

· 述评 ·

HLA 分型方法的发展及其在器官移植中的作用

Qiang Shi (石强) (Division of Transplantation, Department of Surgery, School of Medicine and Public Health, University of Wisconsin-Madison, Madison 53792, Wisconsin, American)

人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 分子表达于我们体内几乎所有的有核细胞表面。HLA 分子控制识别“自身”和“异己”的生物学过程, 它的主要功能是当作载体将异体抗原递交给 T 淋巴细胞, 从而启动特异且适当的免疫反应将异体成分排除。从进化角度上看, HLA 介导的免疫反应是多细胞复杂有机体在简单向复杂个体过度过程中积累的保护物种不受外源生物体袭击的重要途径, 但是它却在临床上成为影响器官移植生存期的主要免疫障碍。如果受体和供体的 HLA 不匹配, 它们之间将引发细胞和抗体介导的排斥反应。组织相容实验室和免疫遗传性实验室的工作就是鉴定受体和供体的 HLA 系统分子构成, 以确定两者之间的 HLA 差异程度。

科学家早在 20 世纪 30 年代就已发现 HLA。20 年后, Jean Dausset、Rose Payne 及 Jon van Rood 通过妊娠和输血先后鉴定了 HLA 异源抗体。美国 Jackson 实验室 Snell 小组以及英国 Gorer 小组使用纯系小鼠在遗传学上确定了 HLA 分子, 并证实它们在异体器官移植中的作用^[1]。随着更多的 HLA 不断地被发现和报道, 国际机构要求科学化统一管理 HLA 分子, 因此, 第一届国际会议于 1964 年在美国北卡 Durham 召开, 其后的十四届会议, 命名了 3 种 I 类 HLA (Class I, HLA-A, HLA-B, HLA-C) 和五种 II 类 HLA (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DO)。根据世界卫生组织 (World Health

Organization, WHO) HLA 命名委员会 2017 年国际免疫遗传学 (the international immunogenetics, IMGT) / HLA 数据库资料, 图 1 展示了迄今 I 类 (绿色) 和 II 类 (黑色) 已认定的 HLA 相关分子数^[2]。

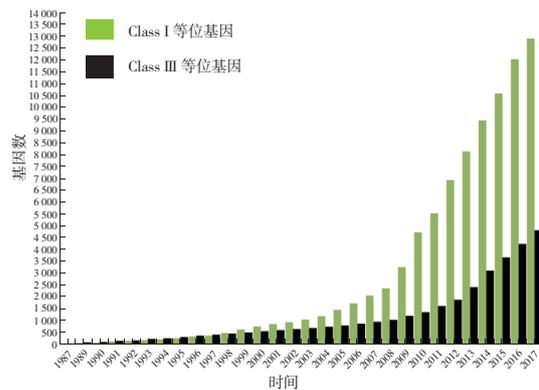


图 1 1987 年 - 2017 年, IMGT 认定和命名的 HLA 分子的基因数目

血清学是最早用于确定 HLA 多态性的方法。1964 年, 美国的 Terasaki 和 McClelland 建立了补体依赖的淋巴细胞毒试验 (complement dependent cytotoxicity test, CDC), 他们使用天然存在的多克隆抗体特异性确定 HLA 的表型^[3-4]。血清学方法依然是当代鉴定 HLA 表型的黄金标准。虽然它只是确定 HLA 组织相容性低分辨率的方法, 但它是唯一可鉴定细胞表面实际表达 HLA 表型和参与器官排异分子的手段, 是功能性试验。其不足之处是抗血清的来源和质量控制影响试验结果, 也不能提供基因序列的等位变异。在目前市场上, 提供 HLA 实验室试剂的厂商以单抗为检测试剂的, 同时加抗体和补体, 在 1 小时内一步完成 CDC。

DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2018.04.002

基金项目: 天津市科学技术委员会资助项目 (17ZXSCSY00100)

通讯作者: Qiang Shi (石强), Email: shi_3rs@yahoo.com

自20世纪90年代,分子遗传学和基因操纵技术的迅猛发展,实验室HLA检测手段有了彻底的改变。基于多聚酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的DNA序列分析分子诊断占据主导地位^[1,5]。当检体基因组DNA被限制性内切酶切割和扩增后,在凝胶电泳板上显示不同长度的片段谱,依次决定HLA分型。与抗体分析相比,它可展示HLA基因的结构,特别适合DR3/5/6单倍型,特异性得到提高,但方法繁杂,分辨率和准确性有局限。然而,依据PCR基本原则却衍生了多种HLA分型的方法,在众多HLA分型试验中,PCR序列特异引物(PCR-SSP)和PCR序列特异的寡核苷酸引物(PCR-SSO)已是常规检测方法。前者使用与对应的3'末端特异性核酸引物进行PCR扩增HLA基因外显子,通过在凝胶上检查阴性反应带决定等位基因存在与否;后者测定欲检HLA基因扩增产物与连接在载体上的寡核苷酸片段杂交程度判断结果。PCR-SSP和PCR-SSO两个方法均可提供一定程度的等位基因中/高分辨率结果,但不同实验室使用时有侧重。Applied Biosystems公司依据realtime PCR原理改进了PCR-SSP的凝胶电泳,显示PCR产物的设计并以荧光分析代替定量产物,使检测时间缩短至45~60分钟,是临床快速HLA分析最常用的技术。

被广泛接受具有高分辨率HLA分型的方法是测定PCR产物的基因序列^[6]。最早的测序手段是使用毛细管的Sanger序列,亦称为PCR-SBT。它的可靠性和特异性高于其他测序,但是它不能很好地区分异质样本内碱基的顺/反排序,从而产生不确定的双关性结果,这是高分辨率分析中重要的障碍。为了解决此问题,许多实验室的工作流程中使用PCR-SSO或PCR-SSP给出初步结果,然后将异质标本的等位基因双链分别扩增,各自进行Sanger测序。如果双关性依然不能排除,要使用多项PCR-SSP逐一鉴定。

近十年来,高通量下一代测序为解决HLA测序双关性结果有了实质性进展。下一代测序在实验设计上有两个巨大的优势,从而使测序过程中

的双关性结果减至最少。①它采用了“克隆性测序”可使连锁多态基因在同一复制子内进行;②“高通量平行测序”可使众多序列在同一运行内完成。下一代测序不仅决定外显子亦可测定内含子的序列。已有四家不同平台的下一代测序设备在商业运行:Thermo Fisher离子半导体系统(Ion Torrent Sequencing)、Roche焦磷酸454测序系统、Illumina Miseq边合成边测序系统以及Life Technology SoLiD边连接边测序系统,它们的区别在于用不同的方法完成克隆测序步骤。据统计,已有270万份标本使用新方法^[7]。在未来的几年内,下一代测序将会有2个突破:①HLA I和II类的测序工作流程更快、更自动化及更加经济;②HLA数据库更完整。届时,HLA实验室的测序结果更加准确。

HLA分型技术在不断地发展,它对器官移植的影响日益加深。但是,移植医师对供者与受者的HLA匹配程度要求则与器官移植的种类有很大的关联。不同国家和地区均有各自的操作程序和规则。一般来讲,实体器官移植的匹配程度以低分辨率为基点,而造血干细胞的移植需要在高分辨率基础上。基于单一和多中心的数据分析,例如Opelz报告肾移植受/供者HLA完全不匹配的器官存活率比完全匹配者低17%^[5,8]。众多临床工作者对依据HLA匹配程度而决定器官分配的政策提出了挑战:①多种高剂量免疫抑制剂方案可降低HLA不匹配患者的排异反应;②为HLA配型而延长器官运输时间会加大组织的损伤而降低器官存活时间。因此,如何平衡两者的关系是临床治疗方案的考虑因素。在心脏移植的问题上,HLA分型匹配的作用远不及肾移植清楚,主要原因是供者数量有限,收集的数据说服力有限。肺移植亦如此。HLA相容性对肝移植的影响至今尚未有清楚的结论,正面和负面影响均有临床试验报道。HLA相容匹配在异体造血干细胞的重要性是十分显著的。造血干细胞移植的供/受体不仅要一类HLA-A、HLA-B、HLA-C完全匹配,而且二类HLA-DR、HLA-DQ,甚至HLA-DP亦要相同,特别是它的匹配是在高

分辨率的基础上。如果配型不当,供者造血干细胞繁衍的免疫细胞会将受者的细胞视为异物而发起攻击,引发移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)综合征。不过有趣的是,当一卵同生的双胞胎在治疗白血病时,造血干细胞移植后,其复发的机会比HLA相同的一级或二级亲属要高。几个不同研究单位的结果显示,在非亲属造血干细胞移植时,单一位点在等位基因水平上(四位数字)HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、HLA-DQ及HLA-DP有一位差异不会导致移植失败,但是组群水平上(二位数字)的差异则会对预后有严重影响^[9]。

器官移植在治疗终端器官衰竭有不可质疑的疗效,因而,有关HLA的分型的基础和临床领域有大幅度扩展。开发高分辨率HLA的技术会不断取得突破和进展,Luminex和基因芯片与PCR结合是未来发展的方向。从临床角度来看,单一细胞群移植是新的课题,如胰岛细胞、神经细胞,已在多家医院开展实用性治疗。使用胚胎干细胞衍生的确定细胞制剂可能占据重要的一席。在移植免疫学未找到解决排斥反应的办法之前,HLA分型就一直有市场和医学价值。

参考文献

[1] Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future [J].

Tissue Antigens, 2012, 80 (1): 1-11.

- [2] Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, et al. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43 (Database issue): D423-D431.
- [3] Ting A, Terasaki PI. Influence of lymphocyte-dependent antibodies on human kidney transplants [J]. Transplantation, 1974, 18 (4): 371-373.
- [4] Drew SI, Bergh O, McClelland J, et al. Antigenic specificities detected on papainized human granulocyte microgranulocyte cytotoxicity [J]. Transplant Proc, 1977, 9 (1): 639-645.
- [5] Sheldon S, Poulton K. HLA typing and its influence on organ transplantation [J]. Methods Mol Biol, 2006, 333 (8): 157-174.
- [6] Gabriel C, Fürst D, Faé I, et al. HLA typing by next-generation sequencing - getting closer to reality [J]. Tissue Antigens, 2014, 83 (2): 65-75.
- [7] Schöfl G, Lang K, Quenzel P, et al. 2.7 million samples genotyped for HLA by next generation sequencing: lessons learned [J]. BMC Genomics, 2017, 18 (1): 161.
- [8] Hernandez-Fuentes MP, Franklin C, Rebollo-Mesa I, et al. Long- and short-term outcomes in renal allografts with deceased donors: A large recipient and donor genome-wide association study [J]. Am J Transplant, 2018 [2018-01-15], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29392897>. [published online ahead of print Feb 1, 2018].
- [9] Charron D. Immunogenomics of hematopoietic stem cell transplantation [J]. Transfus Clin Biol, 2003, 10 (3): 156-158.

(收稿日期: 2018-04-20)

Qiang Shi (石强). HLA分型方法的发展及其在器官移植中的作用[J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2018, 6 (4): 251-253.