

骨髓间充质干细胞的肌源性诱导分化及转染 VEGF 基因的表达

盛小刚¹,冯建章¹,吴书林¹,靳立军¹,余细勇²,张斌¹(广东省心血管病研究所¹ 心内科,² 中心实验室,广东 广州 510100)

摘要:目的 体外诱导兔骨髓间充质干细胞向肌源性细胞分化,并观察血管内皮生长因子 AdTrackCMV-hVEGF165 真核表达质粒转染骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)后的表达。方法 将 20 只兔随机分为对照组和实验组,从骨髓液中分离 MSCs,对照组以低糖 DMEM 培养,实验组加用 5- 氮胞苷 (10 mmol/L)诱导培养,第 28 天进行肌钙蛋白 I 免疫组化染色。另构建 AdTrackCMV-hVEGF165 真核表达质粒,通过脂质体转染对照组 MSCs,用 Northern blotting 和 Western blotting 鉴定血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达,并用 ELISA 法测定培养上清液中 VEGF 的浓度。结果 成功分离培养出兔 MSCs,实验组经 5- 氮胞苷诱导后 MSCs 向肌源性细胞分化,肌钙蛋白 I 免疫组化染色阳性。成功构建 AdTrackCMV-hVEGF165 真核表达质粒并通过脂质体转染 MSCs,Northern blotting 示转染的 MSCs VEGF165 表达信号明显强于未转染细胞,Western blotting 示转染 VEGF165 基因的 MSC 表达 VEGF,ELISA 法测定培养上清液中 VEGF 的浓度在转染后第 3 天 (1 011 pg/ml) 和第 5 天 (1 027 pg/ml) 达高峰,此后逐渐下降,但至第 13 天 (349 pg/ml) 仍显著高于空白对照 (116 pg/ml) 和 pAdTrackCMV 组 (125 pg/ml), $P<0.01$ 。结论 兔骨髓间充质干细胞可在体外向肌源性细胞分化,转染 VEGF 基因可表达 VEGF,有望将干细胞移植和基因治疗结合以治疗缺血性心脏病。

关键词:基因表达;动物,转基因 / 免疫学;骨髓间充质干细胞;肌源性细胞;血管内皮生长因子

中图分类号:R322.7; Q786 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2004)03-0290-05

Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into myogenic cells *in vitro* and expression of vascular endothelial growth factor gene after transfection

SHENG Xiao-gang¹, FENG Jian-zhang¹, WU Shulin¹, JIN Li-jun¹, YU Xi-yong², ZHANG Bin¹

Department of Cardiology¹, Research Center of Medical Science², Guangdong Provincial Cardiovascular Institute, Guangzhou 510100, China

Abstract: Objective To induce the differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into myogenic cells *in vitro*, and to investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene in AdTrackCMV-hVEGF165-transfected MSCs. **Methods** Twenty rabbits were divided equally into control group and experimental group, and MSCs were isolated and purified from their bone marrow by Percoll (1.073 g/ml) followed by cell culture in low-glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. 5-azacytidine (5-Aza) was added into the cell culture of the experimental group on the third day. The expression of troponin I in MSCs was assayed by immunohistochemistry on the 28th day. AdTrackCMV-hVEGF165 eukaryotic expression vector was constructed and transfected into the MSCs, and subsequent VEGF expression was detected by Northern blotting and Western blotting while enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to examine the VEGF concentration in the supernatant of the culture medium. **Results** Following successful isolation and culture of the MSCs from rabbit bone marrow, 5-Aza-induced differentiation of the cells into myogenic cells was demonstrated by their positive staining for cardiac troponin I (cTnI). Northern blotting showed that the expression of VEGF 165 mRNA was much higher in the VEGF165 gene-transfected cells than in the control cells. Western blotting showed VEGF expression in the transfected cells. The concentration of VEGF in the supernatant mounted to the peak level 3-5 d after VEGF165 gene transfection (1 011-1 027 pg/ml) and decreased gradually thereafter, but still maintaining higher levels than those in the control group and pAdTrackCMV group (349 pg/ml vs 116 pg/ml and 125pg/ml, respectively, $P<0.01$). **Conclusion** MSCs can be induced to differentiate into myogenic cells *in vitro* and express VEGF after VEGF gene transfection, and this success may provided a basis for combining MSC transplantation with gene therapy for regeneration of the damaged myocardial cells.

Key words: gene expression; animals, gene transfer/immunology; mesenchymal stem cells; myogenic cells; vascular endothelial growth factor

收稿日期:2003-09-08

基金项目:国家自然科学基金项目(30271287)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30271287)

作者简介:盛小刚(1973-),男,广东省心血管病研究所在读博士研究生,E-mail: shengxiaogang1@sina.com.cn, 电话:020-83827812-1600

骨髓间充质干细胞(MSC)是一种多能干细胞,不仅可分化为造血实质和基质细胞等,还可分化为多种造血以外的组织,特别是中胚层和神经外胚层来源组织的细胞如骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞,甚至心肌细胞^[1]。同时,MSC 还易于外源基因的转染

和表达^[2],可能是细胞治疗和基因治疗的理想靶细胞。由于骨髓基质干细胞易于提取,有强大的增殖能力,不存在伦理问题和排斥反应等优点,有很大的临床应用潜能。目前已有将骨髓干细胞移植治疗缺血性心脏病的临床实验^[3-5],但仍存在如骨髓间充质干细胞移植后能否转化为心肌细胞,能否在缺血心肌中存活等难题。本研究提取兔骨髓间充质干细胞,通过体外定向诱导使其向肌源性细胞转化,并转染 VEGF 基因,观察其表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pUC19-hVEGF165、大肠杆菌 DH5 α 、pAd-TrackCMV 均为广东省人民医院中心实验室提供, HindIII 酶、Sal I 酶、Tag 酶、T4 连接酶、引物合成、PVDF 膜购自上海生工, Percoll 分离液、低糖 DMEM 培养液及胰酶-EDTA 液购自华美公司 (Sigma 产品), Gel Extraction kit、LIPOFECTAMINETM2000 reagent 转染试剂及 TRIzol 均购自 Gibco, 质粒提取试剂盒、QIAprepRspin Miniprep 盒购自 QIAGEN, 胎牛血清(四季青生物制品公司), 5-氮杂胞苷(5-Aza) 及二抗购自 Sigma, cTnI、VEGF 鼠抗人单克隆抗体为 Santa Cruz 产品, SABC 试剂盒购自宝泰克生物制品公司, Northern blotting 盒购自 Roche, 化学发光试剂购自碧云天公司, VEGF ELISA 试剂盒购自晶美生物公司。

1.2 动物

20 只 2 月龄新西兰大白兔 (购自中山大学医学院动物中心), 雌雄不拘, 随机分为实验组(以 5-氮杂胞苷诱导)和对照组。

1.3 方法

1.3.1 AdTrackCMV-VEGF165 真核表达质粒的构建及鉴定 将质粒 pUC19-VEGF165 和含绿色荧光蛋白的真核表达质粒 pAdTrackCMV 分别用 Hind III 和 Sal I 双酶切, 回收纯化目的基因片段 VEGF165 和线性化的质粒 pAdTrackCMV, 两者再用 T4 DNA 连接酶连接。将产物转化大肠杆菌 DH5 α , 用 100 mg/ml 的卡那霉素进行筛选。挑阳性菌株, 提取质粒分别用 Hind III 和 Sal I 酶切, 进行筛选鉴定后测序(大连华运公司)。鉴定后进行扩增, 微柱法提取质粒, 乙醇沉淀法纯化质粒, 用 TE 溶解后-80℃保存备用。

1.3.2 MSCs 的分离及诱导培养 从兔胫骨近端抽取骨髓血 2 ml, 肝素抗凝, 用低糖 DMEM 培养液稀释至 5 ml, 缓慢滴加至 10 ml Percoll (1.073 g/ml) 分离液上, 900 g \times 30 min, 20℃, 取界面细胞层洗涤后以含 10%胎牛血清的低糖 DMEM 于 37℃, 5%CO₂ 培养箱

中培养, 24 h 后更换培养液, 将非贴壁细胞去除, 此后每 3 天换液 1 次, 约 14 d 后传代培养。实验组在培养 72 h 后加入 10 mmol/L 5-Aza, 24 h 后换液继续培养。对照组不加诱导剂。

1.3.3 cTnI 免疫组化检测 细胞培养 28 d 后铺片, PBS 洗后甲醇-20℃固定 20 min, 操作步骤按照 SABC 试剂盒说明进行, DAB 显色。

1.3.4 AdTrackCMV-VEGF165 转染 MSCs 在对照组细胞铺满瓶底时, 用胰酶(0.25%)-EDTA(0.1%)液进行消化, 分成 3 瓶培养, 20 h 后再换液并进行基因转染, 按 LF2000 说明书进行操作。将 AdTrackCMV-VEGF165 及 AdTrackCMV 各转染 1 瓶细胞, 另一瓶作空白对照。48 h 后于倒置荧光相差显微镜下观察有无绿色荧光产生。

1.3.5 Northern blotting 检测 VEGF165 mRNA 的表达 转染 72 h 后, 提取 AdTrackCMV-VEGF165 瓶和空白对照瓶细胞总 RNA (TRIzol), 将 20 μ g 和 40 μ g 的总 RNA 点至尼龙膜上, 用 DIG 标记的 VEGF 基因片段作为探针, 对细胞总 RNA 进行斑点杂交分析。随机引物标记探针及核酸杂交按 Roche 公司地高辛标记及检测试剂盒说明书进行。

1.3.6 Western blotting 检测 VEGF165 基因的表达 转染 72 h 后用三去污裂解液提取 MSCs 总蛋白, 未转染的 MSCs 为对照, 经 10% SDS-PAGE 100V 电泳后, 60 V 电转移 1 h 至 PVDF 膜, 3%牛血清白蛋白封闭过夜后加入 1:1 000 VEGF 鼠抗人单克隆抗体, 室温孵育 4 h 后, PBS 10 ml 洗膜 5 min \times 3 次, 加入 1:2 000 辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG, 室温孵育 1 h, 同上洗膜后化学发光法显影并拍照。

1.3.7 ELISA 法检测培养液上清中 VEGF 浓度 分别取转染前和转染后 1、3、5、7、9、11、13 d 的 MSCs 培养上清液各 100 ml, 按试剂盒说明测定 VEGF 浓度。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 *t* 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 AdTrackCMV-VEGF165 载体鉴定

pAdTrackCMV 是带有绿色荧光蛋白 GFP 作为筛选标志的大小为 9.92 kb 真核表达载体。电泳结果显示, 经 Hind III 和 Sal I 双酶切 pAdTrackCMV-VEGF165 后, 可得到大小分别为 583 bp(VEGF165) 和 9.92 kb(pAdTrackCMV) 的两个片段。

2.2 MSCs 的生长和诱导分化及基因转染

培养第 2 天, 以倒置相差显微镜观察已发现有少量细胞贴壁, 细胞多呈圆形或椭圆形, 大小不一; 第 5 日可见多个贴壁细胞的克隆, 细胞成梭形或纺锤形,

细胞核大,胞质丰富;第 7 天后细胞迅速增殖,第 10 天后出现细胞融合及重叠,约 14 d 即可传代,传代后细胞于 24 h 内完全贴壁。

实验组经 5-aza 诱导后大部分细胞呈梭形、长条索形,可见细胞间有融合并形成管状样,细胞排列有一定方向性,呈漩涡样生长,细胞界限不清(图 1A)。hVEGF165 基因转染 48 h 后于镜下观察可见在黑色背景下散在分布的发绿色荧光的 MSCs,表明质粒已成功转入 MSCs (图 1B)。

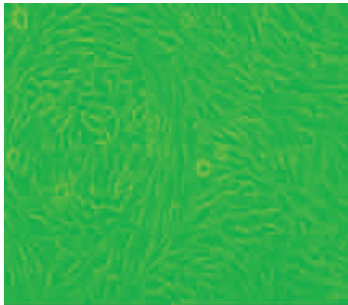


图 1A 经 5-aza 诱导后的兔 MSCs (原放大倍数:×200)

Fig.1A Rabbit MSCs after 5-Aza induction

(Original magnification: ×200)

MSCs: Mesenchymal stem cells; 5-Aza: 5-azacytidine

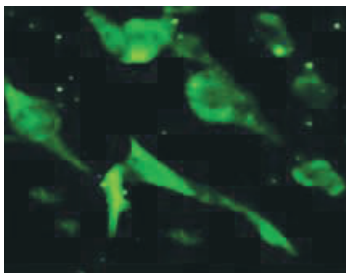


图 1B hVEGF165 基因转染后的 MSCs (原放大倍数:×400)

Fig.1B Rabbit MSCs transfected with hVEGF165

(Original magnification: ×400)

2.3 CTnI 免疫组化染色

经 5-aza 诱导后实验组的 MSCs 染色后见胞质呈棕黄色染色(图 2)。对照组的 MSCs 则无阳性细胞出现。

2.4 MSCs 内 VEGF165 mRNA 转染的基因表达鉴定

Northern blotting 结果表明,转染的 MSCs 内 VEGF165 表达信号明显强于未转染细胞(图 3)。

2.5 MSCs 内 VEGF165 转染的蛋白表达鉴定

Western blotting 显示,转染 VEGF165 基因的 MSCs 在相对分子质量 22 000 处有明显的阳性条带,而未转染细胞为阴性(图 4)。

2.6 转染 MSCs 培养上清 VEGF 浓度变化

转染后第 3 天(1 011±156 pg/ml)和第 5 天(1 027±



图 2 经 5-aza 诱导后 MSCs 的免疫组化染色

(原放大倍数:×400)

Fig.2 Immunohistochemical staining of rabbit MSCs after 5-Aza induction (Original magnification: ×400)

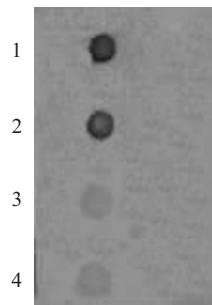


图 3 VEGF 基因的 Northern blotting

Fig.3 Northern blotting of VEGF gene

VEGF: Vascular endothelial growth factor gene; 1: 40 μg RNA of MSCs transfected with pAdTrackCMV-VEGF165; 2: 20 μg RNA of MSCs transfected with pAdTrackCMV-VEGF165; 3: 40 μg RNA of the MSCs; 4: 20 μg RNA of the MSCs.

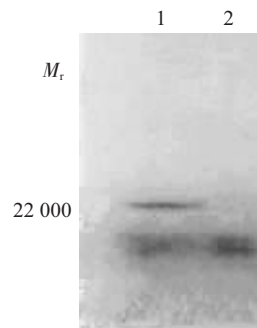


图 4 VEGF 蛋白的 Western blotting

Fig.4 Western blotting of VEGF protein

Lane 1: MSCs transfected with pAdTrackCMV-VEGF165; Lane 2: Control MSCs

124 pg/mL), VEGF 在细胞培养上清液中分泌达高峰,此后渐下降,但至 13 天(349±40 pg/ml)仍显著高于对照组(116±18 pg/ml)和 pAdTrackCMV 组转染前(125±24 pg/mL), $P<0.01$ 。

3 讨论

心肌细胞损伤后大多只能由疤痕组织代替,如何促使心肌再生一直是心血管领域的一个重要的研究

课题。近年来发展起来的细胞性心肌成形术是通过体外培养获得大量心肌细胞或可分化为心肌细胞的干细胞,并将细胞移植至心脏中以促使心肌再生。MSCs 是一种多能干细胞,可以分化成多种中胚层组织,可诱导形成骨^[6]、软骨^[7]和神经^[8]等,其分离和体外扩增方法较简单。本研究采用 1.073 g/ml 的 Percoll 分离液获得骨髓单个核细胞,并用含 10%FBS 的低糖 DMEM 进行培养,实现了细胞的有效扩增,并使 MSCs 的干细胞特性得以长期稳定的维持,在培养约 14 d 时细胞已基本融合长满,细胞形态和增殖情况和路艳蒙^[9]等描述的一致。

目前,研究者一直在探索 MSCs 向肌源性细胞诱导分化的方法。1995 年,Wakitani 等^[10]首先证实 MSCs 在体外经 5-Aza 诱导后可分化为肌源性细胞。Makino 等^[11]从鼠骨髓基质细胞中分离出一株贴壁生长的成纤维母细胞样单克隆细胞株,通过 5-Aza 的诱导后,1 周后细胞之间相互连接,并有肌小管结构形成,2 周后出现细胞自发地产生节律性收缩,表达心肌特异性蛋白,并有心肌细胞类似的动作电位产生,证实已形成类心肌细胞。5-Aza 是胞嘧啶核甙的一个类似物,能引起 DNA 中某些胞嘧啶的低甲基化,从而参与激活表型特异性的基因。这些表型特异性基因在甲基化状态下含有一个肌源性决定部位,一般处于转录失活状态。用 5-Aza 诱导后,这个部位去甲基化,转录激活,引起细胞向肌源性细胞分化。5-Aza 的浓度影响其诱导效果,研究^[10]证实低浓度时如 3~5 mmol/L, MSCs 未向肌源性分化,高浓度时如 20~50 mmol/L,可使细胞大量死亡,而适中浓度 10 mmol/L 既可有效诱导,又不致大量损伤细胞。另外, MSC 在分离培养 72 h 后用 5-Aza 进行诱导,主要是过早诱导,细胞易死亡,而在 96 h 后, MSC 容易不定向转化。本研究中在 MSC 分离后 72 h 用 5-Aza (10 mmol/L) 诱导,培养 28 d 取细胞行肌钙蛋白 I 免疫组化染色示 MSCs 呈阳性染色,表明其向肌源性细胞分化。

近来动物实验证实经 5-Aza 诱导后的 MSCs 移植至心肌梗死区后能改善心功能^[12,13],但尚存在许多问题,如移植的细胞是否能在缺血区存活是首要需解决的难题。对于缺血心肌的治疗关键在于血运的重建,也是移植细胞能否长期存活的关键。我们设想如能增加缺血区血供可能提高 MSCs 的存活率,转基因治疗可能是增加缺血区血供的方法之一。研究发现, MSCs 是基因治疗的理想的靶细胞^[2]。它易于获取,并具有体外长期培养的遗传稳定性和可移植性;外源基因易于植入,并可整合到 MSC 的基因组中稳定表达而不影响其干细胞特性,金丹^[14]等通过逆转录病毒成功地人骨形态发生蛋白 7 基因转染骨髓间充质干

细胞并获得稳定表达;外源基因的表达受所处微环境的影响,具有组织特异性。因此, MSC 有可能成为一种新型的基因治疗的靶细胞;进一步利用其多向分化潜能,通过导入目的基因将细胞工程与基因治疗完美结合。VEGF 有促进血管生成的作用,使其在缺血性心脏病治疗中渐受重视。VEGF 基因是转基因治疗中常用的促进血管生成的目的基因。Yau 等^[15]将 VEGF 基因治疗和心肌细胞移植相结合,将 VEGF 基因转染至移植的心肌细胞中,大量增加了心肌疤痕区毛细血管的密度,改善的左室收缩功能。本实验结果显示 pAdTrackCMV-VEGF165 真核表达载体通过脂质体介导可以成功地转染 MSCs, ELISA 和 Western blotting 结果都显示,转基因的 MSCs 可表达并分泌 VEGF,测培养上清液浓度示其分泌高峰可持续 2~4 d,在 tx 13 d 仍有较高的 VEGF 水平。VEGF 转染后的 MSCs 生长无明显差异。

总之,本研究通过提取兔 MSCs 进行分离和扩增,经 5-Aza 诱导后向肌源性细胞分化,并构建 pAdTrackCMV-VEGF165 真核表达载体,运用脂质体的方法可以成功地转染 MSCs, VEGF 能稳定表达,拟将细胞移植和基因治疗相结合,为细胞性心肌成形术探索一条新的途径。当然,本研究仅为通过体外培养可以初步绘制出其变化过程,体内的变化进程及疗效尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-7.
 - [2] Caplan AI. Mesenchymal stem cells and gene therapy[J]. *Clin Orthop*, 2000, 379(Suppl): S67-70.
 - [3] Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, *et al.* Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure[J]. *Circulation*, 2003, 107(18): 2294-302.
 - [4] Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, *et al.* Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging[J]. *Circulation*, 2003, 108(18): 2212-8.
 - [5] Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, *et al.* Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(10): 1721-4.
 - [6] Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, *et al.* Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow[J]. *Ann Biomed Eng*, 2004, 32(1): 112-22.
 - [7] 江 逊, 崔鹏程, 陈文弦, 等. 诱导的人骨髓间充质干细胞在裸鼠体内生成软骨的实验研究[J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(8): 766-9.
- Jiang X, Cui PC, Chen WX, *et al.* *In vivo* chondrogenesis of induced

human marrow mesenchymal stem cells in nude mice[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(8): 766-9.

[8] 林竞初, 郭坤元, 李江琪, 等. 人骨髓基质干细胞克隆的培养及其向神经元样细胞的定向诱导分化[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(3): 251-3.

Lin JR, Guo KY, Li JQ, *et al.* *In vitro* culture of human bone marrow mesenchymal stem cell clones and induced differentiation into neuron-like cells [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(3): 251-3.

[9] 路艳蒙, 傅文玉, 朴英杰. 人骨髓间充质干细胞的培养及性质鉴定[J]. 第一军医大学学报, 2001: 21(8): 571-3.

Lu YM, Fu WY, Piao YJ. Culture and identification of human mesenchymal stem cells[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001: 21(8): 571-3.

[10] Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine[J]. Muscle Nerve, 1995, 18(12): 1417-26.

[11] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, *et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro* [J]. J Clin Invest, 1999, 103(5):697-705.

[12] Hassink RJ, Brutel de la Riviere A, Mummery CL, *et al.* Transplantation of cells for cardiac repair[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(5): 711-7.

[13] Tomita S, Li RK, Weisel RD, *et al.* Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function[J]. Circulation, 1999, 100(19 Suppl): II247-56.

[14] 金丹, 曾位森, 裴国献, 等. 经转染人骨形态发生蛋白 7 基因后骨髓间充质干细胞 mRNA 的表达[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(3): 222-5.

Jin D, Zeng WS, Pei GX, *et al.* Expression of human bone morphogenetic protein 7 mRNA after the gene transfection in rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(3): 222-5.

[15] Yau TM, Fung K, Weisel RD, *et al.* Enhanced myocardial angiogenesis by gene transfer with transplanted cells[J]. Circulation, 2001, 104(12 Suppl 1): I218-22.

婴儿骨皮质增生症合并继发性再生障碍性贫血 1 例报告

Infantile cortical hyperostosis complicated with secondary aplastic anemia: report of one case

薛 杉, 朱为国, 陶少华, 封志纯 (第一军医大学珠江医院儿科, 广东 广州 510282)

关键词: 骨疾病 / 诊断; 婴儿骨皮质增生症; 再生障碍性贫血 / 治疗

中图分类号: R725.5; R726.8 文献标识码: B 文章编号: 1000-2588(2004)03-0294-02

1 临床资料

患儿, 男, 2 岁 6 个月。因双下肢无力、肌肉萎缩 1 月余, 反复发热 1 周就诊。查体: 体温 38.5℃, 双下肢肌及臀肌萎缩, 肌力 III 级, 可站立, 步态不稳, 四肢肌张力减低。感觉系统检查示无特殊改变; 腹壁反射、提睾反射双侧对称。跟腱反射、膝腱反射亢进。双侧巴氏征、踝阵挛阳性, 腰骶部神经刺激征阳性。辅助检查: 肌电图检查未见特征性改变, 血常规示 WBC 3.19×10⁹/L、淋巴细胞比例 81% 增高、RBC 3.08×10¹²/L、PLT 65×10⁹/L。腰椎穿刺示脑脊液压力稍高。诊断为“亚急性脊髓炎”。用大剂量激素冲击治疗, 甲基强的松龙 0.36 g×3 d, 地塞米松 10 mg×3 d, 强的松口服, 并逐渐减量, 患儿症状好转出院。1 个月后患儿无诱因发热 (体温最高达 39℃) 伴纳差、疲倦再次入院。查体: 中度贫血貌, 全身皮肤粘膜无黄染、出血点及皮疹, 浅表淋巴结未扪及。跟腱反射、膝腱反射无增强或减弱, 巴氏征、布氏征、克氏征未引出。患儿体温持续波动于 37.1℃~39.5℃ 之间, 给予抗炎、补液、退热处理, 症状无明显改善, 血象三系进行性降低。骨髓涂片检查示: 骨髓增生减低, 红系增生减低, 全片未见巨核细胞, 诊断为“再生障碍性贫血”。入院第 3 天发现患儿胫骨前软组织肿胀, 摄 X 线片示: 双侧胫骨骨干大部皮

质旁见葱皮样骨膜反应带, 边缘光整, 致骨干明显增粗, 尺桡骨、股骨骨干、颅骨外板及掌骨皮质骨层葱皮样改变, 四肢骨骨髓未受累, 骨骼周围软组织无肿胀 (图 1)。



图 1 患者首次检查时的 X 线片

实验室检查: C 反应蛋白 118 mg/L、血沉 >130 mm/h、碱性磷酸酶 287 IU/L, 诊断为“婴儿骨皮质增生症”。给予阿司匹林 0.125 g×3 次/d 治疗后, 体温降至 36.6℃, 监测血象白细胞、红细胞缓慢回升, 血小板持续低水平无改变。1 月后药量减至 0.05 g×2 次/d 时患儿再次出现发热, 阿司匹林加量无效, 再

收稿日期: 2003-07-02

作者简介: 薛 杉 (1978-), 现为第一军医大学七年制 97 级学员