

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)03-0201-05

重组人黑色素瘤抗原 MAGE3/HSP70 融合蛋白工程菌的高密度发酵及其免疫学活性

胡沛臻¹ 路凡² 王孝功² 李侠¹ 司少艳¹ 黄杨¹ 马斌¹ 张秀敏¹ 隋延仿¹(第四军医大学¹ 西京医院病理科² 基础部生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710033)

High cell-density fermentation of engineered *E. coli* and antitumor immunity of recombinant human MAGE3/HSP70 *in vivo*

HU Pei-Zhen¹, LU Fan², WANG Xiao-Gong², LI Xia¹, SI Shao-Yan¹, HUANG Yang¹, MA Bin¹, ZHANG Xiu-Min¹, SUI Yan-Fang¹¹Department of Pathology, Xijing Hospital, ²Department of Molecular Biology and Biochemistry, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To realize high cell-density fermentation of MAGE3/HSP70 engineered *E. coli*, and to evaluate the antitumor immunity of MAGE3/HSP70 fusion protein *in vivo*. **METHODS:** High cell-density fermentation of MAGE3/HSP70 engineered *E. coli* was carried out with constant soluble oxygen and continuous cultivation in self-control fermentor. The mouse was immunized by purified MAGE3/HSP70 fusion protein in *E. coli*, and the antitumor immunity was detected by ELISPOT and LDH release assay. **RESULTS:** High cell-density fermentation of MAGE3/HSP70 engineered *E. coli* was successful, and the expression of MAGE3/HSP70 in fermented bacterial was the same as the flask culture. The results of ELISPOT and LDH release assay showed that MAGE3/HSP70 generated tumor specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) to damage tumor cell. **CONCLUSION:** High cell-density fermentation of MAGE3/HSP70 engineered *E. coli* was realized and MAGE3/HSP70 fusion protein can generate specific CTL to kill tumor cell.

【Keywords】 Melanoma antigen; fermentation; *E. coli*

【摘要】目的 实现重组人黑色素瘤抗原 MAGE3/HSP70 融合蛋白工程菌的高密度发酵,并测定 MAGE3/HSP70 融合蛋

收稿日期 2006-07-05; 接受日期 2006-08-21

基金项目 国家自然科学基金(30271464);全军医药卫生科研基金重点资助项目(012084)

通讯作者 隋延仿. Tel (029)84774597 Email suiyanf@fmmu.edu.cn
作者简介 胡沛臻. 博士生(导师隋延仿). Tel (029)84774541 Ext.

211 Email hupigeon@fmmu.edu.cn

白在体内的抗肿瘤免疫效应. 方法 利用自控发酵罐发酵,采用溶氧反馈,分批补料的方法对 MAGE3/HSP70 融合蛋白工程菌进行了高密度发酵,从菌体中纯化 MAGE3/HSP70 融合蛋白,并用所纯化的 MAGE3/HSP70 融合蛋白免疫小鼠,运用酶联免疫斑点法(ELISPOT)和细胞毒性杀伤实验(LDH)检测了融合蛋白激活机体细胞免疫反应的状况. 结果 高密度发酵取得成功,发酵菌中 MAGE3/HSP70 融合蛋白的表达量与摇瓶中的相当,摸索出发酵水平纯化 MAGE3/HSP70 融合蛋白工艺,ELISPOT 和 LDH 显示 MAGE3/HSP70 可以激活机体免疫反应,并产生针对 MAGE3 的 CTL,特异性杀伤表达 MAGE3 的肿瘤细胞. 结论 MAGE3/HSP70 融合蛋白工程菌成功实现高密度发酵, MAGE3/HSP70 融合蛋白可以有效激活机体免疫反应,产生针对特异性抗原 MAGE3 的 CTL,免疫学活性良好,为新型抗肿瘤疫苗临床前研究奠定了良好基础.

【关键词】 黑色素瘤抗原; 发酵; 大肠杆菌

【中图分类号】 Q93-335 R322 **【文献标识码】** A

0 引言

黑色素瘤抗原(melanoma antigen-associated gene, MAGE)是第一类被发现的肿瘤排斥抗原^[1-2], MAGE3 是 MAGE 家族成员之一,不仅在黑色素瘤表达,同时在其它多种肿瘤中均有不同程度的表达,能够诱导机体特异性的 CTL 反应,更重要的是在除睾丸和胎盘外的正常组织中均不表达,人们认为它是肿瘤特异性免疫治疗理想的靶分子之一^[3-4]. 重组人黑色素瘤抗原 MAGE3/HSP70 融合蛋白(专利申请号 ZL03134626.X)是我室研制和开发的一种新型肿瘤疫苗^[5],它对肝癌、胃癌、乳腺癌等常见恶性肿瘤具有良好的治疗效果和预防效果,在肿瘤的治疗方面具有潜在的临床应用价值^[6]. 本研究目的是实现重组人黑色素瘤抗原 MAGE3/HSP70 融合蛋白工程菌的高密度发酵,并用从发酵菌中纯化的目的蛋白,测定其在体内的抗肿瘤免疫效应,为通过动物肿瘤模型研究 MAGE3/HSP70 融合蛋白在肿瘤免疫治疗中的作用奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 含 MAGE3/HSP70 基因的重组表达质粒

pET-28a/MAGE3-HSP70 由本室构建, 宿主菌 BL21 (DE3) 本室保存. NBS Bioflo IV 20L 自动发酵罐 (NBS 公司); J-6B 型大容量冷冻离心机 (Beckman 公司); 微量蛋白电泳仪 (Bio-Rad 公司); ÄKTA explorer 100 层析系统 (Amersham Pharmacia Biotech 公司); 实验动物是由第四军医大学实验动物中心引进繁殖的 4~6 wk 龄二级 C57BL/6 小鼠 40 只, 体质量 18~20 g, 均为雌性, 在 SPF 级饲养条件下进行试验. 转 MAGE-3 基因的小鼠黑色素瘤细胞 B16-MAGE3 由本实验室马家海博士构建, MAGE-3 蛋白和 HSP70 蛋白由本实验室马家海博士提取并鉴定. 小鼠 IFN- γ ELISPOT 系统 (法国 Diaclone 公司); Cytotox96 检测试剂盒 (Promega 公司); Ficoll 淋巴细胞分离液 (Sigma 公司); 蛋白胨、酵母抽提物 (Oxoid 公司); SOURCE 30Q 及 Sephacryl S-200HR (Pharmacia 公司); IPTG (Sigma 公司); 抗 MAGE3 多克隆抗体 (R&D 公司); 其余试剂均为国产分析纯试剂. 主要溶液的配制 ①种子液 1000 mL 种子液中含蛋白胨 16 g, 酵母提取物 10 g, 甘油 20 mL, NaCl 5 g, 用 5 mol/L NaOH 将 pH 值调至 7.0; ②发酵液: 每升发酵液中含有蛋白胨 20 g, 酵母抽提物 9 g, 甘油 5 mL, 十二水磷酸氢二钠 6 g, 磷酸二氢钾 1.5 g, 硫酸铵 1.5 g, 氯化铵 1 g, 七水合硫酸镁 0.25 g, 氯化钙 0.02 g, 硫酸亚铁 0.04 g, 甘氨酸 0.5 g. 每升补料基质含有: 甘油 120 mL, 蛋白胨 80 g, 酵母抽提物 40 g, 七水合硫酸镁 5 g.

1.2 方法

1.2.1 种子培养 取 -70℃, 100 g/L 甘油保存的 pET-HM/BL21(DE3) 菌种 1 支, 从中挑取 1 环, 划含卡那霉素 (Kan) 的 LB 平板, 37℃ 培养过夜, 次日挑取一个边缘整齐、生长良好的单菌落接种到 10 mL LB 培养基中 (含 35 mg/L Kan), 37℃ 振荡培养 12 h, 以 50 g/L 接种量转接 1 次, 37℃ 继续培养 4 h 左右, 使其生长至对数生长期, 以 1% 接种量转接至 200 mL 种子液中, 37℃ 振荡培养过夜.

1.2.2 发酵 采用 20 L NBS Bioflo IV 自控发酵罐, 发酵总体积 12 L (0.6 L 种子液, 0.74 L 发酵液, 1.2 L 缓冲液, 9.48 L H₂O), 含 Kan (35 mg/L). 以 AFS-BioCommand Bioprocessing Software (Version 2.61) 软件对其进行数据采集 (每 30 s 采集数据 1 次), 实现计算机在线控制, 全过程共 10 h. 控制参数为: ①空气流量设定为 12 L/min, 溶氧控制在 40%, 达到最大转速后, 通入纯氧; ②温度控制为 37℃; ③pH 值设定为 7.0, 自动流加浓氨水以保持恒定; ④搅拌速度: 设定搅拌速度下限为 200 r/min, 上限为 1200 r/min.

生长过程中当溶氧低于设定值时通过计算机由 AFS-BioCommand Bioprocessing Software (Version 2.61) 软件控制每分钟增长 5 转. 诱导过后, 搅拌速度改为由 NBS Bioflo IV 发酵罐自动溶氧反馈控制. ⑤补料流加: 在生长阶段, 当溶氧率在 3 min 内持续高于 60% 时补料泵以 5% 的速率进行补加营养. 诱导阶段当溶氧值在 3 min 内持续高于 50% 时补料泵以 100% 的速率进行补加营养 1 min. 每 1 h 取样测定 A_{600 nm} 值, 当培养至 A_{600 nm} = 12 时 IPTG 诱导目的蛋白表达, 诱导 4 h 后收集菌体, 取少量进行 SDS-PAGE 检测蛋白表达水平, 其余菌体保存于 -70℃ 用于纯化目的蛋白.

1.2.3 目的蛋白的纯化 4℃ 离心收菌, 3 mL/g 菌体重悬于 Lysis Buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L imidazole, pH 8.0); 加入溶菌酶至终浓度为 10 g/L, 冰浴 30 min, 超声裂解, 功率 2 kW, 超声 10 s, 间隔 10 s, 共 30 min, 12 000 g, 4℃ 离心 15 min, 取上清, 0.45 μ m 针头滤器过滤; 上 Ni-NTA Superflow 柱, Wash Buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L imidazole, pH 8.0) 冲洗后 Elution Buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L imidazole, pH 8.0) 洗脱, 收集洗脱峰; SDS-PAGE 分析; 以 50 倍体积的 A 液 (20 mmol/L Tris · HCl, pH 8.0) 透析 24 h, 中间换 3 次透析外液, 透析后上清过用 A 液充分平衡的 SOURCE 30Q 柱, 用 B 液 (20 mmol/L Tris · HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH 9.0) 连续梯度洗脱 4~5 个柱床体积, 收集洗脱峰; SDS-PAGE 分析; 收集目的蛋白峰, 以 50 倍体积的 C 液 (20 mmol/L Tris · HCl, pH 7.4) 透析 24 h, 中间换 3 次透析外液, 透析后上清过用 D 液 (137 mmol/L NaCl, 1.4 mmol/L KH₂PO₄, 1.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na₂HPO₄ · 12H₂O, pH 7.4) 液充分平衡的 Sephacryl S-200HR 柱, 收集洗脱峰; SDS-PAGE 及 Western Blot 鉴定. Bradford 法测定蛋白的含量, 冻干, -70℃ 保存.

1.2.4 动物免疫和小鼠脾淋巴细胞的分离与活化 C57BL/6 小鼠 30 只, 随机分为 5 组, 每组 6 只, 各组分列于第 1, 10, 20 日腹腔注射蛋白免疫, MAGE-3 组注射 MAGE-3 蛋白 3.2 μ g (200 pmol); HSP70 组注射 HSP70 蛋白 15.8 μ g (200 pmol); MAGE3/HSP70 组注射融合蛋白 18.6 μ g (200 pmol); HSP70 + MAGE-3 组注射 HSP70 蛋白 7.9 μ g (100 pmol) 和 MAGE-3 蛋白 1.6 μ g (100 pmol), 对照组注射 PBS, 100 μ L/ (只 · 次). 末次免疫后 10 d, 小鼠球后动脉取血, 断颈处死, 无菌取脾脏, 毛玻璃片轻轻捻碎脾脏, 10 号针头轻轻吹吸数次, 用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离淋巴

细胞. 计数后, 用 AIM-V 培养液培养 1 d 后用于后续试验.

1.2.5 MAGE-3 特异性 T 细胞的检测 采用 IFN- γ ELISPOT 方法: 依照法国 DIACLONE 公司 ELISPOT 检测试剂盒使用说明, 用稀释好的捕获抗体 (Capture Antibody) 100 μ L/孔包被 PVDF 板, 4 $^{\circ}$ C 静置 16 h. 20 g/L 脱脂乳 PBS 室温封闭 2 h, 加入 PBS, MAGE-3, HSP70, MAGE3/HSP70 和 MAGE-3 + HSP70 免疫小鼠得到的脾细胞细胞 1×10^4 个/孔, 同时加入转 MAGE-3 基因的小鼠黑色素瘤细胞 B16-MAGE3 细胞 5×10^4 个/孔, 每个实验组设置 3 个复孔, 50 mL/L CO₂ 纳胞培养箱静置培养 20 h. 用 PBS 充分冲洗后加入检测抗体 (Detection Antibody), 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 洗板, 再加入碱性磷酸酶标记的链霉亲和素, 同上孵育洗板, 加入底物显色液. 避光显色 20 min, 1200 dpi 扫描读取斑数, 统计学分析.

1.2.6 LDH 释放法测定细胞杀伤效率 方法参照文献 [5], 主要步骤如下: 以 PBS, MAGE-3, HSP70, MAGE3/HSP70 和 MAGE-3 + HSP70 免疫小鼠得到的脾细胞为效应细胞, 以 MAGE-3 基因的小鼠黑色素瘤细胞 B16-MAGE3 细胞为靶细胞, 以小鼠黑色素瘤细胞 B16 为对照, 进行体外杀伤实验. 靶细胞浓度为 1×10^4 个/孔, 效靶比分别为 5:1, 10:1 和 50:1, 37 $^{\circ}$ C 共育 4 h, 离心后, 每孔吸取 50 μ L 上清液进行 LDH 检测. 实验同时设立效应细胞自发释放孔, 靶细胞自发释放孔, 靶细胞最大释放孔和培养液背景孔. 每个实验组设 3 个复孔, 用 AIM-V 无血清培养液洗涤重悬细胞, 所有检测孔所测得吸光度值减去培养液背景即为实际值. 按下公式计算: 杀伤率 = (实验组 A - 效应细胞自发 A - 靶细胞自发 A) / (靶细胞最大 A - 靶细胞自发 A) \times 100%.

统计学处理 统计资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 分析采用 JMP 统计软件 (V5.0.1.2 SAS Institute Inc.) 进行, 组间比较采用方差分析处理, $P < 0.05$ 表示有统计学意义.

2 结果

2.1 工程菌的发酵 为了获取足量的菌体进行研究, 我们对工程菌进行了高密度发酵. 用溶氧反馈、分批补料的方法, 采用 20 L NBS Bioflo IV 发酵罐进行高密度发酵. 接入种子液时菌体密度为 $A_{600\text{nm}} = 0.01$, 6 h 后达 $A_{600\text{nm}} = 12.8$. 200 μ mol/L IPTG 诱导表达目的蛋白, 于诱导后 4 h 终止发酵, 发酵结束时 $A_{600\text{nm}} = 48.2$, 每升发酵液收湿菌 70 g, 发酵曲线如图 1.

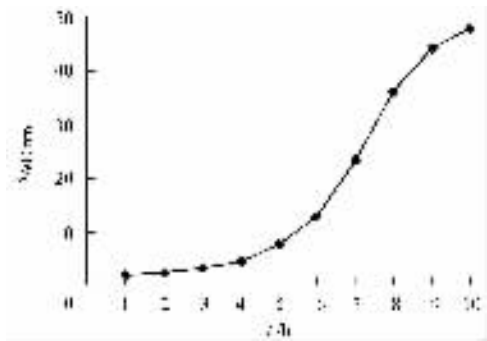
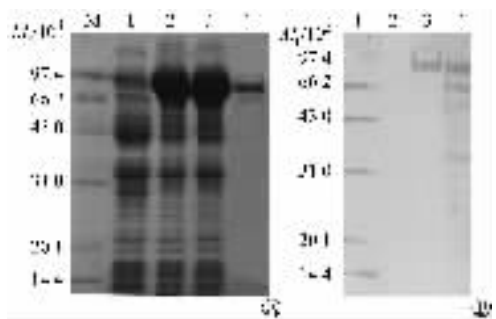


图 1 pET-MH/BL21(DE3)工程菌的发酵曲线

2.2 MAGE3/HSP70 融合蛋白的表达及纯化 结果显示, 在诱导 4 h 后, 发酵菌体的重组蛋白表达量同摇瓶培养表达水平相当 (图 2A). 发酵菌体裂解后取上清, 经过 Ni-NTA Superflow, SOURCE 30Q 及 Sephacryl S-200HR 纯化后, 纯度可达 90% 以上 (图 2A). Western Blot 结果显示, 纯化后的目的蛋白能够与抗人 MAGE3 多克隆抗体特异性结合 (图 2B).



A M: 低分子量蛋白标准; 1: 未诱导 pET-MH/BL21(DE3); 2: 摇瓶 IPTG 诱导 pET-MH/BL21(DE3); 3: 发酵罐 IPTG 诱导 pET-MH/BL21(DE3); 4: 纯化 MAGE3/HSP70 融合蛋白. B 1: 低分子量蛋白标准; 2: 未诱导 pET-MH/BL21(DE3); 3: 纯化 MAGE3/HSP70 融合蛋白; 4: 发酵罐 IPTG 诱导 pET-MH/BL21(DE3).

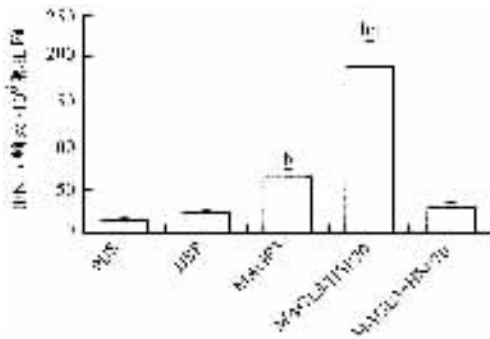
图 2 MAGE3/HSP70 的原核表达与分离纯化 (A) 及 Western Blot (B) 结果

2.3 体外肿瘤免疫学试验

2.3.1 ELISPOT 检测分泌 IFN- γ 的 MAGE3 特异性 T 细胞数量 与 PBS 组比较, HSP70 组、MAGE-3 + HSP70 组小鼠脾淋巴细胞中分泌 IFN- γ 的 T 淋巴细胞频数没有明显变化, MAGE-3 组和 MAGE3/HSP70 组频数显著增加 ($P < 0.05$), 而且 MAGE3/HSP70 组频数显著大于 MAGE-3 组 ($P < 0.01$, 图 3).

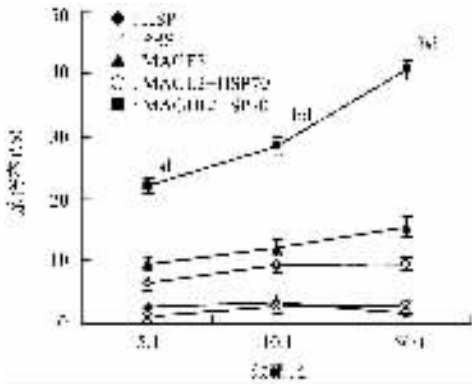
2.3.2 细胞毒性实验 采用 LDH 释放实验, 结果显示, 效靶比为 5:1, 10:1 和 50:1 时, HSP70 组及 PBS 组诱导的 CTL 对 B16-MAGE-3 细胞无特异性杀伤作用, MAGE-3 组、MAGE-3 + HSP70 和 MAGE3/HSP70 组特异性杀伤作用显著增强, 而且 MAGE3/HSP70 组

特异性杀伤作用显著大于 MAGE-3 组、MAGE-3 + HSP70 组 ($P < 0.01$, 图 4), 说明 HSP70-MAGE-3 融合蛋白疫苗能诱导产生 MAGE-3 抗原特异性的 CTL, 对表达 MAGE-3 的肿瘤细胞具有强大的特异性杀伤作用。



^b $P < 0.01$ vs PBS; ^d $P < 0.01$ vs MAGE3.

图3 ELISPOT 检测蛋白疫苗免疫小鼠分泌 IFN- γ 的 T 淋巴细胞频数 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)



^b $P < 0.01$ vs PBS; ^d $P < 0.01$ vs MAGE3.

图4 蛋白疫苗免疫的小鼠脾淋巴细胞对 B16-MAGE-3 细胞的特异性杀伤 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

肿瘤免疫治疗在预防肿瘤复发、转移及治疗微小残留肿瘤病灶等方面有其独特的优势,是肿瘤综合治疗的重要组成部分。肿瘤免疫治疗的分子基础是肿瘤抗原可以激活机体特异性 CTL 杀伤肿瘤细胞。黑色素瘤抗原 (MAGE) 是一种肿瘤特异性抗原,是肿瘤特异性免疫治疗理想的靶分子^[1-2]。其中 MAGE-3 可以激活机体的细胞免疫系统,活化 CTL 特异性地识别并杀伤表达 MAGE-3 的肿瘤细胞^[3-4]。重组人黑色素瘤抗原 MAGE3/HSP70 融合蛋白是我室研制和开发的一种新型肿瘤疫苗^[5],实验表明,它对肝癌、胃癌、乳腺癌等常见恶性肿瘤具有良好的治疗效果和预防效果,在肿瘤的治疗方面具有潜在的临床应用价值^[6]。作为广谱抗肿瘤药物的研究,其用量较大,为了得到大量的重组 MAGE3/HSP70 蛋白,就需

要大量的诱导表达 MAGE3/HSP70 蛋白的基因重组菌体,而高密度发酵是获取大量基因重组菌体重要策略之一^[7]。

基因工程菌的两阶段培养法是基因工程的一大进步,它是通过合适的诱导条件将工程菌的发酵过程分为菌体生长与产物表达两阶段,为了增加基因产品的时控产率,不仅需要提高工程菌的表达水平,同时必需增高菌体增殖密度^[8-9]。对于通过化学诱导表达目标蛋白的工程菌,诱导时机和诱导时间对菌体的生长密度和比生产率有较大影响。在细菌的对数生长中期诱导比早期和后期诱导产率高,而且只有工程菌处于对数生长时期,目标蛋白的表达水平才最高,一旦工程菌进入稳定生长期,目标蛋白的表达水平迅速下降,可能与菌体内的酶体系有关。在对数生长期菌体内的各种酶体系代谢旺盛,尤其是转录、翻译酶体系很活跃,而进入稳定生长期后,该酶体系活性减弱或代谢速度减慢,只能勉强进行转录和翻译,从而引起细菌生长状态下降,表达外源基因的能力也随之降低^[10-11],所以应在对数中期进行诱导。MAGE3/HSP70 工程菌活化 6 h $A_{600\text{nm}}$ 为 12.3 时处于对数生长期中,此时进行 IPTG 诱导,收菌量与目标蛋白的表达量都达到较高水平。研究虽然对 MAGE3/HSP70 工程菌进行成功的发酵,但是收菌量还有待进一步提高,发酵条件还要进一步优化,以达到中试生产的要求。在下步纯化过程工作中我们一方面要提高 MAGE3/HSP70 蛋白的可溶性表达,另外还要摸索包涵体的复性条件,以期提高蛋白的最后得率。

为了进一步明确发酵表达并纯化的 MAGE3/HSP70 在体内的抗肿瘤免疫活性,我们利用检测细胞免疫反应的通用方法,酶联免疫斑点法 (ELISPOT) 和细胞毒性杀伤实验 (LDH) 检测了 MAGE3/HSP70 激活机体免疫反应的情况。结果发现用 MAGE3/HSP70 免疫小鼠,刺激机体产生分泌 IFN- γ 的 T 淋巴细胞频数显著高于 PBS 组, HSP70 组, MAGE-3 + HSP70 组以及 MAGE-3 组。同时 LDH 杀伤实验表明 MAGE3/HSP70 可以激活机体免疫系统产生特异性 CTL 杀伤表达 MAGE3 的肿瘤细胞,且显著高于其他各组,而对不表达特异性抗原的细胞没有杀伤作用。说明 MAGE3/HSP70 在制备过程中保持了药物的性能。本实验为 MAGE3/HSP70 的进一步应用奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Xiao J, Chen HS. Biological functions of melanoma-associated antigens [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(13): 1849-1853.
- [2] 马加海, 隋延仿, 叶菁, 等. 肿瘤抗原基因 MAGE-3 的克隆、

- 原核表达与纯化[J]. 第四军医大学学报, 2004 25(6): 485-488.
- [3] Marchand M, Punt CJA, Aamdal S, et al. Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2: A clinical report[J]. Eur J Cancer, 2003 39(1): 70-77.
- [4] Minami K, Yamaguchi Y, Ohshita A, et al. Generation of antigen-presenting cells using cultured dendritic cells and amplified autologous tumor mRNA[J]. Oncology, 2005 69(5): 399-407.
- [5] Ma JH, Sui YF, Ye J, et al. Heat shock protein 70/MAGE-3 fusion protein vaccine can enhance cellular and humoral immune responses to MAGE-3 *in vivo*[J]. Cancer Immunol Immunother, 2005 54(9): 907-914.
- [6] Duan Z, Duan Y, Lamendola DE, et al. Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2003 9(7): 2778-2785.
- [7] Khalilzadeh R, Shojaosadati SA, Maghsoudi N, et al. Process development for production of recombinant human interferon-gamma expressed in *Escherichia coli*[J]. J Int Microbiol Biotechnol, 2004 31(2): 63-69.
- [8] Zawada J, Swartz J. Maintaining rapid growth in moderate-density *Escherichia coli* fermentations[J]. Biotechnol Bioeng, 2005 89(4): 407-415.
- [9] De Anda R, Lara AR, Hernandez V, et al. Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate[J]. Metab Eng, 2006 8(3): 281-290.
- [10] 孟洁如, 颜真, 赵宁, 等. 导向性人干扰素 α_2a 工程菌的高密度发酵[J]. 第四军医大学学报, 2004 25(23): 2144-2147.
- [11] Sanden AM, Prytz I, Tubulekas I, et al. Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins[J]. Biotechnol Bioeng, 2003 81(2): 158-166.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)03-0205-01

慢性乙醇中毒性肌病 5 例临床分析

姬春玲, 董银华, 籍延华

(天津市第四中心医院神经内科, 天津 300140)

【关键词】慢性酒精中毒 肌病 肌电图

【中图分类号】R595.6 【文献标识码】B

0 引言 慢性乙醇中毒性肌病(chronic alcoholic myopathy, CAM)是由于长期酗酒引起的一种肌病。乙醇依赖和乙醇中毒性疾病患者有逐年增多的趋势,对乙醇中毒性肝病、脑病和周围神经病已有较多研究^[1],但对乙醇中毒性肌病少有报道,现将我院 2002-05/2006-08 收治的 5 例患者分析如下。

1 临床资料 ①一般资料:患者 5 例均为男性,年龄 42~56(中位年龄 48)岁,酗酒 20~30 余年,平均 25 年,每日饮酒量在 300~800(平均 500)mL,多为高度白酒。②临床表现:3 例患者为慢性起病,病程 3~6(平均 4)mo。先出现一侧上肢无力,继而波及另一侧,而后下肢亦出现无力,逐渐出现肌肉萎缩,肌肉疼痛。2 例为急性起病,在长期慢性饮酒的基础上,突然一次大量饮酒后出现四肢近端的无力。查体结果示双侧肩胛肌、三角肌、肱二头肌、髂腰肌等近端肌肉明显萎缩,肌力 II~III 级,远端 III~IV 级,肌张力低,腱反射弱,深浅感觉正常。3 例四肢有轻压痛。③辅助检查:血糖、肾功能正常。3 例肌酶谱轻度增高,以肌酸磷酸激酶增高为主。头颅、颈椎、腰椎及肩关节 CT 均无异常,脑脊液检查无异常。④肌电图检查:患者左侧肱二头肌、伸指总肌和腓肠肌肌电图示肌源性

损害,肌纤维传导速度明显减慢,神经的运动和感觉传导速度正常。⑤诊断标准:符合慢性过量饮酒标准^[2](即每日饮酒中乙醇含量 > 100 g,连续饮酒超过 24 mo),具有骨骼肌慢性损害的临床表现,排除其它病因所致。按参考文献 [2] 中提出的诊断要点,诊为 CAM。⑥治疗与转归:予以大剂量 B 族维生素、烟酸、丹参注射液等治疗,要求患者戒酒并配合增加营养和肢体功能锻炼。30 d 后患者肢体肌力较前恢复,肌张力接近正常,肌肉萎缩无明显好转。出院后随访 5 mo,患者继续戒酒、功能锻炼及服用 B 族维生素,肢体肌力接近正常,肌张力正常,肌肉萎缩较前好转。

2 讨论 以往普遍认为 CAM 是营养不良所致,或是继发于乙醇中毒性周围神经损害。20 世纪 70 年代国外学者研究发现,乙醇中毒性骨骼肌损害是与乙醇中毒有关的常见的和独立的疾病,长期嗜酒人群中 40%~60%^[3]罹患此病,严重影响患者工作能力和生活质量。本病的发病机制主要认为是:乙醇对肌细胞膜的损害、对骨骼肌收缩性的影响、对骨骼肌血液循环及代谢活动的影响。主要病理改变为肌肉萎缩、肌浆网扩张、肌原纤维间糖原颗粒沉积。起病隐匿,发展较慢,主要表现为渐进的肌萎缩和肌无力,以四肢近端肢带肌及骨盆带肌受累为主,肢体远端也可被累及。一般无肌肉疼痛和压痛,腱反射多正常,肌酶谱多不升高或轻度升高,需与多发性肌炎、糖尿病和肾病引起的周围神经病变相鉴别。该病无针对性治疗措施,多以戒酒、大剂量 B 族维生素及对症治疗为主,疗效多不理想。

【参考文献】

- [1] 张祖余, 石国霞, 刘婷婷, 等. 慢性酒精中毒性多发性神经病病人的临床与神经肌电图分析[J]. 临床脑电学杂志, 2000 9(2): 105-106.
- [2] 郑健, 刘勇, 肖道弘, 等. 慢性酒精中毒性肌病的电生理表现[J]. 第三军医大学学报, 2004 26(8): 724-726.
- [3] 刘勇, 郑健. 酒精中毒性肌病[J]. 中风与神经疾病杂志, 2001 18(2): 126-128.

收稿日期 2006-10-16; 接受日期 2006-11-20

作者简介:姬春玲, 副主任医师. Tel (022) 26183237 Email: jichunling1991@sina.com

编辑 王睿