

外周血 sHLA-G 联合免疫细胞因子在肾移植排斥反应鉴别诊断中的应用价值

郑鳧洋, 韩澍, 杨璟辉, 王纪渊, 丁越, 陈瑜, 祝藩原

海军军医大学第二附属医院器官移植科, 上海 200003

[中图分类号] R446.69 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0559.2025.0324

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 郑鳧洋, 韩澍, 杨璟辉, 等. 外周血 sHLA-G 联合免疫细胞因子在肾移植排斥反应鉴别诊断中的应用价值[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(7): 839-846.

[收稿日期] 2024-04-25 [录用日期] 2024-11-11 [上线日期] 2025-03-24

[摘要] **目的** 探讨外周血可溶性白细胞抗原 G(sHLA-G)联合免疫细胞因子在肾移植排斥反应鉴别诊断中的应用价值。**方法** 本研究为病例对照研究。纳入 2020 年 4 月—2023 年 12 月因血清肌酐升高在海军军医大学第二附属医院器官移植科住院的 81 例肾移植患者进行回顾性分析, 其中诊断为急性排斥反应 32 例(设为急性排斥组), 慢性排斥反应 29 例(设为慢性排斥组), 非排斥原因引起的肌酐升高 20 例(设为非排斥组)。选取同期住院和门诊随访血清肌酐正常且稳定的 50 例肾移植患者作为对照组。收集患者的临床资料, 包括性别、年龄、血清肌酐、估算肾小球滤过率(eGFR)和尿蛋白阳性比例等, 采集外周血并采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆 sHLA-G 及免疫细胞因子[γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子- β (TNF- β)、白细胞介素(IL)-2、IL-4、IL-10、IL-5、IL-6、IL-17]水平。将各组 and 全体肾移植患者按性别进行分层, 比较 sHLA-G 水平的差异。**结果** 与对照组比较, 急性排斥组、慢性排斥组、非排斥组血清肌酐水平和尿蛋白阳性比例明显升高, eGFR 明显降低, 且慢性排斥组和非排斥组血清肌酐水平高于急性排斥组, eGFR 低于急性排斥组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。急性排斥组、慢性排斥组、非排斥组、对照组在性别、年龄、血型、体重指数、移植时间和免疫抑制剂使用情况等方面差异均无统计学意义($P > 0.05$)。急性排斥组、慢性排斥组患者的血浆 sHLA-G 水平明显低于对照组 [(19.665 \pm 11.233) U/ml vs. (24.785 \pm 21.668) U/ml vs. (44.918 \pm 39.898) U/ml, $P < 0.05$]。慢性排斥组患者的 sHLA-G/IL-2 比值明显高于急性排斥组 (5.844 \pm 6.248 vs. 1.825 \pm 1.574, $P < 0.05$), 非排斥组患者的 sHLA-G/IFN- γ 比值明显高于慢性排斥组 (3.452 \pm 3.283 vs. 1.543 \pm 2.030, $P < 0.05$)。131 例肾移植患者中, 女性 sHLA-G 水平明显高于男性($P < 0.05$)。各组内比较, 慢性排斥组女性 sHLA-G 水平明显高于男性($P < 0.05$); 急性排斥组、非排斥组和对照组女性 sHLA-G 水平虽高于男性, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 外周血 sHLA-G 水平与肾移植排斥反应存在相关性。sHLA-G/IL-2 比值在肾移植急性与慢性排斥反应, 以及 sHLA-G/IFN- γ 比值在肾移植慢性排斥反应与非排斥反应致肌酐升高的诊断和鉴别诊断中具有潜在的应用价值。

[关键词] 肾移植; 排斥反应; 可溶性白细胞抗原 G; 细胞因子; 主要组织相容性复合体

Application value of peripheral blood soluble HLA-G combined with immune cytokines in the differential diagnosis of renal transplant rejection

Zheng Xue-Yang, Han Shu, Yang Jing-Hui, Wang Ji-Yuan, Ding Yue, Chen Yu, Zhu Fan-Yuan

Department of Organ Transplantation, the Second Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200003, China

*Corresponding author, E-mail: hanshu73@163.com

This work was supported by the General Project of Shanghai Municipal Health Commission (201940020)

[Abstract] **Objective** To investigate the application value of peripheral blood soluble human leukocyte antigen-G (sHLA-G) combined with immune cytokines in the differential diagnosis of renal transplant rejection. **Methods** This case-control study retrospectively analyzed 81 renal transplant patients hospitalized in the Department of Organ Transplantation, the Second Affiliated

[基金项目] 上海市卫生健康委面上项目(201940020)

[作者简介] 郑鳧洋, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事肾移植方面的研究

[通信作者] 韩澍, E-mail: hanshu73@163.com

Hospital of Naval Medical University from April 2020 to December 2023, due to elevated serum creatinine. Among them, 32 patients were diagnosed with acute rejection (acute rejection group), 29 with chronic rejection (chronic rejection group), and 20 with elevated creatinine due to non-rejection causes (non-rejection group). Fifty renal transplant inpatients and outpatients with normal and stable serum creatinine were selected as control group during the same period. Clinical data such as gender, age, serum creatinine, estimated glomerular filtration rate (eGFR), and urine protein positive rate, etc. were collected. Peripheral blood of patients was sampled to measure the levels of plasma sHLA-G and immune cytokines [interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- β (TNF- β), interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10, IL-5, IL-6, IL-17] using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Stratify and compare the differences in sHLA-G levels among different groups and all renal transplant inpatients by gender. **Results** Compared with control group, serum creatinine levels and urine protein positive rate were significantly higher in acute rejection group, chronic rejection group, and non-rejection group, while eGFR was significantly lower, serum creatinine levels in chronic rejection group and non-rejection group were higher than those in acute rejection group, while eGFR was lower than that in acute rejection group, with statistically significant differences ($P < 0.05$). No statistically significant differences were observed in gender, age, blood type, body mass index, transplantation duration, and immunosuppressive agent use among acute rejection, chronic rejection, non-rejection, and control groups ($P > 0.05$). Plasma sHLA-G levels in acute rejection and chronic rejection groups were significantly lower than those in control group [(19.665 \pm 11.233) U/ml vs. (24.785 \pm 21.668) U/ml vs. (44.918 \pm 39.898) U/ml, $P < 0.05$]. The sHLA-G/IL-2 ratio in chronic rejection group was significantly higher than that in acute rejection group (5.844 \pm 6.248 vs. 1.825 \pm 1.574, $P < 0.05$), and the sHLA-G/IFN- γ ratio in non-rejection group was significantly higher than that in chronic rejection group (3.452 \pm 3.283 vs. 1.543 \pm 2.030, $P < 0.05$). Among 131 renal transplant inpatients, female sHLA-G levels were significantly higher than male ($P < 0.05$). Within each group, female sHLA-G levels in chronic rejection group were significantly higher than male ($P < 0.05$). Although female sHLA-G levels in acute rejection, non-rejection, and control groups were higher than those of male, the gender difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusions** Peripheral blood sHLA-G levels are correlated with renal transplantation rejection. The application of sHLA-G/IL-2 and sHLA-G/IFN- γ ratios has potential value in the diagnosis and differentiation of elevated creatinine caused by acute/chronic rejection, chronic rejection and non-rejection causes, respectively.

[Key words] kidney transplantation; transplant rejection; human leukocyte antigen-G; immune cytokines; major histocompatibility complex

随着手术技术的逐渐完善和围手术期管理的不断加强,肾移植已成为治疗终末期肾病的最佳手段^[1-2]。然而,由于供受体主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)与其他细胞表位不相容,肾移植术后排斥反应仍是目前临床上面临的主要问题^[3-4],但肾移植排斥反应的诊断一直缺乏有效且无创的标志物。人类白细胞抗原G(human leukocyte antigen-G, HLA-G)属于非经典MHC I b类分子,最初是在绒毛膜外滋养层细胞中发现的,在维持胎儿-母体免疫耐受中起重要作用^[5-6];之后也在健康个体的免疫特赦组织如角膜^[7]、胸腺髓质^[8]中发现,被认为是一种有助于免疫耐受和抵抗排斥反应的分子。HLA-G基因通过选择性剪切最终表达7种蛋白质分子亚型,包括4种膜结合型(mHLA-G)和3种可溶型(sHLA-G)^[9]。在肝肾联合移植和肺移植中发现,HLA-G表达阳性的组织与排斥反应的发生呈负相关^[10-11]。相较于组织表面的mHLA-G, sHLA-G同样具有免疫抑制的特性,在临床上也更容易获取标本进行检测,但其与肾移植排斥反应尤其是慢性排斥反应的相关性研究鲜见。为此,本研究采用酶联免疫吸附法(ELISA)对肾移植患者外周血sHLA-G和免疫细胞因子进行检测,探讨sHLA-G联合免疫细胞因子在肾移植排斥反应鉴别诊

断中的应用价值,以期为肾移植排斥反应的诊治提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究为病例对照研究。纳入2020年4月—2023年12月因血清肌酐升高在海军军医大学第二附属医院器官移植科住院的81例肾移植患者进行回顾性分析,其中诊断为急性排斥反应32例(39.5%,设为急性排斥组),慢性排斥反应29例(35.8%,设为慢性排斥组),非排斥原因引起的肌酐升高20例(24.7%,设为非排斥组)。根据肾移植手术时间(优先选取同一对供肾的受者),并结合年龄、性别、免疫抑制剂使用情况、既往排斥反应、依从性和配合度,选取同期住院和门诊随访血清肌酐正常且稳定的50例肾移植患者作为对照组(其中急性排斥反应对照21例,慢性排斥反应对照29例)。排除标准:年龄 < 18 岁;二次(多次)肾移植或多器官联合移植;ABO血型不相容的肾移植;女性处于妊娠期或人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)异常升高;合并实体器官肿瘤或正处于放化疗期间;细菌性感染急性期;自身免疫性疾病急性发作期。本研究获海军军医大学第二附属医院伦理委员会批准(2020SLYS8)。

1.2 诊断标准 肾移植急性和慢性排斥反应的诊断标准参考《中国肾移植排斥反应临床诊疗指南(2016版)》^[12]和《肾移植排斥反应临床诊疗技术规范(2019版)》^[13]。急性排斥反应主要以临床诊断为主,对症状不典型的急性排斥反应、所有慢性排斥反应以及肌酐升高病因不明确鉴别诊断困难者进行移植肾穿刺活组织病理检查。

1.3 sHLA-G和免疫细胞因子检测 住院患者在出现肌酐升高的次日采集静脉血,通过门诊收治的患者在办理住院的次日采集静脉血,且外周血样本采集均在移植肾穿刺前完成。肌酐正常且稳定的肾移植患者外周血来自同期住院和门诊随访患者。所有患者均在清晨空腹状态下抽取全血3~5 ml,常规离心提取血浆,于-80℃冰箱储存。采用sHLA-G ELISA试剂盒(上海司鼎生物科技有限公司)测定sHLA-G水平,具体操作按说明书进行。使用分光光度计在450 nm波长下测定吸光度(OD)值,每个样品测量两次,结果取平均值。将标准品稀释至不同浓度并测定系列OD值构建标准曲线,再根据样品OD值计算出相应的sHLA-G含量。该试剂盒可检测的最低sHLA-G浓度为1.5 U/ml。

采用ELISA试剂盒(上海司鼎生物科技有限公司)检测免疫细胞因子 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- β (tumor necrosis factor- β , TNF- β)、白细胞介素(interleukin, IL)-2、IL-4、IL-10、IL-5、IL-6、IL-17水平。

1.4 观察指标 (1)通过病历和就诊记录收集患者的临床资料,包括性别、年龄、血型、体重指数(body mass index, BMI)、移植时间、免疫抑制剂使用情况、血清肌酐水平、估算肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate, eGFR)和尿蛋白阳性比例;(2)收集sHLA-G和免疫细胞因子数据,并将同一患者同一时间抽血检测的sHLA-G/IL-2、sHLA-G/IFN- γ 及TNF- β /IL-4比值作为独立指标进行比较分析;(3)保留活检证实的急性排斥反应和活检证实的慢性排斥肾移植患者,将sHLA-G和免疫细胞因子数据以及sHLA-G/IL-2、sHLA-G/IFN- γ 、TNF- β /IL-4比值与对照组进行比较;(4)将各组 and 全体肾移植患者按性别进行分层,比较sHLA-G水平的差异。

1.5 统计学处理 采用SPSS 21.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用LSD法;按性别分组后两组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组临床资料比较 131例肾移植患者年龄19~

73(42.9 \pm 19.3)岁;男89例(67.9%),女42例(32.1%);移植时间1~317个月,中位时间27个月;免疫抑制剂使用他克莫司95例(72.5%),环孢素A33例(25.2%),西罗莫司4例(3.1%)。非排斥反应所致肌酐升高的具体原因包括腹泻5例、移植肾动脉狭窄2例、移植肾积水或结石3例、BK病毒感染2例、移植后淋巴增殖性疾病1例、狼疮肾炎复发1例、IgA肾病复发1例、新型冠状病毒感染5例。

与对照组比较,急性排斥组、慢性排斥组、非排斥组血清肌酐水平和尿蛋白阳性比例明显升高,eGFR明显降低,且慢性排斥组和非排斥组血清肌酐水平高于急性排斥组,eGFR低于急性排斥组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。急性排斥组、慢性排斥组、非排斥组、对照组在性别、年龄、血型、BMI、移植时间和免疫抑制剂使用情况等方面比较差异均无统计学意义($P>0.05$)(表1)。

2.2 各组sHLA-G和免疫细胞因子水平比较 与对照组比较,急性排斥组sHLA-G、TNF- β 水平以及sHLA-G/IL-2、sHLA-G/IFN- γ 比值明显降低,IFN- γ 、IL-2、IL-10、IL-17水平明显升高($P<0.05$),慢性排斥组sHLA-G水平及sHLA-G/IFN- γ 比值明显降低,IFN- γ 、TNF- β 、IL-10、IL-6、IL-17水平明显升高($P<0.05$),非排斥组IFN- γ 、TNF- β 、IL-10、IL-5、IL-17水平明显升高($P<0.05$)。与急性排斥组比较,慢性排斥组TNF- β 、IL-10水平及sHLA-G/IL-2比值明显升高($P<0.05$),非排斥组TNF- β 水平明显升高($P<0.05$)。与慢性排斥组比较,非排斥组IL-6水平明显降低,sHLA-G/IFN- γ 比值明显升高($P<0.05$)(表2)。

81例血清肌酐升高的肾移植患者中,急性排斥组中有14例(43.8%,14/32)通过移植肾穿刺活检确诊,慢性排斥组所有29例(100.0%,29/29)患者均通过移植肾穿刺活检确诊,非排斥组中有2例(10.0%,2/20)通过病理证实为肾炎复发,所有病理诊断均符合Banff标准。

与对照组比较,活检证实的急性排斥组sHLA-G、TNF- β 水平及sHLA-G/IL-2比值明显降低($P<0.05$),IFN- γ 、IL-2、IL-17水平明显升高($P<0.05$),活检证实的慢性排斥组sHLA-G水平及sHLA-G/IFN- γ 比值明显降低($P<0.05$),IFN- γ 、TNF- β 、IL-10、IL-6、IL-17水平明显升高($P<0.05$)。与活检证实的急性排斥组比较,活检证实的慢性排斥组TNF- β 水平及sHLA-G/IL-2比值明显升高($P<0.05$)(表3)。

2.3 肾移植患者中sHLA水平与性别的关系 所有131例肾移植患者中,女性患者的sHLA-G水平明显高于男性,差异有统计学意义($P<0.05$)。各组内比较,慢性排斥组女性患者的sHLA-G水平明显高于男性,差异有统计学意义($P<0.05$);急性排斥组、非排

表1 各组肾移植患者临床资料比较

Tab.1 Comparison of clinical data of renal transplant recipients in different groups

指标	对照组(n=50)	急性排斥组(n=32)	慢性排斥组(n=29)	非排斥组(n=20)	χ^2/F	P
性别[男,例(%)]	36(72.0)	22(68.8)	18(62.1)	13(65.0)	0.612	0.434
年龄(岁, $\bar{x}\pm s$)	43.1 \pm 14.4	46.8 \pm 8.0	41.2 \pm 10.5	41.3 \pm 8.7	0.467	0.632
血型[例(%)]					5.864	0.118
O型	24(48.0)	13(40.6)	17(58.6)	11(55.0)		
A型	9(18.0)	3(9.4)	1(3.4)	2(10.0)		
B型	16(32.0)	15(46.9)	6(20.7)	5(25.0)		
AB型	1(2.0)	1(3.1)	5(17.2)	2(10.0)		
BMI(kg/m ² , $\bar{x}\pm s$)	20.80 \pm 4.04	22.30 \pm 4.66	20.21 \pm 4.84	21.67 \pm 1.14	2.103	0.134
移植时间(月, $\bar{x}\pm s$)	61.37 \pm 81.30	49.20 \pm 73.58	73.80 \pm 33.25	111.73 \pm 103.20	1.890	0.152
免疫抑制剂[例(%)]					4.015	0.134
他克莫司	41(82.0)	27(84.4)	14(48.3)	13(65.0)		
环孢素A	8(16.0)	3(9.4)	15(51.7)	7(35.0)		
西罗莫司	1(2.0)	2(6.3)	0	1(5.0)		
血清肌酐(μ mol/L, $\bar{x}\pm s$)	111.15 \pm 70.52	156.60 \pm 43.57 ⁽¹⁾	340.40 \pm 152.07 ⁽¹⁾⁽²⁾	267.36 \pm 209.72 ⁽¹⁾⁽²⁾	78.353	<0.001
eGFR(ml/min, $\bar{x}\pm s$)	73.15 \pm 25.08	56.40 \pm 25.14 ⁽¹⁾	20.60 \pm 13.94 ⁽¹⁾⁽²⁾	34.91 \pm 20.95 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	20.089	<0.001
尿蛋白阳性[例(%)]	18(36.0)	22(68.8) ⁽¹⁾	23(79.3) ⁽¹⁾	16(80.0) ⁽¹⁾	19.956	<0.001

BMI. 体重指数; eGFR. 估算肾小球滤过率; 与对照组比较, (1) P <0.05; 与急性排斥组比较, (2) P <0.05; 与慢性排斥组比较, (3) P <0.05

表2 各组肾移植患者的sHLA-G和免疫细胞因子水平比较($\bar{x}\pm s$)Tab.2 Comparison of the levels of sHLA-G and immune cytokines among different groups of renal transplant recipients ($\bar{x}\pm s$)

指标	对照组(n=50)	急性排斥组(n=32)	慢性排斥组(n=29)	非排斥组(n=20)	F	P
sHLA-G(U/ml)	44.918 \pm 39.898	19.665 \pm 11.233 ⁽¹⁾	24.785 \pm 21.668 ⁽¹⁾	32.681 \pm 33.027	13.407	<0.001
IFN- γ (pg/ml)	40.108 \pm 52.677	109.396 \pm 100.381 ⁽¹⁾	76.890 \pm 109.165 ⁽¹⁾	78.465 \pm 91.847 ⁽¹⁾	7.680	<0.001
TNF- β (pg/ml)	349.780 \pm 187.593	251.744 \pm 61.073 ⁽¹⁾	533.760 \pm 605.158 ⁽¹⁾⁽²⁾	516.322 \pm 495.989 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.823	0.437
IL-2(pg/ml)	11.303 \pm 15.687	26.058 \pm 24.828 ⁽¹⁾	15.857 \pm 25.122	16.293 \pm 20.084	0.901	0.410
IL-4(pg/ml)	43.755 \pm 87.016	49.203 \pm 73.580	66.449 \pm 110.411	74.058 \pm 102.310	0.882	0.421
IL-10(pg/ml)	7.502 \pm 8.871	16.762 \pm 20.698 ⁽¹⁾	23.402 \pm 24.758 ⁽¹⁾⁽²⁾	21.107 \pm 43.171 ⁽¹⁾	8.558	<0.001
IL-5(pg/ml)	161.259 \pm 72.601	167.695 \pm 42.895	172.636 \pm 102.810	308.771 \pm 507.738 ⁽¹⁾	4.244	0.017
IL-6(pg/ml)	62.335 \pm 30.289	79.671 \pm 69.133	165.417 \pm 218.609 ⁽¹⁾	73.682 \pm 35.721 ⁽³⁾	9.032	<0.001
IL-17(pg/ml)	13.356 \pm 21.034	40.241 \pm 48.683 ⁽¹⁾	32.600 \pm 51.577 ⁽¹⁾	36.891 \pm 66.491 ⁽¹⁾	5.432	0.009
sHLA-G/IL-2	7.794 \pm 7.946	1.825 \pm 1.574 ⁽¹⁾	5.844 \pm 6.248 ⁽²⁾	5.002 \pm 8.239	15.201	<0.001
sHLA-G/IFN- γ	4.777 \pm 5.834	0.853 \pm 0.967 ⁽¹⁾	1.543 \pm 2.030 ⁽¹⁾	3.452 \pm 3.283 ⁽³⁾	18.620	<0.001
TNF- β /IL-4	67.594 \pm 95.493	46.957 \pm 76.666	47.834 \pm 44.093	62.681 \pm 99.332	0.863	0.429

sHLA-G. 可溶性白细胞抗原G; IFN- γ . γ 干扰素; TNF- β . 肿瘤坏死因子- β ; IL. 白细胞介素; 与对照组比较, (1) P <0.05; 与急性排斥组比较, (2) P <0.05; 与慢性排斥组比较, (3) P <0.05

斥组和对照组女性患者的sHLA-G水平虽高于男性, 但差异均无统计学意义(P >0.05)(表4)。

3 讨论

HLA-G基因最早于1987年被发现属于非经典MHC I家族成员^[14]。该基因位于人类6号染色体短臂6p21.3, 已描述的等位基因有88个, 长度为3151 bp^[15], 包含8个外显子、7个内含子、5'上游调节区域(upstream regulatory region, URR)和3'非翻译区域(untranslated region, UTR), 转录时通过选择性

剪切形成7种mRNAs, 分别编码4种mHLA-G(HLA-G1、G2、G3、G4)和3种sHLA-G(HLA-G5、G6、G7)^[9]。此外, sHLA-G还可通过基质金属蛋白酶水解mHLA-G脱落生成^[16], 也可由mHLA-G以细胞外囊泡的形式进入血液循环^[17]。HLA-G表达与器官移植的关系最早始于2000年的一项心脏移植研究^[18], 此后相继有不同的研究发现其在不同的实体移植器官中表达, 包括心、肾、肝、肺移植及肝肾联合移植、胰肾联合移植等, 但所用的检测方法有所不同^[19]。在器官移植的过程中, HLA-G表达水平对移

表3 活检证实的排斥反应患者sHLA-G和免疫细胞因子水平比较($\bar{x}\pm s$)Tab.3 Comparison of the levels of sHLA-G and immune cytokines in recipients with biopsy-proven allograft rejection ($\bar{x}\pm s$)

指标	对照组(n=50)	活检证实的急性排斥组(n=14)	活检证实的慢性排斥组(n=29)	P ¹	P ²	P ³
sHLA-G(U/ml)	44.918±39.898	17.234±15.265	24.785±21.668	0.002	0.012	0.250
IFN- γ (pg/ml)	40.108±52.677	89.698±95.164	76.890±109.165	0.027	0.027	0.780
TNF- β (pg/ml)	349.780±187.593	233.974±60.022	533.760±605.158	0.004	0.011	0.022
IL-2(pg/ml)	11.303±15.687	27.361±22.715	15.857±25.122	0.010	0.296	0.155
IL-4(pg/ml)	43.755±87.016	44.399±77.649	66.449±110.411	0.980	0.315	0.507
IL-10(pg/ml)	7.502±8.871	13.796±17.398	23.402±24.758	0.097	<0.001	0.201
IL-5(pg/ml)	161.259±72.601	173.312±40.721	172.636±102.810	0.502	0.553	0.980
IL-6(pg/ml)	62.335±30.289	79.847±71.347	165.417±218.609	0.204	<0.001	0.112
IL-17(pg/ml)	13.356±21.034	38.283±44.494	32.600±51.577	0.012	0.008	0.726
sHLA-G/IL-2	7.794±7.946	1.694±1.539	5.844±6.248	<0.001	0.261	0.006
sHLA-G/IFN- γ	4.777±5.834	0.916±1.048	1.543±2.030	0.450	0.003	0.254
TNF- β /IL-4	67.594±95.493	46.334±80.313	47.834±44.093	0.450	0.279	0.934

sHLA-G. 可溶性白细胞抗原G; IFN- γ . γ 干扰素; TNF- β . 肿瘤坏死因子- β ; IL. 白细胞介素; ¹活检证实的急性排斥组与对照组比较; ²活检证实的慢性排斥组与对照组比较; ³活检证实的慢性排斥组与活检证实的急性排斥组比较

表4 各组不同性别肾移植患者的sHLA-G水平比较($\bar{x}\pm s$, U/ml)Tab.4 Comparison of sHLA-G levels in different genders among different groups of kidney transplant recipients ($\bar{x}\pm s$, U/ml)

性别	对照组(n=50)		急性排斥组(n=32)		慢性排斥组(n=29)		非排斥组(n=20)		合计(n=131)	
	例数	sHLA-G	例数	sHLA-G	例数	sHLA-G	例数	sHLA-G	例数	sHLA-G
男	36	39.454±32.614	22	19.330±14.656	18	13.041±4.697	13	22.233±24.801	89	32.775±30.033
女	14	76.335±66.714	10	20.167±8.621	11	32.615±26.422	7	50.965±41.295	42	49.798±46.010
t		-1.896		-0.231		-2.334		-1.959		-2.097
P		0.077		0.819		0.041		0.066		0.040

sHLA-G. 可溶性白细胞抗原G

植物的存活有重要影响。Créput等^[10]分析了40例肝肾联合移植中肝和肾活检标本中mHLA-G的表达情况,发现有14例移植肝mHLA-G表达阳性,9例移植肾mHLA-G表达阳性;进一步研究发现,mHLA-G表达阳性的组织与排斥反应的发生呈负相关,且在移植肝mHLA-G表达阳性的患者中,其移植肾也未发生急性或慢性排斥反应。一项关于肺移植的前瞻性研究也支持该结论,该研究发现移植肺支气管内皮细胞中mHLA-G的表达可显著降低慢性排斥反应的发生风险^[11]。相关机制研究表明,HLA-G主要与目前已知的4种受体[免疫球蛋白样转录因子(Ig-like transcript, ILT)-2、ILT-4、杀手细胞免疫球蛋白受体2DL4(KIR2DL4)和CD160]结合发挥免疫调节/抑制作用,包括下调NK细胞和CD8⁺T细胞的细胞毒作用,抑制CD4⁺T细胞的反应性增殖,诱导产生新型的调节性T细胞(Tregs)以及经典的CD25⁺FOXP3⁺Tregs,也可诱导HLA-G⁺树突细胞产生大量的IL-10^[20],故有利于同种异体移植体被接受并防止排斥反应的发生。尽管移植体mHLA-G的表达与移植排斥密切相关,但临床上难以通过无创的方法进行检测。相较于

mHLA-G, sHLA-G存在于受体血清中,临床上易于获取,有部分研究表明sHLA-G与移植体mHLA-G水平相关,且对移植器官具有保护作用,有助于降低急性排斥反应的发生风险^[19-20],但尚缺乏其与慢性排斥反应关系的研究。本研究采用ELISA法检测外周血sHLA-G水平,发现无论是发生急性排斥反应还是慢性排斥反应的肾移植患者,其sHLA-G水平均明显低于对照组,提示外周血sHLA-G水平与肾移植排斥反应呈负相关。

本研究发现,非排斥反应致肌酐升高的肾移植患者sHLA-G水平较对照组有所下降,但差异无统计学意义,分析原因可能与非排斥反应致肌酐升高的肾移植患者本身疾病构成较复杂有关,表明sHLA-G虽有助于鉴别发生排斥反应的肾移植患者,但不能不加限制地用于肌酐升高的肾移植患者中。此外,sHLA-G水平呈现出急性排斥组<慢性排斥组<非排斥组的变化趋势,但各组间比较差异无统计学意义,表明单独应用sHLA-G鉴别肾移植急、慢性排斥反应,以及慢性排斥反应与非排斥反应致肌酐升高存在不足或局限性。分析原因可能与sHLA-G的影响因

素较多有关：(1)HLA-G基因多态性的影响。如HLA-G*010SN空等位基因突变导致 $\alpha 2$ 结构域缺失，使HLA-G1、G4和G5的表达减少^[9]。3'UTR的不同基因型也可影响sHLA-G的表达水平，如单倍型UTR-1与sHLA-G的表达增加相关，单倍型UTR-5和UTR-7与sHLA-G的表达减少相关，而UTR-2、3、4、6、8、10与sHLA-G的表达无明显关系^[20]。3'UTR的14 bp插入/缺失、+3142 C/G和+3187 A/G变异也可通过影响mRNA的稳定性导致sHLA-G表达水平出现差异^[9,20]。(2)免疫细胞因子与HLA-G相互作用的影响。有研究表明，抗炎细胞因子IL-10、IL-4可上调外周血单个核细胞中HLA-G的表达^[21]；促炎细胞因子IL-2、IL-6可下调绒毛膜癌细胞系JEG-3中HLA-G的表达^[22]；IFN- γ 可诱导ILT-4和其他HLA-G抑制受体的表达，从而间接影响HLA-G的水平^[23]。同样，HLA-G在发挥免疫调节的过程中也会增强Th2抗炎细胞因子IL-4、IL-10及IL-13的表达，降低Th1促炎细胞因子IL-2、TNF- α 及IFN- γ 的表达^[24]。(3)不同疾病和病理状态的影响。多种病毒感染可通过诱导mHLA-G和sHLA-G的表达逃脱免疫监视，使感染的宿主细胞免于被免疫效应细胞杀伤^[25]。血浆或血清中sHLA-G在乳腺癌、肺癌患者中升高，以及血浆和唾液中sHLA-G在胃肠道肿瘤患者中升高，可作为诊断和评估预后的重要生物标志物^[26]。变应性鼻炎患者血清sHLA-G水平升高且与变应原特异性IgE水平、临床严重程度、药物治疗和变应原特异性免疫治疗反应有关^[27]。(4)免疫抑制剂的影响。Sheshgiri等^[28]在心脏移植受者中发现，与使用吗替麦考酚酯的患者相比，使用依维莫司的患者具有更高的sHLA-G水平。Crispim等^[29]发现，使用他克莫司的肾移植患者的HLA-G水平高于使用环孢素A的患者。Bahri等^[30]发现，肾移植患者使用细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA4)免疫球蛋白贝拉西普治疗后诱导HLA的表达，其血浆sHLA-G水平明显高于使用钙调磷酸酶抑制剂的受者或健康供者。但也有体外实验表明，免疫抑制剂包括依维莫司、他克莫司、环孢素A和地塞米松并不能诱导肾小管上皮细胞中HLA-G的表达^[31]。本研究收集数据时发现，肾移植患者使用糖皮质激素和(或)抗胸腺细胞球蛋白(antithymocyte globulin, ATG)后sHLA-G水平较使用前明显下降，然后随时间延长再逐渐升高，推测糖皮质激素和ATG也会影响HLA-G的表达，因此通过动态监测外周血sHLA变化的速度和幅度来评估排斥反应的发生风险可能具有一定临床意义。(5)性别和代谢性疾病的影响。因HLA-G主要在母体-胎儿免疫耐受中发挥作用，有研究认为性别也是sHLA-G的影响因素，女性比男性具有更高水平的

sHLA-G^[32]；有无妊娠或哺乳经历的乳腺癌患者sHLA-G水平也存在明显差异^[33]。本研究按照性别进行分层分析发现，在131例肾移植患者中，女性患者的sHLA水平明显高于男性($P < 0.05$)；各组中仍表现出女性患者sHLA-G水平较高的趋势，其中慢性排斥组性别间存在统计学差异，而急性排斥组和非排斥组性别间差异无统计学意义，分析原因可能与分组后样本量较小有关，因此还需要进行大样本进行验证。此外，Piancatelli等^[34]发现，肾移植患者在移植后第1年血浆sHLA-G水平明显下降，携带HLA-G 14 bp插入/插入或+3142 G/G基因型的糖尿病或肥胖患者移植后sHLA-G水平更低，认为肾移植患者的sHLA-G水平不仅受免疫因素影响，也受到代谢性因素影响。

既往研究显示IL-2、IFN- γ 、IL-17等细胞因子与移植排斥联系紧密^[35]。本研究检测sHLA-G的同时也对同一患者同一时间的部分Th1、Th2类细胞因子及IL-17进行检测。与sHLA-G类似，单独应用某一个细胞因子同样不能鉴别有无肾移植排斥反应及排斥反应的类型，且细胞因子间的调控更为复杂。本研究发现，sHLA-G水平在对照组、非排斥组、慢性排斥组、急性排斥组呈依次降低的趋势，而IL-2和IFN- γ 水平在上述各组中的变化趋势则相反。结合HLA-G与细胞因子间的相互影响(促炎细胞因子IL-2、IFN- γ 可下调HLA-G的表达，而HLA-G也可降低IL-2、IFN- γ 的表达)，即HLA-G与IL-2、IFN- γ 表现出相互逆向的调节和变化，可以假设肾移植患者在发生排斥反应时使用sHLA-G/IL-2比值和sHLA-G/IFN- γ 比值作为独立检测指标可扩大差异，提高鉴别诊断的灵敏性。本研究结果显示，sHLA-G/IL-2比值在急性排斥组较慢性排斥组下降更为明显且差异有统计学意义，可作为肾移植急慢性排斥反应鉴别诊断的有益补充，有助于更早、更及时地预警急性排斥反应的发生。临床上对于肌酐慢性升高的人群尚缺乏简便有效的诊断方法，慢性排斥和非排斥反应引起的肌酐升高常难以鉴别，最终须依赖移植肾穿刺活检进行诊断。sHLA-G/IFN- γ 比值在慢性排斥反应和非排斥反应致肌酐升高的患者间差异有统计学意义，提示其可能是在慢性肌酐升高的肾移植患者中鉴别慢性排斥反应的参考指标之一，对肾移植慢性排斥反应的无创诊断具有潜在的应用价值。究其原因可能与IL-2、IFN- γ 产生和维持的时限不同，以及在不同病理状态下发挥的作用不同有关。IL-2主要来源于活化的T细胞，且与其受体IL-2R的相互作用是T细胞活化及激活免疫反应的关键。Tefik等^[36]在预测亲属活体肾移植早期排斥反应的研究中发现，活检证实急性排斥反应的患者术后第1天和第7天血清

IL-2较肾功能稳定的患者明显升高,而术后第7天和1个月时血清IL-8较肾功能稳定患者明显升高,且IL-8可维持维持在较高水平11(7~30)d,IL-2和IL-8水平升高及持续时间均与肾移植后早期排斥反应相关。IL-2在免疫激活早期反应迅速的特性使其更适用于肾移植排斥反应急性活动期的诊断。IFN- γ 主要由活化的T细胞和NK细胞产生,能够在多种组织中诱导MHC的表达。体内的IFN- γ 在移植早期对血管化同种异体移植物具有保护作用,有研究证实IFN- γ 缺陷小鼠的移植物早期由于微循环衰竭而具有发生坏死的趋势^[37]。而在移植后远期,NK细胞产生的IFN- γ 可与供者的特异性抗体协同作用,通过接触依赖性细胞毒性机制,独立于T细胞和B细胞促进慢性移植物血管病变^[38]。Zhao等^[39]发现,在C3H \rightarrow C57BL/6抗体介导的排斥反应小鼠模型中,肾移植后外周血中NK细胞和相关细胞因子(INF- γ 、穿孔素、颗粒酶B、TNF- α)呈高表达,证实了NK细胞和IFN- γ 在抗体介导的排斥反应中起着至关重要的作用。因此,IFN- γ 促进慢性移植物血管病变并与抗体介导的排斥反应密切相关的特性,使其在慢性排斥反应的鉴别诊断中具有应用价值。

sHLA-G与细胞因子以及不同的细胞因子之间都存在相互影响,且在不同疾病及疾病的不同阶段可能表现出较大差异。临床上,对于血清肌酐慢性升高的肾移植患者,其肌酐升高的具体时间和原因常难以回溯,只能依赖病史和既往检测数据进行大体判断,给临床诊断和鉴别带来了困难,也是本研究不可避免的局限性。尽管笔者通过对研究对象的严格限定及检测时间点的控制尽可能减少选择偏倚,也通过sHLA-G与相关细胞因子的比值作为独立统计指标尽量减少两者的相互影响及个体差异的影响,但仍不能克服此局限性对慢性排斥反应结果的影响。后续研究应重点关注sHLA-G的动态变化,sHLA-G与移植物mHLA-G的量效关系,细化sHLA-G与HLA-G基因多态性、性别、地域和族群差异、排斥时间及排斥反应严重程度的关系,以弥补该研究的不足。

综上所述,本研究结果显示,外周血sHLA-G水平与肾移植排斥反应存在相关性。单独应用sHLA-G有助于诊断肾移植排斥反应,但在急慢性排斥反应与非排斥反应致肌酐升高患者的鉴别诊断中仍存在局限。sHLA-G/IL-2比值在急性与慢性排斥反应,sHLA-G/IFN- γ 比值在慢性排斥反应与非排斥反应致肌酐升高的鉴别诊断中具有潜在的临床应用价值,可一定程度上弥补单用sHLA-G的局限。

【参考文献】

- [1] Wiebe C, Ho J, Gibson IW, *et al*. Carpe diem-Time to transition from empiric to precision medicine in kidney transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2018, 18(7): 1615-1625.
- [2] 夏新泽,赖文辉,黄帅,等. 2型糖尿病合并终末期肾病患者同期胰肾联合移植术后危险因素:UNOS数据库50230例分析[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(4): 371-379.
- [3] Jackson KR, Segev DL. Rethinking incompatibility in kidney transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2022, 22(4): 1031-1036.
- [4] 张菁菁,曹新岭,热衣汉·西里甫,等. 组织相容性复合体I类相关基因A抗体监测在肾移植术后急性及慢性排斥反应中意义[J]. *临床军医杂志*, 2024, 52(3): 316-317, 320.
- [5] Kovats S, Main EK, Librach C, *et al*. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts[J]. *Science*, 1990, 248(4952): 220-223.
- [6] 黄莉莉,张智勤,杜瑜,等. 醋酸戈舍瑞林联合安宫黄体酮对子宫内膜异位症患者可溶性人类白细胞抗原-G、E-钙黏附蛋白影响[J]. *临床军医杂志*, 2023, 51(3): 315-317, 320.
- [7] Le Discorde M, Moreau P, Sabatier P, *et al*. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue[J]. *Hum Immunol*, 2003, 64(11): 1039-1044.
- [8] Mallet V, Fournel S, Schmitt C, *et al*. Primary cultured human thymic epithelial cells express both membrane-bound and soluble HLA-G translated products[J]. *J Reprod Immunol*, 1999, 43(2): 225-234.
- [9] Arnaiz-Villena A, Juarez I, Suarez-Trujillo F, *et al*. HLA-G: function, polymorphisms and pathology[J]. *Int J Immunogenet*, 2021, 48(2): 172-192.
- [10] Créput C, Durrbach A, Menier C, *et al*. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation[J]. *J Hepatol*, 2003, 39(4): 587-594.
- [11] Cristofaro JD, Reynaud-Gaubert M, Carlini F, *et al*. HLA-G*01:04~UTR3 recipient correlates with lower survival and higher frequency of chronic rejection after lung transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2015, 15(9): 2413-2420.
- [12] 中华医学会器官移植分会,中国医师协会器官移植医师分会. 中国肾移植排斥反应临床诊疗指南(2016版)[J]. *器官移植*, 2016, 7(5): 6-12.
- [13] 中华医学会器官移植分会. 肾移植排斥反应临床诊疗技术规范(2019版)[J]. *器官移植*, 2019, 10(5): 505-512.
- [14] Geraghty D, Koller B, Orr H. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84(24): 9145-9149.
- [15] Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, *et al*. IPD-IMGT/HLA database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D948-D955.
- [16] Rizzo R, Trentini A, Bortolotti D, *et al*. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) generates soluble HLA-G1 by cell surface proteolytic shedding[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 381(1-2): 243-255.
- [17] Schwich E, Hò GG, Lemaoult J, *et al*. Soluble HLA-G and HLA-G bearing extracellular vesicles affect ILT-2 positive and ILT-2 negative CD8 T cells complementary[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 2046.
- [18] Lila N, Amrein C, Guillemain R, *et al*. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection[J]. *Circulation*, 2002, 105(16): 1949-1954.

- [19] Liu S, Bos NA, Verschuuren EAM, *et al.* Biological characteristics of HLA-G and its role in solid organ transplantation[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 902093.
- [20] Janssen M, Thaiss F, Nashan B, *et al.* Donor derived HLA-G polymorphisms have a significant impact on acute rejection in kidney transplantation[J]. *Hum Immunol*, 2019, 80(3): 176-183.
- [21] Li X, Sheng Z, Sun YX, *et al.* Human leukocyte antigen-G upregulates immunoglobulin-like transcripts and corrects dysfunction of immune cells in immune thrombocytopenia[J]. *Haematologica*, 2021, 106(3): 770-781.
- [22] Persson G, Bork JBS, Isgaard C, *et al.* Cytokine stimulation of the choriocarcinoma cell line JEG-3 leads to alterations in the HLA-G expression profile[J]. *Cell Immunol*, 2020, 352: 104110.
- [23] Svajger U, Obermajer N, Jeras M. IFN- γ -rich environment programs dendritic cells toward silencing of cytotoxic immune responses[J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 95(1): 33-46.
- [24] Bortolotti D, Gentili V, Rotola A, *et al.* Soluble HLA-G pre-transplant levels to identify the risk for development of infection in heart transplant recipients[J]. *Hum Immunol*, 2020, 81(4): 147-150.
- [25] Jasinski-Bergner S, Schmiedel D, Mandelboim O, *et al.* Role of HLA-G in viral infections[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 826074.
- [26] Kluckova K, Durmanova V, Bucova M. Soluble HLA-G, its diagnostic and prognostic value and potential target molecule for future therapy in cancer[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2021, 122(9): 609-617.
- [27] Negrini S, Contini P, Murdaca G, *et al.* HLA-G in allergy: does it play an immunoregulatory role? [J]. *Front Immunol*, 2022, 12: 789684.
- [28] Sheshgiri R, Gustafsson F, Sheedy J, *et al.* Everolimus but not mycophenolate mofetil therapy is associated with soluble HLA-G expression in heart transplant patients[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2009, 28(11): 1193-1197.
- [29] Crispim JCO, Duarte RA, Soares CP, *et al.* Human leukocyte antigen-G expression after kidney transplantation is associated with a reduced incidence of rejection[J]. *Transpl Immunol*, 2008, 18(4): 361-367.
- [30] Bahri R, Naji A, Menier C, *et al.* Dendritic cells secrete the immunosuppressive HLA-G molecule upon CTLA4-Ig treatment: implication in human renal transplant acceptance[J]. *J Immunol*, 2009, 183(11): 7054-7062.
- [31] Kumano S, Okushi Y, Fujimoto K, *et al.* Role and expression of non-classical human leukocyte antigen-G in renal transplanted allografts [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2021, 25(4): 428-438.
- [32] Rudstein-Svetlicky N, Loewenthal R, Horejsi V, *et al.* HLA-G levels in serum and plasma[J]. *Tissue Antigens*, 2006, 67(2): 111-116.
- [33] Zidi I, Kharrat N, Sebai R, *et al.* Pregnancy and breastfeeding: a new theory for sHLA-G in breast cancer patients? [J]. *Immunol Res*, 2016, 64(2): 636-639.
- [34] Piancatelli D, Maccarone D, Colanardi A, *et al.* Evaluation of plasma levels of soluble HLA-G and HLA-G genotypes in kidney transplant recipients[J]. *Transplant Proc*, 2020, 52(5): 1559-1561.
- [35] Millán O, Rafael-Valdivia L, San Segundo D, *et al.* Should IFN- γ , IL-17 and IL-2 be considered predictive biomarkers of acute rejection in liver and kidney transplant? Results of a multicentric study[J]. *Clin Immunol*, 2014, 154(2): 141-154.
- [36] Tefik T, Ciftci HŞ, Karadeniz MS, *et al.* Predictive value of interleukin 2 and interleukin 8 on early rejection in living related kidney transplant recipients[J]. *Transplant Proc*, 2019, 51(4): 1078-1081.
- [37] Hidalgo LG, Halloran PF. Role of IFN-gamma in allograft rejection [J]. *Crit Rev Immunol*, 2002, 22(4): 317-349.
- [38] Lin CM, Plenter RJ, Coulombe M, *et al.* Interferon gamma and contact-dependent cytotoxicity are each rate limiting for natural killer cell-mediated antibody-dependent chronic rejection[J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(11): 3121-3130.
- [39] Zhao YK, Li XK, Qiu Y, *et al.* Role of natural killer cells in antibody-mediated rejection of kidney transplantation[J]. *Altern Ther Health Med*, 2024: AT9050.

(责任编辑: 纪方方)

解放军医学杂志®