

论著

文章编号:1000-5404(2014)06-0548-05

APOE 基因亚型及其短肽 COG1410 对神经细胞损伤后早期凋亡的影响

江涌^{1,2}, 孙晓川², 陈礼刚¹, 邹莉¹ (646000 四川泸州, 泸州医学院附属医院神经外科¹; 400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院神经外科²)

[摘要] 目的 探讨载脂蛋白 E(APOE 代表基因, apoE 代表蛋白)亚型特异性及其短肽与早期凋亡的相关性,以期明确 APOE 亚型影响脑创伤病情转归及预后的病理机制。方法 采用稳定表达人 APOE 各等位基因的 APOE 敲除鼠的神经干细胞,优化诱导分化条件,构建神经元/胶质细胞共培养体系及细胞划痕损伤模型。通过 Annexin V/PI 联合流式细胞技术检测损伤后各组细胞早期凋亡率,分析人 APOE 各等位基因及其短肽影响继发性神经细胞损伤的差异。结果 成功构建携带人源性 APOE 各亚型的细胞划痕损伤模型;伤后 24 h 时间点各组细胞早期凋亡率较 6、12 h 明显增高 ($P < 0.05$),且人 APOE ϵ_4 组较其余亚型组早期凋亡率明显增高 ($P < 0.05$)。在伤后 24 h apoE 短肽 COG1410 可显著降低各亚型组早期凋亡率 ($P < 0.01$)。结论 APOE ϵ_4 携带者可能通过早期凋亡导致脑创伤急性期病情加重。而 apoE 短肽 COG1410 可通过降低早期凋亡发挥神经保护作用。

[关键词] 载脂蛋白 E;短肽;创伤性脑损伤;体外模型;早期凋亡

[中图分类号] R329.28;R341;R651.102

[文献标志码] A

Effect of APOE alleles and apoE-mimetic peptide COG1410 on early neuron apoptosis after *in vitro* traumatic brain injury

Jiang Yong^{1,2}, Sun Xiaochuan², Chen Ligang¹, Gui Li¹ (¹Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan Province, 646000; ²Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To elucidate the mechanism mediating the effects of apolipoprotein E (APOE for gene, apoE for protein) alleles and apoE-mimetic peptide COG1410 on early apoptosis in an *in vitro* model of experimental traumatic brain injury. **Methods** Eukaryotic expression vectors carrying individual APOE alleles (ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4) were transferred into neural stem cells (NSCs) derived from APOE knockout mice. An *in vitro* neuronal/glia co-culture model of mechanical injury was developed using a controlled scratch. Flow cytometry was performed to analyze the correlations among APOE genotypes, apoE-mimetic peptide COG1410 and early apoptosis. **Results** Early apoptosis after injury was observed in all groups, which was significantly higher at 24 h after injury than at 6 h and 12 h after injury ($P < 0.05$). The group transfected with APOE ϵ_4 showed more significant early apoptosis 24 h after injury as compared to the groups transfected with APOE ϵ_2 or APOE ϵ_3 ($P < 0.05$). Furthermore, decreases of early apoptosis were detected in the groups treated with apoE-mimetic peptide COG1410 at 24 h after injury ($P < 0.01$). **Conclusion** APOE ϵ_4 -transfected NSCs showing a higher rate of early apoptosis indicates that the patients with APOE ϵ_4 may suffer aggravation of brain trauma in acute stage due to early apoptosis. Our results also identify the early neuroprotective effect of apoE-mimetic peptide COG1410.

[基金项目] 国家自然科学基金(81000528);新世纪优秀人才支持计划(NCET-12-1057);四川省卫生厅项目(090217);四川省科技厅项目(2009JY0126);四川省教育厅青年基金(08zb049)

[通信作者] 江涌, E-mail: jiangy0122@gmail.com

孙晓川, E-mail: sunxch1445@gmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140115.1517.010.html>(2014-01-15)

[Key words] apolipoprotein E; apoE-mimetic peptide; traumatic brain injury; *in vitro* model; early apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81000528), the Program for New Century Excellent Talents (NCET-12-1057), the Project of Health Department of Sichuan Province (090217), the Foundation for Sci & Tech Research of Sichuan Province (2009JY0126), and the Foundation for Young Scholars of Sichuan Provincial Education Committee (08zb049). Corresponding author: Jiang Yong, E-mail: jiangy0122@gmail.com; Sun Xiaochuan, E-mail: sunxch1445@gmail.com

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是神经外科最常见的一种疾病,其病死率、致残率居各类创伤之首。基础与临床研究均表明,脑伤后以细胞凋亡为主要特征的继发性脑损伤是影响伤情转归的主要因素,其中尤以 24 h 时间点的早期凋亡与 TBI 患者的病情密切相关^[1-2]。载脂蛋白 E (apolipoprotein E, APOE 代表基因, apoE 代表蛋白) 主要有 $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$ 3 个等位基因,不同的亚型具有不同的神经生物学作用, $\epsilon 3$ 约占人群的 75%,被视为野生型,对神经代谢起到正面作用;而 $\epsilon 2$ 和 $\epsilon 4$ 被视为突变型^[3]。我们前期工作和国外研究显示,携带 $\epsilon 4$ 的患者对脑创伤的耐受性降低,更易出现伤情加重及不良预后^[4-5]。但是 APOE 亚型与脑创伤耐受性的机制仍未阐明,而且其相应蛋白所具有的脑功能保护及治疗作用也值得关注。本实验观察 APOE 多态性对神经细胞早期凋亡的影响,旨在进一步探讨其短肽的神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

人 APOE $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 及 $\epsilon 4$ 等位基因修饰的神经干细胞 (neural stem cells, NSCs)、NSCs 培养液及 4% 多聚甲醛等由本实验室保存。碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、胰酶、DNA 酶 I 均购自美国 Sigma 公司。NSCs 培养添加剂 B27、DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司。NF200 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。通用型免疫组化 S-P 试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自晶美生物技术有限公司。0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS)、胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 为美国 HyClone 公司产品。Annexin V-FITC 检测试剂盒购自 BD Pharmingen。流式细胞仪为美国 FACScan Becton Dickinson 公司产品。

1.2 神经元/胶质细胞共培养体系的构建

采用前期实验中成功建立的人 APOE $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 及 $\epsilon 4$ 等位基因修饰的神经干细胞^[6],通过优化分化条件,构建神经元/胶质细胞共培养体系。

1.2.1 实验分组 采用不同分化条件,诱导神经干细胞向神经元分化,筛选最佳分化作用培养液,得到满足实验需要的神经元/胶质细胞共培养体系,分为 4 组:对照组:以 DMEM/F12 + 1% B27 培养的 NSCs;血清组:以 5% FCS 培养的 NSCs;因子组:10 ng/mL bFGF + 10 ng/mL EGF + 1% B27 + DMEM/F12 培养的 NSCs;联合组:10 ng/mL bFGF + 10 ng/mL EGF + 1% B27 + 5% FCS + DMEM/F12 培养的 NSCs。

1.2.2 诱导分化 将第 2 代细胞消化后,轻柔吹打为单细

胞,先将少量浓缩的细胞悬液以较大密度接种,24 ~ 48 h 后,待细胞贴壁后,再补加相应培养液,每 3 天换液 1 次。按不同培养液分组进行诱导分化,在分化进行至 12 d 时终止诱导,其间每天观察生长及分化情况。经免疫组化检测 NF200 的表达,分析不同分化液对 NSCs 定向诱导为神经元的作用,每孔按照四角加中央取 5 个视野,镜下计数阳性细胞平均数,计算阳性率,筛选出最佳分化作用的培养液。

1.3 细胞划痕损伤模型构建

利用筛选出的最佳分化作用培养液,分化出神经元/胶质细胞共培养体系进行细胞划痕损伤模型构建。参考前期工作^[7],采用神经元/胶质细胞共培养体系,体外培养 7 d 后,显微镜下观察,可见胞体呈多形性,胞质透亮,周围带有光晕。自胞体伸出较多突起,突起间相互联系,形成复杂的网络结构。固定以细小的微量移液器塑料滴头于各培养孔内划伤培养之神经细胞,划伤长度为 20 mm,划伤间距为 3 ~ 4 mm,4 横 4 竖共 8 条划痕,每孔划伤位置尽量保持一致,划伤宽度约 1 mm。

1.4 细胞早期凋亡的检测

①于伤后 6、12、24、48 h 共 4 个时间点观察各 APOE 亚型损伤组细胞早期凋亡情况;②于早期凋亡显著的时间点 (伤后 24 h) 观察 apoE 短肽干预 (伤后立即于培养液中加入 COG1410 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与对照组的细胞早期凋亡情况。方法参照 Annexin V-FITC 检测试剂盒说明书进行,具体操作步骤如下:把细胞培养液吸出至 10 mL 离心管,PBS 洗涤贴壁细胞 1 次,贴壁细胞用不含 EDTA 的 0.125% 胰酶消化收集后,加入离心管内的细胞培养液,混匀。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,收集细胞。用 PBS 重悬细胞并计数,取 1×10^5 重悬细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞。加入 Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μL Propidium Iodide,混匀。避光、室温反应 5 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡的情况。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件,各组间比较行单向方差分析,成组数据比较行 *t* 检验。

2 结果

2.1 神经元/胶质细胞共培养体系的建立

2.1.1 不同培养液对 NSCs 分化的影响 在不同诱导分化条件下,相邻的 NSCs 来源的分化细胞互相结合形成片状或丝状网络,但各组分化快慢及程度不同。联合组分化较快,12 h 后开始出现分化,贴壁 5 d 后分化已较明显,分化细胞多为扁平细胞,其细胞突起较多且粗;少数分化细胞偏小,从胞体发出数个细而短的突起和 1 个相对粗而长的突起,具有早期神经细胞形态 (图 1)。

2.1.2 分化形成的神经元/胶质细胞形态学检测 显微镜下可见培养细胞大致为两大类:一类为神经元样细胞,形状

已很典型,胞体饱满,多呈梭形、锥形,少数呈多边形,细胞质丰富,核大,核仁隐约可见,突起明显增长,透亮,单个均匀分布;另一类扁平状多边形的神经胶质样细胞铺垫,数量较多,细胞突起较多且粗。上述两种神经细胞形成网络状联系(图2)。其中转染人 APOE 基因的 NSCs 分化形成的网络状联系的神经细胞,在激光共聚焦显微镜下可见 EGFP 绿色荧光表达(图3)。

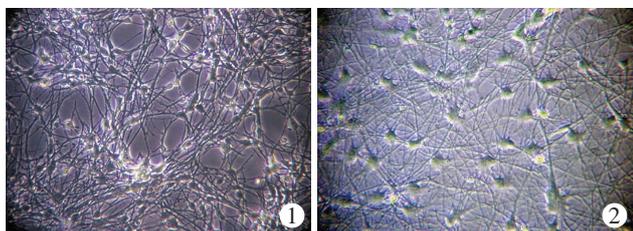
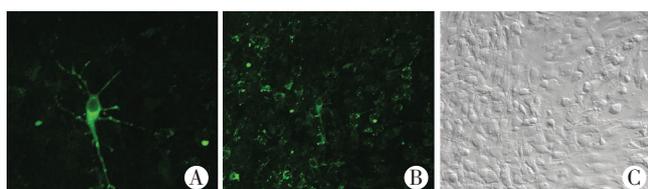


图1 联合组 NSCs 分化观察 (倒置显微镜 ×200)
图2 神经元/胶质细胞共培养体系 (倒置显微镜 ×200)



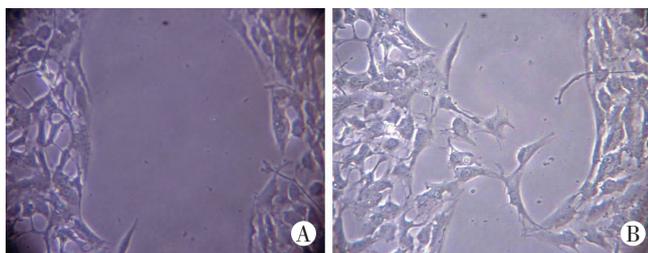
A: 激发荧光下分化后的神经元(×400); B: 激发荧光下神经元/胶质细胞共培养体系(×200); C: 未激发荧光下神经元/胶质细胞共培养体系(×200)

图3 转染人 APOE 基因的 NSCs 分化形成的网络状联系的神经细胞 (激光共聚焦显微镜)

2.1.3 NSCs 在不同培养液条件下分化为神经元的百分率
对照组、血清组、因子组和联合组分化为神经元的百分率分别为(0.31 ± 0.06)%、(9.11 ± 3.13)%、(20.33 ± 1.51)%、(32.15 ± 2.61)% ,组间两两比较有统计学差异($P < 0.05$)。

2.2 细胞划痕损伤模型的构建

2.2.1 机械损伤后细胞形态学观察 神经元/胶质细胞共培养体系机械性划伤后,即可见移液器枪头划伤区域神经细胞胞体及突起结构完全消失,呈现一空白划痕区,并有坏死细胞碎屑漂浮在培养液中,损伤区邻近的神经细胞也可见到部分突起有受损,而稍远隔部位神经细胞在光镜下未观察到结构有明显改变(图4A)。但是,随着损伤后培养时间的延长,损伤区偶可见两侧神经细胞有新生突起长入划伤区及少量胶质细胞向划伤区迁移,损伤区周围神经细胞可见细胞质的透光度逐渐降低,晦暗,甚至有细胞出现细胞膜破裂,细胞体及突起结构崩解,呈碎屑状(图4B)。



A: 伤后早期; B: 伤后晚期

图4 划伤后的神经元/胶质细胞共培养 (倒置显微镜 ×200)

2.2.2 早期凋亡检测 Annexin V/PI 双标记检测结果分为

4个区域,其中只有红色荧光通道能检测到的细胞为损伤细胞(FITC⁻/PI⁺),绿色和红色荧光通道均能检测到的细胞为晚期凋亡细胞和坏死细胞(FITC⁺/PI⁺),两个荧光通道均未能检测到的细胞为活细胞(FITC⁻/PI⁻),只有绿色荧光通道能检测到的细胞为早期凋亡细胞(FITC⁺/PI⁻)。

2.2.2.1 各 APOE 亚型组在不同时间点早期凋亡率的比较

24 h 时,人 APOE ϵ 2 及人 APOE ϵ 3 组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);但该2组分别与人 APOE ϵ 4 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。48 h 时,各组之间两两比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

表1 各实验组于各时间点 Annexin V/PI 检测早期凋亡结果
[n = 5, ($\bar{x} \pm s$) %]

时间点	人 APOE ϵ 2 组	人 APOE ϵ 3 组	人 APOE ϵ 4 组
6 h	5.41 ± 1.25	4.99 ± 1.41	8.10 ± 1.10
12 h	6.46 ± 0.74	6.81 ± 0.36	8.65 ± 1.17
24 h	14.70 ± 1.23 ^a	14.09 ± 2.32 ^a	19.12 ± 1.90
48 h	37.75 ± 5.55	36.86 ± 6.67	36.96 ± 6.47

a: $P < 0.05$, 与人 APOE ϵ 4 组比较

2.2.2.2 apoE 短肽干预后早期凋亡情况 原发性机械划伤导致的早期凋亡大概在伤后 24 h 左右显著出现,于 24 h 时 apoE 短肽干预组与对照组比较发现,人 APOE ϵ 4、人 APOE ϵ 2 及人 APOE ϵ 3 3 组的早期凋亡在 24 h 均呈现下降趋势,具有统计学差异($P < 0.01$,表2)。

表2 人 APOE 各亚型组予 COG1410 后 24 h 早期凋亡率情况
[n = 5, ($\bar{x} \pm s$) %]

组别	人 APOE ϵ 2 组	人 APOE ϵ 3 组	人 APOE ϵ 4 组
对照组	14.70 ± 1.23	14.09 ± 2.32	19.12 ± 1.90
apoE 短肽干预组	8.50 ± 1.11 ^a	7.90 ± 1.53 ^a	9.31 ± 1.50 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组比较

3 讨论

NSCs 是中枢神经系统中保持分裂和分化潜能的细胞,在适宜的微环境的调控下能够增殖、分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。如果利用其分化特性,通过体外培养获得大量 NSCs,进而控制培养条件,可同时或分别获得神经元及胶质细胞进行脑损伤的体外研究。在功能上,神经元和胶质细胞密不可分,构成一个整体(神经元/胶质细胞功能单位),二者均参与继发性脑损伤的病理过程,而且 apoE 主要由星形胶质细胞产生,把二者有机地联系在一起进行体外研究,更能模拟 APOE 基因影响神经细胞损伤的病理过程。本实验中我们成功构建携带 APOE 等位基因的细胞损伤模型,不仅发现具有神经细胞损伤后的镜下形态学改变,而且流式细胞技术检测其早期凋亡率及死亡率,发现随培养时间延长,早期凋亡率及细胞死亡率逐渐增高,说明细胞划痕损伤可以在一定程度上在体外模拟颅脑损伤发生后的病理生理过程,是一种简单易行的体外神经细胞损伤模型^[8]。

近年来,人们注意到 apoE 与凋亡的关系。文献

[9-11]报道 apoE 的转录可以诱导成纤维细胞的凋亡,并且 apoE 在细胞凋亡时表达上调,apoE 可能通过 apoE 受体相互作用发挥清除凋亡小体的重要作用。进一步的研究显示,APOE 对凋亡的影响具有亚型特异性。Hashimoto 等^[12]观察神经元合成神经细胞瘤杂交细胞体系(F11 细胞)发现,同等剂量下 apoE4 较 apoE3 更易致细胞死亡,且 apoE4 诱导的细胞死亡具有典型的凋亡特征。近期研究也证实胶质细胞衍生的 apoE 可以通过受体调控信号通路保护神经元免受凋亡,但存在亚型特异性,其中 apoE3 的保护作用明显强于 apoE4^[13]。Ji 等^[14]观察 APOE 亚型特异性影响 neuro-2a 细胞对 amyloid peptide (A β 1-42) 反应,发现含有 apoE4 的囊泡相比于 apoE3 的更易破裂,这一结果提示,apoE4 更易磷酸化,并且插入溶酶体膜,使之失稳态,直至诱发细胞凋亡。

目前,APOE 基因多态性与颅脑损伤病情及预后的相关性的报道绝大多数为临床研究^[5],探讨其作用机制的实验研究甚少。国内外研究^[1-2]表明,凋亡发生的时间及峰值存在差异,早期凋亡尤其值得关注。本实验采用干扰因素较小,条件易于控制的细胞损伤模型,可以更容易地观察 APOE ϵ 4 对凋亡尤其是早期凋亡的影响。在实验中我们参考前述相关文献设置时间点,发现神经元/胶质细胞共培养体系机械损伤后,在伤后 6 h 各组即可发现有早期凋亡细胞,但是 12 h 时间点的早期凋亡比例与 6 h 相比,各组差异无统计学差异($P > 0.05$),据此我们判断这一结果估计与细胞划伤后细胞较脆弱,而在采集细胞进行流式细胞检测过程中,可能造成部分脆弱细胞的凋亡及坏死倾向,所以两组之间差异无统计学意义,提示致伤后虽可能已有早期凋亡细胞出现,但是不能完全说明是由于原发性机械划伤所致。而在 24 h 时间点时,各组早期凋亡率较 6 h 及 12 h 时间点时均有明显增高($P < 0.05$),提示由原发性机械划伤导致的早期凋亡大概在伤后 24 h 左右显著出现,与文献[1-2]报道相似。进一步到伤后 48 h,各组早期凋亡率及坏死率较前面时间点有显著性差异($P < 0.05$),这一结果提示随着损伤的进展,凋亡及坏死的趋势逐渐明显,但是这一时间点凋亡及坏死的细胞占到 70%~90%,对于分析早期凋亡已经失去意义。

在此基础上,本实验进一步分析 24 h 时间点各实验组之间神经细胞早期凋亡的差异,发现人 APOE ϵ 4 组分别与人 APOE ϵ 2 及人 APOE ϵ 3 组比较有显著性差异($P < 0.05$)。APOE ϵ 4 是目前普遍认同的影响 TBI 预后的高风险因素,已经有一系列临床研究证实了其相关性^[4]。我们的前期临床研究已显示,APOE ϵ 4 还

与 TBI 急性期病情加重相关^[15],提示 APOE ϵ 4 可能早期影响脑损伤后的病理过程及预后。本实验结果表明携带 APOE ϵ 4 更易导致损伤后早期凋亡细胞增多,从而在早期出现伤情恶化,预后不佳。本实验从细胞水平为 APOE 多态性影响 TBI 病情及预后的临床研究结果提供了实验依据。

研究发现,外源性 apoE 全蛋白不能通透血脑屏障(blood-brain barrier, BBB),极大影响了 apoE 的神经保护作用。而重组自 apoE 受体结合区的 apoE 短肽不包括 112 和 158 位残基,理论上可透过正常或脑损伤鼠的 BBB,并保留全蛋白与细胞表面受体结合的能力,发挥其神经细胞再生,细胞膜、轴突及突触修复或重建等正常神经保护作用^[16-17]。基础研究表明,apoE 短肽(COG133、COG1410 等)对颅脑损伤具有良好的治疗作用^[18-19]。在相应的 apoE 短肽中,COG1410 较 COG133 药物效用更强大,更加稳定,且治疗时间窗可延至伤后 120 min 内,更加显示了其在颅脑损伤治疗中的临床应用价值。在本实验中,在损伤后的细胞培养液中加入 COG1410,发现人 APOE ϵ 4、人 APOE ϵ 2 及人 APOE ϵ 3 3 组的早期凋亡在 24 h 这一关键节点均呈现下降趋势,具有统计学差异($P < 0.01$)。

本实验成功构建了携带人 APOE 基因各亚型的体外神经细胞损伤模型,并且明确了各亚型及短肽对早期凋亡的影响。但是体外细胞模型与在体动物实验仍存差异,下一步将进行 APOE 转基因动物相关实验,以期进一步明确 APOE 短肽神经保护作用。

参考文献:

- [1] Ballesteros M A, Lopez-Hoyos M, Munoz P, et al. Apoptosis of neuronal cells induced by serum of patients with acute brain injury: a new *in vitro* prognostic model[J]. *Intensive Care Med*, 2007, 33(1): 58-65.
- [2] Minambres E, Ballesteros M A, Mayorga M, et al. Cerebral apoptosis in severe traumatic brain injury patients: an *in vitro*, *in vivo*, and post-mortem study[J]. *J Neurotrauma*, 2008, 25(6): 581-591.
- [3] Sun X C, Jiang Y. Genetic susceptibility to traumatic brain injury and apolipoprotein E gene[J]. *Chin J Traumatol*, 2008, 11(4): 247-252.
- [4] Zhou W, Xu D, Peng X, et al. Meta-analysis of APOE4 allele and outcome after traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2008, 25(4): 279-290.
- [5] Jiang Y, Sun X, Xia Y, et al. Effect of APOE polymorphisms on early responses to traumatic brain injury[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 408(2): 155-158.
- [6] 江涌,吴海涛,孙晓川,等.人 APOE ϵ 2 及 ϵ 4 等位基因修饰的神经干细胞的建立[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(4): 334-337.
- [7] 吴海涛,江涌,张晓冬,等.载脂蛋白 E 基因多态性影响星形胶质细胞损伤后早期 NF- κ B 表达的实验研究[J]. *第三军医大学学报*. 2010, 32(2): 103-106.
- [8] 李杨,江基尧.神经细胞体外机械损伤模型的研究现状[J]. *国外医学:神经病学神经外科学分册*, 2000, 27(1): 1-4.
- [9] Quinn C M, Kagedal K, Terman A, et al. Induction of fibroblast apo-

lipoprotein E expression during apoptosis, starvation-induced growth arrest and mitosis[J]. *Biochem J*, 2004, 378(Pt 3): 753-761.

[10] Tedla N, Glaros E N, Brunk U T, *et al.* Heterogeneous expression of apolipoprotein-E by human macrophages [J]. *Immunology*, 2004, 113(3): 338-347.

[11] Elliott D A, Kim W S, Jans D A, *et al.* Apoptosis induces neuronal apolipoprotein-E synthesis and localization in apoptotic bodies [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 416(2): 206-210.

[12] Hashimoto Y, Jiang H, Niikura T, *et al.* Neuronal apoptosis by apolipoprotein E4 through low-density lipoprotein receptor-related protein and heterotrimeric GTPases [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(22): 8401-8409.

[13] Hayashi H, Campenot R B, Vance D E, *et al.* Apolipoprotein E-containing lipoproteins protect neurons from apoptosis *via* a signaling pathway involving low-density lipoprotein receptor-related protein-1 [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(8): 1933-1941.

[14] Ji Z S, Miranda R D, Newhouse Y M, *et al.* Apolipoprotein E4 potentiates amyloid beta peptide-induced lysosomal leakage and apoptosis in neuronal cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(24): 21821-21828.

[15] 江涌, 孙晓川, 夏玉先, 等. 载脂蛋白 E 基因多态性与颅脑损伤

的相关性[J]. *中华创伤杂志*, 2005, 21(7): 520-523.

[16] Wang H, Durham L, Dawson H, *et al.* An apolipoprotein E-based therapeutic improves outcome and reduces Alzheimer's disease pathology following closed head injury: evidence of pharmacogenomic interaction [J]. *Neuroscience*, 2007, 144(4): 1324-1333.

[17] Laskowitz D T, Vitek M P. Apolipoprotein E and neurological disease; therapeutic potential and pharmacogenomic interactions [J]. *Pharmacogenomics*, 2007, 8(8): 959-969.

[18] Jiang Y, Brody D L. Administration of COG1410 reduces axonal amyloid precursor protein immunoreactivity and microglial activation after controlled cortical impact in mice [J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(13): 2332-2341.

[19] Hoane M R, Kaufman N, Vitek M P, *et al.* COG1410 improves cognitive performance and reduces cortical neuronal loss in the traumatically injured brain [J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(1): 121-129.

(收稿:2013-12-09;修回:2013-12-26)

(编辑 王小寒)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2014)06-0552-01

反复 10 余年皮疹的类鼻疽病误诊 1 例

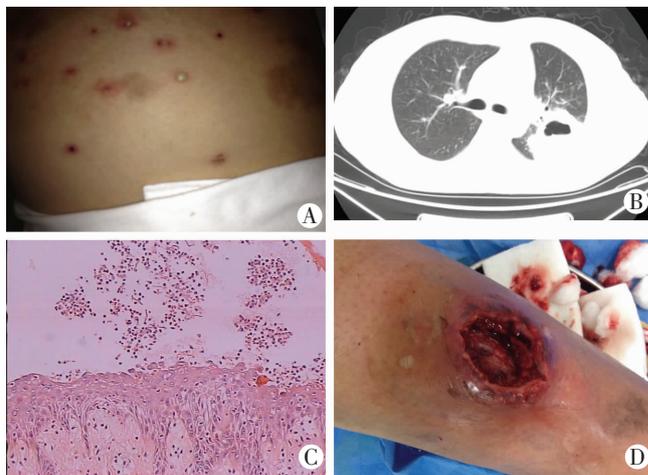
杨 丽, 陆俊羽 (400037 重庆, 第三军医大学新桥医院全军内科呼吸研究所, 全军呼吸病研究重点实验室)

[关键词] 类鼻疽病; 皮疹; 类鼻疽伯克霍尔德菌
[中图分类号] R515.9 [文献标志码] B

1 临床资料

患者, 男性, 46 岁, 维修工人。因“咳嗽、咳痰、左胸痛、发热 20 余天”入院。外院胸部 CT 示左下肺炎。血常规: 白细胞: $22.0 \times 10^9/L$ 。经头孢替安抗感染治疗半个月复查胸部 CT 病灶增大。12 年前至海南度假后出现四肢散在白色水疱, 伴瘙痒; 10 年前移居至海南, 全身开始出现散在水疱 (图 1A)。外院皮肤病理活检后诊断疱疹性皮炎, 口服氨苯砜病情反复。7 年前出现左小腿胫前溃疡, 反复换药后好转; 半年前改为口服强的松片, 水疱反复。10 年前行脾脏切除术后病理提示结核, 术后抗结核半年。查体: 体温 $38.6^\circ C$, 全身皮肤散在皮疹瘢痕, 左下肺可闻及少量湿啰音。诊断: ①左上肺炎; ②角层下脓疱病; ③脾切除术后。查胸部 CT 提示左下肺炎 (图 1B)。予以哌拉西林他唑巴坦 + 克林霉素抗感染及对症治疗。皮肤水疱活检提示角层下脓疱病 (图 1C)。病程中右胸壁及左小腿处出现 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 大小脓肿。治疗 13 d 后症状消失, 胸部 CT 左下肺炎稍有缩小, 但右胸壁及左小腿处包块增大。行超声引导下穿刺抽液术, 抽出红色浑浊液体送细菌培养。右季肋部脓肿穿刺脓液培养为类鼻疽伯克霍尔德菌; 左小腿穿刺脓液培养为洋葱伯克霍尔德菌。行包块切开引流 (图 1D) 后出现高

热, 体温 $39 \sim 40^\circ C$ 。查血培养提示类鼻疽伯克霍尔德菌。予以亚胺培南西司他汀 + 口服磺胺, 48 h 后未再发热, 病情好转。强的松逐渐减量至停药, 皮肤脓疱未再出现, 右胸壁及左小腿皮肤溃烂处愈合。1 个月后复查胸部 CT 病灶明显吸收。抗生素改为阿莫西林克拉维酸钾 + 左氧氟沙星片降阶梯治疗半年后随访至 1 年皮疹无复发。综上所述, 诊断: ①类鼻疽病 (亚急性型); ②败血症 (类鼻疽伯克霍尔德菌); ③脾切除术后。



A: 全身散在水疱; B: 胸部 CT 示左下肺炎 (肺窗); C: 脓疱 HE 染色观察 ($\times 100$); D: 小腿溃疡

图 1 类鼻疽病患者临床表现

(下转 563 页)

[通信作者] 陆俊羽, E-mail: junyulu@aliyun.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140225.0921.001.html> (2014-02-25)