

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2025.01.009
文章编号: 1005-8982 (2025) 01-0054-08

综述

肾移植中供体来源的游离DNA作为潜在的排斥生物标志物的研究进展*

程贤雄¹, 莫银竹¹, 吕仕杰¹, 胡军², 李志伟³, 梁爱君³, 郑鹏肖³, 杨焕芝⁴

(1. 昆明医科大学附属甘美医院, 云南 昆明 650000; 昆明市第一人民医院 2. 骨科;
3. 重症医学科; 4. 药学部, 云南 昆明 650000)

摘要: 肾脏疾病已成为全球公共卫生问题。终末期肾病患者必须依靠透析或肾移植治疗, 而肾移植是终末期肾病的最佳治疗方法。肾移植提高了患者生活质量, 延长了患者生存时间, 然而, 由于免疫或非免疫因素导致一些患者移植功能过早丧失, 因此, 并非所有患者都能从移植术中完全受益。循环游离DNA (cfDNA) 是指存在于血液等体液中的小片段DNA, 通常源自身体各个组织的细胞。供体来源的cfDNA (dd-cfDNA) 是患者外源性且来自移植器官的cfDNA。与侵入性活检不同, dd-cfDNA可以通过对样本的非侵入性分析来检测。dd-cfDNA浓度可能在肌酐水平升高之前就增加了, 这有助于早期诊断移植损伤和充分治疗, 以避免移植过早丢失。该文综述有关cfDNA在肾移植中的作用研究, 希望为dd-cfDNA检测广泛应用于临床实践提供参考依据。

关键词: 肾移植; 供体来源的游离DNA; 免疫排斥反应; 生物标志物

中图分类号: R699.2

文献标识码: A

Research progress on donor-derived cell-free DNA as a potential rejection biomarker in kidney transplantation*

Cheng Xian-xiong¹, Mo Yin-zhu¹, Lü Shi-jie¹, Hu Jun², Li Zhi-wei³, Liang Ai-jun³,
Zheng Peng-xiao³, Yang Huan-zhi⁴

(1. Affiliated GanMei Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650000, China;
2. Department of Orthopaedics, 3. Intensive Care Unit, 4. Department of Pharmacy, The First people's
Hospital of Kunming, Kunming, Yunnan 650000, China)

Abstract: Kidney diseases have become a global public health issue. Patients with end-stage renal disease rely on dialysis or kidney transplantation for treatment, with kidney transplantation being the best option. Kidney transplantation improves the quality of life and prolongs survival, but some patients experience early graft loss due to immune or non-immune factors, meaning not all patients fully benefit from transplantation. Circulating free DNA (cfDNA) refers to small fragments of DNA found in bodily fluids such as blood, typically originating from various tissues. Donor-derived cfDNA (dd-cfDNA) is the exogenous cfDNA from the transplanted organ. Unlike invasive biopsy, dd-cfDNA can be detected through non-invasive analysis of samples. The concentration of dd-cfDNA may increase even before creatinine levels rise, assisting in the early diagnosis of graft injury and providing an opportunity for early intervention to prevent premature graft loss. This review summarizes research on the role of

收稿日期: 2024-08-20

* 基金项目: 云南省科技厅重大科技专项项目 (No: 202302AA310018-F-7); 云南省科技厅重大科技专项计划项目 (No: 202302AA310018); 昆明市卫生健康委员会卫生科研课题 (No: 2023-21-01-002); 云南省教育厅科学研究基金项目 (No: 2024J0376)

[通信作者] 杨焕芝, E-mail: yanghuanzhi1024@163.com; Tel: 15877992260

cfDNA in kidney transplantation and aims to provide a reference for the widespread clinical application of dd-cfDNA testing.

Keywords: kidney transplantation; donor-derived cell-free DNA; immune rejection; biomarker

大多数医疗中心在肾移植方面都取得了很好的成绩,目前肾移植后 1 年内的存活率 >95%。但问题在于肾移植后的长期随访效果不佳,主要原因是慢性或急性抗体介导的排斥反应(antibody mediated rejection, ABMR)^[1]。肾移植的适应证包括终末期肾病、糖尿病、高血压、肾小球肾炎、多囊肾等疾病,其均可导致终末期肾病^[2-5]。肾移植后的患者可能会出现一些表现提示需要进行活检,以最终诊断移植损伤的类型。活检评估目前是基于肾移植病理学班夫分类法,该分类法是肾活检组织病理学评估的国际分类法。评估包括检测是否存在供体特异性抗体(donor specific antibodies, DSAs)^[6-8]。

受体血液中的供体来源的游离 DNA (donor-derived cell-free DNA, dd-cfDNA) 来自移植肾脏中的受损细胞。由于排斥反应,受损细胞的数量增加,从而增加了 dd-cfDNA 的数量。dd-cfDNA 的最大优势是可以对患者的病情进行无创监测,这也是目前临床试验的目标。dd-cfDNA 监测需要更多的临床试验才能使其成为临床实践的标准^[1]。目前国内外尚无标准方法识别游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 的数量,cfDNA 的研究已在肾脏、肝脏、心脏、肺等器官中进行^[5]。本文旨在总结与肾移植中 cfDNA 相关的最新研究,希望为 dd-cfDNA 检测广泛应用于我国的临床实践提供参考依据。

1 cfDNA 的起源和去除

cfDNA 由降解的脱氧核糖核酸片段组成,这些片段被释放到血液和其他体液中,均存在于健康人群和患者中,但患者的浓度要高得多^[9]。1948 年,法国科学家 MANDELA 等^[10]研究了 1 例系统性红斑狼疮患者,首次发现了血液中 cfDNA 分子的存在。

cfDNA 有 4 种主要的生物来源。第一来源于任何形式的细胞死亡,例如细胞凋亡或坏死、焦亡、自噬、吞噬、中性粒细胞的炎症细胞死亡^[11]。染色质在细胞凋亡或坏死的过程中几乎完全降解,裸露的 DNA 片段可以被细胞内核酸酶降解,与完整的蛋白质结合的 DNA 片段可以通过蛋白质包膜而被释放到循环中^[12]。第二来源于移植植物或胎儿 cfDNA,在

妊娠期,胎儿的细胞(如胎盘细胞)会通过胎盘进入母体血液,形成胎儿 cfDNA,cfDNA 也可用于非侵入性产前唐氏综合征筛查^[13-14]和器官移植后的免疫排斥监测^[15-16]。第三来源于自动激活的 DNA 的释放,cfDNA 含量与创伤、烧伤、感染、心力衰竭、脑卒中及器官缺血再灌注损伤有关^[17-19]。第四来源于肿瘤的 cfDNA,虽其只占 cfDNA 的很小一部分,但是 cfDNA 检测广泛应用于肿瘤诊断和治疗,从实体瘤和血液肿瘤的早期诊断和筛查到根据治疗反应评估 cfDNA 含量的动态变化,以及参加基于 cfDNA 含量的介入性临床试验^[20]。由于病理生理过程、致病机制及组织微环境因疾病而异,因此 cfDNA 的产生涉及一个复杂的过程。没有一种机制可以完全解释所有 cfDNA 的来源,通常涉及 2 种或多种机制^[21]。

cfDNA 的形成和释放特征仍然需要进一步研究,研究这些过程的复杂性质以及从体内去除这些分子。迄今为止的研究表明,cfDNA 在血液中的半衰期估计在 16 min ~ 2.5 h^[22-23],但是,这个结果也需要进一步确认,并且必须在各种环境条件下和处于不同健康状况的患者中进行检查。众所周知,由于 DNase I 的酶活性,cfDNA 可以进入肝脏或脾脏并被位于肝脏或脾脏内部的巨噬细胞降解^[24],或者可以通过肾脏过滤从体内清除并通过尿液排出体外^[25]。所以,cfDNA 可以与细胞表面的蛋白质结合,并被转运到其他蛋白质,以便可能降解或转运到细胞核。cfDNA 与细胞表面受体的结合取决于 pH 值、温度等因素,并可被多种物质抑制^[26]。因此,其从人体中去除的速度可能取决于其结合速度和细胞摄取速度。

2 cfDNA 检测方法

cfDNA 的检测是现代医学诊断中一个重要的组成部分,特别是在癌症检测、无创产前测试、移植器官监测等领域。有几种方法可用于确定受体血浆中 dd-cfDNA 的绝对量或相对量。通常涉及聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的一些变体,选项包括实时荧光定量 PCR、液滴数字 PCR 或二代测序(next generation sequencing, NGS)。液滴数字 PCR 和 NGS 检测均已在临床相关范围内进行了分析

验证^[27-29]。实时荧光定量 PCR 是一种灵敏且快速的技术,能够通过特异性引物和探针检测特定 DNA 序列,其广泛用于量化特定的 cfDNA 标记,如特定癌症相关的突变或供体特异性序列。滴滴数字 PCR 提高了检测低 cfDNA 片段的灵敏度,通过将样本分配到多个独立的反应中,然后在每个反应中进行 PCR 扩增。这种技术适用于需要高灵敏度和精确量化的应用,如检测肿瘤 cfDNA 中的低频突变。NGS 允许对 cfDNA 样本进行高通量测序,能够揭示广泛的遗传信息,包括突变、拷贝数变异及其他基因组特征。该方法特别适用于全面分析 cfDNA 样本,以便全面评估疾病相关的遗传变异。基本原理涉及评估单核苷酸多态性,其受体是纯合子,但在供体中不同。重要的是,其可以在没有供体基因分型的情况下完成^[30]。cfDNA 的检测不仅对于早期疾病诊断至关重要,也为疗效监测和预后评估提供了新的可

能性。随着技术的进步,cfDNA 检测方法的精确度和可靠性将继续提高,对临床实践产生深远影响。

3 cfDNA 在肾移植中的研究进展

目前,有关 cfDNA 在肾移植中的研究越来越多,尤其是对血浆 dd-cfDNA 的评估,逐渐被认识为一种无创手段(液体活检),用于识别肾同种异体移植中的主动排斥反应(active rejection, AR),包括稳定同种异体移植物中的亚临床 AR,以及有活检禁忌证的患者的临床 AR。本综述的 16 项研究中,有 13 项来自国外,仅 3 项研究来自国内(见表 1)。该 16 项研究讨论了 cfDNA 的监测变量,包括 AR、Banff 评分、估计肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate, eGFR)、DSA、移植损伤等,分别给出了各自的 cfDNA 水平中位数及 cfDNA 的阈值(见表 2)。

BLOOM 等^[31]测定了 102 例肾移植受者中血浆

表 1 cfDNA 在肾移植中纳入研究的基本信息

文献	受试者信息			捐献者信息				
	国家	人数(男/女)	年龄/岁	人数(男/女)	年龄/岁	已故/%	有无关系/%	
							无	有
2017 BLOOM ^[31]	美国	27(16/11)	46 ± 16	27(NR)	NR	74.0	7.0	93.0
		75(45/30)	53 ± 13	75(NR)	NR	56.0	32.0	68.0
2018 GIELIS ^[33]	比利时	42(30/12)	52(18 ~ 69)	42(NR)	45.4 ± 11.2	83.3	NR	NR
2019 HUANG ^[34]	美国	63(37/26)	49 ± 13	63(NR)	NR	69.8	NR	NR
2020 GIELIS ^[32]	比利时	107(79/28)	51(18 ~ 71)	107(NR)	48(16 ~ 72)	87.9	NR	NR
		38(17/21)	47.91 ± 14.31	38(NR)	NR	92.1	97.2	2.8
2018 SIGDEL ^[35]	美国	72(40/32)	47.88 ± 13.24	72(NR)	NR	62.5	87.5	12.5
		82(48/34)	20.04 ± 11.97	82(NR)	NR	36.6	97.6	2.4
2019 OELLERICH ^[4]	德国	189(120/69)	52 ± 14	189(NR)	NR	61.9	NR	NR
2019 WHITLAM ^[36]	澳大利亚	61(30/31)	53(39 ~ 61)	61(NR)	NR	73.0	83.0	17.0
2019 ZHOU ^[37]	中国	32(NR)	NR	32(NR)	NR	NR	NR	NR
2020 DAUBER ^[5]	奥地利	29(19/10)	53.59	29(NR)(17/12)(NR)	NR	82.8	NR	NR
2020 STITES ^[38]	美国	37(22/15)	49.8 ± 10.46	NR	NR	NR	NR	NR
		42(17/25)	44.1 ± 12.14					
2020 ZHANG ^[39]	中国	18(6/12)	39.4 ± 13.1	18(NR)	NR	50.0	NR	NR
		19(5/14)	32.5 ± 10.7	19(NR)	NR	42.1	NR	NR
2020 SHEN ^[40]	中国	28(18/10)	39.18 ± 2.12	28(20/8)	45.04 ± 2.14	64.3	NR	NR
2021 ANAND ^[41]	美国	125(82/43)	52.6(21 ~ 79)	63(NR)	NR	50.4	NR	NR
2021 PULIYANDA ^[42]	美国	67(38/29)	9.3 ± 5.3	67(NR)	NR	NR	NR	NR
2022 BU ^[43]	加拿大	1 092(655/437)	49.5(17 ~ 84)	1 092(601/491)	40.7(0 ~ 72)	96.0	96.0	4.0
2023 MANTIOS ^[44]	希腊	30(NR)	46.5	30(NR)	55.4 ± 15.0	26.7	26.7	73.3

注: NR 表示未报道。

表 2 cfDNA 在肾移植研究中的监测变量、水平中位数、敏感性、特异性及阈值

文献	监测变量	cfDNA 水平中位数/%	敏感性/%	特异性/%	cfDNA 阈值/%
2017 BLOOM ^[31]	AR	AR: 1.6; ABMR: 2.9; TCMR: 1.2	59	85	1.0
		STA: 0.3	81	83	1.0
2018 GIELIS ^[33]	AR	0.46	NR	NR	0.88
2019 HUANG ^[34]	AR	ABMR: 1.35; STA: 0.38; TCMR: 0.27	100	71.8	0.74
2020 GIELIS ^[32]	AR	0.42	38	85	0.88
		2.32			
2018 SIGDEL ^[35]	AR, eGFR	0.58	88.7	72.6	1.0
		0.4			
2019 OELLERICH ^[4]	AR	AR: 0.57; STA: 0.29	73	69	0.43
2019 WHITLAM ^[36]	AR, eGFR, Banff 评分	NR	85	75	0.75
2019 ZHOU ^[37]	AR	1.17	NR	NR	NR
2020 DAUBER ^[5]	AR	AR: 5.24; STA: 1.5; BL: 1.91	88	81	2.7
		0.25	NR	NR	0.5
2020 STITES ^[38]	AR, eGFR	1.76	NR	NR	
		2.4			
2020 ZHANG ^[39]	AR, eGFR	88.9	88.9	73.7	1.0
		0.65			
2020 SHEN ^[40]	AR, eGFR	NR	NR	NR	NR
2021 ANAND ^[41]	AR, 肾移植次数、供体类型	首次肾移植: 0.31; 重复肾移植: 0.57; 双重肾移植: 1.10	NR	NR	NR
2021 PULIYANDA ^[42]	AR, eGFR, DSA	AR: 0.47; STA: 0.37	86	100	1.0
2022 BU ^[43]	AR, eGFR, DSA, 移植损伤	STA: 0.23; AR: 1.6; eGFR: 6; DSA: 5; 静止期(无损伤): 0.21, 活动性损伤: 0.51	STA: 58; ABMR: 65; TCMR: 45	STA: 82; ABMR: 75; TCMR: 63	0.5
2023 MANTIOS ^[44]	AR, eGFR, 随时间变化的相关性、DSA	AR: 0.94; STA: 0.24	73.7	92.3	0.5

注: eGFR 为估计肾小球滤过率; AR 为主动排斥反应; DSA 为供体特异性抗体; ABMR 为抗体介导的排斥反应; TCMR 为 T 细胞介导的排斥反应; BL 为临界排斥反应; STA 为稳定同种异体移植; NR 为未报道。

dd-cfDNA 水平, 并将其与 107 例活检标本中组织学确定的同种异体移植排斥状态相关联。在显示任何排斥 [ABMR、T 细胞介导的排斥反应 (T cell mediated rejection, TCMR)] 的活检标本和对照组 (组织学上无排斥) 之间区分的 dd-cfDNA 水平曲线下面积 (area under the curve, AUC) 为 0.74 ($P < 0.05$)。在 1.0% dd-cfDNA 的阈值下, 主动排斥的阳性和阴性预测值分别为 61% 和 84%。区分是否含抗体介导的排斥的样品的 AUC 为 0.87。当 dd-cfDNA 临界值为 1.0% 时, 抗体介导的排斥的阳性和阴性预测值分别为 44% 和 96%。中位 dd-cfDNA 在对照组中分别为 2.9% (抗体介导的排斥) 和 1.2% (T 细胞介导的排斥)。因此, 他们发现 dd-cfDNA 可用于评估同种异体移植排斥反应和损伤: dd-cfDNA 水平 $< 1%$ 表示没

有活动性排斥反应, 水平 $> 1%$ 表示可能存在活动性排斥反应。

GIELIS 等^[32]对 107 份肾移植患者血浆样本进行了另一项研究, 在多中心设置中纵向收集血浆样本。该研究共检测了 1 036 份血浆样本, 并建立了 0.88% 的阈值。发现在肌酐水平升高的情况下, 排斥反应具有更高的诊断价值, 但也观察到 dd-cfDNA 的增加。dd-cfDNA 升高常与肾盂肾炎和急性排斥反应有关。尽管如此, 作者在移植后 3 个月的随访中 (同时测定血清肌酐或 eGFR) 没有发现肾功能与 dd-cfDNA 百分比之间存在任何关联。该研究表明, dd-cfDNA 百分比在 AR 预后中具有与血清肌酐相似的诊断价值。在巨细胞病毒或牛科布病毒感染的情况下, dd-cfDNA 也没有显著增加。在 GIELIS 等^[33]

团队之前 2018 年的工作中使用 PCR 研究了患者样本,以确定移植后的 dd-cfDNA 动力学和阈值,移植后 10 d 内血浆水平呈指数下降,阈值为 0.88%。

HUANG 等^[34]通过 dd-cfDNA 和同种异体移植物活检评估了 63 例怀疑排斥反应的成人肾移植受者。其中,27 例(43%)患者具有供体特异性抗体,34 例(54%)通过活检发现排斥反应。ABMR 患者(中位数 1.35%)的 dd-cfDNA 百分比高于无排斥反应的患者(中位数 0.38%)和细胞介导的排斥反应(中位数 0.27%)($P < 0.05$)。dd-cfDNA $\geq 0.74\%$ 的敏感性为 100%,特异性为 71.8%。HUANG 等^[34]认为,由于原因不明,cfDNA 检测在 TCMR 患者中出现假阳性结果。虽然 cfDNA 在检测 ABMR 的存在方面可能具有广泛的应用,但 dd-cfDNA 的现有科学数据有限,需要进一步研究。

SIGDEL 等^[35]进行了一项研究,使用 NGS 通过基于单核苷酸多态性的大规模多重 PCR(mmPCR)测量从肾移植后患者身上采集的 300 份血浆样本中的 dd-cfDNA 水平。在本回顾性分析中,mmPCR-NGS 方法在检测 dd-cfDNA 水平方面具有 88.7% 的敏感性和 72.6% 的特异性(临界值 $>1\%$),高于 eGFR。AR 组的中位 cfDNA 为 2.32%,非排斥反应组为 0.47%,但 TCMR 组和 ABMR 组之间没有差异。

OELLERICH 等^[4]指出,cfDNA 水平的分数测定不准确,并建议通过 dd-cfDNA 的绝对定量来检测该生物标志物,他们对肾移植后的患者进行了一项单中心研究,结果显示,肾移植后 5 d,无论供体如何,dd-cfDNA 分数的平均量约为 0.6%,非活体供体的绝对 dd-cfDNA 为 98 cp/mL,活体供体的绝对 dd-cfDNA 为 68 cp/mL,具有实际意义。活检证实排斥反应的患者中,dd-cfDNA 中位数为 0.57% 和 82 cp/mL,而在稳定患者中为 0.29% 和 25 cp/mL。作者认为,这种生物标志物可以检测到免疫抑制不足,因为其在他克莫司水平较低的患者中增加。在受试者工作特征曲线分析中测量 dd-cfDNA(%)与拷贝数变异(CNV)相比,显示曲线下面积存在差异(分别为 0.73 和 0.83)。WHITLAM 等^[36]得出结论,dd-cfDNA 分数的测定或 dd-cfDNA 的绝对定量可能同样有助于诊断。在 ABMR 的诊断中,dd-cfDNA 和 dd-cfDNA 的测定对两者的敏感性均为 0.85,特异性分别为 0.75 和 0.79。

ZHOU 等^[37]检查了 30 例肾移植患者的 32 份外周血样本,平均 dd-cfDNA 比值为 1.17%(最高为 3.53%;最低为 0.23%),在排斥反应患者中更具统计学意义。排斥反应患者的 dd-cfDNA 水平(1.69 ± 0.79)% 高于无排斥反应活检标本的对照组(0.90 ± 0.38)%。

DAUBER 等^[5]采用靶向插入/缺失多态性的实时荧光定量 PCR 检测 29 例肾移植受者血浆样品中的 ddcfNA,这些受者在临床指示的活检时获得(8 例患者有组织学证实的 AR,9 例有临界排斥,12 例无排斥)。在活检证实的 AR 受者之间,较小的靶向插入/缺失多态性扩增子靶的 ddcfDNA 水平存在差异(中位数为 5.24%, $P = 0.016$),无排斥(1.50%)和临界 AR 患者(1.91%)。他们确定了 dd-cfDNA 的阈值为 2.7%,显示敏感性为 88%,特异性为 81%。他们发现靶向插入/缺失多态性实时荧光定量 PCR 代表了一种在标准实时荧光定量 PCR 仪器上在 6~8 h 内定量 ddcfDNA 的新方法,具有检测 AR 的高敏感性和高特异性。

STITES 等^[38]评估了 79 例被诊断为 TCMR 1A/边缘排斥的患者的临床结果,并同时测量了 dd-cfDNA。42 例患者的 dd-cfDNA 水平升高($\geq 0.5\%$),37 例患者的 dd-cfDNA 水平较低($< 0.5\%$)。dd-cfDNA 水平升高预示着不良的临床结果:在 cfDNA 升高的患者中,eGFR 下降了 8.5%;在低 dd-cfDNA 患者中,新的供体特异性抗体形成率为 40%,在 42 例患者中,9 例发生了未来或持续的排斥反应。他们发现使用 dd-cfDNA 可以补充 Banff 分类法,并对活检发现的边缘/TCMR 1A 患者进行风险分层。

ZHANG 等^[39]对 37 例连续患者接受了同种异体肾脏移植进行分组研究,其中 ABMR 组 18 例,稳定同种异体移植组 19 例(7 例 DSA 阳性,12 例 DSA 阴性)。ABMR 组所有患者 DSA 阳性,稳定组 7 例 DSA 阳性,但未经病理证实的 ABMR。ABMR 组的中位供体来源血浆 cfDNA 分数为 2.4%,高于稳定组 0.65%($P < 0.05$),但与稳定同种异体移植组的 DSA 阳性患者相当($P = 0.074$)。当选择 1% 的 cfDNA 阈值时,其敏感性为 88.9%,特异性为 73.7%。供体来源的血浆 cfDNA 分数在患有 ABMR 的同种异体肾移植受者中增加。作者发现检测供体来源的血浆 cfDNA 组分可能有助于区分 ABMR 和稳定的同种异

体肾移植功能,并可能有助于早期识别早期抗体介导的损伤。

SHEN等^[40]分析了28例AR患者的77份血液样本(ABMR 5例、TCMR 23例)。测定抗排斥治疗前后dd-cfDNA含量,抗排斥治疗后dd-cfDNA的含量从 $(2.566 \pm 0.549)\%$ 下降至 $(0.773 \pm 0.116)\%$ ($P < 0.05$);血清肌酐在抗排斥治疗后的两组中均无差异($P > 0.05$);抗排斥治疗结束2周后对两组dd-cfDNA含量和血清肌酐水平进行比较,结果显示两组dd-cfDNA含量无差异($P > 0.05$);血清肌酐略有下降($P < 0.05$)。

ANAND等^[41]对125例稳定肾移植患者供体来源的无细胞DNA(dd-cfDNA)的纵向变异受供体/受体变量的影响进行研究,结果表明,肾移植治疗后1个月的dd-cfDNA中位数:①重复肾移植治疗(0.57%)和双重肾移植治疗(1.10%)比首次肾移植治疗(0.31%)高($P < 0.05$);②心脏死亡后的供体(0.45%)与活着的亲属(0.27%)供体之间有差异($P < 0.05$)。纵向(1~3个月)dd-cfDNA测量显示所有供体类型都有显著下降趋势。群体反应性抗体(PRA)与dd-cfDNA呈正相关。

PULIYANDA等^[42]前瞻性收集67例儿童患者,对数据进行分析,以确定dd-cfDNA对识别有排斥风险的移植物的预测价值。67例患者中有19例将dd-cfDNA检测作为常规监测的一部分,dd-cfDNA中位数为0.37%。67例临床怀疑有排斥反应的48例患者中,dd-cfDNA中位数为0.47%。DSA阳性受体的dd-cfDNA评分高于阴性,dd-cfDNA评分与DSA阳性强度无相关性。48例受者中有7例活组织检查dd-cfDNA评分 $< 1\%$,其中2例表现出排斥迹象。dd-cfDNA $> 1\%$ 诊断排斥反应的敏感性为86%,特异性为100%,dd-cfDNA为儿童肾移植排斥反应的早期检测提供了一种无创方法。以上研究表明,dd-cfDNA可以高度预测组织学排斥反应,优于其他指标,如移植物功能障碍或抗体阳性,则需进一步研究来完善这些初步观察结果。

肾移植后对dd-cfDNA进行常规监测可使临床医生识别亚临床同种异体移植物损伤,并在临床出现明显的移植物损伤之前进行干预。为了评估这一点,BU等^[43]分析了1 092例肾移植受者在3年内接受dd-cfDNA监测的数据,评估dd-cfDNA与组织

学证据显示的异体移植排斥反应之间的关联。其发现dd-cfDNA值升高(0.5%或更高)与临床和亚临床异体移植排斥反应相关。dd-cfDNA值在0.5%或更高时,出现新的供体特异性抗体的风险增加了近3倍(危险比为2.71),并且在确定供体特异性抗体之前的91天被确定为中位升高。dd-cfDNA持续升高预示着3年内肾小球滤过率将下降25%以上。因此,对dd-cfDNA的常规监测可以及早发现临床上重要的移植物损伤。生物标志物监测是对组织学和传统实验室监测策略的补充,是移植后的预后标记和风险分级工具。因此,持续较低的dd-cfDNA水平可准确识别异体移植物静止或无损伤,为个性化免疫抑制试验铺平道路。

MANTIOS等^[44]的前瞻性单中心队列研究中,收集了30例新肾移植患者的血液样本,分别在第1、2、3和5个月进行dd-cfDNA分析,同时进行肌酐/eGFR和新生供体特异性抗体监测,并收集了32例接受指示性活检的患者的血液样本,这些患者的dd-cfDNA水平在活检时和1个月后进行测量。活检组的32例患者中有14例(43.8%)被诊断为TCMR,32例患者中有5例(15.6%)被诊断为ABMR。在活检患者中,dd-cfDNA被证明在从无排斥反应中诊断排斥反应方面优于肌酐。当dd-cfDNA阈值选择为0.5%时,敏感性为73.7%,特异性为92.3%。在排斥反应患者中,活检前的dd-cfDNA水平(0.94%,0.3~2.0)在开始治疗后显著下降,中位数在1个月时已经恢复到基线水平(0.33%, $P = 0.004$)。在监测组中,移植后第2个月的高水平dd-cfDNA与移植后1年eGFR无增加相关。该研究首次将AlloSeq试剂盒用于肾移植监测,证实了dd-cfDNA检测排斥反应和监测治疗的能力,以及预测eGFR长期恶化结果的能力。

4 总结与展望

综上所述,cfDNA在肾移植管理中具有重要的临床应用潜力,尤其是在非侵入性监测移植器官健康状态和早期识别排斥反应方面,未来可能成为改善移植患者管理和预后的关键工具。然而,尽管其前景广阔,cfDNA的应用也面临一些局限和挑战。虽然cfDNA提供了快速检测的可能,但其敏感性和特异性在不同的病情和患者体内环境中可能会有所不同。高精度的cfDNA检测技术如数字PCR和

NGS 通常成本较高,可能限制了其在一些设施或地区的广泛应用。目前缺乏关于如何标准化 cfDNA 的抽取、检测和结果解释的统一指南。不同实验室可能使用不同的方法和标准,这可能影响测试结果的一致性和可比性。cfDNA 对于长期移植结果的预测价值仍需进一步研究,目前还不清楚 cfDNA 水平与长期排斥反应和移植肾功能衰退之间的具体关系。

综上所述,cfDNA 在肾移植中的应用提供了一种有前景的非侵入性监测工具,能够改善肾移植患者的管理和治疗结果。然而,为了充分利用这一技术的潜力,还需要解决其在实际应用中的一些局限和挑战。希望未来的研究将关注于提高检测技术的敏感性和特异性,降低成本,并制订相关的标准操作流程。

参 考 文 献 :

- [1] VIKLICKY O, NOVOTNY M, HRUBA P. Future developments in kidney transplantation[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2020, 25(1): 92-98.
- [2] MAXEINER A, BICHMANN A, OBERLÄNDER N, et al. Native nephrectomy before and after renal transplantation in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(10): 1622.
- [3] BELLINI M I, COURTNEY A E, MCCAUGHAN J A. Living donor kidney transplantation improves graft and recipient survival in patients with multiple kidney transplants[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(7): 2118.
- [4] OELLERICH M, SHIPKOVA M, ASENDORF T, et al. Absolute quantification of donor-derived cell-free DNA as a marker of rejection and graft injury in kidney transplantation: results from a prospective observational study[J]. *Am J Transplant*, 2019, 19(11): 3087-3099.
- [5] DAUBER E M, KOLLMANN D, KOZAKOWSKI N, et al. Quantitative PCR of INDELs to measure donor-derived cell-free DNA—a potential method to detect acute rejection in kidney transplantation: a pilot study[J]. *Transpl Int*, 2020, 33(3): 298-309.
- [6] SOLEZ K, COLVIN R B, RACUSEN L C, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions[J]. *Am J Transplant*, 2008, 8(4): 753-760.
- [7] JEONG H J. Diagnosis of renal transplant rejection: Banff classification and beyond[J]. *Kidney Res Clin Pract*, 2020, 39(1): 17-31.
- [8] HAAS M, LOUPY A, LEFAUCHEUR C, et al. The Banff 2017 kidney meeting report: revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials[J]. *Am J Transplant*, 2018, 18(2): 293-307.
- [9] HEITZER E, AUINGER L, SPEICHER M R. Cell-free DNA and apoptosis: how dead cells inform about the living[J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26(5): 519-528.
- [10] MANDEL P, METAIS P. Nuclear acids in human blood plasma[J]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1948, 142(3/4): 241-243.
- [11] GRABUSCHNIG S, BRONKHORST A J, HOLDENRIEDER S, et al. Putative origins of cell-free DNA in humans: a review of active and passive nucleic acid release mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8062.
- [12] MONDELO-MACÍA P, CASTRO-SANTOS P, CASTILLO-GARCÍA A, et al. Circulating free DNA and its emerging role in autoimmune diseases[J]. *J Pers Med*, 2021, 11(2): 151.
- [13] VRACHNIS N, VLACHADIS N, CREATSAS G. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(6): 578.
- [14] MALMIR M, ARJOMANDI J, KHOSROSHAHI A G, et al. Label-free E-DNA biosensor based on PANi-RGO-G* NPs for detection of cell-free fetal DNA in maternal blood and fetal gender determination in early pregnancy[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 189: 113356.
- [15] SNYDER M W, KIRCHER M, HILL A J, et al. Cell-free DNA comprises an *in vivo* nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin[J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 57-68.
- [16] DANOVIATCH G M, BUNNAPRADIST S, COHEN D, et al. Tests for the noninvasive diagnosis of kidney transplant rejection should be evaluated by kidney transplant programs[J]. *Am J Transplant*, 2021, 21(11): 3811.
- [17] TIAN Y K, CHARLES E J, YAN Z, et al. The myocardial infarct-exacerbating effect of cell-free DNA is mediated by the high-mobility group box 1-receptor for advanced glycation end products-toll-like receptor 9 pathway[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2019, 157(6): 2256-2269.e3.
- [18] DINSDALE R J, HAZELDINE J, AL TARRAH K, et al. Dysregulation of the actin scavenging system and inhibition of DNase activity following severe thermal injury[J]. *Br J Surg*, 2020, 107(4): 391-401.
- [19] SARAVANAN R, CHOONG Y K, LIM C H, et al. Cell-free DNA promotes thrombin autolysis and generation of thrombin-derived C-terminal fragments[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 593020.
- [20] CESCÓN D W, BRATMAN S V, CHAN S M, et al. Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology[J]. *Nat Cancer*, 2020, 1(3): 276-290.
- [21] GARCÍA-PARDO M, MAKAREM M, LI J J N, et al. Integrating circulating-free DNA (cfDNA) analysis into clinical practice: opportunities and challenges[J]. *Br J Cancer*, 2022, 127(4): 592-602.
- [22] BRONKHORST A J, UNGERER V, HOLDENRIEDER S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management[J]. *Biomol Detect Quantif*, 2019, 17: 100087.
- [23] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI M A, et al. Circulating mutant

- DNA to assess tumor dynamics[J]. *Nat Med*, 2008, 14(9): 985-990.
- [24] DIEHL F, LI M, DRESSMAN D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(45): 16368-16373.
- [25] RECKAMP K L, MELNIKOVA V O, KARLOVICH C, et al. A highly sensitive and quantitative test platform for detection of NSCLC EGFR mutations in urine and plasma[J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(10): 1690-1700.
- [26] CHELOBANOV B P, LAKTIONOV P P, VLASOV V V. Proteins involved in binding and cellular uptake of nucleic acids[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2006, 71(6): 583-596.
- [27] GRSKOVIC M, HILLER D J, EUBANK L A, et al. Validation of a clinical-grade assay to measure donor-derived cell-free DNA in solid organ transplant recipients[J]. *J Mol Diagn*, 2016, 18(6): 890-902.
- [28] ALTUĞ Y, LIANG N, RAM R, et al. Analytical validation of a single-nucleotide polymorphism-based donor-derived cell-free DNA assay for detecting rejection in kidney transplant patients[J]. *Transplantation*, 2019, 103(12): 2657-2665.
- [29] BROMBERG J S, BRENNAN D C, POGGIO E, et al. Biological variation of donor-derived cell-free DNA in renal transplant recipients: clinical implications[J]. *J Appl Lab Med*, 2017, 2(3): 309-321.
- [30] SHARON E, SHI H, KHARBANDA S, et al. Quantification of transplant-derived circulating cell-free DNA in absence of a donor genotype[J]. *PLoS Comput Biol*, 2017, 13(8): e1005629.
- [31] BLOOM R D, BROMBERG J S, POGGIO E D, et al. Cell-free DNA and active rejection in kidney allografts[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(7): 2221-2232.
- [32] GIELIS E M, LEDEGANCK K J, DENDOOVEN A, et al. The use of plasma donor-derived, cell-free DNA to monitor acute rejection after kidney transplantation[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2020, 35(4): 714-721.
- [33] GIELIS E M, BEIRNAERT C, DENDOOVEN A, et al. Plasma donor-derived cell-free DNA kinetics after kidney transplantation using a single tube multiplex PCR assay[J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0208207.
- [34] HUANG E, SETHI S, PENG A, et al. Early clinical experience using donor-derived cell-free DNA to detect rejection in kidney transplant recipients[J]. *Am J Transplant*, 2019, 19(6): 1663-1670.
- [35] SIGDEL T K, ARCHILA F A, CONSTANTIN T, et al. Optimizing detection of kidney transplant injury by assessment of donor-derived cell-free DNA via massively multiplex PCR[J]. *J Clin Med*, 2018, 8(1): 19.
- [36] WHITLAM J B, LING L, SKENE A, et al. Diagnostic application of kidney allograft-derived absolute cell-free DNA levels during transplant dysfunction[J]. *Am J Transplant*, 2019, 19(4): 1037-1049.
- [37] ZHOU Y, YANG G D, LIU H T, et al. A noninvasive and donor-independent method simultaneously monitors rejection and infection in patients with organ transplant[J]. *Transplant Proc*, 2019, 51(6): 1699-1705.
- [38] STITES E, KUMAR D, OLAITAN O, et al. High levels of dd-cfDNA identify patients with TCMR 1A and borderline allograft rejection at elevated risk of graft injury[J]. *Am J Transplant*, 2020, 20(9): 2491-2498.
- [39] ZHANG H X, ZHENG C T, LI X R, et al. Diagnostic performance of donor-derived plasma cell-free DNA fraction for antibody-mediated rejection in post renal transplant recipients: a prospective observational study[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 342.
- [40] SHEN J, GUO L Y, YAN P P, et al. Prognostic value of the donor-derived cell-free DNA assay in acute renal rejection therapy: a prospective cohort study[J]. *Clin Transplant*, 2020, 34(10): e14053.
- [41] ANAND S, LOPEZ-VERDUGO F, SANCHEZ-GARCIA J, et al. Longitudinal variance of donor-derived cell-free DNA (dd-cfDNA) in stable kidney transplant (KTx) patients are influenced by donor/recipient variables[J]. *Clin Transplant*, 2021, 35(9): e14395.
- [42] PULIYANDA D P, SWINFORD R, PIZZO H, et al. Donor-derived cell-free DNA (dd-cfDNA) for detection of allograft rejection in pediatric kidney transplants[J]. *Pediatr Transplant*, 2021, 25(2): e13850.
- [43] BU L H, GUPTA G, PAI A, et al. Clinical outcomes from the assessing donor-derived cell-free DNA monitoring insights of kidney allografts with longitudinal surveillance (ADMIRAL) study[J]. *Kidney Int*, 2022, 101(4): 793-803.
- [44] MANTIOS E, FILIOPOULOS V, CONSTANTOULAKIS P, et al. Assessment of donor derived cell free DNA (dd-cfDNA) at surveillance and at clinical suspicion of acute rejection in renal transplantation[J]. *Transpl Int*, 2023, 36: 11507.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 程贤雄, 莫银竹, 吕仕杰, 等. 肾移植中供体来源的游离 DNA 作为潜在的排斥生物标志物的研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2025, 35(1): 54-61.

Cite this article as: CHENG X X, MO Y Z, LÜ S J, et al. Research progress on donor-derived cell-free DNA as a potential rejection biomarker in kidney transplantation[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2025, 35(1): 54-61.