



外周血干细胞移植后GVHD的动态监控可溶性人类白细胞抗原-I及临床意义

人类白细胞抗原(HLA)又称移植抗原,存在于几乎所有的有核细胞表面,是区别种内个体间差异的主要分子,与移植排斥密切相关。可溶性人HLA-I抗原(sHLA-I)存在于血清[1]、汗液、乳汁、尿液[2]中的HLA-I类分子,其结构与膜HLA分子基本相同,是由 α 链和 β 链微球蛋白以非共价键形成的异源二聚体,其中 α 链具有多态性抗原决定簇,并可被同种抗血清或单克隆抗体(mAb)识别[3]。sHLA-I在体内参与免疫应答,具有免疫调节功能,可诱导产生免疫耐受,临床上可抑制移植排斥反应的发生。1997年以来,国外相继有文献报告肝[4]、骨髓[5]、心[6]、肾[7]、肺[8]的受者在排斥反应发生前1周左右患者血清中总sHLA-I和供者特异性sHLA-I水平会升高,而不发生排斥反应者则不升高,提出sHLA-I作为监控器官移植排斥反应的指标。本研究对24例异基因外周血干细胞移植患者移植前后血清中sHLA-I的浓度进行了检测。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病人及健康献血员 汉族正常献血员63名(男39名、女24名),年龄18~40岁,来自南方医院输血科。异基因外周血干细胞移植患者24例来自长海医院血液科,21例为同胞供体,3例为非血缘关系供体;其中男9名、女15名,年龄14~43岁,平均28岁。24例移植受者的基本临床资料见表1,移植物抗宿主病(GVHD)评价按文献[9]标准。

表 1 同种异基因外周血干细胞移植病人基本临床资料

Tab.1 Clinical data of the allo-PBSCT patients included in this study

| NO | Diagnosis | Conditioning | Prophylaxis | aGVHD (onset) | HLA class typing | Survival time(d) |
|----|-----------|--------------|-------------|---------------|----------------------|------------------|
| 1 | AML-M2 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | 0 | A2,31 B8 | alive |
| 2 | AML-M4 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | 0 | A1,A29 B8,57 | Cw6 alive |
| 3 | AML-M2 | Cy/TBI | CsA/MTX | 0 | A2,36 B5,13 Cw4 | +109 |
| 4 | AML-M3 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | 0 | A11,28 B7,18 Cw5 | alive |
| 5 | AML-M3 | Cy/TBI | CsA/MTX | 0 | A1,3 B8,39 Cw5,w7 | +117 |
| 6 | AML-M4 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | 0 | A24,29 B27,62 Cw7 | +135 |
| 7 | ALL | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | I(+11) | A2,3 B35,47 Cw7, | alive |
| 8 | AML-M1 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | I(+28) | A2,31 B7,35 Cw1,w3 | alive |
| 9 | AML-M2 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | I(+30) | A3,19 B8,40 Cw3 | +159 |
| 10 | AML-M3 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | I(+32) | A2,24 B11,28 Cw5,w7 | alive |
| 11 | AML-M4 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | II(+24) | A3,24 B7,41 Cw1,w3 | +143 |
| 12 | CML | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | II(+25) | A2,3 B7,37 Cw4,w5 | alive |
| 13 | CML | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | II(+26) | A2 B35 Cw4 | alive |
| 14 | AML-M1 | Cy/TBI | CsA/MTX | II(+28) | A3,19 B7,28 Cw7 | +107 |
| 15 | AML-M4 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | II(+46) | A1,24 B58,40 Cw3 | +156 |
| 16 | AML-M4 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | II(+37) | A24,29 B27,49 Cw3,w3 | alive |
| 17 | AML-M3 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | II(+19) | A2,30 B8,13 Cw6,w7 | +138 |
| 18 | AML-M2 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | II(+21) | A11,29 B18,41 Cw1,w3 | alive |
| 19 | AML-M3 | Cy/TBI | CsA/MTX | III(+21) | A3 B37 Cw7 | +98 |
| 20 | AML-M2 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | III(+33) | A2.29 B44,47 | alive |
| 21 | ALL | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | III(+34) | A11,28 B8,35 Cw4 | alive |
| 22 | SAA | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | III(+23) | A2,28 B57,8 Cw6,w7 | alive |
| 23 | AML-M3 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | III(+32) | A3,28 B7,8 Cw7 | +125 |
| 24 | AML-M4 | Cy/TBI | CsA/MTX/MMF | IV(+18) | A1,2 B8,40 Cw3 | +103 |

AML: Acute myeloid leukemia with FAB classification; ALL: Acute lymphoblastic leukemia; CML: Chronic myeloid leukemia. Conditioning: Cyclophosphamide and total body irradiation (Cy/TBI); Prophylaxis: Cyclosporin A(CsA) and methotrexate (MTX). aGVHD: Acute graft-versus-host disease. onset: Day of onset of aGVHD.

1.1.2 血清标本 采集外周血干细胞移植前、后病人及健康献血员外周血5~8 ml分离血清。3个月内每7 d系统收集外周血干细胞移植后本组研究对象的血液标本。并针对症状个别采集1年内的标本。所有标本均存放于-30℃保存。

1.1.3 试剂 W6/32单克隆抗体(晶美公司Serotec产品); 兔抗人 β 微球蛋白(一抗, 华美公司, Fitzgerald产品); 羊抗兔IgG HRP(酶标二抗, 华美公司产品); sHLA I标准品(HLA B7, Sangsart产品); 底物液(磷酸盐 柠檬酸缓冲液, pH 5.0); 终止液(2 mol/LH₂SO₄)。

1.2 方法

1.2.1 ELISA双抗夹心法 采用本研究室创建的ELISA双抗夹心法[10]定量检测sHLA-I。将96孔酶标板经磷酸盐缓冲液(PBS, pH 9.6, 0.05 mol/L)冲洗后, 每孔加W6/32单抗(10 mg/L)100 μ l, 置4℃作用18 h, 再以含吐温-20的PBS洗涤液(pH 7.4, 0.02 mol/L)冲洗, 每孔加1%牛白蛋白(BSA)-PBS, 室温封闭1 h, 再冲洗后备用。被检血清以样本稀释液(0.25%BSA-PBS, 含Mg²⁺ 1 mmol/L)作1:25稀释, 稀释液单独作空白对照。每孔加样100 μ l, 37℃保温2 h后弃上清液并洗涤, 再加兔抗人 β 2m HRP (1%BSA-PBS 1:1 000稀释)100 μ l, 37℃保温1 h, 弃上清液并洗涤, 加底物应用液四甲基联苯胺(TMB)100 μ l, 37℃保温30 min, 加2 mol/L硫酸50 μ l终止反应, 然后在5 min内以酶标测读仪(双波长450 nm/630 nm)测定吸光度值。

1.2.2 资料分析 以各个体在功能稳定期测得的平均值作为该患者的基线水平, 以此基线值为基础。由于同种异基因外周血干细胞移植病人移植前后各个体血清中的sHLA-I含量差异很大, 我们采用 Δ sHLA-I=[post-PBSCT concentration]-[pre-PBSCT concentration], 求得每例患者每份标本的增加率, 进而

求得本研究中24例标本sHLA-I的平均增加率，各组患者间进行比较。并运用SPSS13.0统计软件进行t检验和均数及标准差分析，获得有意义的数据。

2 结果

2.1 健康献血者sHLA-I平均值

63名正常非亲属献血员测得的sHLA-I平均值为(738.16±403.18) μg/L，较外周血干细胞移植前病人血清sHLA-I水平没有显著性差异。

2.2 外周血干细胞移植受者移植前、后sHLA-I的动态检测

2.2.1 未发生GVHD患者移植前后sHLA-I含量变化 检测结果表明6例临床未发生GVHD的外周血干细胞移植受者，其血清中sHLA-I含量无明显波动。移植前后t检验结果P>0.05，没有显著性差异(表2)。

表 2 PBSCT 后未发生 GVHD 的移植病人移植前后血清 sHLA-I 含量变化

Tab.2 Serum sHLA-I level in PBSCT recipients with grade 0 GVHD

| No | Baseline level(ng/ml) | sHLA-I(post-transplantation) |
|----|-----------------------|------------------------------|
| 1 | 628.52±26.17 | 649.64±30.67* |
| 2 | 436.60±30.18 | 426.95±25.53* |
| 3 | 726.67±22.34 | 710.51±27.78* |
| 4 | 843.23±19.81 | 849.69±23.57* |
| 5 | 453.65±28.09 | 464.19±35.76* |
| 6 | 962.13±32.66 | 960.21±41.22* |

*P>0.05 vs Base level

2.2.2 发生 I 度GVHD患者移植前后sHLA-I含量变化 检测结果表明4例临床证实发生 I 度GVHD的外周血干细胞移植受者，其血清中sHLA-I含量无明显波动。发生GVHD前、中及免疫冲击治疗后至稳定期与移植前sHLA-I基础水平含量的t检验分析结果P>0.05，没有显著性差异。Mean+SD(ΔsHLA-I) =1.267±6.968(表3)。

表 3 PBSCT 后发生 I 度 GVHD 的移植病人移植前后血清 sHLA-I 含量变化

Tab.3 Serum sHLA-I level in PBSCT recipients with grade I GVHD

| No | Baseline level(ng/ml) | sHLA-I before aGVHD | sHLA-I during aGVHD | Stable phase sHLA-I after treatment |
|----|-----------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------------|
| 7 | 728.52±41.23 | 743.64±26.74* | 744.73±28.98** | 738.77±45.02 ^o |
| 8 | 436.60±27.78 | 429.95±31.07* | 439.81±19.87** | 433.50±32.12 ^o |
| 9 | 926.67±34.41 | 912.51±29.85* | 916.89±27.46** | 923.74±29.44 ^o |
| 10 | 643.23±29.63 | 653.99±31.46* | 646.90±32.14** | 652.99±30.66 ^o |

*P>0.05, **P>0.05, ^oP>0.05 vs base level

2.2.3 发生 II 度GVHD患者移植前后sHLA-I含量变化 检测结果表明8例临床证实发生 II 度GVHD的外周血干细胞移植患者，其血清中sHLA-I含量在发生GVHD前、中及免疫冲击治疗后有明显波动。发生GVHD前与移植前sHLA-I基础含量的t检验分析结果P<0.05，具有显著性差异。Mean+SD(ΔsHLA-I) = 62.258±5.493(表4)。GVHD期间与移植前sHLA-I基础含量的t检验分析结果P<0.05，具有显著性差异。Mean+SD(ΔsHLA-I) =102.612±6.615。免疫冲击治疗后至稳定期与移植前sHLA-I基础水平含量的t检验分析结果P>0.05，没有显

著性差异; Mean+SD(Δ sHLA-I)=3.041 \pm 3.004。

表 4 PBSCT 后发生 II 度 GVHD 的移植病人移植前后血清 sHLA-I 含量变化

Tab.4 Serum sHLA-I level in PBSCT recipients with grade II GVHD

| No | Base level(ng/ml) | sHLA-I before aGVHD | sHLA-I during aGVHD | Stable phase sHLA-I after treatment |
|----|----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------------|
| 11 | 653.65 \pm 32.45 | 704.83 \pm 24.41* | 761.18 \pm 28.78** | 664.18 \pm 30.11 [§] |
| 12 | 445.23 \pm 33.68 | 513.30 \pm 31.12* | 565.88 \pm 29.03** | 455.10 \pm 40.26 [§] |
| 13 | 756.10 \pm 40.14 | 829.21 \pm 36.71* | 841.26 \pm 32.98** | 751.42 \pm 27.35 [§] |
| 14 | 967.32 \pm 37.65 | 1 030.53 \pm 31.23* | 1 043.69 \pm 35.65** | 973.29 \pm 65.33 [§] |
| 15 | 1 068.26 \pm 33.21 | 1 155.87 \pm 40.12* | 1 158.80 \pm 30.16** | 1 057.63 \pm 36.06 [§] |
| 16 | 598.78 \pm 27.87 | 655.06 \pm 29.17* | 709.04 \pm 24.43** | 591.80 \pm 21.46 [§] |
| 17 | 465.41 \pm 21.36 | 528.87 \pm 26.38* | 597.74 \pm 25.97** | 456.42 \pm 30.21 [§] |
| 18 | 623.65 \pm 31.98 | 658.80 \pm 36.19* | 721.71 \pm 30.98** | 632.91 \pm 28.67 [§] |

*P<0.05, **P<0.05, [§]P>0.05 vs base level

2.2.4 发生III-IV度GVHD患者移植前后sHLA-I含量变化 检测结果表明6例临床证实发生III-IV度GVHD的外周血干细胞移植患者,其血清中sHLA-I含量在GVHD前、中及免疫冲击治疗后发生明显波动。发生GVHD前与移植前sHLA-I基础含量的t检验分析结果P<0.05,具有显著性差异。Mean+SD(Δ sHLA-I)=60.878 \pm 4.927(表5)。GVHD期间与移植前sHLA-I基础含量的t检验分析结果P<0.05,具有显著性差异。Mean+SD(Δ sHLA-I)=172.920 \pm 9.886。免疫冲击治疗后至稳定期与移植前sHLA-I基础水平含量的t检验分析结果P>0.05,没有显著性差异; Mean+SD(Δ sHLA-I)=3.903 \pm 5.885。

表 5 PBSCT 后发生 III-IV 度 GVHD 的移植病人移植前后血清 sHLA-I 含量变化

Tab.5 Serum sHLA-I level in PBSCT recipients with GVHD of grades III-IV

| No | Base level(ng/ml) | sHLA-I before aGVHD | sHLA-I during aGVHD | Stable phase sHLA-I after treatment |
|----|--------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 19 | 757.72 \pm 25.12 | 822.74 \pm 27.18* | 908.08 \pm 31.22** | No Stable phase |
| 20 | 413.18 \pm 21.67 | 459.16 \pm 24.36* | 559.41 \pm 34.45** | 431.06 \pm 25.46 [§] |
| 21 | 921.63 \pm 30.13 | 71.06 \pm 32.18* | 1100.18 \pm 28.36** | 900.37 \pm 33.12 [§] |
| 22 | 838.51 \pm 21.98 | 47.08 \pm 25.14* | 1041.95 \pm 27.33** | 846.44 \pm 27.29 [§] |
| 23 | 502.16 \pm 27.77 | 74.84 \pm 29.24* | 577.00 \pm 30.12** | 497.74 \pm 30.04 [§] |
| 24 | 778.23 \pm 31.08 | 61.29 \pm 27.89* | 939.51 \pm 26.24** | No Stable phase |

*P<0.05, **P<0.05, [§]P>0.05 vs Base level

3 讨论

人类白细胞抗原(HLA)又称主要组织相容性抗原,存在于几乎所有的有核细胞表面,是区别种内个体间差异的主要分子,与移植排斥密切相关。可溶性HLA-I抗原(以下简称sHLA-I)存在于人血清、汗液、乳汁、尿液中的HLA I类分子,其结构与膜HLA分子基本相同,是由 α 链和 β 链微球蛋白以非共价键形成的异源二聚体,其中 α 链具有多态性抗原决定簇。sHLA-I在体内参与免疫应答,具有免疫调节功能,可诱导产生免疫耐受,临床上可抑制移植排斥反应的发生。正是鉴于sHLA-I的上述诸多功能,近年来对sHLA-I的研究倍受移植免疫工作者的重视。

检测sHLA-I的方法有细胞毒抑制试验,一维等电聚焦凝胶电泳(ID-IEF),流式细胞仪(FACS)及酶联免疫吸附试验(ELISA)四种。细胞毒抑制试验操作简便,但只能定性,不能定量,也容易受抗体额外反应干扰。

ID-IEF可检测sHLA-I的同种异型, 但不能定量。FACS要求设备及试剂用量大。双抗夹心法ELISA检测sHLA-I技术至今未引进国内, 本法包被抗体为W6/32单抗, 它能与sHLA-I分子 α 链3区(无多态性)结合, 再以抗 β 2m HRP与W6/32单抗结合, 从而测定sHLA-I。不同文献报告, 正常人血清中sHLA-I含量有所不同, 区别如下: (990 \pm 160) μ g/L(美国), (868.9 \pm 715.0) μ g/L(日本), (415.6 \pm 256.1) μ g/L(韩国)。我们测定本组中国人为(738.16 \pm 403.18) μ g/L。各实验室的结果互有出入的原因, 除与种族差异有关外, 也与试剂及实验技术有关。sHLA-I的临床意义在于: 与各个体正常基础水平相比较或动态观察其升降, 故试剂和操作方法必须一致才能正确比较其结果。

Zavazava等[9]曾报告肾和心脏移植各50例, 出现临床排斥反应前10 d sHLA-I升高10倍, 排斥反应控制后下降。随后国外有文献相续报告肝、骨髓、心、肾、肺的移植受者在排斥反应发生前一周左右患者血清中总sHLA-I和供者特异性sHLA-I水平会升高, 而不发生排斥反应者则不升高, 提出sHLA-I作为监控器官移植排斥反应的指标。升高的sHLA-I主要来源目前有两个方面的解释: 一是GVHD后受到免疫损伤的受体组织在发生GVHD时, 免疫细胞被活化刺激局部或全身性细胞因子的释放, 而这些细胞因子又可以上调HLA-I类抗原的表达。二是免疫损伤导致受体细胞死亡, 死亡细胞膜上的HLA-I类抗原可以水解脱落释放入血液循环。

目前监控外周血干细胞移植后GVHD主要是通过实验室血清学参数, 主要包括: 丙氨酸氨基转移酶、总胆红素、碱性磷酸酶等和组织病理学。然而前者标本易于获得, 但不够灵敏和特异, 后者目前常用于临床诊断排斥反应, 但为侵入损伤性, 预测价值有限。我们初步观察了本组外周血干细胞移植病例, 移植后依据GVHD的发生及等级, 受体内sHLA-I浓度有无不同的变化。研究发现移植后发生II-IV级GVHD的移植病人其血清中sHLA-I含量与移植前浓度有显著性差异($P < 0.005$)。14例发生II-IV度GVHD移植病人在GVHD前期sHLA-I即有显著性升高($P < 0.005$), GVHD期间sHLA-I升高达更具差异并达到峰值, Δ sHLA-I的均数从GVHD前期60.878上升到GVHD期间172.920可以预见检测血清中sHLA-I的含量对于外周血干细胞移植后GVHD的发生具有监控作用。经免疫抑制剂冲击治疗后, 在稳定期又降至基础水平。而无GVHD或I级GVHD患者sHLA-I无明显波动($P > 0.05$)。Liem[10]的研究也曾报道BMT移植后发生GVHD时患者血清中sHLA-I有明显升高, 但未证实在排斥前sHLA-I类分子浓度的变化, 笔者认为这是与移植后样本的及时采集有关联。

sHLA-I作为一种新的血清学参数, 对外周血干细胞移植的监控较敏感、特异, 且是一种非损伤的客观实验诊断指标。因此我们认为通过动态检测sHLA-I类分子的浓度, 可能有助于监控排斥反应, 判断移植状况。但由于不同个体的sHLA-I类分子浓度相差很大, 所以应当建立每例患者的基线水平, 并以基线值为基础, 动态分析每位患者每份标本sHLA-I的升高和降低才具有临床意义。由于本研究实验样本数的限制, 对于sHLA-I在器官移植排斥反应中的变化规律, 生物学意义及影响因素尚有待积累更多病例进一步分析。

(责任编辑: 段咏慧)

参考文献:

- [1] Higuchi A, Hagihara M, Tsumuraya N, et al. Comparison of soluble and membrane bound HLA-class I and DR levels in umbilical cord blood and adult peripheral blood[J]. Tokai J Exp Clin Med, 2003, 28(1): 1-7.
- [2] Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2[J]. J Immunol, 2005, 174(1): 6-19.
- [3] Maller J, Scheck M, Zipfel A, et al. Influence of perioperative sHLA-I concentration on the histological development of the liver graft[J]. Transpl Int, 2000, 13 (Suppl 1): S449-51.
- [4] Sediva A, Stary J, Hromadrikova I, et al. Determination of soluble HLA class I molecules in children in bone marrow transplantation[J]. Cas Lek Cesk, 2000, 139(20): 630-4.
- [5] Koelman CA, Vaemen IM, Balk AH, et al. Donor-derived soluble HLA plasma levels can not be used to monitor graft rejection in heart transplant recipients[J]. Transpl Immunol, 2000, 8(1): 57-64.
- [6] Burlingham WJ, Class FH. Soluble MHC in allograft recipients[J]. Hum Immunol,

1999, 60(5): 401-2.

[7] Risso M, Sundiresan S, Lynch J, et al. Increased concentration of soluble human leukocyte antigen class I levels in the bronchoalveolar lavage of human pulmonary allograft[J]. J Heart Lung Transplant, 1997, 16(11): 1135-40.

[8] 兰炯采, 石宁, 郑世荣, 等. 可溶性HLA-I的检测及中国人正常值[J]. 中国免疫学杂志, 1999, 5(15): 228-30.

Lan JC, Shi N, Zheng SR, et al. Quantification of serum soluble HLA class I antigens [J]. Chin J Immunol, 1999, 5(15): 228-30.

[9] Zavazava N. Soluble HLA class I molecules: biological significance and clinical implications[J]. Mol Med Today, 1998, 4(3): 116-21.

[10] Liem LM, Koelman CA, Doxiadis N, et al. Elevated serum HLA class I levels coincide with acute and chronic graft-versus-host disease[J]. Bone Marrow Transplant, 1997, 20(1): 227-34.

参考文献:

[1] Higuchi A, Hagihara M, Tsumuraya N, et al. Comparison of soluble and membrane bound HLA-class I and DR levels in umbilical cord blood and adult peripheral blood[J]. Tokai J Exp Clin Med, 2003, 28(1): 1-7.

[2] Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2[J]. J Immunol, 2005, 174(1): 6-19.

[3] Maller J, Scheck M, Zipfel A, et al. Influence of perioperative sHLA-I concentration on the histological development of the liver graft[J]. Transpl Int, 2000, 13 (Suppl 1): S449-51.

[4] Sediva A, Stary J, Hromadrikova I, et al. Determination of soluble HLA class I molecules in children in bone marrow transplantation[J]. Cas Lek Cesk, 2000, 139(20): 630-4.

[5] Koelman CA, Vaemen IM, Balk AH, et al. Donor-derived soluble HLA plasma levels can not be used to monitor graft rejection in heart transplant recipients[J]. Transpl Immunol, 2000, 8(1): 57-64.

[6] Burlingham WJ, Class FH. Soluble MHC in allograft recipients[J]. Hum Immunol, 1999, 60(5): 401-2.

[7] Risso M, Sundiresan S, Lynch J, et al. Increased concentration of soluble human leukocyte antigen class I levels in the bronchoalveolar lavage of human pulmonary allograft[J]. J Heart Lung Transplant, 1997, 16(11): 1135-40.

[8] 兰炯采, 石宁, 郑世荣, 等. 可溶性HLA-I的检测及中国人正常值[J]. 中国免疫学杂志, 1999, 5(15): 228-30.

Lan JC, Shi N, Zheng SR, et al. Quantification of serum soluble HLA class I antigens [J]. Chin J Immunol, 1999, 5(15): 228-30.

[9] Zavazava N. Soluble HLA class I molecules: biological significance and clinical implications[J]. Mol Med Today, 1998, 4(3): 116-21.

[10] Liem LM, Koelman CA, Doxiadis N, et al. Elevated serum HLA class I levels coincide with acute and chronic graft-versus-host disease[J]. Bone Marrow Transplant, 1997, 20(1): 227-34.

