PCR方法的基础上，研制了外源基因在毕赤酵母基因组中整合数的通用定量分析试剂，采用该套试剂可以一次试验同时对80余株不同外源基因整合进行扩增分析，简化了实验操作，节省了时间，并且达到了高通量和定量的目标，值得同行借鉴。

PCR定量分析的关键是制备扩增效力与待分析样品一致的PCR标准品，要求标准品与待分析样品的背景应尽可能一致。本研究中，我们以巴斯德毕赤酵母GS115菌株制备酵母基因组水溶液，以此做为标准品模板DNA(pPIC9K-HG质粒)的溶媒，保证了标准管与待测管基因背景的一致性，从而确保了它们拥有相同的扩增效力，使以此为依据的定量成为可能。

参考文献：

[1] BURDYCHOVA R, RUZICKA V, BARTOS M. PCR-based method for identification of integration events in the Pichia pastoris genome[J]. Biotechinques, 2002, 33(6): 1214-1218.

[2] 李克勤，李春海，颜春洪. 人组织型基质金属蛋白酶抑制剂-1在Pichia pastoris酵母中重组表达研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2001，17(2)：160-164.

[3] CEREGHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris[J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(45): 45-66.

[4] 熊 盛，任向荣，唐永红，等. 人源抗HBsAg单链抗体在巴氏毕赤酵母中的表达[J]. 生物工程学报，2003，19(1)：19-23.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2006)07-0643-01

个案与短篇

急慢性特发性血小板减少性紫癜TPO水平的调控及对抗核抗体的观察

罗晓菊，宪 莹，王莉佳 （重庆医科大学儿童医院免疫研究室，重庆 400014）

特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)是一种由于血小板破坏增多而引起的常见出血性疾病。临床特征主要是皮肤黏膜自发性出血，严重者出现颅内出血而危及生命。血小板生成素(thrombopoietin, TPO)是一种作用于巨核细胞，血小板系统的造血调控因子。儿童急慢性ITP时，TPO水平如何变化及调控？抗核抗体(anti-nuclear antiboby, ANA)阳性率如何？现分析如下。

1 材料与方法

1.1 对象

ITP组为2003年我院血液科收治的住院患儿，共有64例，其中急性54例，慢性10例。54例急性ITP中，男性37例，女性17例，平均年龄3岁10个月；10例慢性ITP中，男性7例，女性3例，平均年龄7岁1个月。正常对照组20例，来自健康儿童血清。

1.2 方法

1.2.1 试剂及方法 患儿住院后未经治疗立即抽血及骨髓穿刺。血小板计数采用全自动血细胞分析仪。血清TPO测定：采用ELISA一次性检测。抗核抗体(ANA)采用金标免疫斑点法进行定性检测。

1.2.2 ITP分型标准 急性ITP(AITP)：病程≤6个月，出血一般较重，PLT $<20\times10^9$/L；慢性ITP(CITP)：病程>6个月，出血一般较轻，PLT $(30\sim50)\times10^9$/L。治疗方案主要采用激素或激素+IVIG(静脉注射丙种球蛋白)。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用SPSS10.5统计软件包进行 t 检验。

2 结果

2.1 急慢性ITP患儿PLT、巨核细胞及TPO检测结果

急慢性ITP患儿PLT较正常对照显著下降，巨核细胞较正常对照显著升高($P<0.05$)(表1)。

表1 急慢性ITP儿童PLT、巨核细胞、TPO水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	PLT (10^9/L)	巨核细胞(个/片)	TPO(pg/ml)
正常对照组	20	187.65±64.71	56.35±20.19	202.66±74.93
AITP	54	16.13±10.42[a]	271.33±225.36[a]	220.85±131.86
CITP	10	19.30±12.03[a]	255.80±238.77[a]	165.35±86.57

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.2 急慢性ITP患儿ANA阳性率检测结果

正常对照组20例ANA均阴性，AITP组ANA阳性17例；CITP组ANA阳性4例。AITP、CITP组ANA阳性率与正常对照组比较差异显著($P<0.05$)。

2.3 33例急慢性ITP患儿治疗前后PLT、TPO水平

33例急慢性ITP患儿治疗后PLT较治疗前显著升高($P<0.05$)(表2)。

表2 急慢性ITP患儿治疗前后PLT、TPO水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	PLT(10^9/L)	TPO(pg/ml)
治疗前	33	13.82±8.64	209.68±132.37
治疗后	33	199.24±111.25[a]	164.70±134.17

a：$P<0.05$，与治疗前比较

作者简介：罗晓菊(1965-)，女，重庆市潼南县人，主管技师，主要从事小儿临床免疫学方面的研究，发表论文6篇。电话：(023)63632756-3415

收稿日期：2005-10-13；修回日期：2006-01-18

（下转647页）

采用 PCR 方法对来自临床、禽肉及家禽家畜排泄物共 111 株 CJ 进行的致病基因流行病学调查发现:有许多致病基因分别与 CJ 的粘附力、侵袭力、定植力,毒素产生,以及 GBS 的发生相关。因此,相比而言,DNA 疫苗以其制备和免疫的简单性、安全性和诱导免疫反应的全面性为研究 CJ 新型疫苗开辟了前景[7]。

针对 CJ 是一种抗原基因和表型多样的细菌。在前期研究的基础上,我们选择了 CJ peblA 基因为目的基因。其表达的可溶性粘附蛋白 PEBI 存在于所有 CJ 菌体表面,具有十分稳定而保守的免疫原性。在本研究中,我们通过 PCR 扩增获得 CJ Pen:2、Pen:8、Pen:19和 Pen:21peblA 基因 PCR 产物,并对 CJ Pen:19 peblA 基因 PCR 产物进行 DNA 双向测序,全序列测序结果与 GeneBank 中登录的空肠弯曲菌 Pen:2 标准株 peblA 基因的编码序列一致。表明 CJ peblA 基因具有高度的保守性。并且,在国内外首次成功构建了 CJ 真核表达重组质粒 pcDNA3.1(+)-peblA。为了进一步证实所构建的重组质粒具有应用价值,我们首先检测其能否在真核细胞中表达。我们采用 PolyFect 转染试剂介导的方法,成功把重组质粒转染到真核细胞 COS-7,并借用 RT-PCR 法和 ELISA 检测重组质粒在 COS-7 细胞中的表达产物。结果表明,重组质粒 pcDNA3.1(+)-peblA 转染成功,并能在 COS-7 细胞中表达。这为深入研究 DNA 疫苗在预防和控制 CJ 感染及其相关疾病中的作用,奠定了良好的实验研究基础。

参考文献:

[1] RYAN M M. Guillain-Barre syndrome in childhood[J]. J Paediater Child Health, 2005, 41(5-6): 237-241.

[2] NACHAMKIN I. Chronic effects of Campylobacter infection[J]. Microbes Infect, 2002, 4(4): 399-403.

[3] PARKHILL J, WREN B W, MUNGALL K, *et al*. The genome sequence of the food-borne pathogen Campylobacter jejuni reveals hypervariable sequences[J]. Nature, 2000, 403(6770): 665-668.

[4] 冯永磊,蔡方成,刘　杞,等. 空肠弯曲菌粘附蛋白 PEBI 的克隆表达及免疫保护性初步探索[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(8): 640-641.

[5] WILLISON H J. The immunobiology of Guillain-Barre syndromes[J]. J Peripher Nerv Syst, 2005, 10(2): 94-112.

[6] DATTA S, NIWA H, ITOH K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces[J]. J Med Microbiol, 2003, 52(Pt 4): 345-348.

[7] CUI Z. DNA vaccine[J]. Adv Genet, 2005, 54: 257-289.

(编辑　王　红)

(上接643页)

3　讨论

特发性血小板减少性紫癜是巨核系造血异常性疾病,但多认为与自身免疫有关[1]。目前认为是病毒感染后由体液免疫介导的一种免疫反应。本组 ITP 患儿 ANA 明显高于对照组($P<0.05$)。ANA 是以抗真核细胞核为靶抗原的自身抗体的总和。如果抗血小板抗体与机体的其他细胞的细胞核不存在交叉抗原,则 ANA 对 ITP 的发病机制无意义。如果存在交叉抗原,则 ANA 有可能是造成血小板减少的又一自身抗体。经观察 ANA 阳性与阴性的 ITP 患儿,其临床表现、治疗前后的血小板数量、TPO 水平无显著性改变,两种治疗方案的治疗效果与 ANA 无明显关系[2]。

血小板生成素(TPO)主要作用是促进巨核系细胞造血,本组 ITP 儿童 TPO 水平与正常对照组比较无显著性差异(表1),与报道的成人 ITP 的 TPO 水平一致[3]。急慢性 ITP 时,血小板数量明显下降,而 TPO 水平处于正常水平,TPO 水平受哪些因素调控?经研究表明 TPO 的调控有以下两种机制:①TPO mRNA 的调控[4]。②特异性 TPO 受体 C-MPL(血小板生成素受体)介导的调节[5]。

本组64例急慢性 ITP 患儿骨髓巨核细胞明显高于正常,因此 ITP 时巨核细胞的增加是调节 TPO 水平的一个因素,增加的巨核细胞加速了 TPO 的降解,才使得 ITP 时 TPO 水平保持正常,提示儿童 ITP 时血清 TPO 水平的调控不是单一因素而是受到血小板数量的降低和骨髓巨核细胞数增多双重因素的调控。

综上所述,急慢性血小板减少性紫癜患儿,其血小板数明显降低,巨核细胞数明显增加,而 TPO 水平大致正常。ITP 经治疗后,血小板数升高明显,TPO 水平稍有下降,表明 TPO 水平受到血小板数量和巨核细胞数量的双重调控。抗核抗体阳性率高于正常,可能只是一种伴随现象,对阳性者应长期进行随访。

关键词:儿童;特发性血小板减少性紫癜;血小板生成素;抗核抗体

中图法分类号:R554.6　　**文献标识码**:B

参考文献:

[1] 沈　迪,王辨明,宋善俊,等. 临床血液学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1989: 713-718.

[2] 罗晓菊,宪　莹. 儿童特发性血小板减少性紫癜抗核抗体、血小板生成素特征与治疗方案[J]. 儿科药学杂志, 2005, 11(6): 21-22,29.

[3] HIRAYAMA Y, SAKAMAKI S, MATSUNAGA T, *et al*. Concentrations of thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, aplastic anemia, and essential thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells[J]. Blood, 1998, 92(1): 46-52.

[4] 张晓泉,杨耀明,史惠琳,等. 特发性血小板减少性紫癜患者血小板生成素相关基因表达的研究[J]. 中华血液学杂志, 1998, 19(11): 587-589.

[5] 杨　玲,辜学忠,佟　力,等. 血小板减少症患者 TPO 水平及其受体 c-mpl 的检测及临床意义[J]. 中华临床医学研究杂志, 2005, 11(3): 305-308.

(编辑　薛国文)