

。短文报道。

心脏移植后外周血 SRP68 基因表达的研究*

北京市心肺血管疾病研究所(100029)细胞免疫室

许秀芳 孟旭** 刘艳霞 李文 刘舒 周健*** 黄益民

对扩张性心肌病患者来说,施行原位心脏移植术是其最佳选择,移植术后排斥反应的检测是指导临床用药的关键措施,目前有许多移植术后急性排斥反应的诊断方法,但是特异性较差。本文目的是从分子水平探讨免疫排斥反应的机理和寻找外周血免疫排斥反应的早期监测指标。

1. 临床资料(1)患者移植前情况 男,44岁,临床诊断为扩张性心肌病,施行原位心脏移植术,供者配型:HLA I: A1, 28; B8, 35; [BW6] HLA II: DR13; [DR52] DQ5(1)DQ2 受者配型:HLA I: A11, B52(5), 62(15)[BW4 BW4] HLA II: DR15(2), 1304(6) DR52 DQ6(1) DQ(3)。术前超声心动图示:左心增大,室间隔肥厚,室壁运动普遍减低,左心功能减低,二尖瓣关闭不全。(2)患者移植后情况 术后1周心功能II级;超声心动图示右心右房轻度增大,左室顺应性降低,极少量心包积液;CsA(环孢霉素A)浓度检测第一日354.59ng/ml,第三日434 ng/ml,第五日303.4ng/ml,第六日318ng/ml,第七日611.8ng/ml,第八日466.88ng/ml,第九日502.22ng/ml,第十日856ng/ml。第十天心肌活检示部分心肌肥厚,轻度急性细胞排斥反应,间质水肿,内皮细胞增生,不排除轻度体液排斥。

2. 外周血(1)外周血白细胞的分离 术前取受体和供体的外周血及受术术后1h、72h、187h、283h、305h外周血用淋巴细胞分离液分离白细胞。(2)利用RNeasy kit试剂盒(Qiagene)提取总RNA。

3. 仪器PCR仪是Perkin Elmer R/Cetus公司的DNA Thermal Cycler 480,电泳仪为genomex LR™ DNA Sequencer electrophoresis System(G×100)。

4. DD-PCR cDNA第一链合成以T7(d12)AP(anchor primer)为引物,按HIEROGLYRH™ m-RNA Profile System试剂盒说明书操作,3'端锚定引物

AP(2 μ M)2 μ l加入1 μ g总RNA,70℃变性5min,置于冰上。再加入dNTP(250 μ M)2 μ l,5Xbuffer4 μ l,DTT(100mM)2 μ l,Superscript II(200u/ μ l)0.3 μ l,加水补充到总反应体系20 μ l,42℃,10min,50℃60min,50℃60min;70℃15min。3'端引物(7#)5'ACGACTCACTCTATAGGGCTTTT TTTT TTTT CG3'。差异显示PCR和差异片段回收以反转录产物为模板进行PCR,反应体系为10 μ l,其中3 μ l反转录产物,2 μ l dNTP(250 μ m),1.5 μ l的水,1 μ l10Xbuffer,0.6 μ l Taq酶(10U/ μ l),0.7 μ l的TMR-AP(fluoroDD anchored primer,5 μ m,7#),分别加1.75 μ l的ARP(9#10#11#)。反应条件:95℃,2min,1个循环;94℃,30s,50℃,30s,72℃,2min,进行4个循环;94℃,30s,60℃,30s,72℃,2min,共进行25个循环,于72℃,延伸7min。3'荧光引物(7#)5'*ACGACTCACTCTATAGGGCTTTT TTTT TTTT CG3'5'引物9#5'ACAATTTACAGGATAAGACTAGC3'10#5'ACAATTTACAGGAGATCTCAGAC3'11#5'ACAATTTACAGGAACGCTAGTG T3'

5. 变性PAGE分离差异条带与荧光显影 将10 μ l的PCR产物加4 μ l荧光上样缓冲液,95℃浓缩,加到5.6%变性聚丙烯酰胺胶(HR-1000)上,以3000V,52℃,100W恒功率电泳,4h后genomex XSC扫描仪荧光显示差异条带,比较差异条带。差异条带回收与二次PCR将凝胶上回收的差异表达条带,溶于30 μ l TE缓冲液中,37℃温育60min。取3 μ l作模板,按下述反应体积:4 μ l dNTP(250 μ m),5'端引物和3'端引物各2 μ m 2 μ l,2 μ l10Xbuffer,0.06 μ l Taq酶(10/ μ)。反应条件:95℃,2min,1个循环;95℃,30s;60℃,30s,72℃,2min,进行29个循环;72℃,7min3'引物(T7 promotor)5' GTAATACGACTCAC

TATAGGGC (T)₁₂ GG 3' 5' 引物 (M13 reverse) 5'
AGCGGATAACAATTTCACACAGGA 3'

6 克隆测序 用 PGEM-T easy 克隆试剂盒 (Promega) 对差异表达的 cDNA 片段进行连接和克隆。具体操作参照试剂盒提供的方法进行。核酸序列分析, 双链 DNA 测序采用 Big Dye Terminator 试剂盒在 ABI PRISM 377+96 型自动测序仪进行测序。测序后将差异 cDNA 的核苷酸序列与 GenBank 核酸数据库中的已知序列进行同源性比较和读框分析。

结果 1. mRNA 差异显示条带 利用差异显示 PCR 技术分析移植后外周血白细胞基因表达的差异, 共选用了 1 个 3' 端锚定引物 (dT₁₂CG) 与 3 个 5' 端随机引物共同进行 DDPCR 反应, 在聚丙烯酰胺凝胶显示的 cDNA 条带中有 10 条 cDNA 条带的表量在移植前后发生变化 (图 1), 其中第七条带是特殊的, 这一条带基因在术前表达, 而术后不表达。

2 序列分析 见图 2。将第七条带 cDNA 的核苷酸序列与 GenBank 核酸数据库中的已知序列进

行同源性比较和读框分析, 结果显示与 SRP68 基因有 95% 同源性。

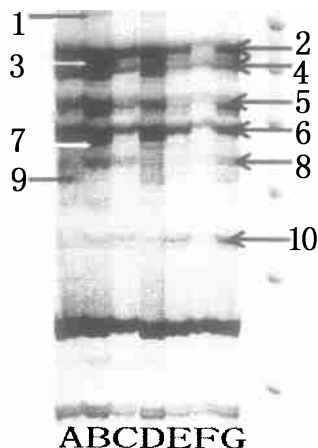


图 1 DDPCR 凝胶电泳显影

注: A 供体, B 受体术前, CDEFGH 分别为 1、72、187、283、305h (1 ~ 10) 分别为移植前后表达量改变的 cDNA 条带

```

42lccccgaaaac ggtttcactt gttatctcgc ctacgcaaag ccgtgaagca tgcagaggaa
48l1ttggaacgct tgtglaagag caatcgctgt gatgccaaga ccaaattaga ggctcaggct
54ltacacagctt acctctcagg aatgctacgt tttgaacatc aagaatggaa agctgccatt
60lgaggctttta acaaatgcaa aactatctat gagaagctag ccagtgcatt cacagaggag
66lcaggctgtgc tgtataacca acgtgtggaa gagatttcac ccaacatccg ctattgtgca
72ltataatattg gggaccagtc agccatcaat gaactcatgc agatgagatt gaggtctggg
78lggcactgagg gtctcttggc tgaaaaattg gaggctttga tcactcagac tgcagccaaa
84l caggcgacta ccatgagtga agtggagtgg agaggagaa cggttccagt gaagattgac
90l aaagtgcgca ttttcttatt aggactggct gataacgaag cagctattgt ccaggctgaa
96l agcgaagaaa ctaaggagcg cctgtttgaa tcaatgctca gcgagtgtcg ggacgccatc
  
```

图 2 SRP68 部分核苷酸序列分析

讨论 mRNA 差异显示技术已广泛用于鉴定和克隆真核生物不同细胞之间、不同器官之间以及不同环境条件下差异表达的基因, 与 cDNA 文库差异筛选和减法杂交等技术相比, DD-PCR 具有简便、快速、灵敏度高等优点。本文应用 DD-PCR 技术检测心脏移植后外周血白细胞基因的表达。外周血检查与活组织检查方法相比具有对移植器官无创伤、患者痛苦少等优点, 在探讨基因在移植中的作用以

反应, 间质水肿, 内皮细胞增生, 轻度体液排斥, 而 DD-PCR 结果显示外周血特殊基因有变化: SRP68 基因术前表达, 术后不表达, 在急性排斥反应发生时仍不表达, 活检结果与基因变化是否相关值得探讨。

SRP68 是 Politz 首次测得的, SRP 是信号识别体, 它是一种核糖核蛋白构成的颗粒, 它的沉降系数为 11S, 含有 7S RNA 和 6 条分子量为 72K、68K、54K、19K、14K 以及 9K 的多肽。SRP 能专一

有信号肽的核糖体引向内质网表面,与分布其上的停靠蛋白(又称信号识别体受体)相结合。停靠蛋白通过与 SRP 作用使暂时抑制的翻译过程恢复进行,它可引起内质网上核糖体受体蛋白的聚集,这种受体具有形成孔道的功能,可使翻译出来的肽链直接进入内质网腔,进入内质网的蛋白质在信号肽切除之后即进入折叠、糖基化及二硫键形成等加工过程。总之 SRP68 基因是蛋白表达调控元件。

移植后 SRP68 不表达,是否会影响多肽的合成和加工或细胞因子的表达,SRP68 表达的变化是否是移植后环孢霉素药物作用(CsA 能抑制 calcineurin 的丝氨酸磷酸酯酶活性,抑制胞浆中对 CsA 敏感的 NF-AT 的活化,从而阻断 IL-2 基因的活化),或是排斥反应其它转录因子的作用所致有待进一步的研究证实。

(2000-03-06 收稿,2000-04-29 修回)

冷凝集试验强阳性病人急诊体外循环处理(附 1 例报告)

北京安贞医院(100029)体外循环科

刘凤珍 王仕刚 车毅君 尤 斌 戴 萍 龚庆成

1998 年 12 月,我院完成 1 例急诊冷凝集试验强阳性病人体外循环。患者女性,42 岁,因心慌、憋气、右下肢肿胀 3 个月,以“右房粘液瘤”急诊入院。血库配血,室温 23℃抽血时发生凝集现象,放 37℃水箱 5 min 后消失,交叉配血呈同样结果,冷凝集素效价 1:1024。常规麻醉,CPB 应用西京 90 氧合器,预充乳酸林格液 1000ml,血安定 500ml,5% NaHCO₃ 50ml,地塞米松 20mg,加温至 37℃。体内肝素 3mg/kg,机内肝素 1mg/kg,室内温度不低于 23℃,灌注前 30min,将晶体停跳液插排气针头放在 35℃水浴中预热。主动脉、上下腔静脉插管,CPB 中血温保持 37~38℃,阻断升主动脉,加压灌注安贞 I 号温晶体停跳液 1000ml,心电图呈直线,心肌表面未降温,术中发现右房血栓样物。转流中鼻咽温/肛温:37.2℃/36.9℃,动脉流量 70ml/kg/min,血压 7.6~11.2kPa(57~84mmHg),ACT 730 秒,阻断冠状动脉血流 20min,心肌电机械活动一直呈静止状态。开放升主动脉,心脏自动复跳,CPB 共 35min,尿量 400ml,色清。停转流后鱼精蛋白 3mg/kg 中和肝素。术后 7h 清醒,11h 拔管,12h 安全返回病房。病理诊断右房血栓,术后 14 天痊愈出院。6 个月后复查未见复发。

讨论 冷凝集试验阳性病人比较少见,强阳性且急诊体外循环更少见,我们结合本例浅谈对冷凝集强阳性体外循环的管理。冷凝集试验阳性病人的抗体主要为 IgM(冷凝集),在 30℃以下反应活跃,使红细胞凝集成块,在循环中相撞而溶血。冷凝素亦可使补体激活直接破坏红细胞。本例由于室温 23℃配血时发现冷凝集试验强阳性,因条件所限血标本在 23℃以上环境未做此实验。因此我们在 CPB 中(1)血温保持 37℃,室内温度不小于 23℃,避免产生冷抗体。(2)常温手术灌注流量采用中高度,灌注压大于 70mmHg,头低位,确保重要脏器的血供。(3)温晶体停跳液灌注,避免冠状循环内凝血或溶血的发生,避免冠脉栓塞,避免体温降底。(4)心脏表面未降温:由于预计冠脉血流阻断时间比较短,避免开放升主动脉时心肌温度达不到 23℃以上。(5)ACT 每隔 20min 测 1 次。(6)观察泵压变化。(7)监测鼻咽温及肛温,肢体末端需保暖。(8)术后尽量不输血或少输血,输入的血必须选择与同种抗体相容的血液,交叉配血实验应严格在 37℃进行,最适输血量依临床情况而定,适当将血加温,且需慢输,输入的红细胞量达到维持氧交换和心肺功能即可。(9)有条件者体外循环前应作冷凝集试验。

(2000-02-25 收稿)