论著

文章编号:1000-5404(2005)06-0550-04

肾移植早期巨细胞病毒感染与慢性移植肾肾病关系的临床研究

王平贤,王安静,黄秀英,黄赤兵,范明齐,张艮甫 (第三军医大学新桥医院泌尿外科,全军肾脏病中心,重庆 400037)

提 要: 目的 探讨肾移植受者术后早期巨细胞病毒(CMV)感染与远期慢性移植肾肾病的关系。**方法** 自1999年8月至2001年3月,根据术后6个月内CMV-pp65抗原血症指数及其持续时间,将178例肾移植患者分为非活动性、低活动性、短期高活动性和长期高活动性CMV感染4组;3年后共有89例患者完成了全程随访,比较4组患者肾功不全的发生率和肌酐清除率(Ccr)损失量有无差异;对肾功不全的患者通过活检明确是否为慢性移植肾肾病(CAN)。**结果** 长期高活动性CMV感染的患者,在术后3年内Ccr减少了(15.8±8.3) ml/min、有52.4%(11/21)的患者肾功不全,二者均明显高于其它3组($P<0.01$)。肾功能不全者病理证实为慢性移植肾肾病。**结论** 肾移植术后早期长时间高活动性的CMV感染是削弱远期移植物功能,导致慢性移植肾肾病的重要原因。

关键词: 肾;移植;巨细胞病毒;肾病

中图法分类号: R512.99; R617; R692 **文献标识码**: A

Chronic allograft nephropathy associated with cytomegalovirus infection

WANG Ping-xian, WANG An-jing, HUANG Xiu-ying, HUANG Chi-bing, FAN Ming-qi, ZHANG Gen-fu (Renal Diseases Research Center, Department of Urinary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate whether cytomegalovirus (CMV) infection is associated with chronic allograft nephropathy (CAN). Methods From August 1, 1999 to May 30, 2001, 178 recipients of kidney transplantation were divided into four groups according to CMV-pp65 antigenemia (the number of CMV-pp65-positive leukocytes) and its duration of time in peripheral blood within the first 6 months posttransplantation. Group Ⅰ consisted of recipients with negative CMV-pp65 antigenemia. Group Ⅱ consisted of recipients with low active CMV infection (the antigenemia is from 1 to 30). Group Ⅲ consisted of recipients with short-time high active CMV infection (the antigenemia was more than 100 and lasted less than 2 weeks). Group Ⅳ consisted of recipients with long-time high active CMV infection (the antigenemia was more than 100 and lasted more than 8 weeks). Three years later, there were 89 patients who had finished the whole follow up. The number of patients with renal dysfunction and creatinine clearance (Ccr) was compared between one another. The kidneys with renal dysfunction were biopsied to determine whether they suffered from CAN. Results Three years later, in Group Ⅳ the loss of Ccr was (15.8±8.3) ml/min, and 52.4% (11/21) of patients suffered from renal dysfunction. More loss of Ccr and more number of renal dysfunction cases were found in Group Ⅳ than those in other 3 groups ($P<0.01$). The kidneys with renal dysfunction were all confirmed to be CAN through biopsies. Conclusion Serious CMV infection with long duration is associated with lower long-term survival rate of kidney graft. This kind of CMV infection may be a risk factor for CAN.

Key words: kidney; transplantation; cytomegalovirus; nephropathy

由于免疫抑制剂的发展和临床移植水平的提高,肾移植近期效果已明显改善,但远期效果至今未能得以相应的提高,移植肾的平均半寿期只有7~10年,这主要是因为慢性移植肾肾病(chronic allograft nephropathy, CAN)导致了不少患者于肾移植数月,特别是1年或数年后,移植肾功能进行性减退、最终肾功能衰竭,恢复透析[1]。近年来动物实验表明,巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)感染可能是导致CAN的重要原因之一[2]。在临床上,肾移植后早期活动性CMV感染高达50%~75%,它是否为导致CAN的原因目前尚未定论[3]。本研究旨在通过检测肾移植术后早期CMV抗原血症(CMV-pp65),对肾移植患者活动性CMV感染

作者简介:王平贤(1964-),男,湖南省双峰县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事器官移植方面的研究,发表论文23篇。电话:(023)68774617, E-mail: wpx8@21cn.com

收稿日期:2004-06-16;修回日期:2004-07-17

进行定量诊断，根据 CMV 感染的轻重和持续时间对患者进行分组，前瞻性观察各组患者移植肾的远期功能，以此探明 CMV 感染与慢性移植肾肾病的关系，为临床改善肾移植远期效果提供依据。

1　资料与方法

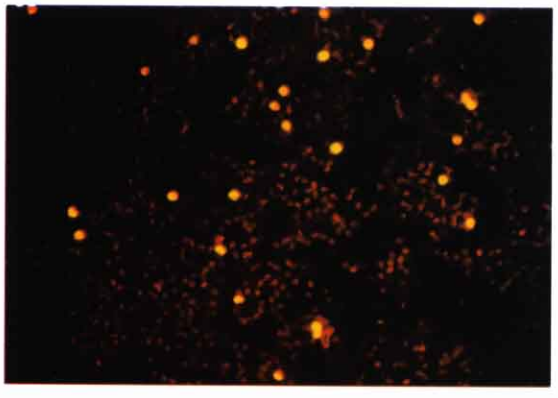
1.1　CMV-pp65 抗原血症检测

采外周血后分离 WBC，涂片、荧光染色，以荧光素标记的抗 pp65 单克隆抗体可与 WBC 内的 pp65 抗原结合，在荧光显微镜下 CMV-pp65 阳性 WBC 呈黄绿色。以每 5×10^4 个外周血 WBC 中 CMV-pp65 抗原阳性 WBC 的数量（称为“抗原血症指数”）对 CMV 抗原血症进行定量。

术后开始为每 2 周、3 个月后改为每 4 周检测 1 次；当发现 CMV-pp65(+)WBC 数 > 100/(5×10^4)WBC 时，第 2 周则复查 1 次；对 CMV 病疑是患者则随时检查，共为期 6 个月。CMV 检测试剂盒为荷兰 IQ 公司产品（购自深圳晶美生物工程有限公司）。

1.2　活动性 CMV 感染诊断标准

根据试剂盒中说明书指示，在每 5×10^4 个外周血 WBC 中，只要发现有 1 个 CMV-pp65(+)的 WBC，即“抗原血症指数” ≥1/(5×10^4)WBC，就可诊断为活动性 CMV 感染。本研究将“抗原血症指数” > 100/(5×10^4)WBC，定为“高活动性 CMV 感染”（图 1）。



CMV-pp65 antigen-positive cells (yellow-green fluorescent staining) surrounded by CMV-pp65 antigen-negative normal human leucocytes (reddish staining)

图 1　外周血白细胞涂片　（免疫荧光 ×200）

Fig 1　Human peripheral blood leucocytes　(immunofluorescence × 200)

1.3　CAN 的诊断标准

对肾移植后血清肌酐（Cr）异常升高（Cr > 114 μmol/L）的患者，通过以下步骤明确是否为 CAN。① 临床表现：血 Cr 异常升高发生在肾移植至少 6 个月以后，以甲基强的松龙等激素冲击治疗和调整免疫抑制剂等处理后肾功无好转，并且以后移植肾功能呈现出进行性减退的趋势；② 辅助检查：通过移植肾 B 超、CsA 或 FK506 血药浓度检测等，初步排除急性排斥反应、急性环孢素 A 中毒、梗阻/返流、肾血管狭窄、感染等可导致肾功能慢性损害的有着明确原因的疾患；③ 移植肾穿刺与组织学检查：对上述患者常规作移植肾穿刺活检，根据“Banff 97”分类标准，在组织学上移植肾没有急性排斥反应、急性环孢素 A 中毒、肾小球肾炎复发等特征性的病理改变，而是呈现出以间质纤维化、肾小管萎缩等为特点的各种非特异性病理改变。

1.4　研究对象与分组

在我院 1999 年 8 月至 2001 年 3 月期间、首次行肾移植的 217 例患者中，术后无肾功能恢复延迟、未使用过 ATG 等抗淋巴细胞球蛋白、术后 6 个月内移植肾功能正常、急性排斥反应 ≤2 次者、能按要求保持随访 6 个月以上的患者，共有 178 例。对上述患者进行前瞻性观察，其中能保持正常随访达 3 年以上，并能符合以下分组要求者共 89 例。

Ⅰ组（非活动性感染组）：在术后 6 个月内所规定的历次检查中，CMV-pp65 抗原血症始终为阴性，即“抗原血症指数”始终为 0，共 17 例。

Ⅱ组（低活动性感染组）：在术后 6 个月内，“抗原血症指数”最高值（峰值）在 1 ~ 30，共 33 例。

Ⅲ组（短期高活动性感染组）：在术后 6 个月内，“抗原血症指数”峰值 > 100，但持续时间 ≤2 周。共 18 例。

Ⅳ组（长期高活动性感染组）：在术后 6 个月内，“抗原血症指数”峰值 > 100，且持续时间 ≥8 周，共 21 例。

1.5　研究方法

3 年后比较 4 组患者肾功不全（Cr > 114 μmol/L）的病例数和肌酐清除率（Ccr）损失量有无差异；Ccr 损失量 = 术后 6 个月时的 Ccr-3 年后的 Ccr（恢复透析者则为首次透析前的 Ccr）。

对肾功不全的患者通过以上方法明确是否为 CAN。

组Ⅳ患者在年龄、性别、供者年龄、组织配型、冷缺血时间、免疫抑制剂使用、术后 6 个月时的 Ccr 等方面与其他患者比较有无差异。

1.6　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行 χ^2 检验、t 检验、方差分析（F 检验）。

2　结果

2.1　4 组患者术后 3 年内肾功能损失量、肾功异常的病例数比较

结果显示：Ⅳ组在术后 3 年内肾功能损失量、肾功不全病例数明显大于其它 3 组（表 1）。

表 1　4 组患者 3 年内肾功能损失量及肾功异常病例数比较

Tab 1　Loss of Ccr and number of patients with renal dysfunction within 3 years

Group	n	Cases with Cr > 114 μmol/L	Loss of Ccr (ml/min)
Ⅰ	17	1*	5.5±5.1**
Ⅱ	33	3*	6.1±5.4**
Ⅲ	18	1*	5.9±4.8**
Ⅳ	21	11	15.8±8.3

$F=5.37$，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* Ⅳ

2.2 Ⅳ组与其它患者多种因素比较

组Ⅳ在年龄、性别、供者年龄、组织配型、冷缺血时间、免疫抑制剂使用、术后6个月时的Ccr等方面与其他患者比较没有明显差异($P>0.05$)(表2)。

表2 组Ⅳ与其他患者多种因素比较

Tab 2 Comparison of various factors in Group Ⅳ and other groups

	Group Ⅳ($n=21$)	Group Ⅰ~Ⅲ($n=68$)	P value
Age (year)	32.9±6.2	33.2±8.7	>0.05
Gender(m/f)	12/9	37/31	>0.05
Donor age (year)	29.4±7.5	28.3±6.9	>0.05
HLA-A,B mismatch	2.5±0.9	2.2±0.8	>0.05
HLA-Dr mismatch	1.3±0.6	1.2±0.7	>0.05
Cold ischemia time (h)	9.2±4.4	8.9±5.6	>0.05
CsA/FK506	16/5	57/11	>0.05
Ccr(ml/min) at month 6 posttransplantation	94.1±5.0	93.6±4.9	>0.05

2.3 CAN的诊断

在术后3年内,4组患者中共有16例患者血Cr>114 μmol/L,在临床排除了可导致肾功能慢性损害的有着明确原因的疾患后,移植肾穿刺活检,各标本经石蜡切片、HE染色,在普通光镜下观察亦均未发现急性排斥反应、CsA中毒等的特征性改变,而都呈现出以间质纤维化、肾小管萎缩为特征的慢性移植肾肾病的改变。

3 讨论

慢性移植肾肾病(CAN)是指同种异体肾移植数月、特别是1年或数年后,移植肾功能进行性减退,最终肾功能衰竭、恢复透析,在组织学上移植肾呈现出以间质纤维化、肾小管萎缩等为特点的各种非特异性病理改变[4,5]。CAN一般在肾移植6个月后才发生。这种移植物功能减退以往叫做慢性排斥反应,鉴于其发病原因涉及到免疫和非免疫因素,故更适宜用"慢性移植肾肾病"这一包容性更大的术语[1]。

移植后早期活动性CMV感染高达50%~75%,且10%~30%为有症状的CMV病[3],CMV感染被认为不仅是肾移植术后近期死亡的重要原因,而且可能与慢性移植肾肾病有关,肾移植后能否有效、及时地防治CMV感染可能是影响移植效果的关键。因此,目前对CMV感染的研究正受到器官移植领域广泛的关注[6]。

长期以来,如何及时、准确地诊断活动性CMV感染成为了阻碍其临床研究的关键[6]。正常情况下,只要从血清中检出抗CMV-IgM,或抗CMV-IgG由阴性转为阳性或双份血清显示抗CMV-IgG滴度升高4倍以上,即可诊为活动性CMV感染。然而,由于肾移植患者术后应用了大剂量的免疫抑制剂,其抗体反应弱而迟钝,在这个特殊的群体中,依靠血清学检查已不能做出正确的诊断;此外,如果能从病变组织中分离出CMV,也可诊为活动性CMV感染,但CMV自身的特点,即生长缓慢、培养周期长(4~6周)、阳性率低(长时间培养易受细菌和真菌等干扰)等,通常也使该病源学诊断失去了临床意义;至于聚合酶链反应(PCR),虽敏感性高,但其过程繁琐、要求高,阳性诊断价值低,特别是不能区分潜伏感染和活动性感染[7]。

为了克服诊断上的困难,近年来以检测外周血白细胞中pp65抗原,以此判断体内有无活动性CMV感染正逐渐应用于临床。pp65是CMV基因UL83编码的由561个氨基酸构成的磷酸化蛋白,属CMV的结构蛋白。pp65在病毒DNA复制后大量扩增,并主要积聚在宿主细胞胞浆的致密颗粒和细胞外的病毒颗粒中,它的出现提示CMV已复制完毕、形成了完整的病毒,是活动性CMV感染的标志。CMV有着广泛的嗜细胞性,特别是血管内皮细胞、外周血中的白细胞等极易受到其侵袭,在活动性CMV感染时,外周血中的白细胞以主动或被动的方式从脱落于血循环中的内皮细胞等获取大量的病毒抗原,因此,只要能在外周血中检测到含有pp65抗原的白细胞,即可诊断为活动性CMV感染。不仅如此,pp65阳性白细胞的数目还可以反映受者体内病毒的负荷,能体现CMV感染的严重程度、抗病毒治疗效果以及感染的预后[6]。

本研究采用荷兰IQ公司生产的试剂盒检测CMV-pp65抗原,在WBC涂片中,以荧光素标记的抗pp65单克隆抗体与WBC内的pp65抗原结合,在荧光显微镜下CMV-pp65阳性WBC呈黄绿色。根据试剂盒说明,在每5×10^4个外周血WBC中,只要发现有1个CMV-pp65(+)的WBC,即"抗原血症指数"$\geq 1/(5\times10^4)$WBC,即视为抗原血症(+)。尽管目前在抗原血症对活动性CMV感染进行确诊上尚缺乏统一的标准,但由于本研究是以探讨高活动性CMV感染、即高抗原血症("抗原血症指数">100)对远期肾功能的影响,因此无论采用何种标准对本研究结果都应该没有影响。鉴于肾功能恢复延迟、使用抗淋巴细胞球蛋白、反复急性排斥反应等因素可能会对术后pp65抗原血症指数有较大的影响[8],故本研究在病例选择上排除了上述患者。

本研究结果显示:①肾移植术后早期"长时间高活动性"CMV感染的患者,在术后3年内肾功能(肌酐清除率)损失量、肾功不全发生率均明显多于其他患者,而且肾功不全的患者,在病理上均显示以肾小管萎缩、间质纤维化等非特异性改变为特点的CAN的基本病理改变。②肾移植术后早期"长时间高活动性"CMV

感染的患者与其他患者比较，在年龄、性别、供者年龄、组织配型、冷缺血时间、免疫抑制剂使用、术后 6 个月时的 Ccr 等可能会对远期肾功能发生影响的因素都没有明显的差异。由此可以推断，肾移植后早期“长时间、高活动性” CMV 感染可能是削弱移植肾远期功能、导致 CAN 的又一个重要原因；相比之下，其它类型的 CMV 感染对 CAN 的发生影响较小。这也是本研究一个新的发现。

CMV 感染能导致 CAN 可能与以下因素有关：CMV 感染可直接导致移植肾发生炎症和免疫反应[9]；CMV 感染后能诱导机体产生非特异性抗体，后者可沉积于移植肾肾小球血管周围，通过激活补体可引起移植肾损害[10]；CMV 能上调粘附分子，从而促进炎症反应；CMV 能激活细胞毒 T 淋巴细胞，后者释放 λ 干扰素等细胞因子，诱导感染细胞表达 MHC-Ⅱ类分子[11]；CMV 能诱导受感染细胞释放多种炎症因子，后者可促进细胞表达 MHC-I 和 MHC-Ⅱ类分子，从而增多了移植组织的不相容性，引起移植肾发生排斥损伤[12]；CMV 感染可引起血管内皮的损伤，产生抗内皮细胞的自身抗体；CMV 感染可引起血管壁中层平滑肌细胞（SMCs）迁移和增生，导致血管硬化，继而引起移植肾发生缺血性损伤等[13]。至于为什么“长时间高活动性”CMV 感染是引起 CAN 的一个重要的危险因素，而相比之下，其它类型的 CMV 感染对 CAN 的发生影响较小，其原因与机制尚需进一步探讨。

根据本研究结果，作者认为，肾移植后有必要监测活动性 CMV 感染，对严重的 CMV 感染的患者应予以警惕和有效处理；为改善肾移植远期效果，防治严重 CMV 感染十分重要。

参考文献：

[1] Paul L C. Chronic allograft nephropathy: An update[J]. Kidney Int, 1999, 56(3): 783 - 793.

[2] Ishimura T, Fujisawa M, Higuchi A, *et al*. Transforming growth factor-beta1 expression in early biopsy specimen predicts long-term graft function following pediatric renal transplantation[J]. Clin Transplant, 2001, 15(3): 185 - 191.

[3] Snanoudj R, Kriaa F, Arzouk N, *et al*. Single-Center experience with cyclosporine therapy for kidney transplantation: analysis of a Twenty-Year period in 1200 patients[J]. Transpl Proc, 2004, 36(2 Suppl): 83 - 88.

[4] Inkinen K, Soots A, Krogerus L, *et al*. Cytomegalovirus increases collagen synthesis in chronic rejection in the louse[J]. Nephrol Dial Transplant, 2002, 17(5): 772 - 779.

[5] 王平贤，张艮甫，黄赤兵，等. 肾移植后慢性移植物肾病患者的免疫抑制方案 [J]. 第三军医大学学报，2002，24(12)：1460 - 1461.

[6] Celik B, Randhawa P S. Glomerular changes in BK virus nephropathy[J]. Hum Pathol, 2004, 35 (3): 367 - 370.

[7] 张志成，邓少丽. 肾移植术后巨细胞病毒检测的临床意义[J]. 第三军医大学学报，2003，25(9)：809 - 810.

[8] Vazquez Martul E, Mosquera J M, Rivera C F, *et al*. Histological features with clinical impact in chronic allograft nephropathy: review of 66 cases [J]. Transplantation Proceedings, 2004, 36(3): 770 - 771.

[9] Gerstenkorn C, Robertson H, Bell A, *et al*. CMV infection as a contributory factor for renal allograft injury and loss[J]. Transplant Proc, 2001, 33 (4): 2461 - 2462.

[10] Yagmurdur M C, Sevmis S, Emiroglu R, *et al*. Tacrolimus conversion in kidney transplant recipients: analysis of 107 patients [J]. Transplantat Proc, 2004, 36 (1): 144 - 147.

[11] Abdel Wahab N, Weston B S, Roberts T, *et al*. Connective tissue growth factor and regulation of the mesangial cell cycle: role in cellular hypertrophy[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(10): 2437 - 2445.

[12] Houlihan C A, Akdeniz A, Tsalamandris C, *et al* . Urinary transforming growth factor-beta excretion in patients with hypertension, type 2 diabetes, and elevated albumin excretion rate: effects of angiotensin receptor blockade and sodium restriction[J]. Diabetes Care, 2002, 25(6): 1072 - 1077.

[13] Yang C W, Ahn H J, Kim W Y, *et al*. Synergistic effects of mycophenolate mofetil and losartan in a model of chronic cyclosporine nephropathy [J]. Transplantation, 2003, 75(3): 309 - 315.

（编辑　陈聪连）

（上接 549 页）

变。腹部 B 超提示：①肝回声密集，肝中静脉、肝右静脉内径增宽，肝淤血。②脾大。予利尿，扩静脉，间断强心及抗感染治疗，患者病情好转出院。

讨论

房间隔缺损是成人中常见的先心病，较多见于女性，愈后一般较好，平均自然寿命约 50 岁[1]。70 岁以上病例鲜有报道。手术修补是可靠的治疗手段[2]，用导管介入治疗也是一种治疗选择[3]。因为房间隔缺损是左右心的通道，就可能发生反向的栓塞，反向栓塞的表现包括不明原因的卒中，周围栓塞，脑脓肿，和潜水员的减压症。上述现象发生的机制尚不清楚，但它确实为右到左的栓子提供了一个通道[4]。该患者未行手术治疗且长期存活的原因考虑为，以静息性生活方式为主，40 岁后即退休，长期于家中休养。极少从事体力活动，从而降低心脏负担。

关键词：高龄；房间隔缺损

中图法分类号：R541.1　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 陈灏珠. 实用内科学 M]. 第 11 版. 北京：人民卫生出版社，2001. 1411.

[2] 肖列沙，钟卫权，黄志坚，等. 高龄房间隔缺损的手术治疗[J]. 南华大学学报，2003，31(2)：212.

[3] 张玉顺，李　宾，代政学. 成人房间隔缺损介入治疗进展[J]. 心脏杂志，2003，15(1)：73 - 75.

[4] 孙静平，胡国孔木团 J]. 中国医刊，2003，38(10)：5 - 6.

（编辑　陈聪连）