DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.022

降低了目的蛋白的表达速度,有利于蛋白的正确折叠而形成可溶性的天然空间结构。通过超声破菌,严格分离上清,再直接从上清中进行亲和层析分离纯化获得N端融合6×His的PPARγ2重组蛋白。免去了从包涵体分离蛋白、复性等的复杂步骤。我们分离获得的蛋白纯度在90%以上,可以直接用于配体结合活性的分析及新配体的筛选。

参考文献:

[1] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism[J]. Endocr Rev, 1999, 20(5): 649-688.
[2] Kliewer S A, Forman B M, Blumberg B, *et al*. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(15): 7355-7359.
[3] Tontonoz P, Hu E, Graves R A, *et al*. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer[J]. Genes Dev, 1994, 8(10): 1224-1234.
[4] Rosen E D, Spiegelman B M. PPARγ: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth[J]. J Biol Chem, 2001, 276(41): 37731-37734.
[5] 曹廷兵, 叶治家, 巩燕, 等. 一种快速鉴定RNA质量的方法[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(8): 992-993.
[6] Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease [J]. Nature, 2000, 405(6785): 421-424.
[7] Xu H E, Lambert M H, Montana V G, *et al*. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors[J]. Mol Cell, 1999, 3(3): 397-403.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2004)01-0060-02

造血干细胞移植治疗儿童急性白血病2例

Treating 2 cases of acute leukemia in children with hematopoietic stem cell transplantation

黄 宁,徐世侠,吴南海,胡晓红,王鹏云,龚小军 (北京海军总医院儿科,北京 100037)

在儿童急性白血病的治疗中,采用异基因造血干细胞移植,成为继化疗后又一突破性进展,为难治性急性白血病提供了一个有力的治疗措施[1],越来越受到人们的重视。我们应用HLA相合的同胞脐血移植治疗1例急性单核细胞白血病及1例急性淋巴肉瘤白血病患儿,现报告如下。

1 资料和方法

1.1 病例

病例1,男,9岁。1997年11月因发热、咽痛伴进行性面色苍白、乏力全身10 d入院,经骨髓检查确诊为AML-M5b。住院后经DA(柔红霉素+阿糖胞苷)方案化疗一个疗程后缓解,相继用DA、HA(三尖杉质碱+阿糖胞苷)及中剂量的阿糖胞苷等方案强化治疗。脐血移植前1周采集自体骨髓按15 ml/kg采集600 ml,后经程控降温冻存于液氮中备用。移植前查体:身高132 cm,体质量31 kg,浅表淋巴结不肿大,心、肺正常,肝脾不大。外周血、骨髓及脑脊液检查均示CR。肝肾功能无异常,肝炎病毒全套检查均阴性,咽拭子、血、尿、大便细菌培养均阴性;血巨细胞病毒IgG(+),IgM(-),B超和X线胸片检查均示肝胆、胰、脾、肾正常。

病例2,男,11岁,体质量50 kg。1998年10月29日因"颈部肿物,皮肤瘀点10 d"入院。查体:肝肋下3 cm,剑下4 cm,脾肋下5 cm,血常规:白细胞54.5×10^9/L,幼稚细胞0.11,血小板42×10^9/L,骨髓原幼淋占0.98,诊断为L2型白血病。淋巴结活检确诊为淋巴肉瘤白血病(B细胞来源),血LDH 742 U/L,确诊:淋巴肉瘤白血病。经COI+L-asp(环磷酰胺、长春新碱、去甲氧柔红霉素、左旋门冬酰胺酶)诱导缓解治疗,第14天复查骨髓完全缓解。曾进行颅脑放疗(18 Gy)。诊断:急性淋巴肉瘤白血病(首次缓解)。本次入院查肝肾功、心电图、心脏彩超、脑片均正常,用威猛加阿糖胞苷强化后循环采血后采集自体骨髓,采集1 200 ml备用。

1.2 供者

例1患儿母亲再孕一男婴,并于产前(孕30周)行脐静脉取血做HLA配型。结果表明脐血HAL-A、B、DR位点儿与患儿完全相合;血型相合,均为O型。例2母亲再孕一女婴,分娩时留取脐血,行HLA配型,结果脐血HLA-A、B、DR位点与患儿完全相合。患者血型A,脐血B型。

1.3 移植过程

1.3.1 预处理方案 采用BU/CY2方案:马利兰(BU)1 mg/kg,1次/6 h,用4 d,共16次,环磷酰胺(CY)60 mg/kg·d,用2 d。

1.3.2 脐血采集 于母亲预产期前10天常规剖腹产,采用一次性无菌采血袋分别采集脐血150 ml(例1)及180 ml(例2),例1采集脐血有核细胞数3.7×10^7/kg,$CD34^+$3.9×10^5/kg,当天回输。例2同时留取6 ml作HLA配型,脐血未经分离全血-196 ℃液氮冷冻,预处理结束后解冻立即回输,回输脐血有核细胞数1.62×10^7/kg,$CD34^+$1.60×10^5/kg。

(下转63页)

作者简介:黄 宁(1943-),女,湖北省洪湖县人,主任医师,主要从事小儿哮喘、小儿血液病方面的研究。电话:(010)66958409

收稿日期:2002-11-05;修回日期:2003-08-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

码子总数为 64 个, 其中 2 个氨基酸各有 1 个密码子, 9 种氨基酸各有 2 个密码子, 1 种氨基酸各有 3 个密码子, 5 种氨基酸各有 4 个密码子, 3 种氨基酸各有 6 个密码子, 而终止密码子有 3 个(TAG、TAA、TGA)。为了减少终止密码子的出现, 也可设计 K 为 G、C、T, 密码子总数为 48 个, 其中 5 个氨基酸各有 1 个密码子, 7 种氨基酸各有 2 个密码子, 5 种氨基酸各有 3 个密码子, 2 种氨基酸各有 4 个密码子, 1 种氨基酸各有 5 个密码子, 而终止密码子有 1 个(TAG)。但值得注意的是, 按这两种方案进行设计, 结果将导致 20 种氨基酸出现频数有明显的差异(0.104/0.021), 氨基酸分布极不均衡, 密码子最多的为 5、6 个, 最少的则为 1 个。而本实验将 K 设计为 G 和 T, 如此设计密码子总数仅为 32 个, 其中 12 个氨基酸各有一个密码子, 5 种氨基酸各有 2 个密码子, 3 种氨基酸各有 3 个密码子, 这样可使氨基酸分布较均衡, 氨基酸出现频数的差异较小, 同时终止密码子只有一个(TAG), 且此终止密码子可被宿主菌的琥珀酸突变抑制, 这样就克服了由于终止密码子的出现而使融合蛋白不能完全表达的现象。

库容是衡量随机肽库主要指标, 理论上设计的编码区将具有约 1×10^{29} 种核酸序列, 1×10^{21} 种多肽序列, 而构建的随机肽库的库容为 1.28×10^{7}, 其库容小于理论值的原因主要来源于转化方法的限制, 目前建库采用转化效率最高的电转化方法, 最高达到 $10^{9}\sim 10^{10}/\mu g$。这样的库容及复杂度在理论上包括 5～7 个氨基酸长度的肽的所有可能的排列顺序。更长的肽库都将是不完全的, 然而这并不影响它的应用。一方面由于不完整的大库中包括一系列框架移动的完整的小库。另一方面, 对于大多数蛋白质相互作用界面, 仅 3～5 个关键残基已能够保证充分的作用稳定性, 而库中可能出现这一系列的克隆的几率很大。而且肽段越长, 越有利于发现有亲和作用的表位序列, 特别对那些关键氨基酸并不是连续的靶分子的结合表位的筛选。本实验的完成为进行酵母双杂交随机肽库筛选靶蛋白相互作用多肽奠定了基础。

参考文献:

[1] 徐　祥, 梁华平, 刘　昕, 等. p65 DNA 结合域的克隆、表达及其酵母双杂交自身激活作用检测[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(2), 123－126.

[2] Yang M, Wu Z, Fields S. Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(7): 1152－1156.

[3] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989, 340(6230): 245－246.

[4] 颜子颖, 王海林 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 121－132.

[5] Cloas P, Brent R. The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(8): 355－363.

(编辑　张大春)

(上接 60 页)

2　结果

例 1 于＋18 d 粒系植入, ＋33 d 血小板植入。例 2 于＋13 d 粒系植入, ＋35 d 血小板植入。细胞因子的应用可以加速造血重建, 例 1 于＋30 d DNA 指纹图示骨髓全部为供者型, 移植后 2 个月外周血 T 细胞亚群恢复正常。随访 10 个月, 患者各项检查正常, 未发生急、慢性 GVHD。例 2 于＋33 d 外周血性染色体分析证明为供者型, 于＋7 d, 发生急性Ⅱ度 GVHD, 用激素后控制, 无并发症。

3　讨论

儿童全身照射(TBI)后, 生长激素的分泌受到限制, 且对性发育及生殖功能有重要影响。BU/CY 方案具有较强的抗白血病及免疫抑制作用, 对于 20 岁以下的白血病患者具有较高的植入率及较低的复发率, 尤其对于急性髓性白血病及慢粒患者效果较好[2], 文献[3]报道儿童白血病移植后的相关病死率增加。2 例患儿预处理时经给予美那斯、强迫利尿及保肝治疗后, 均无出血性膀胱炎及肝动脉血管闭塞症(VOD)等并发症, 且移植后植入时间早, 至今无病生存, 提示 BU/CY 方案对儿童白血病安全有效。

目前在造血干细胞移植的预处理方案中, 常规使用放疗、化疗。我们在常规化疗预处理前, 用物理方法按留取患儿含有肿瘤细胞骨髓, 确能起到减少肿瘤负荷作用。同时使患儿骨髓细胞龛腾空, 以利造血干细胞的植入。并且不用放疗, 避免对患儿骨髓的抑制作用, 以促进移植成功, 减少复发。该方案可取代常规预处理方案, 但作为新的去髓预处理方案在临床中应用, 需要进一步积累临床资料。

关键词: 造血干细胞移植; 白血病; 儿童
中图法分类号: R733.71　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Will A M. Umbilical cord blood transplantation[J]. Arch Dis Child, 1999, 80(1): 3－5.

[2] Sahebi F, Copelan E, Crlley P, *et al*. Unrelated allogeneic bone marrow transplantation using high-dose busulfan and cyclophosphamide(BU-CY) for the preparative regimen[J]. Bone Marrow Transplant, 1996, 17(3): 685－687.

[3] Davies S M, Ramsay N K C, Klein J P, *et al*. Comparison of preparative regimes in transplantations for childhood acute leukemia[J]. J Clin Onco, 2000, 18(2): 340－343.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net