

# 心脏移植后外周血 FK506 结合蛋白 1A 基因的表达<sup>†</sup>

北京市心肺血管疾病研究所细胞免疫室

许秀芳 李温斌\* 孟旭\* 李文 刘艳霞 刘舒 周健<sup>△</sup> 黄益民

**提要:** 利用荧光差异显示 PCR(DD-PCR)技术检测心脏移植后外周血白细胞基因的表达。结果显示: RPL23 基因移植后有波动, 排斥发生时表达增强; FK506 结合蛋白 1A 基因移植后表达较弱, 排斥发生时明显增强。提示: 外周血 DD-PCR 检测白细胞基因的表达可能对研究排斥反应机制及进行移植排斥反应诊断具有一定的意义。

**关键词:** 心脏移植; 荧光差异显示 PCR; 差异表达; 序列测定

**中图分类号:** R 654.2

对扩张性心肌病行原位心脏移植术后患者最主要的是检测排斥反应, 以指导临床用药。关于移植术后急性排斥反应的诊断方法很多, 但是特异性均较差。本研究从分子水平探讨免疫排斥反应的机制, 并寻找外周血免疫排斥反应的早期监测指标。

## 1 材料和方法

### 1.1 临床资料

患者移植前情况: 男, 44 岁, 1999 年 11 月以扩张性心肌病收入我院, 行原位心脏移植术。供者配型: HLA I: A1, 28; B8, 35; [BW6] HLA II: DR1 3; [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。

患者移植后情况: 术后心功能 2 级; 术后超声心动图示右心房轻度增大, 左心室顺应性降低, 极少量心包积液; CsA(环孢霉素 A)质量浓度检测: 术后第 2 天 354.6  $\mu\text{g/L}$ , 术后第 3 天 434.0  $\mu\text{g/L}$ , 术后第 5 天 303.4  $\mu\text{g/L}$ , 术后第 6 天 318.0  $\mu\text{g/L}$ , 术后第 7 天 611.8  $\mu\text{g/L}$ , 术后第 8 天 466.9  $\mu\text{g/L}$ , 术后第 9 天 502.2  $\mu\text{g/L}$ , 术后第 10 天 856.0  $\mu\text{g/L}$ 。第 10 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, 不排除轻度排斥。

### 1.2 外周血

外周血白细胞的分离: 术前取受体和供体的外周血及受体于术后 1、72、187、283、305 h 用淋巴细胞分离液分离的白细胞。

利用 RNeasy kit 试剂盒(Qiagen)提取总 RNA。

DD-PCR: CDNA 第 1 链合成: 以 T7(d12) AP (anchored primer) 为引物, 按 HIERO-GLYPH<sup>TM</sup> mRNA Profile System 试剂盒说明书操作。3'端锚定引物 AP(2  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 加入 1  $\mu\text{g}$  总 RNA, 70  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 置于冰上。再加入 dNTP(250  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 5 $\times$ buffer 4  $\mu\text{L}$ , DTT(100 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , Superscript II (200 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ , 加水补充到总反应体系 20  $\mu\text{L}$ , 42  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min, 50  $^{\circ}\text{C}$  60 min; 70  $^{\circ}\text{C}$  15 min。3'端引物(7 #): 5'ACGACTCACTCTATAGGGCTTT TTT TTT TTT TCG3'。

差异显示 PCR 和差异片段回收: 以反转录产物为模板进行 PCR, 反应体积为 10  $\mu\text{L}$ , 其中 3  $\mu\text{L}$  反转录产物, 2  $\mu\text{L}$  dNTP(250  $\mu\text{mol/L}$ ), 1.5  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O, 1  $\mu\text{L}$  10 $\times$ buffer, 0.6  $\mu\text{L}$  Taq 酶(10 U/ $\mu\text{L}$ ), 0.7  $\mu\text{L}$  TMR-AP(fluoroDD anchored primer, 5  $\mu\text{mol/L}$ , 7 #), 分别加 1.75  $\mu\text{L}$  ARP(9 # 10 # 11 #)。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min, 1 个循环; 94  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 50  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min, 进行 4 个循环; 94  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min, 共进行 25 个循环, 于 72  $^{\circ}\text{C}$ , 延伸 7 min。

3' 荧光引物 (7 #): 5' \*ACGACTCACTC-TATAGGGCTTTTTTTTTTTTCG 3'

5' 引物: 9 # 5' ACAATTTACAGGA TAAGACTAGC 3'; 10 # 5' ACAATTTAC AGGAGATCTCAGAC 3'; 11 # 5' ACAATTT CACAGGAACGCTAGTG T 3'

变性 PAGE 分离差异条带与荧光显影: 将 10  $\mu$ L 的 PCR 产物加 4  $\mu$ L 荧光上样缓冲液, 95  $^{\circ}$ C 浓缩, 加到 5.6% 变性聚丙烯酰胺胶 (HR-1000) 上, 以 3 000 V, 52  $^{\circ}$ C, 100 W 恒功率电泳, 4 h 后 gemomyXSC 扫描仪荧光显示差异条带, 比较差异条带。差异条带回收与 2 次 PCR: 将凝胶上回收的差异表达条带, 溶于 30  $\mu$ L TE 缓冲液中, 37  $^{\circ}$ C 温育 60 min。取 3  $\mu$ L 作模板, 按下述反应体积: 4  $\mu$ L dNTP (250  $\mu$ mol/L), 5' 端引物和 3' 端引物各 2  $\mu$ mol/L 2  $\mu$ L, 2  $\mu$ L 10 $\times$  buffer, 0.06  $\mu$ L Taq 酶 (10 U/ $\mu$ L)。反应条件: 95  $^{\circ}$ C, 2 min, 1 个循环; 95  $^{\circ}$ C, 30 s; 60  $^{\circ}$ C, 30 s; 72  $^{\circ}$ C, 2 min, 进行 29 个循环; 72  $^{\circ}$ C, 7 min。

3' 引物 (T7 promotor): 5' GTAATAC-GACTCACTATAGGGC(T)<sub>12</sub>GG 3'

5' 引物 (M13 reverse): 5' AGCGGATAA-CAATTTTCACACAGGA 3'

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。

## 2 结果

mRNA 差异条带: 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 (dT<sub>12</sub>CG) 与 3 个 5' 端随机引物共同进行 DDPCR 反应, 从聚丙烯酰胺凝胶显示的 cDNA 条带中上, 图 1 有 10 条 cDNA 条带的表达量在移植前后发生变化,

其中第 5、10 条带是特殊的, 第 5 条带移植后有波动, 排斥发生时表达增强; 第 10 条带移植后表达较弱, 排斥发生时明显增强。

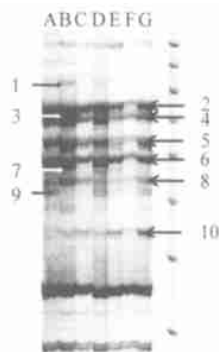


图 1 DDPCR 凝胶电泳显影

A: 供体; B: 受术术前; CDEFGH: 分别为术后 1、72、187、283、305 h 1~10 为移植前后表达量改变的 cDNA 条带

RK506 部分核苷酸序列分析为:

```
GATTTAGGAAGTGTGAGCTTGGAAA
GTTATGAGATTACAAATTCCTGAAAG
TCCATTAGAAAACCACAGGACGAAAA
AAAAAAAAAGCCCTATAGTGAGTCGTAT
TACAATCACTAGTGAATTCGCGCCGC
CTGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTC
CCAACGCGTTGATGCA TAGCTTGAGT
ATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTG
GCTGAGTCATGGTCATAGCTGTTTCCT
GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT
CCACACAACATACGAGCCGGAAGCATA
AAGTG TAAAGCCTGGGCTGCC TAATGA
GTGAGCTAAC TCACATTAATTGCGTTG
CGCTCACTGCCCCGCTTCCAGGGGAAA
ACCTGTCGTGCCAGCTGCNTTAATGAA
TCGGCCAACGCGCGGGGANG
```

将表示 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显示, 第 5 条带是 RPL23 基因, 第 10 条带是 FK506 结合蛋白 1A 基因。

## 3 讨论

mRNA 差异显示技术已广泛应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<sup>[1~4]</sup>, 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。本研究应用 PCR(DD-PCR) 技术检测心脏移植后外周血白细胞基因的表达, 与活组织检查方法相比具有无创、患者痛苦少等优点, 在探讨基因在移植中的作用以及对排斥反应的诊断方面有一定的应用价值。移植后第 10 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, 轻度体液排斥, 而 DDPCR 结果显示外周血特殊基因有变化: RPL23 移植

后有波动, 排斥发生时表达增强; FK506 结合蛋白 1A 移植后表达较弱, 排斥发生时明显增强。活检结果与基因变化是否相关值得探讨。

RPL23(是核糖体亚基成分)移植后有波动, 排斥发生时表达增强<sup>[3]</sup>, 它是否影响在急性排斥反应发生时免疫细胞因子及与免疫有关的蛋白合成增强, 是否受转录因子作用的影响? FK506 结合蛋白 1A 移植后表达较弱, 排斥发生时明显增强, RPL23 与 FK506 基因排斥发生时表达增强是否预示排斥反应的发生及在排斥反应中的作用有待深入研究。

## 参 考 文 献

- 1 Roland J, Ronald G N, Suzanne M C, et al. Identification and cloning of differentially expressed genes by long-distance differential display. *Anal Biochem*, 1998, 259: 235~244
- 2 Yoshikawa Hiroyuki M, Kiyozou A, et al. Differential display with carboxy-x-rhodamine-labeled primer and the selection of differentially amplified cDNA fragments without cloning. *Anal Biochem*, 1998, 256: 82~91
- 3 李新波, 朱依纯, 姚泰. SHY 与 WKY 大鼠肾脏组织基因表达差异分析. *生物化学与生物物理学报*, 1999, 26(6): 581~583
- 4 杨岐生, 林卿, 李奕, 等. 用差异显示法从人胎脑基因文库分离一个编码序列. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(6): 876~880
- 5 Herauct Y, Michel D, Chatelain G, et al. cDNA and predicted amino acid sequences of the human ribosomal protein genes rpS12 and rpL17. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(14): 4001

# Gene Expression of Peripheral Blood from a Heart Graft Patient

Xu Xiufang, Li Wenbin\*, Meng Xu\*,

Li Wen, Liu Yanxia, Liu Shu, Zhou Jian<sup>△</sup>, Huang Yimin

*Department of Cellular Immunology, Beijing Heart Lung and Blood Vessel Institute*

**Abstract:** In the paper the technique known as differential display polymerase chain reaction(DD-PCR) was applied to explore genes expression in white cells of peripheral blood drawn from an allogenic heart graft patient on the day before the transplant operation and after the operation in order to assess genes' role in transplantation. Morphologic changes of the heart grafts were observed 11 d after transplant operation. RPL23 gene was expressed undulatority after the operation, but strongly when acute rejection occurred; FK506 binding protein 1A gene was expressed weakly after the operation, but strongly when acute rejection occurred. The result indicates that the study of genes expression of peripheral blood from a heart graft patient will be useful to assess genes' role in transplantation.

**Key words:** heart transplant; fluoroDDPCR; differential expression; sequential test

\* Department of Cardiac Surgery, Beijing Anzhen Hospital, <sup>△</sup> Microbe Graduate School of Chinese Academy of Sciences