DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.006

SSH是筛选克隆差异表达基因的有效方法。同时在SSH技术应用过程中有以下几点体会,首先提取纯化优质足量的mRNA(≥2 μg)至关重要,mRNA的降解将影响SSH构建的消减文库质量。从mRNA纯化到双链cDNA的合成,要一气呵成。其次双链cDNA与接头的连接效率决定SSH成功与否,连接效率大于25%方可进行下一步实验,最后利用斑点杂交初步筛选cDNA消减文库可大大减少Northern杂交验证和测序工作量,是一个经济有效的方法,若与基因芯片技术结合,会进一步提高筛选效率。

参考文献:

[1] Diatchenko L, Lau Y C, Campbell A P, *et al*. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6 025—6 030.

[2] Von Stein O D, Thies W G, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(13): 2 598—2 602.

[3] Kuang W W, Thompson D A, Hoch R V, *et al*. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(4): 1 116—1 123.

[4] Wang X, Yaish-Ohad S, Li X, *et al*. Use of suppression subtractive hybridization strategy for discovery of increased tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 gene expression in brain ischemic tolerance[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18(11): 1 173—1 177.

[5] Pitzer G, Stassar M, Zoller M. Identification of renal-cell-carcinoma-related cDNA clones by suppression subtractive hybridization[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1999, 125(8—9): 487—492.

[6] 张 强,张志文,龚 侃,等.应用抑制消减杂交技术克隆鉴定肾癌特异表达基因[J].科学通报,2000, 16(45): 1 758—1 762.

[7] Den Hollander A I, van Driel M A, de Kok Y J, *et al*. Isolation and mapping of novel candidate genes for retinal disorders using suppression subtractive hybridization[J]. Genomics, 1999, 58(3): 240—249.

[8] 陈 杰,钱桂生.抑制消减杂交在肿瘤相关基因克隆中的应用[J].癌症,2000, 19(6): 614—616.

(编辑 王 红)

经验与短篇

文章编号:1000-5404(2001)02-0134-01

重度安定中毒致多脏器功能障碍1例报告

A case report of multiple system organ dysfunction resulted from severe Diazepam poisoning

赵洪雯,吴雄飞,彭罗民 (第三军医大学附属西南医院全军泌尿中心肾内科,重庆 400038)

患者女性,30岁,无业。因口服安定片剂270片(2.5 mg/片)及静脉注射安定注射液16支(5 mg/支)后昏迷、僵卧24 h,无尿3 d收入院,院外曾出现低血压性休克。入院查体:T:38.6℃,P:138次/min,R:23次/min,BP:17.0/9.5 kPa(多巴胺60 mg加入500 ml液体中静滴维持),意识丧失,双侧瞳孔等大等圆,直径1.5 mm,压眶反射和瞳孔对光反射消失,唇绀,颈静脉充盈,双肺呼吸音粗糙,可闻及广泛痰鸣音,双下肺可闻及中、细湿罗音,心率138次/min,律齐,各瓣膜听诊区未闻及杂音,腹软,移动性浊音(+),尿管通畅,尿液呈酱油色,全天40 ml,右上肢略红肿,双下肢呈压陷性水肿,右侧明显,并可见右大腿外侧红肿,皮温增高,四肢无自主活动,神经体征阴性。辅助检查:肾功示钾6.0 mmol/L,尿酸689 μmol/L,肌酐973 μmol/L,尿素36.89 mmol/L;肝功示谷丙转氨酶、谷草转氨酶明显增高;心肌酶谱示肌酸激酶1 324 IU/L,肌酸激酶同工酶108.8 IU/L,乳酸脱氢酶1 654 IU/L,羟丁酸脱氢酶622 IU/L;心电图示心肌损害。诊断:①多脏器功能障碍:急性肾功能衰竭;心肌损害;肝脏功能障碍;中枢神经系统损害;②安定药中毒。

患者入院后立即予血液灌流2.5 h加血液透析6 h,血液灌流2 h时患者压眶反射和瞳孔对光反射出现,但较迟钝,左上肢、左下肢可不自主活动。第2天改为持续非卧床腹膜透析(CAPD),4 h 1次,每天超滤2 500~3 500 ml,辅以保护心肌、护肝、右侧肢体局部理疗、支持等治疗。

入院后50 h开始苏醒,发现右侧肢体活动障碍,右大腿外侧压痛明显,仍红肿,但无肿块及液波感。头颅CT未发现明显异常。入院后11 d,进入多尿期,18 d肾功正常,乳酸脱氢酶和羟丁酸脱氢酶逐渐下降,肝功、肌酸激酶和肌酸激酶同工酶恢复正常,右下肢肿胀明显缓解,但仍遗留活动受限,右上肢功能正常。

讨论

安定属苯二氮䓬类镇静催眠药,分布容积大,经肝药酶代谢为多种活性产物,经肾排泄,血液灌流治疗效果显著。我科1995~1999年共收治12例安定中毒昏迷,其中11例于服药后2~5 h被发现而进行洗胃、利尿等处理后急诊血液灌流治疗,均在治疗过程中苏醒,未发生急性肾衰和其他严重并发症。有2例因症状反跳而进行第2次血液灌流,考虑为组织结合的药物释放入血所致。本例血液净化进行晚,药物已充分吸收并与组织结合,而且曾在院外发生低血压性休克,导致多脏器功能障碍。

因肾脏血液灌注不足,同时患者长时间右侧位僵卧,局部受压致部分肌肉溶解坏死产生大量肌红蛋白而出现酱油尿,肌红蛋白堵塞肾小管造成急性肾功能衰竭,即非外伤性横纹肌溶

(下转137页)

作者简介:赵洪雯(1970—),女,北京市人,硕士研究生,医师,主要从事肾脏病和肾移植方面的研究。电话:(023)65306969

收稿日期:2000-04-25;修回日期:2000-08-28

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

2.4　染色体分析

SPC-A-1/CDDP 细胞和 SPC-A-1 细胞染色体数目、大小无明显变化, 见图 4。

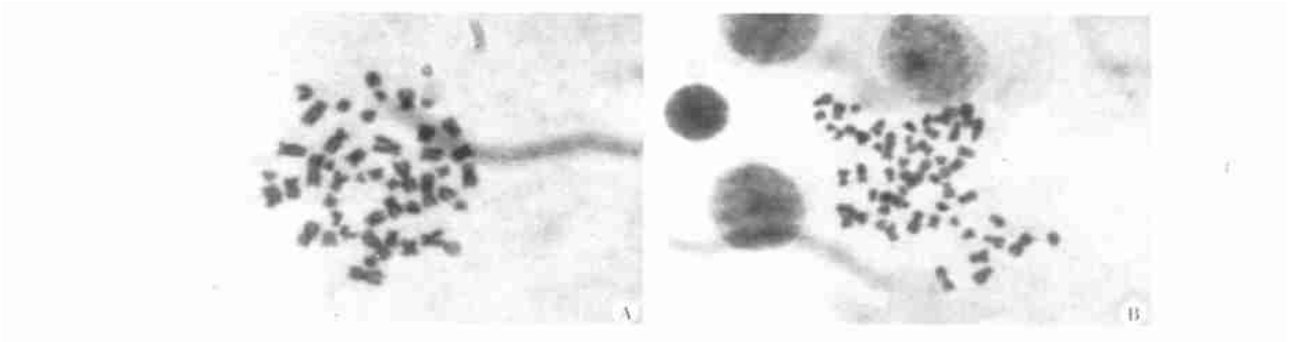


图 4　染色体分析结果　(吉氏染色× 1 000)

Fig 4　Results of the chromosome analysis　(Giemsa stain× 1 000)

A: SPC-A-1 cell; B: SPC-A-1/CDDP cell

3　讨论

体外建立多药耐药细胞系是研究肿瘤细胞产生多药耐药性机制的重要手段, 在细胞培养条件下应用抗癌药已成功地建立了包括白血病、卵巢癌、膀胱癌[3] 等多种 MDR 细胞系。目前大多采用逐步增加剂量法[4] 或大剂量冲击法进行诱导建株[5], 各有优缺点, 前者诱导时间长, 后者药物剂量不易控制。顺铂是肺癌化疗方案中的基本药物, 应用顺铂诱导建立的肺癌多药耐药细胞系具有代表性[6,7]。本研究采用大剂量冲击和逐步增加剂量相结合的方式, 以顺铂为诱导药物, 经过 192 d 的诱导, 建立了多药耐药细胞系。MTT 结果表明该细胞系对顺铂、5-氟尿嘧啶、丝裂霉素、长春新碱、和足叶乙甙等药物有不同程度的耐药性。但其相对耐药程度不同, 对 5—氟尿嘧啶的耐药性最强, 对足叶乙甙的耐药性最弱, 可能与药物的分子量、亲水亲脂性和作用机制有关[4]。生长曲线、倍增时间和形态学检测显示 SPC-A-1/CDDP 细胞性状稳定, 是可靠的人肺腺癌多药耐药细胞系, 可应用于下游实验, 同时提示大剂量冲击和逐步增加剂量相结合可缩短药物诱导时间。有研究表明阿霉素诱导的耐药细胞存在染色体畸变或重排现象[4], 但本研究的常规染色体检测未发现耐药细胞与亲代细胞间染色体的明显变化, 可能与检测方法的敏感程度有关, 采用 G 显带和核型分析有利于发现耐药细胞系的特征性改变。

(致谢: 衷心感谢第三军医大学附属西南医院病理学研究所卞修武教授在电镜阅片过程中的热情帮助和指导。)

参考文献:

[1] 司徒镇强, 吴军正 主编. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社西安分公司, 1996. 186—189.

[2] 胡义德, 钱桂生. 人肺腺癌 A549 多重抗药细胞株生物学特性的变化[J]. 第三军医大学学报, 1997, 1(5): 421—423.

[3] 鄂　征 主编. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994. 164—169.

[4] 李　曦, 郭先健, 黄桂君, 等. 人肺腺癌多药抗药细胞系 LC-3/CDDP 细胞周期及 DNA 含量变化[J]. 河南肿瘤学杂志, 1997, 10(2): 93—95.

[5] 陈　鹏, 刘叙仪, 赫复生. 耐顺铂人肺腺癌细胞系 A549/CDDP 的建立及耐药机制[J]. 中国肿瘤临床, 1995, 3(4): 582—587.

[6] Oie H K, Russell E K, Carney D N, *et al*. Cell culture methods for the establishment of the NCI series of lung cancer cell lines[J]. J Cell Biochem Suppl, 1996, 24: 24—31.

[7] Nishio K, Nakamura T, Koh Y, *et al*. Drug resistance in lung cancer[J]. Curr Opin Oncol, 1999, 11(2): 109—115.

(编辑　王　红)

(上接 134 页)

解症[1,2], 在吸毒、酒醉、一氧化碳中毒及药物性自杀时可见, 与一般的安定中毒不同。非外伤性横纹肌溶解症诊断上除急性肾衰外还可有局部肌肉肿胀尤其受压部位肿胀现象, 严重时肿胀肢体可变硬、起水疱、破溃感染及丧失功能, 同时可伴有高尿酸血症、高血清肌酶及酱油尿。此类患者应尽快进行血液净化治疗, 其中血液灌流因可吸附循环中的药物和肌红蛋白, 效果尤其显著, 血液透析[2] 和腹膜透析也有效, 早期还可予利尿剂、阿片受体阻滞剂纳络酮[3] 等。治疗应按病情采取综合措施, ①注意肢体局部处理, 尤其是肌肉溶解严重时需尽快清除局部坏死组织及肿胀组织减压, 防止肌肉进一步坏死溶解。②控制感染。③纠正水电解质和酸碱平衡失调, 其中高血钾的抢救尤为重要。④碱化尿液。⑤注意保持气道通畅。

关键词: 多脏器功能障碍; 中毒; 安定

中图法分类号: R971.4　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 陈统清, 黄英伟. 非外伤性横纹肌溶解症致急性肾功能衰竭 3 例[J]. 中华肾脏病杂志, 1998, 14(2): 113.

[2] 陈憬影, 陈胜生, 吴光苹, 等. 碳酸氢盐血透治疗横纹肌溶解相关急性肾衰: 附 2 例报告[J]. 福建医药杂志, 1998, 20(5): 76—77.

[3] Bell E F. The use of naloxone in the treatment of diazepam poisoning[J]. J Pediatr, 1975, 87(5): 803—804.

(编辑　薛国文)

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