

· 综 述 ·

辐照血液预防输血相关性移植物抗宿主病的研究进展

赵树铭 综述, 林武存 审校

(第三军医大学西南医院输血科, 重庆 400038)

关键词: 血液; 移植物抗宿主病; 辐照

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.08.039

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)08-0822-03

输血相关性移植物抗宿主病(transfusion-associated graft-versus-host disease, TA-GVHD)是免疫功能低下的受血者输入含有免疫活性的淋巴细胞(主要是 T 淋巴细胞)的血液和血液成分后发生的抗宿主的致命的免疫并发症,此病治疗困难,病死率高,重在预防,最有效的预防措施就是输用辐照血液制剂^[1-6]。

1 概 述

输血给免疫功能正常的人,受血者能将输入的白细胞视为“非己”异物进行排斥,使供血者的淋巴细胞在受血者体内不能生存。输血给免疫功能低下的患者,由于不能识别和排斥输入的具有免疫活性的供血者淋巴细胞,淋巴细胞在受血者体内得以存活。因供血者与受血者在免疫遗传学上存在差异,供血者的淋巴细胞受到受血者组织抗原的刺激而增殖分化,反将受血者的组织器官当作“非己”进行攻击,攻击的靶组织主要是皮肤、胃肠道、肝脾和骨髓,引起一系列临床病理症候群,导致 TA-GVHD 的发生^[2-5]。发达国家已广泛采用血液辐照技术来预防血液成分输注的 TA-GVHD,辐照血液主要用于免疫缺陷患者、胎儿以及单倍型人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)移植患者。

2 移植物抗宿主病的发生机制

受血者出现移植物抗宿主病(GVHD)有 3 个先决条件:(1)受体与供体之间组织相容性不同;(2)移植物中存在免疫活性细胞;(3)宿主无法清除这些免疫活性细胞。大多数情况下,具有免疫活性的受体组织通过淋巴细胞杀灭了供体来源的 T 细胞。然而,在输血过程中情况有所不同,从一个具有纯合型 HLA 的供体输血给一个具有杂合型 HLA 的受体中,由于他们的 HLA 单倍型相同将导致受体无法识别供体细胞,就会出现抑制效应。但只要异体(MHC)抗原或宿主主要组织相容性抗原,或者两者同时刺激了 T 细胞增殖,就可导致炎症反应,释放大量细胞因子,最终导致 GVHD 的发生和临床症状的出现。Th1CD4 T 细胞分泌 IL-2, Th2CD4 T 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 和 TNF- α , Th1 和 Th2 细胞都分泌 IL-3 和粒细胞-巨核细胞集落刺激因子。1 型细胞是前炎性细胞,可诱导细胞免疫,而 2 型细胞具有抗炎作用。向 1 型或 2 型分化是一个复杂的过程,取决于早期暴露于 IL-4 或 IL-12、抗原提呈细胞的类型、共刺激分子和巨核细胞的存在以及他们特有的细胞因子等因素^[1,7]。

移植后出现急性 GVHD 主要过程如下,宿主组织分泌 TNF- α 和 IL-1,可提高供体 T 细胞对宿主 MHC 或次要相容组织抗原,或同时对二者的识别能力;供体 T 细胞活化导致 Th1 T 细胞增殖,可分泌 TNF- α 和 IL-2,反过来进一步激活了 T 细胞,诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)和自然杀伤细胞

(NK)反应。TA-GVHD 的发生是否与上述过程相似还不确定^[1-6]。亲属间相互输血,TA-GVHD 发生率高于非亲属间输血。这是因为供血者与受血者带有相同的 HLA 单倍体,输入的淋巴细胞较易存活。

3 临床诊断

TA-GVHD 的发生多在输血后 1 个月内(多数于 1~2 周),可见发热,厌食,恶心,呕吐和腹泻等常见症状。皮肤出现斑丘疹,向全身蔓延,可发展成水泡、皮肤剥脱、红皮病等。腹痛、恶心、呕吐、腹泻稀便或血水样便。伴有发热、肝区疼痛、黄疸、肝脾大,淋巴结核病变。血液化验呈全血细胞减少、肝功能异常。TA-GVHD 与急性 GVHD 不同,在同种异体移植过程中,出现严重的全系血细胞减少,经常导致患者死亡^[1-6]。

由于临床表现缺乏特异性,易误诊为原发病加重或化疗、放疗、药物的不良反应。询问输血史、皮肤组织活检、HLA 定型、基因分析等,可帮助诊断。皮肤活检可见表皮基层细胞空泡化,上皮细胞与真皮层分离,形成水泡;表皮内单核细胞浸润。肝脏活检可出现嗜酸性细胞浸润,胆小管退化,周边炎症,淋巴细胞浸润。骨髓检查呈现典型的“空髓化”,全系血细胞减少,纤维化,部分淋巴细胞浸润。荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)有助于快速诊断^[8]。精确诊断较为复杂,可用不同的方法来鉴定患者外周血或感染组织内的外源性淋巴细胞,只要受血者体内检查出供血者淋巴细胞植活的证据,可确诊为 TA-GVHD。HLA 检查和短串联重复序列(short tandem repeat, STR)基因分析有助于诊断近亲输血引起的 TA-GVHD^[9]。

4 辐照血液的适应证

预防 TA-GVHD 适用于心外科、肿瘤外科、老年、新生儿、重症创伤、先天性免疫缺陷等受血者。不但对采血后 72 h 内的血液辐照,而且保存 14 d 的也可以进行辐照。近年已少有 PT-GVHD 病例报告^[10]。受血者发生 TA-GVHD 的临界值是供血者淋巴细胞数量达 $10^7/\text{kg}$ ^[10]。输入供血者的淋巴细胞数量越多,病情越重,死亡率越高。是否输用辐照血液,主要从受血者免疫状态和血液成分所含活性淋巴细胞多少两方面考虑。免疫功能低下的受血者和输用活性淋巴细胞多的血液成分制剂,都是血液辐照的适应证。

4.1 高危受血者 (1)免疫功能严重损害。大剂量化疗放疗、接受嘌呤类和免疫抑制剂治疗、免疫缺乏症和免疫缺陷类疾病、骨髓或外周血干细胞移植、白细胞小于 $0.5 \times 10^9/\text{L}$ 、急性白血病、霍奇金淋巴瘤肉瘤等患者。(2)免疫功能低下。年龄大于 50 岁的受血者、早产儿、低体质量($<1\ 500\ \text{g}$)新生儿。(3)输用亲属血液的受血者。(4)输血量较大者以及 6 个月以下的婴儿输血、新生儿溶血病换血等。

4.2 高危血液成分 (1)必须辐照:浓缩粒细胞、新鲜浓缩血小板、新鲜悬浮红细胞、新鲜全血和新鲜液体血浆等,均需辐照。(2)最好辐照:全血和及血细胞成分血(如红细胞、血小板)。(3)不需辐照:经冷冻融化处理的成分血及血液制品,如冷冻红细胞、冷冻血小板、新鲜冷冻血浆、普通冷冻血浆、冷沉淀等。常见的辐照血液及其成分制剂的临床适应证为^[1]:(1)胎儿/婴儿,宫内输血、早产儿、先天性免疫缺陷症及患有红细胞增多症并接受了输血治疗者;(2)儿童/成年人,先天性免疫缺陷、血液恶性肿瘤或实体瘤(神经母细胞瘤、肉瘤,接收了放化疗的霍奇金病)、接收过外周血干细胞/骨髓移植者、接收过亲属献血者及接收过白细胞抗原配对的输血者;(3)潜在指征,足月婴儿、遗传同质性人群的受/供配对者及接收免疫抑制剂治疗的血液恶性肿瘤或实体瘤的其他患者。

5 血液及其成分的辐照

5.1 辐照过程 应用血液辐照仪(器)发射出的射线辐照血液,通过放射性同位素衰变中产生射线以核子或次级电子的形式产生的电离辐射作用,快速穿透有核细胞,直接损伤细胞核的 DNA 或间接依靠产生离子或自由基的生物损伤作用,可有效灭活 T 淋巴细胞。辐射过程主要能阻止移植的供者 T 淋巴细胞针对宿主本身抗原提呈细胞的增殖,达到避免 GVHD 发生的目的。用于血液制品辐照的射线一般为 γ 射线和 X 射线两种,在辐照剂量范围内其对血液成分中 T 淋巴细胞灭活的功能基本一致。 γ 射线的放射源为一般的同位素铯源(¹³⁷Cs)或钴源(⁶⁰Co),目前利用 γ 射线辐照血液成分在血站系统应用较为广泛^[1-6]。

5.2 辐照仪器 在¹³⁷Cs 血液辐照仪中,血液成分制剂被放入旋转台上的金属罐中。由 1~4 束很近的光束产生 γ 射线照射到旋转的金属罐上,射线贯穿血液成分的各个部分。以⁶⁰Co 为放射源产生 γ 射线的血液辐照仪与¹³⁷Cs 血液辐照仪相类似,但是其存放血液成分制剂的容器不旋转,而是⁶⁰Co 围绕放血液成分制剂的容器旋转。当血液辐照仪工作时, γ 射线贯穿空气和血液成分制剂后产生衰减,¹³⁷Cs 产生的 γ 射线衰减程度比⁶⁰Co 产生的 γ 射线衰减程度强。¹³⁷Cs 半衰期为 30.2 年,⁶⁰Co 为 5.2 年。⁶⁰Co 的放射性、穿透力比¹³⁷Cs 强。为了保证屏蔽,采用⁶⁰Co 的血液辐照仪比较笨重,价格昂贵、操作计算不便,因此多采用¹³⁷Cs。

5.3 辐照血液种类 血液成分制剂中能引发 TA-GVHD 的主要成分是白细胞群,特别是淋巴细胞群。根据动物模型得到的数据和骨髓移植相关报道得知,白细胞 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ /kg 体质量在免疫缺陷的宿主体内可以导致 GVHD。几乎所用血液成分中都含有足够量的能使易感受血者发生 GVHD 的淋巴细胞(表 1)^[1]。对可能发生 GVHD 的患者来说,所有可能含有 T 淋巴细胞的血液制剂都应该进行辐照处理,包括全血和血细胞成分血。辐照后的血液成分中的红细胞质量无明显变化。去白细胞过滤后的红细胞制剂也应经过辐照处理。

5.4 辐照后红细胞和血小板的保存 美国 FDA 规定红细胞辐照后保存不超过 28 d,最好尽快输注,输后体内恢复率应大于 75%,红细胞制剂经辐照后且没有其他处理方式的情况下其保存期限为 28 d,红细胞制剂保存的总时间不能超过未辐照的红细胞制剂保存时间^[5,11-13];辐照对血小板功能影响较小,允许血小板可在保存期内任何时间以 50 Gy 以下剂量辐照^[5],欧洲会议则推荐红细胞的辐照应在采血后 14 d 内进行,并且

辐照后红细胞的保存时间应在辐照后 14 d 内^[6]。很多研究表明,辐照后血小板的特性基本没有改变,所以无论新鲜血小板是否经过辐照,其保存期限都是在 20~24 °C 震荡状态下 5 d,并可以在血小板保存期 5 d 内任何时间辐照^[14]。采用紫外线辐照的方式对血小板和血浆的影响均较小^[15-18]。

表 1 不同血液成分中白细胞含量

血液及其成分种类	量(mL)	平均白细胞含量
全血	450	(1~2) × 10 ⁹
浓缩红细胞	250	(2~5) × 10 ⁹
洗涤红细胞	可变	< 5 × 10 ⁸
冷冻、融解、去甘油红细胞	250	~ 10 ⁷
浓缩血小板	50~75	4.0 × 10 ⁷
冷沉淀	20~30	0
新鲜冷冻血浆	100	0
新鲜血浆	100	1.5 × 10 ⁵
浓缩粒细胞	200~500	1.0 × 10 ¹⁰

5.5 辐照剂量的选择 血液制剂的辐照剂量以其对被照射物质的吸收剂量来计算,吸收剂量取决于照射量。一般吸收量以 Rad 或 Gy(戈瑞)为单位,1 Gy=100 rad=100 CGy。血液制剂的最佳辐照剂量是完全消除供血者淋巴细胞的有丝分裂能力而不破坏其他血液细胞功能。美国血库协会(AABB)曾推荐的最低剂量标准是 15 Gy,但仍有残余活性淋巴细胞存在。25 Gy 照射后几乎没有淋巴细胞的增殖反应。1993 年,FDA 把照射中心的靶剂量定为 25 Gy,其他部位的剂量标准不得低于 15 Gy^[1,12]。欧洲学术委员会制定的照射剂量范围是 25~40 Gy,英国规定的剂量范围是 25~50 Gy。血液制剂的最佳辐照剂量标准不尽一致。一般认为,辐照应使淋巴细胞的反应抑制率大于 95%。辐照剂量的加大,虽可提高抑制率,但对血液其他成分如红细胞和血小板功能的影响增加。任芙蓉等^[19]分别用不同剂量辐照血液,测定 3H 掺入量以检测淋巴细胞的残存增殖活性。结果 15 Gy 剂量不足以预防 TA-GVHD,最低辐照剂量应为 25 Gy。而陈宇等^[20]表明 30 Gy 是 γ 射线辐照的合适剂量;吴燕飞等^[21]研究表明辐照剂量 35 Gy 可有效预防 TA-GVHD 的发生,是一个比较适合的辐照剂量。我国要求的照射剂量为 25 Gy。

5.6 质量控制 辐照血液制剂的照射效果与照射质量控制密切相关。血液辐照仪发出的实际照射剂量对血液各部分吸收的均一性、重复性直接影响 T 淋巴细胞的灭活程度,因此要对血液辐照进行严格的质量控制。(1)照射剂量^[1]:照射中心的靶剂量定为 25 Gy,其他部位的剂量不得低于 15 Gy。(2)剂量分布^[1]:核对中心剂量率,并测定照射物表面的相对剂量分布。¹³⁷CS 每年做 1 次剂量分布图检测,⁶⁰Co 每半年 1 次;放射性物质衰变的校正,¹³⁷CS 每年 1 次,⁶⁰Co 每季度 1 次。

为了预防放射性的漏出,辐射仪周围用铅等物质做屏蔽。这对其安全应用是非常重要的。因此应每年定期检测评价其自屏蔽效果。可视性放射敏感性标签粘贴于被辐照血液制剂的表面,当接受射线辐射后,由于离子化作用标签发生颜色改变,并且由“未辐照”变成“已辐照”的字样。可以作为血液制剂被辐照的标记,并标出大概剂量范围,以控制被辐照血液的质量。

6 辐照对血液质量的影响

辐照对血液各种成分的影响,国内外已有较多研究。血液成分辐照所面临的问题主要包括:输血时间延迟、费用提高、辐照失败、红细胞成分的钾离子升高和寿命缩短、红细胞回收率降低、以及使用放射源如¹³⁷Cs所面临的防护等安全问题^[2]。在合适的辐照剂量和条件下,各种血液成分均可进行辐照,达到灭活血液制剂中淋巴细胞的活性并保留各种有效成分的目的。红细胞悬液经辐照后,对红细胞的功能有一定影响,随时间延长,红细胞 2,3-DPG、ATP、pH 的变化不大,但 K⁺ 含量在一周内迅速升高^[22];辐照后红细胞的保存时间应在辐照后 14 d 内。血小板经辐照后,血小板计数、pH、聚集功能、ATP 释放功能、低渗休克反应等指标无显著差异,IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 等细胞因子水平显著降低^[23]。辐照对血小板影响很小,因此,血小板在保存期内任何时间均可进行辐照。

参考文献:

- [1] Luban NLC, Wong ECC. Irradiated products and washed/volume reduced products [M]//Hillyer CD, Silberstein LE, Ness PM. Blood banking and transfusion medicine basic principles & practice. Pennsylvania: Churchill Livingstone, 2003: 253-264.
- [2] Mintz PD, Wehrli G. Irradiation eradication and pathogen reduction. Ceasing cesium irradiation of blood products [J]. Bone Marrow Transplant, 2009, 44(4): 205-211.
- [3] Dwyre DM, Holland PV. Transfusion-associated graft-versus-host disease [J]. Vox Sang, 2008, 95(2): 85-93.
- [4] Oto OA, Paydas S, Baslamisli F, et al. Transfusion-associated graft-versus-host disease [J]. Eur J Intern Med, 2006, 17(3): 151-156.
- [5] Moroff G, Leitman SF, Luban NL. Principles of blood irradiation, dose validation and quality control [J]. Transfusion, 1997, 37(10): 1084-1092.
- [6] Schrezenmeier H, Seifried E. Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? [J]. Vox Sang, 2010; 99(1): 1-15.
- [7] Triulzi D, Duquesnoy R, Nichols L, et al. Fatal transfusion-associated graft-versus-host disease in an immunocompetent recipient of a volunteer unit of red cells [J]. Transfusion, 2006, 46(6): 885-888.
- [8] Akay MO, Temiz G, Teke HU, et al. Rapid molecular cytogenetic diagnosis of transfusion associated graft-versus-host disease by fluorescent in situ hybridization (FISH) [J]. Transfus Apher Sci, 2008, 38(3): 189-192.
- [9] Tipu HN, Ahmed TA, Khalilullah, et al. Transfusion associated graft versus host disease [J]. J Pak Med Assoc, 2008, 58(3): 143-145.
- [10] Asai T, Inaba S, Ohto H, et al. Guidelines for irradiation of blood and blood components to prevent post-transfusion graft-vs.-host disease in Japan [J]. Transfus Med, 2000, 10(4): 315-320.
- [11] Wagner SJ, Myrup AC. Prestorage leucoreduction improves several in vitro red cell storage parameters following gamma irradiation [J]. Transfus Med, 2006, 16(4): 261-265.
- [12] Williamson LM, Stainsby D, Jones H, et al. The impact of universal leukodepletion of the blood supply on hemovigilance reports of posttransfusion purpura and transfusion-associated graft-versus-host disease [J]. Transfusion, 2007, 47(8): 1455-1467.
- [13] Moreira OC, Oliveira VH, Benedicto LB, et al. Effects of gamma-irradiation on the membrane ATPases of human erythrocytes from transfusional blood concentrates [J]. Ann Hematol, 2008, 87(2): 113-119.
- [14] Tynngard N, Studer M, Lindahl TL, et al. The effect of gamma irradiation on the quality of apheresis platelets during storage for 7 days [J]. Transfusion, 2008, 48(8): 1669-1675.
- [15] Mohr H, Gravemann U, Bayer A, et al. Sterilization of platelet concentrates at production scale by irradiation with short-wave ultraviolet light [J]. Transfusion, 2009, 49(9): 1956-1963.
- [16] Weisbach V, Strobel J, Hahn B, et al. Effect of gamma irradiation with 30 Gy on the coagulation system in leukoreduced fresh-frozen plasma [J]. Transfusion, 2007, 47(9): 1658-1665.
- [17] Mohr H, Gravemann U, Muller TH. Inactivation of pathogens in single units of therapeutic fresh plasma by irradiation with ultraviolet light [J]. Transfusion, 2009, 49(10): 2144-2151.
- [18] Hirayama J, Kojima S, Akino M, et al. The effect of irradiation on platelets in M-sol additive solution with 30 percent residual plasma [J]. Transfusion, 2009, 49(4): 813-815.
- [19] 任芙蓉, 李慧, 吕秋霜, 等. γ 射线辐照对淋巴细胞杀伤效果的研究 [J]. 中国输血杂志, 2002, 15(2): 94-97.
- [20] 陈宇, 陈波斌, 王钦红, 等. γ 射线辐照抑制淋巴细胞增殖的剂量-效应关系研究 [J]. 中国临床医学, 2003, 10(4): 540-544.
- [21] 吴燕飞, 余晋林, 聂凯声, 等. 袋血辐照对淋巴细胞凋亡及红细胞活性的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(12): 1789-1793.
- [22] 陆典瑞, 胡继征, 李启辉, 等. X 射线辐照对保存红细胞质量的影响 [J]. 临床输血与检验, 2003, 5(4): 266-268.
- [23] 黎儒青, 蒋天伦, 胡建, 等. ¹³⁷Cs γ 射线辐照对手工分血小板制品细胞因子灭活的研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(3): 389-391.