DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.016
第26卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 7
2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

文章编号:1000-5404(2004)07-0601-03

论著

人TLR4及MD2基因反义真核表达载体的构建

李永旺[1],李淑萍[1],钱桂生[1],张德明[1],麻 莉[2] (第三军医大学:[1]新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037,[2]西南医院病理科,重庆 400038)

提 要:目的 构建人TLR4及MD2基因反义真核表达载体,为研究其在肺炎症反应中的作用奠定基础。方法 通过PCR技术扩增出TLR4及MD2基因片段,然后分别反向插入真核表达载体pEFBOS的多克隆位点,最后对产生的重组子进行酶切和测序鉴定。结果 扩增出的TLR4目的片段为2.6 kb,MD2为0.5 kb,并成功地连接到pEFBOS载体上,DNA测序结果也显示插入片段为目的片段。结论 成功构建人TLR4及MD2基因反义真核表达载体。

关键词:Toll样受体4;MD2;反义基因
中图法分类号:Q782 文献标识码:A

Construction of antisense expression vectors of human TLR4 and MD2

LI Yong-wang[1], LI Shu-ping[1], QIAN Gui-sheng[1], ZHANG De-ming[1], MA Li[2] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037; [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct antisense expression vectors of human TLR4 and MD2. Methods Partial sequences of TLR4 and MD2 gene were cloned by PCR method. The cloned fragments were reversely inserted into the multiclone sites of plasmid pEFBOS, respectively. The constructed recombinants were identified with enzyme digestion and DNA sequencing. Results The cloned fragments of TLR4 and MD2 were 2.6 kb and 0.5 kb, respectively, and successfully bound to pEFBOS. The inserted fragments were also proved to be the objective ones by DNA sequencing. Conclusion Antisense expression vectors of TLR4 and MD2 are successfully constructed.

Key words: Toll like receptor 4; MD2; antisense gene

Toll样受体4(Toll like receptor 4, TLR4)及其附属蛋白MD2在脂多糖(lipopolysacchride, LPS)诱发的炎症反应中起着关键作用,控制着炎症信号进入细胞内的通路[1~3]。本实验应用反义真核表达载体构建技术,构建了人TLR4及MD2基因反义真核表达载体,为进一步研究其在LPS所致肺急性炎症反应中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

含有TLR4基因的真核表达载体pEFBOS-TLR4及含有MD2基因的pEFBOS-MD2由日本Saga医学院的Kensuke Miyake博士惠赠。*Xho*Ⅰ酶、*Bam*HⅠ酶、*Bgl*Ⅱ酶、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒、连接试剂盒均购自promega公司。TLR4 PCR上游引物(P1)为:5′-gatggatccAAAACCAGTGAGGATGATGC-3′含有*Bam*HⅠ酶切位点,下游引物(P2)为:5′-gatctcgagGATAGATGTTGCTTCCTGCC-3′含有*Xho*Ⅰ酶切位点,MD2上游引物(P3)为:5′-gatagatctGCATTTGTAAAGCTTTGGAGA-3′含有*Bgl*Ⅱ酶切位点,下游引物(P4)为:5′-gatctcgagATTTGAATTAGGTTGGTGTAGG-3′含有*Xho*Ⅰ酶切位点。由TaKaRa公司合成。

1.2 方法

1.2.1 TLR4及MD2基因的克隆 将pEFBOS-TLR4和pEFBOS-MD2质粒分别转化感受态细菌DH5α,然后接种于含Amp的LB平板,挑取单菌落接种于LB培养基,37 ℃培养过夜。用质粒抽提试剂盒提取质粒。以pEFBOS-TLR4质粒为模板,以P1、P2为引物扩增TLR4编码区基因;同时以pEFBOS-MD2质粒为模板,以P3、P4为引物扩增MD2编码区基因。PCR产物经0.7%琼脂糖凝胶电泳鉴定。用胶回收试剂盒回收PCR产物。

1.2.2 TLR4反义真核表达载体的构建

1.2.2.1 酶切反应 用*Xho*Ⅰ酶、*Bam*HⅠ酶双酶切pEFBOS,酶切完全后,将反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,利用试剂盒回收线性化的载体DNA。同时用*Xho*Ⅰ酶、*Bam*HⅠ酶双酶切TLR4 PCR产物,酶切完全后,65 ℃灭活10 min,即可用于连接反应。具体操作按试剂盒说明书进行。

1.2.2.2 连接反应 具有两种不同粘端的线性化pEFBOS

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39730210)
Supported by the Major Program of National Natural Science Foundation of China (39730210)
作者简介:李永旺(1971—),男,河南省确山县人,博士,主治医师,主要从事ARDS方面的研究。电话:(023)68755320
收稿日期:2003-03-10;修回日期:2004-01-06

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

质粒与目的片段之间的连 接反应，按插入片段与载体分子数 5∶1 进行，具体操作按试剂盒说明书进行。连接反应完毕，取 5 μl 用于转化感受态细菌 DH5α。

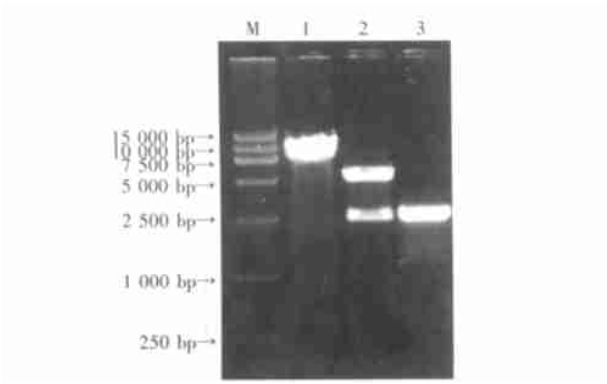
1.2.2.3 重组子的筛选与鉴定 将转化有重组载体的细菌接种于含 Amp 的 LB 平板，挑取单菌落接种于 LB 培养基，37 ℃培养过夜。用质粒抽提试剂盒提取质粒，质粒经 *Xho*Ⅰ/*Bam*HⅠ酶切鉴定后送 TaKaRa 公司进行 DNA 测序。

1.2.3 MD2 反义真核表达载体的构建 用 *Xho*Ⅰ酶、*Bgl*2 酶双酶切 pEFBOS，酶切完全后，将反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，利用试剂盒回收线性化的载体 DNA。同时用 *Xhol* 酶、*Bgl*2 酶双酶切 MD2 PCR 产物，酶切完全后，65 ℃灭活 10 min，即可用于连接反应。具体操作按试剂盒说明书进行。连接反应及重阻子的筛选与鉴定同上。

2 结果

2.1 TLR4 反义真核表达载体的酶切鉴定

从含 TLR4 基因的质粒中扩增出的 TLR4 基因长度为 2.6 kb，与理论值相附。构建的 TLR4 反义载体（anti-pTLR4）经 *Xho*Ⅰ/*Bam*HⅠ双酶切后经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶中出现两条 DNA 带，分别位于 5.5 kb（pEFBOS）处及 2.6 kb（TLR4）处。TLR4 反义载体经 *Xho*Ⅰ酶切后电泳，在 8.1 kb（pEFBOS＋TLR4）处出现一条 DNA 带，见图 1。



M：DNA Marker DL 15×10³；1：Digestion with anti-pTLR4/Xhol（8.1 kb）；2：Digestion with anti-pTLR4/*Xho*Ⅰ and *Bam*HⅠ（5.5 kb＋2.6 kb）；3：TLR4 PCR product

图 1 **TLR4** 反义载体酶切鉴定

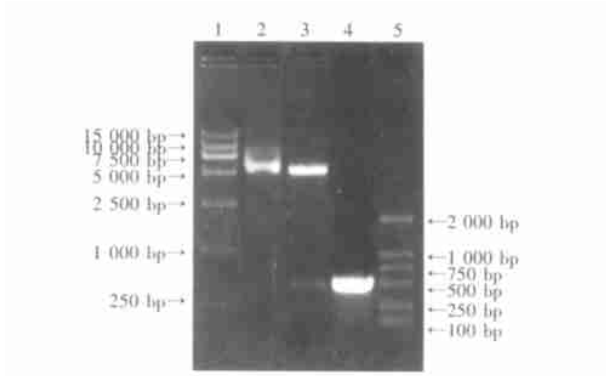
Fig 1 Restriction endonuclease map of the antisense vector of pTLR4

2.2 MD2 反义真核表达载体的酶切鉴定

从含 MD2 基因的质粒中扩增出的 MD2 基因长度为 0.5 kb，与理论值相符。构建的 MD2 反义载体（anti-pMD2）经 *Xho*Ⅰ/*Bgl*2 双酶切后经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶中出现两条 DNA 带，分别位于 5.5 kb（pEFBOS）处及 0.5 kb（MD2）处。MD2 反义载体经 *Xho*Ⅰ酶切后电泳，在 6 kb（pEFBOS＋MD2）处出现 1 条 DNA 带，见图 2。

2.2 DNA 测序及分析结果

通过网址：www.ncbi.nlm.nih.gov 进入 Nucleotide BLAST 搜索网站，通过分析比较，TLR4 基因片段的测序结果与 Genebank 中 TLR4（ACCESSION NM-138554）的序列完全一致；MD2 基因片段的测序结果与 GenBank 中 MD2（ACCESSION NM-015364）的序列完全一致。



1：DNA Marker DL15 000；2：Digestion with anti-pMD2/*Xho*Ⅰ（6.0 kb）；3：Digestion with anti-pTLR4/*Xho*Ⅰ and *Bgl*2（5.5 kb＋0.5 kb）；4：TLR4 PCR product；5：DNA Marker DL 2000

图 2 **MD2** 反义载体酶切鉴定

Fig 2 Restriction endonuclease map of the antisense vector of pMD2

3 讨论

TLR4 及其附属蛋白 MD2 是 LPS 炎症信号进入细胞内的关键所在，若能阻断 TLR4 及 MD2 的作用就有可能阻断 LPS 诱发的炎症反应。而要阻断某一物质的作用，通常采用抗体技术，但抗体的制备较为复杂；通过反义技术同样可以封闭某一物质的作用，而且操作起来相对简单。反义技术是指利用反义核酸来抑制基因的表达。反义核酸主要包括反义 DNA、反义 RNA、核酶以及反义寡核苷酸。目前主要使用的是人工合成的反义寡核苷酸和反义 RNA 表达载体，后者是在启动子和终止子间反向插入一段靶 DNA 于表达载体中，通过表达载体产生反义 RNA，与特定的 mRNA 形成双链体。这样即可阻止 mRNA 从核的转运和与核糖体结合的过程，又可根据反义与正义 RNA 在细胞中的位置而引起 RNase 对反义 RNA-mRNA 双链体的降解[4,5]。我们通过 PCR 扩增出 TLR4 基因的编码区序列，借助 *Xho*Ⅰ和 *Bam*HⅠ两个限制性酶切位点，将 PCR 产物克隆到真核表达载体 pEFBOS 的多克隆位点中。由于上游引物带有 *Bam*HⅠ，下游引物带有 *Xho*Ⅰ位点，使得扩增序列的 5′端为 *Bam*HⅠ位点，3′端为 XhoI 位点；而在真核表达载体 pEFBOS 的多克隆位点中，*Xho*Ⅰ位点于 *Bam*HⅠ位点的上游；这样在 T4DNA 连接酶作用下，扩增序列就反向插入到相同酶切的载体中，形成 EF1α 启动子控制下的重组 TLR4 反义基因。通过同样

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

的技术，借助 *Xho* Ⅰ和 *Bgl*2 两个酶切位点重组了 MD2 反义基因。通过酶切鉴定及序列测定，证实了重组 TLR4 及 MD2 反义基因的真核表达载体构建成功，为后续实验奠定了基础。

参考文献：

[1] Schwartz D A. The role of TLR4 in endotoxin responsiveness in humans [J]. J Endotoxin Res, 2001, 7(5): 389－393.

[2] Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2[J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(1): 119－128.

[3] 李永旺，毛宝龄，钱桂生. 内毒素诱导的 TLR4-MD2 信号传导通路[J]. 中国药理学通报，2002，18(2)：121－125.

[4] 李永明，赵玉琪. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京：科学出版社，2000. 123－133.

[5] Raizada M K, Francis S C, Wang H, *et al*. Targeting of the renin-angiotensin system by antisense gene therapy: a possible strategy for the long-term control of hypertension [J]. J Hypertens, 2000, 18(4): 353－362.

（编辑　薛国文）

文章编号：1000-5404(2004)07-0603-01

个案与短篇

术后胃瘫的护理

Nursing care of patients with postoperative gastroparesis

饶　芸，宋　娟，蔡志民　（第三军医大学西南医院普通外科，重庆 400038）

术后胃瘫是指腹部术后胃肠动力紊乱所致的非机械性胃排空延迟所导致的临床症状[1]。我科自 1995 年 5 月至 2003 年 5 月收治了 21 例胃瘫患者，为提高对本病的认识及采取有效的护理与防治方法，现将护理措施介绍如下。

1　临床资料

21 例胃瘫患者，男 12 例，女 9 例。年龄 21～78 岁（平均 53.5 岁），各种类型的胃切除、胃空肠吻合术 5 例，胰十二指肠切除术 4 例，胃空肠吻合术 8 例，高选迷走神经切断术 1 例，其他非胃部手术 3 例；患者主要表现在术后拔除胃管进食后，上腹饱胀或压迫感，呕吐含胆汁胃液，听诊肠鸣音减弱或消失。对各患者均采用保守治疗包括：禁食，持续胃肠减压，高渗温热盐水洗胃，完全胃肠外营养（TPN），静滴制酸剂和糖皮质激素，间断输入新鲜全血或血浆，胃管内注入促进胃肠动力的药物，同时积极治疗并发疾病。其中 10 例在发病后 17～21 d 恢复，5 例在第 4 周恢复，4 例在第 5 周恢复，仅 2 例在 7 周后恢复。

2　护理措施

心理护理：术后胃瘫的患者需再行胃肠减压时，易出现厌烦、不配合、焦虑心理，给治疗、护理带来了困难。应关心体贴患者，让患者明白本病属于功能性病变，采用保守治疗可以治愈，以及胃肠减压的必要性。使其积极配合胃肠减压的正常进行。

胃肠减压的护理：选择柔软胃管，减压过程中配合按压合谷、内关穴位可减轻不适。并且严密观察胃液的色泽、性状、液量，保持胃管通畅。胃管内注入药物后立即用温生理盐水冲管，防止阻塞。

完全胃肠外营养的护理：选择适合的营养液，配置过程严格无菌操作，注意药物的配伍禁忌；24 h 内均匀输入；防止管道扭曲、堵塞；不可经深静脉管道输血、抽血。

药物治疗及观察：临床应用的促进胃肠动力的药物主要有 3 类[2]：多巴胺受体阻滞剂、刺激胃动素受体和 5-羟色胺受体拮抗剂。以上药物联合应用有协同作用，但应注意观察其副作用。

饮食指导：胃动力恢复后，患者应少食多餐，禁食产气食物，餐前 15～30 min 及睡前服用促胃动力药物。进流食 2～3 d 若无不适，可予半流质 2～3 d，感觉良好可停用药物，仍予半流质 2～3 d，无不适后改软食，但食量不能多，多进一些含钾的食物。

3　讨论

胃瘫是以胃排空障碍为主要征象的胃动力紊乱综合征，常见于腹部手术后。研究认为主要是手术激活了抑制性交感神经反射系统，使胃交感神经活动增强，胃肠动力受抑，残胃弛张无力，不能通过蠕动将食物排入空肠内[3]。本病的主要临床特点为腹部手术后数日肛门曾恢复排气，但胃肠减压解除后不久即出现腹胀呕吐，进食后症状加重，再禁食减压症状缓解，再解除减压恢复饮食，症状又复出现，无机械性硬阻之征象，持续 7 日以上无改善。针对这些特点，我们通过加强心理护理，消除患者的紧张心情和恐惧心理，采取禁食、持续胃肠减压、胃肠外营养等措施，19 例患者在 5 周内胃动力恢复。在护理中，我们体会到，当胃瘫症状消失、解除胃肠减后，饮食指导至关重要，要告诫患者循序渐进，切忌操之过急，暴食暴饮，避免病情的反复。

关键词：胃瘫；护理
中图法分类号：R473.6　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 蔡志民，刘全达，余佩武. 术后功能性胃排功障碍的诊断和治疗 25 例临床分析[J]. 重庆医学，2003，32(6)：723－724.

[2] Rabine J C, Barnett J L. Management of the patient with gastroparesis[J]. J Clin Gastroenterol, 2001, 32(1): 11－18.

[3] 陈　涛，周庆贤，田伏洲. 胃大部切除术后残胃功能性排空障碍的诊断和治疗[J]. 中国实用外科杂志，1999，19(6)：341－343.

（编辑　王　红）

作者简介：饶　芸（1975－），女，四川省大竹县人，主管护师，主要从事普通外科护理方面的研究。电话：(023)68754000-73172

收稿日期：2003-07-22；修回日期：2004-01-05

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