DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.022

果,这可能与糖尿病患者免疫力低下有关,因此对预防糖尿病患者并发肺结核不仅只根据PPD试验结果而定,应把糖尿病患者列为结核病的高危人群和作为预防结核病的主要对象。研究表明糖尿病患者免疫功能低下,使用 *M. vaccae* vaccine 疗程结束3个月后,CD3和CD4较治疗前有显著升高,CD8显著下降,各项指标与对照组比较具有显著性差异;对PPD皮试阴性病例使用 *M. vaccae* vaccine 治疗后,转阳率比对照组显著性提高,其结果可能是由于 *M. vaccae* vaccine 的免疫增强作用。通过对两组近2年随访观察,M组无1例发生肺结核,而C组有2例发生,患病率为5.26%。表明 *M. vaccae* vaccine 有显著改善或增强糖尿病患者的细胞免疫功能,对预防肺结核的发生有较好的作用。同时我们还观察到 *M. vaccae* vaccine 对糖尿病患者的血糖控制等指标无不良影响,使用安全。但由于本研究观察的时间仅有2年,该菌苗改善糖尿病患者的免疫功能能维持多长时间,长期预防效果如何,在疗程结束是否需要以后每1~2年继续使用 *M. vaccae* vaccine 给予增强或巩固等问题,还需作进一步研究。

参考文献:

[1] 陈 虹,罗永艾.母牛分枝杆菌菌苗对糖尿病结核大鼠NO的影响[J].医药导报,2002,21(3):136-137.
[2] 陈 虹,罗永艾,黄习臣,等.母牛分枝杆菌菌苗预防糖尿病并发肺结核的实验研究[J].中华结核和呼吸杂志,2002,25(1):21-24.
[3] 石晓建,李军华,刘 群,等.糖尿病合并肺结核患者肺泡巨噬细胞人类组织相容性类抗原信使核糖核酸的表达[J].临床荟萃,2004,19(4):193-195.
[4] Gambelunghe G, Ghaderi M, Tortoioli C, *et al*. Two distinct MICA gene markers d discriminate major autoimmune diabetes types[J]. Clin Endocrinol Metab, 2001, 8(6): 3754-3760.
[5] Zeidler A, Raffel L J, Costin G, *et al*. Autoantibodies and human leucocyte antigen class II in first-degreefamily members of Mexican-American type I diabetic Patients[J]. Clin Endocrinol Metab, 2001, 8(6): 4957-4962.

(编辑 栾 嘉)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2004)16-1478-02

携带反义热休克蛋白70的重组腺病毒载体的构建

Construction of human antisense heat shock protein 70 recombinant adenovirus

王晓侠[1],李胜利[2],姚小宝[3],嵇宪生[1],朱宏亮[3],樊代明[4] ([1]中国人民解放军第451医院耳鼻咽喉科,西安 710054;[2]西安交通大学第二医院耳鼻咽喉科,西安 710004;[3]西安交通大学第一医院耳鼻咽喉科,西安 710061;[4]第四军医大学西京医院消化病研究所,西安 710032)

反义核苷酸是近几年肿瘤基因治疗的新热点。已有许多报道证实,恶性肿瘤常常高表达热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70),并且在体内外许多不利于肿瘤生长的环境中,具有保护肿瘤细胞的作用,严重影响抗肿瘤治疗的效果[1]。肿瘤细胞HSP70表达增高,并使其获得抗拒凋亡的能力;若减少细胞内HSP70的表达可使多种恶性肿瘤不能维持其正常代谢,发生生长抑制及死亡[2]。因而本研究采用新的,简便易行的重组腺病毒AdEasy系统[3]构建反义HSP70的重组腺病毒,为进一步开展喉癌基因治疗研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒pAdTrack-CMV、pAdEasy-1、菌株Bj5183由第四军医大学西京医院消化病研究所提供。质粒PcDNA 3.1-ASHSP70由本人构建保存于西安交通大学第二医院耳鼻咽喉科。

作者简介:王晓侠(1975-),女,河北省易县人,硕士,医师,主要从事喉癌的基因治疗方面的研究,发表论文6篇。电话:(029)2257076

收稿日期:2003-03-10;修回日期:2003-08-15

1.2 方法

1.2.1 反义热休克蛋白70的重组腺病毒的重组穿梭质粒的构建 *Hind* Ⅲ和 *Eco* Ⅴ双酶切PcDNA 3.1-ASHSP70回收HSP70的cDNA与 *Hind* Ⅲ和 *Eco* Ⅴ双酶切的穿梭质粒PTrack-CMV按摩尔比2∶1混合,连接转化后抽提质粒。获得重组质粒pTrack-CMV-HSP70;经双酶切鉴定后,将反向插入的重组质粒命名为pTrack-CMV-ASHSP70。

1.2.2 细菌内的同源重组产生重组腺病毒质粒 提取10 μl pTtrack-CMV和pTrack-CMV-HSP,质粒用 *Pme* Ⅰ限制性内切酶线性化,乙醇沉淀后分别与1 μl超螺旋质粒pAdEasy-1在2 500 V,200 Ω,25 μF条件下,电穿孔共转化20 μl Bj5183感受态细菌,50 μg/ml卡那霉素培养基平板筛选,37 ℃孵育16~20 h后挑5个克隆,抽提质粒电泳鉴定,将重组子转化至DH5α菌,提取质粒。进一步进行酶切鉴定。

1.2.3 哺乳动物细胞中产生腺病毒 待293细胞长至丰度80%时将10 μl *Pac* Ⅰ酶切后的重组腺病毒质粒按Lipofectamine说明书加到90 μl无血清DMEM,4 h后加含10% FBS培养液800 μl/孔。7~10 d后,收集细胞反复冻融3次,收上清,为第1代病毒。

(下转1481页)

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

同时在 AEP 组与对照组, 诱导期与麻醉维持期病人的血流动力学变化并无显著性差异。说明 AEP-index 可为异丙酚 TCI 麻醉的镇静、镇痛与神经反射抑制程度提供较为明确的量化指标, 用其监测异丙酚麻醉时的麻醉深度具有一定价值。本研究还表明在病人心率增快、血压上升或出现体动反应前几秒, AEP-index 值即升高, 说明 AEP-index 能够更敏感地预测麻醉的减浅, 预防术中知晓。另外还提示对照组 AEP-index 值偏小, 异丙酚的用量也明显高于 AEP 指导组, 说明 AEP-index 通过为麻醉深度监测提供量化指标, 可明显减少麻药的用量, 避免了通过盲目加深麻醉来弥补镇痛与肌松不足的倾向。我们还发现, 虽然异丙酚 TCI 麻醉时 AEP-index 随着累积剂量的增加进行性地降低, 但有时可有短暂的不明原因的瞬间突然升高, 甚至大于 40(发生率 30%~40%), 但术后随访并无术中觉醒与术后追忆。这种现象是说明麻醉深度不够或波动或监测方式有缺陷, 尚需今后进一步研究。

本研究结果显示, AEP-index 作为麻醉深度监测的一项新指标能够有效评价异丙酚 TCI 麻醉时病人的麻醉深度, 有助于指导麻醉用药、调控麻醉深度、避免术中知晓、减少并发症, 但对于 AEP-index 在不同年龄和不同麻醉方式中的变化规律需进一步研究。此外, 仪器抗干扰能力欠佳, 无法在使用电刀时测量 AEP-index, 也限制了它的临床应用。

参考文献:

[1] Doi M, Gajraj R T, Mantzaridis H, *et al*. Prediction of movement at laryngeal mask airway insertion: comparison of auditory evoked potential index, bispectral index, spectral edge frequency and median frequency[J]. Br J Anaesth, 1999, 82(2): 203—207.

[2] Stanski D R. Monitoring depth of anesthesia[A]. In: Lucy Evertt M D, Steward D J, Lerman J. Anesthesia[M]. 5th ed. New York: Churchill Livingstong, 2001. 1087—1116.

[3] Katoh T, Bito H, Sato S. Influence of age on hypnotic requirement, bispectral index, and 95% spectral edge frequency associated with sedation induced by sevoflurane[J]. Anesthesiology, 2000, 92(1): 55—61.

[4] Kaga K, Hink R F, Shinoda Y, *et al*. Evidence for a primary cortical origin of a middle latency auditory evoked potential in cats[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1980, 53(3-4): 254—266.

[5] Mantzaridis H, Kenny G N. Auditory evoked potential index: a quantitative measure of changes in auditory evoked potentials during general anaesthesia [J]. Anaesthesia, 1997, 52(11): 1030—1036.

[6] Gajraj R T, Doi M, Mantzaridis H, *et al*. Comparison of bispectral EEG analysis and auditory evoked potentials for monitoring depth of anaesthesia during propofol anaesthesia[J]. Br J Anaesth, 1999, 82(5): 672—678.

(编辑　薛国文)

(上接 1478 页)

2　结果

2.1　反义 HSP70 的重组腺病毒的重组穿梭质粒的鉴定

用 *Hind* Ⅲ和 *Eco* Ⅴ 双酶切重组质粒 pTrack-CMV-ASHSP70, 0.75%琼脂糖凝胶电泳可见释放 2.5 kb 的片段, 与目的片段大小一致。

2.2　细菌中重组腺病毒质粒的产生和鉴定

Pme Ⅰ 线性化 pTrack-CMV 和 pTrack-CMV-HSP70 后和 pAdEasy-1 共转化 Bj5183 感受态细菌, 在该受体菌中二者的同源序列之间同源重组, 重组后的质粒由原来的氨苄西林抗性(pAdEasy-1)变为卡那霉素抗性, 因此只有重组体 pAdEasyGFP-ASHSP70 或 pTrack-CMV 和 pTrack-CMV-HSP70 才具有卡那霉素抗性。抽提质粒 0.75%琼脂糖电泳根据大小鉴定出重组体。用酶切的方法进一步鉴定用 *Pac* Ⅰ 酶切重组体可释放一个 4.5 kb 的片段。

2.3　感染人喉癌细胞 Hep-2 观察 GFP 的表达

用滤过的重组腺病毒以 MOI 为 1∶10 感染 Hep-2 细胞, 3 d 后荧光显微镜下几乎全部细胞均有 GFP 表达。

3　讨论

反义基因治疗是指应用反义核酸在转录或翻译水平阻断某些异常基因的表达, 使肿瘤细胞进入正常分化轨道或导致瘤细胞凋亡。复制缺陷型腺病毒是目前基因治疗最常用载体之一, 具有安全性高, 感染细胞范围广, 滴度高, 且感染可在细胞周期任何时段的优点, 因此被广泛应用于遗传病和肿瘤的基因治疗中, 但它仍存在许多不足, 重组过程复杂是其中之一。由于哺乳动物细胞内同源重组的效率低, 需要多次空斑纯化, 故重组病毒产生的周期较长而限制了腺病毒载体的广泛应用。本系统应用细菌中高效的同源重组机制代替哺乳动物细胞, 用含抗菌素的平板筛选重组子而大大简化了筛选过程, 同时利用在同源重组时由穿梭质粒 pTrack-CMV 整合入腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的 GFP 可以直接观察转染与感染的效率, 解决了传统方法在空斑或细胞病变出现前, 不能早期要了解和证实腺病毒产生的难题, 使腺病毒的重组、筛选和纯化更方便、快捷。整个过程可在 3 周内完成, 速度大大加快。

HSP70 在许多癌组织中高表达, 并与许多癌症的预后有关。本研究应用美国 FDA 批准使用 E1 缺陷的重组腺病毒, 为进一步探索反义 HSP70 在肿瘤区基因转染后抑制肿瘤细胞生长作用研究打下了坚实的基础。

关键词: 反义热体克蛋白 70; 重组; 腺病毒
中图法分类号: R394-33　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Lazaris A C, Theodoropoulos G E, Davdari P S, *et al*. Heat shock protein 70 and HLA-DR molecules tissue expression prognostic implication in colorectal cancer[J]. Dis Colon Rectum, 1995, 38(7): 739—745.

[2] Huot J, Roy G, Lambert H, *et al*. Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27 000 heat shock protein[J]. Cancer Res, 1991, 51(19): 5245—5252.

[3] He T C, Zhou S, daCosta L T, *et al*. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2509—2514.

(编辑　陈聪连)

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