保持环状,有利于下一步λ噬菌体的包装。但是,无外源基因插入的质粒仍存在 *Swa* Ⅰ酶切位点,而被切开线性化,使其不利于λ噬菌体的包装,不能导入细菌中扩增,从而使阳性克隆出现率显著提高。

用DNA-末端蛋白复合物(DNA-TPC)可以明显提高重组腺病毒的转染效率。Ad5腺病毒基因组在其DNA5′末端共价结合有末端蛋白(TP),TP可保护病毒核酸免受外切酶攻击,在病毒感染细胞并脱壳后,可指导病毒核心颗粒入核并在附着于核基质的过程中起作用。Miyake等首先将目的基因的表达盒用单一酶切位点 *Swa* Ⅰ引入克隆有腺病毒全长基因组的柯氏质粒中,用柯氏质粒与DNA-TPC共转染293细胞,使重组腺病毒阳性率提高了几十倍到几百倍[5,6]。

在鉴定柯氏质粒载体中是否有目的基因插入及插入方向时,作者采用PCR扩增技术,在同一PCR体系中加入腺病毒特异引起物和MMP13 cDNA的特异引物,可迅速、准确地鉴定出阳性克隆。且在PCR粗筛后,将所得质粒用 *Sal*Ⅰ酶切后亚克隆为带有目的基因的重组质粒,进一步酶切鉴定是否有插入及插入方向。

参考文献:

[1] Vorburger S A, Hunt K K. Adenoviral gene therapy[J]. Oncologist, 2002, 7(1): 46—59.
[2] 刘 林,罗成基,粟永平. 复制缺陷型人TPO重组腺病毒的构建与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(5): 314—317.
[3] Nasz I, Adam E. Recombinant adenovirus vectors for gene therapy and clinical trials[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2001, 48(3—4): 323—348.
[4] Miyake S, Makimura M, Kanegae Y, *et al*. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(3): 1 320—1 324.
[5] Yoshida Y, Sadata A, Zhang W, *et al*. Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma[J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(17): 2 503—2 515.
[6] Okada T, Ramsey W J, Munir J, *et al*. Efficient directional cloning of recombinant adenovirus vector using DNA-protein complex[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(8): 1 947—1 950.

(编辑 张 宁)

文章编号:1000-5404(2002)07-0809-01

个案与短篇

老年死亡461例临床分析

Clinical analysis of the death of 461 old men

童一平,王 凯,蔡玉瑾 (重庆市第八人民医院老年科,重庆 400015)

1 临床资料

一般资料:查阅1992年4月—2001年12月60岁以上的住院死亡病例461份。根据住院病历的出院诊断、死亡诊断确定疾病的分类,以内科学教材(第5版)诊断标准为依据[1]。

男女死亡病例构成:本组461例死亡病例,男为298例,占64.64%,女为163例,占35.36%,男性死亡较女性高。

内外科疾病的构成:本组461例死亡病例中内科411例,占89.15%,外科50例,占10.85%,老年死亡病例以内科为主。

基础疾病与死亡例数构成比,见表1。

表1 基础疾病与死亡例数构成比

基础疾病	例数	构成比(%)
呼吸系统	143	31.02
恶性肿瘤	112	24.30
脑血管	81	17.57
心血管	75	16.27
消化道	24	5.21
泌尿道	11	2.39
糖尿病	11	2.39
其他	4	0.86
合计	461	100.00

合并症与死亡病例的构成比,见表2。

表2 不同合并症与死亡例数的构成比

合并症	例数	构成比(%)
1种	29	6.29
2种	58	12.58
3种	74	16.05
4种	113	24.51
5种	187	40.56
合计	461	100.00

2 讨论

从461例住院死亡病例看,男性为298人,占64.64%,女性为163人,占35.36%,男女死亡比例为2∶1。男性的死亡比女性高,与国内外统计的结果基本相似。原因有待于进一步探讨。

按内外科住院病例来进行死亡分类,在461例死亡病例中内科为411人,占89.15%,而外科仅为50人占10.85%。老年人生理防御功能、免疫功能随年龄的增长而逐年减弱,并有不同程度的多器官功能减弱,造成手术机会减少,而出现老年人外科死亡率比内科低。

从表1可见呼吸系统疾病占首位,肿瘤为第2位,这与上海市的死因调查一致[2]。呼吸系统为首位可能与重庆市环境

(下转812页)

作者简介:童一平(1952—),女,重庆市人,副主任医师,主要从事老年病临床方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)63852670

收稿日期:2001-12-05;修回日期:2002-01-21

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

达,其菌密度及 rhGH 表达量均较高。结果见图 4。

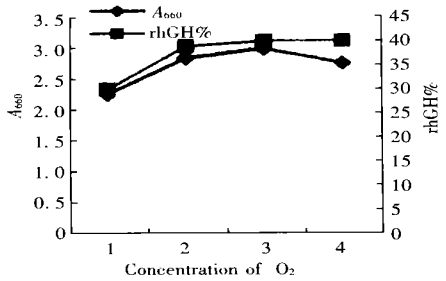


图 4 培养基氧浓度对细菌生长及表达 **rhGH** 的影响

Fig 4 Effects of O_2 concentrations on rhGH expression

2.4 起始诱导时间及诱导表达时间对细菌生长和 rhGH 表达的影响

在半对数期生长期(培养 4~5 h)迅速升温可获得较高的重组蛋白表达量,且菌密度应控制在 A_{600nm} 3.0 之前诱导均有利于重组蛋白表达,见表 2。因为早期诱导达不到一定菌密度,培养基营养成份得不到充分利用。而后期营养的消耗和生长环境恶化可能导致外源基因表达能力的降低。在确定最佳起始诱导时间后,我们设定了 7 个诱导表达时间 1、2、3、4、5、6、8 h。结果显示,见表 3。不同表达时间对 rhGH 表达均有所不同。细菌开始诱导后其生长明显减慢,而表达量由占菌体总蛋白 18%徒升至 32%,4 h 后表达量达 40%,说明诱导后细菌的能量主要消耗在外源基因表达上。随着诱导表达时间的延长,细菌生长虽不断上升,但表达量却不断下降。因此诱导表达时间以 4~5 h 为宜。

表 2 不同起始诱导时间对细菌生长及 **rhGH** 表达量的影响

Tab 2 Effects of different starting time of induction on rhGH expression

Ttime of starting induction (h)	Density of Bacterium(A_{600})		RhGH
	Induced beginning	Induced ending	Expression ratio(%)
4	2.45	2.93	40
5	2.92	3.22	40
6	3.25	3.34	38
7	3.46	3.61	35
8	3.65	3.84	32

表 3 不同诱导表达时间对细菌生长及 **rhGH** 表达量的影响

Tab 3 Effects of different inducing time on rhGH expression and bacterial growth

Time of inducing expression (h)	1	2	3	4	5	6	8
Bacterium Density of induced end A_{600}	1.84	2.06	2.17	2.23	2.28	2.29	2.30
Expression ratio of rhGH(%)	18	32	38	40	40	39	36
Dry weight of bacterium(g/l)	10.8	13.1	13.5	13.8	14.2	14.7	15.9

综上所述,我们认为,不同目的基因的蛋白表达在不同宿主菌中不尽一致,选择最适宿主菌尤为重要;此外,良好的培养基、稳定的 pH 及氧供给对提高菌量及目的蛋白表达也有重要影响,三者缺一不可,在此基础上选择最佳发酵时机及诱导表达时间,优化其培养条件,改善设备条件,可确定周期短、产率高、稳定、可靠的发酵工艺。本所构建的工程菌 DH5α/PBV-GH,在 pH7.5~7.8 的 TB 培养基中发酵生长 10 h,可使菌量最佳扩增,目的产物 rhGH 表达效率最高,上述研究为工业化生产奠定了基础。

参考文献:

[1] Beckers V, Milet J, Legros J J. Prolonged treatment with recombined growth hormone improves bone measures: study of body composition in 21 deficient adults on treatment[J]. Ann Endocrinol, 2001, 62(6): 507—515.

[2] Kolstad O, Jenssen T G, Ingebretsen O C, *et al*. Combination of recombinant human growth hormone and glutamine-enriched total parenteral nutrition to surgical patients: effects on circulating amino acids[J]. Clin Nutr, 2001, 20(6): 503—510.

[3] 李为勤, 黎介寿, 许宝华, 等. 重组人生长激素和全肠外营养支持对腹腔感染患者低白蛋白血症的治疗作用[J]. 中华外科杂志, 1998, 36(11): 643—645.

[4] Lahijni R, Hully G, Soriano G, *et al*. High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation[J]. Hum Gene Ther, 1996, (16): 1 971—1 975.

[5] 刘社际, 杨立明. 重组人生长激素在大肠杆菌 BL21(DE3)中高效表达研究[J]. 生物技术通讯, 2000, 11(4): 264—267.

[6] 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 908—909.

(编辑 郭建秀)

(上接 809 页)

污染,酸雨、大气污染及吸烟人员较多有关;而心血管位于第 4 位,这可能由于重庆的经济状况及山城坡高路陡,人们长期爬坡运动,从而减少了血管硬化和粥样斑块的形成。

从表 2 统计上我们发现在 461 例死亡病例中 81.12%(16.05%+24.5%+40.56%)的老年病例除了死亡病因外常常合并三种以上的疾病,如一个慢性支气管炎可同时合并高血压、糖尿病、冠心病等,这可能是与 60 岁以上的老年人本身就因各种器官功能的减退是各种疾病的易感人群,而且合并症多少与年龄的增长有关系。

综上所述,老年人防止疾病转危的重点应放在呼吸系统,必须提高老年人的免疫、防御功能,减少各种器官功能的损伤,在用药和治疗中注意各系统器官的保护工作,减少死亡率,提高老年人的寿命。

关键词:老年疾病;死因

中图法分类号:R195.4 文献标识码:B

参考文献:

[1] 叶任高. 全国高等医药院校教材内科学[M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 2.

[2] 宋桂香, 杨 青. 上海市 1988~1992 年老年人死因调查[J]. 中华老年医学杂志, 1997, 16(2): 123—124.

(编辑 陈聪连)

Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net