 1 例,PRA 阳性;移植肾存活 3 年以上组患者 17 例,HLA 错配 1 个抗原和 2 个抗原者各 1 例,PRA 阳性,HLA 错配 3 个抗原者 3 例,其中 1 例 PRA 阳性,HLA 错配 4 个抗原者 7 例,1 例术前和术后均有抗Ⅱ类抗体,4 例 PRA 阴性,2 例 PRA 阳性,HLA 错配 5 个抗原者 5 例,4 例 PRA 阴性,1 例 PRA 阳性。结论 HLA 配型是维系移植肾长期存活的重要因素,而 HLA 抗体对移植肾长期存活和移植肾功能的影响具有重要作用。

关键词:肾移植; HLA 抗原; 群体反应性抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.17.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)17-2060-02

Study of the relationship between HLA and PRA in renal retransplant patients^{*}

Jia Baoxiang, Ma Weiran, Tian Ye

(Department of Urology, Beijing Friendship Hospital, Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** To study the relationship between HLA and PRA in renal retransplant patients. **Methods** PRA levels were retested in 30 patients who received renal retransplant. PRA was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) via LATM and LAT1240 (OneLambda). **Results** Patients were divided into 3 groups according to the transplant time. 3 patients were with allograft survive more than 8 years. Among them, there were 1 patient with 2 HLA antigens mismatch, 2 patients with 4 HLA antigens mismatch. 10 patients were with allograft survive more than 5 years. Among them, there were 6 patients with 4 HLA antigens mismatch, 3 patients with 2 HLA antigens mismatch, and 1 patient with 3 HLA antigens mismatch and PRA positive. 17 patients were with allograft survive more than 3 years. Among them, there were 1 patient with 1 HLA antigen mismatch, 1 patient with 2 HLA antigens mismatch and PRA positive, 3 patients with 3 HLA antigens mismatch, 1 patient of them with PRA positive, 7 patients with 4 HLA antigens mismatch, 1 patient of them HLA-Ⅱ antibody positive both in pretransplant or post transplant, 4 patients PRA negative and 2 patients with PRA positive, 5 patients with 5 HLA antigen mismatch, 4 patients of them with PRA negative. **Conclusion** HLA match is an important factor which can ensure long-term renal survival, while HLA antibody plays a significant role in long-term renal survival and function.

Key words: kidney transplantation; HLA antigens; panel reaction antibody

再次肾移植移植效果历来是肾移植术后关注的重点,其原因在于再次移植后发生急慢性排斥反应和肾功能延迟的概率高于初次肾移植患者。肾移植受者人类白细胞抗原(HLA)配型是器官移植患者术前选择移植供者的最重要检测之一,而肾移植术后群体反应性抗体(PRA)检测则是鉴别移植植物发生排斥反应的重要项目之一。本文对再次肾移植受者于肾移植术后追踪其 HLA 配型对 PRA 的影响进行研究,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2000 年 3 月至 2007 年 6 月行再次肾移植手术的患者 30 例,其中男性 19 例,女性 11 例;最大年龄 58 岁,最小年龄 22 岁。于近期(2010 年 10 月前后)再次检测 PRA。根据肾移植手术时间分为 3 组:移植肾存活 8 年以上组;移植肾存活 5 年以上组;移植肾存活 3 年以上组。

1.2 方法

1.2.1 HLA 分型 采用美国莱姆德公司和美国 GTI 公司提供的低分辨 SSP-HLA-Ⅰ类、Ⅱ类分型试剂。(1)提取 DNA:取 EDTA 抗凝血 2 mL,3 000 r/min 离心 5 min,吸取白细胞层,加入红细胞裂解液 8~10 mL,混匀,3 200 r/min 离心 8 min,弃上清液,加入白细胞裂解液 2 mL、10% SDS 60 μL、5 mol/L 高氯酸钠 500 μL、饱和氯化钠 1 mL,充分混匀,2 600 r/min 离心 15 min,吸取上清加入到 4 mL 异丙醇中,待 DNA 析出,清洗,DNA 干燥后加入 400~600 μL 蒸馏水,溶解 DNA 备用。(2)扩增:每人份取 D-Mix 1 管,加入 Taq 酶 7 μL(5 U/μL)、DNA 111 μL,充分混匀后点入 96 孔板,每孔 10 μL,置入 PCR 仪扩增,扩增条件为 96 ℃ 130 s,63 ℃ 60 s,扩增 1 个循环,96 ℃ 10 s,63 ℃ 60 s,扩增 9 个循环,96 ℃ 10 s,59 ℃ 50 s,72 ℃ 30 s,扩增 20 个循环,4 ℃ 结束。(3)电泳:用 TBE 缓冲液配制 2.5% 琼脂糖凝胶,将扩增产物移至凝胶中进行电

^{*} 基金项目:北京友谊医院科研启动基金资助项目(No. 2009-24)。

泳,150 V 3~4 min,紫外灯下观察结果。

1.2.2 PRA 检测 采用美国莱姆德公司提供的 ELISA 筛选 HLA-I 类、II 类混合抗原板。鉴定抗体类型采用采用美国莱姆德公司鉴定抗原板(LAT-1240),其抗原板包含 21 种 HLA-A 抗原,29 种 HLA-B 抗原,15 种 HLA-Cw 抗原,14 种 HLA-DR 抗原,7 种 HLA-DQ 抗原,操作步骤按说明书。

2 结 果

在 30 例再次肾移植患者中,PRA 阳性患者有 8 例,占 26.67%。移植肾存活 8 年以上组患者 3 例,其中 HLA-A、HLA-B、HLA-DR 抗原错配 2 个抗原者 1 例,错配 4 个抗原者 2 例,PRA 均为阴性。移植肾存活 5 年以上组患者 10 例,其中 HLA-A、HLA-B、HLA-DR 抗原错配 4 个抗原者 6 例,错配 2 个抗原者 3 例,PRA 为阴性,错配 3 个抗原者 1 例,术后 PRA 阳性,抗体强度较高,PRA 达到 66.67%,且为抗供者特异性抗体(DSA),目前其移植肾已丧失肾功能。移植肾存活 3 年以上组患者 17 例,其中 HLA-A、HLA-B、HLA-DR 抗原错配 1 个抗原和 2 个抗原者各 1 例,术后 PRA 阳性,HLA 错配 3 个抗原者 3 例,其中 2 例 PRA 阴性,1 例术后 PRA 阳性,HLA 错配 4 个抗原者 7 例,其中 1 例术前和术后均有抗 HLA-II 类抗体,4 例 PRA 阴性,2 例术后 PRA 阳性,HLA 错配 5 个抗原 5 例,其中 4 例 PRA 阴性,1 例术后 PRA 阳性。8 例 PRA 阳性的再次肾移植中,1 例再次肾移植前后均有抗体,但其肾功能正常,而另外 7 例再次移植患者中有 1 例移植肾功能丧失,6 例移植肾功能下降。见表 1~2。

PRA 检测结果	移植肾存活时间		
	8 年以上	5 年以上	3 年以上
阳性	—	1	7
阴性	3	9	10
合计	3	10	17

—:无数据。

HLA 配型错配	PRA 检测结果	
	阴性	阳性
1 个抗原(<i>n</i> =1)	—	1
2 个抗原(<i>n</i> =5)	4	1
3 个抗原(<i>n</i> =4)	2	2
4 个抗原(<i>n</i> =15)	12	3
5 个抗原(<i>n</i> =5)	4	1
6 个抗原(<i>n</i> =0)	—	—
合计(<i>n</i> =30)	22	8

—:无数据。

3 讨 论

在肾移植术后及时检测抗 HLA 抗体,可预防急性排斥反应的发生,否则治疗延缓则可导致移植失败。等待肾移植的尿毒症患者体内生成抗 HLA 抗体的主要因素有输血、妊娠和曾经历过肾移植手术而失败者。移植前预存有抗供者特异性抗体,将影响术后移植肾功能和长期存活^[1-2]。再次肾移植前的患者 PRA 阳性率可达 70.92%^[3],乃至更高,达到 94%~

100%^[4]。因此,再次肾移植患者在术前选择良好的 HLA 配型和避开 DSA 是 2 项必不可少的环节。有研究者证实,理想的 HLA 配型,尤其是 DR 抗原的相配合,可使存活率提高 10%~30%^[5],对再次肾移植和高危患者的效果更明显。再次移植患者的组织配型上,第 1 次 HLA 错配的抗原,严禁在第 2 次移植上重复出现,尤其是 DR 抗原。器官移植中供、受者 HLA 相容性程度是影响移植物成活的重要因素之一,但从长期存活的再次肾移植中可见,并不是 HLA 配合率越高,PRA 阳性率越低,此现象可能与可接受 HLA 抗原有关^[6]。在本研究的 30 例再次肾移植患者中,PRA 阳性患者有 8 例,占 26.67%,远远低于再次肾移植前的患者 PRA 阳性率,可见,此 30 例再次肾移植患者在移植前基本选择了良好的 HLA 配型或避开了 DSA。从 30 例患者 HLA 配型中可见,33.33%的患者 HLA 配合率达到 3 个抗原以上,而其他患者即使 HLA 配合率较低,但再次移植手术时均无 DSA。Paramesh 等^[7]发现 HLA 错配率越高,急性排斥发生率越高,移植肾功能下降的患者越多。贾保祥等^[8]对 121 例肾移植供受者 HLA 分型配合率和术后 PRA 对移植肾功能进行研究,结果术后发生急性排斥反应的患者有 15 例,占 12.4%,6 例患者 PRA 阳性(占 4.96%),29 例患者肾功能下降或失功(占 23.97%)。HLA-A、B、DR、DQ 半相合或以上的 51 例患者中 44 例患者肾功能良好(占 86.27%),低于半相合的 70 例患者中 48 例患者肾功能良好(占 68.57%)。而在亲属肾移植中,由于接受直系亲属供肾,因此术后产生抗 HLA 抗体的概率较低,移植肾功能良好,提示亲属肾移植供受者之间良好的 HLA 配型关系是维系移植术后长期存活和较少排斥的基础^[9]。

可见良好的 HLA 配合对降低移植肾的急性排斥发生率具有重要作用,但是 PRA 对移植肾功能长期存活和移植肾慢性失功具有重要意义。在本研究中,移植肾存活 8 年以上的 3 例患者,虽然 HLA 供受者配型没有达到零错配,但 PRA 为阴性,移植肾功能正常;而移植肾存活 5 年以上的 10 例患者,仅有 1 例 PRA 阳性,其移植肾功能丧失。由此可见,再次肾移植患者在 PRA 阴性情况下,仍可得到长期存活,而且再次肾移植患者存活率与初次肾移植患者的存活率无差异^[10]。Ishida 等^[11]回顾性研究了 DSA/非供者特异性抗体(NDSA)的存在和抗体效价对移植后移植物排斥的关系,发现有 DSA 的患者在肾移植术后更容易发生抗体介导的排斥(AMR)反应。在本研究中,8 例 PRA 阳性的再次肾移植患者中,1 例为术后 PRA 阳性、抗体强度较高且为 DSA 的患者,目前移植肾功能已丧失,另 6 例 PRA 阳性者也呈移植肾功能下降。可见 DSA 和抗体强度是影响移植肾功能的重要因素之一。本研究发现,在移植肾存活 3 年以上的 17 例患者中,HLA 供受者配型虽然各异,但再次肾移植后出现 PRA 阳性的患者例数较高,达 35.29%(6/17),远高于移植肾存活 5 年以上和存活 8 年以上的患者。此现象需要进行更深入的研究,以期得到合理的解释。

参考文献

[1] Singh N, Diamali A, Lorentzen D, et al. Pretransplant donor-specific antibodies detected by single-antigen bead flow cytometry are associated with inferior kidney transplant outcomes[J]. Transplantation, 2010, 90(10):1079-1084.

[2] Haririan A, Nogueira J, Kukuruga D, et al. Positive cross-match living donor kidney transplantation: longer-term(下转第 2064 页)

用于两者的鉴别。

本研究中 AIH 组、PBC 组和病毒性肝炎组及肝硬化组血清 HA、PCⅢ、CⅣ、LN 均高于健康对照组,同时 AIH 组的四项指标均明显高于病毒性肝炎组。虽然病毒性肝炎和 AIH 的炎症都是免疫介导的肝细胞损伤,但自身免疫反应损伤较重,肝细胞坏死较多,纤维化进展较快^[10]。肝硬化组的 CⅣ、LN 高于 PBC 组,可能是因为肝硬化患者中晚期患者比例较多,纤维化程度较重,而 PBC 患者病程进展较慢,早期主要以胆管炎和胆汁淤积为主,肝实质损害较轻。本研究因未对患者严格按病理分级和分期进行分组,因此尚不能确定 4 项血清标志物与 ALD 病理变化之间的对应关系。

肝纤维化是一个可逆的过程,一旦炎症坏死消失,过多的细胞外基质被降解,纤维化便可逆转。骆定海等^[11]的研究显示肝纤维化谱指标反映了 AIH 患者病情的轻重程度,可以指导治疗及预后。本研究通过对 AIH 和 PBC 患者治疗前与治疗 6 个月后纤维化标志物的配对比较显示治疗后 4 项指标均明显下降,表明以上标志物与纤维化程度及病情存在一定相关性。

AIH 患者血清纤维化标志物与部分肝功能指标的相关性分析显示其与 AST、ALP 和 TBA 具有较好的相关性,说明该 4 项指标不仅可反映肝纤维化的程度,同时也反映了肝实质细胞损害的程度和肝内胆汁淤积的程度,但 TBIL 除与 PCⅢ存在相关关系外,与其他 3 项指标未显示出统计学相关,其原因是在除急性黄疸性肝炎和慢性活动性肝炎以外的其他肝病中,TBIL 反映肝脏损害的敏感性较差,而 TBA 则较为敏感^[12]。

综上所述,检测血清 HA、PCⅢ、CⅣ、LN 有助于 ALD 患者肝纤维化的诊断及与病毒性肝炎、肝硬化的鉴别,在 ALD 的治疗过程中动态监测 4 项纤维化标志物水平,可间接反映肝脏炎症和纤维化的程度。

参考文献

[1] Manns MP, Strassburg CP. Autoimmune hepatitis: clinical challenges[J]. Gastro enterology, 2001, 120: 1502-1505.

[2] 丁贤君,李世波,李绍佐,等. 慢性肝病患者肝纤维化血清指标与肝组织纤维化分期的量化关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(12): 911-914.

[3] Czaja AJ, Freese DK. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis[J]. Hepatology, 2002, 36(2): 479-497.

[4] Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Disease practice guidelines[J]. Hepatology, 2000, 31(4): 1005-1013.

[5] Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis[J]. Hepatology, 2010, 51(6): 2193-2213.

[6] 尤欣,刘炜,张恒,等. 原发性胆汁性肝硬化和原发性干燥综合征患者血清中不同抗核抗体型别的分析[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(3): 168-170.

[7] Martinez SM, Crespo G, Navasa M, et al. Noinvasive assessment of liver fibrosis[J]. Hepatology, 2011, 53(1): 325-335.

[8] 吴正林,吴意,叶军,等. 血清中肝纤维化指标测定在肝病中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 31-32.

[9] Voumrouraki A, Koulentaki M, Notas G, et al. Serum surrogate markers of liver fibrosis in primary biliary cirrhosis[J]. Eur J Intern Med, 2011, 22(1): 77-83.

[10] 牟君成,赵昕,王文昕. 肝抗原自身抗体检测对自身免疫性肝病的诊断价值探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(4): 451-454.

[11] 骆定海,吴建胜,贾国葆,等. 自身免疫性肝炎合并纤维化指标异常对疾病预后的判断意义[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(5): 97-100.

[12] 唐丽英. 血清总胆汁酸与胆红素在肝胆疾病中的相关关系探讨[J]. 南华大学学报:医学版, 2009, 30(3): 296-297.

[1] Manns MP, Strassburg CP. Autoimmune hepatitis: clinical challenges[J]. Am J Transplant, 2009, 9(3): 536-542.

[3] 贾保祥,武俊杰,孙利宁,等. 2 429 例尿毒症患者致敏因素的分析[J]. 中华器官移植杂志, 2010, 31(7): 429-432.

[4] El-Awar N, Terasaki P, Lazda V, et al. Almost all patients who are waiting for a regraft of a kidney transplant have anti-HLA antibodies[J]. Transplant Proc, 2002, 34(7): 2531-2532.

[5] Thompson JS, Thacker LR, Krishnan G. Human leukocyte antigens DR and AB and kidney retransplantation[J]. Transplantation, 2003, 75(5): 718-723.

[6] Marrari M, Duquesnoy RJ. Detection of donor-specific HLA antibodies before and after removal of a rejected kidney transplant[J]. Transpl Immunol, 2010, 22(3/4): 105-109.

[7] Paramesh AS, Zhang R, Baber J, et al. The effect of HLA mismatch on highly sensitized renal allograft recipients[J]. Clin Transplant, 2010, 24(6): E247-252.

[8] 贾保祥,唐雅望,马威然,等. HLA 配型和 PRA 对移植肾功能的影响研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(16): 1802-1804.

[9] 贾保祥,孙立宁,田野. 亲属肾移植患者术后群体反应性抗体与肾功能的比较研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 675-676.

[10] Barba Abad J, Robles Garcia JE, Saiz Sansi A, et al. Impact of renal retransplantation on graft and recipient survival[J]. Arch Esp Urol, 2011, 64(4): 363-370.

[11] Ishida H, Hiral T, Kohei N, et al. Significance of qualitative and quantitative evaluations of anti-HLA antibodies in kidney transplantation[J]. Transpl Int, 2011, 24(2): 150-157.

(收稿日期:2012-02-12)

(收稿日期:2012-02-03)