DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.047

个案与短篇

GAP-43 cDNA及 TH-3 cDNA重组腺病毒表达载体的构建及鉴定*

Construction and identification of the GAP-43cDNA and TH-3 cDNA recombinant adenoviral vectors

刘 俊 蔡文琴** 张可成 杨 辉 (第三军医大学附属新桥医院神经外科) 重庆, 630037

腺病毒载体介导的基因转移技术是近几年建立起来的高效基因转移方法。具有感染滴度高,可容纳较大的外源基因片段(7.5 kb),致病力较弱,临床应用比较安全等特点。特别是腺病毒具有感染非增殖细胞如神经元的特点,使其在基因治疗神经系统疾病的应用上具有诱人的前景。因此,腺病毒载体介导的基因转移技术将成为进行基因治疗,神经生物学研究,遗传病基因诊断,细胞增殖、分化、癌变及死亡等不同研究的主要技术基础之一[1,2]。为此,我们构建了 GAP-43及 TH-3重组腺病毒表达载体(命名为 pAdGAP-43E_1CMV及 pAdTH-3E_1CMV)。

1 材料与方法

DNA限制性内切酶, T_4DNA连接酶等工具酶购自 Promega公司和华美生物工程公司,腺病毒载体由军事医学科学院贺福初教授赠送。

1.1 pAdGAP-43E_1CMV的构建

从含有全长 GAP-43 cDNA的重组质粒 pGEM-4中,以 HindⅢ, DraⅠ 双酶切下约905 bp的 GAP-43 cDNA片段,该片段去除了 GAP-43 cDNA的大部份非编码区(约248 bp),凝胶电泳回收片段。腺病毒载体用 HindⅢ及 HpaⅠ酶切,回收约7.64 kb片段,以摩尔比 3∶1连接(15℃过夜),转化大肠杆菌 DH5a后,提取转化质粒 DNA,根据分子量大小及酶切图谱鉴定阳性重组子。

1.2 PAdTH-3E_1CMV的构建

从含有全长 TH-3 cDNA的重组质粒 pGEM-2中,以 HindⅢ及 SphⅠ 双酶切下约1.67 kb的片段,该片段去除了 TH-3 cDNA的一部分非编码区,凝胶电泳回收片段。与经相同酶切的 pUC18质粒进行连接,相同方法鉴定阳性重组子。将该阳性重组子再用 HindⅢ, HinclⅠ双酶切下已连入的 TH-3 cDNA片段,凝胶电泳回收。再与经 HindⅢ及 HpaⅠ 双酶切的腺病毒载体进行连接,转化大肠杆菌 DH5a后,提取转化质粒 DNA,根据分子量大小及酶切图谱鉴定阳性重组子。

2 结果

(1) GAP-43 cDNA定向克隆入腺病毒载体后,重组子经 HindⅢ及 ClaⅠ 酶切,电泳见两条带,分别为1.0及7.48 kb左右。(2) TH-3 cDNA重组子经同样酶切后电泳,两条带分别为1.86及7.48 kb左右,见图1、2。

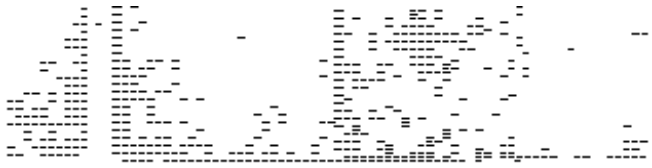


图1 pAdGAP-43E_1CMV质粒鉴定
a: pAdGAP-43E_1CMV
b: λDNA/EcoRⅠ+HindⅢ Markers

图2 pADTH-3E_1CMV质粒鉴定
a: λDNA/HindⅢ Markers
b: pAdTH-3E_1CMV

3 讨论

GAP-43(神经生长相关蛋白质)存在于神经元内,集中在神经生长区和突触重建区。目前认为 GAP-43在神经发育、再生、塑形、神经递质释放及突触重建中起重要作用[3,4]。而 TH-3(酪氨酸羟化酶)是脑内多巴胺神经元合成多巴胺的主要调节物,对帕金森病有明确的治疗作用[5]。因此,我们构建的 GAP-43及 TH-3重组腺病毒表达载体为基因治疗帕金森病及为进一步探讨中枢神经系统神经元的生长发育机理奠定了基础,目前对这两种重组子的表达产物及治疗帕金森的研究正在进行之中。

关键词 GAP-43基因; TH-3基因;腺病毒载体
中图法分类号 Q78

参考文献

1 Ali M, Lemoine N R, Ring C J A. The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. Gene Therapy, 1994, 1(6): 367
2 Karpati G, Lochmuller H, Nalbantoglu J *et al*. The principles of gene therapy for the nervous system. Trends Neu-

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39370686
** 基础部组织与胚胎学教研室 重庆, 630038

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

rosci, 1996; 19(2): 49
3 Eggen B J L, Brandsma D, Kasperaitis M *et al*. Rat B-50 gene transcription and translation. Brain Res, 1995; 690(1): 73
4 Lin P X, Fields R D, Agoston D V. Effects of electrical stimulation on GAP-43 expression in mouse sensory neurons. Dev Brain Res, 1993; 76(1): 95
5 Kastner A, Hirsch E C, Agid Y *et al*. Tyrosine hydroxylase protein and messenger RNA in the dopaminergic nigral neurons of patients with Parkinson's disease. Brain Res, 1993; 606(2): 341

(收稿: 1996-07-11;修回: 1997-01-17)
(编辑 张大春)

糖尿病性肾病并发多系统脏器衰竭一例抢救成功

Successful emergency treatment of a case of diabetic renal disease accompanied by multiple system organ failure

李开龙 朱妙珍 涵露 张建国 何娅妮 (第三军医大学附属大坪医院肾内科) 重庆, 630042

患者男性, 73岁。因反复颜面及双下肢浮肿 3月, 发热、咳嗽、咳痰 2 d 昏迷 2 h于 1995年 10月 20日入院。3月前在我院诊断为糖尿病 (II 型)、糖尿病肾病。既往无明确高血压、慢性支气管炎及支气管哮喘史。入院时检查 T 35.5℃、P 82次 /min R 22次 /min BP 28 kPa/14 kPa 神志不清、出冷汗、眼睑及双下肢轻度浮肿, 双下肺满布细湿 音及哮鸣音, 心、腹无阳性发现。生理反射消失, 病理反射未引出。血象: WBC 13×10^9/L、N 90%、L 10%; 血糖 1.8 mmol/L; 尿常规: Prot ⅲ; 生化肾功能正常; ECG示左心室肥厚。诊断: ① 糖尿病 (II 型)、低血糖昏迷、糖尿病肾病; ② 高血压病 (III期)、左心室肥厚。立即静注 50% GS 50 ml后病人苏醒。入院后 5 h突发急性左心衰, 经强心、利尿、扩血管等处理, 患者自觉症状缓解。21日晚出现明显呼吸困难, BP 22 kPa/21 kPa R 34次 /min 唇绀。双肺满布哮鸣音, 呼气末明显, 无咳粉红色泡沫痰。强心、利尿、扩血管无效, 排除心源性哮喘, 考虑肺部感染致哮喘急性发作, 给予地塞米松, 氨茶碱等平喘。但患者病情继续发展, BP (27~30) kPa/(14~18) kPa, 22日尿量由前一天的 3 000 ml降至 930 ml, 哮喘进展呈持续状态。23日患者进入深昏迷。查血气: pH 7.147 PCO_2 9.75 kPa PO_2 7.36 kPa AB 25.3 mmol/L O_2 sat 0.78 BE 5.8 mmol/L; 血 BUN (18.8~23.7) mmol/L Cr (364~505.5) μmol/L 床旁胸片示双肺感染、慢性支气管炎、肺气肿。考虑并发急性肾功能衰竭[1]、II 型呼衰、肺性脑病。给予呼吸兴奋剂, 纠正酸中毒、脱水、利尿、压宁定降压等处理。48 h后患者意识逐渐恢复。血压稳定在 (18~24) kPa/(10~14) kPa 但感染控制不理想, 且在大小便及痰中发现霉菌, 遂及时更用泰能和酮康唑抗感染, 6 d后感染控制。此时出现上消化道出血, 经对症处理后缓解。以后病情进一步好转, 日尿量增至 2 000 ml以上, BP 18 kPa/11 kPa左右, 双肺呼吸音清晰, 全身浮肿消失; 复查血气: pH 7.424 PCO_2 5.61 kPa PO_2 9.54 kPa AB 27.5 mmol/L O_2 sat 0.91 BE 3.4 mmol/L; 血象: WBC 5.3×10^9/L、N 83%、L 17%; 大便 OB(-); 小便培养无菌生长; 肝、肾功能正常; 血糖 7.5 mmol/L。11月 6日出院。

讨论

该患者为糖尿病肾病, 因双肺严重耐药金葡菌和坡畸氏肠杆菌混合感染诱发哮喘持续状态, 进而发展至肺、脑、肾、心及胃肠道等多系统脏器衰竭。对该病人的抢救体会如下: ① 临床诊断不能过分依赖病史。该患者无高血压、慢性支气管炎及哮喘发作史, 但入院后呈恶性高血压, 有急性左心衰表现, ECG示左心室肥厚, 胸片示心脏略向左下扩大、主动脉增宽。故诊断高血压病 (III期)、心脏扩大、急性左心衰。而在心衰纠正后, 哮喘仍进行性发展直至哮喘持续状态, 此时哮喘无法用心源性解释, 结合胸片报告考虑肺部感染诱发哮喘持续状态[2]。② 抗感染, 社区感染, 致病菌首先考虑革兰氏阳性球菌, 以后根据痰革兰氏染色以及痰和咽试子培养加药敏结果及时调整抗菌素收到较好的效果。③ 积极控制血糖, 该患者血糖一直稳定在 10 mmol/L以下, 一般在正常范围内, 这对于控制感染, 减轻脑细胞水肿以及肾功能的迅速恢复具有重要意义。④ 气管切开问题, 老年糖尿病患者, 有严重的肺部感染, 气管切开应慎重, 早期大剂量呼吸兴奋剂的使用可能会收到更好的效果。⑤ 降压, 根据 Friedrich经验用药[3], 特别是压宁定, 最高日用量 300 mg, 我们的体会是压宁定安全有效。⑥ 利尿剂、脱水剂的使用, 由于患者存在恶性高血压、左心衰、ARF、脑细胞水肿等, 且此时肾脏对袢利尿剂仍有较好的反应。适当使用利尿剂和脱水剂可能收到与透析相同或更好的效果, 但要注意扩容 (尤其对非少尿型急性肾衰者) 和呼吸道的护理, 以防加重肾衰和出现痰堵, 该患者出现 3次严重痰堵, 因发现和处理及时避免了窒息的发生。⑦ 预防性使用 H_2受体拮抗剂对上消化道出血的防治有积极意义。其它如纠正水、电解质、酸碱平衡紊乱、充分支持治疗等对抢救成功都具重要意义。

关键词 糖尿病性肾病; 多器官衰竭
中图法分类号 R692.5

参考文献

1 林善锬. 急性肾功能衰竭. 见: 上海医科大学《实用内科学》编

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