

· 论 著 ·

51 例 APL 患者 PML/RAR $\alpha$  mRNA 转录本的检测及其意义\*韩兰秀<sup>1,2</sup>, 林江<sup>1</sup>, 周剑波<sup>2</sup>, 钱军<sup>1 $\Delta$</sup> , 徐昕<sup>2</sup>

(1. 江苏大学附属人民医院血液科, 江苏镇江 212002; 2. 东南大学附属江阴医院检验科, 江苏江阴 214400)

**摘要:**目的 建立实时定量聚合酶链反应(RQ-PCR)方法并检测初诊急性早幼粒细胞白血病(APL)患者甲幼粒细胞白血病/维甲酸受体(PML/RAR $\alpha$ )融合基因含量,评价检测结果的临床意义。方法 采用“欧洲抗癌计划”推荐的引物和探针建立RQ-PCR方法,检测51例初诊APL患者的PML/RAR $\alpha$ 融合基因含量,并分析其临床意义。结果 APL初诊患者的年龄与外周血白细胞(WBC)数呈负相关( $r=-0.376, P=0.014$ ),相关性主要见于长型和变异型患者( $r=-0.51, P=0.005$ )。51例APL初诊患者中,长型患者33例,变异型患者3例,长型和变异型36例。APL初诊患者PML/RAR $\alpha$ 转录本绝对含量为 $3.75 \times 10^2 \sim 6.20 \times 10^5$ 拷贝/50 ng(中位 $7.24 \times 10^3$ 拷贝/50 ng);相对含量为0.51%~676.87%(中位9.31%)。15例短型患者PML/RAR $\alpha$ 转录本绝对含量为 $2.26 \times 10^3 \sim 2.33 \times 10^6$ 拷贝/50 ng(中位 $1.17 \times 10^5$ 拷贝/50 ng);相对含量为12.04%~802.68%(中位95.26%)。短型患者外周血WBC数明显高于长型患者( $P=0.041$ ),其融合基因含量也明显高于长型患者( $P<0.01$ ),而在性别、年龄、外周血Hb、PLT,骨髓原粒及异常早幼粒细胞比例、血液学缓解时间和分子生物学缓解时间等方面比较差异无统计学意义。33例初诊患者血液学缓解时间、分子生物学缓解时间与患者的年龄、WBC数及融合基因含量无相关性。结论 RQ-PCR方法敏感、可靠,可以对APL初诊患者进行诊断和分型。

**关键词:**聚合酶链反应;白血病,早幼粒细胞,急性;受体,维甲酸

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.01.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)01-0001-03

Detection of PML/RAR $\alpha$  fusion gene transcript by real-time quantitative PCR\*Han Lanxiu<sup>1,2</sup>, Lin Jiang<sup>1</sup>, Zhou Jianbo<sup>2</sup>, Qian Jun<sup>1 $\Delta$</sup> , Xu Xin<sup>2</sup>

(1. Department of Hematology, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212002, China;

2. Department of Laboratory, Affiliated Jiangyin Hospital, College of Medicine, Southeast University, Jiangyin 214400, China)

**Abstract: Objective** To establish the real time quantitative PCR (RQ-PCR) assay and analyze its results in detection and quantification PML/RAR $\alpha$  fusion transcripts in newly diagnosed patients with acute promyelocytic leukemia (APL). **Methods** Three pairs of primer and TaqMan probe were designed according to 'Europe Against Cancer' (EAC) program for detecting the most frequent isoforms (Long-form, Short-form and Variant-form) of PML/RAR $\alpha$  transcripts. To evaluate the utility of this assay, bone marrow samples from 51 newly diagnosed APL patients were detected and the results were analyzed. **Results** There was significant negative correlation between initial WBC count and the age of APL patients ( $r=-0.376, P=0.014$ ), mainly seen in the patients with Long-form and the Variant-form ( $r=-0.51, P=0.005$ ). In 51 newly diagnosed APL patients, there were 33 cases with Long-form PML/RAR $\alpha$  transcripts, 3 with Variant-form PML/RAR $\alpha$  transcripts and 15 with Short-form PML/RAR $\alpha$  transcripts. In 36 cases with Long-form or Variant-form transcripts, the median absolute and normalized amount of PML/RAR $\alpha$  transcripts were  $3.75 \times 10^2 - 6.20 \times 10^5$  copies/50 ng (median  $7.24 \times 10^3$  copies/50 ng) and 0.51% - 676.87% (median 9.31%) respectively. In 15 cases with Short-form transcripts, the median absolute and normalized amount of PML/RAR $\alpha$  transcripts were  $2.26 \times 10^3 - 2.33 \times 10^6$  copies/50 ng (median  $1.17 \times 10^5$  copies/50 ng) and 12.04% - 802.68% (median 95.26%) respectively. The WBC count was higher in the Short-form group than in the Long-form group ( $P=0.041$ ). The normalized amount of Short-form PML/RAR $\alpha$  transcripts was significantly higher than that of Long-form ( $P<0.01$ ). However, there was no statistical difference in the sex, age, Hb, PLT, proportion of the blast and promyelocyte in the bone marrow, the time of achieving hematologic complete remission and molecular complete remission between the Long-form patients and the Short-form patients. Among 33 cases with follow-up data, neither of the time of achieving hematologic complete remission nor molecular complete remission was correlated with the age, initial WBC and the expression level of the PML/RAR $\alpha$  transcripts. **Conclusion** RQ-PCR for detecting the isoforms of PML/RAR $\alpha$  fusion transcripts is a sensitive, reliable quantitative assay and can be used in the diagnosis of APL.

**Key words:** polymerase chain reaction; leukemia, promyelocytic, acute; receptors, retinoic acid

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)约占所有急性髓系白血病(AML)患者的10%~15%<sup>[1]</sup>。该型白血病易并发弥漫性血管内凝血(DIC),预后较为凶险。90%以上的APL患者有t(15;17)(q22;q12-21),该易位使15

号染色体上的早幼粒细胞白血病(PML)基因与17号染色体上的维甲酸受体(RAR $\alpha$ )基因融合,形成甲幼粒细胞白血病/维甲酸受体(PML/RAR $\alpha$ )融合基因,编码PML/RAR $\alpha$ 融合蛋白,该蛋白具有不同于正常RAR $\alpha$ 等位基因编码的野生

\* 基金项目:江苏省医学重点人才基金资助项目(RC2007035);江苏省自然科学基金资助项目(BK2009206);镇江市社会发展基金资助项目(SH2008041)。  $\Delta$  通讯作者, Tel:13852912838; E-mail:qianjun0007@sina.com。

型 RAR $\alpha$  的功能,阻断了粒细胞的分化成熟,导致 APL 的发生<sup>[2-3]</sup>。既往检测 PML/RAR $\alpha$  融合基因的逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)无法定量,且需要扩增后产物处理。而实时定量聚合酶链反应(RQ-PCR)方法快速、特异、敏感度高、可定量,已经在临床上得到越来越广泛的应用。本文根据“欧洲抗癌计划”建立了 RQ-PCR 方法<sup>[4]</sup>,对 51 例 APL 初诊患者 PML/RAR $\alpha$  融合基因的表达类型及表达水平进行了检测,并探讨其临床意义。

## 1 材料与方 法

**1.1 病例选择和细胞系分型** 初诊 APL 患者 51 例,诊断按张之南和沈悌主编《血液病诊断及疗效标准》第 3 版<sup>[5]</sup>。经定性 RT-PCR 检测,33 例患者为长型 PML/RAR $\alpha$  阳性,15 例患者为短型 PML/RAR $\alpha$  阳性,3 例患者为变异型 PML/RAR $\alpha$  阳性。因变异型患者数量较少,将其并入长型患者中统计。阳性对照选用 NB4 细胞株,正常对照取自血常规正常的 20 例胸外科肿瘤患者的肋骨骨髓。

**1.2 细胞分离、RNA 提取及逆转录** 肝素抗凝的新鲜骨髓标本 2 mL,用 Ficoll 密度梯度离心法分离单个核细胞(MNC),应用 TRIzol 一步法提取总 RNA,经紫外分光光度仪定量。将 2.0  $\mu$ g 总 RNA 应用随机引物逆转录合成第一链 cDNA,反应体系为 40  $\mu$ L,含 MMLV 逆转录酶 200 U、dNTP(每种 0.5 mmol/L)、10 mmol/L DTT、25 U RNAsin,于 37  $^{\circ}$ C 逆转录 1 h、95  $^{\circ}$ C 5 min 灭活,cDNA 储存于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

**1.3 RT-PCR 检测** 按文献<sup>[4]</sup>合成 PML/RAR $\alpha$  RT-PCR 引物,序列分别为 5'-TCT TCC TGC CCA ACA GCA A-3'(长型上游引物)、5'-CCG ATG GCT TCG ACG AGT T-3'(短型上游引物)、5'-ACC TGG ATG GAC CGC CTA G-3'(变异型上游引物)和 5'-GCT TGT AGA TGC GGG GTA GAG-3'(共同下游引物),PCR 反应体系 25  $\mu$ L,含引物 0.2  $\mu$ mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L、dNTPs 0.2 mmol/L 和 Taq 酶 1.0 U(MBI 公司),反应条件均为 94  $^{\circ}$ C 30 s、58  $^{\circ}$ C 30 s、72  $^{\circ}$ C 1 min;扩增片段分别为 129、147、123 bp,同时应用 ABL 基因的 RT-PCR 引物扩增 ABL(118 bp),PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.4 阳性模板制备** 将 3 例不同类型 PML/RAR $\alpha$  转录本扩增产物纯化后连接到 PGEM-T 载体(美国 Promega 公司),再转入 DH5 $\alpha$  感受态中,利用蓝白斑筛选挑取白色阳性菌落克隆,测序正确后进行质粒小提、定量,最后从 10<sup>8</sup>/ $\mu$ L 开始进行 10 倍稀释建立阳性模板梯度,4  $^{\circ}$ C 条件下储存备用。

**1.5 实时定量 PCR 检测** 长型、短型、变异型 PML/RAR $\alpha$  转录本扩增引物序列同 RT-PCR,共同探针序列为 5'-FAM-AGT GCC CAG CCC TCC CTC GC-TAMRA-3'。为降低逆转录反应中应用的总 RNA 量和逆转录效率差异所引起的误差,看家基因 ABL 序列为 5'-TCC TCC AGC TGT TAT CTG GAA GA-3'(上游引物)、5'-TCC AAC GAG CGG CTT CAC-3'(下游引物)和 5'-FAM-CGG CCA GTA GCA TCT GAC TTT GAG CCT-TAMRA-3'(探针)。

PCR 反应为 25  $\mu$ L,含 10 $\times$  buffer 2.5  $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub> 4.0 mmol/L、dNTPs 0.2 mmol/L、引物 0.5  $\mu$ mmol/L、探针 0.2  $\mu$ mmol/L、Taq 酶 1.0 U、50 $\times$  ROX 0.5  $\mu$ L 和 cDNA 50 ng。反应在 7300 扩增仪(ABI 公司)上进行,反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94  $^{\circ}$ C 15 s、60  $^{\circ}$ C 1 min,共 45 个循环,应用 SDS1.3 软件进行数据分析。每次实验均设阳性对照、正常对照、空白对照(NTC)及标准曲线。PML/RAR $\alpha$  转录本的绝对

量表示为每 50 ng 总 RNA 中含有的拷贝数,相对量为  $N_{\text{PML/RAR}\alpha} = (\text{PML/RAR}\alpha \text{ 转录本的拷贝数} / \text{ABL 拷贝数}) \times 100\%$ 。

**1.6 统计学处理** 符合正态性分布和方差齐性的条件时,均数比较用两个独立样本的 *t* 检验。不满足正态性分布的条件,选择非参数统计两个独立样本比较的 Mann-Whitney 检验和相关样本比较的 Wilcoxon 秩和检验,多组比较选择 Kruskal-wallis H 检验。相关性分析选择 Spearman 秩相关。应用 SPSS10.0 统计软件进行分析处理。

## 2 结 果

**2.1 RQ-PCR 方法学分析及标本质量评价** 4 组标准曲线均包含标准品质粒 10<sup>8</sup>~10<sup>1</sup>,其斜率在 -3.31~-3.37 之间,说明 RQ-PCR 反应体系的扩增效率接近理想水平;相关系数均大于 0.998,证明循环域值与标准品质粒 DNA 的 Log 值呈线性相关(图 1、2)。对所建立的 RQ-PCR 敏感性和重复性进行了评价,揭示其最大敏感性可以达到 10 拷贝/ $\mu$ L,但是 10 拷贝/ $\mu$ L 重复性不好。10<sup>8</sup>~10<sup>2</sup> 拷贝/ $\mu$ L 重复性良好,其变异系数(CV)介于 0.01%~1.17% 之间。空白对照及 20 例正常对照均无扩增,说明了该方法的特异性。看家基因 ABL 含量低于 1.0 $\times$ 10<sup>3</sup> 拷贝/50 ng 则判断为 RNA 降解。

**2.2 初诊时 APL 患者的一般临床特征** 外周血白细胞计数与患者年龄呈负相关( $r = -0.376, P = 0.014$ ),相关性主要见于长型和变异型患者( $r = -0.51, P = 0.005$ )。长型和变异型阳性患者共 36 例,其中 18 例儿童(<18 岁)患者中外周血白细胞计数[中位 3.75 $\times$ 10<sup>9</sup>/L, (1.3~120.1) $\times$ 10<sup>9</sup>/L],明显高于 18 例成人( $\geq 18$  岁)患者[中位 1.65 $\times$ 10<sup>9</sup>/L, (1.0~150) $\times$ 10<sup>9</sup>/L]( $P = 0.015$ )。外周血白细胞计数与骨髓原始细胞及异常早幼粒细胞比例之和正相关( $r = 0.556, P < 0.001$ );白细胞增高者( $> 10 \times 10^9$ /L)骨髓中原始细胞及异常早幼粒细胞比例之和(中位 93.0%, 82.5%~97.5%)高于白细胞不高者( $< 10 \times 10^9$ /L)(中位 88.0%, 33.5%~98.5%)( $P < 0.001$ )。

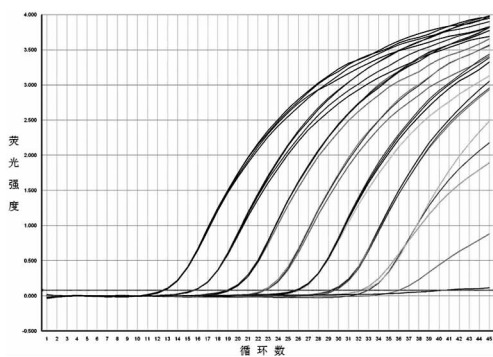
**2.3 51 例 APL 初诊患者 RQ-PCR 结果** 36 例长型和变异型 APL 初诊患者 PML/RAR $\alpha$  转录本绝对含量为 3.75 $\times$ 10<sup>2</sup>~6.20 $\times$ 10<sup>5</sup> 拷贝/50 ng(中位 7.24 $\times$ 10<sup>3</sup> 拷贝/50 ng);相对含量为 0.51%~676.87%(中位 9.31%)。15 例短型患者 PML/RAR $\alpha$  转录本绝对含量为 2.26 $\times$ 10<sup>3</sup>~2.33 $\times$ 10<sup>6</sup> 拷贝/50 ng(中位 1.17 $\times$ 10<sup>5</sup> 拷贝/50 ng);ABL 纠正后的相对含量为 12.04%~802.68%(中位 95.26%)。统计分析结果表明患者融合基因相对含量与患者的性别、年龄、外周血 WBC、Hb、PLT、骨髓原粒及异常早幼粒细胞比例之和、患者达到初次血液学缓解和分子生物学缓解的时间无明显相关性。

**2.4 长型/变异型患者与短型患者临床特征的比较** 两组 APL 初诊患者的外周血白细胞数比较差异有统计学意义,短型患者的外周血白细胞数高于长型/变异型患者( $P = 0.041$ )。两组患者 PML/RAR $\alpha$  转录本的相对定量比较差异有统计学意义,短型患者融合基因表达量高于长型/变异型患者( $P < 0.01$ ),而两组患者在性别、年龄、外周血 Hb、PLT、骨髓原粒及异常早幼粒细胞比例、血液学缓解时间和分子生物学缓解时间等方面比较差异无统计学意义。

**2.5 危险度分级** 作者对 51 例患者进行了危险度分级<sup>[6]</sup>,结果表明高危、中危及低危组患者的骨髓原粒及异常早幼粒细胞比例之和比较差异有统计学意义( $P = 0.031$ ),高危组患者骨髓原粒及异常早幼粒细胞比例之和高于中危组( $P = 0.027$ )和低危组( $P = 0.01$ ),而 3 组患者在性别、年龄、外周血 Hb、融合

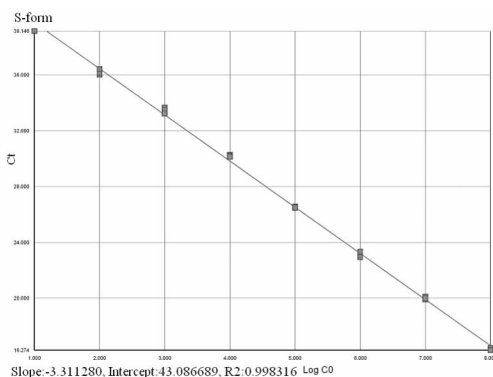
基因含量、血液学缓解时间和分子生物学缓解时间等方面比较差异无统计学意义。

**2.6 患者达到初次血液学完全缓解(HCR)时间和分子生物学完全缓解(MCR)时间的临床意义** 51 例患者中,2 例在初发时死亡,6 例放弃治疗,10 例患者失访,33 例患者达到了初次血液学和分子生物学的缓解。经统计学的 Spearman 秩相关分析,结果表明患者达到初次 HCR 和 MCR 的时间与患者的性别、年龄、外周血 WBC、Hb、PLT、骨髓原始粒细胞和异常早幼粒细胞所占比例及融合基因的表达水平无明显相关性。



横坐标为循环数,纵坐标为荧光强度。

图 1 长型标准品的扩增曲线



横坐标为对数浓度,纵坐标为各浓度时的 CT 值。

图 2 短型标准品的标准曲线

### 3 讨论

PML/RAR $\alpha$  融合基因在 17 号染色体的断裂位点在第 2 内含子,根据在 PML 基因上断裂位点的不同,又分为 3 种亚型,即长型(断裂位点在第 6 内含子)、变异型(断裂位点在第 6 外显子)、短型(断裂位点在第 3 内含子)。因此,PML/RAR $\alpha$  融合基因是 APL 的特异性分子生物学标记,在 APL 的诊断和微小残留病灶的监测中具有重要的临床意义<sup>[7-8]</sup>。作者拟根据 EAC 方法建立不同 PML/RAR $\alpha$  转录本检测的 RQ-PCR 法,并对 51 例初诊 M3 患者的标本进行了检测,以评价其在 APL 患者分子诊断和微小残留病灶(MRD)监测中的意义。

本组研究结果提示长型和变异型患者中儿童的外周血白细胞计数明显高于成人,这与其他文献报道相近<sup>[9-10]</sup>,但两组间的 PML/RAR $\alpha$  转录本水平无明显差异。通过比较长型/变异型和短型 APL 患者的临床特征,作者发现短型患者的外周血白细胞数较高,国内主鸿鹄等<sup>[11]</sup>的报道也证实了这一点。虽然作者的研究结果还证实短型 PML/RAR $\alpha$  阳性患者其融合基因转录本含量明显高于长型/变异型患者,这与秦亚漆等<sup>[12]</sup>、姚利等<sup>[13]</sup>报道一致,但主鸿鹄等<sup>[11]</sup>报道的结果揭示长型和短型患者之间并无差异;几个研究都认为不同

PML/RAR $\alpha$  转录本的表达水平与患者初诊时的临床参数之间并无相关性。作者对初诊患者进行了危险度分级,结果发现高危患者的骨髓原粒和异常早幼粒细胞所占比例之和高于中危和低危患者,这可能与高危患者的白细胞较高有关。

作者对患者达到初次血液学缓解、分子生物学缓解时间与患者的临床参数进行了相关性分析,没有发现有统计学意义的结果,可能与本研究病例数较少和患者的治疗依从性有关。虽然国际和国内对于 MRD 监测的时间并不完全统一,最近的研究建议 APL 患者每隔 2 个月检测一次 PML/RAR $\alpha$  转录本以更好地监测患者体内的 MRD<sup>[14]</sup>。近年来的染料法 RQ-PCR 技术能有效降低试剂成本,同时又有良好的特异性、灵敏性<sup>[15]</sup>。总之,本研究建立了敏感、可靠、特异的 RQ-PCR 方法,检测了 51 例初诊 APL 患者的 PML/RAR $\alpha$  融合基因,并统计分析了患者的临床特征及融合基因的临床意义,为以后监测患者 MRD 和评价治疗效果打下了基础。

### 参考文献:

- [1] Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net [J]. *Blood*, 2009, 113(9):1875-1877.
- [2] Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party, Groupe Francais de Cytogénétique Hématologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies" [J]. *Blood*, 2000, 96(8):1297-1299.
- [3] Kastner P, Lawrence HJ, Waltzinger C, et al. Positive and Negative Regulation of Granulopoiesis by Endogenous RAR $\alpha$  [J]. *Blood*, 2001, 97(5):1314-1316.
- [4] Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - A Europe Against Cancer Program [J]. *Leukemia*, 2003, 17(12):2318-2320.
- [5] 张之南,沈梯. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 3 版. 北京, 科学出版社, 2007:106-206.
- [6] Ribeiro RC, Eduardo Rego. Management of APL in Developing Countries; Epidemiology Challenge and Opportunities for International Collaboration [J]. *Hematology*, 2006, 16(2):237-239.
- [7] Ghaffari SH, Rostami S, Bashash D, et al. Real-time PCR analysis of PML-RAR alpha in newly diagnosed acute promyelocytic leukaemia patients treated with arsenic trioxide as a front-line therapy [J]. *Ann Oncol*, 2006, 17(10):1553-1554.
- [8] Santamaria C, Chillón MC, Fernández C, et al. Using quantification of the PML-RAR $\alpha$  transcript to stratify the risk of relapse in patient with acute promyelocytic leukemia [J]. *Haematologica*, 2007, 92(3):315-317.

CD25<sup>+</sup>T 细胞比例明显提高,而已有大量文献证明 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞是机体维持自身耐受的重要组成部分,提示口服 MHC 肽后,受体大鼠机体免疫系统已发生免疫应答。BN 大鼠-Lewis 大鼠为急性排斥模型,生存时间一般为 6~10 d 左右。术后从两组大鼠一般情况观察,实验组大鼠出现异常情况,如精神差、消瘦、食欲差等现象明显晚于对照组,说明异体移植肾脏发生排斥等不良反应晚于对照组,实验组术后生存时间明显延长,最长者生存天数长于对照组 18 d。病理切片进一步显示,移植术后未用药及口服 MHC 肽组移植排斥迅速,于术后第 5 天第 1 只移植大鼠死亡,移植肾病理切片显示肾小球上皮水肿,肾血管充血,大量炎性细胞浸润。而口服 MHC 肽组移植术后生存迹象平稳,于术后第 17 天才死亡第 1 只。体外混合淋巴细胞培养显示,相同供体细胞与两组大鼠刺激细胞单向混合培养,T 淋巴细胞增殖反应明显不同,而 d 组添加 MHC 肽 50 μg 后,进一步抑制了 T 淋巴细胞增殖。Magee 等<sup>[13]</sup>在动物体内试验中,证实 MHC 肽能上调血红素氧化酶(HO-1)的活性,且起调节作用与热休克蛋白有直接关系;易善红等<sup>[14]</sup>在体外试验中发现,MHC 肽具有较强的体外抑制人外周单核细胞 HO-1 活性的作用,且呈现出剂量依赖性,MHC 肽是通过影响细胞内血红素氧化酶-1 的活性,进而通过某种途径达到免疫抑制的结果。

#### 参考文献:

- [1] Marc R. Hammerman: Transplantation of renal precursor cells: a new therapeutic approach[J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 14(4): 513-517.
- [2] Edemir B, Kurian SM, Eisenacher M, et al. Activation of counter-regulatory mechanisms in a rat renal acute rejection model[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 71-78.
- [3] 张立显. 口服抗原与肠黏膜免疫[J]. *郧阳医学院学报*, 2005, 24(6): 372-374.
- [4] Osamu I, Yasuo Y, Eiji A, et al. Prolonged survival of rat hepatic allografts treated with a pretransplant donor-specific blood transfusion is associated with reduced cytokine induced neutrophil chemoattractant expression [J]. *Transplantation*, 1998, 29(3): 378-381.
- [5] Tanigawa T, Monden M, Gotoh M, et al. Pretreatment of recipients with mitomycin C treated spleen cells induces

significant prolongation of cardiac allograft survival in rats[J]. *Transplant Proc*, 1994, 26(23): 3359-3360.

- [6] Holler E, Roncarolo MG, Hintermeier-Knabe R, et al. Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 25(3): 237-241.
- [7] 杜晓刚, 甘华. 口服免疫耐受大鼠脾淋巴细胞对肾小球系膜细胞中 NF-κB p65 活性的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 20(6): 708-711.
- [8] Patriarca G, Nucera E, Roncallo C, et al. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003, 17(3): 459-465.
- [9] Giral M, Cuturi MC, Nguyen JM, et al. Decreased cytotoxic activity of natural killer cells in kidney allograft recipients treated with human HLA-derived peptide[J]. *Transplantation*, 1997, 63(7): 1004-1011.
- [10] Sun JB, Eriksson K, Li BL, et al. Vaccination with dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen conjugated to cholera toxin efficiently induces specific tumoricidal CD8<sup>+</sup> cytotoxic lymphocytes dependent on cyclic AMP activation of dendritic cells [J]. *Clinical Immunology*, 2004, 12(1): 35-44.
- [11] Annie GC, Eriksson K, Lebens M, et al. Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells[J]. *Infection and immunity*, 2001 (69): 5716-5725.
- [12] Rappuoli R, Pizza M, Douce G, et al. Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and Escherichia coli heat-labile enterotoxins[J]. *Immunol Today*, 1999, 20(4): 493-500.
- [13] Magee CC, Azuma H, Knoflach A, et al. In Vitro and in vivo immunomodulatory effects of RDP1258, a novel synthetic peptide[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 34(10): 1997-2005.
- [14] 易善红, 宋波, 汪泽厚. RDP1258 对人外周单核细胞增殖能力及 HO-1 活性的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(3): 230-333.

(收稿日期: 2011-07-09 修回日期: 2011-08-22)

(上接第 3 页)

- [9] Creutzig U, Ritter J, Zimmermann M, et al. Improved treatment results in high-risk pediatric acute myeloid leukemia patients after intensification with high-dose cytarabine and mitoxantrone; results of Study Acute Myeloid Leukemia-Berlin-Frankfurt-Münster 93[J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(10): 2705-2707.
- [10] de Botton S, Coiteux V, Chevret S, et al. Outcome of childhood acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and chemotherapy[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(8): 1404-1406.
- [11] 主鸿鹄, 刘艳荣, 秦亚濂, 等. 实时定量 PCR 检测 46 例初诊急性早幼粒细胞白血病难患者 PML/RAR $\alpha$  mRNA 的分子表达[J]. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15(1): 1-4.
- [12] 秦亚濂, 李金兰, 主鸿鹄, 等. 实时定量 RT-PCR 技术测定

初治白血病患者常见融合基因转录子水平及其标准化的探讨[J]. *中华血液学杂志*, 2007, 28(4): 433-435.

- [13] 姚利, 陈子兴, 岑建农, 等. 应用实时定量逆转录聚合酶链反应方法检测急性早幼粒细胞白血病患者 PML/RAR $\alpha$  基因转录本的临床意义[J]. *中华血液学杂志*, 2006, 27(7): 773-775.
- [14] Ommen HB, Schnittger S, Jovanovic JV, et al. Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CBF $\beta$ -MYH11 acute myeloid leukemias[J]. *Blood*, 2010, 115(2): 198-200.
- [15] 朱照辉, 林江, 钱军, 等. 实时定量甲基化特异性 PCR 检测 PRAME 基因启动子低甲基化 30 例及其临床意义[J]. *重庆医学*, 2010, 39(23): 3165-3168.

(收稿日期: 2011-06-07 修回日期: 2011-08-15)