

论著

文章编号:1000-5404(2013)01-0024-05

慢病毒载体在人角质形成细胞基因组中的整合位点分析

钱卫, 彭代智, 王丽华, 刘小玲, 李睿夫, 舒文婷, 何传果, 刘潇, 周新, 刘敬 (400038 重庆, 第三军医大学西南医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] 目的 检测慢病毒载体(lentiviral vector)在人角质形成细胞基因组中的整合位点,初步分析慢病毒载体在表皮细胞基因组中的整合位点分布规律。方法 以本课题组前期研究中构建的慢病毒载体感染的人永生角质形成细胞系为研究对象,应用连接介导 PCR(ligation-mediated PCR, LM-PCR)技术克隆慢病毒载体在其基因组中的整合位点序列,测序克隆片段后经在线工具 GTSG-QuickMap 在人类基因组上定位,从而得到整合位点。再从整合位点分布与染色体、基因及其转录起始位点的关系来分析慢病毒载体在人角质形成细胞基因组中的整合倾向性。结果 对1 148个阳性转化子DNA测序及定位分析,共得到199个整合位点。与GTSG-QuickMap模拟的随机对照相比,慢病毒载体的整合频率在第4、5、15、16号染色体上、基因转录起始位点上游5 kb至50 kb范围内显示出统计学显著性差异。结论 慢病毒载体倾向于整合在人角质形成细胞基因组中的基因转录起始位点附近区域,而并不倾向于整合在基因内部的整合模式。

[关键词] 慢病毒载体;人角质形成细胞;连接介导PCR;整合位点;整合频率;整合倾向

[中图分类号] R322.991; R394.33; R394.3 **[文献标志码]** A

Analysis of lentiviral vector integration site preference in human keratinocytes

Qian Wei, Peng Daizhi, Wang Lihua, Liu Xiaoling, Li Ruifu, Shu Wenting, He Chuanguo, Liu Xiao, Zhou Xin, Liu Jing (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 40038, China)

[Abstract] **Objective** To determine lentiviral vector integration sites in human keratinocytes, and to make a preliminary analysis of lentiviral vector integration preference in human epidermal cells. **Methods** Ligation-mediated PCR (LM-PCR) was used to clone integration site sequences of lentiviral vector in the genome of transfected human immortalized keratinocyte line from our previous study. After the cloned DNA fragments were sequenced, the sequence reads were inputted into the online tool GTSG-QuickMap as requested and mapped in the human genome to get the integration sites. The integration preference of lentiviral vector in human keratinocytes was analyzed in view of the relationship between integration sites distribution and chromosomes, genes and transcription start sites. **Results** A total of 1 148 positive transformants were sequenced and analyzed, and 199 unique integration sites were obtained. As compared with the matched random control simulated by GTSG-QuickMap, the integration frequencies of lentiviral vector in chromosomes 4, 5, 15 and 16 and 5 ~ 50 kb upstream region of transcription start sites showed statistically significant differences. **Conclusion**

This study reveals an integration pattern that lentiviral vector preferentially integrates into the vicinity of transcription start sites with no favor for genes in the genome of human keratinocytes, and provides experimental evidences for assessing the latent risk of lentiviral vector used in gene therapy for skin diseases.

[Key words] lentiviral vector; human keratinocyte; ligation-mediated PCR; integration site; integration frequency; integration preference

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071575) and the First Class Project of State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury (SKLZZ200904). Corresponding author: Peng Daizhi, Tel: 86-23-68754226, E-mail: dzpengpub@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071575);国家重点实验室I类课题(SKLZZ200904)

[通信作者] 彭代智,电话:(023)68754226,E-mail:dzpengpub@126.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121107.1148.003.html>(2012-11-07)

逆转录病毒载体是常用的外源基因整合载体,对基因治疗和转基因动物研究具有重要价值。但是,目前逆转录病毒载体尚不能将目的基因插入特定位点,当该类载体异位整合于靶细胞染色体基因组中,原病毒(provirus)与宿主(host)之间相互作用,极有可能导致转基因表达沉默及插入性诱变(insertional mutagenesis)等不良事件(adverse events)的发生。由于整合位点的不同而造成的基因治疗效果的差异,分析逆转录病毒及其载体在宿主基因组中的整合位点及其分布倾向,已经成为评价载体应用安全性的重要手段之一^[1]。慢病毒载体是以慢病毒[包括人类免疫缺陷病毒I型(HIV-I)、猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)、猫免疫缺陷病毒(feline immunodeficiency virus, FIV)、马传染性贫血病毒(equine infectious anemia virus, EIAV)等]为来源的一类特殊逆转录病毒载体,并且与其他逆转录病毒载体[如鼠白血病病毒(murine leukaemia virus, MLV)]和腺病毒载体相比,具有稳定整合于靶细胞的基因组、转移基因片段容量大、目的基因表达时间较长、不易诱发宿主免疫反应等优点,适于细胞基因修饰及体内基因治疗。目前,慢病毒载体在皮肤细胞基因修饰、皮肤遗传病基因治疗中已经得到较好的应用^[2-3],但其生物安全性问题尚不清楚。国内外有关慢病毒载体在表皮细胞基因组中的整合倾向性研究少见报道。本研究应用本课题组前期研究中构建的慢病毒感染的人永生角质形成细胞系为研究对象,探索慢病毒载体在表皮细胞基因组中的整合位点分布规律,以期慢病毒载体在皮肤病基因治疗中应用的生物安全性评价提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞来源、主要试剂

实验细胞为本室实验人员先前构建的慢病毒感染的人永生角质形成细胞系(HaCaT)^[2]。改良型RPMI1640培养基[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司],优级新生牛血清(兰州民海生物工程有限公司),DNeasy Blood & Tissue Kit(德国QIAGEN公司),*Mse* I酶、*Pst* I酶、高浓度(5×)*T*₄ DNA连接酶(美国NEB公司),Platinum *Taq* DNA高保真聚合酶、TOPO TA克隆测序试剂盒(美国Invitrogen公司),*Mse* I连接子序列及引物序列,由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 细胞培养与基因组总DNA的提取

将1.1中所述的细胞培养于含10%新生牛血清的改良型RPMI1640培养基中,置于37℃、饱和湿度、5% CO₂的培养箱中培养。取汇合率达80%的细胞进行传代,取对数生长期的细胞提取基因组总DNA。DNA提取按照QIAGEN的DNeasy Blood & Tissue Kit说明书操作。

1.3 基因组DNA限制性酶切

采用Primer Premier 5.0软件对前期研究中感染人永生角质形成细胞系所用的慢病毒载体pHSER-dsRNA-GFP-SIN的序列进行限制性酶切位点分析,采用*Mse* I(NEB公司)和*Pst* I(NEB公司)对细胞基因组DNA进行酶切消化。反应体系:10×NEBuffer 3 2.0 μL,100×BSA 0.2 μL,DNA 1.0 μg,*Mse* I、*Pst* I各1.0 μL(10 U),双蒸水补足至总体积20.0 μL。混合后37℃恒温水浴2.5 h,再于80℃恒温水浴20 min后,置于4℃临时保存。

1.4 *Mse* I连接子退火与连接

Mse I连接子序列为:Linker + (5'-GTAATACGACTCACC-TATAGGGCTCCGCTTAAGGGAC-3'); Linker-(5'-PO4-TAGTC-CCTTAAGCGGAG-NH₂-3')。于生工生物工程(上海)有限公司合成后,溶于STE缓冲液(10 mmol/L Tris pH 8.0, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA)中,各取5 μL,混匀后置于Bio-Rad DNA Engine型PCR仪上从98℃至4℃(每分钟下降1℃)进行退火,后置于-20℃冻30 min。4个溶解-冷冻循环后,按上述条件重复1次退火。连接按照NEB公司*T*₄连接酶说明书操作。反应体系:1.3中的酶切产物10.0 μL,10×NEB ligase buffer 1.4 μL,已退火的100 μmol/L *Mse* I连接子1.0 μL,高浓度(5×)*T*₄ DNA连接酶1.0 μL。16℃恒温水浴3 h后,置于室温临时保存。

1.5 巢式PCR

针对连接子序列和慢病毒载体末端LTR区,参照文献[4-5],分别设计2对特异的巢式PCR引物,引物序列如下:①*Mse* I linker primer(5'-GTAATACGACTCACTA TAGGGC-3');②*Mse* I linker nested primer(5'-AGGGCTCCGCTTAAGGGAC-3');③5' LTR primer(5'-GAGGGATCTCTAGTTACCAGAGTCA-CA-3');④5' LTR nested primer(5'-AGCCAGAGAGCTCCCAG-GCTCAGATC-3')。

第1轮PCR:按照Invitrogen公司Platinum *Taq* DNA高保真聚合酶说明书操作。反应体系:10×High Fidelity PCR Buffer 5.0 μL,50 mmol/L MgSO₄ 2.0 μL,10 mmol/L dNTP mixture 1.0 μL,10 μmol/L primer ①、③各1.0 μL,Platinum *Taq* High Fidelity 0.2 μL,DNA模板(1.4中的连接产物)1.0 μL,加双蒸水补足至总体积50.0 μL。反应条件:95℃热启动2 min,95℃变性15 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,25个循环。

第2轮PCR:使用第1轮PCR产物1 μL作DNA模板,②、④作引物,其余反应体系及反应条件同上。将第2轮PCR产物在1%琼脂糖凝胶上进行电泳,另将1.2中的细胞基因组总DNA、1.3中的双酶切产物、1.4中的连接产物也在2%琼脂糖凝胶上进行电泳,用Bio-Rad ChemiDoc XRS+型凝胶图像分析仪采集图片。

1.6 TOPO TA克隆、测序

使用第2轮PCR产物1 μL,按照Invitrogen公司TOPO TA克隆测序试剂盒说明书操作。将筛选所得阳性转化子送北京六合华大基因科技股份有限公司,在ABI3730 DNA测序仪上采用Sanger测序法测序克隆的DNA片段。

1.7 统计学分析

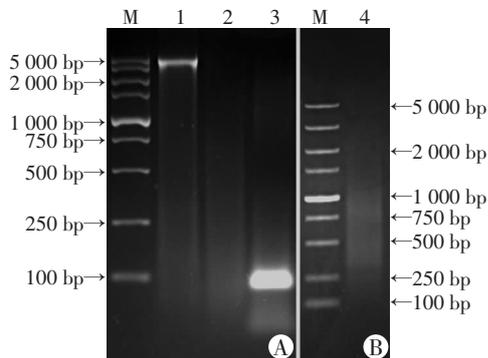
将测序结果的DNA序列与上述第2轮PCR的正、反向引

物序列进行比对分析,从而得到整合位点序列。再将其经在线工具 GTSG-QuickMap^[6] 定位于人类染色体基因组 [Homo Sapiens (Ens62, Apr 2011, GRCh37. p3 / HG19)] 上,从而得到整合位点,同时 GTSG-QuickMap 会自动统计整合位点在各个染色体/基因组特征 (chromosomal/genomic features) 内的整合频数与整合频率。进一步比较载体整合位点与 GTSG-QuickMap 模拟产生的随机整合位点之间的整合频率差异时,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 细胞基因组 DNA 及 LM-PCR 相关产物的鉴定

琼脂糖凝胶电泳结果显示(图1),基因组 DNA 已被 *Mse* I、*Pst* I 切开,条带弥散于 50~3 000 bp 之间(泳道2);*Mse* I 连接子条带清晰,基因组 DNA 双酶切产物条带弥散(泳道3);第2轮 PCR 产物众多,且长短不一,电泳并不呈一条或多条特异性条带,弥散于 100~2 000 bp 之间(泳道4)。



A:2% 琼脂糖凝胶电泳结果;B:1% 琼脂糖凝胶电泳结果

M:DNA 分子量标准 DL5000;1:细胞基因组 DNA;2:细胞基因组 DNA 经 *Mse* I、*Pst* I 双酶切产物;3:双酶切产物与 *Mse* I 连接子连接产物;4:第二轮 PCR 产物

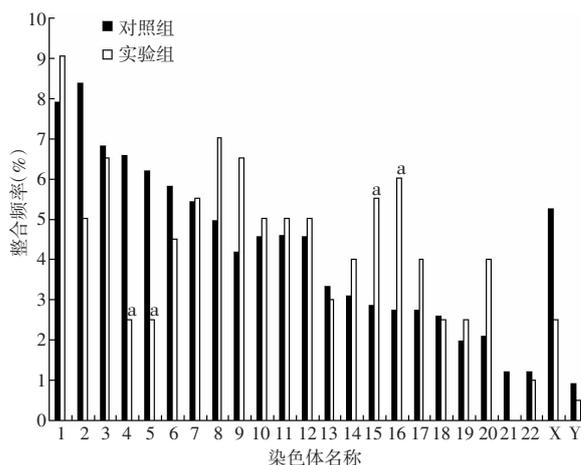
图1 细胞基因组 DNA 及 LM-PCR 相关产物琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 卡那霉素抗性筛选阳性转化子

将第2轮 PCR 产物进行 TOPO TA 克隆后的反应产物转化入感受态大肠杆菌(TOP10),涂布于6块含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸卡那霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,分别长出形态基本一致、大小各异的阳性菌落。

2.3 整合位点序列的测序、定位与染色体上的整合频率分析

卡那霉素抗性筛选出的1 148个阳性转化子,测序后,经 GTSG-QuickMap 定位,共得到位于人类染色体基因组上的199个整合位点,作为实验组,再以 GTSG-QuickMap 自动模拟产生的1 000 000个随机整合位点作为对照组,分析染色体上的整合频率的差异性。结果发现(图2),第4、5、15、16号染色体上的整合频率显示有统计学显著性差异,且第15、16号染色体上整合频率显著高于对照组(P 值分别为0.024,0.005),而第4、5号染色体上整合频率显著低于对照组(P 值分别为0.021,0.031),提示慢病毒载体倾向于整合在人永生角形成细胞系的第15、16号染色体上,而不倾向于整合在第4、5号染色体上。



a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图2 慢病毒载体整合位点的染色体分布

2.4 基因及其转录起始位点附近区域内的整合倾向性分析

对已获得的整合位点信息进行分析发现(表1),慢病毒载体在该细胞基因组中的基因内部(包括外显子、内含子)的整合频率与随机对照相比,并无统计学显著性差异,提示其在基因内部(包括外显子、内含子)并无整合倾向性;而分别在距基因转录起始位点50 kb 范围(包括上游及下游,即 ± 50 kb)、基因转录起始位点上游50 kb 范围(即 +50 kb)、基因转录起始位点上游5~50 kb 范围(即 +5~+50 kb) 内的整合频率与随机对照相比,显示出统计学显著性差异($P < 0.01$),此3个范围内的分析综合提示慢病毒载体倾向于整合在人永生角形成细胞系基因组中的基因转录起始位点上游5~50 kb 范围。

表1 慢病毒载体整合位点在细胞基因及其转录起始位点的分布(%)

整合位点分布	对照组 (n=1 000 000)	实验组 (n=199)	P 值
在基因内	44.61% (446 080)	47.24% (94)	0.456
在内含子内	42.12% (421 233)	45.23% (90)	0.375
在外显子内	2.48% (24 847)	2.01% (4)	0.840
在距基因转录起始位点+5 kb 内	6.18% (61 849)	8.04% (16)	0.277
在距基因转录起始位点-5 kb 内	4.24% (42 405)	5.53% (11)	0.368
在距基因转录起始位点 ± 5 kb 内	10.43% (104 254)	13.57% (27)	0.147
在距基因转录起始位点+50 kb 内	25.22% (252 156)	36.18% (72)	0.000
在距基因转录起始位点-50 kb 内	44.61% (446 080)	47.24% (94)	0.456
在距基因转录起始位点 ± 50 kb 内	69.82% (698 236)	83.42% (166)	0.000
在距基因转录起始位点+5~+50 kb 内	19.03% (190 307)	28.14% (56)	0.001
在距基因转录起始位点-5~-50 kb 内	40.37% (403 675)	41.71% (83)	0.700

+ :整合位点位于基因转录起始位点上游;- :整合位点位于基因转录起始位点下游;括号内数据为位点数

3 讨论

慢病毒载体不仅能感染分裂细胞,同时也能感染非分裂细胞,目前在基因修饰与治疗领域的应用日益增多。然而,外源基因的整合具有明显的位置效应。病毒载体介导的基因转导的可能风险之一是其未知的整合倾向性可能干扰靶细胞内源基因表达与功能,诱

发克隆优势或肿瘤生成,这些潜在的副作用已经引起人们的极大关注^[1,7]。既往研究^[8]发现,逆转录病毒及其载体倾向于整合在宿主基因组中的一些染色体/基因组特征区域,例如 HIV-1 及其载体主要倾向于整合在某些细胞基因组中的活跃转录单位(active transcription unit)内;鼠白血病毒(MLV)载体主要倾向于整合在与宿主基因启动子相关的基因转录起始位点附近区域^[4-5,9-10]。因此,围绕整合位点分布与染色体、基因、基因转录起始位点这3大染色体/基因组特征之间的关系,来初步阐明慢病毒载体在人角质形成细胞基因组中的整合倾向性至关重要。

逆转录病毒或其载体进入靶细胞后, RNA 基因组首先反转录成双链 cDNA,再与病毒编码的整合酶(integrase, IN)及来自于靶细胞和病毒自身的一些蛋白共同构成前整合复合体(preintegration complex, PIC),最后整合到染色体上,由此可见,染色体是否易于接近可能对整合有重要影响^[11]。我们获得了经测序的慢病毒载体在人角质形成细胞基因组中的整合位点序列信息,结果显示,慢病毒载体倾向于整合在人永生角质形成细胞系的第15、16号染色体上,而不倾向于整合在第4、5号染色体上,而先前的研究^[12]发现慢病毒载体倾向于整合在 CD4⁺ T 细胞富含基因的第16、17、19、22号染色体上,而不倾向于整合在基因稀缺的第4、13号和 Y 染色体上,可见我们的研究结果与之并不完全一致。故不能用慢病毒载体倾向于整合在富含基因的染色体上的观点来解释,我们推测可能与该细胞系染色体核型异常^[2,13]以及染色体不稳定等特性有关,有关逆转录病毒及其载体(包括慢病毒及其载体)整合与靶细胞染色体核型、稳定性之间的关系有待进一步研究。

在基因转导中,如果载体原病毒恰好整合在靶细胞基因内或其周围区域,尤其是癌基因或者是控制着细胞生长、发育、凋亡等功能基因内或其附近,可能会改变细胞行为或产生细胞恶性转化。先前的大部分细胞内研究提示慢病毒载体倾向于整合在转录活跃的基因内,且主要是内含子内^[4,8]。另外,Beard 等^[14]研究发现慢病毒载体在犬 CD34⁺ 细胞内距基因转录起始位点 10 kb 和 50 kb 范围内并无整合倾向性。本研究的实验结果与之完全不同,慢病毒载体在人永生角质形成细胞系的基因内部(包括外显子、内含子)并无明显整合倾向性,而倾向于整合在基因转录起始位点上游 5~50 kb 范围内。这可能与表皮细胞内存在独特的参与靶向整合的细胞内辅助因子有关,需要进一步研究。现在已知道 50 kb 是一个非常保守的距离,原病毒只要整合在此范围内的基因附近,其携带的启动子或增强子等元件会反式激活该基因^[15],即使慢病毒载体也不能除外。最近, Sadelain 等^[16]提出了靶细

胞基因组中“安全港”(genomic safe harbour, GSH)的概念,即靶细胞染色体上的一个位点处,原病毒在此整合后既能确保转基因稳定可靠的表达,同时又不严重影响内源基因结构或表达。其中1条标准是:该位点离任一基因5'端的距离大于50 kb。当然,基因内部是不属于“安全港”的。本研究发现慢病毒载体在人永生角质形成细胞系的基因内部虽无明显整合倾向性,但其倾向于整合在基因转录起始位点上游5~50 kb 范围内,而且在94个基因内发生整合现象,故将慢病毒载体应用于人永生角质形成细胞系的基因修饰显然是不安全的,不排除激活或干扰附近基因的可能。整合位点附近的基因的表达及功能是否会发生变化需要进一步研究。

外源基因整合位点研究通常应用染色体步移技术^[17]。为建立适用于慢病毒载体整合位点检测的经济且有效的技术体系,我们选择应用作为常用的染色体步移技术之一的连接介导 PCR(LM-PCR),该方法首先是选择合适的限制性内切酶消化基因组 DNA,再在酶切后的基因组 DNA 片段上连接成双链、单链或者部分双链的接头,用序列特异引物和接头引物引发 PCR 扩增,得到与已知序列相邻的未知序列,从而应用于外源 DNA 插入位点的鉴定。本研究选择了退火的双链接头,而且接头上有氨基、磷酸基修饰,来抑制接头引物的单引物扩增,设计了2对巢式 PCR 特异性引物,提高了 PCR 产物的特异性,故确保了扩增目的 DNA 的高效性和特异性。与之相比,先前应用的反向 PCR(inverse PCR)环化反应难以控制、扩增效率低, Alu-PCR、TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)等特异引物 PCR 无法有效控制由随机引物引发的非特异产物的产生。另外, Wu 等^[5]研究发现 LM-PCR 中不同限制性内切酶的引入并不会导致整合位点倾向研究结果出现偏差。由此可见, LM-PCR 是鉴定病毒载体整合位点的一种理想而可靠的方法。

综上所述,慢病毒载体在人角质形成细胞基因组内呈现出一种新的整合模式,即倾向于整合在基因转录起始位点附近区域,而并不倾向于整合在基因内部。这一整合模式与前述的 HIV-1 及其载体的整合模式并不相同,而与鼠白血病毒(MLV)载体的整合模式有相似之处,但也并不完全相同。

参考文献:

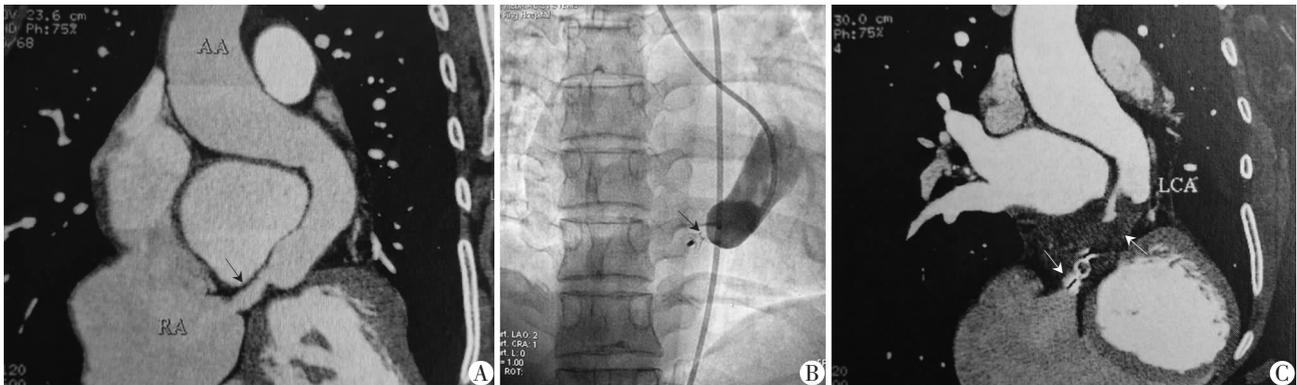
- [1] Biasco L, Baricordi C, Aiuti A. Retroviral integrations in gene therapy trials[J]. Mol Ther, 2012, 20(4): 709-716.
- [2] 王丽华, 彭代智, 刘敬, 等. CCL20 基因敲低型组织工程皮肤种子细胞的克隆筛选及其干扰效果[J]. 中华外科杂志, 2009, 47(8): 621-624.
- [3] Di-Nunzio F, Maruggi G, Ferrari S, et al. Correction of laminin-5 deficiency in human epidermal stem cells by transcriptionally targeted

- lentiviral vectors[J]. *Mol Ther*, 2008, 16 (12): 1977-1985.
- [4] Mitchell R S, Beitzel B F, Schroder A R, *et al*. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(8): E234.
- [5] Wu X, Li Y, Crise B, *et al*. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration [J]. *Science*, 2003, 300 (5626): 1749-1751.
- [6] Appelt J U, Giordano F A, Ecker M, *et al*. QuickMap: a public tool for large-scale gene therapy vector insertion site mapping and analysis [J]. *Gene Ther*, 2009, 16 (7): 885-893.
- [7] Hargrove P W, Kepes S, Hanawa H, *et al*. Globin lentiviral vector insertions can perturb the expression of endogenous genes in beta-thalassemic hematopoietic cells[J]. *Mol Ther*, 2008, 16(3): 525-533.
- [8] Schroder A R, Shinn P, Chen H, *et al*. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots [J]. *Cell*, 2002, 110(4): 521-529.
- [9] Derse D, Crise B, Li Y, *et al*. Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses [J]. *J Virol*, 2007, 81 (12): 6731-6741.
- [10] Kim S, Kim N, Dong B, *et al*. Integration site preference of xenotropic murine leukemia virus-related virus, a new human retrovirus associated with prostate cancer [J]. *J Virol*, 2008, 82 (20): 9964-9977.
- [11] Desfarges S, Ciuffi A. Retroviral integration site selection [J]. *Viruses*, 2010, 2(1): 111-130.
- [12] Wang G P, Levine B L, Binder G K, *et al*. Analysis of lentiviral vector integration in HIV+ study subjects receiving autologous infusions of gene modified CD4+ T cells [J]. *Mol Ther*, 2009, 17(5): 844-850.
- [13] Boukamp P, Petrussevska R T, Breitkreutz D, *et al*. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line [J]. *J Cell Biol*, 1988, 106 (3): 761-771.
- [14] Beard B C, Keyser K A, Trobridge G D, *et al*. Unique integration profiles in a canine model of long-term repopulating cells transduced with gammaretrovirus, lentivirus, or foamy virus [J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18 (5): 423-434.
- [15] Kustikova O, Fehse B, Modlich U, *et al*. Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking [J]. *Science*, 2005, 308 (5725): 1171-1174.
- [16] Sadelain M, Papapetrou E P, Bushman F D. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12 (1): 51-58.
- [17] 刘博, 苏乔, 汤敏谦, 等. 应用于染色体步移的 PCR 扩增技术的研究进展 [J]. *遗传*, 2006, 28 (5): 587-595.

(收稿:2012-07-20;修回:2012-10-30)

(编辑 汪勤俭)

(上接 19 页)



A: 封堵术前心脏 64 排 CT 提示左回旋支-右心房瘘(↘:示瘘口); B: 封堵术后冠脉造影提示回旋支-右房瘘消失(↘:示封堵器); C: 封堵术后 1 个月心脏 64 排 CT 提示回旋支末端少许血栓(↘), 封堵器清晰可见(↘)

图 1 左冠回旋支-右心房瘘封堵术效果观察

2 讨论

弥漫性重度冠状动脉瘤样扩张是一类少见的疾病^[1], 而同时合并右房瘘则更为少见。该病的治疗方法可以采用外科手术、弹簧圈封堵或安置封堵器封堵^[2-3]。该例病人由于左冠回旋支弥漫性重度瘤样扩张, 同时在进入右房时形成一明显狭窄瘘口, 因此可以采用室间隔缺损封堵术中建立动静脉轨道的方式, 分别穿刺股动静脉, 经由股动脉→降主动脉→主动脉弓→升主动脉→左冠回旋支→瘘口→右房→下腔静脉→股静脉建立动静脉轨道, 然后选用合适的动脉导管封堵器以动脉导管未闭封堵术的手术方式封堵瘘口。之所以不直接采用动脉导管未闭封堵术的方式由股静脉→下腔静脉→右房→瘘口→左回旋支支送入封堵器, 是因为钢丝要在右房侧通过瘘口并进入左回旋支实属不易, 并且容易损伤冠状动脉。由于封堵伞部分位于冠状动脉中, 所以术后处理完全按照冠状动脉支架术后的方式

进行。术后该患者症状明显减轻, 心前区连续性杂音消失, 1 个月后复查心脏 64 排 CT 提示瘘口封闭, 虽然回旋支远端有部分血栓形成, 但经过 1 年的临床治疗随访患者一般情况良好, 无特殊症状和体征, 血栓也已消退。

参考文献:

- [1] 罗裕, 普家海, 刘学波. 冠状动脉扩张的研究现状 [J]. *心血管病学进展*, 2012, 33(4): 494-498
- [2] Strecker T, Hakami L, Singer H, *et al*. Congenital coronary artery fistula draining into the right ventricle: successful surgical closure after failed transcatheter coil embolization [J]. *Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 54(1): 61-63.
- [3] Kilic H, Akdemir R, Bicer A, *et al*. Transcatheter closure of congenital coronary arterial fistulas in adults [J]. *Coron Artery Dis* 2008; 19 (1): 43-45.

(收稿:2012-09-22;修回:2012-11-22)

(编辑 梁嘉)