DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.030

2.5 生物学活性检测

重组mhIL-18作用于经conA刺激的正常人PBMC 24 h后，细胞培养上清中检测到了IFN-γ。随着IL-18浓度的增高，上清中IFN-γ的含量也随之增加，在浓度为0.1、1.0和10.0 nmol/L时，诱导产生IFN-γ的量分别为51.7、128.3、497.0 IU/ml。

3 讨论

有活性的成熟的hIL-18(即mhIL-18)是由157个氨基酸组成的单条多肽，分子量约19×10^3，不含疏水信号肽序列及糖基化位点，适合于在大肠杆菌中表达[2]。国内已有多家单位开展hIL-18的基因克隆及其在大肠杆菌中表达的研究，但多为融合型表达，融合型表达虽然有助于重组蛋白的分离与纯化，但不适合于进行基因工程药物的研究与开发。进行非融合型表达的，表达量又不甚理想。为此，有必要构建一种hIL-18的非融合型高效表达载体，为大量获得非融合型重组hIL-18打下基础。

该研究首先从人肝脏Kupffer细胞扩增到编码mhIL-18的DNA片段。DNA测序分析表明，由肝脏Kupffer细胞来源的hIL-18 cDNA序列与从外周血及全肝组织来源的hIL-18 cDNA序列完全一致。

选择有效的表达系统是进行外源基因高效表达的重要前提。pet原核表达质粒是最有效的原核表达系统之一，它利用噬菌体T7启动子与T7 RNA聚合酶之间作用的高度特异性及高效性使外源基因在细胞中呈现高效表达，利用该载体，mhIL-18基因未经修饰即在大肠杆菌中获得了高效表达。且表达产物以包涵体形式存在，有利于目的蛋白的纯化。纯化的包涵体中，目的蛋白的纯度已达80%以上，透析复性后包涵体蛋白具有透导人PBMC产生IFN-γ的能力，为后续的工程菌发酵及大规模分离纯化打下了很好的基础。

参考文献：

[1] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, *et al*. Cloning of a new cytokine that induce IFN-gamma production by T cells[J]. Nature, 1995, 378(6 552): 88－91.
[2] Ushio S, Namba M, Okura T, *et al*. Cloning of the cDNA for human IFN-γ-inducing factor, expression in Escherichia coli and studies on the biological activities of the protein[J]. J Immunol, 1996, 156(10): 4 274－4 279.
[3] Dinarello C A. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family[J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 101(1): 11－24.
[4] Golab J. Interleukin-18-interferon gamma inducing factor-a novel player in tumor immunotherapy[J]. Cytokine, 2000, 12(4): 332－338.
[5] Ohkusu K, Yoshimloto T, Takeda K, *et al*. Potentiality of IL-18 as a useful reagent for treatment and prevention of Leishmania Major infection[J]. Infect Immun, 2000, 68(15): 2 449－2 456.
[6] Okamoto I, Kohno K, Tanimoto T, *et al*. IL-18 prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice[J]. J Immunol, 2000, 164(11): 6 067－6 074.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)02-0186-01

子宫阔韧带结石和卵巢巨大结石2例报告

Report of a case with calculus of broad ligament of uterus and another great calculus of ovary

钱 锋，蔡志民，姜 军 (第三军医大学附属西南医院普通外科，重庆 400038)

病例1：女，55岁，因反复右下腹痛半年，加重20 d于1994-05-05入院。腹痛为持续性隐痛，阵发加重，向会阴部放射，感肛门坠胀，排便后症状可稍缓解。腹部、直肠、阴道三合诊检查于直肠子宫陷窝位置可触及一8 cm×8 cm×6 cm包块，质硬，光滑，固定，有触痛。B超提示：子宫后方实质不均质肿块。腹部X线片见盆腔内有一8 cm×7 cm×6 cm分叶状高密度影(较骨密度高)，位于耻骨联合上缘4 cm、骶尾椎前1 cm。硬膜外麻醉下行剖腹探查发现：盆腔内有一包块，与子宫直肠粘连，将直肠推向左后方，子宫推向右前方，游离后见包块位于左侧卵巢内。切除包块及左卵巢、输卵管。术后检视：包块为卵巢内结石，外观为椭圆体，9 cm×7 cm×6 cm，重达235 g，表面呈结节状，质地异常坚硬，锯开见剖面为灰白色实心组织，硬若骨皮质。病理诊断：卵巢结石。

作者简介：钱 峰(1967－)，男，云南省祥云县人，硕士，主治医师，主要从事腹腔感染及胃癌方面的研究，发表论文6篇。电话：(023)68753793
收稿日期：2001-01-20；修回日期：2001-09-20

病例2：女，60岁，因下腹隐痛不适2 d就诊，于2000-08-20入院。检查：下腹部明显膨隆，如妊娠7个月大小。B超提示：下腹部巨大囊肿。CT示：下腹部低密度肿块，CT值16～18 Hu，最大截面为25 cm×14 cm；另外发现在子宫上方位置有一2 cm×2 cm高密度钙化灶。在硬膜外麻醉下行剖腹探查，见腹腔肿块为左侧卵巢囊肿，切除后测量大小为23 cm×21 cm×15 cm，内为清淡液体，总重量为3 150 g；在右侧子宫阔韧带内有一质硬肿块，分离切除，见一2 cm×2 cm×2 cm结石，表面呈结节状，质地坚硬，重6.21 g。病理诊断：①卵巢囊肿；②右侧子宫阔韧带结石。

讨论

卵巢结石和子宫阔韧带结石相当罕见，追朔近10年国内文献仅有个别零星报道，亦多为卵巢钙化斑或畸胎瘤。卵巢钙化斑或卵巢畸胎瘤内的钙化物一般都很小，很少超过1 cm，影

(下转188页)

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

产生交叉耐药，见表 1。

2.2 P-170、MRP 阳性表达率

P-170 在 HL-60 及 HL-60/Mx 细胞中的表达无显著性差异。MRP 在 HL-60 及 HL-60/Mx 细胞中表达有非常显著性差异（$P<0.01$），见表 2。

表 1 HL-60/Mx 细胞耐药谱（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Changes of drug resistance of HL-60/Mx cells（$\bar{x}\pm s$）

	IC50（ng/ml）		RF
	HL-60	HL-60/Mx	
Mx	12.4±4.2	188.2±20.1	15.2
VCR	3.1±0.5	35.1±5.2	11.3
MTX	3.6±0.9	13.2±4.5	3.8
THP	36.6±3.1	422.7±130.7	11.6
Vp16	324.2±42.5	3044.5±411.8	9.4

表 2 P-170、MRP 在两细胞系中的阳性表达率（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Rates of expression of P-170, MRP in HL-60 cells and HL-60/Mx cells（$\bar{x}\pm s$）

	HL-60（%）	HL-60/Mx（%）	*P* value
P-170	5.6±1.6	6.0±1.3	0.2109
MRP	6.2±1.7	10.0±2.2	0.0044

3 讨论

目前，化学治疗仍然是白血病及其他恶性肿瘤的主要治疗方法，然而在化疗过程中，MDR 的产生不可避免，直接影响化疗效果。MDR 的产生导致肿瘤细胞对多种化疗药物的全面耐受，是白血病治疗过程中急需攻克的难题之一[2,3]。体外建立 MDR 细胞系，为研究 MDR 机制、寻找逆转耐药方法提供了基本的条件，对提高化疗效果、最终根治白血病有重要意义。米托蒽醌属于蒽环类抗肿瘤药物，分子量为 444.49（$C_{22}H_{28}N_4O_6$），通过与细胞 DNA 分子结合，抑制核酸合成而导致细胞死亡，与其他蒽环类药物无交叉耐药性。我们将 HL-60 细胞反复暴露在浓度递增的 Mx 环境中，结合低浓度持续刺激，建立了 HL-60/Mx 细胞系。此细胞系不但对 Mx 耐药（RF：15.2），同时对化学结构和药理作用均不相同的 VCR、MTX、THP、Vp16 产生耐药，RF 分别达 11.3、3.8、11.6、9.4，与临床病人对药物的抗性倍数 2～10 倍基本符合[4]，适合 MDR 研究。

白血病细胞表达 ATP 结合膜转运蛋白（ATP-binding cassette transporter），P-170、MRP、LRP（Lung resistance related protein）以及新近发现的 BCRP（Breast cancer resistance protein）是 MDR 的重要机制之一[5～7]，是否表达 ABC 也成为鉴定 MDR 的一个重要手段。本实验显示 HL-60/Mx 细胞系 MRP 表达阳性率较产生耐药前明显增高（$P=0.0044$），而 P-170 表达阳性率无明显变化，与美国组织、细胞培养中心（ATCC）提供的资料一致。目前，国内外许多细胞研究所均可提供 MDR 细胞系，但大多价格昂贵且无具体耐药谱资料，自行诱导不但费时、费力，最主要问题是没有经典诱导方法。本实验通过参考许多实验室诱导产生 MDR 方法的优点，建立了反复暴露合并小剂量负荷的诱导方法，成功地用米托蒽醌诱导出了 HL-60/Mx 细胞系。此方法具有简便、需时短、成功率高等优点，不失为自行建立 MDR 细胞系的好方法。完整、详细的耐药细胞资料还应该包括耐药的持久性、细胞遗传学变化、分子生物学变化方面的内容，如耐药性是否伴有染色体变化，是否伴有 bcl-2、bax、Fas/Fasl、P53 等表达的变化，以及是否伴有拓扑异构酶Ⅱ表达的改变等。这些方面的工作有待进一步研究。

参考文献：

[1] Sergeant J M, Jailor C G. Appraisail of the MTT assay as a rapid test of chemo-sensitivity in acute myeloid leukemia[J]. Br J Cancer, 1989, 60(2): 206－210.

[2] Mansson E, Paul A, Lofgren C, *et al*. Cross-resistance to cytosine arabinoside in a multidrug-resistant human promyelocytic cell line selected for resistance to doxorubicin: implications for combination chemotherapy[J]. Br J Haematol, 2001, 114(3): 557－565.

[3] Lehne G. P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer[J]. Curr Drug Targets, 2000, 1(1): 85－99.

[4] Antamank, Eder J P, Elias A, *et al*. High dose combination alkylating agent preparation regimen with antologous bone marrow support: the Dara Farker Cancer Znstitutc/Beth Israel Hospital experience[J]. Cancer Treatment Reports, 1987, 71(2): 119－125.

[5] Ross D D. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia[J]. Leukemia, 2000, 14(3): 467－473.

[6] Lage H, Perlitz C, Abele R, *et al*. Enhanced expression of human ABC-transporter tap is associated with cellular resistance to mitoxantrone[J]. FEBS Lett, 2001, 503(2-3): 179－184.

[7] Kim C H, Gupta S. Expressio of TRAIL (Apo2L), DR4 (TRAIL receptor 1), DR5 (TRAIL receptor 2) and TRID (TRAIL receptor 3) genes in multidrug resistant human acute myeloid leukemia cell lines that overexpress MDR1 (IIL60/Tax) or MRP (IIL60/AR)[J]. Int J Oncol, 2000, 16(6): 1 137－1 139.

（编辑 王 红）

（上接 186 页）

像诊断常误诊为输尿管结石或膀胱结石。结石的成因不清楚，子宫阔韧带结石可能是某种非特异炎症致钙盐在子宫阔韧带软组织内沉积所至，卵巢结石可能是在卵巢囊肿的基础上发生。此前仅见的 1 例卵巢巨结石为 1999 年汪新亚[1] 所报道，大小为 6.5 cm×7.5 cm。

与泌尿系结石和胆结石不同，卵巢结石和子宫阔韧带结石症状不典型，本身又极罕见，因此多在行下腹部影像学检查时偶然发现，但多数结石常被误诊为来源于泌尿系统，术前很少确诊。影像检查发现的盆腔高密度影，应常规行泌尿系造影加以鉴别诊断，只要思想重视术前应可明确诊断。卵巢结石和子宫阔韧带结石的治疗，若结石较小手术剥出即可，若结石巨大难以剥离，则行一侧附件切除，本报告两例病人均痊愈出院。

关键词：子宫阔韧带结石；卵巢巨大结石

中图法分类号：R711.7 文献标识码：B

参考文献：

[1] 汪新亚. 卵巢囊肿巨结石一例[J]. 临床放射学杂志, 1999, 18(5): 22.

（编辑 冯崇英）

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