DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.030

增殖更为有效。IL-3可通过高亲合力的结合位点对成熟骨髓效应细胞(巨噬细胞,嗜酸性粒细胞,嗜碱性粒细胞)发挥作用,可促进巨噬细胞,嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的活力,延长存活期并抑制其死亡。而且,rhIL-3还提高巨噬细胞和嗜酸性粒细胞的细胞毒、杀菌以及杀癌细胞的能力。IL-3除以上的生物学活性外,还能使造血系统对 EPO, GM-CSF更敏感。通过对 hIL-3结构与功能关系的深入研究,将会有助于进一步从分子水平阐明其多种生物学功能以及作用机理。同时,在深入理解 hIL-3结构与功能关系的基础上,研制高活性,低毒副作用的 hIL-3突变体,由于 hIL-3自身结构, IL-3很难以非融合型蛋白在大肠杆菌中高效表达。本室应用遗传工程技术构建了 pBV220 hIL-3表达质粒,但在大肠杆菌中未见表达。在此基础上,本研究用 PCR定点突变技术,将人 IL-3 N末端第 3位蛋氨酸(Met3)突变成缬氨酸(Val3), N末端第 116位赖氨酸(Lys116)突变成缬氨酸(Val116),以分析蛋白质在改造前后的活性变化,其后,在大肠杆菌表达系统中表达了 hIL-3突变体。用 hIL-3细胞依赖株检测活性,结果表明: 在大肠杆菌 TAP106中表达的 pSM53MV hIL-3突变体的活性明显高于在相同宿主菌中表达的 pSM53N hIL-3天然型。

将 Lys116突变为 Val116取代了野生型 Lys116后,经用 EMBL Seguens程序进行 IL-3突变体蛋白质二级结构分析,其 D螺旋的参数变化不大。实验中所采用的大引物 PCR定点突变方法,突变率可达 100%。PCR扩增产物,经 Sanger双脱氧法测序证实 NhIL-cDNA与野生型的 hIL-3 cDNA完全一致, MhIL-3 cDNA和 MVh IL-3 cDNA突变体与我们预期设计的结果一致,均无因 Taq DNA多聚酶的自然错配而发生非预期的突变,这说明当目的 DNA序列不是很长,同时严格优化 PCR反应的各种条件,是可以得到理想的点突变的结果。使我们可以在基因任何位置引入点突变,为基因的修饰,蛋白质工程的研究提供了简单、稳定的方法。

利用原核细胞表达真核基因因一系列的原因,要获得高效表达是比较困难的。因细菌 RNA聚合酶不能识别真核基因的启动子,真核基因转录的 mRNA缺乏 Shine Dalgarno(SD)序列,因而不能结合到核糖核蛋白体(Ribosome)上,不能启动翻译过程,表达的真核蛋白质在原核细胞中不稳定,容易被细胞蛋白酶破坏,另外由于原核细胞缺乏转录后加工体系。用于表达的真核基因,必须删除信号肽编码序列,而且是 mRNA的反转录产物即 cDNA,才能使表达产物为成熟蛋白形式。所构建的两个表达载体, pKK233-2 hIL-3经 IPTG诱导培养后 SDS-PAGE未见特异性表达带,而 pSM53 hIL-3经温度诱导培养后 SDS-PAGE在 Mr 15× 10^3 u(15 KD)处可见特异性表达带,诱导表达的条带经免疫印迹证实为 hIL-3蛋白分子。仅是 pSM53 hIL-3 SDS-DAGE在 Mr 15× 10^3 u(15 KD)处可见特异性表达带。这可能与 hIL-3cDNA ATG与载体 SD序列之间的距离有关, pKK233-2 hIL-3的 pKK233-2为载体,利用载体上带有起始密码子 NcoI 酶切位点将 hIL-3 cDNA与载体相连, ATG与 SD序列间距离为 8bp,而 pSM53 hIL-3同样以 NcoI 酶切位点上的 ATG为起始密码子,其 ATG距 SD序列为 10 bp,是将 pSM53以 EcoRI 酶切,填平后连接。从此结果表明,虽然转录水平是决定外源基因表达蛋白产率的重要因素,但仅将外源基因置于强启动子之下远不能轻易获得高效表达,启动子的选择, SD序列与起始密码子之间的距离是相当重要的。没有一定的固定模式。将天然型 pSM53 NhIL-3与突变型 pSM53 MhIL-3, pSM53 MV hIL-3在相同条件下培养诱导的包含体经变性,复性制备的粗纯化 hIL-3待测上清与 pSM53质粒, hIL-3标准品同时用 TF-1细胞株进行体外测活。突变型 pSM53 MV hIL-3活性比相同条件下表达的天然型 pSM53 N hIL-3和突变型 pSM53 MhIL-3提高了 3~4倍。

关键词 PCR定点突变; hIL-3; cDNA突变体;高效表达; PL启动子; hIL-3突变体

中图法分类号 R392.12

(收稿: 1996-11-29;修回: 1997-12-20)

(编辑 汪勤俭)

骨外固定治疗长骨缺损不连接的实验研究

An experimental study on the treatment of long tubular bone defect and nonunion with external fixation

杨 柳 李起鸿 (第三军医大学附属西南医院骨科)重庆, 630038

长骨干缺损不连接伴肢体短缩,一直是骨科临床治疗中最为棘手的难题之一。它常见于严重开放粉碎性骨折、骨折手术感染和先天性胫骨假关节等反复多次手术失败,以及骨髓炎大块死骨切除和长骨肿瘤段切除后等。传统的治疗方法,如游离植骨和带血管骨移植因受诸多病理条件的限制,疗效难以满意。本研究应用 X线照片、血管造影、墨汁灌注透明切片和图像分析、微血管铸型 SEM观察、放射微球法局部血流量测定,组织学光镜观察, BMD和 CTD测定、力学强度测试、TGFβ1 cDNA探针原位杂交等多种技术手段,通过 107只山羊和 68只日本大耳白兔建立的不同实验模型,较为系统地研究了长骨缺损不连的骨外固定治疗及方法的合理选择,初步探讨了如何促进延长区骨愈合的方法(PEMF,延迟延长, TGFβ1)和可能机制,

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

主要研究结果如下:

(1)长骨缺损不连接的骨外固定治疗有两种基本方法,即 EECL和 SBTL,对于骨缺损超过 20% 原长度时,应采用 SBTL 骨外固定方法。对于缺损不超过 15% 骨长度者,应首选 EECL。总之,EECL具有方法更为简便、疗效更为确实、可避免不必要手术的优点,因此两种方法的选择,应遵循只要断端直接对位加压后不出现肢体远端血循环障碍为原则,多谱勒血流测定可作为临床监测肢体远端血循环的重要参考指标。

(2)实验中发现干骺端截骨术后 4 d,即重建血循环,延长区血管极其丰富,随延长同步生长,并随延长区皮质和髓腔形成而逐渐向皮质和髓腔血管衍变,骨缺损断端皮质血管术后 7 周即开始吻合沟通,对位良好的骨缺损断端,在牢稳加压外固定条件下,可以出现骨折一期愈合;干骺端部位截骨延长,延长区骨修复改建迅速。

(3)节段性转移骨段在转移过程中,未显示血循环障碍,延长区在延长过程中其血管网极为丰富,无连续性中断或血管稀少缺失,骨缺损断端相互接触加压固定后,断端间皮质血管于延长结束 2月后开始跨过间隙相互吻合沟通。表明 SBTL方法在治疗大段骨缺损方面具有手术相对简单,可充分矫正缺损,而且不需植骨等优点。

(4) PEMF刺激对延长区骨修复改建有明显的促进作用,但机理尚不清楚,需进一步研究。

(5)截骨后不同时间开始延长,对延长区骨愈合具有重要影响;适当的延迟延长有利于延长区骨愈合,最佳延迟延长应以截骨断端血循环重建时间为依据;过度延迟延长可能造成延长区骨痂断裂,发生骨不连。

(6)从干骺端截骨延长开始,TGFβ1 mRNA表达阳性细胞逐渐增加,15 d时达最高峰,此阶段阳性细胞主要定位于血管内皮细胞和成纤维细胞,20 d后,延长区表达阳性细胞开始减少,且主要定位于骨小梁边缘成骨细胞,表明 TGFβ1在延长区骨修复中具有重要作用。如何提高和维持 TGFβ1 mRNA 的高水平有效表达,可能对促进和加速延长区骨愈合具有重要的意义。

关键词　骨缺损;骨不连;骨延长;骨外固定

中图法分类号　R683

(收稿: 1996-12-06;修回: 1996-12-31)

(编辑　冷怀明)

胃粘膜肠上皮化生和胃癌的发生机理及其逆转与干预治疗的实验研究

Experimental studies on the mechanism of development of intestinal metaplasia and gastric carcinoma and their differentiated therapy in rats

孙贵银　刘为纹　(第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆, 630038

本实验分别以致癌剂甲基硝基亚硝基胍(MNNG)联合法莫替丁(F)方法和致突变剂丙基硝基亚硝基胍(PNNG)饮水法等两种不同的方法成功地建立了 Wistar大鼠实验性胃粘膜肠上皮化生模型;并在肠化模型和体外细胞培养的基础上,分别用病理检查、生物化学、粘液组化、免疫组化、电镜和原位杂交等手段,观察与探讨了肠化的组织发生、肠化与胃癌的关系以及叶酸、β-胡萝卜素和中药方"肠化I 号"对肠化和胃癌细胞的逆转与干预治疗作用与机理。主要研究结果如下:

(1)以饮水法给予 PNNG或小剂量 MNNG+ F(混入食料)是建立大鼠胃粘膜肠上皮化生模型的两种有效方法。

(2)胃粘膜肠化可能起源于腺颈部的干细胞;Ⅲ型肠化与胃癌关系密切;胃癌的发生方式可能有两种:① 正常胃粘膜→肠化(Ⅲ型)→异型增生→胃癌;② 正常胃粘膜→异型增生→胃癌。

(3)自由基在实验性胃癌及其癌前病变的发生中具有一定作用,外源性自由基清除剂的应用可能对胃癌及其癌前病变具有辅助治疗作用。

(4)超氧化物歧化酶在大鼠实验性胃粘膜癌前病变的发生中具有一定作用;即使在生理状态下,胃粘膜也在持续不断地受到活性氧的攻击。

(5)在生理状态下,Wistar大鼠胃粘膜 MnSOD和 CuZn-SOD mRNA的表达主要位于腺颈部;致癌剂 PNNG可能对 SOD mRNA的表达具有严重的损伤作用。

(6)叶酸、β-胡萝卜素和肠化I 号对胃癌及其癌前病变具有良好的阻断作用。

(7)叶酸、β-胡萝卜素和肠化I 号的作用机理之一可能是其自由基清除作用;其二,可能与其改变抑癌基因 p53和癌基因 C-myc的表达,导致细胞凋亡有关。

(8)肿瘤相关抗原 MG7 增殖细胞核抗原(PCNA)和碱性磷酸酶是肿瘤细胞良性转化的标志物,可用于监测瘤细胞的生物学行为。

关键词　肠上皮化生;诱导分化;叶酸;β-胡萝卜素;肠化I 号;基因表达;丙基硝基亚硝基胍;甲基硝基亚硝基胍;超氧化物歧化酶

中图法分类号　R735.2

(收稿: 1996-12-03;修回: 1997-01-10)

(编辑　王　红、沈锡庚)

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