即可触发大鼠心脏产生预处理的延迟效应，并改善 St. Thomas 液保存供心的效果。即保存 4h 后心脏功能恢复明显优于单纯改良 St. Thomas 液保存组（B 组），且 CK-MB 漏出量减少，心肌 ATP 恢复较快。同样，C 组以 CCPA 预处理 24 h 后，缺血 180 min、复灌 60 min 对心肌所造成的损伤较单纯改良 St. Thomas 液保护的 E 组轻，即左心室压力变化最大速率恢复率较高，心肌 ATP 恢复较快，CK-MB 漏出较少。本研究结果还提示以 CCPA 预处理产生延迟保护效应的同时伴有心肌 Mn-SOD 活性上升，心肌 MDA 减少。文献[4]报道如果阻碍蛋白质的合成，延迟效应则会随之消失。然而，蛋白质分子表达上调需要核转录因子的参与。目前已发现与基因表达有关的转录因子除 NF-κB 外还有 AP-1、TRE、OCT-1、CRE 和 SPL[2] 等。这些因子是否都参与预处理的基因表达，尚不完全清楚。但是 PDTC 仅对 NF-κB 具有强烈的抑制作用[2]。本实验结果表明虽然24 h 前所用的 PDTC 本身心肌再灌注损伤无明显影响，但可阻止以 CCPA 激活腺苷 A1 受体触发心肌预处理延迟效应，以致心功能恢复率、心肌 ATP 和心肌 CK-MB 漏出量与未作预处理相近，同时伴随 Mn-SOD 活性下降。这说明 PDTC 通过抑制 NF-κB 阻止合成新的蛋白质分子，从而取消延迟保护效应。有关 NF-κB 的活化的机制比较复杂。体内 NF-κB 抑制因子（IκBα）控制 NF-κB 的活性，当其磷酸化后就可解除对 NF-κB 的抑制状态。缺血预处理通过腺苷等信号分子始动级联反应，使 IκBα 磷酸化[5]。至于活化的 NF-κB 又怎样促使相关基因表达还需要进一步探讨。

参考文献：

[1] Takano H, Bolli R, Black R G Jr, *et al*. A1 or A3 adenosine receptors induce late preconditioning against infarction in conscious rabbits by different mechanisms[J]. Circ Res, 2001, 88(5): 520－528.

[2] Xuan Y T, Tang X L, Banerjee S, *et al*. Nuclear factor-κB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits[J]. Circ Res, 1999, 84(9): 1095－1109.

[3] 朱水波，孙宗全，殷桂林，等. 腺苷与单磷酯 A 联合预处理对供心保存的实验研究[J]. 中华器官移植杂志，2003，24(6)：338－340.

[4] Meldrum D R, Cleveland J C, Rowland R T Jr, *et al*. Early and delayed preconditioning: differential mechanisms and additive protection[J]. Am J physiol, 1997, 273(2P2): H725－H733.

[5] Zhang J, Bolli R, Tang X L, *et al*. Direct demonstration of both tyrosine and serine phosphorylation of IκBα during ischemic preconditioning in conscious rabbits[J]. Circulation, 1999, 100(12): 1－56.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2005)08-0715-01

个案与短篇

实时荧光定量 PCR 在献血员筛检中的应用

Appliacation of Real-time quantitative PCR in screening blood donor

谭春泽 （中国人民解放军第 181 医院输血科，桂林 541002）

我科 2002 年 1 月至 2003 年 12 月在部队进行无偿献血 5 260人次，其中 125 人份不合格。作者将其中 ALT 单项不合格的 75 份标本进行了 HBV-DNA 实时荧光定量 PCR 检测分析，阳性率达 4.0%。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本

来自部队 5 260 份无偿献血员标本，经初、复检 75 份 ALT 单项不合格（赖氏法大于 25 单位为不合格）标本，留取血清 0.5 ml，置－30 ℃冰箱保存备检。

1.2 试剂

HBsAg、抗 HCV、抗 HIV、抗 TP 初筛 ELISA 试剂盒（广东中山生物技术有限公司）、复检 ELISA 试剂盒（厦门新创生物技术有限公司）为批检合格产品。ALT 试剂盒（北京中生和长春汇力），HBV-DNA 实时荧光定量 PCR 试剂盒（上海申友公司）。

1.3 仪器

FTC-2000 型实时荧光定量 PCR 仪（加拿大），StatFax-2100 型酶标仪、RT-2600 型洗板机（均为美国），ASD-400C 半自动生化分析仪（长春亚星）。

1.4 方法

HBsAg、抗 HCV、抗 HIV、抗 TP、ALT 均严格按操作说明书同时进行初、复检和结果判定。将其中 ALT 大于 25U（赖氏单位）单项不合格的 75 份标本按 ALT 的赖氏单位数分 3 组进行 HBV-DNA 实时荧光定量 PCR 检测分析。

2 结果

5 260份献血员标本共检出125人份不合格，其中34份

（下转 719 页）

作者简介：谭春泽（1962－），男，湖南省邵阳市人，主管技师，主要从事临床免疫与输血检验方面的研究。电话：(0773)2081498

收稿日期：2005-01-12；修回日期：2005-02-13

酸酶组化染色、免疫组化检测 SSEA-1、SSEA-4 抗原的表达和检测转录因子 Oct-4 的表达，结果表明人胚胎第 4.5 周生殖嵴中没有 SSEA-1、SSEA-4 阳性细胞和碱性磷酸酶阳性细胞，证明 PGCs 在此时期尚未迁移到生殖嵴中。人胚胎第 5 周后至第 11 周生殖嵴中出现持续 SSEA-1、SSEA-4 阳性细胞，同时这些细胞呈碱性磷酸酶阳性且转录因子 Oct-4 高表达。表明自第 5 周后开始有 PGCs 迁移至生殖嵴且在此期内胚胎生殖嵴或生殖腺中持续存在未分化 PGCs。人胚胎 12 周后生殖腺中仍然存在碱性磷酸酶阳性细胞而这些细胞不表达 SSEA-1、SSEA-4 抗原，说明此两种表面标志物表达不一致，提示人胚胎第 12 周开始生殖腺中 PGCs 大量分化。

另外，在胚胎第 4.5 周时检测生殖嵴阶段特异性胚胎抗原 SSEA-1 和 SSEA-4，未见阳性细胞，而中肾嵴中的中肾小管呈阳性，此现象可能提示，在早期胚胎的中肾小管上皮本身就表达阶段特异性胚胎抗原，或有可能在 PGCs 向生殖嵴迁移的过程中有部分 PGCs 迁移到了中肾小管，因为中肾小管的微环境不适合原始生殖细胞的生长、发育，而最终走向凋亡，此种假设还需进一步实验证实。在观察部分 5～11 周胚胎生殖嵴的阶段特异性胚胎抗原 SSEA-4 和 SSEA-1 的表达时，还发现部分血管中有阶段特异性胚胎抗原表达阳性的细胞，迄今少有国内外文献报道。如果此现象具有普遍性，那么可能早期胚胎血液中也存在阶段特异性胚胎抗原阳性细胞。提示 PGCs 的迁移路径可能有两条：①沿后肠背侧系膜迁移；②也可以通过血液进行迁移，或者是迁移到生殖嵴中的 PGCs 进又入血管。以上假设需要进一步实验证实。

总之，通过上述实验证实 PGCs 在人胚胎第 5 周前尚没有迁移至生殖嵴，而在后肠背侧系膜间充质中，此时不宜取胚胎生殖嵴培养胚胎生殖细胞，在胚胎第 5～11 周胚胎生殖嵴中已经迁移了大量的原始生殖细胞，并且 PGCs 也在此期未分化增殖，数量多，是用于培养胚胎生殖细胞的最好时间。而第 12 周后生殖腺的阶段特异性胚胎抗原表达下降，Oct-4 不表达，证明 PGCs 已经大部分分化为精原细胞或卵原细胞，此期生殖腺已经不能用于培养胚胎生殖细胞。

参考文献：

[1] Shamblott M J, Axelman H, Wang S, *et al*. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(23): 13726－13731.

[2] Goto T, Adjaye J, Rodeck C H, *et al*. Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis[J]. Mol Hum Reprod, 1999, 5(9): 851－860.

[3] Fujimoto T, Miyayama Y, Fuyutta M, *et al*. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. [J]. Anat Rec, 1977, 188(3): 315－330.

[4] Satoh M, *et al*. Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos [J]. J Anat, 1991, 177: 85－107.

（编辑　薛国文）

（上接 715 页）

HBsAg＋、12 份抗 HCV＋、6 份抗 TP＋、75 例 ALT 超过 25 个赖氏单位、抗 HIV 全部阴性。不合格率分别为：0.65%、0.23%、0.07%、1.43%、0.0%，以 ALT 单项不合格报废率为最高，总不合格率为 2.38%。75 例 ALT 单项不合格标本中，26～40 U 的 45 例，41～100 U 的 20 例，100 U 以上的为 10 例，HBV-DNA 实时荧光定量阳性检出率分别为 0.0%（0/75）、1.30%（1/75）、2.7%（2/75），检出总阳性率为 4.0%（3/75）。上述各组阳性检出率分别为：0.0%、5.0%、20.0%，以 ALT 100 U 以上的检出为最高，40～100 U 的次之。

3　讨论

本研究结果显示，献血员 HBsAg、抗 HCV、抗 HIV、抗 TP、ALT 的单项与总的报废率都远远低于地方血站的文献报道[1]，但单项 ALT 升高不合格报废率仍为最高，达 1.43%。

ALT 是一项非特异性试验，但可以鉴别出多数输血相关肝炎携带者。在我国的《血站基本标准》中规定，供血者必须检测 ALT。但在国外，关于 ALT 在血液筛检中的利弊存在许多不同看法和争论[2]。本试验结果表明，献血员筛查时，除 ALT 单项升高外，其它指标正常，但采用灵敏度高、特异好的 Real Time Q-PCR 技术进行 HBV-DNA 测定，阳性率达 4.0%，说明在献血员筛查时，ALT 作为筛查项目很有必要。ALT 升高除乙肝外还常见于各种病毒性肝炎，如丙肝、丁肝、庚肝等。仅管用 PCR 检测 HBV-DNA 阴性也不可能排除其他病毒性肝炎。如果将 ALT＞25 U，而 HBV-DNA 阴性的血液输给病人，既加大了风险系数，也不能达到安全输血的目的。采用 PCR 技术检测只能降低输血风险，但不能做为评判输血是否安全的指标。

乙肝病毒变异时，并不影响 HBV 复制与传播[3]，对肝细胞同样有损害，常规的 ELISA 不易检测。目前 HBsAg ELISA 试剂盒多为一步法，如果标本中 HBsAg 含量很高时，很容易产生 HOOK 效应（即钩状效应），出现假阴性结果[4]。因此，在献血员筛检时，如果 ALT 单项升高，作者认为最好用二步法试剂进行复检，以便降低输血风险。总之，在实际工作中，要严格执行国家关于血液检测标准，凡是 ALT＞25 U 的血液一定要报废，才能真正达到输血安全。

关键词：献血员；筛检；PCR；HBV-DNA
中图法分类号：R457　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 袁克宇，刘　泳，蔡红军. 无偿献血血液报损原因及有效监控探讨[J]. 临床输血与检验杂志，2002，4(1)：42.

[2] Legler T J, Maas J H, Blaschke V, *et al*. RHD genotyping in weak D phenotypes by multiple polymerase chain reactions[J]. Transfusion, 1998, 38(5): 434－440.

[3] Brunetto M R, Stemler M, Bonino F, *et al*. A New hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 1990, 10(2): 258－261.

[4] 单桂秋，李秋生，肖韶英. 检测乙型肝炎表面抗原的一步法试剂的钩状效应分析[J]. 中华医学检验杂志，2002，25(2)：107－108.

（编辑　薛国文）