

表 2 曲美他嗪对再灌注心律失常的影响

组别	n	室速	室颤	频发室早	房室传导阻滞	合计
对照组	10	8	2	10	4	24
20 mg/(kg·d)	10	4 ¹⁾	1	8	1	14 ¹⁾
40 mg/(kg·d)	10	3 ^{1), 2)}	0	9	3	15 ^{1), 2)}

与对照组相比, 1) $P < 0.01$; 与 20 mg/(kg·d) 组相比, 2) $P > 0.05$

3 讨论

曲美他嗪对单纯的心肌缺血具有明显的治疗作用, 但与硝酸酯类、 β -受体阻滞剂及钙离子拮抗剂不同, 其抗心肌缺血时, 并不影响心血管系统的主要血流动力学参数和心肌的耗氧量^[1~3]。但对心肌缺血再灌注损伤的保护作用, 由于这类研究复杂, 并难以标准化, 不同实验之间缺乏同质性, 且曲美他嗪所用的剂量和途径不同, 因而不同实验结果之间差别很大^[4, 5]。本实验通过左室内压及心电图的监测, 发现在缺血及再灌注后, 经曲美他嗪预处理者, 其再灌注心律失常的发生率和左室内压峰值及变化速率峰值的恢复程度明显优于对照组。同样再灌注后, 心室复跳的速度在曲美他嗪预处理者快于对照组并与曲美他嗪剂量相关, 说明口服曲美他嗪一周后对缺血再灌注心肌有保护作用。

Boucher 等^[4]对离体大鼠心脏进行缺血再复灌时发现, 单纯给予曲美他嗪口服(3 mg/(kg·d), 一共 5 d) 无明显的心肌保护作用, 而单独在灌注液中加入曲美他嗪却能减轻心肌的缺血再灌注损伤, 然而当两者合用时, 效果更明显。而本实验在灌注液中加入曲美他嗪, 而仅给予该药预处理却能观察到明显的心肌保护作用。两者的差别一方面可能与各自所采取的缺血与再复灌方式不同有关, 另一方面也可能与曲美他嗪所用的剂量不同有关。本实验中曲美他嗪的用量为 20 或 40 mg/(kg·d), 大大超过 Boucher 所用的剂量。

曲美他嗪对缺血再复灌损伤的保护机制, 迄今尚未完全弄清, 目前一般认为曲美他嗪促进心肌细胞内能量代谢由脂肪酸氧化为主型转移到葡萄糖氧化为主型可能是其作用的基础^[6~8]。最近 Kantor 等^[1]研究发现这一过程是通过曲美他嗪抑制线粒体内长链脂肪酸 3-酮酰辅酶 A 硫解酶来实现的, 其结果使细胞内的 β 氧化直接受抑制, 并间接增加葡萄糖的氧化分解, 从而有利于改善缺血缺氧时葡萄糖酵解与葡

萄糖氧化失耦联, 使细胞内的 H^+ 浓度降低, Na^+ 、 Ca^{2+} 聚集减少, 抑制自由基的形成。在本实验中, 离体心肌的灌注液仅含有葡萄糖而未加任何链长的脂肪酸, 因而不存在直接抑制脂肪酸的 β 氧化这一途径, 但本实验中出现阳性结果, 说明曲美他嗪对缺血再灌注心肌的保护作用可能不仅通过抑制脂肪酸 β 氧化的途径起作用, 还可能存在着多种作用机制, 这也是目前尚未明了之处。

总之, 曲美他嗪是具有独特的药理作用的新一类抗心肌缺血药物。本研究发现其口服预处理对离体缺血再灌注大鼠心脏有保护作用, 它使离体缺血再灌注心脏的复跳时间缩短, 减轻缺血再灌注对心功能的损害。

参考文献:

- [1] Kantor P F, Lucien A, Kozak R, *et al.* The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase[J]. *Circ Res*, 2000, 86(5): 580.
- [2] Manchanda S C, Krishnaswami S. Combination treatment with trimetazidine and diltiazem in stable angina pectoris[J]. *Heart*, 1997, 78(4): 353.
- [3] Lu C, Dabrowski P, Fragasso G, *et al.* Effects of trimetazidine on ischemic left ventricular dysfunction in patients with coronary artery disease[J]. *Am J Cardiol*, 1998, 82(7): 898.
- [4] Boucher F R, Hearse D J, Opie L H. Effects of trimetazidine on ischemic contracture in isolated perfused rat hearts[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1994, 24(1): 45.
- [5] Vedrinne J M, Vedrinne C, Bompard D, *et al.* Myocardial protection during coronary artery graft surgery: a randomized double-blind placebo-controlled study with trimetazidine[J]. *Anesth Analg*, 1996, 82(4): 712.
- [6] El-Banani H, Bernard M, Cozzone P, *et al.* Ionic and metabolic imbalance as potential factors of ischemia reperfusion injury[J]. *Am J Cardiol*, 1998, 82(5A): 25k.
- [7] El-Banani H, Bernard M, Baetz D, *et al.* Changes in nuclear magnetic resonance study of the effects of TMZ on intracellular Na^+ and pH during ischemia and reperfusion[J]. *J Moll Cell Cardiol*, 1999, 31(6): A53.
- [8] Mody F V, Singh B I V, Mohiuddin I H, *et al.* Trimetazidine induced enhancement of myocardial glucose utilization in normal and ischemic myocardial tissue: an evaluation by positron emission tomography[J]. *Am J Cardiol*, 1998, 82(5A): 42K.

(编辑 刘清海)

人 CD134L 基因原核表达载体的构建、鉴定及序列分析

张强, 张春艳, 宁波, 陈琼玲

(中山大学中山医学院免疫学教研室, 广东 广州 510089)

摘要: 【目的】克隆人 CD134L 的 cDNA, 构建人 CD134L 的原核表达载体 pGEX-4T-1/hCD134L, 并进行序列分析。【方法】以 EB 病毒转化健康人外周血 B 淋巴细胞, 从激活的 EB 病毒转化的 B 细胞中提取总 RNA, 采用 RT-PCR 方法扩增出人 CD134L cDNA, 经 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切后, 克隆入原核表达载体 pGEX-4T-1, 构建高效表达载体 pGEX-4T-1/CD134L, 经限制性内切酶酶切分析和 cDNA 序列分析鉴定重组

收稿日期: 2002-08-06

作者简介: 张强(1972-), 男, 江西高安人, 硕士生, 现在南海出入境检验检疫局工作。

质粒。【结果】人CD134L cDNA 已正确克隆到原核表达载体 pGEX-4T-1 中, 测序结果表明中国人CD134L cDNA 与 GenBank 国外报告的完全一致。【结论】本研究成功构建人CD134L的原核表达载体, 为下一步进行人CD134L与自身免疫性疾病的关系奠定基础。

关键词: hCD134L; RT-PCR; DNA 序列分析

中图分类号: R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)5S-0024-02

CD134L 为 CD134 的配体分子, 是 TNF 超家族成员 II 型跨膜糖蛋白。CD134/CD134L 分子是典型的双向信号系统^[1,2]。激活的 CD4⁺ T 细胞上 CD134 分子的交联(cross-linking)可导致 CD4⁺ T 细胞增殖, IL-4 分泌增加, 促使 CD4⁺ T 细胞向 Th2 类细胞的分化。激活的 B 细胞上 CD134L 分子的交联可引起 B 细胞增生及特异性抗体分泌, 在 T 细胞依赖的 B 细胞终末分化期起关键作用。动物实验表明, 利用抗 CD134L 单抗在体内阻断 CD134-CD134L 间的相互作用可抑制 CD4⁺ T 细胞的激活和增殖, 对炎性肠病(IBD)、多发性硬化症和移植物抗宿主病(GVHD)等自身免疫性疾病有明显治疗作用^[3~5]。为进一步研究 CD134/CD134L 分子作用机理。我们从激活的 EBV-B 细胞中克隆了中国人 CD134L 全长 cDNA, 并构建了其原核表达载体。

1 材料与方 法

1.1 材 料

质粒 pGEX-4T-1 购自 Pharmacia 公司; 大肠杆菌 BL21、AET 处理的绵羊红细胞由本室提供; B95-8 细胞株为广州血液中心付涌水博士惠赠; 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、UNIQ-10 柱离心式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒、dNTP、高保真 Taq DNA 聚合酶为上海生工生物工程公司产品; 琼脂糖胶 DNA 回收试剂盒购自宝灵曼公司。

1.2 方 法

1.2.1 EBV 转化 B 淋巴细胞的获得 ① B 淋巴细胞的分离: 采用密度梯度离心法分离单个核细胞。将得到的单个核细胞调至 $(2 \sim 3) \times 10^9$ 个/L, 并以等体积的 10 g/L AET 处理的绵羊红细胞混合, 37 °C 放置 20 min, 其间轻摇。500 r/min 离心 5 min, 放入 4 °C 1 h。将混合物加入淋巴细胞分离液中, 2 000 r/min, 离心 20 min, 吸出中间的白膜层即为所需的 B 淋巴细胞。② EBV 转化 B 淋巴细胞: B95-8 细胞置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 2 d 后, 转入 34 °C、体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱培养 2 周, 收获含 EBV 的上清。将 B 淋巴细胞悬浮于用 B95-8 培养上清稀释(1:1)的 RPMI1640 培养液中, 调整细胞浓度至 2×10^9 个/L, 分于 96 孔细胞培养板, 然后于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后半量换液, 以后每周半量换液 2 次。经多次传代后, 取细胞生长稳定、状态良好的转化 B 淋巴细胞进行实验。

1.2.2 引物设计 根据 GenBank 中 hCD134L 基因序列、载体 pGEX-4T-1 的多克隆位点及读码框架, 经 DNAClub 软件评价后设计合成一对引物。P1: 5'-GCGGATCCAGATTG-TGAAGATGGA-3'; P2: 5'-CCGTGCACCTGGTTTTAGAT-ATTGCC-3'。引物 5' 端各添加了两个保护基, 以提高 PCR 产物的酶切效率。引物 P1 含有起始密码和 BamHI 酶切位点, 引物 P2 中含终止密码和 SalI 酶切位点。利用此引物可扩增出片段大小为 607 bp 的产物, 包括起始密码及终止密码子在内的 hCD134L 分子 cDNA 全序列。

1.2.3 RT-PCR 扩增 hCD134L cDNA ① EBV 转化的 B 细胞的激活^[6]: 取 4 mL 生长良好的 EBV 转化的 B 淋巴细胞(约 10⁶ 个细胞), 加入 1.5 μL 的 PMA(5 μg/L)和 3 μL 的 ionomycin(500 μg/L), 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中继续培养 3 d, 期间不换液。3 d 后, 转入 10 mL 玻璃离心管, 1 000 r/min, 离心 10 min, 弃去上清, 收集细胞。② RT-PCR: 用 UNIQ-10 柱离心式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒抽提细胞中的总 RNA, 逆转录合成 cDNA 第一条链, 然后进行常规 PCR 实验。扩增条件: 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环。同时设立阴性对照, 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 hCD134L cDNA 的克隆及鉴定 将 PCR 产物与 pGEX-4T-1 分别用 BamHI 和 SalI 双酶切, 10 g/L 琼脂糖电泳, 试剂盒回收, 用 T4 DNA 连接酶 18 °C 连接 16 h, 转化 BL21 感受态细胞, 筛选重组子提取质粒 DNA, PCR 及 BamHI 和 SalI 双酶切鉴定有无插入片段, 有插入片段的重组子命名为 pGEX-4T-1/hCD134L。

1.2.5 DNA 序列测定 取酶切鉴定正确的重组质粒 pGEX-4T-1/hCD134L 进行序列测定, 由大连宝生生物工程公司完成。

2 结 果

2.1 EBV 转化的 B 淋巴细胞株的建立

将从 B95-8 细胞中分离得到的 EBV 和成人 B 淋巴细胞混合培养, 2 周后, 未转化的 B 淋巴细胞死亡, 转化的 B 淋巴细胞易相互粘附生长形成细胞团。选取生长良好的转化 B 淋巴细胞株多次传代, 冻存后复苏, 细胞仍能旺盛生长。

2.2 RT-PCR 扩增 hCD134L cDNA

将 RT-PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 结果表明 PCR 扩增出一特异性条带, 条带大小约 607 bp, 与预期的一致(图 1)。

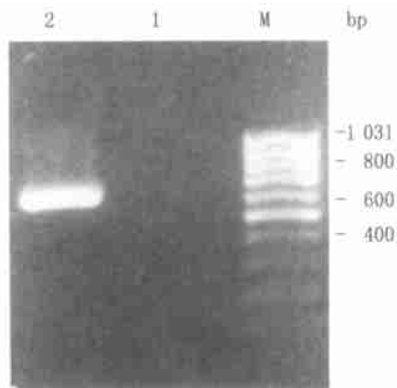


图 1 琼脂糖凝胶电泳分析 RT-PCR 产物

M: 1 kb DNA 标准; 1. 阴性对照; 2. hCD134L cDNA 的 RT-PCR 产物

2.3 hCD134L cDNA 的克隆与鉴定

分别将 PCR 产物和 pGEX-4T-1 质粒以 *Bam*HI 和 *Sal*I 酶切后, 经 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 BL21, 经 LBA 平板筛选阳性克隆, 提取重组质粒, 经酶切鉴定, 经琼脂糖凝胶电泳, 出现约 4.9 kb 的质粒 DNA 片段和 607 bp 的目的基因, 重组质粒被命名为 pGEX-4T-1/hCD134L(图 2)。

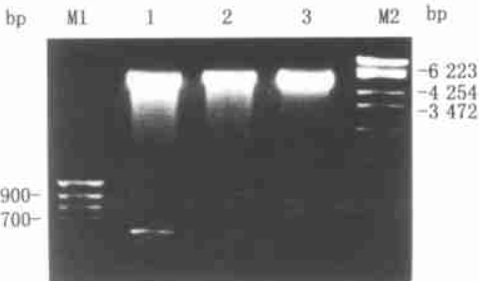


图 2 重组质粒 pGEX-4T-1/CD134L 的酶切分析

M1: 1 kb DNA 标准 M2: Lambda DNA/Eco1301 DNA 标准
1: *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切后的重组质粒 pGEX-4T-1/hCD134L; 2: *Bam*HI 单酶切后的重组质粒 pGEX-4T-1/hCD134L; 3: *Bam*HI 单酶切后的空质粒 pGEX-4T-1

2.4 序列分析

对重组子 pGEX-4T-1/hCD134L 进行双向测序, 结果表明与 GenBank 中报告的序列完全一致。

3 讨论

许多研究认为, CD134/CD134L 参与了细胞与体液免疫反应。它能协调 CD4⁺ T 细胞的选择、迁移和 Th2 类细胞的分化; 还能与 CD154/CD40、CD70/CD27 一起共同调节 T 细胞依赖性的 B 细胞反应^[7]。动物实验中通过阻断 CD134/CD134L 信号来治疗自身免疫性疾病的设想有明显优点, 它只针对炎症部位的 T 细胞和巨噬细胞, 不影响外周 T 细胞群, 从而可避免全身免疫抑制。我们拟采用抗人 CD134L 的单克隆抗体阻断 CD134/CD134L 信号途径, 来研究这一信号途径在自身免疫性疾病发病过程中的作用。因此, 本实验中我们采用 RT-PCR 方法从激活的 EBV 转化 B 细胞中扩增出了中国人 CD134L 全长 cDNA, 并构建了其高效原核表达载体, 为 hCD134L cDNA 的表达和抗 hCD134L 单抗的制备准备了实验材料。

我们选用的 pGEX-4T-1 载体是表达 GST 融合蛋白的大肠杆菌高效表达载体, 选择该载体的主要原因是: ① 其含非常强的 *tac* 启动子, IPTG 可诱导目的基因的高效表达。② 其表达产物利于分离纯化: 融合蛋白可通过谷胱甘肽-交联葡聚糖 4B 柱亲和层析纯化, 温和的抽提条件对融合蛋白的抗原性和功能活性影响极小。再用凝血酶或 Xa 因子将 GST 切除, 可方便地获得目的蛋白。我们构建的 pGEX-4T-1/CD134L 经双酶切鉴定证实 hCD134L cDNA 已成功克隆入 pGEX-4T-1 载体中。序列测定结果表明, 中国人 CD134L cDNA 序列与 GenBank 中报告的完全一致, 为今后研究 CD134/CD134L 分子作用机理和制备抗 hCD134L 单抗打下基础。

参考文献:

- [1] Flynn S, Toellner K M, Raykundalia C, *et al.* CD4⁺ T cell cytokine differentiation; the B cell activation molecular, OX40 ligand, instructs CD4⁺ T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blnr-1[J]. *J Exp Med* 1998, 188(2): 297.
- [2] Ohshima Y, Yang L P, Uchiyama T, *et al.* OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4⁺ T cells into high IL-4 producing effectors[J]. *Blood*, 1998, 92(9): 3338.
- [3] MacDonald T T. The role of activated T lymphocytes in gastrointestinal disease[J]. *Clin Exp Allergy*, 1990, 20(3): 247.
- [4] Raine C S. Multiple sclerosis; a pivotal role for the T cell in lesion development[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1991, 17(4): 265.
- [5] Tsukada N, Akiba H. Blockade of CD134(OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation[J]. *Blood*, 2000, 95(6): 2434.
- [6] Godfrey W R, Fagnoni F F, Harara N A, *et al.* Identification of a human OX40 ligand, a costimulator of CD4⁺ T cells with homology to tumor necrosis factor[J]. *J Exp Med*, 1994, 180(2): 757.
- [7] Morimoto S, Kanno Y, Tanaka Y, *et al.* CD134L engagement enhances human B cell Ig production; CD154/CD40, CD70/CD27, and CD134/CD134L in interactions coordinately regulate T cell dependent B cell responses[J]. *J Immunol* 2000, 164(8): 4097.

(编辑 张敏瑞)

GSTM1 基因缺失与非小细胞肺癌关系的病例对照研究

乔贵宾¹, 吴一龙², 曾伟生¹, 蒋仁超¹, 王思愚², 杨学宁²

(1. 广州军区广州总医院心胸外科, 广东广州 510010; 2. 中山大学肺癌研究中心, 广东广州 510630)

摘要: 【目的】探讨谷胱甘肽硫转移酶 μ 基因缺失与肺癌发生的关系。【方法】采用病例对照研究方法和 PCR 检测手段分析谷胱甘肽硫转移酶 μ 基因缺失在病例和对照组中的分布情况, 并分析其与肺癌发生的关系。【结果】谷胱甘肽硫转移酶 μ 基因(GSTM1)缺失在病例组和对照组中的分布存在显著差异 ($P < 0.01$), 病例组中 GSTM1-/- 基因型携带率较高(61%), 而对照组则为 48%; GSTM1-/- 基因型是

收稿日期: 2002-07-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670651)

作者简介: 乔贵宾(1969-), 男, 山西太原人, 博士生, 吴一龙, 导师, 教授。