bridization: a method for generating differentially regulated or tissue-sepecific cDNA probe and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6 025—6 030.
[2] Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y F, *et al*. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes [J]. Methods Enzymol, 1999, 303: 349—380.
[3] Marchuk D, Drumm M, Saulino A, *et al*. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(5): 1 154—1 159.
[4] 李永明, 赵玉琪 著. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 72—73.
[5] Von Stein O D, Thies W G, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(13): 2 598—2 602.
[6] Lee J H, Miele M E, Hicks D J, *et al*. KISS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene[J]. J Natl Cancer Inst, 1996, 88 (23): 17 31—1 737.
[7] Kuang W W, Thompson D A, Hoch R V, *et al*. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(4): 1 116—1 123.
[8] Pitzer G, Stassar M, Zoller M. Identification of renal-cell-carcinoma-related cDNA clones by suppression subtractive hybridization[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1999, 125(8-9): 487—492.
[9] Hufton S E, Moerkerk P T, Brandwijk R, *et al*. A profile of differentially expressed genes in primary colorectal cancer using suppression subtractive hybridization[J]. FEBS Lett, 1999, 463(1-2): 77—82.
[10] Zhang L, Cilley R E, Chinoy M R. Suppression subtractive hybridization to identify gene expressions in variant and classic small cell lung cancer cell lines[J]. J Surg Res, 2000, 93(1): 108—119.

(编辑 薛国文)

文章编号: 1000-5404(2001)06-0701-01

个案与短篇

慢性再生障碍性贫血患者血清干细胞因子水平测定

Determination of serum SCF level in patients with chronic aplastic anemia

宫立众[1], 张茂宏[2], 徐从高[2] ([1]第三军医大学附属西南医院血液内科, 重庆 400038; [2]山东医科大学附属医院血液病研究室, 济南 250012)

为了探讨干细胞因子(Stem cell factor, SCF)在再生障碍性贫血(AA)发病中的作用及SCF能否用于AA治疗的前期研究工作的一部分, 我们检测了31例初诊或治疗无效、18例缓解和11例基本治愈共60例慢性再生障碍性贫血(CAA)患者血清SCF水平, 结果报告如下。

1 材料与方法

患者: 60例CAA患者均符合诊断标准[1]。其中初诊病人21例, 治疗无效10例, 男15例, 女16例, 平均年龄31.1岁(12~67岁), 病程半月至6年; 18例病人经治疗后取得缓解, 男10例, 女8例, 平均年龄29.7岁(14~63岁), 病程2~10年; 11例病人经治疗后取得基本治愈, 女6例, 男5例, 平均年龄33.7岁(13~62岁), 病程2~13年。

正常对照: 共30例, 男15例, 女15例, 平均年龄30.2岁(13~58岁), 一个月内未服用药物, 无家族及血液系统疾病史的体检者。

标本采集: 病人2周内未接受全血或成份输血。取空腹静脉血4 ml, 分离血清, -80 ℃或-20 ℃冻存, 待测。

SCF检测: 采用美国R&D公司生产的Quantikin™人SCF免疫检测试剂盒。检测按试剂盒说明书操作。

统计学方法: 血清SCF浓度以$\bar{x}\pm s$表示, 各组间显著性检验采用t检验方法。血清SCF浓度与性别、年龄、病程及疾病严重程度(血细胞计数)之间的关系, 用相关分析方法判断。

2 结果

CAA患者血清SCF水平: 正常对照组血清SCF水平为(3 270±1 051) pg/ml, CAA初诊及治疗无效患者SCF水平为(1 736±599) pg/ml, 显著低于正常对照, $P<0.01$。缓解患者为(3 011±1 102) pg/ml, 基本治愈者为(3 159±641) pg/ml, 与正常对照比较, 差异无显著性($P>0.05$)。

CAA患者SCF水平与性别、年龄、病程、疾病严重程度的关系: 正常对照和CAA患者血清SCF水平性别间均无显著性差异($P>0.05$)。SCF水平与年龄、病程、疾病严重程度(红细胞计数、白细胞计数、血小板计数)亦无显著相关($P>0.05$)。

3 讨论

影响SCF水平的因素: 影响SCF水平的因素尚不清楚, 其调控机制尚待探讨。Langley测定了257例正常人血清SCF水平, 发现年龄、性别均不影响血SCF水平。我们的30例正常对照亦未见性别差别, 不受年龄影响(资料略)。CAA患者SCF水平与性别、年龄、病程和疾病严重程度无关。

30例正常对照血清SCF水平为(3 270±1 051) pg/ml, 与报道的3.3 ng/ml类似[2], 而与Kojima所报结果为(1 160±316) pg/ml有较大差别[3], 除了与实验方法有关外, 尚有许多未知的因素有待探讨。

SCF在AA发病中的作用: CAA初诊时血清SCF水平低于正常。可能有二种原因: ①因骨髓基质细胞的数量减少而造成SCF分泌量下降, 推测这种情况肯定存在, 因为体外培养AA患者骨髓基质细胞克隆数比正常明显减少; ②由于基质细胞质的异常, 即基质细胞的SCF基因转录和/或翻译缺陷。研究发现AA患者的SCF mRNA不缺乏, 体外培养AA患者基质细胞也发现其上清液中的SCF水平正常[3], 因此认为可溶性SCF减少是由于基质细胞数量减少所致。

作者简介: 宫立众(1966—), 男, 河北省巨鹿县人, 博士, 主治医师, 讲师, 主要从事血液内科临床及外周血干细胞移植的实验研究, 发表论文10余篇。电话: (023)68755395

收稿日期: 2000-04-13; 修回日期: 2000-09-29

(下转704页)

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

子及某些协同刺激分子(如 B_7)的表达,从而抑制巨噬细胞的抗原提呈功能[2]。严重烫伤后巨噬细胞 IL-10 mRNA 表达水平呈下降趋势,至 12 h 已显著降低,而 TNF-α 的水平呈上升趋势,至 12 h 达到高峰。表明严重烫伤后 12 h 内,致炎因子 TNF-α 与抗炎因子 IL-10 严重失衡。在伤后 24 h 及 48 h 时,随着 IL-10 mRNA 的回升,逐步发挥其抑制巨噬细胞生成 TNF-α 的效应,致使 TNF-α 的蛋白质及 mRNA 水平均呈下降趋势(另文待发表)。因此,烧伤后早期 TNF-α 的过量分泌与 IL-10 的严重失衡可能为全身炎症反应综合征及多器官功能衰竭的发生机制之一,故早期运用免疫调理剂具有重要意义。

3.2 烫伤后巨噬细胞内 AP-1 活性的变化及 PD98059 的调控

活化蛋白-1(AP-1)由 Fos/Jun 异源二聚体或 Jun/Jun 同源二聚体构成,c-Jun/c-Fos 组成的 AP-1 为最常见形式,介导细胞的增殖、分化及炎性细胞因子表达。该转录因子属于丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)的亚型——$ERK_{1/2}$、JNK、P38 的共同作用的底物之一。ERK 通路(途径)为细胞外信号转导至核内的重要通路之一。标准的传导模式为 Ras 或 PKC→Raf-1→$MEK_{1/2}$→$ERK_{1/2}$→底物蛋白磷酸化[3]。其中 $ERK_{1/2}$ 可使 AP-1 的 C-Jun 的丝氨酸 Ser 63 Ser 73 位点磷酸化[3],因此,AP-1 为 ERK 通路中重要的转录因子之一。严重烫伤后,小鼠腹腔巨噬细胞内 AP-1 的活性与正常对照相比,于伤后 2 h 活化、6 h 活性达到高峰,以后逐步下降,48 h 已接近正常,表明伤后巨噬细胞内 MAPK 信号途径被激活。经 $MEK_{1/2}$ 特异性抑制剂 PD98059 作用后,AP-1 的活性受到显著抑制,这也间接证实了 AP-1 为 ERK 的作用底物之一(图像未提供)。

在人的 IL-10 启动子上无 κB 位点,而有 AP-1 的结合位点,故 NF-κB 不参与 IL-10 的调控,而 MAPK 通路可能参与 IL-10 的生成[4,8]。Foey 等[4]实验表明,在人的外周血单核细胞中,给予 p38 阻断剂 SB203580 可有效地抑制 IL-10、IL-1β、TNF-α 的生成,而用 PD98059 抑制 P42/44 MAPK 则稍稍减少 TNF-α、IL-1β 的表达,对 IL-10 无影响,故有理由认为,IL-10 由 P38 MAPK 所介导,ERK 途经不参与。另有人用 MEK 阻断剂 Ro092210 等方法发现,IL-10 mRNA 由 JNK 或/和 P38 所调控,而给予 PD98059 后,IL-10 mRNA 无变化[8]。我们的实验结果 3 次均显示,PD98059 组的 IL-10 mRNA 的表达与单纯烫伤组相比无明显变化,故 ERK 通路可能不参与烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 IL-10 mRNA 的表达。因此,我们可以推论,P38、JNK 信号通路可能参与了 IL-10 mRNA 的调控。

参考文献:

[1] 陈仕林,张贞乾,王俊义. 创伤后机体吞噬细胞的功能变化[J]. 国外医学:创伤与外科基本问题分册,1994,15(2):143-147.

[2] Gerard C, Bruyns C, Marchant A, *et al*. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endoto-xemia[J]. J Exp Med, 1993, 177(2): 547-550.

[3] Seger R, Krebs E G. The MAPK signaling cascade[J]. FASEB J, 1995, 9(9): 726-735.

[4] Foey A D, Parry S L, Williams L M, *et al*. Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-α: role of the P38 and P42/44 mitogen-activated protein kinases[J]. J Immunol, 1998, 160(2): 920-928.

[5] Autenrieth I B, Bucheler N, Bohn E, *et al*. Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2 deficient mice with bowel inflammation[J]. Gut, 1997, 41(6): 793-800.

[6] Andrews N C, Fallor D V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(9): 2 499.

[7] 王 勇,黄文华. 一种改进的核转录因子的电泳迁移率改变分析法[J]. 第三军医大学学报,2001,23(1):119-120.

[8] Bruggen T V, Nijenhuis S, Ruaij E V, *et al*. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the Raf-1/MEK1-MEK1/ERK1-ERK2 pathway[J]. Infect Immun, 1999, 67(8): 3 824-3 829.

(编辑 陈聪连)

(上接 701 页)

CAA 缓解或基本治愈患者,SCF 明显升高,基本达到正常水平,说明基质细胞或造血微环境的改善早于造血恢复,造血微环境的恢复,为造血干/祖细胞准备了合适的"土壤",而此时仍有造血缺陷,则提示可能有造血干细胞质的异常[4]。

检测 AA 患者 SCF 水平的临床意义:初诊或治疗无效的 CAA 患者 SCF 水平显著下降,似乎提示对 AA 诊断有一定协助作用,但我们所观察的 CAA 患者 SCF 变化范围较大,有相当一部分与正常对照组值重叠,所以,SCF 用于诊断 AA 灵敏度较差,且 MDS 患者亦可见血清 SCF 水平较低,故 SCF 对 AA 诊断的特异性也不高,所以,SCF 不宜作为 AA 的诊断性指标。CAA 的 SCF 似乎可以对病情转归、预后判断起一定作用,缓解或基本治愈的 SCF 已有明显升高,也有人发现,较高的 SCF 水平,病人则有较好的临床状况:生存期长、造血恢复快、输血依赖不超过 1 个月。

SCF 水平高低与采用免疫抑制剂治疗效果无明显相关[3],我们所观察的 60 例 CAA 患者,不能发现 SCF 水平与治疗效果的关系,因为大都采用常规方案治疗,且一部分病人没有长期随访。SCF 能否用于 AA 患者的治疗,何时应用能起到治疗作用,仍有待临床试验。

关键词:再生障碍性贫血;干细胞因子
中图法分类号:R556.504 文献标识码:B

参考文献:

[1] 张之南 主编. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,1998. 33-39.

[2] Wodnar-Filipowicz A, Yancik S, Moser Y, *et al*. Levels of soluble stem cell factor in serum of patients with aplastic anemia[J]. Blood, 1993, 81(12): 3 259-3 264.

[3] Kojima S, Matsuyama T, Kodera Y. Plasma levels and production of soluble stem cell factor by marrow stromal cells in patients with aplastic anaemia[J]. Br J Haematol, 1997, 99(2): 440-446.

[4] Novitzky N, Jacobs P. In aplastic anemia progenitor cells have a reduced sensitivity to the effects of growth factors[J]. Eur J Haematol, 1999, 63(3): 141-148.

(编辑 王 红)

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