DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.007

致连接失败。一个可能的原因是酶切位点前的保护碱基存在碱基偏爱性,即有些碱基的构象利于某些酶识别,有些则相反,其中的机制有待进一步探讨。相对而言,采用PUC-T载体不失为一种PCR引物上直接引入酶切位点失败时行之有效的一种方法。

由于本研究中涉及的质粒片段较大(约13.4 kb),其连接及转化的效率都很低,尤其在进行农杆菌的转化时。以往资料认为,电转化优于冻融法或钙离子依赖感受态细胞转化法,简便、转化效率高,可获得较理想的结果。本研究发现,电转化小分子质粒(4 kb)时,其转化效率可达$10^7/\mu g$,而用钙离子依赖感受态细胞转化法,其转化率为$10^6/\mu g$,相差不大;但进行大分子质粒(13.4 kb)转化时,其转化效率(最高为$3.5\times 10^4/\mu g$)明显降低,而用反复冻融法转化法时转化率极低,仅为$10^2/\mu g$。因此,本研究认为进行大分子质粒转化时,采用电转化法为首选途径。同时我们发现,LB培养基加葡萄糖(250 mmol/L)和采用YEB培养基进行农杆菌的培养具有相同的培养效果。

本研究选用植物表达载体进行目的基因的构建,为利用植物作为生物反应器打下基础。与传统的疫苗表达系统如细菌系统、酵母系统和哺乳动物细胞系统相比,植物表达系统生产疫苗有以下的优点[7,8]:①植物的组织、细胞、原生质体均能在离体条件下诱导再生成一个完整的植株,且培养、种植条件简单易成活,可降低成本。②植物表达系统生产的蛋白质疫苗可进行正确加工,保持了自然状态下的免疫原性。③转基因植物生产的疫苗不会感染人体,因而更具有安全性。④转基因植物细胞是可以启动粘膜免疫的有效途径。其机制可能是植物细胞壁给抗原提供了一种生物微囊,后者可保护抗原不被消化道酶所降解,并有缓释作用。⑤植物表达系统生产的疫苗可以直接储存在植物种子和果实中,易于长距离运输和普及推广。⑥转基因植物中的外源基因可通过植物杂交的方式进行基因重组,生产高效的多价口服疫苗。

近年来轮状病毒疫苗的研究策略有两种途径:一种是研制减毒活疫苗,另一种是亚单位疫苗。但其活疫苗的稳定性以及由于病毒毒力回复带来的安全性问题是减毒活疫苗面临的本质上的缺陷,亚单位疫苗的研制策略是运用基因工程方法进行轮状病毒重组多肽疫苗的研究,目前尚没有成功的先例。植物基因转化技术的发展和完善为上述问题的解决提供了可以选择的另一途径。1995年以来开展了以番茄、香蕉生产口服食品疫苗。麻疹病毒抗原、狂犬病毒糖蛋白、天花病毒表面抗原均在番茄中获得成功表达[3~6]。

轮状病毒外壳蛋白VP4是病毒中和反应的主要目标,经胰蛋白酶裂解成蛋白VP5或VP8(P蛋白)两部分,可增强病毒的感染性。由于VP4作为同源抗原具有良好的异源中和抗体,因此以VP4作为抗原基因进行转基因番茄的表达研究,将为研制开发有效的轮状病毒疫苗探索一条新的途径。

参考文献:

[1] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. Second Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1~50.
[2] Hofgen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for Agrobacterium transformation[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16(20): 9 877.
[3] Huang Z, Dry I I, Webster D, *et al*. Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice[J]. Vaccine, 2001, 19(15-16): 2 163—2 171.
[4] Gil F, Brun A, Wigdorovitz A, *et al*. High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants[J]. FEBS Lett, 2001, 488(1-2): 13—17.
[5] Richter L J, Thanavala Y, Arntzen C J, *et al*. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(11): 1 167—1 171.
[6] Tacket C O, Mason H S, Losonsky G, *et al*. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes[J]. J Infect Dis, 2000, 182(1): 302—305.
[7] Langridge W H. Edible vaccines[J]. Sci Am, 2000, 283(3): 66—71.
[8] Haq T A, Mason H s, Clements J D, *et al*. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants[J]. Science, 1995, 268(5 211): 714—716.

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2002)08-0894-01

妊娠合并卵巢两性母细胞瘤扭转破裂1例

A case report of pregnancy complicated with torsive and ruptured gynandroblastoma

王晓峰,夏华琼 (重庆市涪陵中心医院妇产科,重庆 408000)

患者,吴某,27岁,因停经3月下腹疼痛3 h,于2001年1月2日入院,本次月经2000年9月26日,停经后无明显早孕反应,于入院前3 h睡觉中突然觉下腹疼痛,为持续性隐痛,阵发性加剧,以左下腹痛为甚,同时伴头昏、心慌。入院后查体,T 36.8 ℃,P 120次/min,BP 10.5/5.6 kPa,贫血貌,痛苦病容,心肺未发现异常,腹部膨隆,肌紧张,脐下两横指扪及色块,界线不清,妇科检查宫颈软,子宫大小界线不清,盆腔内包块近5月孕大,有压痛、反跳痛、腹肌紧张,B超检查子宫增大3月孕,宫内见完整胎儿图像,有胎心搏动,在子宫的上方见12 cm×7.8 cm×10 cm大小的包块,边界完整,内为低液混合回声。入院后2 h在硬膜外

(下转897页)

作者简介:王晓峰(1955—),女,重庆市涪陵区人,主治医师,主要从事妇产科方面的研究。电话:(023)72223057
收稿日期:2002-03-08;修回日期:2002-06-20

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

体便处于失代偿状态, 从而导致继发性损害。在应激反应中糖皮质激素效应起着至关重要的作用, 机体在应激反应时糖皮质激素(Glucocorticoids, GC)分泌增多, 其意义在于对抗应激激活的以炎症反应为主的防御反应, 使防御反应不至于过强而破坏机体的内环境稳态[3]。然而, 当机体受到严重创伤时, 虽然 GC 分泌显著增多, 但是临床上仍需应用大剂量外源性 GC 进行救治, 提示严重创伤时机体在糖皮质激素效应的某一环节上发生了失调。

本研究从蛋白水平深入探讨了严重烫伤大鼠早期不同时相点肝脏 GR 的表达改变, 结果显示烫伤后早期肝脏 GR 表达显著下调。GR 的表达下调必然会导致其转录激活能力下降和功能受抑。徐仁宝等[4,5]运用放射受体配基分析技术曾发现烫伤以及失血性休克大鼠肝胞液 GR 数目会减少, 烫伤及失血的程度越重, GR 减少幅度越大, 动物的生命状况越差, 死亡率越高。说明严重创伤后糖皮质激素效应的失常与 GR 表达下调密切相关。

是什么原因引起严重创伤后 GR 表达的下调呢? 本实验结果发现, 严重烫伤大鼠肝脏 GR 下调的过程中外周血皮质酮和 TNF-α、IL-1 等炎性细胞因子显著升高。为了深入分析它们与 GR 变化之间的关系, 我们通过体外细胞培养观察了烫伤血清和地塞米松刺激后对 GR 表达的影响, 结果显示烫伤血清对 GR 表达有显著的下调作用, 而地塞米松作用不明显, 说明烫伤动物血液中有对 GR 起下调作用的物质, 但是这种物质不是 GC。设想, 如果高浓度 GC 能够引起 GR 的表达显著降低, 那么再给严重创伤患者应用大剂量 GC 就失去了其治疗意义, 事实上, 在严重创伤等危重病人的急救时常常应用大剂量外源性 GC, 因此, 从临床实际用药来看大剂量 GC 应该不会引起 GR 的表达下调。

进一步分析 TNF-α、IL-1 对培养肝细胞 GR 的作用后发现, 它们可以引起 GR 表达显著下调。结合体内实验 GR 与炎性细胞因子的变化时间来看, TNF-α、IL-1β 在烫伤后早期 15 min 有一分泌高峰, 而肝脏 GR 的表达则在烫伤后 30 min 才开始发生显变化, 同时由于实验取材限制, 我们选用第一个时相点即为 15 min, 因此不怀疑在这之前这些炎性细胞因子就已经开始升高。另外, 本实验室同期的其他研究也表明, 给大鼠注射 TNF-α 和 IL-1 的中和性抗体可以显著提高肝脏 GR 的亲和力和受体数目, 并能降低外周血 TNF-α、IL-1 的含量[6]。从而间接证实本实验所发现的 TNF-α 和 IL-1 能够引起 GR 表达下调这一现象。所以, 通过对结果的综合分析, 我们认为严重创伤后早期炎性细胞因子增多可能是引起机体 GR 表达下调的一个主要原因。

已知, GR 具有抑制 TNF-α、IL-1 等炎性细胞因子生成和释放的功能[7,8]。但是, 还未见到严重创伤时 TNF-α、IL-1 可以反过来影响 GR 表达和功能的相关报道。我们的研究提示, 严重创伤时 GR 和炎性细胞因子之间存在着相互影响, 细胞因子的增多引起 GR 表达下调, GR 表达下调则进一步加重了炎性细胞因子的分泌和生成, 从而促进炎症反应的进一步加重, 造成炎症反应失控, 形成继发性全身损害。

参考文献:

[1] Barens P J, Adock I M. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechansims[J]. Trends Pharmacol Sci, 1993, 14(2): 436—441.

[2] Zhou D H. Characterization of a silencer element in the human aromatase gene[J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 353(2): 213—220.

[3] Munck A, Guyre P M, Holbrook N J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions[J]. Endocr Rev, 1984, 5(1): 25—44.

[4] 徐仁宝, 谭金兴. 病理性应激时大鼠肝胞液糖皮炙激素受体的变化[J]. 生理学报, 1982, 34(4): 460—465.

[5] 石汉平, 李建珍, 秦路平, 等. 失血大鼠肝、脑组织糖皮质激素受体的变化及意义[J]. 中国危重病急救医学, 1996, 8(10): 577—578.

[6] 刘都户, 粟永萍, 楼淑芬 等. 烫伤大鼠肝组织糖皮质激素受体的变化及α-MSH、合成肽 KPV 的调节作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(5): 550—552.

[7] Auphan N, DiDonato J A, Rosette C, *et al*. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis[J]. Science, 1995, 270(5 234): 286—290.

[8] De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors[J]. J Neuroimmunol, 2000, 109(1): 16—22.

(编辑　陈聪连)

(上接 894 页)

麻醉下行剖腹探查术, 术中见腹膜呈紫蓝色, 腹腔内有暗红色积血约 1 200 ml, 左侧卵巢增大约 18 cm× 15 cm× 15 cm 蒂部逆行时针扭转 180°, 其右下方底部两侧均有较大破口, 其内为淡黄色质脆鱼肉样组织及陈旧性血凝块, 子宫增大如 3 月孕。术中行左卵巢肿瘤切除术, 术后病理报告为卵巢两性母细胞瘤, 术后半月行药物引产终止妊娠。

讨论

两性母细胞瘤是十分罕见的卵巢肿瘤, 由于肿瘤由颗粒-泡膜成分和支持-间质成分组成, 瘤细胞可以分泌雌激素, 亦可分泌雄激素, 因此, 临床上出现内分泌变化的多种表现, 该病例在内分泌改变下妊娠更为罕见。目前卵巢两性母细胞瘤被视为良性肿瘤, 因为肿瘤形态学上呈良性表现, 尚无临床复发及转移的报道, 但肿瘤成分中有大量颗粒细胞瘤成分时, 因颗粒细胞属低度恶性肿瘤, 所以有复发的可能。对这组病人要长期严密随访, 并争取用血浆肿瘤标记 inhibin mlc2 等监测, 对于肿瘤的预后还需深入观察研究, 才能有确切的定论。

关键词: 妊娠; 卵巢肿瘤; 扭转破裂
中图法分类号: R737.31　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 郎景和, 唐敏一. 卵巢性腺间质瘤[A]. 见林巧稚 主编, 妇科肿瘤[M]. 北京: 人民出版社, 1982.185—209.

[2] Biscotticv, Hart W R. Juvenile granulosa cell tumors of the ovary[J]. Arch Pathol Lab Med, 1989, 113(6): 40.

(编辑　薛国文)

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