

SYBR 荧光实时定量 PCR 检测肝移植受者 CD95 和 CD95L mRNA 表达

于立新, 韩述岭, 苗 芸(南方医科大学南方医院器官移植中心, 广东 广州 510515)

摘要:目的 检测肝移植受者外周血淋巴细胞 CD95 和 CD95L mRNA 的表达, 并探讨其在移植肝急性排斥反应中的意义。方法 采用 SYBR 荧光实时定量 PCR 法检测 56 例肝移植受者外周血淋巴细胞 CD95 和 CD95L mRNA 的表达。结果 CD95 和 CD95L mRNA 在移植肝急性排斥患者外周血中的表达均显著升高 ($P < 0.01$), 时间上平均早于血肝功能酶谷丙转氨酶、谷草转氨酶升高 2 d。结论 CD95 和 CD95L 与移植肝急性排斥反应密切相关, CD95 和 CD95L mRNA 可作为移植肝急性排斥反应发生的预测和诊断指标之一。

关键词: 荧光定量; CD95; CD95L; 肝脏移植; 排斥反应

中图分类号: R657.3; R392.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4254(2006)02-0185-04

Detection of CD95 and CD95L mRNA expression after liver transplantation using SYBR real-time PCR during acute rejection

YU Li-xin, HAN Shu-ling, MIAO Yun

Center of Organ Transplantation, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To detect the expression of CD95 and CD95L mRNAs after liver transplantation and investigate the role of CD95 and CD95L in acute liver allograft rejection. **Methods** The expressions of CD95 and CD95L mRNAs of peripheral blood lymphocyte from 56 liver allograft recipients were examined using SYBR real-time PCR. **Results** CD95 and CD95L mRNA levels in the recipients with acute rejection were significantly higher than those without rejection ($P < 0.01$), and the elevation occurred about 2 days earlier than that of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. **Conclusion** CD95 and CD95L are related to acute liver allograft rejection and their mRNA expression level may serve as an indicator for prediction and diagnosis of acute rejection episodes.

Key words: fluorescent quantitative; CD95; CD95L; liver transplantation; allograft rejection

同种异体肝移植手术是治疗终末期肝脏疾病的主要手段, 尽管目前免疫抑制剂发展迅速, 但临床上移植肝急性排斥反应仍很常见, 对移植受者存活影响巨大, 是导致移植肝失功和受者死亡的主要原因之一, 因此对急性排斥反应的及时预测和诊治十分重要。有研究表明, CD95/CD95L 与急性排斥反应的发生、发展密切相关, 是至关重要的膜蛋白分子^[1,2]。本实验通过设计特异引物, 应用 SYBR 荧光实时定量 PCR 法检测肝移植受者外周血淋巴细胞 CD95 和 CD95L mRNA 的表达水平, 旨在研究 CD95/CD95L 与移植肝急性排斥的关系, 探讨其在预测移植肝急性排斥反应中的意义。

1 材料和方法

1.1 一般资料

1.1.1 临床资料 2004 年 10 月~2005 年 5 月间 56 例接受肝移植手术的患者, 其中术前诊断为肝硬化 41 例, 原发性肝癌 10 例, Wilson 病 3 例, 多囊肝、多囊

肾 2 例。男 39 例、女 17 例, 年龄 25~65 岁, 平均 42.3 岁。术中应用甲基强的松龙 0.5 g+ 赛尼哌 50 mg, 术后免疫抑制方案均为普乐可复 + 强的松。

1.1.2 标本采集 所有接受肝移植手术的患者于术后第 1 天起每日采集静脉血, 术后病情平稳者可适当延长采血间隔日期, 至术后第 30 天。检测血清肝功能酶谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 和外周血淋巴细胞 CD95 和 CD95L mRNA。对临床症状及实验室检查疑似发生急性排斥反应者, 行移植肝脏穿刺活检确诊, 诊断标准参见 1997 年国际移植学会制定的 Banff 方案^[3]。

1.1.3 分组情况 在 56 例研究对象中, 10 例经临床、实验室检查和穿刺活检病理结果确诊为发生急性排斥反应。将所有研究对象分为两组, A 组: 未发生急性排斥反应者, 共 46 例, 男 32 例、女 14 例; B 组: 发生急性排斥反应者, 共 10 例, 男 7 例、女 3 例。两组在性别、年龄、原发病、免疫抑制方案上无差异。

1.2 方法

1.2.1 SYBR 荧光实时定量 PCR 原理 荧光定量 PCR 是利用 Taq 酶对荧光双标记探针的切口平移效应, 连续不断地检测反应体系中荧光信号的变化。当信号增强到某一阈值时, 此时的循环阈值 (Ct 值) 就被记

收稿日期: 2005-10-28

基金项目: 广东省自然科学基金(23003)

Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (23003)

作者简介: 于立新(1950-), 男, 主任医师, 博士生导师, 020-61641787

录下来。该参数与 PCR 体系中起始 DNA 量的对数值之间有严格的线性关系, 利用阳性梯度标准品的 Ct 值就可以准确确定出起始 DNA 的数量。

1.2.2 扩增引物 CD95 扩增引物:F 为 5'-AAGACTGTTACTACAGTTG-3';R 为 5'-GCTTATGGCAGAAT TGGCCA-3';CD95L 扩增引物:F 为 5'-TGGCAGAACTCCGAGAGTCTA-3';R 为 5'-GCCTATTTGCTTC TCCAAAG-3'。引物由上海生物工程有限公司合成纯化。

1.2.3 RNA 的提取和鉴定 取 500 μl EDTA 抗凝的全血, PBS 洗涤 1 次后, 加入 0.5 ml 红细胞裂解液处理, 充分混匀并离心, 弃上清。细胞沉淀中加变性液 TRIZol 1 ml, 充分混匀后, 15~30 °C 孵育 5 min; 加入氯仿(0.2 ml 氯仿 /1 ml TRIZol), 盖紧盖子, 用力摇动 15 s, 15~30 °C 孵育 2~3 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min。取上清液至新的 Eppendorf 管, 加异丙醇(0.5 ml 异丙醇 /1 ml TRIZol), 15~30 °C 孵育样品 10 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min。弃上清液, 75%乙醇洗涤沉淀 1 次(至少 1 ml 75%乙醇 /1 ml TRIZol), 4 °C、7500 r/min 离心 5 min, 弃乙醇, 空气或真空干燥 5~10 min (不要完全干燥), 加 DEPC 处理水溶解 RNA, -80 °C 保存备用。测定 260 nm 和 280 nm 处吸光度值, 计算 A_{260/280} 比值; 比值大于 1.8, 说明制备的 RNA 较纯, 无蛋白质污染。

1.2.4 逆转录反应 取 2 μl RNA 模板做逆转录反应。仪器为 PE9600 PCR 仪, 反应体系如下: 5×逆转录 Buffer 2 μl, 下游引物(25 μmol/L)0.5 μl, dNTPs(10 mmol/L)1 μl, MMLV(10 U/μl)1 μl, DEPC 水 3.5 μl, RNA 模板 2 μl。反应条件: 37 °C、1 h, 然后 95 °C、3 min。

1.2.5 SYBR 荧光实时定量 PCR 测定 按以下反应体系进行: 5×SYBR Green 1 Buffer(美国 ABI 公司试剂盒)10 μl, 上游引物 F(25 μmol/L)1 μl, 下游引物 R(25 μmol/L)1 μl, dNTPs(10 mmol/L)1 μl, Taq 酶 2 μl, cDNA 5 μl, ddH₂O 30 μl。反应条件: 93 °C、2 min, 然后 93 °C、1 min, 50 °C、1 min, 72 °C、1 min, 共 40 个循环, 最后是 72 °C、7 min 延伸。荧光定量仪: PE 7000 全自动荧光定量 PCR 仪(美国 Perkin Elmer 公司)。反应结束后, 由电脑自动分析并计算结果。

1.2.6 统计学处理 所有数据采用均数±标准差表示, 用 SPSS 10.0 软件处理, 两个样本均数间比较采用 t 检验, 以 P<0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 CD95 测定的阳性标准品实时荧光扩增动力曲线和实时荧光扩增回归曲线

由图 1 可见, 不同起始浓度的模板, 在反应后平台期产物量相差不大, 根据 Ct, 经对数拟合做图, 得到定量标准曲线, 起始模板浓度与 Ct 值之间呈良好的线性关系。由图 2 可见所得标准曲线回归系数大于 0.986, 显示出极好的线性关系, 说明定量结果准确、可靠。

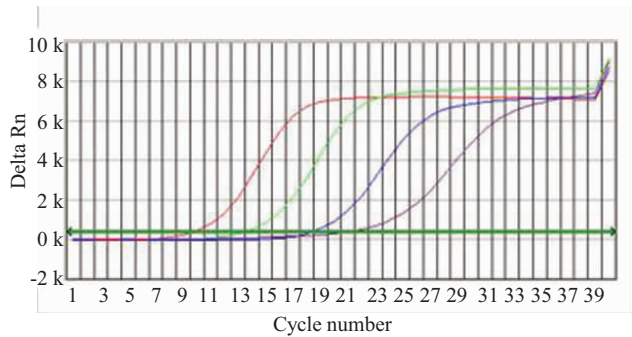


图 1 CD95 荧光实时定量阳性标准品扩增动力曲线图

Fig.1 SYBR amplifiable dynamic curve of CD95-positive standard substance

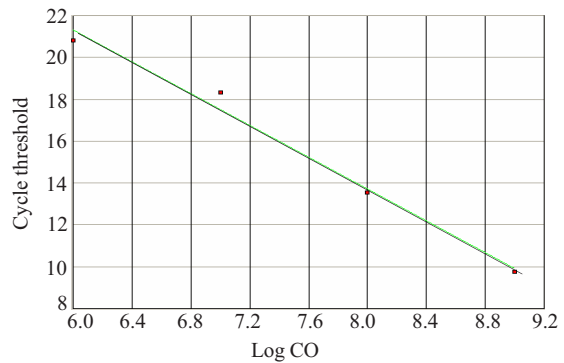


图 2 CD95 荧光实时定量阳性标准品扩增回归曲线图

Fig.2 SYBR amplifiable regression curve of CD95-positive standard substance

2.2 CD95L 测定的阳性标准品实时荧光扩增动力曲线和实时荧光扩增回归曲线

由图 3 可见, 不同起始浓度的模板, 在反应后平台期产物量相差不大, 根据 Ct, 经对数拟合做图, 得到定量标准曲线, 起始模板浓度与 Ct 值之间呈良好的线性关系。由图 4 可见所得标准曲线回归系数大于 0.994, 显示出极好的线性关系, 说明定量结果准确、可靠。

2.3 肝移植受者外周血淋巴细胞 CD95 和 CD95L mRNA 表达水平

见表 1。

2.4 肝移植受者血清肝功能酶 ALT、AST 表达水平

见表 2。

2.5 外周血淋巴细胞 CD95 和 CD95LmRNA 与血清肝功能酶 ALT、AST 开始上升时间比较

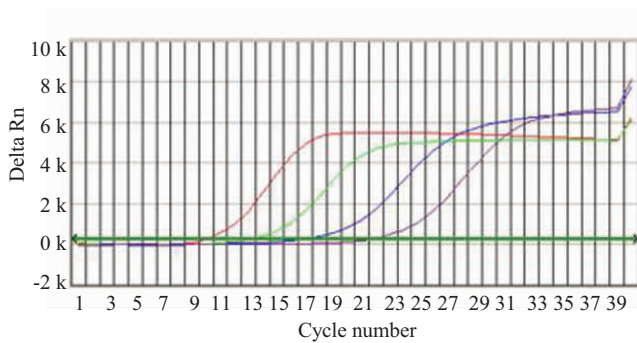


图 3 CD95L 荧光实时定量阳性标准品扩增动力曲线图

Fig.3 SYBR amplifiable dynamic curve of standard CD95L positive sample

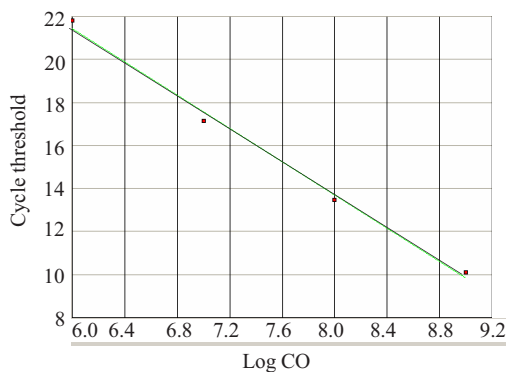


图 4 CD95L 荧光实时定量阳性标准品扩增回归曲线图

Fig.4 SYBR amplifiable regression curve of standard CD95L-positive sample

表 1 外周血淋巴细胞 CD95 和 CD95L mRNA 表达量

Tab.1 Quantity of CD95 and CD95L mRNA in lymphocyte

Group	n	CD95 mRNA ($\times 10^5$ copies/ μ g)		CD95L mRNA ($\times 10^5$ copies/ μ g)	
		Before rejection	Rejection	Before rejection	Rejection
		A	46	1.25 \pm 0.88	-
B	10	1.33 \pm 0.95	7.88 \pm 2.3* Δ	0.95 \pm 0.35	8.78 \pm 1.3* Δ

Group A: Non-rejection group, Group B: Rejection group.

** $P < 0.05$ vs group A, $\Delta P < 0.05$ vs before rejection

表 2 血清肝功能酶水平

Tab.2 Quantity of ALT and AST (U/L, Mean \pm SD)

Group	Before rejection		Rejection	
	ALT	AST	ALT	AST
A	128 \pm 49	87 \pm 32	-	-
B	132 \pm 42	91 \pm 31	989 \pm 324* Δ	475 \pm 182* Δ

** $P < 0.05$ vs group A, $\Delta P < 0.05$ vs before rejection. ALT:

Alanine aminotransferase, AST: Aspartate aminotransferase

检测到 10 例移植肝急性排斥反应患者的外周血淋巴细胞 CD95 和 CD95L mRNA 与血清肝功能酶 ALT、AST 均明显升高。CD95 和 CD95L mRNA 开始

上升见于 4~10 d,ALT、AST 开始上升见于 5~12 d,其中每例患者 CD95 和 CD95L mRNA 开始上升时间均早于 ALT、AST 开始上升时间 1~3 d,平均 2 d。

3 讨论

SYBR green I 是最新推出的不对称菁类荧光素,非特异地嵌合在 DNA 双螺旋结构的小沟内,结合状态的荧光强度较之游离状态的荧光强度增强千倍。因此,只需在扩增体系中直接加入 SYBR green I,避免了设计、标记荧光探针和使用价格昂贵、复杂的试剂,适用于任何 PCR 扩增体系。在操作方面,更为简便安全,对环境污染很小^[4,5]。

CD95 在第 5 届人白细胞分型国际会议上被正式命名,属于肿瘤坏死因子超家族,其基因位于 10 号染色体长臂。CD95 分子由 3 部分组成:膜外的 N 末端区、跨膜区和膜内的 C 末端区,其为非谱系特异性抗原,广泛表达在活化的 T、B 淋巴细胞表面,在肝脏等组织中也有表达。CD95L 基因位于 1 号染色体,属于肿瘤坏死因子超家族,为 II 型跨膜蛋白,C 末端位于胞外,胞内为 N 末端,主要表达在活化的 T 淋巴细胞和 NK 细胞上。HLA 抗原可诱导 T 细胞激活,表达 CD95L。接受肝移植手术的患者,其淋巴细胞在移植过程中被激活而表达 CD95L,其作用于移植肝中表达 CD95 抗原的靶细胞,CD95L 与 CD95 分子 N 端的死亡信号激发域结合后,引起 CD95 发生分子三聚化,将信号传递到膜内,诱导 CD95 死亡域与 CD95 关联蛋白结合,结合物再结合 Caspases,从而激活细胞的一系列蛋白水解酶,最终激活核酸内切酶,降解染色体 DNA,导致细胞凋亡。肝细胞凋亡在移植肝急性排斥反应的发生、发展过程中发挥重要作用^[1,6-8]。

测定的荧光定量阳性标准品梯度扩增曲线分析:Ct 又叫循环阈值,代表 PCR 循环过程中最先检测到高于基线水平的荧光信号增长时所对应的循环数(或者说每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数),它是实时定量 PCR 技术中进行量的一个重要参数。在 DNA 扩增每个循环的过程中荧光信号值都被记录下来,其与扩增产物的量成正比。在反应的起始,模板数越高,需要越少的循环数达到荧光信号阈值,阈值代表的荧光信号值显著大于背景信号。此时需要的循环数即是 Ct,它总是出现在扩增的指数期。因此,定量过程不受反应组成的影响,而主要取决于反应体系的原始底物浓度。根据标准曲线,可对要扩增基因的原始模板浓度进行准确定量。图 1、图 3 分别为 CD95 和 CD95L 的阳性标准品的实时荧光扩增动力曲线,扩增曲线平滑,每条曲线均有明显的指数扩增期。在进行诊断时,可通过标准品

的回归曲线来准确定量样品的绝对拷贝数。在定量仪进行反应的过程中，电脑自动测定阳性标准品浓度 Ct 值，Ct 值为纵坐标，阳性标准品模板浓度的对数值为横坐标建立标准品的回归曲线，这样根据样品的 Ct 值可准确定量样品的浓度(即拷贝数)。本实验中，阳性标准品进行荧光实时定量 PCR 后得到的标准曲线相关系数分别为 0.986 和 0.994，回归曲线具有良好的相关性，说明定量的结果准确、可靠。

本研究发现 CD95 和 CD95L mRNA 的表达水平在移植肝发生急性排斥反应的早期，即出现临床症状和血肝功能酶升高之前，其基因 mRNA 表达水平已经开始增高，并迅速增高且维持在较高水平，贯穿急性排斥反应的全过程；加大抗排斥药物剂量后，随着肝脏功能的恢复而逐渐降低；其开始升高时间比血肝功能酶开始升高和组织学证据约早 2 d。因此为指导临床及时调整免疫抑制治疗方案，避免移植肝出现进一步的病理损害和功能障碍，可考虑将 CD95 和 CD95L mRNA 表达量作为预测和诊断急性排斥反应早期可靠的指标之一。由于这是一种非侵入性检查方法，可作系列动态分析，临床应用前景广泛，同时也为通过反义技术封闭基因表达来抑制器官移植急性排斥反应的方法提供了新的可供选择基因。

参考文献：

[1] Ke B, Buelow R, Shen XD, et al. Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/CD95L/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(10): 1189-99.

[2] Rivero M, Crespo J, Mayorga M, et al. Soluble Fas in acute rejection in patients with liver transplantation [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2000, 23(5): 215-8.

[3] 丁颖彦, 沈柏用, 周光文, 等. Banff 方案临床肝移植后急性排斥反应分级的指导作用[J]. *中华器官移植杂志*, 2003, 24(1): 76-7.

Ding YY, Shen BY, Zhou GW, et al. Application of Banff schema in grading acute rejection following transplantation [J]. *Chin J Organ Transplant*, 2003, 24(1): 76-7.

[4] 王艳, 徐小元, 何为, 等. Sybr green I 实时定量 PCR 检测乙型肝炎病毒 DNA 的探索[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2002, 16(2): 160-1.

Wang Y, Xu XY, He W, et al. Detection of the HBV DNA with Sybr green I real-time polymerase chain reaction [J]. *Chin J Exp Clin Virol*, 2002, 16(2): 160-1.

[5] Rasmussen R, Morrison T, Herrmann M, et al. Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye [J]. *Biochemistry*, 1998, 2(1): 8-11.

[6] Orlinick JR, Vaishnav AK, Elkon KB, et al. Structure and function of Fas/Fas ligand [J]. *Int Rev Immunol*, 1999, 18: 293-308.

[7] Tannapfel A, Kohlhaw K, Ebel J, et al. Apoptosis and the expression of Fas and Fas ligand (FasL) antigen in rejection and reinfection in liver allograft specimens [J]. *Transplantation*, 1999, 67(7): 1079-83.

[8] Gerhing S, Rottmann S, Menkel AR, et al. Inhibition of proliferation and apoptosis by the transcriptional repressor Mad1 repression of Fas-induced caspase-8 activation [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(14): 10413-20.

[1] Ke B, Buelow R, Shen XD, et al. Heme oxygenase 1 gene transfer

prevents CD95/CD95L/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(10): 1189-99.

[2] Rivero M, Crespo J, Mayorga M, et al. Soluble Fas in acute rejection in patients with liver transplantation [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2000, 23(5): 215-8.

[3] 丁颖彦, 沈柏用, 周光文, 等. Banff 方案临床肝移植后急性排斥反应分级的指导作用[J]. *中华器官移植杂志*, 2003, 24(1): 76-7.

Ding YY, Shen BY, Zhou GW, et al. Application of Banff schema in grading acute rejection following transplantation [J]. *Chin J Organ Transplant*, 2003, 24(1): 76-7.

[4] 王艳, 徐小元, 何为, 等. Sybr green I 实时定量 PCR 检测乙型肝炎病毒 DNA 的探索[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2002, 16(2): 160-1.

Wang Y, Xu XY, He W, et al. Detection of the HBV DNA with Sybr green I real-time polymerase chain reaction [J]. *Chin J Exp Clin Virol*, 2002, 16(2): 160-1.

[5] Rasmussen R, Morrison T, Herrmann M, et al. Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye [J]. *Biochemistry*, 1998, 2(1): 8-11.

[6] Orlinick JR, Vaishnav AK, Elkon KB, et al. Structure and function of Fas/Fas ligand [J]. *Int Rev Immunol*, 1999, 18: 293-308.

[7] Tannapfel A, Kohlhaw K, Ebel J, et al. Apoptosis and the expression of Fas and Fas ligand (FasL) antigen in rejection and reinfection in liver allograft specimens [J]. *Transplantation*, 1999, 67(7): 1079-83.

[8] Gerhing S, Rottmann S, Menkel AR, et al. Inhibition of proliferation and apoptosis by the transcriptional repressor Mad1 repression of Fas-induced caspase-8 activation [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(14): 10413-20.



(上接 184 页)

[6] Danielsson KG, Marions L, Rodriguez A, et al. Comparison between oral and vaginal administration of misoprostol on uterine contractility [J]. *Obstet Gynecol*, 1999, 93(2): 275-80.

[7] 邓坚, 杨世琼. 小剂量米索前列醇用于晚期妊娠引产 358 例临床分析 [J]. *中国妇幼保健*, 2004, 19(7): 43-4.

Deng J, Yang SQ. 358 cases of clinical analysis of induction by small dose of misoprostol in late trimester of pregnancy [J]. *Chin J Health Mother Child*, 2004, 19(7): 43-4.

[8] 刘荣霞, 白凤楼. 米索前列醇不同给药途径用于计划分娩的临床观察 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2005, 13(3): 111-2.

[9] 尹春艳, 王保平, 吕小燕, 等. 晚期妊娠米索前列醇引产指征的探讨 [J]. *中国误诊学杂志*, 2005, 5(2): 201-3.

[10] 尹春艳, 王保平, 周敬珍, 等. 晚期妊娠米索前列醇引产的子宫收缩和产程特点分析 [J]. *实用妇产科杂志*, 2005, 21(11): 21-4.

Yin CY, Wang BP, Zhou JZ, et al. Analysis of uterine contraction and birth process characteristics of being induced by misoprostol in late trimester of pregnancy [J]. *J Pract Obstet Gynecol*, 2005, 21(11): 21-4.

[11] 李小毛, 张宇万, 杨越波. 宫颈成熟条件对米索前列醇足月妊娠

引产影响的综合分析 [J]. *新医学*, 2004, 34(4): 92-3.

Li XM, Zhang YQ, Yang YB. Composite analysis of the influence of the condition of cervical maturity on induction in late trimester of pregnancy by misoprostol [J]. *J New Med*, 2004, 34(4): 92-3.

[12] 李君. 小剂量米索前列醇阴道给药用于晚期妊娠引产的临床研究 [J]. *实用妇产科杂志*, 2001, 17(4): 236-7.

LI J. Clinical study of small dose of misoprostol on induction in late trimester of pregnancy by vaginal drugging way [J]. *J Pract Obstet Gynecol*, 2001, 17(4): 236-7.

[13] Alfirevic Z. Oral misoprostol for induction of labour [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2000, 4: 1338-43.

[14] Nuthalapaty FS, Ramasey PS, Biggio JR, et al. High-dose vaginal misoprostol versus concentrated oxytocin plus low-dos vaginal for midtrimester labor induction: A randomized trial [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 193(3): 1071-5.

[15] Castaneda CS, Izquierdo-Puente JC, Leon-Ochoa RA, et al. Misoprostol dose selection in a controlled-release vaginal insert for induction of labor in nulliparous women [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 193(3): 1065-70.