构建于 pGCSIL-GFP 真核表达载体,转染细胞后,在 U_6 启动子的作用下转录为“茎环”结构的 pre-miR-15a,通过细胞内自身的 RNA 聚合酶Ⅲ Dicer 的作用下剪接加工成为成熟 miR-15a,从而发挥对靶基因的调控作用。这符合 miRNA 的一般生物合成过程和作用原理,相对经济、简便、效果稳定,符合实验需要。pGCSIL-GFP 真核表达载体带有的启动子 U_6 具有明确的转录起点和终点,不会影响下游基因的表达,并且含有绿色荧光蛋白基因和 G418 筛选标记,便于观察和筛选,可用于基因的稳定表达。本实验还引入了结合通用引物快速简便鉴定阳性克隆的 PCR 方法,利用载体通用引物与 pGCSIL-GFP 真核表达载体进行菌液 PCR 反应,用 PCR 产物电泳结果来筛选阳性克隆,有效的对短插入片段重组子进行筛选与鉴定。与传统的酶切和普通 PCR 鉴定方法相比,该方法简便快速,是筛选和鉴定阳性克隆的有效手段[9]。本实验构建的 pre- miR-15a 真核表达载体经 PCR 阳性克隆鉴定及基因测序均与目的序列一致,这为进一步研究 miR-15a 在肿瘤细胞中的生物学功能奠定了实验基础。

本实验间接免疫荧光法检测 pre-miR-15a 组 Bcl-2 蛋白的表达量明显低于对照组,台盼蓝拒染法测 pre-miR-15a 组细胞 24 h 细胞计数与相应对照组间差异无显著性,而 48 h 和 72 h 增殖活性显著下降,结果表明,本实验成功构建了 pre-miR-15a 真核表达载体,且 pre-miR-15a 可下调 Bcl-2 蛋白的表达,而抑制 Raji 的生长。

参考文献:

[1] Calin G A, Croce C M. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11): 857 - 866.
[2] McManus M T. MicroRNAs and cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2003, 13(4):253 - 258.
[3] Gregory R I, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(9): 3509 - 3512.
[4] Chen C Z. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. N Engl J Med, 2005, 353(17): 1768 - 1771.
[5] Cimmino A, Calin G A, Fabbri M, *et al*. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(39): 13944 - 13949.
[6] Zamore P D, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs[J]. Science, 2005, 309(5740): 1519 - 1524.
[7] Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, *et al*. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(9): 2999 - 3004.
[8] 张小勇,余　冰,倪　明,等. 人 miR-16 真核表达载体的构建与鉴定[J]. 医学分子生物学杂志,2008,5(1):31 - 34,39.
[9] 崔　静,黄爱龙,张文露. 结合通用引物快速简便鉴定阳性克隆的 PCR 方法[J]. 生物技术通报,2008,(3):99 - 102.

(编辑　张　维)

文章编号:1000-5404(2009)23-2337-01

个案与短篇

成人返流性肾病 1 例

吴　静,杨惠标,袁发焕,赵景宏,黄云剑,张　憬,叶自林,冯　兵　(第三军医大学新桥医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,重庆 400037)

1　资料资料

患者,男性,43 岁,因“腰痛伴夜尿增多 4 年余,发现肾功能减退 1 年”入院。患者入院前 4 年开始出现腰痛,伴夜尿增多,起夜 2 ~ 3 次,总量 600 ~ 800 ml,外院查腹部平片示“左侧输尿管上段靠近盆腔入口处轻度扩张”,诊治不祥。入院前 1 年发现血肌酐(SCr) 154.7 μmol/L,未行诊治。病程中患者无血尿,无尿路刺激征,无发热,无皮疹及关节肿痛。近日患者因腰痛加重,收入我科。入院时查体:血压 120/70 mmHg,心肺腹无异常。化验显示:尿常规示尿蛋白(+),尿比重 1.005,尿蛋白定量 0.77g/24 h;肾功:肌酐 182 μmol/L,尿素氮 6.4 μmol/L。腹部 B 超检查显示:右肾轻度增大,左肾明显缩小,双肾形态不规则;右肾小囊肿,膀胱壁较厚。静脉肾盂造影显示:双肾盂扩大及双侧输尿管稍增粗,左肾转位欠佳。自由尿流率测定最大尿流率正常。尿动力学分析正常。排尿性膀胱造影检查:输尿管、肾盂明显扩张,造影返流入全段输尿管及肾集合系统内(图 1)。肾脏活检病理报告:轻中度系膜增生性肾小球病变伴间质性血管慢性病变(图 2)。根据患者病史体征和辅助检查,确诊为返流性肾病。

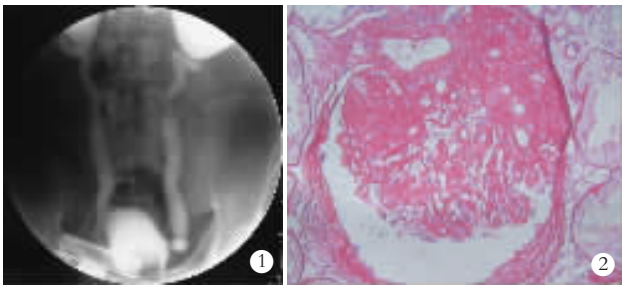


图 1　返流性肾病患者膀胱造影
图 2　肾脏活检组织病理观察　(过碘酸雪夫反应染色 ×400)

作者简介:吴　静,女,重庆市人,医师,主要从事急性肾炎方面的研究。电话:(023)60758057,E-mail:wujing_614@163.com

收稿日期:2009-02-13;修回日期:2009-02-26

(下转 2346 页)

病毒,CA16 变异频率也相对较高[18]。因此继续加强研究和积累 CA16 的相关流行病学资料具有十分重要的意义。本研究为进一步深入阐明和认识 CA16 的起源和进化积累了基础资料。

参考文献:

[1] Chan L G, Parashar U D, Lye M S, *et al*. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group[J]. Clin Infect Dis,2000, 31(3): 678 - 683.

[2] Lin T Y, Twu S J, Ho M S, *et al*. Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: occurrence and recognition[J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(3): 291 - 293.

[3] Chang L Y, Lin T Y, Huang Y C, *et al*. Comparison of enterovirus 71 and coxsackie-virus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998[J]. Pediatr Infect Dis J, 1999, 18(12): 1092 - 1096.

[4] Wang C Y, Li-Lu F, Wu M H, *et al*. Fatal coxsackievirus A16 infection[J]. Pediatr Infect Dis J, 2004,23(3): 275 - 276.

[5] Legay F, Leveque N, Gacouin A, *et al*. Fatal coxsackievirus A-16 pneumonitis in adult[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(7): 1084 - 1086.

[6] 朱俊萍,徐子刚,陈 辉,等. 2007 年北京地区儿童手足口病病原的初步筛查[J]. 病毒学报, 2009,25(1):23 - 28.

[7] 沐桂藩,吕 华,顾方舟,等. 北京市手足口病的病原学研究[J]. 病毒学报, 1986,2(3):220 - 222.

[8] 肖明华,叶智贞,张之伦,等. 天津市首次从手足口病人分离出 Cox-A16 肠道病毒[J]. 天津医药, 1985,13(6):355 - 357.

[9] 曹逸云,阳选祥,李 靖,等. 我国手足口病的病原学研究[J]. 中国医学科学院学报, 1985,7(5):333 - 336.

[10] 杨智宏,朱启镕,李秀珠,等. 2002 年上海儿童手足口病病例中肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型的调查[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(9):648 - 652.

[11] 张寿斌,廖 华,黄呈辉,等. 深圳 237 例手足口病肠道病毒血清型基因及临床特征[J]. 中国当代儿科杂志, 2008,10(1):38 - 41.

[12] Li L,He Y,Yang H,*et al*. Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China[J]. J Clin Microbiol, 2005,43(3): 3835 - 3839.

[13] 朱汝南,钱 渊,邓 洁,等. 北京市儿童手足口病与肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型感染有关[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(10): 1004 - 1008.

[14] Cardosa M J, Perera D, Brown B A, *et al*. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes[J]. Emerg Infect Dis, 2003,9(4):461 - 468.

[15] Perera D, Yusof M A, Podin Y, *et al*. Molecular phylogeny of modern coxsackievirus A16[J]. Arch Virol,2007,152(6):1201 - 1208.

[16] Brown B A, Oberste M S, Alexander J P, *et al*. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998 [J]. J Virol, 1999,73(12): 9969 - 9975.

[17] Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, *et al*. Genetic diversity of coxsackievirus A16 associated with hand, foot, and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003[J]. J Clin Microbiol, 2007,45(1): 112 - 120.

[18] 杨朝辉,尹少甫,张宗久,等. 柯萨奇病毒 A 组 16 型[J]. 中国疫苗和免疫, 2009,15(1):72 - 77.

(编辑 王 红)

(上接 2337 页)

2 讨论

RN 临床并不少见,病发率在普通人群中为 0.11% ~10%,主要发生于儿童。患者早期表现为膀胱和输尿管返流(vesicoureteric reflux,VUR),随着病情的进展,当损害肾间质导致肾功能障碍时,即引起 RN。目前 RN 尚缺少敏感的检测方法,其发病机制也不清楚,可能与菌尿、尿流动力改变、免疫损伤、血管病变等方面的因素有关。本病系慢性进行性疾病,最后发生肾功能衰竭。由于 RN 均为 VUR 所致,因此 RN 的诊断分 2 步[2]:首先判断是否存在 VUR,其次判断是否有相关的肾脏结构和功能损害。

排尿性膀胱尿路造影是目前诊断 VUR 最直接、最准确的检查手段,该项检查结合膀胱压和尿流速率监测还可评价膀胱及尿道功能,通过导尿管和耻骨上膀胱穿刺管注入含可溶性造影剂溶液,排尿时摄片观察有无膀胱输尿管返流。返流分轻、中、重度,返流入肾脏集合系统的为重度返流,对肾功能损害较大。该项检查无创伤,简便、安全,如消毒彻底,检查前控制感染有效,很少发生逆行感染。本例患者经检查显示严重 VUR,而膀胱及尿道功能正常。肾脏功能损害主要依据尿蛋白、尿比重和肾功检测,确诊主要通过肾活检。本例患者肌酐明显增高,出现蛋白尿和尿比重下降,提示肾功能异常;肾活检显示肾小球及其间质的病变,证实其肾脏结构的损害。因而符合 RN 的诊断。

RN 的治疗是制止尿液返流和控制感染[2],防止肾功能进一步恶化。内科治疗包括控制尿路感染、定期排尿,避免膀胱内压力增高;如有便秘以及泌尿系结石应积极治疗。外科治疗包括抗返流手术——输尿管重新植入,该手术特别适用于儿童重度返流,轻或中度患者常无输尿管扩张或肾盂积液,一般不会造成严重肾实质病变,而且通常在控制尿路感染后返流可消失,所以一般不考虑手术治疗。成人 VUR 并出现反复尿路感染,经内科积极治疗无法控制者可考虑手术治疗。

关键词: 返流性肾病;膀胱造影;诊断

中图法分类号: R692 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] Cendron M. Reflux nephropathy[J]. J Pediatr Urol,2008, 4(6):414 - 421.

[2] Brakeman P. Vesicoureteral reflux, reflux nephropathy, and end - stage renal disease[J]. Adv Urol, 2008, 2008: 508 - 949.

(编辑 张 维)