DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.007

插入到杆状病毒穿梭载体Bacmid，然后将提取的重组Bacmid DNA转染入昆虫细胞，即可获得含有外源基因的重组病毒用于表达目的蛋白。

为了便于表达产物的纯化，我们应用经过改构的pFASTBAC载体，即在基因的C末端引入了6×His°tag纯化标签（带终止密码），基因的上下游引物分别引入对应的酶切位点*Sal* I和*Hind* III，且下游引物不含有终止密码子。基于在tLBP的C-末端加上纯化标签而不在N-末端，我们考虑，其一是由于tLBP的N-末端有25个氨基酸的信号肽，表达产物要切下这段信号肽才能分泌到胞外，因而不容易引入6×His°tag；其二是考虑到在N-末端添加非天然的序列可能会影响tLBP蛋白的结构和生物学活性。

目前，围绕LPS诱导体内损害途径的防治研究大致包括阻断胞内信号传导、拮抗膜受体、阻断胞外LPS损伤效应以及中和体内LPS等[11,12]。由于LBP蛋白的N-末端1～197位残基（tLBP）具有LBP的部分活性，且发挥着与LBP竞争结合LPS或中和LPS的作用。基于此点，进行tLBP的结构与功能探讨将对LPS介导的临床感染、脓毒症等疾病的基础和防治研究提供理论依据。

参考文献：

[1] Schumann R R, Lamping N, Kirschning C, *et al*. Lipopolysaccharide binding protein: its role and therapeutical potential in inflammation and sepsis[J]. Biochem Soc Trans, 1994, 22(1): 80—82.

[2] Usui M, Hanamuru N, Hayashi T, *et al*. Molecular cloning, expression and tissue distribution of canine lipopolysacchride (LPS)-binding protein [J]. Biochem Biophys Acta, 1998, 1397(2): 202—212.

[3] Han J, Mathison J C, Ulevitch R J, *et al*. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein, truncated at Ile-197, binds LPS but does not transfer LPS to CD14[J]. J Biol Chem, 1994, 269(11): 8 172—8 175.

[4] Theofan G, Horwitz A H, Willams R E, *et al*. An amino-terminal fragment of human lipopolysaccharide-binding protein retains lipid A binding but not CD14-stimulatory activity[J]. J Immunol, 1994, 152(7): 3 623—3 629.

[5] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第2版. 北京：中国协和医科大学出版社，1999. 456—465.

[6] Schumann R R, Leong S R, Flaggs G W, *et al*. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein[J]. Science, 1990, 249(4 795): 1 429—1 431.

[7] 龙建银，刘建强，薛沿宁，等. 人脂多糖结合蛋白基因的克隆及序列测定[J]. 生物化学与生物物理进展，1998，25(5)：469—471.

[8] 张学敏，王宜强，沈倍奋. 靶向新基因的分子克隆策略——理论与方法[M]. 北京：军事医学科学出版社，1999. 44—50.

[9] Hubacek J A, Buchler C, Aslanidis C, *et al*. The genomic organization of the genes for human lipopolysaccharidebinding protein (LBP) and bactericidal permeability increasing protein (BPI) is highly conserved[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 236(2): 427—430.

[10] Kirschning C J, Au-young J, Lamping N, *et al*. Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins[J]. Genomics, 1999, 46(3): 416—425.

[11] Scott M G, Vreugdenhil A C E, Buurman W A, *et al*. Cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein[J]. J Immunol, 2000, 164(2): 549—553.

[12] Iwagaki A, Porro M, Pollack M. Influence of synthetic antiendotoxin peptides on lipopolysaccharide (LPS) recognition and LPS-induced proinflammatory cytokine responses by cells expressing membrane-bound CD14[J]. Infect Immun, 2000, 68(3): 1 655—1 663.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)06-0640-01

非手术治疗重症急性胰腺炎17例

Non-surgical treatment of 17 cases of severe acute pancreatitis

李正平，李占京 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所肝胆外科，重庆 400042）

我们自1998年1月至2000年7月共收治重症急性胰腺炎（Severe acute pancreatitis, SAP）17例，均采用非手术治疗，现将结果报告如下。

1 临床资料

一般资料：17例均符合文献[1]重症急性胰腺炎的诊断标准，男9例，女8例，年龄23～75岁，平均43岁，发病时间3～48 h，平均17 h。入院时出现休克2例，肾衰4例，ARDS 3例，肠麻痹及血性腹水14例，黄疸4例，其中梗阻性黄疸3例，合并胆囊结石14例，胆总管结石3例，糖尿病5例。Bacthar CT分级D级6例，E级11例。

治疗方法：两组均采用施他宁和常规治疗。施他宁的应用方法：首次静脉推注0.25 mg，继后用5%葡萄糖溶液500 ml加施他宁3 mg，以每分钟8～15滴缓慢静脉滴注，持续3～5 d。B组在A组基础上加用中药清胰汤（主要组成：大黄，芒硝，柴胡，黄芩，胡黄连，白芍，木香，延胡索，加减）治疗，每天1剂，约500 ml，经胃管注入，每小时1次，每次30～40 ml，注入前吸尽胃液，注入后保留1 h，持续3～6 d。

2 结果

17例均治愈。治疗过程中，通常在施他宁连续治疗3 d左右，病情出现回转，表现为腹痛及上腹、腰背部紧缩感减轻。B组腹痛缓解同前述外，在清胰汤治疗后数小时，肠鸣音多可出现或恢复，通常6～24 h可首次解出深灰色混浊稀水样大便，继后每

（下转643页）

作者简介：李正平（1971—），男，湖南邵阳市人，主治医师，主要从事胰腺外科方面的研究。现在解放军477医院一外科工作，襄樊市 441021。电话：(0710)3211449

收稿日期：2000-08-04；修回日期：2001-04-14

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

位并可促进受体二聚化。在 AR 的 8 个外显子中, 外显子 B 和 C 高度保守, 很少发生突变[9], 且其核苷酸序列与其他甾体激素受体的同源性低; 该区完整性的破坏可导致 AR 无法与目的基因结合。因此, 本研究选择此区的 cDNA 序列作为构建 AR 反义 RNA 逆转录病毒载体的插入片段, 载体表达的反义 RNA 与 AR mRNA 互补结合后, 可阻断翻译的进行, 并可进一步被细胞内的 RNA 酶 III(针对双链 RNA)水解, 从而使细胞雄激素受体水平下降。采用反义 RNA 抑制 AR 表达, 目前国内外尚未见文献报道。

我们通过 PCR 的方法扩增了外显子 B 和 C 的绝大部分。PCR 在载体构建中应用较为广泛, 本研究通过在正、反向引物的 5′端设计上特定的限制性内切酶位点, 而在扩增产物的两端引进对应于载体的酶切位点, 引进的酶切位点可确保插入片段能够反向插入到逆转录病毒载体的多克隆位点。这样, 采用相同的限制性内切酶双酶切 pLXSN 和 PCR 扩增产物, T4 DNA 连接酶连接, 将 AR cDNA 片段定向亚克隆至 pLXSN, 从而构建出含有反向插入片段的重组逆转录表达载体, 后者在真核细胞内, 在 5' LTR 启动子和增强子的驱动下, 可以转录出 AR 反义 RNA。

本研究采用逆转录病毒载体 pLXSN 作为 AR 反义 RNA 表达载体。逆转录病毒载体的特点是细胞感染率高, 导入的基因拷贝数多, 外源基因表达稳定[10]。pLXSN 由美国 Miller[11] 改造而成, 并获得美国 FDA 临床试验许可证, 是目前较好的逆转录病毒载体。本实验挑取的 PA317 克隆, 其上清病毒滴度足以用于各种目的的实验。经 RT-PCR 鉴定, 上清中的逆转录病毒含 AR 目的片段。我们下一步的工作是用含逆转录病毒的上清感染前列腺癌细胞, 观察 AR 反义 RNA 对 AR 表达的抑制作用和对细胞生长的抑制作用, 本研究为下一步的工作奠定了基础。

参考文献:

[1] Kyprianou N, Isaacs J T. Quantal relationship between prostatic dihydrotestosterone and prostatic cell content: critical threshold concept[J]. Prostate, 1987, 11(1): 41—50.

[2] Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot[J]. Cell, 1995, 83(6): 851—857.

[3] Kallioniemi O P, Visakorpi T. Genetic basis and clonal evolution of human prostate cancer[J]. Adv Cancer Res, 1996, 68(1): 225—255.

[4] Koivisto P, Kolmer M, Visakorpi T, *et al*. Androgen receptor gene and hormonal therapy failure of prostate cancer[J]. Am J Pathol, 1998, 152(1): 1—9.

[5] Parker S L, Tong T, Bolden S, *et al*[J]. Cancer statistics, 1996. CA Cancer J Clin, 1996, 46(1): 5—27.

[6] 刘耀庭, 李秀霞, 程　伟. 泌尿外科肿瘤发病情况的变化[J]. 临床泌尿外科杂志, 1997, 12(1): 47—49.

[7] Mangelsdorf D J, Thummel C, Beato M, *et al*. The nuclear receptor superfamily: the second decade[J]. Cell, 1995, 83(6): 835—839.

[8] Brinkmann A O, Jenster G, Kuiper G G, *et al*. The human androgen receptor: structure/function relationship in normal and pathological situations [J]. J Steroid biochem Mol Biol, 1992, 41(3—8): 361—368.

[9] Lubahn D B, Brown T R, Simental J A, *et al*. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(23): 9 534—9 538.

[10] Mulligan R C. The basic science of gene therapy[J]. Science, 1993, 260(5 110): 926—932.

[11] Miller A D, Rosman G J. Improved retroviral vectors for gene tranfer and expression[J]. Biotechniques, 1989, 7(9): 980—982.

(编辑　汪勤俭)

(上接 640 页)

天腹泻数次甚至数 10 次, 病人腹痛及精神状态随之好转。两组中无消化道出血、肺部感染、胰腺假性囊肿等并发症发生。治疗过程中康复指标(从施他宁或清胰汤联合治疗开始)见表 1。

表 1　两组病例的康复指标比较

组别	n	开始排便时间(h)	体温恢复时间(d)	血淀粉酶恢复时间(d)	平均住院时间(d)
A 组	10	111.40±23.36	14.40±2.99	22.60±4.72	35.10±4.31
B 组	7	15.14±5.98*	7.86±1.77*	13.14±3.24*	19.00±4.32*

*: $P<0.001$ 与 A 组比较

3　讨论

重症急性胰腺炎的治疗观念及策略已发生很大变化, 除胰周脓肿必须行手术治疗外, 非手术治疗几乎已取代传统的早期手术治疗[2], 本组 17 例 SAP 采用非手术治疗, 效果满意。

施他宁为 SAP 提供了一种强有力的非手术治疗手段, 挽救了不少 SAP 病人的生命, 其作用机制主要是抑制胰酶和胃酸的分泌。据我们观察, 在应用施他宁 3 d 左右, 病情开始稳定, 表现为病人腹痛缓解及上腹腰背紧迫感减轻, 血淀粉酶下降或不再升高。虽然施他宁用于治疗 SAP 效果较好, 但由于胃肠功能恢复较慢, 病程仍较长。

SAP 时肠运动抑制, 肠腔扩张, 毒素和微生物聚积, 致肠粘膜缺血、缺氧, 屏障功能破坏, 细菌和内毒素从肠道进入血循环和器官, 导致坏死胰腺的感染和多脏器损害。动物实验表明, 所有的出血坏死性胰腺炎的严重损害均与细菌感染有关[3]。"攻里通下"对阻止其恶性循环极为重要。中药清胰汤具有良好的"攻里通下"作用, 其中起导泻作用的主要成分是大黄, 大黄的有效成分为大黄蒽醌, 该成分能直接刺激肠粘膜和奥尔巴赫神经节(肠肌丛神经节), 进而促进肠蠕动和发挥导泻作用[4], 使肠道内细菌数量下降, 减少了内源性细菌移位, 排出了内毒素, 并能保护肠粘膜。因此, 清胰汤在治疗中发挥肠道去污、减少内源性细菌易位以及促进肠蠕动等方面可能具有重要作用。本组治疗结果表明, 肠鸣音恢复是 SAP 病情好转的重要征象, 常规方法联合施他宁、清胰汤治疗能迅速改善 SAP 病情, 促进恢复, 缩短疗程和提高治愈率。

关键词: 胰腺炎, 重症; 药物疗法; 生长抑素; 大黄
中图法分类号: R576.053　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 中华医学会外科学会胰腺学组. 急性胰腺炎的临床诊断及分级标准[J]. 中华外科杂志, 1997, 35(12): 773—775.

[2] 刘胜利, 陈　峰, 杨德同, 等. 急性胰腺炎的非手术治疗[J]. 中国普通外科杂志, 1998, 8(3): 172—174.

[3] Marotta F, Geng T C, Wu C C, *et al*. Bacterial translocation in the cause of acute pancreatitis: beneficial role of nonabsorbable antibiotics and lactitol enemas [J]. Digestion, 1996, 57(6): 446—452.

[4] 陈晓理, 冉瑞图. 大黄治疗坏死性胰腺炎的机理探讨[J]. 华西医大学报, 1996, 27(4): 418—421.

(编辑　潘式文)

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