

无偿献血对骨髓造血干细胞的影响

陶黎阳 胡丙杰 周豪杰 聂咏梅 付涌水 江朝富

摘要 目的: Southern 印迹杂交测定外周血白细胞端粒 DNA 长度, 观察无偿献血对骨髓造血干细胞的影响。方法: 收集 35~40 岁有 15 次左右献血史者的血样, 同年龄组无献血史者的血样与之对照, 酚/氯仿提取基因组 DNA, Southern 印迹杂交, 积分光密度扫描计算 TRF 值。结果: 无偿献血组 TRF 值平均为 11.76 Kb, 对照组平均为 11.81 Kb。经统计学分析 $P > 0.05$ 两组样本差异无显著性。结论: 通过对两组样本端粒长度的检测未发现长期的无偿献血会对献血者的骨髓造血干细胞产生负面影响。

关键词 供血者 端粒 无偿献血 Southern 印迹杂交

《中华人民共和国献血法》于 1998 年正式颁布实施, 其中规定 18~55 周岁健康公民每隔 6 个月可献血 1 次。但是目前并没有客观资料显示这样是否会对献血员的造血系统产生影响。端粒是脊椎动物染色体末端的重复 TTAGGG 序列和结合蛋白组成的复合体^[1,2], 其中的重复序列长度会随着细胞的有丝分裂次数而缩短, 与衰老和肿瘤的发生有着密切的关系^[3]。骨髓造血干细胞的转化次数可以通过外周血白细胞的端粒 DNA 长度反映出来。长期的固定无偿献血必然会刺激骨髓的造血细胞分裂增殖以补充损失的血液成分。本实验试图通过测定长期固定无偿献血者与无献血史者外周血白细胞端粒 DNA 长度来观察长期无偿献血是否会对献血者的造血系统产生影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 35~40 岁献血 15 次左右的献血者血样 30 例。选择年龄段与之相匹配的初次献血者的血样 30 例。所有献血者均达到国家献血法规定的健康标准, 血样均来自本血液中心。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 500 μ L EDTAK₂ 抗凝冻存全血, 常规饱和酚/氯仿抽提基因组 DNA。0.8% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 mg/mL EB) 5 V/cm 电泳 0.5 h, 紫外灯下观察抽提效果。紫外分光光度计 (Lambda 3B, PE) 测定 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值。

1.2.2 基因组 DNA 的酶切消化、电泳 1.5 μ g 基因组 DNA, Hinf I 和 Rsa I 各 15 U, 37℃ 水浴过夜。琼脂糖凝胶电泳, 并以高分子量标准 DNA 作为对照。

1.2.3 Southern 印迹杂交 电泳样品真空转移, 0.2 mol/L HCl 脱嘌呤 5~10 min, 0.5 mol/L NaOH、1.5 mol/L NaCl 变性 30 min, 0.5 mol/L Tris、3 mol/L NaCl (pH 7.5) 中和 20 min, 20×SSC (pH 7.0) 50 mbar 转移 1 h, 紫外交联 3 min。转印后的阳离子尼龙膜 (Roche) 经预杂交液 42℃ 孵育 1 h, 带有地高辛标记探

针 (Roche) 的杂交液 42℃ 水浴振荡过夜。2×、0.2× SSC 0.1% SDS 梯度洗膜 4 次, 阻滞剂 (Roche) 室温孵育 30 min, 显色剂 (Roche) 室温 5 min, X 线片曝光 20 min, 显影 2~5 min, 定影直到谱带清晰约 5 min。

1.2.4 图象分析 X 线片经积分光密度扫描, 按照公式 $\sum (OD_i) / \sum (OD_i / Li)^{[3]}$ 计算出端粒 DNA 平均长度 (TRF)。Li 为处于 i 处的 Marker 分子长度, OD_i 为处于 i 位的杂交谱带光密度值。

2 结果

实验所用 DNA 样品酶切后电泳紫外灯下均呈瀑布样分布, 酶切完全且各电泳条带亮度相当。X 线片曝光后实验组与对照组谱带清晰, 密度位置相等 (见图 1)。经公式计算得出实验组 TRF 值平均为 11.76 Kb, 对照组 TRF 值平均为 11.81 Kb。两组数据的均值差异无统计学意义 ($t = 1.051, P > 0.05$)。

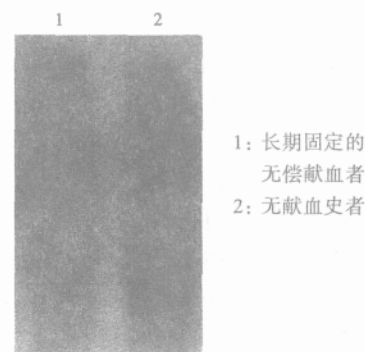


图 1 地高辛标记探针针对端粒 DNA 的 Southern 印迹杂交

3 讨论

端粒是维持染色体末端稳定性的一种帽状结构, 可以避免染色体末端之间的相互融合, 与真核细胞的衰老和永生有着极其密切的关系。在生长过程中体细胞不断分裂增殖, DNA 一次又一次地被复制, 由于末端复制问题每复制一次染色体末端必然会缩短 50~100 个碱基, 当短到一定程度时细胞就进入复制性衰老期 (replicative senescence), 这些衰老的细胞并不立即死亡而是在 p53 和 pRB 通路都失活的情况下继续分裂增生, 进入不稳定的危机期 (crisis), 这一期

作者单位: 510095 广州血液中心 (陶黎阳, 周豪杰, 聂咏梅, 付涌水, 江朝富); 510180 广州市卫生局科技教育处 (胡丙杰)

端粒将变得更短,如此短的端粒不足以维持染色体的稳定,于是细胞大批死亡,仅有极少数细胞会通过端粒酶的活化获得永生^[4]。献血会刺激造血干细胞分裂增殖以补充损失的血液成分,测量外周血白细胞的端粒 DNA 长度可以间接反映出骨髓造血干细胞的分裂增殖情况^[5],借此就可以观察长期的无偿献血是否会引起端粒的缩短,是否会对献血者的造血系统产生影响。

人类的造血系统每天约产生 2×10^{11} 个红细胞^[6],而一次献血约献出 $(0.8 \sim 1.6) \times 10^{12}$ 个红细胞。可见一次献血对骨髓造血干细胞仅能产生很微小的刺激,并不能导致大规模的分裂增殖。本实验也发现长期的固定无偿献血与无献血史者的端粒长度差异没有显著性,预示着长期的固定无偿献血对献血者的造血系统还不会产生负面的影响。但由于实验材料的限制本研究仅选取了有 15 次左右献血史且局限在某个特定年龄段的个体,对骨髓造血干细胞的影响是否会从更

多次的献血中表现出来还有待进一步的追踪研究。

4 参考文献

- 1 Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG) n present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(18): 6622 - 6626
- 2 Colgin L, Reddel R. Telomere biology: a new play in the end zone. *Curr Biol*, 2004, 14(20): R901 - R902
- 3 Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 1990, 345(31): 458 - 460
- 4 Kim SH, Kaminker P, Campisi J. Telomeres, aging and cancer: In search of a happy ending. *Oncogene*, 2002, 21(4): 503 - 511
- 5 Brummendorf TH, Rufer N, Holyoake TL, et al. Telomere length dynamics in normal individuals in patients with hematopoietic stem cell-associated disorders. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 938(1): 293 - 303
- 6 MacKey MC. Cell kinetic status of haematopoietic stem cells. *Cell Prolif*, 2001, 34(1): 71 - 83

(收稿 2005 - 05 - 23)

多发性硬化患者瞬目反射的检测及意义

罗 华 黄 惠 李小刚

摘 要 目的 探讨瞬目反射 (BR) 在确定多发性硬化 (MS) 脑干病灶中的作用及临床意义。方法 分析 60 例 MS 患者的临床资料及 BR 的检查结果。结果 BR 的异常率为 56.7%, 主要表现为 R_1 、 R_2 及 R_2' 潜伏期延长, BR 的异常和 MS 患者的病程及脑干病灶所在位置相关。35 例无脑干损伤征象的患者, BR 的异常率为 42.9%。结论 BR 检查是确定 MS 患者脑干病灶的较敏感的方法, 对揭示 MS 患者脑干的临床及亚临床病灶具有重要意义。

关键词 眨眼 多发性硬化

多发性硬化 (MS) 是原发于中枢神经系统的脱髓鞘疾病, 其特点为时间及空间上的多发。电生理学检查在确定 MS 病灶方面具有重要意义。瞬目反射 (BR) 是众多脑干反射中的一种, 它在揭示 MS 患者脑干病变方面有无意义, 目前国内报道尚少^[1], 故我们对 60 例 MS 患者进行 BR 检查, 以探讨 BR 在确定 MS 脑干病灶中的作用及临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象 MS 组 60 例, 男 32 例, 女 28 例, 年龄范围 20 ~ 47 岁, 平均 (36.2 ± 6.3) 岁, 其中临床怀疑有脑干损害的患者 25 例, 在这 25 例中眼震、复视或眼肌麻痹 8 例, 周围性面瘫 3 例, 面部痛觉减退 2 例, 眩晕 8 例, 构音障碍及吞咽困难 4 例, 此 25 例患者均行头颅 MRI 检查, 其余患者行 CT 或 MRI 检查, 所有病例均为 2002 年 1 月至 2004 年 12 月本院门诊及住院病人, 诊断符合 Poser 等^[2]提出的 MS 临床确诊或实验室检查支持确诊标准, 对照组: 泸州地区健康体检人员 54 例, 自愿参加试验, 男 28 例, 女 26 例, 年龄范

围 22 ~ 48 岁, 平均 (35.4 ± 6.5) 岁。

1.2 方法 采用丹麦丹迪 keypoint 型肌电诱发电位仪记录, 室温在 25℃ 左右, BR 检测: 受检者取坐位或仰卧位, 保持安静轻松状态, 眼微闭, 记录电极用表面电极置于眼轮匝肌下方, 参考电极置于眼角外侧 2 cm 处, 左右对称放置, 地极接于手腕, 刺激电极负极置于眶上切迹处, 正极在负极上方 2 cm, 采用时限为 0.2 ms 的方波脉冲电流刺激, 强度基本相同, 滤波带通 2 ~ 10 kHz, 分析时间 100 ms, 一侧刺激, 两侧同时记录, 需反复检查, 取最佳值。BR 的诊断标准以对照组为依据, 凡正常波形消失, 分化不良或各波潜伏期超过对照组平均值与 2.5 s 之和, 或波幅一侧低于健侧 1/2 均判断为异常。

1.3 统计学分析 全部数据由本教研室专人经 SPSS 10.0 for Windows 软件处理, 患者组与对照组的均数比较用 t 检验, 数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 率的比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 BR 检查 所有患者及健康对照均行 BR 检查, 测值见表 1。多发性硬化组 R_1 、 R_2 及 R_2' 测定值与对照

作者单位 646000 泸州医学院附属医院神经内科