

白细胞介素 2及其受体 mRNA 早期诊断心脏移植免疫排斥反应

李 岩 陈宝田 邱长春

目的 为探讨心脏移植急性免疫排斥反应的早期诊断,为临床治疗提供依据。**方法** 采用健康人外周血单个核细胞(PBMC)及非紫绀型先天性心脏病患者心肌细胞作为研究对象。使两者混合培养制备成体外心脏移植急性免疫排斥反应模型,借助逆转录—多聚酶链式反应(RT-PCR)技术和血清学检测方法,对IL-2、IL-2RmRNA在免疫排斥反应中的早期诊断进行了探索研究。**结果** IL-2、IL-2RmRNA转录及蛋白产生,受同种抗原刺激后有明显升高,与对照组相比差异均有显著意义($P < 0.01$)。IL-2、IL-2RmRNA转录高峰出现在培养开始后24小时,比心肌细胞受损出现时间,及IL-2、IL-2R蛋白高峰出现时间(72小时)提前48小时。**结论** IL-2、IL-2R系统参与了心脏移植免疫排斥反应的发生、发展;IL-2、IL-2RmRNA的监测对免疫排斥反应有早期诊断意义;RT-PCR技术能够快速分析mRNA,而且灵敏、特异性高,适用于临床研究。

关键词 白细胞介素 2 受体 核糖核酸,信使 心脏移植 排斥反应
早期诊断

IL-2, IL-2R mRNA gene expression and protein production. Li Yan, Chen Baotian, Qiu Changchuan. Department of Heart surgery, An zheng Hospital, Beijing 100029.

Objective To analyse IL-2, IL-2 RmRNA gene expression and protein production before, during, and after rejection of heart transplantation in vitro model. **Method** The in vitro system consists of peripheral PBMC of health donor as response cells and cardiomyocytes of patient suffering from acyanotic congenital heart disease as stimulating cells. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used. **Results** mRNA transcription and protein production of IL-2, IL-2R rose markedly after stimulation of alloantigen, and were different from those of the control ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The summit of IL-2, IL-2 RmRNA transcription was detected 24 hours after initiation of mixed culture, 48 hours earlier than the time (72 hours) at which damage of cardiomyocytes was detected electronmicroscopy and the peak of IL-2, IL-2 Rprotein production detected. **Conclusion** IL-2/IL-2R system plays an important role in the rejection of heart transplantation. Detection of IL-2, IL-2 RmRNA transcription is significant for early diagnosis of rejection. RT-PCR makes analysis of mRNA rapid, and is sensitive and high specific.

Key words IL-2 IL-2R mRNA Heart transplantation Rejection Early Diagnosis

(Natl Med J China, 1996, 76: 505-508)

心脏移植是治疗终末期心脏病的有效方

法。由受体淋巴细胞引起的免疫排斥反应仍是心脏移植成功的主要障碍。进行急性免疫排斥反应早期诊断的研究,对其临床治疗有重要意义。我们利用体外心脏移植急性免疫排斥反应

本课题为卫生部科研基金资助项目

作者单位: 100029 首都医科大学附属北京安贞医院心脏外科(李岩、陈宝田)。中国医学科学院基础医学研究所

心肌细胞为刺激细胞,借助逆转录-多聚酶链式反应(RT-PCR)技术和血清学检测方法,对 IL-2 mRNA 对于免疫排斥反应的早期诊断进行了探索研究。

对象和方法

一、对象

实验对象为健康人外周血单个核细胞(PBMC);非紫绀型先天性心脏病(简称先心病)患者心肌细胞(Dn)。

二、方法

1. 心肌细胞的分离纯化:术中取心肌,剪成 1mm^3 组织块;收集后加酶消化液适量,于 30°C 消化 15~20 分钟,加 1/3 体积胎牛血清终止消化。纯化心肌细胞,台盼蓝染色鉴定心肌细胞活率大于 90%,用达尔伯克氏(DMEM)完全培养液调细胞浓度为 $\times 10^5/\text{L}$ 。

2. PBMC 的制备:采用 FICOLL 梯度离心法,分离后的 PBMC 用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液,调细胞浓度为 $\times 10^5/\text{L}$ 。

于 24 孔培养板中每孔加入细胞及试剂 I 组:PBMC 悬液 1ml 植物血凝素 A(PHA) $20\mu\text{g}$ DMEM 1ml; II 组:PBMC 悬液 1ml DMEM 1ml; III 组:心肌细胞(Dn)悬液 1ml DMEM 1ml; IV 组:PBMC 悬液 1ml Dn 悬液 1ml; V 组:PBMC 悬液 1ml 自体心肌细胞(ND)悬液 1ml; VI 组:PBMC 悬液、Dn 悬液各 1ml 环孢素 A(CsA) $0.33\text{mg}/\text{ml}$ 每组设 6 个复孔,分别在培养开始后 6 24 48 72 96 144 小时 6 个不同的时间点收集培养液上清。PBMC 及心肌细胞。实验用 10 个不同个体的心肌重复 10 次。

3. 逆转录:收集 PBMC 于 0.5ml Eppendorf 管中。加入 40U RNA 酶抑制剂(RNasin),二乙基焦磷酸胺(DEPC)水 $20\mu\text{L}$,充分混匀后置冰浴中 20 分钟破细胞膜,使 RNA 释放于液相中,2000r/min 离心 10 分钟,取上清备用。逆转录试剂盒为美国 Spectronics 公司产品。反应条件: 4°C 保温 30 分钟,然后于

冰冷却后 4°C 保存备用。

4. PCR 扩增:扩增引物(中国科学院微生物研究所合成)序列: β -actin $5'$ -GAAACTACCTTCAACTCCATC- $3'$, $5'$ -CTAGAAGCATTGCGGTGGAC- $3'$, (300bp); IL-2 $5'$ -TG-TACAGGATGCAACTCCTG- $3'$, $5'$ -CAATG-GTTGCTGTCTCATCAG- $3'$, (402bp); IL-2R $5'$ -GAATTTATCATTTTCGTGGTGGGGCA, $5'$ -TCTTCTACTCTTCCTCTGTCTCCG, (394bp)。PCR 扩增条件: 95°C 变性 40 秒; 60°C 退火 1 分钟; 72°C 延伸 1 分钟,循环 30 次。 β -actin, IL-2, IL-2R 的 PCR 扩增条件相同。PCR 扩增产物用 1.8% 琼脂糖凝胶作电泳分析。紫外灯下观察 DNA 带,拍照记录。

5. IL-2 的检测采用 MTT 比色法:于 96 孔平底培养板中加入 CTLL-2 细胞悬液 $50\mu\text{L}$ ($4 \times 10^5/\text{ml}$),倍比稀释的待测液(培养上清) $50\mu\text{L}$,每稀释度设 3 个复孔,对照加细胞和 RPMI 1640 培养液各 $50\mu\text{L}$,于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 48 小时,加 MTT $20\mu\text{L}$,继续培养 4 小时,再加 10% SDS $100\mu\text{L}$,于 37°C 过夜后测 570nm 的吸光度(A)“旧称光密度(OD)”值,三孔取均值,然后于标准曲线上查出 IL-2 的含量。

6. IL-2R 的血清学检测:将待测 PBMC 与 4°C Buffered 培养液 1ml 作用 1 分钟,离心去上清,加入含 IL-2 标准品 $20\text{U}/\text{ml}$ 的 1640 培养液 1ml,置 5% CO_2 ,饱和湿度, 37°C 的培养箱中作用 1 小时,离心后测上清液中 IL-2R 的含量(同 IL-2 的检测),标本中 IL-2R 的含量用下列公式计算:

$$\text{IL-2R}(\text{U}/\text{ml}) = [\text{IL-2 标准品量}(\text{U}/\text{ml}) \times \text{加入体积} - \text{剩余 IL-2 量}(\text{U}/\text{ml}) - \text{剩余体积}] / \text{剩余体积}$$

7. 心肌细胞的电镜检查:离心收集待检心肌细胞,6 小时内送检。拍照记录结果。

结果

1. I、IV 组 IL-2 mRNA 在培养 6 小时就在阳性表达,高峰出现在培养 24 小时,

表 1 不同培养时间检测 IL-2 m RNA IL-2R m RNA的阳性个体数

组别	标本数	培养时间 (h)					
		6	24	48	72	96	144
PBM G+ PHA Δ	10	6 (4)	10 (8)	9 (9)	4 (6)	1 (2)	0 (0)
PBMC	10	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
PBM G+ Dn Δ	10	4 (4)	9 (10)	10 (9)	4 (6)	2 (4)	0 (0)
PBM G+ ND	10	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
PBM G+ Dn+ Cs A	10	0 (0)	1 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

注: PBM G- 外周血单个核细胞; PHA- 植物血凝素 A; Dn- 异体心肌细胞; ND- 自体心肌细胞; Cs A- 环孢素 A; 括号内为 IL-2Rm RNA; (表 2下同) Δ 与 PBM G+ ND组和 PBM G+ Dn+ Cs A组相比 $P < 0.05$

表 2 不同培养时间 IL-2(IL-2R蛋白)表达检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	培养时间 (h)					
		6	24	48	72	96	144
PBM G+ PHA Δ	10	-	3.6 \pm 1.1	5.5 \pm 1.8	13.3 \pm 2.8	11.3 \pm 3.0	2.7 \pm 1.7
		(-)	(2.7 \pm 1.1)	(7.7 \pm 0.6)	(17.2 \pm 2.8)	(9.2 \pm 3.0)	(2.0 \pm 0.7)
PBMC	10	-	-	-	-	-	-
PBM G+ Dn Δ	10	-	2.2 \pm 1.4	4.7 \pm 1.4	11.3 \pm 2.0	9.9 \pm 1.8	2.0 \pm 0.9
		(-)	(2.2 \pm 1.5)	(5.7 \pm 1.2)	(15.0 \pm 3.0)	(9.9 \pm 2.2)	(1.5 \pm 1.0)
PBM G+ ND	10	-	0.7 \pm 0.9	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	-
		(-)	(0.7 \pm 0.1)	(0.2 \pm 0.1)	(0.6 \pm 0.2)	(0.2 \pm 0.1)	(-)
PBM G+ Dn+ Cs A	10	-	-	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	-
		(-)	(-)	(0.7 \pm 0.1)	(0.2 \pm 0.1)	(0.7 \pm 0.1)	(-)

注: Δ 与 PBM G+ ND组和 PBM G+ Dn+ Cs A组相比 $P < 0.01$

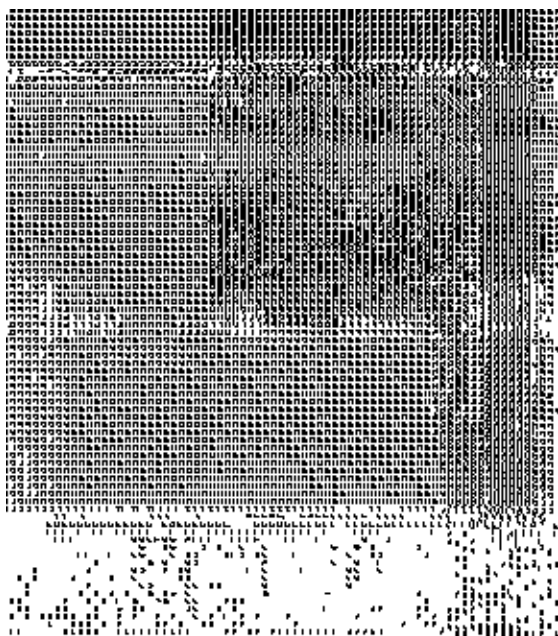


图 1B IV组培养 24小时, 9个个体出现 IL-2, m RNA 2R转录; 10个个体出现 IL-2Rm RNA 转录 Marker PBR322/M SP

actin m RNA的检测为内对照, 各组 PBMC都有 β -actin m RNA 表达, 证明实验中总 RNA 完整, 逆转录成功。

2. I、IV组培养 24小时出现 IL-2, IL-2R 蛋白表达, 72小时达高峰(表 2) V、VI组无明显蛋白表达 ($P < 0.01$)。

3. 心肌细胞电镜检查显示: IV组心肌细胞培养 72小时明显受损, 其它各组心肌细胞均无 e, 明显受损表现(图 2)

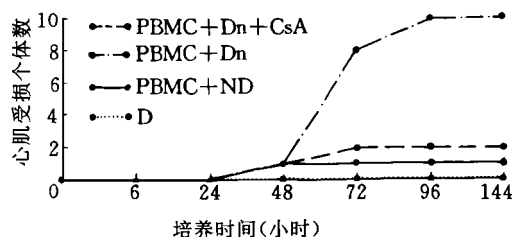


图 2 各组心肌受损时间

4. IL-2, IL-2Rm RNA的检出比 IL-2, IL-2R蛋白高峰出现时间和心肌受损时间, 早 48

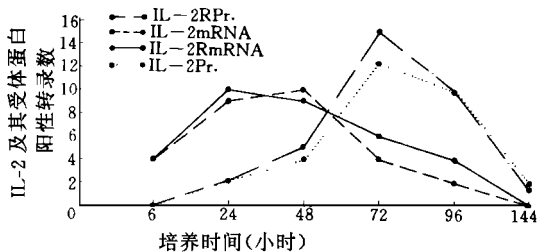


图3 IL-2 IL-2RmRNA及蛋白高峰时间

讨论

IL-2/IL-2R系统是淋巴细胞增殖、活化所必需的淋巴因子。Benito等^[1]认为,IL-2的免疫放大效应是急性免疫排斥反应发生的重要机制。Salom等^[2]在动物心脏移植研究发现,发生免疫排斥反应时,IL-2蛋白水平升高。IL-2/IL-2R蛋白产生,首先要经过mRNA的转录,然后翻译合成蛋白。理论上说,mRNA的出现早于蛋白的合成。因此,监测IL-2/IL-2RmRNA对移植排斥反应有早期诊断意义。对临床治疗更有帮助。

动物心脏移植研究发现,IL-2蛋白的升高,与移植免疫排斥反应有明显的相关性^[2],抑制IL-2/IL-2R的蛋白水平的表达,可达到对免疫排斥反应的防治作用,并可诱导出动物脏器移植受体的特异性免疫耐受^[3]。本组实验结果亦表明,IL-2,IL-2R参与了免疫排斥反应。

本组心脏移植模拟实验发现,未发生免疫排斥反应时(心肌细胞尚未出现受损表现时),就已有IL-2,IL-2RmRNA的转录高峰出现。而排斥反应发生,造成心肌损害出现于72小时,此时才出现IL-2/IL-2R蛋白表达高峰。因此推测,移植受体IL-2,IL-2RmRNA转录的检测,对免疫排斥反应有早期诊断意义。

IL-2/IL-2RmRNA的转录对于同种异体抗原刺激具有一定的特异性。在动物心脏移植研究中,只有在同种异基因心脏移植动物发生急性免疫排斥反应时,才有IL-2mRNA出现,并认为受体淋巴细胞只有受同种抗原刺激时,

才有IL-2mRNA的转录^[4]。本组实验表明,IL-2mRNA的转录及蛋白表达,在同基因心脏移植模型组(V组),没有明显升高。而在同种异体心脏移植模型组(IV组)明显升高,两组相比差异有非常显著意义($P < 0.05$),支持以上结论。

临床研究发现^[5],接受CsA治疗仍有排斥反应发生的病人,也有IL-2/IL-2R蛋白水平升高。本实验CsA(VI)组中,IL-2/IL-2RmRNA的转录受抑制,没有排斥反应发生,心肌细胞生长良好。因此,对使用CsA治疗的心脏移植病人,监测IL-2mRNA,对排斥反应同样有诊断意义。

总之,IL-2/IL-2R系统参与了心脏移植免疫排斥反应;IL-2/IL-2RmRNA的检测对排斥反应有早期诊断意义。对IL-2/IL-2R系统与心脏移植免疫排斥反应的关系,进行深入的实验及临床研究,可望找到排斥反应早期诊断的新途径。

参考文献

- 1 Benito A Y, Mariska K, Marion EP. Analysis of cytokine production by graft-infiltrating cells isolated from rejecting renal allografts. *Transplantation*, 1994, 57: 153.
- 2 Salom R N, Julie AM, Wayne WH. Mechanism of a clinically relevant protocol to induce tolerance of cardiac allografts. *Transplantation*, 1993, 56: 1309.
- 3 Diego C, Brigitte LM, Maryoonne H, et al. Prevention of acute rejection episodes with an anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibody. *Transplantation*, 1994, 57: 198.
- 4 Morgan C. Alloantigen-dependent endothelial phenotype and lymphokine mRNA expression in rejecting murine cardiac allografts. *Transplant*, 1993, 55: 919.
- 5 Dittmer R, Harfmann P, Tenschert R, et al. Monitoring of renal transplant patients with interleukin-2 and interleukin-2 receptor enzyme immunoassay and interleukin-2 receptor immunocytology. *Transplant Proc*, 1990, 22: 2284.

(收稿: 1995-08-07 修回: 1996-02-12)

(本文编辑: 陈新石)