

· 综 述 ·

## 全长 cDNA 文库及构建方法与应用进展

韩慧霞<sup>1</sup>综述,陆洪光<sup>1</sup>,王 鲁<sup>2</sup>审校

(1. 贵阳医学院附属医院皮肤科, 贵州贵阳 550004; 2 重庆市第一人民医院皮肤科 400011)

关键词: DNA, 互补; 基因组文库; 实验室技术和方法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.16.034

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)16-1639-04

互补 DNA (complementary DNA, cDNA) 文库是指生物不同生长发育时期, 特定组织或器官所转录的全部 mRNA 经反转录形成的 cDNA 与载体连接后形成的克隆的集合, cDNA 文库是在基因组水平上研究某一生物特定器官、组织和发育时期基因表达的前提和基础<sup>[1]</sup>。全长 cDNA 文库是生物体内完整的 mRNA 分子反转录而获得的 DNA 分子群集, 是 mRNA 分子群的一个完整的拷贝。全长 cDNA 文库不仅提供完整的 mRNA 信息, 而且可以通过基因序列比对得到 mRNA 剪接信息, 此外, 还可以对蛋白质序列进行预测及进行体外表达和通过反向遗传学研究基因的功能等<sup>[2]</sup>。全长 cDNA 文库的优点明显, 克隆大部分是全长的, 有效提高了基因测序和生物信息学分析的进程, 利于后期蛋白质表达及功能分析。目前几乎所有构建全长 cDNA 文库的方法都是基于真核生物完整 mRNA 的一个共同特征——“帽子”结构, 即 mRNA 的 5' 端存在的 m<sup>7</sup> GpppNp-结构。多数 cDNA 文库构建过程大致为分离总 RNA, 纯化 mRNA, 反转录成 cDNA, 然后与两端带有限制性酶切位点的人工接头相连接, 并将其插入到载体中, 转染大肠杆菌, 得到 cDNA 文库。近年来全球众多学者一直在有计划、大规模地进行一些重要模式生物的全长 cDNA 文库的构建及研究, 如拟南芥、水稻、果蝇、小鼠及猪等<sup>[3]</sup>, 这些生物全长 cDNA 文库已构建完成, 得到大量有重要价值的数据。本文主要介绍几种比较常用的全长 cDNA 文库的构建方法及其应用进展。

## 1 Oligo-capping 法

该法最早由 Maruyama 和 Sugano<sup>[4]</sup>于 1994 年建立。它利用完整的 mRNA 分子具有 5' 端帽子结构, 而部分降解的 mRNA 分子没有此结构的特点, 采用寡核苷酸 (oligonucleotide) 替换 mRNA 的帽子结构, 并标记 mRNA 的 5' 端。

首先利用细菌碱性磷酸酶 (bacterial alkaline phosphatase, BAP) 水解 5' 端无 m<sup>7</sup> GpppNp-保护的部分, 降解 5' 磷酸基团, 并防止截短的 mRNA 在后续反应中与寡核苷酸连接; 然后用烟草酸焦磷酸酶 (tobacco acid pyrophosphatase, TAP) 除去 mRNA 5' 端的帽子结构, 暴露磷酸基团; 再用 T<sub>4</sub> RNA 连接酶在 mRNA 的 5' 端连上一个寡核苷酸, 作为引发第二链合成的引物结合位点; 最后, 经 RT-PCR 扩增、酶切、连接, 只有完整的 mRNA 才能合成 cDNA, 建成目的全长 cDNA 文库。不足之处在于其涉及多种酶促反应, 各种酶的效率直接影响文库的最终质量, 尤其是 T<sub>4</sub> RNA 连接酶; mRNA 经过多步酶促反应后, 易发生降解, 故 RNA 需要量大; PCR 反应对模板量及长度有一定选择性, 易影响难扩增基因的克隆, 导致文库中克隆的代表性不强; 反应所用的 TAP 价格较贵, 此法成本较高。有人对 Oligo-capping 法进行改进, 以少量总 RNA (约 100 μg) 替代 mRNA 作起始材料, 寡核苷酸替换帽子结构后再分离 mRNA 进行 cDNA 合成, 可避免 mRNA 在酶处理过程中被降解, 构建

的文库在建库效率、全长比例和代表性等方面都有所提高<sup>[5]</sup>。2004 年 Clepet 等<sup>[6]</sup>用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶替代 T<sub>4</sub> RNA 连接酶, 在一定程度上提高了寡核苷酸 mRNA 的连接效率, 提高了文库全长比例。同年 Ota 等<sup>[7]</sup>用此法完成了 21 243 条日本人 cDNA 文库的构建和测序, 所构建文库中大约有 85% 的克隆为全长。Kim 等<sup>[8]</sup>改良此法, 提出 RNA 连接酶介导的 cDNA 末端快速扩增 (RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends, RLM-RACE)。2006 年 Sunderland 等<sup>[9]</sup>用 RLM-RACE 确定拟南芥 LIG1 基因所有可能的转录起始位点。2009 年 Tsuchihara 等<sup>[10]</sup>将 Oligo-capping 法与大规模平行测序技术结合, 提出以高通量方式收集转录起始位点 (transcription start sites, TSS) 信息和定量分析转录物表达水平的方法。改良后的 Oligo-capping 法被广泛用于实验研究。Sumio Sugano 实验室利用此法不断完善人类基因转录起始位点数据库和全长 cDNA 文库, 通过对选定人类和小鼠 cDNA 5' 端的测序, 获得 3.3 亿新标签<sup>[11-13]</sup>。

## 2 SMART 法

RNA 反转录 5' 末端交换机制 (switching mechanism at 5' end of RNA transcript, SMART) 是在第一链合成时使用专利 SMART IV<sup>TM</sup> 寡核苷酸产生大量全长双链 cDNA。此法是在 PCR 基础上利用 SMARTScribe<sup>TM</sup> MMLV 反转录酶的末端转移酶活性及限制性内切酶 Sfi I 的特性, 快速构建全长 cDNA 文库。SMARTScribe<sup>TM</sup> MMLV RT 是由小鼠白血病病毒 (moloney murine leukemia virus, MMLV) 反转录酶点突变而获得, 无 RNase H 活性。当反转录到达 mRNA 的 5' 端时, RT 能在相应的核酸 3' 端添加一段 oligo(dC), 对于非全长 cDNA, 由于反转录没有延伸到 mRNA 的 5' 端, RT 不能在其不完整的 3' 端加上 oligo(dC)。合成 cDNA 第二链时, 对于截短的第一链 cDNA, 反转录酶没有识别到 mRNA 的 5' 端帽子结构, 3' 端携带的 oligo(dG) 第二链引物就不能与截短的第一链 cDNA 片段结合, 最终得到的是全长双链 cDNA。在实验流程中, cDNA 引物的 5' 端引入了 Sfi I A 和 Sfi I B 识别位点, 只需对目的 cDNA 进行 Sfi I 单酶切, 就可实现目的基因的定向克隆。此方法只需用少量起始材料 (最低 0.025 μg 的 poly A<sup>+</sup> RNA 或 0.05 μg 的总 RNA) 经 18~26 次长距离 DNA 扩增 (long distance PCR, LD-PCR) 或 0.5~2.0 μg 的 poly A<sup>+</sup> RNA 通过引物延伸法合成双链 cDNA, 对扩增后的双链 cDNA 进行分级分离, 然后进行载体连接, 转化构建全长文库。mRNA 在合成 cDNA 前无酶促反应及化学处理, 不会在处理过程中出现 mRNA 的降解和浪费。产生的单链 cDNA 富含 mRNA 完整的 5' 非翻译区 (untranslated region, UTR), 省去合成接头的连接、甲基化等步骤, 更易获得全长克隆。

作为基于 PCR 的基因扩增技术, Wang 等<sup>[14]</sup>将其用于扩增侵袭性肿瘤细胞的 cDNA, 并鉴定和检测基因表达特征; 用

此法构建的还有腐霉、小麦条锈病菌等真菌的全长 cDNA 文库<sup>[15-16]</sup>;2006 年 Cheung 等<sup>[17]</sup>构建了蒺藜苜蓿的标准化 cDNA 文库及 cDNA 质粒文库;2007 年 Du 等<sup>[18]</sup>构建了发情前小尾寒羊卵巢的全长 cDNA 文库;2008 年 Vera 等<sup>[19]</sup>用此法分别合成了格兰维尔贝母蝴蝶幼虫、蛹及成虫的 cDNA;2009 年 Fedorov 等<sup>[20]</sup>构建了冬眠的美洲黑熊的脑、肝、睾丸及骨骼肌的全长 cDNA 文库。将 SMART 和双链特异性核酸酶 (duplex-specific nuclease, DSN) 均一化技术结合是目前构建全长均一化 cDNA 文库的首选方法<sup>[21]</sup>。

### 3 CAP-trapper 法

该法于 1996 年由 Carninci 等<sup>[22]</sup>建立,并用此法构建了小鼠脑细胞全长 cDNA 文库,全长比例超过 95%,且仅需 10 μg 起始 mRNA。此法建库原理是依据真核细胞 mRNA 的帽子结构上存在一个相同的二醇残基,此二醇结构经氧化后与生物素结合而被标记。生物素化的 mRNA 经反转录酶催化,进行第一链 cDNA 合成,接着经 Rnase I 酶切,去除所有非全长 cDNA 5' 端及所有未被 cDNA 保护的 mRNA 的生物素标签,经链霉亲和素磁珠(免疫磁珠)吸附,弱碱降解,获得的单链全长 cDNA 在末端转移酶的催化下,5' 端 oligo(G) 加尾,开始合成第二链,定向克隆获得全长 cDNA 文库。Carninci 等<sup>[22]</sup>所在实验室不断对此法进行改进:(1)在全长 cDNA 合成时,用海藻糖和山梨糖醇启动反转录,提高反转录酶热稳定性,减少反转录过程中的二级结构,提高全长 cDNA 的合成比例;(2)采用对甲基化敏感的限制性内切酶 SstH、Bsa I 或 BamH I /XhoI 替代 Ecol I /XhoI 双酶切,提高文库的全长比例;(3)用核糖核酸单链连接法(single-strand linker ligation method, SSLLM)加尾,减少 oligo(G) 加尾对测序和蛋白质翻译的干扰,利于全长 cDNA 的有效转录和表达克隆。

2005 年在 Ng 等<sup>[23]</sup>的研究中,采用此法获得 E14 小鼠胚胎干细胞的全长 cDNA。2006 年 Carninci 等<sup>[24]</sup>将此法用于哺乳动物基因启动子的研究。2008 年 Tajj 等<sup>[25]</sup>采用改良后的 CAP-trapper 法,用海藻糖启动反转录,构建了盐芥在高盐度、严寒及酸性环境下的全长 cDNA 文库。2009 年 Sato 等<sup>[26]</sup>采用此法构建全长 cDNA 文库,对水稻和拟南芥的基因同源性进行了比较分析。此外,用此法构建的还有毛果杨树<sup>[27]</sup>、大豆<sup>[28]</sup>和豌豆蚜虫<sup>[29]</sup>的全长 cDNA 文库。

此法具有建库效率高、全长比例高的优点,但酶促反应多, mRNA 暴露时间长,增加了 mRNA 降解的危险性,部分降解的 5' 端也会被生物素标记,尤其是技术要求高,流程长,需做同位素平行实验,操作复杂。

### 4 Vector-Capping 法

这是一种构建高质量 cDNA 文库简单而有效的方法。它利用 T4 RNA 连接酶将 mRNA/cDNA 双链复合体中第一链 cDNA 的 3' 端连接到载体 DNA 的平端,这样,全长 cDNA 就能以与锚定连接相同的方式在 5' 端加上 G。Kato 等<sup>[30]</sup>因 cDNA 在连接过程中加上载体作为“帽子”,故将这种方法命名为“Vector-capping”。根据 Ohtake 等<sup>[31]</sup>的研究,当具有帽子结构的 mRNA 作为模板时,锚定连接产生的 cDNA 在 5' 端加上了 dGMP,并且加上的核苷酸的碱基与帽子结构的碱基互补,这就意味着 5' 端出现的 G 能保证 cDNA 的完整性。该法仅由 3 步组成:(1)利用反转录酶和载体引物合成第一链 cDNA,所用载体是一端具有 dT 尾巴的线性载体;(2)用 T<sub>4</sub> RNA 连接酶将第一链 cDNA 连接到载体引物的另一端;(3)利用 Rnase H、E. coli DNA 聚合酶 I 及 E. coli DNA 连接酶的活

性,用 cDNA 替换 mRNA。使用载体引物能达到定向插入的目的,有利于 cDNA 的测序及表达,这种载体引物能由具有 dT 加尾的 3' 端突出位点和移除一端 dT 尾巴的邻近位点的限制性酶切位点的质粒载体制备而来。

用该法构建高质量 cDNA 文库的关键因素是 dT 尾巴的长度和载体引物的纯度。未剪切及未加尾的载体会增加文库的背景干扰,必须尽可能除去。建库的关键步骤是第二步,利用 T<sub>4</sub> RNA 连接酶的活性环化 cDNA-载体引物双链,虽然连接效率很低,但得到转化子的数量已能满足建库需要。该法在简易性、有效性、全长比例和 cDNA 质量等方面较传统方法有显著优势。

目前,许多实验室已采用此法构建多种生物组织的 cDNA 文库。Osada 等<sup>[32]</sup>比较 Vector-capping 法和 Oligo-capping 法所建文库的冗余性发现:用 Vector-capping 法构建食蟹及猕猴肝细胞文库的冗余性为 3.21,用 Oligo-capping 法构建食蟹及猕猴肝细胞文库的冗余性为 5.19,明显高于 Vector-capping 法 ( $P < 0.001$ )。Watanabe 等<sup>[33]</sup>构建了多种顶复门原虫,如 4 种致病性疟原虫、刚第弓形虫、多房棘球绦虫及小隐孢子虫的全长 cDNA 文库。2008 年 Oshikawa 等<sup>[34]</sup>构建了人类视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 的全长 cDNA 文库,所建文库全长比例超过 95%,大片段克隆长达 11 199 bp。Aboge 等<sup>[35]</sup>构建了野生型 gibbon 巴贝虫的全长 cDNA 文库,筛选出 gibbon 巴贝虫的二氢叶酸还原酶-胸苷酸合成酶(dihydrofolate reductase-thymidylate synthase, DHFR-TS)的基因,证明 DHFR-TS 是治疗 gibbon 巴贝虫病的抗叶酸类药物的作用靶位。此外,用此法构建的还有茛菪<sup>[36]</sup>和烟草 BY-2 对数生长期细胞<sup>[37]</sup>的全长 cDNA 文库。

### 5 小 结

全长 cDNA 文库较传统 cDNA 文库更有优势,其重要性决定了它是目前全长新基因克隆、基因鉴定和基因组功能研究的必要工具,是现代生物学研究不可或缺的重要手段。研究者可通过构建生物全长 cDNA 文库,获得完整的基因全序列信息,从中寻找特异性基因片段,利用核酸、抗体探针筛选文库,从而获得目的基因片段数据。随着分子生物学理论和技术的发展,全长 cDNA 文库的构建方法日臻完善。以上所介绍的 4 种方法目前应用已较为成熟,其中 SMART<sup>TM</sup> 试剂盒作为产品推出,现已广泛用于多种生物的全长 cDNA 文库构建和基因研究。Vector-capping 法优点明显,所建文库的全长比例是所有方法中最高的,克服了传统方法的众多局限和缺点,有望被广泛应用。研究者应根据所研究生物的生理、病理因素,基因研究目的及研究者所在实验室条件,选择适合的全长 cDNA 文库的构建方法,使各种建库方法在使用中能够充分发挥各自优点。

### 参考文献:

- [1] 许兰珍,何永睿,姜国金,等. cDNA 文库构建及其在植物抗性研究中的应用[J]. 安徽农业科学,2007,35(3):660-662.
- [2] 谢卡斌,张建伟,向勇,等. 10 828 条水稻全长 cDNA 的分离和注释[J]. 中国科学 C 辑,2005,35(1):6-12.
- [3] Kim TH, Kim NS, Lim D, et al. Generation and analysis of large-scale expressed sequence tags (ESTs) from a full-length enriched cDNA library of porcine backfat tissue [J]. BMC Genomics,2006,7:36.

- [4] Maruyama K, Sugano S. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides[J]. *Gene*, 1994, 138(1/2): 171-174.
- [5] Oh JH, Kim YS, Kim NS. An improved method for constructing a full-length enriched cDNA library using small amounts of total RNA as a starting material[J]. *Exp Mol Med*, 2003, 35(6): 586-590.
- [6] Clepet C, Le Clainche I, Caboche M. Improved full-length cDNA production based on RNA tagging by T4 DNA ligase[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(1): 6.
- [7] Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(1): 40-45.
- [8] Kim TH, Barrera LO, Qu C, et al. Direct isolation and identification of promoters in the human genome[J]. *Genome Res*, 2005, 15(6): 830-839.
- [9] Sunderland PA, West CE, Waterworth WM, et al. An evolutionarily conserved translation initiation mechanism regulates nuclear or mitochondrial targeting of DNA ligase 1 in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant J*, 2006, 47(3): 356-367.
- [10] Tsuchihara K, Suzuki Y, Wakaguri H, et al. Massive transcriptional start site analysis of human genes in hypoxia cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(7): 2249-2263.
- [11] Yamashita R, Suzuki Y, Wakaguri H, et al. DBTSS: data base of human transcription start sites, progress report 2006[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(Database issue): D86-89.
- [12] Wakaguri H, Yamashita R, Suzuki Y, et al. DBTSS: data base of transcription start sites, progress report 2008[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Database issue): D97-101.
- [13] Yamashita R, Wakaguri H, Sugano S, et al. DBTSS provides a tissue specific dynamic view of Transcription Start Sites[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Database issue): D98-104.
- [14] Wang W, Goswami S, Lapidus K, et al. Identification and Testing of a Gene Expression Signature of Invasive Carcinoma Cells within Primary Mammary Tumors[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(23): 8585-8594.
- [15] Cheung F, Win J, Lang JM, et al. Analysis of the *Pythium ultimum* transcriptome using Sanger and Pyrosequencing approaches[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 542.
- [16] Ling P, Wang M, Chen X, et al. Construction and characterization of a full-length cDNA library for the wheat stripe rust pathogen (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) [J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 145.
- [17] Cheung F, Haas BJ, Goldberg SM, et al. Sequencing *Medicago truncatula* expressed sequenced tags using 454 Life Sciences technology[J]. *BMC Genomics*, 2006, 7: 272.
- [18] Du LX, Liu SF, Zhu J, et al. Construction of SMART cDNA library of sheep ovary and identification of candidate gene by homologous cloning[J]. *AGR SCI CHINA*, 2007, 6(11): 1390-1395.
- [19] Vera JC, Wheat CW, Fescemyer HW, et al. Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing[J]. *Mol Ecol*, 2008, 17(7): 1636-1647.
- [20] Fedorov VB, Goropashnaya AV, Toien O, et al. Elevated expression of protein biosynthesis genes in liver and muscle of hibernating black bears (*Ursus americanus*) [J]. *Physiol Genomics*, 2009, 37(2): 108-118.
- [21] Wall PK, Leebens-Mack J, Chanderbali AS, et al. Comparison of next generation sequencing technologies for transcriptome characterization[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 347.
- [22] Carninci P, Kvam C, Kitamura A, et al. High-efficiency full-length cDNA cloning by biotinylated CAP trapper[J]. *Genomics*, 1996, 37(3): 327-336.
- [23] Ng P, Wei CL, Sung WK, et al. Gene identification signature (GIS) analysis for transcriptome characterization and genome annotation[J]. *Nat Methods*, 2005, 2(2): 105-111.
- [24] Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, et al. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(6): 626-635.
- [25] Taji T, Sakurai T, Mochida K, et al. Large-scale collection and annotation of full-length enriched cDNAs from a model halophyte, *Thellungiella halophila* [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 115.
- [26] Sato K, Shin IT, Seki M, et al. Development of 5 006 full-length cDNAs in barley: a tool for accessing cereal genomics resources[J]. *DNA Res*, 2009, 16(2): 81-89.
- [27] Ralph SG, Chun HJ, Cooper D, et al. Analysis of 4 664 high-quality sequence-finished poplar full-length cDNA clones and their utility for the discovery of genes responding to insect feeding[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 57.
- [28] Umezawa T, Sakurai T, Totoki Y, et al. Sequencing and analysis of approximately 40 000 soybean cDNA clones from a full-length-enriched cDNA library[J]. *DNA Res*, 2008, 15(6): 333-346.
- [29] Shigenobu S, Richards S, Cree AG, et al. A full-length cDNA resource for the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* [J]. *Insect Mol Biol*, 2010, 19 Suppl 2: S23-31.
- [30] Kato S, Ohtoko K, Ohtake H, et al. Vector-capping: a simple method for preparing a high-quality full-length cDNA library[J]. *DNA Res*, 2005, 12(1): 53-62.
- [31] Ohtake H, Ohtoko K, Ishimaru Y, et al. Determination of the capped site sequence of mRNA based on the detection of cap-dependent nucleotide addition using an anchor ligation method[J]. *DNA Res*, 2004, 11(4): 305-309.
- [32] Osada N, Hirata M, Tanuma R, et al. Collection of *Macaca fascicularis* cDNAs derived from bone marrow, kidney, liver, pancreas, spleen, and thymus[J]. *BMC Res Notes*, 2009, 2: 199.
- [33] Watanabe J, Wakaguri H, Sasaki M, et al. Comparasite: a database for comparative study of transcriptomes of parasites defined by full-length cDNAs[J]. *Nucleic Acids*

Res,2007,35(Database issue):D431-438.

[34] Oshikawa M, Sugai Y, Usami R, et al. Fine expression profiling of full-length transcripts using a size-unbiased cDNA library prepared with the vector-capping method [J]. DNA Res,2008,15(3):123-136.

[35] Aboge GO, Jia H, Terkawi MA, et al. Cloning, expression, and characterization of Babesia gibsoni dihydrofolate reductase-thymidylate synthase; inhibitory effect of antifolates on its catalytic activity and parasite proliferation [J]. Antimicrob Agents Chemother,2008,52(11):4072-4080.

[36] Kakita M, Murase K, Iwano M, et al. Two distinct forms of M-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with S-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in Brassica rapa [J]. Plant Cell,2007,19(12):3961-3973.

[37] Toyooka K, Goto Y, Asatsuma S, et al. A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the golgi to the plant cell exterior [J]. Plant Cell,2009,21(4):1212-1229.

(收稿日期:2010-11-18 修回日期:2011-03-07)

• 综 述 •

# 逆行自体血预充体外循环技术的临床应用

杨天德

(第三军医大学新桥医院麻醉科,重庆 400037)

**关键词:**逆行自体血预充;体外循环;冠状动脉旁路移植术  
**doi:**10.3969/j.issn.1671-8348.2011.16.035 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-8348(2011)16-1642-03

逆行自体血预充(retrograde autologous priming,RAP)是一种新的预充技术,在患者体外循环(cardiopulmonary bypass,CPB)前,尽可能使用患者自身血液来替换体外循环管路中的晶体预充液。1998 年 Rosengart 和 DeBois 提出 RAP 概念以来<sup>[1-2]</sup>,国内外学者相继将这一新的预充技术用于体外循环的心血管手术中<sup>[3-4]</sup>,本文就 RAP 产生背景、基本方法、临床应用与研究以及相关争议等方面进行综述。

## 1 RAP 产生的背景和基本方法

**1.1 RAP 的产生背景** 主要有两个方面<sup>[3]</sup>:一是复杂的心血管手术往往需要大量库血或血液制品的输注,而血源紧张、输血带来的免疫反应及病毒播散等问题促使人们探求新的血液保护措施及减少用血的方法,以降低异体输血需求,因此,RAP 应运而生;二是体外循环常规的晶体液预充不可避免地带来严重的血液稀释和血浆胶体渗透压下降,而严重的血液稀释和血浆胶体渗透压下降都将对机体产生不利影响。体外循环中红细胞比容(hematocrit,Hct)的最佳水平目前存在争议,而明确的红细胞输注指南也尚未建立。通常认为低温体外循环时,Hct 为 14%~15%,人体是可以耐受的且没有不良反应,但也有人认为 Hct 低于 23%或 24%时,会造成机体氧供需不平衡,导致组织缺氧以及心肌功能障碍,增加术后并发症的发生率和死亡率;晶体液预充可使体外循环初始血浆胶体渗透压降低 37%~60%,将大大增加重要脏器(心、肺、胃肠)和皮下组织的细胞外液量,过低的血浆胶体渗透压与冠状动脉搭桥术患者术后器官功能不全有关。最初的临床研究显示<sup>[2-3]</sup>,RAP 能够维持体外循环中较高 Hct 值,减少体外循环初始血浆胶体渗透压下降的程度,减少术中、术后库血的输注,能够部分克服常规晶体液预充对机体的不利影响。

**1.2 RAP 的基本方法**<sup>[3]</sup> 采用常规晶体预充液预充循环管道、排气,待全身肝素化后,经主动脉插管连接,打开内循环,使动脉血液经动脉滤器缓慢逆行置换预充液(预充液被置换入输液袋中),置换后钳闭动脉滤器近端,关闭内循环开关。腔静脉插管连接后,缓慢引流静脉血以置换静脉端循环管道内的预充液,置换后钳闭静脉端,打开内循环开关,通过滚压泵排出储血

器内多余的预充液。整个过程中要严密监测患者生命体征,维持动脉收缩压大于 100 mm Hg,必要时可与麻醉科医师协调,使用苯肾上腺素升高血压。如果患者在 RAP 过程中出现动脉收缩压低于 100 mm Hg 且应用升压药物效果不佳时,应终止进行 RAP。

## 2 RAP 的临床应用与研究

2001 年 Srinivas 和 Singh<sup>[5]</sup>观察了 60 例冠状动脉旁路移植术(coronary artery bypass grafting,CABG)患者,其中 30 例患者采用急性等容血液稀释和 RAP(RAP 时放血 300 mL),结果发现,RAP 组患者共输库血 26 U(平均 0.86 U)、体外循环中 Hct 平均下降 27.03%,而对照组患者共输库血 52 U(平均 1.73 U)、体外循环中 Hct 平均下降 39.50%( $P<0.01$ ),两组患者均未进行成分输血,说明 RAP 可以减少库血的用量。2002 年 Balachandran 等<sup>[6]</sup>采用前瞻性随机临床对照试验观察 104 例 CABG 患者,RAP 组患者平均(808.8±159.3)mL 预充液被自体血置换,两组患者均维持较高的 Hct 进入重症监护病房(intensive care unit,ICU)或出院,对照组有 49%的患者需要输血,输血量(277.6±363.8)mL,RAP 组有 17%的患者需要输血,输血量(70.1±173.5)mL,他们认为 RAP 减少输血量源于减少了晶体液的预充量。Brest 等<sup>[7]</sup>进一步发现小环路(动、静脉管均为 3/8 英寸)、低预充(650 mL)复合 RAP(最终将预充量减至 50 mL)可安全用于危重患者的 CABG,而术中 Hct 变化非常小。Saxena 等<sup>[8]</sup>观察术中自体输血和 RAP 在低体表面积(body surface area,BSA)的瓣膜手术患者中的应用情况,发现自体输血和 RAP 可以提高 Hct、减少术后胸腔引流量和异体血输注,说明自体输血和 RAP 是安全、经济、有效的血液保护技术。Hou 等<sup>[9]</sup>采用前瞻性随机对照实验观察 120 例心内直视手术,也证实 RAP 在低体表面积( $BSA<1.5\text{ m}^2$ )成人心脏手术中,可减轻体外循环血液稀释程度、减少库血应用。李建辉<sup>[10-11]</sup>相继观察了 RAP 在儿童和成人中的应用,发现 RAP 能够减少库血用量、促进患者恢复。

随着 RAP 应用的增加,有关 RAP 研究逐渐增多。Eising 等<sup>[12]</sup>对比观察了标准晶体液预充和 RAP 对择期 CABG 患者