

临床医学诊疗丛书

主 编 ○ 孙承美 高淑芳 张微

内科分册

《临床医学诊疗丛书·内科分册》

主 编 孙承美 山东省临沂市医疗保险事业处

高淑芳 山东省威海市文登中心医院

张 微 湖北省宜昌市中医院

副主编 郭炳彦 河北省故城县医院

张海雯 胜利石油管理局滨海医院

关 琦 内蒙古民族大学第二附属医院

沈 英 北京健宫医院

陈明明 河北省血液中心

编 委 徐玉玲 郑州市中医院

王 昊 郑州市中医院

廖华伟 川北医学院附属医院

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

临床医学诊疗丛书·内科分册/孙承美, 高淑芳, 张微主编.

—北京: 军事医学科学出版社, 2008.6

ISBN 978-7-80245-114-8

I. 临... II. ①孙... ②高... ③张... III. ①临床医学

②内科-疾病-诊疗 IV. R4 R5

中国版本图书馆CIP数据核字 (2008) 第092479号

出 版: 军事医学科学出版社

地 址: 北京市海淀区太平路27号

邮政编码: 100850

联系电话: 发行部: (010) 63801284

63800294

编辑部: (010) 66884418, 86702315, 86702759

86703183, 86702802

传 真: (010) 63801284

网 址: <http://www.mmssp.cn>

印 装: 北京冶金大业印装厂

发 行: 新华书店

开 本: 850mm × 1168mm 1/32

印 张: 18.25

字 数: 701千字

版 次: 2008年7月第1版

印 次: 2008年7月第1次

全套定价: 480.00 元 每册定价: 40.00 元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者, 本社发行部负责调换

目 录

第一章 概论	1
第一节 绪论	1
第二节 分子生物学基础与临床	5
第三节 遗传医学基础	13
第四节 临床免疫学基础	21
第二章 呼吸系统疾病	29
第一节 急性上呼吸道感染	29
第二节 急性气管 - 支气管炎	32
第三节 慢性支气管炎	36
第四节 阻塞性肺气肿	42
第五节 支气管哮喘	46
第六节 支气管扩张	63
第七节 呼吸衰竭	73
第八节 肺炎	90
第三章 消化系统疾病	117
第四章 泌尿系统疾病	183
第五章 血液系统疾病	244

第六章 内分泌系统疾病	277
第一节 糖尿病慢性并发症	294
第七章 神经系统疾病	366
第一节 病史采集	366
第二节 周围神经病	368
第三节 面神经炎	371
第四节 末梢神经炎	373
第五节 脊髓疾病	375
第六节 脊髓压迫症	378
第七节 脊髓空洞症	382
第八节 脑血管病	385
第九节 脑血管病的分类	386
第十节 出血性脑血管病	388
第十一节 缺血性脑血管病	395
第十二节 高血压脑病	402
第十三节 锥体外系疾病	403
第十四节 风湿性舞蹈病	407
第十五节 肝豆状核变性	408
第十六节 肌病	411
第十七节 多发性肌炎	414
第十八节 周期性瘫痪	417

第十九节 重症肌无力	421
第二十节 癫痫	425
第八章 风湿性疾病	433
第九章 充血性心力衰竭	449
第一节 慢性心力衰竭	449
第二节 急性充血性心力衰竭	476
第三节 难治性心力衰竭	481
第四节 心律失常	482
第五节 过早搏动	490
第六节 窦性心动过速	493
第七节 心房扑动与心房颤动	496
第八节 心室扑动与心室颤动	498
第九节 预激综合征	499
第十节 缓慢性心律失常	500
第十一节 肺原性心脏病	506
第十二节 急性肺原性心脏病	507
第十三节 慢性肺原性心脏病	509
第十四节 原发性肺动脉高压	517
第十五节 心肌病	526
第十六节 肥厚型心肌病	531

第十七节 限制型心肌病	535
第十八节 病毒性心肌炎	536
第十九节 风湿性心瓣膜病	546
第二十节 二尖瓣关闭不全	551
第二十一节 二尖瓣脱垂综合征	555
第二十二节 主动脉瓣狭窄	558
第二十三节 主动脉瓣关闭不全	568
第二十四节 三尖瓣狭窄	573

第一章 概论

第一节 绪论

医学是生命科学的重要组成部分,是一门探讨疾病的发生和发展规律,研究其预防和治疗对策的学科。自人类在地球上诞生以来,与疾病做斗争以维护和增进自身健康、延长寿命就成为人类历史中重要的一章,所以医学是一门历史悠久称得上是古老的科学。公元前 5~3 世纪的古希腊时期,希波克拉底就创立了医学的理论和实践,撰写了众多的医学论著,奠定了现代医学的基础;此时我国春秋战国时代也有托名黄帝所写的医学专著《内经》问世,总结了古代我国人民长期与疾病做斗争的经验和理论知识,奠定了我国传统医学的理论基础。随着岁月的渐进,科学的发达,促使建筑在科学实验基础上的现代医学不断地发展。观念不断更新;实践不断改进。因此,医学又是一门不断创新的学科。以不断的变化作为它永恒不变的规律,体现了现代医学的活力。

内科学是临床医学领域中一门重要的学科,它涉及面广,整体性强,在研究人体各器官系统疾病的诊断和防治中,以诊治措施不具创伤性(如体格检查、药物治疗等)或仅有轻微的创伤性(如介入性诊断和治疗)为其特色。它又是临床医学中各学科的基础,并与它们之间存在着密切的联系。近年来,以生物学(尤其是分子和细胞生物学)、化学、物理学、数学和基础医学的理论和技术的蓬勃发展为基础,临床医学正处在内容不断更新和深入的阶段,内科学也相应地进入了一个飞跃发展的时期。

20 世纪 70 年代以来,随着人群中年龄结构、疾病谱和死因谱的改变,医学的理论模式也发生了深刻的变化。20 世纪以前,医学是在生物学发展基础上形成的“生物医学模式”。它从生物学因素出发,着重于个体疾病的诊断和防治,从而对疾病的认识、预防和治疗取得了显著的成就。但随着人类文明的进步和科技的发展,这一医学模式日渐显露出它的局限性。例如在美国的研究表明,人群的疾病大约 50% 与生活方式和行为有关;20% 与环境有关(包括生活和社会环境);20% 与遗传、衰老等生物学因素有关;还有 10% 与卫生服务的缺陷有关。可见在防治疾病、维护健康的实践中,不仅要注意影响健康的生物学因素,同时也要注意疾病防治中的心理、环境和社会问题。据此,1974 年,加拿大学者 Lalonde 和美国学者 Blum 相继提出了新的医学模式称为“生物-心理-社会医学模式”(bio-psycho-social model)。从“生物医学模式”转变为“生物-心理-社会医学模式”体现在医疗卫生工作从以疾病为主导转变为以健康为主导;从以医院等医疗卫生机构为基础转变为以社会为基础;从主要依靠医学科技和医疗卫生部门转变为依靠众多的学科和

全社会的参与;满足人民对医学的需求不仅是面向个体的医疗保健,更需要面向群体的卫生保健;疾病防治的重点不仅是危害人群健康的传染病,更要重视与心理、社会和环境因素密切相关的非传染病。其目标是使人民的身心处于更加良好的健康状态。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)提出的健康标准是“健康是身体上、精神上和社会适应上的完好状态,而不仅指无病或不虚弱”(1948年世界卫生组织宪章)。

内科学的发展很快,目前对许多疾病的病因和发病机制的认识已日益明确和深入,在诊断技术和防治方法上也有很大的革新。

1.病因和发病机制方面 由于遗传学、免疫学、内分泌学、细胞生物学、分子生物学和物质代谢研究等方面的飞跃发展,使不少疾病的病因和发病机制得以进一步阐明。开始于1990年由美、英、法、德、日和我国合作进行的人类基因组计划,要将人体细胞的23对染色体中的30亿个碱基对进行识别和测序。此项工作原预期在2003年全部完成,但在2000年6月26日已提前公布了人类基因组框架结构草图,2001年2月又公布了人类基因组图谱及初步分析结果,2003年4月30日宣布人类基因组的精细测序工作全部完成。这将为阐明基因如何在决定人类生长、发育、衰老和患病中起作用提供结构基础,也为深入到基因和分子水平来认识遗传性疾病和与遗传有关的疾病提供条件。

此前已从染色体基因内DNA分析的分子水平来认识白血病和珠蛋白生成障碍性贫血的发病机制,发现了700多种人类异常血红蛋白,并从胎儿绒毛膜或羊水细胞DNA的分析做出胎儿珠蛋白生成障碍性贫血遗传类型和血友病的产前诊断。BCR/ABL融合基因、PML/RAR α 融合基因分别有助于慢性粒细胞性白血病和急性早幼粒细胞白血病的判断和分型。进行性肌营养不良、遗传性运动感觉神经病、精神发育迟缓等病已能在基因水平做出定位诊断。已发现家族性肌萎缩性侧硬化症是由于21q22.1-q22.2上Cu/Zn SOD-1基因的点突变所致。曾被认为是慢性病毒感染并与动物所患的疯牛病相关的Creutzfeldt-Jakob病,已发现朊蛋白存在于神经元中,一旦染色体20qter-q12上朊蛋白基因突变,则出现亚型朊蛋白,后者不能抵抗蛋白的溶解而致病。随着朊蛋白基础研究的发展,使朊蛋白病成为受到临床重视的疾病。发现有成年起病的遗传性共济失调为a-TTP(a-生育酚转移蛋白)基因101位置点突变的纯合子,给予维生素E治疗,神经功能得到改善。发现了1型糖尿病、强直性脊柱炎等的发病,都可能与HLA某些位点有密切关系,据此提出了血清阴性脊柱关节病的概念。目前已发现300余种由于酶或其他蛋白质异常或缺乏引起的遗传性疾病。发现与动脉粥样硬化有关的ALOX5基因。认识生物膜(细胞膜、基底膜等)在疾病发生发展中的意义,细胞Na⁺-K⁺-ATP酶对Ca²⁺通道的作用及分子探针对病毒(如HBV)DNA复制的检测等。下丘脑垂

体疾病的发病机制日趋明确,长期以来一直有争议的垂体瘤发病机制已渐趋统一。

对自体免疫性疾病特点的认识、原发性和获得性免疫缺陷(包括艾滋病)的发现,以及免疫机制障碍在很多疾病过程中所起的作用受到重视,如恶性肿瘤、部分慢性活动性肝炎、肾小球疾病、Grave 病、风湿病等。下丘脑多种神经内分泌激素的发现和某些神经递质作用的阐明,使调节人体生理活动的三大系统(神经、免疫和内分泌系统)相互关系得到更深入的认识,推动了神经内分泌学的发展,并对不少疾病的发病机制提供了进一步解释。格林-巴利综合征已被确认为免疫介导的周围神经病。组织激素如消化道激素、前列腺素、心钠素(和脑钠素)、内皮素、内皮舒张因子(已证实为 NO)等的发现和研究,不仅为某些消化系统、循环系统疾病发病机制和治疗的探索开辟了新途径,而且对了解其他疾病的发病机制也具有较广泛的意义。此外,近年来还不断发现了新的病种,例如胰生长抑素瘤、肾素瘤等;由于应用染色体显带技术,已发现遗传病和免疫病中新的综合征 30 余种;细胞膜、细胞质、核受体的发现,引出了以受体异常的疾病命名;对不少旧有的疾病也作了新的分类,如糖尿病的近代分类、高血压、高血脂的新分类等就标志着这个领域研究的进展。认为各种生命现象最终可能以物质代谢的生物化学过程来解释。

2. 检查和诊断技术方面 高效液相层析、放射免疫和免疫放射测量、酶联免疫吸附测定、聚合酶链反应和酶学检查技术的建立和完善,使测定体液中微量物质、免疫抗体、药物或微生物的 DNA 和 RNA 成为可能,其灵敏度可以达到皮克(Pg)乃至飞克(fg)水平。单克隆抗体制备成功又把高度专一性的分析技术推进一步,为诊断学和实验医学提供了新的有效手段。临床生化分析向超微量、高效能、高速度和自动化方面发展,已有每小时能完成 300 份标本、20 项指标的多道生化分析仪。心(包括血压)、肺、脑的电子监护系统能连续监测病情,当出现超过容许范围的变化时能及时报警,提高了抢救危重病人的成功率。内镜的不断改进扩大了内镜的用途,减轻了病人在检查时的痛苦,并通过直接观察、电视照相、电影照相、采取脱落细胞和活组织检查等手段,提高了对消化道、呼吸道、泌尿道、腹腔内等一些疾病的早期诊断,而且可用于治疗,如止血、切除息肉、取出结石等,逐渐发展成为微创性治疗的手段,代替了部分外科手术治疗。近年又有用于心血管系统的内镜问世。电子计算机在诊断、治疗和科研上的应用越来越广;电子计算机化 X 线体层显像(CT)从用于颅脑检查发展到全身检查,操作技术也发展到快速 CT 和螺旋 CT,多排螺旋 CT 更可进行影像的三维重建,提高了诊断,尤其是肿瘤和心血管病诊断的准确性;更新的计算机化磁共振体层显像(MRI),对显示软组织结构,例如心、脑等又略胜一筹;数字减影法动脉造影(DSA)对于肝脏、胰腺和肠道肿瘤的诊断、对肠道出血、尤其是小肠出血有定位和定性的诊断价值。数字减影法心血管造影的意义也很大。全数字化心血管 X 线造影专用系统用于心导管检查能提高影像的

分辨率,增强组织对比度,用光盘录像,激光打印,可录得并能显示更多细节的高质量图像,给诊断和治疗提供更有参考价值的资料。仿真内镜检查术是将CT或MRI所取得的图像经计算机处理获得的体内管腔三维动态影像,对胃肠道息肉、肿瘤等病变有诊断价值,成为一种新的非侵入性诊断技术。目前几乎所有的医用电子仪器都已计算机化。放射性核素检查的新技术已广泛应用于胃、肠、肝胆、心血管、内分泌、肾、血液、肺部疾病的诊断,用单光子计算机化体层显像(SPECT)使诊断水平进一步提高,而用正电子体层显像(PET)可无创伤地观察活体内的物质代谢改变,使诊断更加深入。超声诊断近年发展很快,已从A型(一维)、B型(二维)发展到三维成像,可得到脏器的立体图;多普勒彩色血流显像更可对血流及其变化取得直观的效果;食管内多平面超声心动图能在更接近心脏的部位进行探测;心肌超声显像技术有助于判断心肌的血液灌注情况。这些都是诊断疾病很有用的无创性检查技术。在有创性检查方面,临床心脏电生理检查极大地提高了心律失常的诊断水平;血管内超声显像能显示血管壁结构的变化,有力地补充血管造影的不足;对肝、肾、肺、心内膜和心肌、甲状腺等进行经皮活组织检查的技术,提高了这些脏器疾病的诊断准确性。随着影像诊断的广泛应用,出现了无症状的“肾上腺意外瘤”的诊断。

3.预防和治疗方面 在免疫活性细胞研究的基础上,出现了免疫工程在治疗上的应用,对不同类型的先天性或获得性免疫缺陷,按其性质给予相应的免疫治疗措施,如进行骨髓移植、给予免疫抑制剂或免疫增强剂等。对白血病进行联合化疗和造血干细胞移植,显著地提高了疗效,有可能将白血病彻底治愈。采用异基因骨髓移植治疗重型再生障碍性贫血取得病人长期存活的效果。周围造血干细胞移植也已在临床应用并日趋成熟。药理学的一些新进展,如关于受体和信号转导学说以及受体阻滞和神经介质的研究,导致从发病机制角度研究新药,生产诸如肾上腺素能 α 受体阻滞剂、 H_2 受体阻滞剂、多巴胺能受体阻滞剂、5-HT $_2$ 受体促效和阻滞剂等药物,同时也促进了神经精神药理学的发展。质子泵阻滞剂的问世大大提高了消化性溃疡的疗效。钙通道阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂、血小板GPIIb/IIIa受体阻滞剂和血管紧张素 α 受体阻滞剂新品种的不断问世;用基因重组技术生产的红细胞生成素、集落刺激因子、生长激素、胰岛素、组织型纤溶酶原激活剂和链激酶等的出现;HMG-CoA还原酶抑制剂和新型促胰岛素分泌剂及增效剂的开发,为治疗一些疾病提供了更有效的手段。

血液净化技术的不断改进和普及应用,使急慢性肾功能衰竭,一些中毒和容量超负荷状态的治疗大为改观。器官移植,包括肾移植、肝移植、心脏移植和肺移植长期存活率的提高,使脏器功能严重衰竭病人的寿命明显延长,部分病人尚能恢复工作。埋藏式人工心脏起搏器向微型、长效能源、程序控制、多功能和多腔多

位点起搏方面发展,制造出既可治疗缓慢心律失常、又可抗快速心律失常和除颤的埋藏式自动起搏复律除颤器(ICD),使本来预后很差的心脏病人因此能够正常地生活和工作。用带球囊的心导管扩张狭窄的动脉(特别是冠状动脉)和心脏瓣膜,用可引入电能、射频、激光、超声、冷冻等物理因子,以及带刀刃和可送入支架的心导管行心脏内消融术或血管内尤其是冠状动脉内消融、旋切或旋磨,或支架放置等介入性治疗;有防止发生再狭窄作用的药物洗脱支架(如雷帕霉素、紫杉醇洗脱支架)已在临床推广应用。用体外振波法击碎肾和胆结石等,都可部分替代外科手术。对急性心肌梗死的冠脉再灌注治疗已采用介入性治疗作为优先于溶解血栓治疗的措施。幽门螺杆菌的发现和抗菌治疗,使消化性溃疡病程大为改观,明显提高了治愈率和降低了复发率。经动脉化疗、栓塞,为一些无法手术切除的肿瘤提供一种副反应小,疗效相对好的姑息疗法。

计划免疫在全球范围内推行是传染病防治的重要组成部分,传统的生物制品如活菌(疫)苗、死菌(疫)苗、类毒素的应用已取得了明显的成效。目前疫苗已从完整的病原体发展到基因工程合成的蛋白质或肽链疫苗。通过合理安排膳食,改善人类营养,提高免疫力,来预防心脑血管疾病、抗癌、抗衰老已成为国际关注的热点,维生素 A 和锌与免疫的密切关系、维生素 C, E, 胡萝卜素和硒抗自由基损害的作用等均已被证实,这些都有助于疾病的防治和衰老的延缓。20 世纪 30 至 40 年代磺胺和青霉素 G 先后问世,启动了抗微生物药的发展。近年来 β 内酰胺类、奎诺酮类等抗生素的发展更为突出,大环内酯类也有较快的发展。抗病毒药物虽未有突破,但随着 HIV、各型肝炎病毒、埃博拉病毒、西尼罗河病毒、特别是 SARS 冠状病毒感染的出现,对抗病毒药物和疫苗的发展会有所推动。抗蠕虫药物吡喹酮的发现使血吸虫病的治疗取得了划时代的进展。由基因突变引起的许多疾病,可能通过对突变的基因进行修复、更换等基因疗法来治疗。基因疗法现已进入临床试验阶段,但由于要用病毒作为载体,而因病毒曾致病并使患者死亡,一度被美国和法国政府所暂时禁用,近日英国政府表示支持基因治疗的研究。基因治疗近期可望用于治疗血液病、肿瘤和心血管病。基因疗法还将可能用于提高智力、体力和延缓衰老。人类基因组计划的完成,宣告了一个新纪元即后基因组时代的到来。其中,功能基因组学成为研究的重点,而蛋白质组学则是功能基因组学研究的前沿。这方面的研究也将会促进内科学的发展。

第二节 分子生物学基础与临床

1953 年 Warson 和 Crick 发现了 DNA 双螺旋结构,并揭示了 DNA 自我复制的机制,为分子生物学树立了里程碑,使人们开始用分子生物学的语言来解释人类的遗传现象。1961 年 Marmur 和 Doty 发现了 DNA 分子的复性规律并建立了核酸分子杂交技术;1966 年 Nirenberg, Crick 和 Ochoa 等破译了人类的遗传密码,并提

出了遗传信息的中心法则,1968 年 Arber 等发现了 DNA 限制性内切酶;1972 年 Boyer, Cohen 和 Berg 成功地建立了 DNA 无性繁殖技术;1975 年 Sanger 和 Gilbert 建立了 DNA 分子中核苷酸顺序分析法。在上述基础理论和基本技术的发现和发明的基础上,建立了重组 DNA 一基因工程技术,而今已成为分子生物学的核心技术,并已渗透到生命科学的各个领域,成为研究和揭示生命现象的本质和规律的重要工具,在医学领域尤为突出。利用重组 DNA 一基因工程技术,不仅研制了多种多样的疫苗、药物和诊断试剂用于防病治病,而且揭示了几乎所有疾病的发病机制都与特定基因的结构和功能、基因表达及其调控有关。分子生物学的理论和技术正在深刻地促进着医学的发展。

一、基因工程的基本过程

基因工程是通过人为的基因重组和转移,将某种生物细胞的基因或人工合成的基因导入另一种生物细胞,在此种细胞内大量复制外源基因并转录翻译该基因编码的蛋白质(或多肽),改变此种细胞的基因表型。表达的蛋白质(或多肽)提纯后形成基因工程产品,具有重要的应用价值。基因工程的基本过程为。

【目的基因的制备】

1.人工合成利用化学合成基因片段和 DNA 连接酶的催化作用合成基因。自从 DNA 合成仪问世以来,人工合成的效率更高,一般只需 4-6min 就可以延长一个核苷酸的长度,化学合成脱氧寡核苷酸多采用固相磷酸三酯法。

2.逆向转录先从组织制备信使 RNA(mRNA),再以 mRNA 为模板,用 oligo(dT) 为引物,逆向转录酶催化下合成与 mRNA 碱基互补的单链 DNA(ss-cDNA),然后用碱水解除去 mRNA,并以 ss-cDNA 为模板,在 DNA 聚合酶催化下合成互补双链 DNA(ds-cDNA)。最后用 S1 核酸外切酶处理,切去发夹结构和单链结构。由此途径合成的 ds-cDNA 含有该组织细胞内各种各样的遗传信息,不仅仅是某一特定的基因,必须与载体 DNA 重组,转化细菌制成 cDNA 基因库,然后用合适的探针从 cDNA 基因库中筛选分离出带有所需基因的 cDNA 的克隆。

3.逆向转录结合 PCR 可直接制备基因。从组织提取 mRNA,通过逆向转录酶催化,合成单链 DNA,然后加入扩增特定基因的引物,用 PCR 反应扩增基因。

4.从染色体 DNA 分离分子量较大的基因需要从染色体 DNA 中分离。首先制备核内大分子 DNA,然后用限制性核酸内切酶水解染色体 DNA,将需要的 DNA 片段与载体 DNA 重组,转化宿主细胞,制成基因库。再用合适的探针通过分子杂交,从基因库中分离出含有特定基因的克隆。染色体 DNA 往往含有插入序列或内含子,会给基因的表达带来很大的困难。

〔重组 DNA 分子导入宿主细胞〕

目的基因与载体 DNA 在体外连接成重组体 DNA 分子后,导入宿主细胞。根

据基因载体的不同,选择原核或真核宿主细胞。导入的方法因宿主细胞不同而不同。

1.转化(transformation)以质粒为载体的重组 DNA 导入原核宿主,通常利用化学法诱导细菌进入感受态,以便使外源 DNA 进入细菌内。例如采用低温低渗处理宿主菌,使细菌膨胀成球形,改变膜通透性,而转化混合物中的 DNA 形成对 DNase 有抗性的经基—钙磷酸复合物,粘附在细菌表面,经短时间热休克处理,促进细菌吸收 DNA 复合物,然后涂布在选择性培养基平板上,挑选转化子。

2.转染(transfection)以噬菌体或病毒作载体将外源基因导入宿主细胞。噬菌体转染时与质粒转化细菌基本相同,所不同的仅是被感染菌涂布在软琼脂层上,以便形成噬斑。外源重组基因转染哺乳动物细胞的方法有 DNA-磷酸钙沉淀、电穿孔、脂质体介导、DEAE-多聚糖以及显微注射等多种技术。

[克隆的筛选和鉴定]

(一)原核宿主系统

- 1.利用药物筛选基因 如氨苄青霉素和四环素等。
- 2.利用显色反应重组 M_{13} 病毒感染细菌后形成无颜色噬斑,野生型 M_{13} 病毒感染细菌后形成蓝色噬斑。 λ gt10 载体组装的重组病毒形成光滑透亮噬斑,而单纯 λ gt10 的噬斑混浊而边缘粗糙。
- 3.菌落或噬斑原位杂交。
- 4.重组质粒或噬菌体 DNA 的内切酶片段分析。
- 5.选择性翻译用变性重组质粒或噬菌体 DNA 与 mRNA 杂交,洗脱 mRNA,观察后者能否翻译出外源基因编码的多肽或蛋白质。
- 6.捕获性翻译先进行上述杂交反应,再进行翻译反应,观察是否抑制特异 mRNA 的翻译功能,有抑制作用者,其重组质粒或噬菌体中含有外源基因。
- 7.放射免疫法通过放射免疫反应或光化学反应检测该克隆是否能翻译出目的基因编码的蛋白质。
8. DNA 核苷酸序列测定。

(二)真核宿主系统真核载体都有筛选基因,如:二氢叶酸还原酶(dhfr)基因、胸腺核苷激酶(tk)基因、氯霉素乙酰转移酶(cat)基因、新霉素磷酸转移酶(neo)基因和次黄嘌呤—鸟嘌呤磷酸糖基转移酶(hgt)基因等。因此,真核载体构建的重组 DNA 转化动物细胞后,利用选择培养基即可分离阳性克隆。

1.dhfr 筛选系统二氢叶酸还原酶(dihydrofolatereductase, dhfr)在真核细胞的核苷酸合成中起着重要的作用,它催化二氢叶酸还原成四氢叶酸,四氢叶酸在胸腺嘧啶的合成过程中提供甲基,无四氢叶酸则不能合成胸腺嘧啶。由二氢叶酸还原成四氢叶酸的反应过程能被叶酸的类似物氨基喋呤和甲氧喋呤竞争性抑制。dhfr

一表型的细胞由于不能合成四氢叶酸,除非培养基中含有外源的胸腺肽 pry、甘氨酸和 Pr 呤,否则细胞因缺乏胸腺嘧啶及嘧啶而死亡,但将 dhfr 基因转入缺陷型细胞后,细胞则能合成四氢叶酸,所以转入以 dhfr 基因作筛选基因的重组 DNA,细胞就能在无胸腺嘧啶和次黄嘌呤的选择培养基中存活,而未转入 dhfr 基因的细胞则被选择淘汰。如含 pSV-dhfr 载体的重组子转化 CHO-dhfr 细胞后,细胞培养于 DMEM 培养液中,无重组子进入,细胞不能存活,因 CHO-dhfr- 细胞中 dhfr 基因有缺陷,细胞不能合成二氢叶酸还原酶,造成胸腺嘧啶核苷酸等合成障碍和 DNA、RNA 合成障碍。而含有 pSVz-dhfr 载体组分重组子进入 CHO-dh-fr- 细胞,由于外源基因中除有目的基因外,尚含有 dh-fr 基因,故转化细胞能编码二氢叶酸还原酶,能在 DMEM 选择培养液中存活。

dhfr 基因选择系统需要 dhfr 一表型的受体细胞,这种系统可以使外源基因得到扩增,当培养基中逐渐增加甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)的浓度时,随着细胞对 MTX 抗性的增加,dhfr 基因与外源基因均明显扩增,从而提高外源基因的表达水平。

2.tk 选择系统胸腺激酶(thymidine kinase)是核酸合成代谢途径中的一种酶,能将胸苷转换成胸-磷酸。几乎在所有的真核细胞中都能有效地表达胸苷激酶基因(tk)。在胸苷激酶基因选择系统中,必须用 tk 表型缺陷型(tk-)细胞作为宿主细胞。选择 tk+ 细胞的培养基含次黄嘌呤(hypoxanthine),氨基嘌呤(aminopterin)和胸苷(thymidine),称 HAT 选择法。其选择原理为:如果用叶酸的类似物氨基嘌呤(A)处理细胞,二氢叶酸还原酶被抑制,不能使二氢叶酸还原成四氢叶酸,其结果是培养基中的四氢叶酸因得不到补充而逐渐耗尽,于是从 dUMP 合成 TTP,dATP 和 dCTP 均被阻断。次黄嘌呤是 dATP 和 dCTP 补救合成途径的一种底物,培养基中含有这种物质时,细胞就能越过氨基嘌呤的抑制作用,利用补救途径继续合成出这些核酸。同时由于在 HAT 培养基中含有外源的胸苷(T),所以 tk+ 细胞通过胸腺激酶的作用合成 TTP,继续存活下去;而 tk- 细胞因缺乏胸腺激酶而不发生这种合成,因而死亡。如将正常的 tk 基因导入 tk- 细胞,这些细胞能够存活下去。所以使用 HAT 培养基,能够选择出经 tk 基因转化的 tk- 细胞。

3.neo 选择系统新霉素是细菌抗生素,它可以干扰原核生物的核糖体,使其蛋白质合成不能正常进行,而真核细胞核糖体则不受新霉素的影响。新霉素的一种类似物 6418 (geneticin)对真核细胞和原核细胞均有毒性。细菌的新霉素抗性基因(neo)能在真核细胞中表达,当 neo 基因与真核 DNA 序列连锁时能获得有效的表达。neo 基因编码一种磷酸转移酶,这种酶能使 6418 失活。所以,当细胞表达了这种 neo 抗性基因后,就会在含 6418 的选择培养基中存活。

4.cat 系统氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, cat)是由大肠

杆菌转座子 Tn9 编码的,cat 可催化乌钱霉素发生乙酰化作用,从而使其失去活性。虽然真核细胞不含有内源的 cat 酶活性,但真核细胞的启动子却可引发外源 cat 基因的表达,所以细菌的这个基因可以作为检测外源基因导入真核细胞的一种十分敏感的标记基因,这一选择系统适用于瞬时表达的研究。带有 cat 基因的质粒载体转化哺乳动物细胞后,就会合成 cat。哺乳动物细胞本身不能合成 cat,只要在转化的细胞中检测到 cat 的活性,即肯定来自外源的 cat 质粒,这也是 cat 基因选择系统的优点。为了测定转化细胞的 cat 的活性,在转化后的 48-72 小时,离心收集细胞,并制备细胞提取物,然后加入乙酰辅酶 A 和 ^{14}C 标记的氯霉素进行孵育,如果细胞中有 cat 存在,氯霉素就被乙酰化,作薄层层析分离,便可将氯霉素和乙酰化的氯霉素分开,然后通过放射自显影技术测定乙酰化的产物。此法十分灵敏,而且精确。

【目的基因的表达及检测】

(一)目的基因的表达

当真核基因转化大肠杆菌后,除了少数低等真核基因以外,都不能在大肠杆菌中转录和翻译蛋白质。这是因为:①原核细胞不认识真核细胞的转录和翻译信号(如启动、延长、终止等)。②真核基因常有插入顺序,需在转录后加工时除去,从而形成 mRNA。而原核生物一般不存在转录后的加工系统,所以大肠杆菌小能利用这种基因合成有模板活性的 nRNA,也就不能表达这些含有插入顺序的真核基因。双链 cDNA 基因是以 mRNA 作模板合成的,没有插入顺序,常用于基因工程。③在转录翻译时没有合适的空间构型。

在原核细胞中高效表达真核基因必须注意以下几点:

1.在编码基因起始密码前加入一个原核细胞认识的控制基因表达的结构,其中包括:① CAP 的结合位点;c-AMP 与受体蛋白复合物结合位点,该部位的 DNA 构型可发生改变,适合于 RNA 聚合酶进入转录单位,从而触发转录过程;②启动子(promotes):RNA 聚合酶结合位点;③操纵基因(operator)阻抑蛋白结合位点;④核糖体结合位点:包括起始密码和 sD 顺序(Shine-Dalgarno) SD 顺序位于起始密码 ATG 上游 3-126p 区域,长度约 6-7cm。这段顺序与大肠杆菌 16SrRNA 3- 端顺序互补,所以 mRNA 分子中与 SD 顺序相应的区域能和 16SrRNA3- 端结合,两者互补程度和 ATG 与 SD 片段距离都会影响表达水平。

2. 编码基因要完整,必须有一正确的阅读框架,没有插入顺序。5'- 端有 ATG, 3'- 端要有终止信号。

3.若真核基因表达产物在大肠杆菌中不稳定,可将真核基因与原核的某个基因融合。例如与 R 半乳糖苷酶基因融合,表达融合蛋白以避免细菌蛋白酶的水解作用。融合蛋白经化学方法或酶学方法处理,可以分离出目的蛋白。例如胰岛素原

半乳糖酶融合蛋白溴化氰处理,能破坏胰岛素基因起始密码所编码的甲硫氨酸,从而分离出胰岛素原。如果在起始信号前克隆一段 Asp 编码基因,则可用肠激酶处理融合蛋白,然后分离出胰岛素原,因为加入的这段顺序二是肠激酶的识别位点。

4.许多蛋白质或多肽的s'一端往往含有一段信号肽基I,在基因中保留信号肽顺序,有利于表达产物自细菌分泌到培养液中(例如胰岛素),有利于产物的分离和纯化。

用动物细胞表达真核基因的优点:动物细胞有DNA, RNA剪接加工,蛋白质糖化,组装一硫键等系统,以及向细胞外分泌蛋白质等功能。可从培养液中分离纯化表达产物。常用的受体细胞有中国仓鼠卵巢上皮细胞(CHO)和仓鼠肺成纤维细胞(CHL)。

(二)外源基因表达产物的检测

1.免疫化学方法免疫荧光抗体法、免疫沉淀法、Western印迹法等。

2. SDS-PAGE表达菌或细胞溶解后进行电泳,观察表达产物在电泳图谱中显示的特征性条带。

3.若表达产物是一种酶,可测定其活性;表达产物为激素或细胞因子,则可测定其特异的生物学活性。

二、基因治疗

利用重组DNA技术将外源正常基因导入靶细胞,使外源基因制造的产物纠正或补偿因基因缺陷引起的异常,从而达到治疗目的。从广义说,基因治疗还可包括从DNA水平治疗某些疾病的措施和新技术。例如用5-氮胞苷抑制甲基化酶,使已关闭的 γ 基因(胎儿及新生儿期的珠蛋白基因簇的成员)转录,大量合成 γ 链,与 α 链形成HbF($\alpha\gamma$),替代HbA的功能。再如反义技术也是在RNA, DNA水平治疗疾病,是很有发展前途的高新技术。外源基因转移方法有化学法(磷酸钙、DEAE-葡聚糖等)、物理法(电穿孔、显微注射、脂质体)、同源重组法、病毒介导法(反转录病毒载体、腺病毒载体等)。当前普遍采用的方法是应用反转录病毒作为载体的基因导入法。作为载体的反转录病毒已经缺失功能蛋白基因。目的基因同反转录病毒载体重组后经包装成病毒颗粒,转染受体细胞从而实现基因转移。这种重组反转录病毒将所携带的功能性目的基因整合到细胞染色体上,目的基因的表达产物将弥补原来缺失的基因产物。为克服反转录病毒载体整合目的基因的盲目性,用同源重组或基因打靶的方法,将目的基因定位整合,但在效率上远不如反转录病毒载体;还可以将组织或器官特异性启动子与目的基因重组,使外源基因在特定的组织或器官中表达。例如,Keratin typ-5启动子控制下,外源基因只在皮肤、牙齿和毛发进行表达。遗传性疾病的基因治疗,目前局限于单基因缺陷所引起的疾病,如血友病、腺酸脱氨酶(ADA)缺陷症、地中海贫血、镰刀型细胞