

科治疗,改善心、肺功能,术后加强气道的管理,延长机械通气时间^[4]。

表 2 23例换瓣病人术后远期心肺功能测定($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Vc (L)	FEV1 (L)(ml·min ⁻¹ ·mmHg ⁻¹)	DLCO (L)	TLC (L)	RV (L)
A 组	7					
测定值		4.1±0.7	3.2±0.6	26±9	6.1±1.3	1.3±0.6
预计值		4.0±1.0	3.2±0.7	28±5	6.2±1.2	1.2±0.4
B 组	8					
测定值		3.9±0.6	3.2±0.3	25±7	5.9±1.1	1.3±0.7
预计值		4.0±0.7	3.1±0.4	26±6	5.7±2.1	1.1±0.5
C 组	8					
测定值		2.6±1.2	2.1±0.5*	24±9	4.5±1.4	1.6±0.6*
预计值		3.9±0.5	3.0±0.5	26±4	6.0±0.6	1.3±0.7

组别	例数	mPAP (kPa)	CI (L·min ⁻¹ ·m ⁻²)	PaO ₂ (kPa)	EF (%)
A 组	7				
术前		2.34±0.61	2.40±0.20	12.68±0.31	55±4
术后		2.30±0.70	2.32±0.47	12.82±0.22	57±9
B 组	8				
术前		3.37±0.35*	2.46±0.18	12.61±0.72	55±7*
术后		2.72±0.26	3.28±0.31	12.82±0.35	63±7
C 组	8				
术前		6.8±2.58*	2.11±0.32	11.73±1.04	40±4*
术后		3.41±0.51	2.92±0.16	12.02±0.62	55±4

注:与预计值或术后比较 *P<0.05

最近的研究表明瓣膜替换术后早期(1个月内),由于受手术创伤机械通气等因素的影响,尽管所有病人心功能明显改变,但肺功能各项指标均降低,术后3个月时术前肺功能正常者或轻度损伤者,肺功能开始好转,而术前肺功能严重损伤者,尽管心功能和血流动力学明显改善,但肺功能仍较差^[5]。关于瓣膜替换术对远期心肺功能的影响,目前尚不清

楚^[1]。

本研究表明,瓣膜替换手术10年后,术前心、肺功能Ⅰ级和Ⅱ级的病人,心肺功能均恢复正常水平,肺动脉压正常,肺通气功能各项指标与正常预计值无显著差异,尽管年龄增大,但仍显著高于术前测定值。术前心肺功能Ⅲ级的病人,术后心功能改善,肺动脉压正常,EF值增大,肺通气功能与术前比较,可见明显改善,但仍低于正常预计值,以阻塞性通气功能障碍为主,表明术前有不可逆的肺功能损伤。

总之,风湿性瓣膜心脏病病人的心肺功能改变具有一定阶段性特点,肺动脉压正常和轻度增高者术前肺功能正常或轻度损害,术后随着心肺血流动力学的改善,其肺功能迅速好转,远期疗效较好。肺动脉压重度增高者即使合并严重肺功能损害,仍为手术适应证,术后远期心肺血流动力学能逐渐改善,但肺功能恢复较差。术前心肺功能检查和分级可以作为一种比较完整的评估手术后远期疗效的方法。

参 考 文 献

1 Junina J, Stark T, Seifert B, et al. Predictors of the long-term outcome after combined aortic and mitral valve surgery. *Circulation*, 1999, 100: 48-53.
2 Vaidya R, Husain T, Ghosh PK. Spirometric changes after open mitral surgery. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 1996, 37: 295-300.
3 王宁夫, 陈长熙, 于润江. 风湿性瓣膜心脏病患者左右心功能与肺功能的对比研究. *中华结核和呼吸杂志*, 1993, 16: 21-23.
4 Mustafa KY, Nour MM, Shuhaiber H, et al. Pulmonary function before and sequentially after valve replacement surgery with correlation to preoperative hemodynamic data. *Am Rev Respir Dis*, 1984, 130: 400-405.
5 Ota T, Tsukube T, Matsuda H, et al. Effect of mitral valve on surgery on impaired pulmonary function. *Thorac Cardiovasc Surg*, 1994, 42: 94-99.

(收稿日期: 2000-03-27)
(本文编辑: 陈新石)

一例心脏移植患者外周血白细胞多基因表达的变化

刘舒 许秀芳 张慧信 孟旭 黄益民 周建

原位心脏移植患者移植器官的组织活检是临床检测免疫排斥反应的金标准。但由于活检不能实现动态监测,因此往往错过对早期免疫排斥反应的发现而延误了临床的及时控制和治疗;活组织检查中创伤部位移植植物抗原的再释放,

又可进一步刺激或加重免疫排斥反应。作者通过对一例心脏移植患者于移植前后白细胞多基因表达水平变化的比较,探讨和寻找外周血免疫排斥反应的早期监测指标。

一、对象与方法

1. 对象:患者男,44岁,移植前情况:临床诊断为扩张性心肌病,行原位心脏移植术。供者配型:HLAⅠ: A1, 28; B8, 35; [BW6] HLAⅡ: DR1 3; [DR52] DQ5(1) DQ2。受者配型:HLAⅠ: A11, B52(5), 62(15) [BW4 BW4] HLAⅡ: DR15(2), 1304

基金项目:北京市卫生局重点学科基金、北京市心血管病研究实验室基金联合资助项目

作者单位:100029 北京市心肺血管疾病研究所(刘舒、许秀芳、黄

全。患者移植后情况: 术后心功能 II 级; 术后超声心动图示右房轻度增大, 左室顺应性降低, 极少量心包积液; CsA(环孢霉素 A) 浓度检测: 术后第 2 天 354.59 $\mu\text{g/L}$, 术后第 3 天 434 $\mu\text{g/L}$, 术后第 5 天 303.4 $\mu\text{g/L}$, 术后 6 d 318 $\mu\text{g/L}$, 术后 7 d 611.8 $\mu\text{g/L}$, 术后 8 d 466.88 $\mu\text{g/L}$, 术后 9 d 502.22 $\mu\text{g/L}$, 术后 10 d 856 $\mu\text{g/L}$ 。

2 外周血白细胞多基因表达检测: (1) RNA 提取: 分别于术前抽取受体和供体的外周血及受体术后 1 h、24 h、48 h、72 h、240 h 提取白细胞总 RNA。(2) 差异显示聚合酶链式反应(DD-PCR): 按 HIEROGLYPHTM mRNA Profile System 试剂盒说明书操作, 以 2 μl T7(d12) AP(anchored primer) 为 3'端锚定引物中加入 1 μg 总 RNA, 合成 cDNA 第一链。以上 3 μl 反应产物为模板和 0.7 μl 的 TMR-AP 锚定引物、1.75 μl 3 种随机引物(ARP) 进行 PCR。

3 表达差异基因片段的确定: 将 10 μl 的 PCR 产物加 4 μl 荧光上样缓冲液中, 95 $^{\circ}\text{C}$ 浓缩后上样于 5.6% 变性聚丙烯酰胺凝胶凝上, 在 3 000 V、52 $^{\circ}\text{C}$ 、100 W 恒功率条件下进行 4 h 电泳, 用荧光扫描仪显示扩增产物条带, 计算机比较同一基因条带在移植前后灰度的差异。

4 明显差异条带的回收与二次 PCR: 回收凝胶上灰度差异明显的条带, 溶于 30 μl TE 缓冲液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min。取 3 μl 作模板, 加入 T7、M13 引物, PCR。

5 克隆测序: 用 PGEM-T easy 克隆试剂盒(美国 Promega 公司)并参照说明书的方法对回收并二次扩增的明显差异的条带 cDNA 片段进行连接和克隆。每个片段挑选 8 个阳性克隆, 进行测序并与 GenBank 核苷酸数据库比较。

6 于心脏移植术后第 10 天, 经静脉导管于心室尖部取心内膜心肌组织进行病理学观察。

二、结果

1 外周血白细胞多基因 mRNA 差异显示结果: 共发现有 10 多条 cDNA 条带的灰度在移植后发生了不规则变化, 其中 7 个基因与免疫有关。结果表明它们分别为核糖体蛋白、鲨烯合成酶、核糖体蛋白、信号识别颗粒 SRP68、mRNA 识别蛋白 REA1、酪氨酸激酶 P59-Fyn 和 FK506 结合蛋白等蛋白或因子的基因(表 1)。

表 1 测序结果与 Genbank 数据的同源性比较读框分析

条带	mRNA 序列	编码蛋白	染色体位置
1	RPL23	核糖体蛋白	C6
	鲨烯合成酶	鲨烯合成酶	C4
2	RPL24	核糖体蛋白	C3q
3	SRP68	信号识别颗粒	未见报道
	REA1	mRNA 识别蛋白	C20
4	P59-Fyn	酪氨酸激酶	C6q
	FKBP1A	FK506 结合蛋白	C20p

2 心肌活组织检查: 术后第 10 天部分心肌肥厚, 毛细血

三、讨论

本实验中 P59Fyn 与 FKBP1A 于术前、术后 1 h、24 h、48 h、72 h 表达极弱。但在第 10 天心内膜活检发现轻度免疫排斥反应同时, P59Fyn 与 FKBP1A 的表达量明显增加。P59Fyn 可使 T 细胞内底物蛋白的酪氨酸残基磷酸化, 参与蛋白-蛋白之间相互作用。P59Fyn 还可通过激活和招募 ZAP-70、磷酸化 SLP-76 接头蛋白等方式激活 T 细胞的 Ras-Mitogen 通路, 并同时通过活化磷脂酶 C- γ , 磷脂酰激酶 3 激酶而激活 IP₃、DG 等第二信使通路^[1]。FKBP1A 是个 12 000 的蛋白, 编码脯氨酰肽顺反异构酶。它与 4 个 Ryanodine 受体构成的 Ca^{2+} 通道结合发挥 Ca^{2+} 调节作用^[2]。由于二者分别处于 T 细胞受体活化和 Ca^{2+} 通道激活的初始阶段, 提示了此时 T 细胞开始被激活及细胞免疫开始被启动。

RPL23、24 是编码蛋白质装配机-核糖体蛋白的基因; 移植术后 RPL23、RPL24 的基因表达水平波动。mRNA 出核蛋白(RAE1)、信号识别体蛋白 68(SRP68) 是各种蛋白表达所需的辅助工具。RAE1 编码 Gle2p 蛋白, 它结合于核孔复合物上, 作为一个穿梭运输的载体, 使具有 PolyA 的成熟 mRNA 从核内转移至核外, mRNA 进入胞浆后, 核糖体与之结合翻译出前导肽, 在 SRP(signal recognition parcel) 作用下与内质网上的停泊蛋白相结合, 使 mRNA 翻译的新肽链定向进入内质网, 进行加工为下一步蛋白表达做准备^[3]。术前 SRP68 与 REA1 表达量较高, 但术后表达量降低。免疫抑制药物-环孢霉素 A 抑制 NF-ATp 脱磷酸等生化反应, 从而达到抑制 IL-2 表达的作用。但目前未见环孢霉素 A 影响 RPL23、24、SRP68 和 REA1 表达的报道。

有报道表明感染时产生的大量内毒素及 IL-1 可使鲨烯合成酶的 mRNA 降低, 本文中鲨烯合成酶的表达水平有所波动, 但未见明显降低, 由于病人未被感染, 提示此酶表达水平波动与感染无关, 但其与免疫排斥反应的关系有待进一步研究证实。

移植后第 10 天心肌活检的诊断轻度排斥反应, 这与 DD-PCR 发现的外周血白细胞免疫相关因子基因特别是 T 细胞 P59Fyn 与 FKBP1A 的基因表达水平明显增加的时间相吻合, 提示外周血白细胞某些基因表达水平改变, 可用于临床免疫排斥反应机理研究和临床早期免疫排斥反应的诊断。

参 考 文 献

- 1 Denny MF, Patai B, Straus DB. Differential T-cell antigen receptor signaling mediated by the Src family kinases Lck and Fyn. *Mol Cell Biol*. 2000, 20: 1426-1435.
- 2 Xiao RP, Valdivia HH, Bogdanov K, et al. The immunophilin FK506-binding protein modulates Ca^{2+} release channel closure in rat heart. *J Physiol*. 1997, 500Q: 343-354.
- 3 Pritchard CE, Fomerod M, Kasper LH, et al. RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J Cell Biol*. 1999, 145: 237-254.