

# MN基因型定型在异基因脐血干细胞移植植活证据检测中的应用

刘忠<sup>1</sup>, 兰炯采<sup>1</sup>, 何立群<sup>2</sup>, 张印则<sup>1</sup>, 吕蓉<sup>3</sup>, 方勤<sup>3</sup>, 郭晓捷<sup>3</sup> 第一军医大学南方医院输血科 广东广州 510515 中国科学技术大学 安徽合肥 230022 合肥市红十字会中心血站 安徽合肥 230022

**摘要** 目的 探讨异基因脐血干细胞移植植活证据检测中简单易行的方法。方法 取供者和受者移植前及移植后 15 和 300 d 的标本, 提取 DNA, 根据已发表的基因序列设计合成两对引物, 采用 PCR-SSP 方法检测 MN 血型基因型。结果 供者为 NN 型, 受者移植前为 MM 型, 移植后 15 d 为 MN 型, 混合型, 移植后 300 d 为 NN 型。供者型 MN 基因在移植植活证据中作为供者的标记物在受者体内发现。结论 采用 MN 血型基因型检测作为植活证据, 可以对异基因脐血干细胞移植进行早期监控, 且标本量小, 较其他方法更加敏感。

**关键词** 基因型; 脐血干细胞移植; 异基因; 移植存活

中图分类号: R617; R733.72 文献标识码: A 文章编号: 000-2588(2002)10-0912-03

## Graft survival assessment of MN genotype after allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood

LIU Zhong<sup>1</sup>, LAN Jiong-cai<sup>1</sup>, HELI-qun<sup>2</sup>, ZHANG Yin-ze<sup>1</sup>, LYU Rong<sup>3</sup>, FANG Qin<sup>3</sup>, GUO Xiao-jie<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Transfusion, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;

<sup>2</sup>University of Science and Technology of China, Hefei 230022, China; <sup>3</sup>Hefei Red Cross Blood Center, Hefei 230022, China

**Abstract:** Objective To establish a simple and practical method to assess the outcome of allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells from umbilical cord blood. Methods The DNA was extracted from the samples collected from the donor and the receptor separately before and 15 and 300 d after transplantation. MN genotype was determined by PCR with sequence-specific primers (PCR-SSP) with the 2 pair of specific primers designed and synthesized on the basis of reported MN gene sequence. Results The donor was identified as having NN genotype while the recipients showed to be MM genotype. MN genotype was detected in the recipient (mixed chimerism) at 15 d after transplantation. The genotype reversed to NN (donor origin) at 300 d after transplantation. The NN gene, as the donor's marker and evidence for the graft survival analysis, was eventually identified in the recipient. Conclusions With MN genotype test to confirm the graft survival, early engraftment monitor of allogeneic umbilical cord blood transplantation is ensured, with the advantages of better sensitivity and requiring small amount of sample (0.2 ml). It may also facilitate subsequent therapeutic decisions.

**Key words:** genotype; umbilical stem cell transplantation; allogeneic; graft survival

异基因造血干细胞移植是治疗某些遗传性疾病及恶性血液病的有效手段。移植成功的重要指标之一是受者体内查到供者源性细胞。传统的血清学植活证据检测方法灵敏度低, 有一定的局限性。近年来普遍采用的串联可变序列短重复片段 DNA 指纹等方法, 样本量需要较大, 成本较高, 时限长, 操作复杂。本研究根据供受者的情况, 选用 PCR 序列特异性引物, 采用 PCR-SSP 对供受者进行 MN 血型基因分型, 旨在探讨移植植活证据的监测方法。

### 1 对象和方法

#### 1.1 受检对象

收稿日期: 2002-04-12

基金项目: 安徽省自然科学基金 0057142, 合肥市重点攻关项目 000-E-01

作者简介: 刘忠, 男, 1969 年, 安徽合肥人, 第一军医大学在读硕士研究生, 单位为合肥市红十字会中心血站, E-mail: blood@mail.hf.ah.cn

受者男, 30 岁。外周血及骨髓象检查示急性淋巴细胞白血病。术前骨髓涂片检查为 ALL。完全缓解象。血型: A 型, 血型: A(08,33), B(40,17), DR(03,05)。

供者脐血血型: N 型, 血型: A(08,33), B(40,17), DR(03,05)。反复洗涤, 清除二甲基亚砜后, 快速输入患者体内。

受者获得有核细胞数:  $0.51 \times 10^8 / \text{kg}$ 。CD34<sup>+</sup> 细胞数为  $0.46 \times 10^6 / \text{kg}$ 。CD45<sup>+</sup> 细胞数为  $0.58 \times 10^8 / \text{kg}$ 。FU-GM 细胞数为  $0.50 \times 10^5 / \text{kg}$ 。

#### 1.2 方法

1.2.1 采血 分别采集受者移植前及移植后 15 d 移植后 300 d 外周血和供者脐血各 0.5 ml, 加入 EDTA 抗凝。

1.2.2 DNA 抽取 采用美国 G&T 公司 DNA 抽提试剂盒, 盐析法取 0.2 ml EDTA 抗凝外周血加入 1 ml

红细胞裂解液中离心取上清沉淀加入 170 滋核裂解液及 4 滋 SDS 激烈振荡再加入 72 滋 NaCl 溶解液 0 000r/min 离心取上清加入 20 滋 异丙醇沉淀 DNA 将 DNA 溶于 100 滋 TE 溶液中保存待用

1.2.3 引物设计 MN 基因序列特异性引物设计参照文献委托美国 G&T 公司合成两对引物序列如下 M 基因 5'-GCATCAAGTACCACTGGT3' 和 5'-GA GAAGTTGAGAAAGGGGT3' N 基因 5'-GCATTAA GTACCACTGAG3' 和 5'-GAGAAGTTGAGAAAGGG GT3' 扩增产物片段长度均为 781bp 内对照采用人类生长素基因扩增产物片段为 429bp

1.2.4 PCR 扩增体系 反应体系 10 滋 每份标本取两管分别加入 MIX-M 和 MIX-N 混合液在混合液中加入 1 滋 DNA 混合 100ng DNA 混 滋 Taq 酶 5U/滋 扩增条件为 95 益预变性 5min 5 益变性 30 s 3 益退火 30 s 2 益延伸 90 s 40 个循环后 72 益延伸 7min

1.2.5 扩增产物鉴定 取扩增产物 10 滋 在 2% 的琼脂糖凝胶上点样同时采用 PE 公司 100 bp DNA Ladder 作为标记 150V 电泳 30min 在紫外灯下观察结果

### 2 结果

所有受检样品都产生 429bp 的内对照片段 M 型个体与 M 基因引物反应产生 781bp 的片段与 N 基因引物反应无 PCR 扩增产物 N 型个体与 N 基因引物反应产生 781bp 的片段与 M 基因引物反应无 PCR 扩增产物 MN 型个体与 M 和 N 基因引物反应都将产生 781bp 的片段 结果见图 1

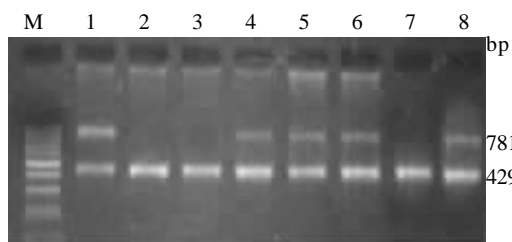


图 1 脐血干细胞移植后 MN 基因型的转变

Fig.1 Alteration of MN genotype after umbilical stem cell transplantation

M:Marker; Lane 1,2:Recipient before transplantation, MM; Lane 3,4: Donor, NN; Lane 5,6:Recipient at 15 days after transplantation, MN (mixed chimerism); Lane 7,8:Recipient at 300 days after transplantation, NN (donor origin)

受者于术后 5 d 白细胞数降至  $0.03 \times 10^9$  个/L 5 d 血小板及白细胞计数开始上升白细胞数达到  $1.4 \times 10^9$  个/L 血小板数达到  $28 \times 10^9$  个/L 00 d 后患者外周血象恢复正常骨髓象未见异常无移植抗宿主病表现

### 3 讨论

异基因脐血移植成功的关键是受者的造血系统被供者所取代移植后受者的骨髓造血功能起源于供者的造血细胞移植后血型的转变要经过一个由嵌合状态到完全转为供者血型的过程本例中患者移植前为 MM 型供者为 NN 型患者在移植后 15 d MM 血型变为 MN 型处于一种供者与受者的造血细胞共存于受者体内的嵌合状态移植后 300 d 受者 MN 血型已完全转变为供者型这种血型的逐渐转变过程直接反映了移植的骨髓成活与否及造血功能的恢复状态在临床上可根据其结果决定下一步的治疗方案同时提示对于脐血移植术后血型转变的病人要根据血型的变化来选择相应血型的血液制剂

传统植活证据靠监测性别染色体 X 细胞表面抗原 酶等判断这些标志物易受多种因素影响多次输血 性别 血型 ILA 全相合等有一定的局限性而且检测方法灵敏度低移植后早期白细胞数少

目前国内大多采用串联可变序列短重复片段 DNA 指纹图等方法分析移植状态其多态性高特异性好大多用于亲子鉴定 体识别 也是一个较好的移植植活检测指标方法但其需要标本量较大 大于 0.5ml 费用高 时间长 DNA 指纹图还需限制内切酶酶切等 临床应用受到限制 MN 血型是继 ABO 血型后被检出的第 2 个血型在血清学遗传学和生物学方面都表现出一定的复杂性 编码 MN 系统抗原的基因 GPA 位于第 4 号染色体 4q28.2-31.1 上 M 抗原蛋白在氨基端 1 和 5 位的氨基酸不同 M 抗原蛋白为 Ser CA Gly GT N 抗原蛋白为 Leu TA Glu AG 本研究正是基于这种差别设计出引物来区分 M 和 N 基因型 随着对 MN 血型基因型结构的进一步研究 发现了很多亚型 其应用有待于进一步探讨

本例中供受者 ABO 血型相同 故选用 MN 血型的转变为植入证据的检测 MN 血型的检测大多采用血清学方法检测红细胞表面抗原 因移植后患者需大剂量输血 因此在作为植活证据检测时血清学检测不可靠 本方法采用 PCR-SSP 法直接检测其基因型 只需 0.2ml 全血 一步 PCR 扩增便可直接测出 MN 血型的基因型 其结果准确可靠 且技术操作简单 省时 5 d 即可检测 是早期证明植入的敏感方法 在实验中应注意严格控制反应条件 防止假阳性或假阴性的发生

### 参考文献

咱暂 RothbergPG, GamisAS, BakerD. Use of DNA polymorphism to monitor engraftment after allogeneic bone marrow transplantation 咱暂 Clin Lab Med, 1997, 17(1):109-18.

咱暂 Lo YM, Patel P, Baigent CN, et al. Prenatal sex determination from maternal peripheral blood using the polymerase chain reaction 咱暂 Hum Genet, 1993, 90(5):483-8.

咱暂 Gleissner B, Blau IW, Sindram A, et al. Analysis of chimerism during the early period after allogeneic peripheral stem cell transplantation 咱暂 Clin Lab Haematol, 2001, 23(6):401-6.

咱暂 王建增, 王健民, 章卫平, 等. 可变数串联重复序列检测异基因外造血干细胞移植后植活证据的研究[J]. 中华医学杂志, 2000, 11(11):823-5.

Wang JZ, Wang JM, Zhang WP, et al. Variable number of tandem repeats as an evidence of engraftment status after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation 咱暂 Chin Med J, 2000, 11(11):823-5.

咱暂 Corfield VA, Moolman JC, Martell IT, et al. Polymerase chain reaction-based detection of MN blood group-specific sequences in the human genome 咱暂 Transfusion, 1993, 33(2):119-21.

咱暂 Amitage JB. Bone marrow transplantation 咱暂 N Engl J Med, 1994, 330(3):827-38.

咱暂 Goltsov AA, Eisensmith RC, Konecki DS, et al. Associations between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene 咱暂 Am J Hum Genet, 1992, 51(3):627-36.

咱暂 van-Deerlin VM, Leonard DG. Bone marrow engraftment analysis after allogeneic bone marrow transplantation 咱暂 Clin Lab Med, 2000, 20(1):197-225.

## 双黄连注射液致肺水肿 1 例报告

Pulmonary edema due to Shuanghuanglian injection: report of one case

徐 静<sup>1</sup> 袁关 英<sup>2</sup> 渊江苏扬州卫生学校儿科袁江苏 扬州 225001 白第一军医大学珠江医院药剂科袁广东 广州 510280 冤

关键词 双黄连注射剂 / 副作用 肺水肿

中图分类号 R289.5; R541.63 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2002)10-0914-01

双黄连注射液具有抗病毒和抗菌作用袁也能增强机体的免疫功能袁近年在儿科临床得到广泛应用遥我们在用药过程中发现双黄连注射液致肺水肿 1 例袁现报告如下遥

### 1 病例资料

患儿男袁 岁袁体重 15 kg袁咳嗽 3 d 加重并发热来院就诊遥查体: 体温 39.1 益袁急性热病容袁神情合作袁口唇红润袁呼吸 30 次/min袁无紫绀袁咽部充血明显袁双肺呼吸音粗袁未闻干袁湿罗音袁心率 118 次/min袁心律齐袁前区未闻杂音遥血常规: 白细胞 7.8伊<sup>9</sup>/L袁分类中性粒细胞 0.59袁淋巴细胞 0.41袁诊断为急性上呼吸道感染袁入院留察遥给予 5% GS+ 双黄连注射液 600 mg 渊哈尔滨中药二厂冤静脉滴注遥大约 3 min 时患儿出现恶心袁呕吐胃内容物 1 次袁面色苍白袁口唇轻微发绀袁意识清楚袁脉搏有力渊20 次/min冤袁血压 11/7 kPa遥立即静脉缓慢推注地塞米松 5 mg袁紫绀消失袁面色好转遥继续静脉滴注双黄连注射液袁 0 min 后口唇再次出现紫绀袁面色苍白袁呼吸急促袁 0 次/min袁可见三凹征袁心率 120 次/min袁脉搏有力袁血压 11/7 kPa袁立即停用双黄连注射液袁改用 5% GS 静脉滴注袁同时吸氧遥患

者口唇仍然发绀袁面色青灰袁且出现红色丘疹遥 25 min 时双肺底部出现中湿罗音袁心率 120 次/min袁肝肋下 0.5 cm袁出现肺水肿遥急查血钾 3.7 mmol/L袁血钠 104 mmol/L袁二氧化碳结合力 16 mmol/L遥用 5% 碳酸氢钠注射液 40 ml 静脉滴注袁纠正酸中毒遥 45 min 时体温 38.6 益袁心率 120 次/min袁呼吸 50 次/min袁面色仍青灰袁口唇发绀袁患儿处于嗜睡状态遥 50 min 时患儿面色转为红润袁紫绀消失袁肺部罗音减少袁停用氧气遥胸片示肺纹理增多袁考虑肺水肿表现遥 2.5 h 时体温下降至 37.8 益袁呼吸 38 次/min袁心率 110 次/min袁肺部罗音消失袁肝肋下 0.5 cm袁肺水肿已纠正遥静脉滴注能量合剂补充细胞营养遥 2 h 后体温降至 37 益袁神情合作袁面色红润袁心率 98 次/min袁呼吸 29 次/min遥

### 2 讨论

患儿静脉滴注双黄连注射液 3 min 即出现恶心呕吐袁面色苍白袁继续用药后袁呼吸急促袁面色青灰袁出现红色丘疹袁继而呼吸困难加重袁出现水肿袁考虑为双黄连过敏遥经抗过敏对症治疗袁紫绀消退袁肺部罗音减少袁肺水肿最终消失遥提示双黄连的过敏反应除了皮疹袁恶心袁呕吐袁还可以引起呼吸困难袁肺水肿遥建议广大临床工作者在应用双黄连注射液时袁警惕呼吸困难等严重过敏反应发生遥双黄连注射液致肺水肿的病例国内尚未见报道遥

收稿日期 001-11-20

作者简介 徐 静 渊959 冤女袁袁江苏泰州人袁药师袁主治医师