DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.016

10 pg 水平，较传统方法提高1 000倍，可以检测出微量抗原，且反应迅速，最终的实验结果反映在X线片上，易于保存，检测后的膜经洗涤后可以重复利用，X线片可用来进行图像扫描分析，易于定量。本实验应用抗SP特异性抗血清结合经SDS-PAGE电泳后的相应特异蛋白质，然后与辣根过氧化物酶标记的IgG共孵育，最后用增强性化学发光试剂进行检测，是一种测定ALI前后BALF中SP含量的新技术。本实验结果表明，在X线片上得到的条带规则，背景干净，分辨率高，非特异性结合少，重复性好的X线片，目的带的位置与文献报道一致，X线片经用图像扫描分析，结果以面积×吸光度表示，得出目的蛋白质的相对含量。

分析ALI早期BALF中SP-A、SP-B含量下降的机制，可能与油酸的直接作用、Ⅱ型上皮细胞肿胀、脱落、空泡样变性、顽固性低氧血症、大量炎性细胞的侵入，释放大量氧自由基、细胞因子、蛋白水解酶有关[5,6]，一方面是破坏增加，另一方面是生成减少，就必然造成SP-A、SP-B含量的下降。

本实验建立的灵敏有效的SP含量变化监测方法可供实验研究采用。急性肺损伤早期即出现SP含量的下降，提示早期给予含SP的表面活性物质替代治疗或许对缓解ALI症状，抑制其病程起到重要作用。而急性肺损伤早期SP蛋白表达下降的机制将是我们需要进一步探讨的课题。

参考文献：

[1] Green K E, Wright J R, Steinberl K D. *et al*. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS[J]. Am J Respir Care Med, 1999, 160(6): 1 843—1 850.
[2] 崔社怀，郭先健，钱桂生. 高原ARDS表面活性物质相关蛋白A、B、C mRNA表达的变化[J]. 第三军医大学学报，1999, 21(3): 181—183.
[3] Cleary G M, Antunes M J, Ciesieka D A. *et al*. Exudative lung injury is associated with decreased levels of surfactant proteins in a rat model of meconium aspiration[J]. Pediatrics, 1997, 100(6): 998—1 003.
[4] 熊仁平，周元国. 蛋白免疫印迹法在G蛋白检测中的应用[J]. 第三军医大学学报，1998, 20(2): 145—147.
[5] Kremlev S G, Phelps D S. Surfactant protein A stimulation of inflammatory cytokine and immunoglobulin production[J]. Am J Physiol, 1994, 267(11): L712—L719.
[6] 黄翠萍，徐永健，刘晓晴. 急性呼吸窘迫综合证的预测指标[J]. 国外医学：内科学分册，1999, 26(5): 204—207.

（编辑 薛国文）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2001)02-0156-01

重组腺病毒介导的CTLA-4Ig cDNA在体外培养细胞中的表达

Expression of recombinant adenovirus mediated CTLA-4Ig in cultured different types of cells recton

杨世昕，吴 军，罗高兴，易绍萱，贺伟峰，黄赤兵，周立新，张 宁，陈希炜 （第三军医大学附属西南医院烧伤研究所，重庆 400038）

本研究用构建的CTLA-4Ig重组腺病毒转染体外培养的人真核细胞，以探讨核载体临床治疗应用的可行性。

1 材料

293细胞购自ATCC（美国），鼠抗人CTLA-4Ig单抗购自Pharmingen公司，5 ml亲合层析柱HiTrap Protein A为Pharmacia公司产品。

2 方法

2.1 细胞培养

293细胞用含10%小牛血清的DMEM培养液；人成纤维细胞、人脐静脉内皮细胞、HeLa细胞均用含5%小牛血清的DMEM培养液。培养条件均为37 ℃，5% CO_2，饱和湿度细胞培养箱中培养。

2.2 重组腺病毒的制作

将罗高兴[1]构建CTLA-4Ig重组腺病毒在293细胞中进行大量反复扩增，收集培养上清及细胞，反复冻融破碎细胞，离心取上清、过滤除菌，经亲合层析柱除去CTLA-4Ig蛋白制作成为转染液，－180°保存备用。

2.3 病毒滴度的测定

用空斑实验法测定转染液病毒滴度，按以下公式计算病毒滴度：病毒滴度(PFU/ml)= 每孔细胞数× 病毒原液稀释度× 10 ÷加入病毒液的量(ml)。

2.4 转染

将病毒转染一加入生长状态良好、增殖活跃的HeLa细胞于37 ℃ CO_2 培养箱转染不同时间，洗去转染液加入含5%胎牛血清的DMEM培养液继续培养。同样转染人成纤维细胞、人脐静脉内皮细胞。

2.5 免疫组化法检测细胞CTLA-4Ig表达

将转染的以上细胞在不同时相点终止，随后进行免疫组化法检测CTLA-4Ig表达。

（下转159页）

基金项目：国家自然科学基金资助项目(39970756)
作者简介：杨世昕(1968－)，男，江西省永丰县人，硕士，主治医师，主要从事移植免疫方面的研究，现在南京军区空军九江庐山疗养院。电话：(023)68754149-8021
收稿日期：2000-03-02；修回日期：2000-09-23

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

看, 治疗第 1 周和第 2 周 PEF、症状计分及喘乐宁用量差异均不显著。提示在该剂量下, 继续延长使用时间并不能进一步的改善哮喘症状。由于 β_2 激动剂对气道炎症无治疗作用, 要获得较好的临床疗效, 需要与吸入激素联合使用。

沙博特与全特宁主要副作用为肌肉震颤、心悸、失眠等。两组的副作用的发生率也相似。通常这两种药物的副作用均较轻, 不影响治疗。在治疗期间没有一例患者因药物不良反应而退出试验。沙博特经改型为缓释剂后, 使用次数减少也有利于提高患者用药的依从性。沙博特和全特宁组分别有 2 例和 1 例患者脱落, 脱落率分别为 10% 和 5%。脱落的原因主要为患者的依从性差, 随访困难等。

本研究中, 沙博特和全特宁入组患者的一般情况, 包括年龄、病程、肺功能 (FEV_1、PEF) 和症状均基本相似, 统计学无显著差异, 表明具有可比性。治疗结果显示两种药物具有相似的临床疗效和安全性, 但沙博特价格较全特宁低廉, 具有更好的疗效/经济性, 值得推广应用。

参考文献:

[1] 中华医学会呼吸分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1997, 20(5): 261—267.

[2] Maesen F P, Smeets J J. Comparison of a controlled-release tablet of salbutamol given twice daily with a stantard tablet given four times daily in the managment of chronic obstructive lung diseases[J]. Eur J Clin Pharmacol, 1986, 31(2): 431—436.

[3] Wilding P, Clark M, Coon J T, *et al*. Effect of long-term treatment with salmeterol on asthma control: a double blind, randomised crossover study [J]. BMJ, 1997, 314(7 092): 1 441—1 446.

[4] Committee on Drugs, American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. Safety and appropriate use of salmeterol in the treatment of asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98(3): 475—480.

(编辑　汪勤俭)

(上接 156 页)

2.6　转染细胞形态观察及活性检测

在倒置显微镜下观察细胞形态, 用台盼蓝拒染法检测细胞活性, 即滴 4% 苔盼蓝于细胞片上 3 min 内观察。

3　结果

3.1　转染细胞形态观察

转染 293 细胞细胞逐渐圆缩, 堆聚、漂浮, 由于局部细胞的脱落漂起而出现无细胞区, 区周边有细胞附着即病毒病变空斑, 常称空斑。而转染 HeLa 细胞、人成纤维、人脐静脉内皮细胞贴壁生长形态良好, 苔盼蓝拒染只有 0.1% 的细胞染成蓝色, 与未转染相应细胞在形态、活性上均未见明显差异。

3.2　滴度测定

病毒滴度为 7×10^8 PFU/ml(公式假定 10 个病毒感染 1 个细胞)。

3.3　免疫组化分析

免疫组化染色显示, 胞浆棕黄为阳性细胞。用该腺病毒转染 6 h 使 HeLa 细胞获得转染, 12 h 开始表达, 36 h 表达达高峰, 约 80% 细胞阳性表达; 人成纤维细胞转染 8 h 后培养 24 h 开始表达, 60 h 达高峰约 70% 细胞阳性表达; 人脐静脉内皮细胞转染 4 h 后培养 12 h 开始表达, 36 h 后达高峰约 80% 细胞阳性表达。相同条件下用滴度为 7×10^7 PFU/ml 腺病毒转染相应细胞未见阳性表达, 未转染的对照细胞亦未见阳性表达。

4　讨论

腺病毒腺具有制备简单、宿主范围广泛、感染率高、安全性好等特点, 近年以发展成基因治疗临床实验中的常用载体。而且既能感染正在分裂的细胞, 又能感染非分裂细胞, 是活体基因治疗的首选病毒载体。可溶性 CTLA-4Ig 是人 CTLA-4 分子胞外区与人免疫球蛋白 γ1 绞链区、CH2、CH3 区组成的融合蛋白, 与 B7 有高度的亲和力, 可以阻断 B7 与 CD28 或 CTLA-4 结合。在 TCR 识别外来抗原的同时给予可溶性 CTLA-4Ig, 在体外可诱导 T 细胞无应答, 在体内则可诱导特异性免疫耐受[2, 3]。实验动物异种移植模型已证明 CTLA-4Ig 重组腺病毒转染后能明显延长心、、胰等的存活时间[4, 5]。

本实验使用的是 E1 区缺失的 5 型腺病毒, 是一种复制性缺陷病毒, 具有感染靶细胞的能力但在无 E1 表达的细胞内不能复制, 因而不会直接造成靶细胞的损害。而 293 细胞是一种用腺病毒 E1 区转化的人胚肾细胞, 缺陷型腺病毒可以在 293 细胞内重组和扩增而使细胞出现病变。实验中我们也观察到用该载体感染细胞未见形态改变, 细胞活性良好。通过免疫组化结果分析得出以下结论: ①腺病毒必须达到足够滴度才能有效地转染细胞; ②转染时间是影响转染率的另一重要因素, 细胞的转染率随时间延长而提高, 有较好的时效关系; ③细胞在足够的滴度和充足的时间, CTLA-4Ig 重组腺病毒可使 70% ~ 80% HeLa 细胞、人脐静脉内皮细胞、成纤维细胞转染表达, 表明 CTLA-4Ig 重组腺病毒可作为 CTLA-4Ig 基因治疗的高效转移载体。

本研究利用构建的 CTLA-4Ig 重组腺病毒成功转染体外培养的人真核细胞, 证实了 CTLA-4Ig 基因导入人的真核细胞及其表达的可行性, 为下一步器官转染研究及其治疗应用奠定基础。

关键词: 转染; 腺病毒; CTLA-4Ig
中图法分类号: R394.3　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 罗高兴, 吴　军, 易绍萱. 重组腺病毒载体局部介导 CTLA-4Ig 延长小鼠异体移植皮肤存活[J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(1): 37—39.

[2] Kemp B E, Pearson R B. Protein kinase recognition sequence motifs[J]. Trends Biochem Sci, 1990, 15(9): 342—346.

[3] Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation[J]. Cell, 1986, 46(5): 659—667.

[4] Kita Y, Li X K, Ohba M, *et al*. Prolonged cardiac allograft survival in rats systemically injected adenoviral vectors containing CTLA4Ig-gene [J]. Transplantation, 1999, 68(6): 758—766.

[5] Liu C, Deng S, Yang Z, *et al*. Local production of CTLA4-Ig by adenoviral-mediated gene transfer to the pancreas induces permanent allograft survival and donor-specific tolerance[J]. Transplant Proc, 1999, 31(1-2): 625—626.

(编辑　谢义霞)

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