DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.02.011
第26卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 2
112 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)02-0112-03

人NHE-1基因反义真核表达载体的构建及初步鉴定

滕小春,刘海峰,陈 刚,杨孟华,杨仕明 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 构建人Na^+-H^+交换蛋白-1(Na^+-H^+ exchanger-1,NHE-1)基因反义真核表达载体。方法 采用分子克隆技术,用*Eco*RⅠ和*Hin*dⅢ双酶从NHE-1 cDNA pEAP切下所需目的片段,然后将该片段反向插入真核表达载体pcDNA3.1(-)/Zeo的多克隆位点,最后对产生重组子进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果 经琼脂糖凝胶电泳鉴定,将目的片段成功的连接到pcDNA3.1(-)/Zeo载体上。结论 成功地将NHE-1目的片段反向插入到pcDNA3.1(-)/Zeo中,构建了人NHE-1反义表达真核载体hNHE-1。

关键词:NHE-1基因;胃肿瘤;反义技术;重组载体
中图法分类号:Q781;Q782;R73-3 文献标识码:A

Construction and identification of Na^+-H^+ exchanger-1 gene antisense eukaryotic expression vector

TENG Xiao-chun, LIU Hai-feng, CHEN Gang, YANG Meng-hua, YANG Shi-ming (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the antisense expression vector of human Na^+-H^+ exchanger-1 (NHE-1). Methods NHE-1 gene fragment, cleaved from cDNA pEAP with *Eco*RⅠ and *Hin*dⅢ, was reversely inserted into the polyclone site of plasmid eukaryotic expression vector pcDNA3.1(-)/Zeo. Finally, the constructed recombinant was identified by agarose gel electrophoresis. Results Agarose gel electrophoresis confirmed that the target fragment was successfully bound to pcDNA3.1(-)/Zeo. Conclusion The antisense eukaryotic expression vector of NHE-1, namely, hNHE-1, has been constructed successfully by means of reversely inserting the target fragment into pcDNA3.1(-)/Zeo.

Key words: NHE-1 gene; gastric neoplasm; antisense technology; recombinant vector

胞膜离子交换蛋白Na^+-H^+交换泵(Na^+-H^+ exchanger,NHE)是存在于所有真核细胞的一种跨膜蛋白。目前已发现NHE有7个亚型,分别命名为NHE1~7,NHE1主要存在于人类,是一种管家基因,通过Na^+-H^+交换将胞内H^+排出,从而保持细胞内pH值稳定[1,2]。由于肿瘤细胞糖酵解优势,导致肿瘤细胞产生大量的乳酸和H^+,依靠其表达增强的NHE-1膜蛋白,使肿瘤细胞进行强大的Na^+-H^+交换,将大部分H^+泵出细胞外,阻止肿瘤细胞内酸化,从而使肿瘤细胞免遭凋亡[3~6]。我们用免疫组化方法研究证明,NHE1蛋白在胃癌组织中的表达程度显著高于正常胃组织。因此抑制人胃癌细胞NHE-1基因上调表达可能诱发细胞内酸化,导致细胞凋亡,达到治疗肿瘤的目的。本实验利用NHE-1基因片段构建其反义真核表达载体,为将来能在体内应用抑制NHE-1基因表达的肿瘤治疗奠定基础,为开辟抗肿瘤治疗的新途径和寻找新的抗肿瘤药物提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

DH52细菌由消化实验室保存;含NHE-1目的片段的质粒cDNA pECE由Jossete.Noel(Montreaty University)惠赠;真核表达载体pcDNA3.1(-)/Zeo,*Eco*RⅠ、*Hin*dⅢ限制性内切酶,T_4 DNA连接酶,琼脂糖,质粒提取试剂盒构自Invitrogen公司;DNA回收试剂盒由金泰生物技术(厦门)有限公司惠赠。

1.2 NHE-1基因反义真核表达载体的构建

1.2.1 构建策略,见图1。

基金项目:第三军医大学科研基金资助项目(2002)
Supported by the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2002)
作者简介:滕小春(1970-),男,四川省阆中县人,硕士研究生,主治医师,主要从事胃癌发病机制方面的研究。电话:(023)65399049
通信作者:刘海峰,电话:(023)68754656
收稿日期:2003-03-20;修回日期:2003-09-15

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

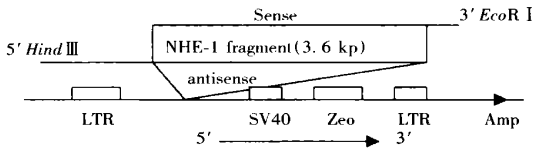


图 1　构建策略图

Fig 1　Construction strategy

1.2.2　感受态的制备　　$CaCl_2$ 法常规制备感受态。

1.2.3　质粒转化扩增　　cDNA pEAP、pcDNA3.1(-)/Zeo 质粒分别转化感受态, 扩增后试剂盒提取质粒。

1.2.4　pcDNA3.1(-)/Zeo 载体的酶切及 NHE-1 cDNA 的制备　pcDNA3.1(-)/Zeo 用 *Eco*RⅠ、*Hin*dⅢ酶切后, 等体积酚/氯仿抽提 1 次, 离心沉淀, 用去离子水溶解, 取 1 μl 电泳, 余置 −20 ℃备用。cDNA pECE 全长 6.5 kb, 含 3.6 kb 的目的片段, 用 *Eco*RⅠ、*Hin*dⅢ酶切电泳后, 试剂盒回收目的片段。

1.2.5　DNA 重组连接　　连接反应体系由目的片段 6 μl, 酶切后 pcDNA3.1(-)/Zeo 载体 6 μl, 去离子水 4 μl, T4DNA 连接酶 2 μl, T4DNA 连接酶缓冲液 2 μl, 总体积 20 μl; 在 16 ℃条件下连接 16 h。

1.2.6　重组质粒的细菌转化扩增　　取 2 μl 重组质粒转化感受态, 扩增后试剂盒提取大量质粒。为下一步反义重组质粒向胃癌细胞转染作好准备。

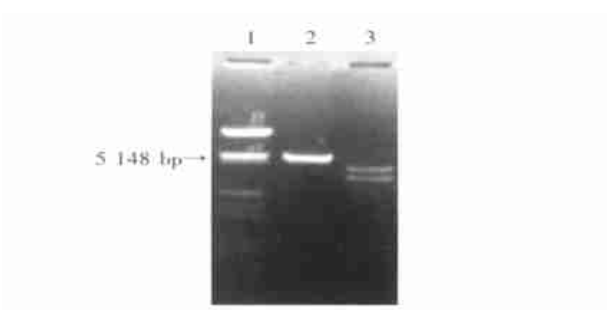
1.3　重组质粒的酶切鉴定

重组质粒用 *Eco*RⅠ、*Hin*dⅢ酶切后, 进行电泳鉴定。

2　结果

2.1　cDNA pEAP 的酶切鉴定

cDNA pEAP 全长 6.5 bp, 含 3.6 bp 的目的片段, 位于 *Eco*RⅠ、*Hin*dⅢ两个酶切位点之间(5′ 含 *Hin*dⅢ酶切位点, 3′ 含 *Eco*RⅠ 酶切位点), 用 *Eco*RⅠ、*Hin*dⅢ酶切后, 形成 2.9 bp 和 3.6 bp 两条带, 见图 2。



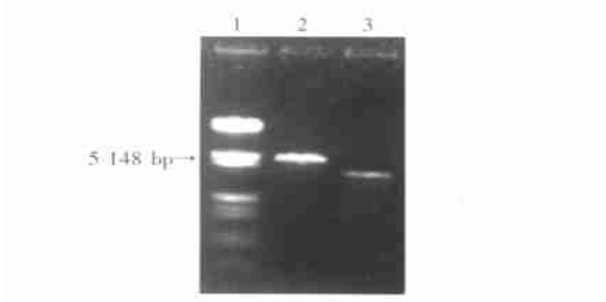
1: λDNA/*Eco*RⅠ + *Hin*dⅢ marker; 2: pLas mid PEAP; 3: PEAP double enzyme cleaving

图 2　**PEAP** 质粒酶切鉴定

Fig 2　Identification of PEAP plasmid with digestion

2.2　pcDNA3.1(-)/Zeo 的酶切鉴定

pcDNA3.1(-)/Zeo 含 *Eco*RⅠ、*Hin*dⅢ酶切位点(5′ 含 *Eco*RⅠ酶切位点, 3′ 含 *Hin*dⅢ酶切位点), 用 *Eco*RⅠ、*Hin*dⅢ酶切后, 形成 5.0 kp 的线性条带, 见图 3。



1: λDNA/*Eco*RⅠ + *Hin*dⅢ marker; 2: pcDNA301 plasmid; 3: pcDNA31 double enzyme cleaving

图 3　**pcDNA3.1** 质粒酶切鉴定

Fig 3　Identification of pcDNA3.1 plasmid with digestion

2.3　重组载体的酶切鉴定

重组质粒用 *Eco*RⅠ、*Hin*dⅢ酶切后释放出 3.6 kb 的片段, 提示目的片段成功插入载体中, 见图 4。



1, 3, 5: 26 Double enzyme digestion of recombinant plasmid; 2, 4: Recombinant plasmid; 6: λDNA/*Eco*RⅠ + *Hin*dⅢ marker

图 4　重组质粒酶切鉴定

Fig 4　Identification of vecombinat plasmid with digestion

3　讨论

实验结果表明, 我们成功地将目的片段反向连接到真核表达载体 pcDNA3.1(-)/Zeo 的多克隆位点上, 成功构建了人 NHE-1 基因的反义真核表达载体, 对肿瘤细胞 NHE-1 基因表达的抑制可能具有一定的作用。目前真核表达载体在有机体中表达外源基因, 仍然是肿瘤基因治疗的活跃领域。因此 NHE-1 基因反义表达载体的构建, 为将来能在体内应用抑制 NHE-1 基因表达的肿瘤治疗奠定基础, 具有重要的实践意义。

参考文献:

[1] Putney L K, Denker S P, Barber D L. The changing face of the Na^+/H^+

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

exchanger, NHE1: Structure, regulation, and cellular actions[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002, 42: 527—552.
[2] Orlowski J, Kandasamy R A, Shull G E, *et al*. Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family[J]. J Biol Chem, 1992, 267(13): 9331—9339.
[3] Mclean L A, Roscoe J, Jorgensen N K, *et al*. Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278(4): C676—C688.
[4] Reshkin S J, Bellizzi A, Albarani V, *et al*. Phosphoinositide 3-Kinase is involved in the tumor-specific activation of human breast cancer cell Na^+/H^+ exchanger, motility, and invasion induced by serum deprivation[J]. J Biol Chem, 2000, 275(8): 5361—5369.
[5] 黄桂君, 吴国明, 张 青, 等. 人肺癌细胞 NHE_1 基因片段的克隆及其反义表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): 538—540.
[6] 黄桂君, 钱桂生. NHE-1表达在人肺癌细胞pHi调节及凋亡调控中的作用[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(1): 4.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)02-0114-02

预存式自体输血在外科手术中的应用

Application of preserved auto-blood for transfusion in surgical operation

段慧玲, 滕本秀 (第三军医大学新桥医院输血科, 重庆 400037)

节约用血和安全输血一直是输血工作中的一个重要研究课题。随着对同种异体输血传播疾病的危险和所致不良反应认识的不断提高, 为了避免异体输血产生诸多副作用并保证病人能及时手术, 以自体血回输代替异体输血成为当前患者手术治疗的最佳输血方案。我科对60例外科择期手术患者和某些稀有血型(如RhD阴性)的患者, 采用术前预存自体血手术中回输的方法, 取得了良好的临床效果。现报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

60例外科择期手术患者, 女21例, 男39例。年龄23~64岁。其中椎间盘突出症12例, 颅内肿瘤14例, 肢体骨折18例, 颅骨缺损3例, 风湿性心脏病3例, 纤维血管瘤4例, 腰椎骨折1例, 颈动脉体瘤3例和听神经瘤2例。血型血清学检查其中2例为RhD阴性, 58例为RhD阳性。

1.2 化验

采血前除常规体格检查外, 查血常规: RBC、Hb、WBC、Plt、Ret、Hct, 肝功能、乙肝病毒5项均符合自身献血条件, 自体血回输后3~4 d重复检验。

1.3 方法

采血前检测患者呼吸、血压、脉搏。储血量根据手术时间、手术大小、用血量多少的估计来分次采血, 60名患者储血量最少300 ml, 最多800 ml。备血200~300 ml者采血, 备血均一次完成(在术前3 d用CPD A保存液血袋采患者自体血)。备血200~800 ml者, 首次采集200~400 ml, 72 h后再采集200~400 ml。将采出的血液置4~6 ℃恒温冰箱中保存。监测患者在采血过程中生命体征的变化, 观察采血前后血红蛋白浓度(Hb)和红细胞压积(Hct)变化, 记录围手术期自体血和异体血的输入量。采血后应给患者加强营养, 补充铁剂。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2 结果

采血与围手术期输血情况: 60名患者采血时仅有2人出现轻度头晕, 脉搏增快至110次/min左右, 饮淡糖水, 休息片刻后缓解。回输时无寒战、发热、过敏等任何输血反应。患者术前贮血和围手术期异体血输入情况, 见表1。60名患者中52名仅输自体血即可补充术中失血, 维持生命征稳定, 顺利度过了围手术期。8名加输异体血的患者中, 5名因距手术日期较近, 而未能备足所需用血, 2名因术中失血过多。所有患者术后恢复良好。

表1 患者术前贮血和围手术期异体血输入情况

贮血量(ml)	贮血者(n)	用异体血者(n)	异体血量(ml)
200	6	1	200
300	3	0	0
400	37	4	200~400
600	5	1	400
700	2	0	0
800	7	2	400~800

采血前、后患者部分血液指标变化, 见表2。采血后患者Hb、Hct均较采血前下降, 但仍在正常值范围内。

表2 采血前后患者 **Hb**、**Hct** 测定结果($\bar{x}\pm s$)

	n	Hb(g/L)	Hct(%)
采血前	60	141.17±16.09	41.68±4.50
采血后	60	130.04±15.541 **	40.55±4.392 *

与采血前比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

作者简介: 段慧玲(1964—), 女, 云南省昆明市人, 主管技师, 主要从事临床输血方面的研究, 发表论文9篇。电话: (023)68755794

收稿日期: 2002-10-28; 修回日期: 2003-01-23

(下转117页)

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