DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.002


论著

文章编号:1000-5404(2004)08-0658-05

# 人A20基因ORF的克隆

吴丽娟[1],蒋建新[1],朱佩芳[1],康格非[2],王正国[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400042;[2] 重庆医科大学医学检验系,重庆 400046)

提 要:目的 克隆人A20 ORF,为人A20的体外合成、抗体制备奠定基础。方法 从LPS诱导的人外周血白细胞炎症模型中提取总RNA,用特异性引物介导的逆转录反应合成cDNA第一链,经巢式梯度RT-PCR的两次扩增,最终得到2 361 bp长的人A20 ORF并插入pCR$^R$4-TOPO$^R$载体测序验证。结果 采用巢式梯度RT-PCR我们成功收获了人A20 ORF,测序结果与GenBank公布结果完全一致。结论 采用巢式梯度RT-PCR克隆人A20 ORF,在技术路线上可以为某些难克隆基因提供参考。

关键词:锌指蛋白;A20,RT-PCR;生物信息学
中图法分类号:Q522;Q785 文献标识码:A

# Cloning of human A20 ORF

WU Li-juan[1], JIANG Jian-xin[1], ZHU Pei-fang[1], KANG Ge-fei[2], WANG Zheng-guo[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; [2]Department of Medical Laboratory, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400046, China)

**Abstract**: Objective To clone human A20 opening reading frame (hA20 ORF) for providing foundation for researches of *in vitro* synthesis of hA20 and preparation of its antibodies. Methods Total RNA was isolated from inflammation model of human peripheral white blood cells induced by LPS. The first-strand cDNA was synthesized by specific primer mediated reverse transcription reaction. An hA20 ORF of 2 361 bp was cloned by amplification of gradient nested RT-PCR for two times. Then the cloned hA20 ORF gene was inserted into pCR$^R$4-TOPO$^R$ vector for sequencing verification. Results hA20 ORF was obtained by gradient nested RT-PCR. The sequence of the cloned hA20 ORF was identical to that published in GenBank. Conclusion The strategy of cloning hA20 ORF by gradient nested RT-PCR may provide technical references for some genes hard to be cloned.

**Key words**: zinc finger protein; A20; RT-PCR; bioinformatics

人A20(human A20, hA20)最初由Dixit等[1]在人内皮细胞中作为肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和白介素-1(IL-1)刺激的应答产物被发现。后来的研究表明在hA20启动子内有2个κB基序[2]。多种炎症刺激因素如细菌内毒素、外毒素、EB病毒、促炎细胞因子(TNF-α、IL-1)等都能诱导体内多种细胞表达hA20。hA20表达又对TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8、细胞间粘附分子等多种促炎因子的过度释放以及细胞凋亡和坏死有明显的抑制作用[3,4]。hA20基因全长4 426 bp,编码的hA20蛋白分子量$90\times10^3$,其氨末端半区能够特异性地与TNF受体相关因子2(TNF receptor-associated factor 2, TRAF2)和TRAF6结合,参与凋亡抑制[5],羧末端半区利用其7个Cys2/Cys2型锌指结构(zinc finger, zf)抑制NF-κB和AP-1活性[5,6]。Lee等[7]的研究发现,A20缺陷小鼠将发生严重的炎症反应和恶病质,对LPS和TNF的敏感性异常增高,未等发育成熟即死亡。A20缺陷细胞无法终止TNF诱导的NF-κB应答,较对照细胞易发生细胞程序化死亡。Arvelo等[8]向A20缺陷BALB/c鼠和A20正常BALB/c对照鼠静脉注射氨基半乳糖(D-galactosamine, D-gal)和LPS,发现前炎症刺激因子可以诱导肝细胞表达A20,后者通过抑制NF-κB

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054203),第三军医大学创伤烧伤复合伤国家重点实验室开放基金资助项目(2003)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (G1999054203)

作者简介:吴丽娟(1965-),女,四川省成都市人,博士研究生,副主任医师,副教授,主要从事临床分子生物学及临床免疫学方面的研究,发表论文30余篇,现为重庆医科大学2001级博士生。电话:(023)68757272,E-mail:wulijuan1638@sina.com.cn

收稿日期:2003-12-03;修回日期:2004-03-12

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

活性将炎症反应限制在一定程度内, 并且能够保护肝细胞免于发生大面积凋亡。因此, 人们推测 A20 在预防体内炎症反应失控以及机体炎症的内源性细胞保护中发挥着重要作用。为了开展 hA20 研究, 收获 hA20 蛋白和制备 hA20 多抗、单抗, 我们首先克隆了 hA20 ORF, 通过生物信息学分析初步推测 hA20 的一些理化特性, 为 hA20 表达研究提供了有益的信息。

## 1　材料与方法

### 1.1　主要材料与试剂

健康人静脉血来源于自愿献血者; SuperScript Ⅱ RT、Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity、dNTPs、pCR$^R$4-TOPO$^R$ 克隆载体购于 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 JM109 为本室保存菌种; *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ、*Sac*Ⅰ、*Bgl*Ⅱ、*Sna*BⅠ、小牛肠碱性磷酸酶(CIAP)、DNA 分子量标准品、RNA 提取试剂盒购于 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、低熔点琼脂糖、DEPC、SDS、氨卞青霉素(AP)等购于 Promega 公司; PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶中 DNA 回收试剂盒购于 Omega 公司; 白细胞分离液为为天津 TBD 生物技术发展中心产品。引物合成、基因测序由上海申能博彩公司完成。

### 1.2　方法

1.2.1　血样处理　　从 20 ml 健康人静脉血(EDTA·$Na_2$ 抗凝)中分离白细胞(方法参见文献[9]), 经生理盐水洗涤后, 悬浮于 1.0 ml 含 5% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中, 加入终浓度为 100 ng/ml 的 LPS, 37 ℃ 5% $CO_2$ 培养 1 h。

1.2.2　总 RNA 的提取及甲醛变性凝胶电泳　　参见文献[10]。

1.2.3　巢式梯度 RT-PCR 克隆 hA20 ORF　　cDNA 第一链的合成: 向 20 μl 的反应体系, 依次加入总 RNA 10 μl, 10 mmol/L dNTPs 1.0 μl, 50 μmol/L 特异性引物 A (5′-gag gtg ttg gag agc aca atg gc-3′, 23 bp) 0.01 μl, $H_2O$ 0.99 μl, 混匀, 65 ℃ 5 min, 立即冰浴冷却。继续加入 5× First-Strand Buffer 4.0 μl, 0.1 mol/L DTT 2 μl, 40 U/μl RNaseOUT™ 1.0 μl, 轻轻混匀, 42 ℃ 2 min。加入 200 U/μl SuperScript™ Ⅱ 1.0 μl, 轻轻混匀, 42 ℃ 50 min。70 ℃ 15 min 灭活 SuperScript™ Ⅱ。加入 5× Hybrid RNA Degeneration Buffer 12 μl, 2 U/μl 的 *E. coli* RNaseH 0.8 μl, $H_2O$ 27.2 μl, 混匀 30 ℃ 1 h。乙醇沉淀法浓缩 cDNA。

第一轮梯度 PCR 扩增: 向 100 μl 的反应体系, 依次加入 Platinum$^R$ *Taq* High Fidelity 0.4 μl, 10× High Fidelity PCR Buffer 10 μl, 10 mmol/L dNTP mixture 2 μl, 50 mmol/L $MgSO_4$ 4 μl, 50 μmol/L 特异性 A 和引物 B(5′-gaa cct tgg gct gaa tct gac at-3′, 23 bp)各 0.2 μl, cDNA 第一链模板 4.0 μl, $H_2O$ 79.6 μl, 混匀后平分成 4 只, 各加 1 滴石蜡油。首先 94 ℃ 5 min, 再进入 94 ℃ 45 s→52 ℃/55 ℃/58 ℃/61 ℃ 45 s→68 ℃ 5min 的 30 次热循环, 最后 72 ℃ 10 min。取 PCR 产物 5 μl, 加入 1 μl 5 mg/ml 的 EB, 混匀后行 0.8% 琼脂糖凝胶。电压 80 V, 时间 40 min, 凝胶扫描仪扫描结果。剩余 PCR 产物低熔点琼脂糖凝胶电泳回收目标产物片段。

鉴定 PCR: 向 50 μl 的反应体系, 依次加入 Platinum$^R$ *Taq* High Fidelity 0.4 μl, 10× High Fidelity PCR Buffer 5 μl, 10 mmol/L dNTP mixture 1 μl, 50 mmol/L $MgSO_4$ 2 μl, 第 1 次 PCR 产物回收物 2.0 μl, $H_2O$ 38.6 μl, 10 μmol/L 的特异性引物 C(5′-ttccygtcac-cagcgttcc-3′)和引物 D(5′-ccaaacctgagcatcgtg-3′)各 1.0 μl。首先 94 ℃ 5 min, 再进入 94 ℃ 1 min→55 ℃ 1 min→72 ℃ 1 min 的 35 次热循环, 最后 72 ℃ 10 min。取 PCR 产物 5 μl 做 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 以凝胶扫描仪扫描结果, 剩余 PCR 产物全部做低熔点琼脂糖凝胶电泳回收目标片段。

第二轮 PCR: 向 50 μl 的反应体系, 依次加入 Platinum$^R$ *Taq* High Fidelity 0.4 μl, 10× High Fidelity PCR Buffer 5 μl, 10 mmol/L dNTP mixture 1 μl, 50 mmol/L $MgSO_4$ 2 μl, 第 1 次 PCR 产物回收物 2.0 μl, $H_2O$ 38.6 μl, 10 μmol/L 的特异性引物 E(5′-gtc ctt cct cag gct ttg tat tt-3′, 23 bp)和引物 F(5′-tta gcc ata cat ctg ctt gaa-3′, 21 bp)各 1.0 μl。首先 94 ℃ 5 min, 再进入 94 ℃ 1 min→55 ℃ 1 min→68 ℃ 3 min 的 30 次热循环, 最后 72 ℃ 10 min。取 PCR 产物 5 μl 做 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 以凝胶扫描仪扫描结果, 剩余 PCR 产物全部做低熔点琼脂糖凝胶电泳回收目标片段。

1.2.4　TOPO-hA20 的构建　　向 6 μl 的反应体系依次加入巢式梯度 RT-PCR 产物 4.0 μl, 盐溶液 1.0 μl, pCR$^R$4-TOPO$^R$ vector 1.0 μl, 轻轻混匀, 22～23 ℃ 30 min。将试管插入冰浴或放入 -20 ℃冰箱过夜。取 2 μl TOPO TA 克隆反应物, 将其加入到 1 支 TOPO 大肠杆菌感受态中, 轻轻旋转混匀, 冰浴 30 min。42 ℃ 热休克 30 s, 立即插入冰浴中。加入 500 μl 预热的 LB 培养基, 37 ℃轻摇 1 h, 100 μl/平板接种 LB 平板(AP$^+$), 37 ℃过夜培养。

1.2.5　菌落 PCR 快速筛选阳性克隆　　挑平板上长出的菌落少许于 10 μl 去离子水中, 煮沸法制备 PCR 模板[10]。PCR 方法同 1.2.3 第 2 次 PCR。

1.2.6　阳性克隆的酶切鉴定　　挑菌落 PCR 鉴定为阳性的菌落少许接种 5 ml LB 肉汤(AP$^+$), 37 ℃培养过夜, 取 2～3 ml 菌液提取 TOPO-A20 质粒, 做 *Eco*RⅠ 和 *Bam*HⅠ 酶切鉴定。

1.2.7　阳性克隆的测序分析　　将上述两种方法筛选得到的 TOPO-hA20/TOPO 大肠杆菌外送上海申能博彩生物科技公司进行测序分析。

### 1.3　hA20 生物信息学分析

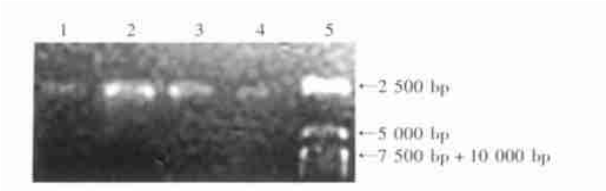
用 NCBI BLAST、ExPASy-ProtParam Tool、DNAStar Protean 等软件对 hA20 进行生物信息学分析。

## 2　结果

### 2.1　hA20 cDNA 的克隆与测序分析

用特异性引物 A 逆转录合成 cDNA 第一链, 采用巢式梯度 RT-PCR 技术, 用特异性引物 A 和引物 B 经过第一轮的梯度 PCR 扩增得到一个包含 hA20 ORF 及部分调控序列在内的长 2.64 kb 片段(图 1)。在 hA20 特异性鉴定 PCR 初步对 2.64 kb 片段进行验证得到预期 870 bp 片段(图 2)之基础上, 以该纯化的 2.64 kb 片段为模板, 经过自行设计的另一对 hA20 特异性引物对 E 和 F 的第二轮 PCR 扩增, 得到 2 361 bp 的 hA20 ORF(图 3), 随后将其插入 pCR$^R$4-TOPO$^R$ 载体。经过菌落 PCR 的快速筛选得到 2 株阳性克隆(图 4), 用 *Eco*RⅠ 和 *Bam*HⅠ 对提取的质粒进行酶切鉴定进一步肯定了菌落 PCR 的鉴定结果(图 5)。测序结果证实, 我们得到的序列与 GenBank 公布序列一致, 未发生 1 个碱基改变。

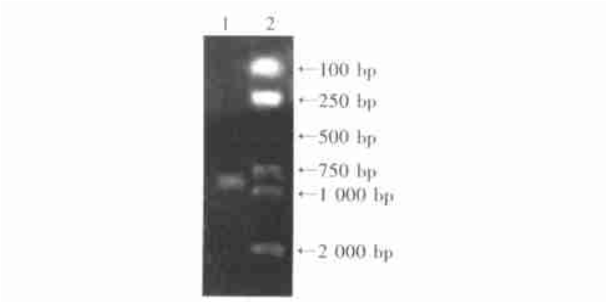
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net




1—4: Results of gradient RT-PCR at 52 ℃, 55 ℃, 58 ℃ and 61 ℃ annealing temperature respectively; 5: Marker DL 15 000

图 1 巢式梯度 RT-PCR 第 1 次扩增结果

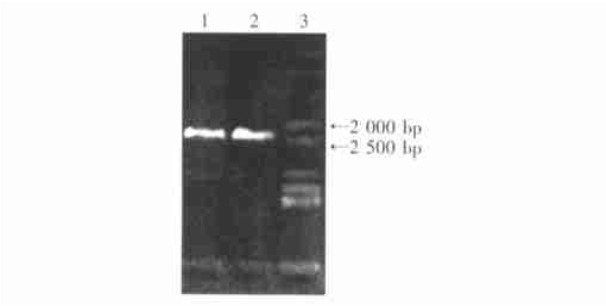
**Fig 1 Results of the first amplification of gradient nested RT-PCR**




1: Result of evaluating PCR; 2: Marker DL 2 000

图 2 鉴定 PCR 结果

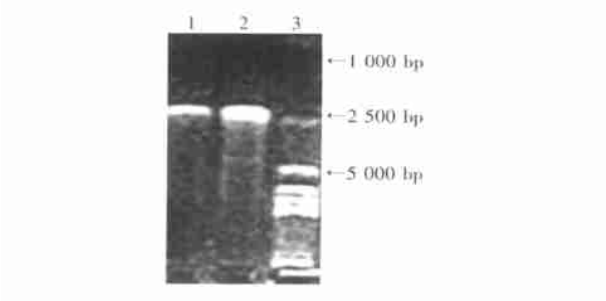
**Fig 2 Result of PCR**




1, 2: Results of second PCR; 3: Marker DL 15 000/DL 2 000

图 3 巢式梯度 RT-PCR 第 2 次扩增结果

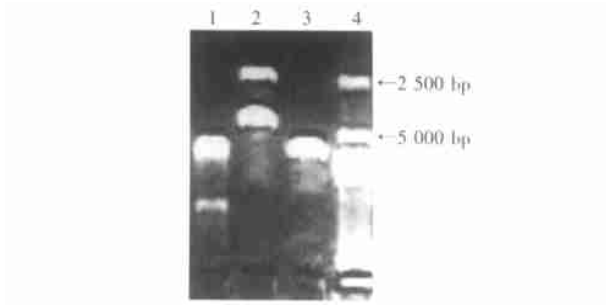
**Fig 3 Results of the second amplification of gradient nested RT-PCR**




1, 2: Results of colony PCR for strain W021217-1 and W021217-2; 3: Marker DL 15 000

图 4 菌落 PCR 快速筛选 TOPO-hA20 阳性克隆结果

**Fig 4 Results of colony PCR for quick screening TOPO-hA20 positive strains**




1: Plasmid W021217-1; 2, 3: Plasmids W021217-1 digested by *Eco*RⅠ and *Bam*HⅠ respectively; 4: Marker DL 15 000

图 5 TOPO-hA20 质粒的酶切鉴定结果

**Fig 5 Results of TOPO-hA20 vectors digested by endonucleases**

## 2.2 生物信息学分析结果

hA20 全长 790 个氨基酸，保守序列占 96%，分子量 89 613.9，等电点(pI)8.61，氨基酸组成中带负电荷的残基(Asp＋Glu)87 个，带正电荷的残基(Arg＋Lys)102 个，分子式 $C_{3897}H_{6108}N_{1152}O_{1162}S_{60}$，其 N 末端为甲硫氨酸(methionine)，推测在哺乳动物网状细胞中的半衰期 30 h，在酵母菌内的半衰期大于 20 h，在大肠杆菌内的半衰期大于 10 h，蛋白的不稳定指数(Ⅱ)为 56 025。图 6 是 ANAStar Protean 软件分析预测的 A20 的二级结构、亲水性、α 两性区域、β 两性区域、柔性区域、抗原指数和表面可及性方面的信息，提示 A20 是一种稳定性、抗原性较强的亲水性蛋白质，但可以被表 1 所列出的蛋白水解酶降解。

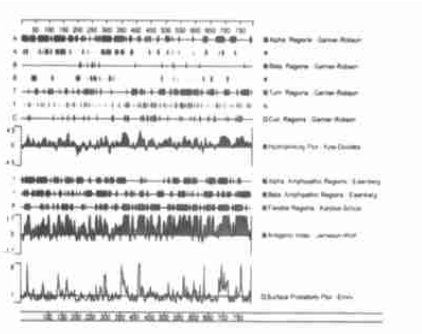


图 6 hA20 的二级结构与某些特性分析

**Fig 6 The structure and some characteristics analysis of hA20**

表 1 hA20 蛋白水解酶及其裂解产物数

**Tab 1 The cleavages digested by hydrolase**

| Name of enzyme | No. of cleavages | Name of enzyme | No. of cleavages |
|---|---|---|---|
| Arg-C proteinase | 56 | Iodosobenzoic acid | 9 |
| Asp-N endopeptidase | 30 | LysC | 46 |
| BNPS-Skatole | 9 | Pepsin (pH 1.3) | 178 |
| CNBr | 20 | Pepsin (pH>2) | 138 |
| Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) | 59 | Proline-endopeptidase | 5 |
| Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) | 164 | Proteinase K | 278 |
| Formic acid | 4 | Staphylococcal peptidase I | 53 |
| Glutamyl endopeptidase | 57 | Thermolysin | 184 |
| Hydroxylamine | 5 | Trypsin | 97 |

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

## 3　讨论

病原微生物感染是当今临床危重病例死亡的重要原因之一, 有关机体对病原微生物感染的免疫应答研究一直备受医学界的重视。当前的研究表明, 革兰阴性菌胞壁的脂多糖(LPS)、革兰阳性菌胞壁的肽聚糖(peptidoglycan, PGN), 以及真菌、分枝杆菌、病毒等病原微生物胞壁成分, 可以与体内炎性反应细胞的膜受体 TLRs (tool-like receptors)家族中的 TLR2 或 TLR4 结合, 在 CD14 及 MD2 的协助下, 将感染信号传递到细胞内, 激活一组核转录因子, 引起一系列基因表达的改变, 形成机体对感染的天然免疫应答和炎症反应。适度的炎症反应是机体的一种自身防御, 但是在临床我们常常会遇到炎症反应过度引起自身免疫损伤的情况发生, 如严重感染、创伤并发脓毒血症等。此时, 感染刺激信号的跨膜转运, 过度激活了包括 NF-κB、AP-1 等在内的多种炎症相关核转录因子, 他们之间相互协同发挥作用, 导致细胞合成并释放大量的促炎细胞因子(如 TNF-α、IL-1、IL-6 等), 其中的 TNF-α 和 IL-1 反过来又与细胞表面的 TNF-α 受体 1(TNFR1)和 IL-1 受体(ILR)结合, 再通过相同的信号转导途径, 使炎症相关核转录因子进一步被活化, 造成促炎细胞因子更多的释放……形成级联放大环, 最终引起炎症反应失控和免疫机能紊乱, 发生脓毒性休克、多器官功能障碍综合征(MODS)等。

辩证唯物主义告诉我们, 任何事物都具有两面性。机体一方面存在调度炎症反应增强的机制, 就应该存在相应的防止炎症反应过度的措施。事实上, 来自方方面面的相关医学研究已经为我们展示了机体预防体内炎症反应失控发生的机制——炎症时机体的内源性细胞保护效应。归纳起来, 包括以下四种: ①神经内分泌系统的调节; ②核受体的调节; ③抗炎介质对促炎介质的拮抗; ④某些炎症调控蛋白的调控作用。其中, 某些炎症调控蛋白的研究日益受到人们的重视, 如 A20、热休克蛋白等。目前的研究进展表明, A20 在炎症时机体的内源性细胞保护效应中发挥着重要作用[11]。因此, 开展 A20 表达的研究是一项十分有意义的工作。

表 2　人 A20 ORF 克隆策略

**Fig 2　Strategies for cloning hA20 ORF**

| Gradient nested RT-PCR | Schematic representation of target sequences | Product size | Name | Score | Specificity |
|---|---|---|---|---|---|
| First amplification | | 2 640 bp | Primer A | 80 | hA20 |
| | | | Primer B | 100 | Four genes |
| | | | Product | 78 | — |
| Evaluation PCR | Primer C 2 606 / 1 737 Primer D | 870 bp | Primer C | 100 | hA20 |
| | | | PrimerD | 100 | hA20 |
| | | | Product | 87 | — |
| Second amplification | Primer E 2 439 / 78 Primer F | 2 361 bp | Primer E | 63(78) * | hA20 |
| | | | Primer F | 100(100) * | hA20 |
| | | | Product | 37(71) * | — |

* The digits in sign of aggregation are scores of primer E and primer F when product of the first gradient nested PCR was used as DNA template of the second PCR

本研究中, 我们事先用 Primer Premier5.0、Primer3 等多种 PCR 引物设计软件进行克隆 hA20 ORF 的引物对设计, 但是都没有找到评分满足 PCR 反应基本要求的引物对。在这种情况下, 我们采用"迂回包超"的战术, 放大扩增范围, 通过设计多对巢式梯度 RT-PCR 引物对方案, 将克隆目的基因的 PCR 反应分步完成, 逐步降低 PCR 模板的复杂程度, 提高 PCR 引物相对得分, 最终达到克隆 hA20 ORF 的目的。设计时以选择引物对及其产物得分值相对较高为原则, 所设计引物及其扩增位置等信息见表 2, 其中引物 B 为 4 种基因特异性的, 发现在 hA20 以外还有人 OC134901 mRNA、TNFAIP3 mRNA 和 LOC1128993 mRNA 上含有引物 B 序列。实验所用人静脉血白细胞总 RNA 的逆转录物属于人白细胞在 LPS 刺激之特定条件下的"表达库", 复杂程度极高, 为了增加靶基因转录效率, 我们在逆转录反应中使用了特异性引物 A。由于无特异性和评分满足直接克隆靶基因的引物, 在这种情况下, 我们先行设计了 1 对引物(1 条为特异性引物, 另 1 条为次特异性引物)经过梯度 RT-PCR 扩增包含 hA20 ORF 目的序列在内的长 2.64 kb 的片段, 在 hA20 特异性鉴定 PCR 对其进行扩增鉴定, 肯定该 2.64 kb 片段为 hA20 cDNA 的基础之上, 以纯化的 2.64 kb 片段为模板进行第二轮的特异性巢式 PCR, 降低摸板复杂程度, 使引物 E 得分从 63 分提升到 78 分, PCR 产物得分从 51 分提高到 71 分, 最终成功收获 hA20 ORF。引物 E 和引物 F 配对 PCR 产物(即 hA20 ORF)得分仍然较低, 事实上从图 3

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

里我们能够分辨出大小约在 5 000 bp 的 PCR 产物二聚体。综上所述，梯度 RT-PCR 产物的纯化十分必要，我们采用低熔点琼脂糖凝胶电泳回收法纯化回收之，去除“表达库”基因和非目标条带基因效果较好，从而使第二轮 PCR 的模板单一化，最终实现了靶基因的克隆，该方案可以为其他难克隆基因的克隆所借鉴。

pCR$^{R}$4-TOPO$^{R}$ 克隆载体为 Introgen 公司新近推出的一种 TA 克隆载体，含蓝白斑筛选标志以及卡那霉素和氨卞青霉素抗性，其最大特点是在 PCR 产物插入缺口处的胸腺嘧啶(T)上带有一种拓扑异构酶Ⅰ(topoisomeraseⅠ)，它可以在室温条件下 5 min 内催化 pCR4-TOPO 载体 3′末尾 T 磷酸基团与 PCR 产物 5′的 1 个羟基反应，将断裂的两条 DNA 链连接起来，是一种快速、高效的 TA 克隆载体，阳性克隆筛选时假阳性几乎可以不考虑，可用 M13 和 T7 引物进行测序分析。

生物信息学是一门近年崛起的融合生物科学与计算机科技的新学科，也是一种重要的生物医药研究开发工具。我们借用当前生物信息学的多种免费分析软件，对 hA20 的基因与蛋白质信息进行分析预测，对于下一步 hA20 的生物合成、蛋白质分离与纯化等都具有重大的指导性意义。

参考文献：

[1] Dixit V M, Green S, Sarma V, *et al*. Tumor necrosis factor-α induction of novel genes in human endothelial cells including a macrophage specific chemotaxin[J]. J Biol Chem, 1990, 265(5): 2973－2978.

[2] Krikos A, Laherty C D, Dixit V M. Transcriptional activation of the TNFα-inducible zinc finger protein, 20, is mediated by kappa B elements[J]. J Biol Chem, 1992, 267(25): 17971－17976.

[3] Tewari M, Wolf F W, Seldin M F, *et al*. Lymphoid expression and regulation of A20. An inhibitor of programmed cell death[J]. J Immunol, 1995, 154(4): 1699－1706.

[4] Rudi B, Karen H, Sofie V H, *et al*. A20 and A20-binding protein as cellular inhibitors of nuclear factor-κB-dependent gene expression and apoptosis [J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60(8): 1143－1151.

[5] Karen H, Dirk D V, Wim V B, *et al*. The zinc finger protein A20 inhibits TNF-induced NF-κB-dependent gene expression by interfering with an RIP- or TRAF2-mediated transactivation signal and directly binds to a novel NF-κB-inhibiting protein ABIN[J]. J Cell Biol, 1999, 145(7): 1471－1482.

[6] Susan M, O' Reilly, Paul N Moynagh. Regulation of Toll-like receptor 4 signalling by A20 zinc finger protein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 303(2): 586－593.

[7] Lee E G, Boone D L, Chai S, *et al*. Failure to regulate TNF-α induced NF-κB and death responses in A20 deficient mice[J]. Science, 2000, 289 (5488): 2350－2354.

[8] Arvelo M B, Cooper J T, Longo C, *et al*. A20 protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide acute toxic lethal hepatitis[J]. Hepatology, 2002, 35(3): 535－543.

[9] 吴丽娟，邓光贵，石展鹰，等. 应用聚合酶链反应技术快速诊断结核病[J]. 中华内科学杂志，1995，34(7)：481.

[10] 吴丽娟，黎 燕，胡美茹，等. 改进 SDS-Phenol 法快速提取细胞总 RNA[J]. 第三军医大学学报，1999，21(1)：65－67.

[11] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophi c yeast Pichia pastoris[J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(1): 45－66.

(编辑 张大春)

# 个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)08-0662-01

## 注射用内给氧对低氧血症患者行纤维支气管镜检的作用

## Effects of carbamide hydrogen peroxide injection for hypoxemia patients treated with fibrobronoscope

朱 琳，黄 英，徐绍萍 (第三军医大学西南医院呼吸内科，重庆 400038)

我科室自 2001 年以来，对部分低氧血症患者行纤维支气管镜检时予鼻导管给氧联合注射碳酸酰胺过氧化氢内给氧，能快速提高动脉血氧分压，使检查治疗能顺利进行，现报告如下。

### 1 对象与方法

对象：病人 76 例，经胸部 X 光检查及血气分析检测，均为肺疾病低氧血症患者，需行纤维支气管镜检查，按随机分段分组：对照组 38 例，实验组 38 例。

方法：对照组在行纤维支气管镜检时仅采用单纯鼻导管吸氧。实验组采用鼻导管吸氧结合碳酸酰胺过氧化氢，即在行鼻导管给氧的同时，纤维支气管镜检前 30 min 建立一静脉通道，予生理盐水 250 ml，碳酸酰胺过氧化氢 1 g 静滴，50～70 滴/min。然后根据指尖血氧饱和度监测数据及时调控输液速度，而不影响操作及治疗。

作者简介：朱 琳(1972－)，女，四川省资中县人，助理实验师。电话：(023) 68753702

收稿日期：2003-10-09；修回日期：2003-12-31

(下转 673 页)

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