论著

文章编号:1000-5404(2005)06-0480-05

FGFR2条件性敲除载体的构建及中靶ES细胞的筛选与鉴定

王建民,宋瑞华,杜晓兰,尹良军,陈 波,孙 晶,苟元彬,赵 玲,陈 林 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军战创伤中心,重庆 400042)

提 要:目的 构建成纤维细胞生长因子2型受体(Fibroblast growth factor receptor-2, FGFR2)条件性敲除载体,并对中靶ES细胞进行筛选与鉴定,为最终建立FGFR2条件性敲除小鼠模型,研究FGFR2在小鼠骨骼、肺脏等组织、器官发育过程中的作用打下基础。**方法** 在分析小鼠FGFR2基因组DNA序列结构的基础上,设计并构建了条件性敲除小鼠FGFR2外显子7、8的基因打靶载体,采用电穿孔法在ES细胞中进行了打靶重组,G418与Ganciclovir被用于对电转的ES细胞进行正负筛选,最后对ES细胞克隆进行了Southern与PCR鉴定。**结果** 将所构建的条件性打靶载体通过电穿孔转染入表达重组酶(Cre)的AmI细菌,经PCR、酶切和测序鉴定,Cre酶能正确将条件性打靶载体的外显子7、8和选择性标记Neo基因经重组剔除,电转了基因敲除载体的ES细胞经正负筛选后共挑取克隆83个;经5′端探针Southern杂交鉴定,发现4株阳性克隆;该4株克隆再经3′端探针Southern杂交鉴定,发现2株阳性克隆;最后经Southern和PCR检测发现1株ES细胞克隆仍保留外显子7、8两侧的loxP序列。**结论** FGFR2条件性基因敲除ES细胞已成功构建。

关键词: 成纤维细胞生长因子2型受体;条件性敲除;同源重组; Cre蛋白;ES细胞

中图法分类号: Q782; R394-33; R394.2 **文献标识码:** A

Construction of targeting vector for conditional knockout of murine FGFR2 and screening and identification of targeted ES cells

WANG Jian-min, SONG Rui-hua, DU Xiao-lan, YIN Liang-jun, CHEN Bo, SUN Jing, GOU Yuan-bin, ZHAO Ling, CHEN Lin (Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the functions of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2) signals in murine organogenesis, we constructed the FGFR2 conditional knockout vector, in which the exons 7 and 8 of FGFR2 were floxed and Cre-mediated recombination of loxP could be deleted. Then, we obtained and identified the targeted ES clones. **Methods** Based on the fact of Cre-mediated recombination loxP, a conditional targeting vector was constructed. At first, the Cre-mediated deletion of floxed exons 7 and 8 was confirmed by introduction of the targeting vector into Cre-expressing competent AmI bacteria. The transfection of targeting vector into ES cells was carried out by electroporation, and the transfected ES cells were screened with G418 and Ganciclovir. Finally, the ES clones with correct targeting event were identified by Southern blot and PCR. **Results** PCR and restriction enzyme digestion confirmed that a targeting vector for conditional knockout of murine FGFR2 was successfully made. A total of 83 ES clones were collected after screening by both G418 and Ganciclovir, and 4 positive ES clones were found by Southern blot of 5′-end flank probe, in which 2 ES clones with correct targeting event were found by Southern blot of 3′-end flank probe again. One targeted ES clone was found by Southern blot and PCR to have 2 flanking loxP of exons 7 and 8. **Conclusion** The ES clones with FGFR2 conditional knockout were established successfully.

Key words: fibroblast growth factor receptor-2; conditional knockout; homologous recombination; Cre; ES cell

成纤维细胞生长因子2型受体(fibroblast growth factor receptor-2, FGFR2)是与多种FGFs具有高度亲和力的跨膜酪氨酸激酶受体[1]。研究表明FGFR2在头颅、肢体及多种含上皮细胞器官、组织(肺、肾、皮肤、胸腺等)的形成和发育过程中具有重要作用,已发现FGFR2的近30种功能获得型(gain of function)点突变可引起多种人类颅骨发育异常性遗传病,囟门早闭(cra-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30230370, 30271343)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30230370, 30271343)

作者简介: 王建民(1962-),男,江苏省南京市人,博士,副研究员,主要从事急性肺损伤与肺纤维化发病机制与基因治疗方面的研究,发表论文24篇。电话:(023)68757572

通讯作者: 陈 林,E-mail: linchen70@163.com

收稿日期: 2004-05-17;**修回日期:** 2004-09-16

niosynostosis)[2,3]。同其它 FGFRs 一样，FGFR2 含有 3 个位于细胞膜外的免疫球蛋白(Ig)样区以及细胞内的酪氨酸激酶区(tyrosine kinase, TK)，有两种不同的剪切体，外显子 7、8 编码 Ⅲa/Ⅲb，该剪切体为 KGFR (FGFR2b)，外显子 7、9 编码 Ⅲa/Ⅲc，该剪切体为 BEK (FGFR2c)[4,5]。IgⅢ区是 FGFR2 与 FGFs 的特异性结合部位，也是维持 FGFR2 活性的功能区。缺失 FGFR2 IgⅢ区的小鼠在胚胎期第 10～11.5 天因胎盘形成异常等原因而死亡[6]。为研究 FGFR2 信号在胚胎后期发育和成年后多种生理和病理过程中的作用，有必要建立 FGFR2 条件性敲除小鼠模型。为此，我们设计并构建针对小鼠 FGFR2 基因外显子 7、8 的条件性打靶载体，并经 ES 细胞打靶筛选、鉴定，获得了 1 株发生正确同源重组的阳性克隆，为下一步建立 FGFR2 条件打靶小鼠模型打下了基础。

1　材料与方法

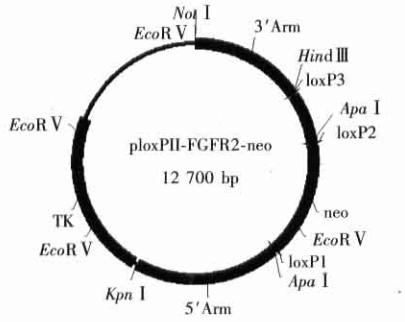
1.1　材料

质粒：pBluescript Ⅱ SK +/-(Stratagene 公司)，基因敲除载体 ploxpneo、ES 细胞株(美国 NIH 邓初夏博士惠赠)；DH5α(本实验室保存)；组成型表达 Cre 重组酶的大肠杆菌 AmI 菌种(美国密苏里大学 Rucker 博士惠赠)[7]、G418 抗性的小鼠胚胎成纤维细胞由军事医学科学院杨晓教授惠赠。工具酶为 New England、Roche、TaKaRa 公司产品；λ/*Hind* Ⅲ Marker、DL2000 marker 为 TaKaRa 公司产品；质粒 DNA 抽提试剂盒为 Omega 公司产品；胶回收试剂盒为 Qiagen 公司产品；测序由上海申能博彩生物技术公司完成；引物由美国 Gibco BRL 公司合成；电穿孔仪、电穿孔杯为 BioRad Gene Pulser Ⅱ System(BioRad 公司)。LIF、DMEM 高糖培养基、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、青-链霉素溶液、β-巯基乙醇、胎牛血清、丝裂霉素 C、DMSO、PBS 缓冲液 pH 7.2、EDTA-胰酶、G418、明胶等试剂分别购自 Gibco BRL，Sigma 和 HyClone 公司。

1.2　打靶载体的构建及鉴定

1.2.1　打靶载体的构建　　用菌落杂交法从 sv129 小鼠基因组文库中筛选出涵盖范围从 FGFR2 的 6 号内含子到 10 号外显子的 DNA 克隆(R2-1a-5)，用 *Apa* Ⅰ + *Eco*RⅤ从 R2-1a-5 克隆中切取 2.9 kb 的 *Apa* Ⅰ/*Eco*RⅤ片段，该片段起于 6 号内含子的 *Apa* Ⅰ位点，止于 9 号外显子的 *Eco*RⅤ位点，将该片段插入 pBluescriptⅡ SK(+/-)得到 PAV 质粒。PAV 质粒经 *Nhe* Ⅰ酶切后于该位点插入 loxP3，得到 R2A1 质粒。R2A1 质粒经 *Not* Ⅰ/Asp718 酶切后作为一个同源臂插入 ploxpneo，得到 ploxPR2A1 质粒；另从上述 R2-1a-5 克隆中用 *Kpn* Ⅰ + *Apa* Ⅰ切取 2.5 kb *Kpn* Ⅰ/*Apa* Ⅰ的片段，该片段插入 pBluescript Ⅱ SK(+/-)得到 KAPA 质粒。KAPA 质粒用 *Kpn* Ⅰ/*Cla* Ⅰ酶切后作为另一同源臂插入 ploxPR2A1 质粒得到条件性打靶载体 R2CKO(图 1)。

1.2.2　R2CKO 打靶载体的酶切鉴定　　用限制性内切酶 *Not* Ⅰ、*Not* Ⅰ + *Xho* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ + *Cla* Ⅰ分别对条件敲除载体 R2CKO 进行酶切消化，以对所构建的载体进行初步鉴定。

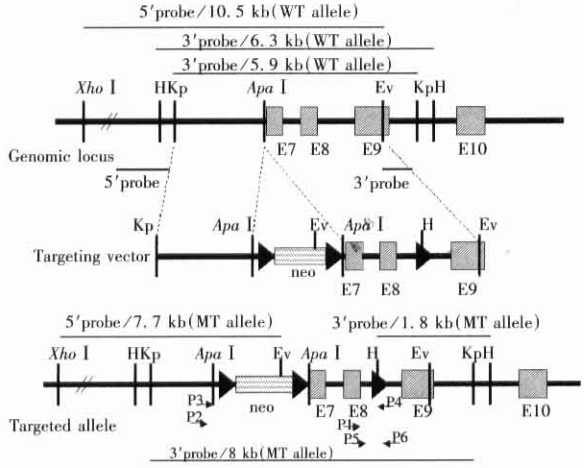


The part of thin line is genomic sequence, loxP3 is located in inner of 3′-Arm, trigon represents sequence and direction of loxP, neo gene is located between 3′-Arm and 5′-Arm, and tk gene is located out of 5′-Arm

图 1　FGFR2 条件性基因打靶载体示意图

Fig 1　Targeting vector FGFR2 conditional gene target

1.2.3　R2CKO 打靶载体的测序鉴定　　分别以 P1(5′-GATTG-GACTGCACACTTCCC-3′)与 P2(5′-TAGGTAGTCCATAAC TCGG-3′)测序引物(引物位置见图 2)，采用 ABI3700 型基因测序仪，对打靶载体的部分序列进行了测序。



Frames represent exons (sign is E) and neo gene; arrow is site and direction of loxP, which are loxP 1 - 3 from left to right. H: *Hind* Ⅲ; Kp: *Kpn* Ⅰ; Ev: *Eco*RⅤ; P1 and P2 are site and direction for two sequecing primers; P3 - P6 are site and direction of PCR primers

图 2　打靶载体与 FGFR2 基因同源重组示意图

Fig 2　Homologous recombination between targeting vector and FGFR2 gene

1.3　Cre 介导 R2CKO 重组功能的鉴定

1.3.1　AmI 细菌电击基因转染　　取 AmI 感受态细菌 40 μl，加入 200 ng 条件打靶载体 DNA，混匀后移入电穿孔杯中，用 Biorad Gene Pulser Ⅱ Electroporation 系统进行电击。电击条件为 25 kV，2.5 μF。37 ℃振荡培养 1 h 后取少量接种于含 Amp 的 LB 培养基上，37 ℃培养过夜后随机挑取 40 个 Amp 抗性克隆用于鉴定重组情况。

1.3.2 PCR筛选重组细菌 用位于loxP1 5′端的引物P3(5′-GTGAATAAGAGGCCTTATACG-3′)和loxP3 3′端的引物P4(5′-CCTCCAGTGTCACAGTCACTGG-3′)(引物位置见图2)进行PCR,从所挑取的细菌克隆中筛选外显子7、8和选择性标记基因Neo基因同时被剔除的克隆。

1.3.3 酶切验证 将所得的阳性细菌克隆菌液进行扩增,提取质粒后用*Eco*RⅤ进行酶切,验证重组情况。

1.4 滋养层细胞的制备和ES细胞的培养

取小鼠原代胚胎成纤维细胞,扩增后用丝裂霉素C(Mitomycin C)处理2~3 h,丝裂霉素C终浓度为10 μg/ml,处理后的滋养层细胞分装冻存于-80 ℃。

1.5 电击转染ES细胞

扩增后的ES细胞用胰酶消化后重悬于PBS中,使细胞密度达到2×10^7以上。将50 μg线形化的打靶载体DNA与1 ml细胞混匀装入电穿孔槽中电击,电击参数为600 V,25 μF,200 Ω,电击时间为32 ms,电击后的细胞分入长满滋养层的培养皿中,24 h后换成ES细胞筛选培养液(含G418,280 μg/ml;Ganciclovir,2 μmol/L)。

1.6 ES克隆的挑取和扩增

转染后第8天挑取ES细胞克隆。将挑取的单个未分化ES克隆置于96孔板中,充分消化后将每个克隆一分为二,一份冻存,另一份培养后转移至24孔培养板上扩增并提取基因组DNA。

1.7 FGFR2条件基因打靶中靶ES细胞的鉴定

1.7.1 Southern杂交鉴定 将上述G418/Ganciclovir抗性的ES细胞克隆于24孔板上扩增提取基因组DNA后,采用相应的酶切消化,分别用打靶载体5′端与3′端外侧的探针进行Southern杂交,野生型与FGFR2中靶ES细胞的带型差别,及探针位置见图2所示,其中5′端探针大小为3.1 kb,3′端探针大小为1.5 kb。

1.7.2 PCR鉴定 为了检测位于内含子8中的loxP3在同源重组后是否丢失,我们采用位于loxP3两侧的序列引物P5(5′-ATAACTTCGTATAATGTATGC-3′)、P6(5′-GAATATACGTGCTTGGCGG-3′)(引物位置见图2)对loxP3进行了检测。

2 结果

2.1 FGFR2条件基因打靶载体的构建及主要酶切位点鉴定

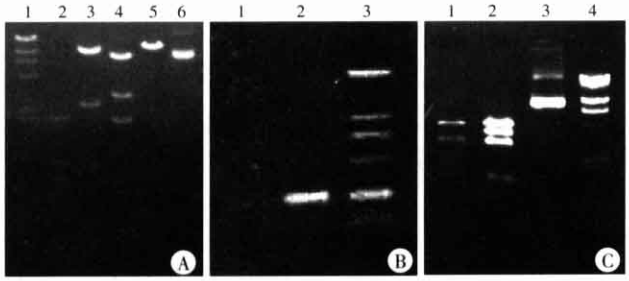
构建完成的FGFR2条件性打靶载体的短臂2.5 kb,长臂2.9 kb,除Neo基因5′、3′端各有一ploxpneo载体本身携带的loxP(loxP1、2)外,新引入的loxP(loxP3)位于内含子8内。经重组酶(Cre)介导后可将外显子7、8及/或选择性标记基因Neo基因同时剔除。构建好的载体及主要酶切位点如图1所示。经*Not*Ⅰ酶切呈线性化;经*Not*Ⅰ/*Xho*Ⅰ双酶切后得到1.9、2.9、5.5 kb 3个片段;经*Kpn*Ⅰ/*Cla*Ⅰ双酶切后得到2.5、10 kb两个片段,与预期的酶切结果相符合(图3A)。

2.2 条件打靶载体的测序鉴定

对条件打靶载体R2CKO还进行了部分测序,测序范围为两个同源臂和ploxpneo两端的交界区,新霉素(Neo)基因和单纯疱疹病毒胸苷激酶(TK)基因以及位于内含子8中的loxP3。测序结果与设计序列相一致。

2.3 打靶载体转染AmI感受态细菌后重组效率的鉴定

用引物I8R和I6F2进行PCR筛选出外显子7、8和选择性标记基因Neo基因同时被剔除的克隆。电泳结果见图3。将从PCR阳性细菌中提取的质粒用*Eco*RⅤ酶切后得到4.1、2.9、1.6 kb 3个条带,而未重组的质粒用*Eco*RⅤ酶切后得到4.5、2.5、2.9、1.6 kb 4个条带(100 bp条带虽存在但未能显示)(图3),证明外显子7、8和选择性标记基因Neo基因可在Cre重组酶的作用下被有效剔除。上述结果表明所构建的FGFR2条件打靶载体符合设计要求,可以用于ES细胞的转染和筛选。



A: Identification of primary digestion sites for R2CKO. 1: λ/*Hin*dⅢ marker; 2: DL2000 marker; 3: *Kpn*Ⅰ and *Cla*Ⅰ digestion; 4: *Not*Ⅰ and *Xho*Ⅰ digestion; 5: *Not*Ⅰ digestion; 6: Control for R2CKO without digestion; B: PCR identification for the recombination of conditional gene targeting vector in AmI-Cre cells. 1: Exon 7, 8 of R2CKO and neo gene has notbeen deleted; 2: Exon 7, 8 of R2CKO and neo gene has been deleted; 3: DL2000 marker; C: Digestion identification for the recombination of conditional gene targeting vector in AmI-Cre cells. 1: *Eco*RⅤ digestion after exon 7, 8 of R2CKO and neo gene has been deleted; 2: *Eco*RⅤ digestion for R2CKO; 3: R2CKO vector without digestion; 4: λ/*Hin*dⅢ marker

图3 R2CKO及其重组鉴定

Fig 3 Identification for the R2CKO vector and its recombination

2.4 中靶ES细胞的初步筛选

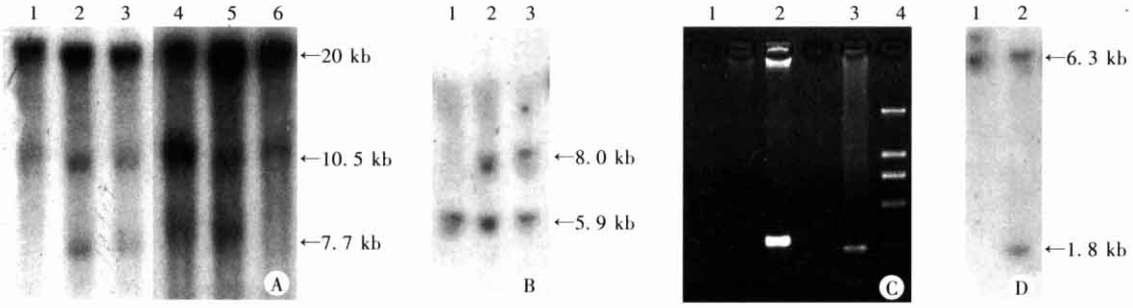
在G418抗性的滋养层细胞上培养扩增ES细胞密度达到2×10^7/ml时,将线形化的打靶载体DNA与ES细胞混匀后电击,在含G418和Ganciclovir的选择培养基中培养。转染第8天后挑选抗性ES克隆86个,所有克隆经胰酶消化后一分为二,一半冻存,一半转移至24孔板后扩增提取基因组DNA。*Xho*Ⅰ与*Eco*RⅤ双酶切消化后用打靶载体5′端外侧的探针进行Southern杂交(探针位置及*Xho*Ⅰ与*Eco*RⅤ位点如图2),杂交结果如图4A,野生型出现1条大于22 kb的非特异性条带及1条10.5 kb的条带(图4A中带1、6),FGFR2-CKO中靶等位基因由于插入的Neo基因序列中携带了1个*Eco*RⅤ位点,使得与该探针杂交的阳性条带从10.5 kb下移到7.7 kb,因此中靶ES细胞除上述两条带以外,尚增加了7.7 kb的条带(图4A中条带1~5)。经过初步筛选,得到4株阳性ES细胞克隆。

2.5 阳性ES细胞克隆的复苏及进一步鉴定

从冻存板中复苏4株5′端探针Southern杂交阳性的ES细胞克隆,在24孔板中扩增后,部分冻存以备胚泡显微注射用,其余再扩增后提取染色体组DNA做进一步的鉴定。*Xho*Ⅰ与

*Eco*RⅤ双酶切后 5′端探针 Southern 杂交结果同前。另外，经 *Kpn* Ⅰ与 *Hin*dⅢ酶切后分别用 3′端的探针进行 Southern 杂交鉴定(探针及酶切位点位置见图 2)。在 *Kpn* Ⅰ酶切后的 Southern 杂交中，野生型出现 1 条 5.9 kb 的条带(图 4B 中条带 1)，FGFR2-CKO 中靶等位基因由于插入了 Neo 基因及 loxP 序列(约 2 kb)，使得与探针杂交的阳性条带从 5.9 kb 上移到了 8.0 kb，因此中靶 ES 细胞出现了 5.9 kb 与 8.0 kb 两条带(图 4B 中条带 2、3)；为检测 loxP3 是否在重组过程中丢失，采用 *Hin*dⅢ酶切后的 Southern 杂交中，野生型出现 1 条 6.3 kb 的条带(图 4D 中条带 1)，FGFR2-CKO 中靶等位基因由于插入的 loxP3 序列中携带一个 *Hin*dⅢ位点(图 2)，使得与探针杂交的阳性条带从 6.3 kb 下移到了 1.8 kb，因此中靶 ES 细胞出现了 6.3 kb 与 1.8 kb 两条带(图 4D 中条带 2)。

最后，还采用位于 loxP3 两侧的序列引物 P5 与 P6 对 loxP3 进行了 PCR 检测。由于插入的 loxP 序列约 63 bp，在野生型仅出现一约 250 bp 大小的条带(图 4C 中条带 3)，而中靶 ES 的等位基因上由于 loxP 序列的插入，可出现一约 310 bp 大小的条带，因此中靶 ES 细胞可出现 250、310 bp 两条带(图 4C 中条带 1)。



A: Digestion of both *Xho* Ⅰ and *Eco*RⅤ, and detection by 5′-probe. 1 and 6: negative control from genomic DNA of wild type; 2 - 5: Southern blot results from genomic DNA of ES cell, coding number are G11, B11, G4 and H4 respectively

B: Digestion of *Kpn* Ⅰ, and detection by 3′-probe. 1: Negative control from genomic DNA of wild type; 2 and 3: Southern blot results from genomic DNA of ES cell, coding number are G11 and B11 respectively

C: PCR detection in loxP3 flanks. 1: Genomic DNA of ES cells; 2: Positive control from R2CKO targeting vector; 3: Negative control from genomic DNA of wild type; 4: DL2000-DNA marker

D: Digestion of *Hin*dⅢ, and detection by 3′-probe. 1: Negative control from genomic DNA of wild type; 2: Southern blot results from genomic DNA of B11ES cells

图 4　中靶 ES 细胞的酶切与 PCR 鉴定

Fig 4　Identification of digestion and PCR for targeted ES cells

3　讨论

为在整体动物水平研究 FGFR2 的功能，有关研究人员进行了 FGFR2 的常规敲除实验。Xu 等[8]将小鼠 FGFR2 基因的 7、8、9 外显子敲除后发现胚胎期第 10.5 天的小鼠较正常小鼠胚胎体形小，肢体及胎盘的发育出现异常；在胚胎期第 10 ~ 11.5 天，2/3 的小鼠由于胎盘发育及卵黄囊融合的异常而导致死亡；胚胎期第 11.5 天后则所有胚胎均死亡[6]。其它实验室也发现完全敲除 FGFR2 可引起小鼠胚胎发育早期死亡。因此，FGFR2 基因的完全敲除不能进一步研究 FGFR2 在后期发育和成年后各种生理、病理情况中的作用。为此，我们决定建立 FGFR2 的条件性敲除小鼠模型。为建立该模型，我们构建了针对 FGFR2 基因外显子 7、8 的条件性打靶载体，敲除外显子 7、8 可望同时去除 KGFR 和 BEK，即可完全去除 FGFR2 功能。利用条件性打靶技术研究基因的功能有以下优点：①可以避免因在所有目的基因表达组织剔除基因导致的胚胎死亡；②可以对一些广泛表达的基因其在特定细胞类型中的功能进行研究；③可以使靶基因的灭活发生在所需要研究的特定时期[9]。

在本实验中所用 ploxpneo 敲除载体含有正负双向选择基因——Neo 基因和 TK 基因。在 Neo 基因的 3′和 5′端各含有 1 个 loxP(loxP1、2)[9,10]，经 Cre 酶作用后可将 Neo 基因去除，以消除 Neo 基因对被敲除基因表达的干扰。根据以往构建基因敲除载体设计的经验，其同源臂的总长度可为 5 ~ 8 kb，每个同源臂长度至少 0.5 kb[8,10]。我们将 FGFR2 条件性敲除载体的两个同源臂长度设计为 2.5 kb 和 2.9 kb。为能够将外显子 7、8 敲除，我们在内含子 8 中引进了另 1 个 loxP 序列(loxP3)。当 FGFR2 条件性敲除小鼠和在特定细胞和组织中表达 Cre 基因的转基因小鼠交配后，即可在表达 Cre 的细胞、组织中将 FGFR2 外显子 7、8 选择性的敲除，即将 FGFR2 功能去除。由于 Cre 酶介导同一条 DNA 链上两个方向相同的 loxP 序列的重组而切除两重组 loxP 序列之间的 DNA 序列，在 FGFR2 条件性敲除载体构建完成后，我们通过测序验证了 3 个 loxP 的序列和方向，并利用表达 Cre 蛋白的 AmI 细菌证明引

进的loxP3能在Cre酶的作用之下成功的剔除loxP1、3之间的DNA序列，提示我们构建的FGFR2条件性敲除载体在整合至小鼠体内后可发生Cre介导的条件性敲除。

在向ES细胞转染打靶载体并经G418与Ganciclovir正负双向选择培养后，共挑取了86个ES细胞抗性克隆；经5′端探针Southern杂交鉴定，得到了4株阳性ES细胞克隆；经*Kpn* Ⅰ酶切后的3′端探针检测，得到了2株阳性ES细胞克隆；再经*Hin*d Ⅲ酶切后用3′端探针做Southern blot和PCR检测loxP3是否丢失，得到了G11号发生了正确同源重组的ES细胞克隆。该正确打靶阳性ES细胞克隆的获取为我们下一步的工作打下了良好的基础。

（致谢：本研究部分实验在军事医学科学院杨晓教授实验室完成，特此致谢！）

参考文献：

[1] Muenke M, Schell U. Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders[J]. Trends Genet, 1995, 11(8): 308-313.

[2] Ornitz D M, Marie P J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease[J]. Genes Dev, 2002, 16(12): 1446-1465.

[3] Wilkie A O, Morriss Kay G M. Genetics of craniofacial development and malformation[J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(6): 458-468.

[4] Eswarakumar V P, Monsonego Ornan E, Pines M, *et al*. The Ⅲc alternative of Fgfr2 is a positive regulator of bone formation[J]. Development, 2002, 129(16): 3783-3793.

[5] Ornitz D M, Xu J, Colvin J S, *et al*. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family[J]. J Biol Chem, 1996, 271(25): 15292-15297.

[6] Xu X, Weinstein M, Li C, *et al*. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction[J]. Development, 1998, 125(4): 753-765.

[7] Rucker E B, Piedrahita J A. Cre-mediated recombination at the murine whey acidic protein (mWAP) locus[J]. Mol Reprod Dev, 1997, 48(3): 324-331.

[8] Xu X, Qiao W, Li C, *et al*. Generation of Fgfr1 conditional knockout mice[J]. Genesis, 2002, 32(2): 85-86.

[9] Joyner A L. Gene Targeting. A Practical Approach[M]. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2000. 63-80.

[10] Chen L, Li D, Li C, *et al*. A Ser250Trp substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2(Fgfr2) result in craniosynostosis[J]. Bone, 2003, 33(2): 169-178.

（编辑　张大春）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)06-0484-01

睾旁横纹肌肉瘤伴脊髓压迫1例

A case report of paratesticular rhabdomyosarcoma accompanied with spinal cord compression

桂　芹，周　平　（第三军医大学西南医院儿科，重庆 400038）

患儿，男性，15岁，因进行性双下肢麻木、无力、活动受限，大小便潴留2 d入院。入院前2 d患儿无明显诱因出现双下肢麻木、无力。初为双下肢行走乏力，但尚能扶走，同时伴大小便潴留，以后双下肢麻木、乏力逐渐加重，且渐往上行，并发展到腰部麻木、无力，活动受限。入院当日患儿已完全不能行走，双下肢不能活动，仍麻木，但不伴四肢疼痛，无发烧及呕吐，无耳鸣。为进一步诊治来我院就诊，门诊以"急性横贯性脊髓炎"收住院。入院查体：腹股沟处扪及数个黄豆大小淋巴结，活动，无压痛。枕部扪及约2 cm×3 cm大小的硬性包块，颈阻可疑，心肺无异常，肝脾不大，外阴无明显异常，脊柱四肢无畸形，双下肢无水肿，四肢肌肉无萎缩，双侧肢体肌张力正常，肌力Ⅰ级，胸10平面以下痛觉减退，跟腱反射可引出，双侧Babinski征阳性，Chaddock征阳性，克氏征阳性。皮肤无多汗及少汗，括约肌功能障碍。院外检查：胸片和脑脊液检查正常；头颅CT示：头颅枕部见一包块，考虑纤维样瘤；脑内未见异常。MRI结果为：胸3、8、11椎体变薄，向后突出，压迫硬囊及脊髓，椎体信号不均且呈低T_1W_1和低T_2W_1信号，相邻椎间隙变窄，增强扫描椎体无明显强化，腰椎体信号不均匀，胸腰椎体多发性病变，考虑骨髓瘤的可能性大。尿本周氏蛋白检查正常。骨髓细胞分类和染色体检查不支持骨髓瘤的诊断。患儿家属发现患儿阴囊后上方可见一大小约6 cm×4 cm的包块，无触痛，基底较固定，质硬。病理检查：在送检肿块和淋巴结组织内见瘤组织，瘤细胞呈圆形、卵圆形或梭形，体积较小并见多核巨细胞，胞浆嗜酸性，核圆形、卵圆形，深染，有异形，可见核分裂像。瘤细胞呈片状或弥漫排列，并见灶性坏死。免疫组化染色：Desmin阳性，Myoglobin阳性，Actin阳性，SMA阴性，Vimentin阳性，NSE阴性，PLAP阴性，NF阴性，LCA阴性，CK阴性，AFP阴性，HMB45阴性。诊断为胚胎性横纹肌肉瘤伴腹股沟淋巴结转移。

讨论

横纹肌肉瘤起源于胚胎间质的任何部位，发生于泌尿系统的约占20%[1]，而最易发病的部位为前列腺、膀胱及阴道。睾

（下转489页）

作者简介：桂　芹（1964-），女，重庆市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事哮喘发病机制方面的研究。电话：(023)68765412

收稿日期：2004-06-19；修回日期：2004-10-27