论著

文章编号:1000-5404(2010)04-0364-05

PDX1与NKX6.1双基因表达腺病毒载体的构建、鉴定与表达

唐小龙[1,2],张荣波[2],汪雪峰[2],张 文[1] (510120 广州,广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)检验科[1];232001 安徽 淮南,安徽理工大学医学院生物工程研究所[2])

[摘要] **目的** 运用pADxsi系统构建带人PDX1与NKX6.1双基因表达腺病毒载体。**方法** 采用基因克隆技术,将目的基因NKX6.1克隆至pShuttle-GFP-CMV中,得到pShuttle- GFP-CMV-NKX6.1;将PDX1克隆至pShuttle-CMV-GFP/CMV-NKX6.1上,替换掉GFP,得到pShuttle-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1;将CMV-PDX1/CMV-NKX6.1从pShuttle-CMV-PDX1/CMV- NKX6.1转移到ADxsi骨架载体上,得到pADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1,在293细胞中进行包装与扩增活病毒,病毒滴度测定;体外感染人胎肝间充质干细胞。**结果** 分别酶切重组人PDX1与NKX6.1基因表达穿梭质粒与腺病毒载体质粒,阳性克隆均获得与理论相一致的目的条带;重组腺病毒感染人胎肝间充质干细胞比例达90%以上;RT-PCR结果表明目的基因在人胎肝间充质干细胞内能稳定表达;免疫细胞化学与间接荧光检测目的PDX1与NKX6.1蛋白分子均特异在细胞核表达。**结论** 应用pADxsi系统重组技术成功构建了人PDX1与NKX6.1双基因表达腺病毒载体。

[关键词] 腺病毒;胰腺十二指肠同源框1基因;NK6转录因子相关, 基因座1;间充质干细胞
[中图法分类号]R373;R394-33;R394.2 [文献标志码] A

Construction, identification and expression of PDX1 and NKX6.1 double-gene adenovirus expression vectors

Tang Xiaolong[1,2], Zhang Rongbo[2], Wang Xuefeng[2], Zhang Wen[1] ([1]Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital also known as Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong Province, 510120; [2]Biomedical Engineering Institute, Medical College, Anhui University of Science and Technology, Huainan, Anhui Province, 232001, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct the human PDX1 and NKX6.1 double-gene adenovirus expression vector using the pADxsi system. **Methods** pShuttle-GFP-CMV-NKX6.1 was constructed by cloning the target gene NKX6.1 into pShuttle-GFP-CMV. pShuttle-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 was constructed by cloning PDX1 into pShuttle-CMV-GFP/CMV-NKX6.1 to replace GFP. The pADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 was constructed by transferring CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 to ADxsi backbone plasmid vector from pShuttle-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1. Then, the pADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 adenovirus vector was amplified in 293 cells and viral titer was measured. Human placental liver mesenchymal stem cells were infected with adenoviruses. **Results** Restriction enzyme analysis and PCR showed that the PDX1 and NKX6.1 double-gene adeno-virus expression vector was successfully constructed, which could infect the human placental liver mesenchymal stem cells and was specifically located in nuclei. **Conclusion** Human PDX1 and NKX6.1 double-gene adenovirus expression vectors can be successfully constructed using recombinant techniques of the pADxsi system.

[**Key Words**] adenovirus vector; pancreatic and duodenal homeobox factor 1; NK6 transcription factor related locus 1; mesenchymal stem cells

Corresponding author: Tang Xiaolong, E-mail: txljd2006@126.com

胰腺β细胞的分化发育过程中转录因子与信号通路调控机制十分复杂,多种复杂的信号通路启动干细胞多种转录因子的时序表达,决定着胰腺的分化与发育进程。早在胰芽开始形成时,就开始表达的反式作用因子(trans-acting factor)——胰腺十二指肠同源框蛋白1(pancreatic and duodenal homeobox factor 1)调控干细胞到β细胞的发育;除PDX1之外,尚需一系列转录因子时序表达来协同调控与限制细胞向β细胞分化发育,PDX1通过结合于多种基因启动子上特定的具有转录调节功能的顺式作用元件(cis-acting

[通信作者] 唐小龙,E-mail:txljd2006@126.com

element),活化相应的因子转录与表达,进而启动干细胞向胰腺前体细胞分化[1-4],其中 NK6 transcription factor related, locus 1(NKX6.1)、NGN3 与 paired box gene(PAX4)的有序表达,对β细胞的形成起着决定性作用[1,2,5,6]。研究发现在胚胎组织中,PDX1 与 NKX6.1 是决定胰腺前体细胞向内分泌前体细胞,进一步向β前体细胞与β细胞分化发育的重要分子,联合 PDX1 与 NKX6.1 对诱导获取胰岛素产生细胞可能是有效的方法。因此,我们构建 PDX1 及双基因 PDX1 与 NKX6.1 腺病毒载体转染间充质干细胞,探索 NKX6.1 在 PDX1 诱导 MSC 重新编程并定向向β细胞转分化过程中的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

*Bgl*Ⅱ等多种限制性内切酶、Klenow 及 T_4 DNA ligase 均购自 New England Biolabs 公司,CIP(Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal)酶购自 Promega 公司,质粒提取纯化试剂盒和凝胶回收试剂盒购自 Promega 公司,腺病毒 pADxsi 载体系统由北京诺赛基因研究中心提供,DH5α 菌株及 293 细胞由暨南大学孙奋勇博士惠赠,pUC57-NKX6.1 与 pUC57-PDX1 质粒为本所保存。兔抗人 NKX6.1/IgG、鼠抗人 PDX1/IgG 购自 American Research Products. INC™公司,HRP 标羊抗鼠 IgG、HRP 标羊抗兔 IgG、FITC 标羊抗兔 IgG、CY5 标羊抗鼠 IgG 购自 eBioscience 公司。Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,引物由上海博亚生物工程有限公司合成,RT-PCR 试剂盒为大连宝生公司,DMEM/F12 培养基购自 Gibaco 公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 HyClone 公司。

1.2 pADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 腺病毒质粒载体的构建

首先构建 pShuttle-GFP-CMV-NKX6.1 穿梭质粒:应用 *Bgl*Ⅱ与 *Eco*RⅠ分别酶切 pUC57-NKX6.1(NKX6.1 序列上游有 *Nhe*Ⅰ和 *Bgl*Ⅱ酶切位点,下游有 *Sal*Ⅰ和 *Eco*RⅠ酶切位点)与 pShuttle-GFP-CMV 穿梭质粒,回收两目的片段后酶连,获 pShuttle-GFP-CMV-NKX6.1。再构建 pShuttle-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 穿梭质粒载体:先用 *Xho*Ⅰ酶切 pUC57-PDX1 后,Klenow 处理,过柱回收再 *Nhe*Ⅰ酶切,回收 0.87 kb 片段;另用 *Nhe*Ⅰ与 *Pme*Ⅰ酶切pShuttle-GFP-CMV-NKX6.1 后,CIP 处理后回收 5.7 kb 片段;上述两目的片段酶连,获 pShuttle-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1,转化 DH5α 扩增并提 pShuttle-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 质粒。第3步酶连用限制性内切酶 I-*Ceu*Ⅰ+I-*Sce*Ⅰ双酶切好的 pADxsi 骨架质粒与 pShuttle-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 目的片段;产物转化 DH5α,扩增 pADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 病毒质粒,产物分别进行电泳和测序等鉴定。

1.3 重组腺病毒包装、扩增和滴度测定

*Pac*Ⅰ酶切线性化重组腺病毒质粒,用 Lipofectamine 2000 脂质体转染细胞密度约 80% 的 293 细胞,3~5 d 后,开始出现明显噬斑,待大部分细胞病变时,收集细胞及上清液,反复冻融 3 次,离心收集上清,继续感染 293 细胞扩增病毒,病毒液于 -80 ℃ 冻存。TCID 50 法滴度测定:根据 CPE 法来样品滴度[2]。按下列公式计算样品滴度:

样品滴度(PFU/ml) = 稀释倍数 × 稀释度(CPE 阳性细胞孔数 -4)/8 = 10^6 × 3(CPE 阳性细胞孔数 -4)/8

1.4 胎肝间充质干细胞(FL-MSCs)的分离和培养

来自健康成年孕妇自然流产的胚胎(3 个月大小,患者知情同意),无菌取胎肝、剪碎并离散细胞,低速离心去肝实质细胞后收集上清中的有核细胞,于 DMEM/F12、10% FCS 培养液中 37 ℃、体积分数 5% CO_2 环境中培养,48 h 后全量换液,以后每 3~4 天换液。当细胞密度达 80% ~90% 时,用 0.25% 的胰蛋白酶-EDTA 消化,差速贴壁法传代,3 代后行细胞鉴定。

1.5 重组腺病毒体外感染人体细胞的效率及其目的基因表达

2×10^6/孔的 FL-MSCs 细胞接种于 6 孔板,在细胞融合至 80% 时,按感染倍数为 10∶1、50∶1、100∶1 加入腺病毒上清。培养 24、48 h 分别观察荧光细胞数。同时设 ADxsi-CMV-GFP 感染的空病毒对照组;分别于实验的不同阶段收集细胞,行 RT-PCR 检测目的基因表达。引物分别如下:PDX1(上游:5′-ACCTTCACCACCACCTCCCG-3′,下游:5′-TTCAACATGACAGCCAGCTCCAC-3′,61 ℃,310 bp);NKX6.1(上游:5′-CAATGGAAGGCACCAGACA-3′,下游:5′-GCTACGGGCATAGAGGGTC-3′,57 ℃,313 bp);GAPDH(上游:5′-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3′,下游:5′-TGAGGAGGGGAGATTCAGTG-3′,54 ℃,400 bp)。

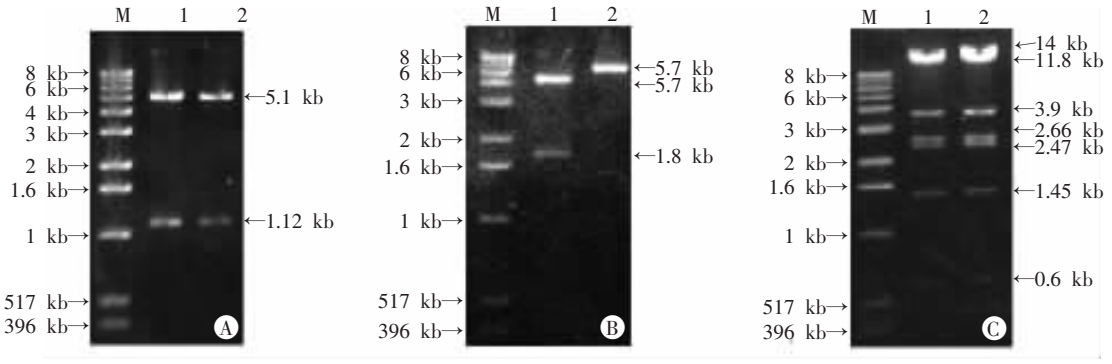
1.6 流式和免疫组化检测

收集培养的第 3 代 MSCs 细胞,PBS 洗 2 次后 PBS 重悬,分别加入 CD16、CD29、CD34、CD44、CD45、CD106 和 HLA-DR 等单克隆抗体,4 ℃孵育 30 min 后 PBS 洗涤 3 次,加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)或藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的小鼠抗人 IgG,室温下避光反应 30 min,PBS 洗 2 次,PBS 重悬,流式细胞仪检测细胞标志分子。同时用 PBS 代替小鼠抗人 IgG 作空白对照。进行免疫组化检测时,分别将对照组及实验组的细胞爬片,4% 多聚甲醛固定。0.3% Triton X-100 孵育 10 min, 5% 牛血清白蛋白封闭 30 min,分别加入相应的一抗(鼠抗人 PDX1、兔抗人 NKX6.1,4 ℃孵育过夜后,再加入相应 HRP 标记的二抗,DAB 显色以检测细胞 PDX1 和 NKX6.1 的表达。

2 结果

2.1 重组腺病毒质粒的鉴定

*Bgl*Ⅱ+*Eco*RⅠ酶切 pShuttle-GFP-CMV-NKX6.1,阴性克隆为 1 条 5.1 kb 带;阳性克隆有 1.12 kb 和 5.1 kb 2 条带;*Bgl*Ⅱ酶切 pShuttle-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 质粒,阴性克隆仅有 1 条 5.7 kb 带,阳性克隆存在 1.8 kb 和 4.6 kb 2 条带;*Xho*Ⅰ酶切 pADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1,其中阳性克隆有 14、11.8、3.9、2.66、2.47、1.45 kb 和 0.6 kb 共 7 条带,而阴性克隆只有 14、11.8、4.0、2.47、1.45 kb 和 0.6 kb 共 6 条带。所有质粒酶切结果均与理论预期一致,表明 PDX1 与 NKX6.1 片段已成功插入 pADxsi 载体中,具体酶切结果如图 1。测序结果与人



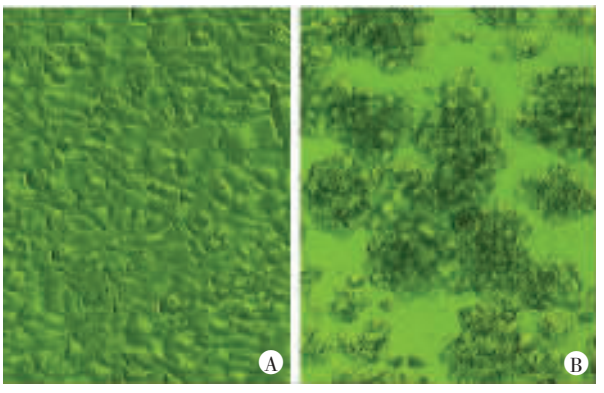
A：*Bgl*Ⅱ＋*Eco*RⅠ酶切 pShuttle-GFP-CMV-NKX6.1　M：1 kb DNA 标准；1、2：阳性克隆；B：*Bgl*Ⅱ酶切 pShuttle-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 M：1 kb DNA 标准；1：阳性克隆；2：阴性克隆；C：*Xho*Ⅰ酶切 pADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1　M：1 kb DNA 标准；1、2：阳性克隆

图1　构建载体酶切鉴定结果

NKX6.1（1.12 kb）和 PDX1（0.87 kb）等目的基因 cDNA 序列完全一致，且连接正确。

2.2　重组腺病毒的产生和扩增

*Pac*Ⅰ酶切线性化的 pADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 重组腺病毒质粒经脂质体 Lipofectamine 2000 转染 293 细胞后 72 h，开始出现病变效应，细胞变圆或出现葡萄状、核浓缩、脱落，出现病毒噬斑；5 d 后细胞全部悬浮，收集液体，见图 2。作对照用的空载体病毒 Adxsi-CMV-GFP 转染后，293 细胞内 24 h 后即开始表达报告基因 GFP；3 d 后细胞出现病变效应。



A：转染 3 d；B：转染 4 d

图2　普通光镜绿色滤片观察重组腺病毒质粒 pADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 转染 293 后细胞形态（×200）

2.3　腺病毒滴度测定

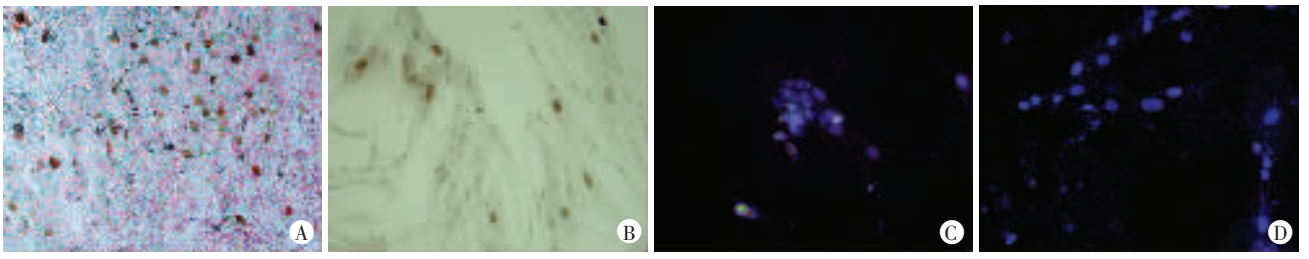
通过包装与扩增后，得到重组腺病毒 ADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 的滴度为 3.5×10^9 pfu/ml；使用同样的方法测定对照组，空载腺病毒 ADxsi 的滴度为 4.0×10^9 pfu/ml。

2.4　流式检测细胞表面标志

FL-MSCs 不表达造血细胞标志 CD15、CD16、CD19、CD34 和 CD45；CD29（β12 整合素）、基质受体 CD44（透明质酸受体）和 CD106 的阳性率分别为 97.7%、95.5% 和 96.8%，表明 FL-MSCs 是区别于人胎肝中造血细胞的另一类细胞。另外，人胎肝间充质样干细胞不表达与 GVHD（移植物抗宿主病）相关的肝组织相容抗原及其共刺激因子，其中 HLA-DR 阳性率为 1.3%，CD80、CD40 和 CD86 的阳性率分别为 0.9%、1.0% 和 0.7%，说明其免疫原性较低。

2.5　镜下检测细胞形态与相关分子表达

从第 2 代后，FL-MSCs 呈典型的长梭形，呈漩涡状或放射状平行排列（图 3A）；ADxsi-GFP-CMV 空病毒感染后 24 h 即可观察到 GFP 表达（图 3B）。免疫细胞化学染色与间接荧光分别证实 ADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 腺病毒以 MOI = 100∶1 感染目的细胞 24 h 后实验组 FL-MSCs 的细胞核中即可检测到 PDX1 与 NKX6.1 蛋白开始表达；从图 3C、D 可以看出，PDX1（CY5）与 NKX6.1（FITC）是在相同的细胞核中表达，但部分细胞核中 PDX1 表达相对较高。

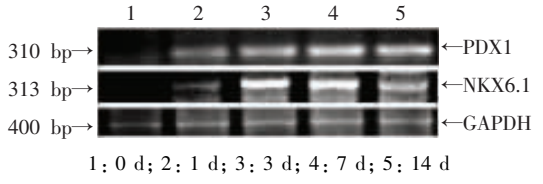


A、B：免疫组化分别检测转染空病毒与 ADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 腺病毒后目的分子 PDX1 的表达结果；C、D：间接荧光分别检测转染空病毒与 ADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 腺病毒后目的分子 PDX1 与 NKX6.1 的表达结果　PDX1 为 CY5 标记，NKX6.1 为 FITC 标记

图3　转染空病毒与 ADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 腺病毒后 FL-MSCs 相关因子的表达（×400）

2.6 RT-PCR 检测结果

感染 Adxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 的 FL-MSCs 于 24 h 后至 2 周均可检测到转录因子 PDX1 与 NKX6.1 基因表达。见图 4。



1: 0 d; 2: 1 d; 3: 3 d; 4: 7 d; 5: 14 d

图 4 RT-PCR 检测 FL-MSCs 诱导后不同时间 PDX1 和 NKX6.1 mRNA 的表达

3 讨论

如何获得更纯而且更具分化潜能的 MSCs,并对其进行重新编程,使之定向分化为目的细胞成为医学的热点之一。胎儿肝脏中存在数量丰富的 MSCs,但同时也含有多种其他细胞成分如成纤维细胞、造血干细胞、各种血细胞等,故需尽可能纯化 FL-MSCs,以利于它的应用。目前对于胎肝中 MSCs 的分离纯化方法没有一致方案,有些方法还相当繁琐,不利于 MSCs 的标准化及推广[7,8]。

我们通过联合应用 Fincoll 与差速贴壁法,连续传数代后,可成功获取纯度较高的 FL-MSCs 基本特征为:贴壁生长,成纤维细胞样外观,细胞沿长轴生长,成单层放谢状或旋涡状排列;高表达 CD29、CD44 与 CD106,极低表达 CD16、CD19、CD34、CD45 和 HLA-DR。MSCs 表达的分子 CD44 是透明质酸酶/纤维结合蛋白受体,参与细胞黏附、增殖和迁移[9-12]。流式细胞仪检测 FL-MSCs 的 CD29、CD44、CD106 阳性表达率分别为 98.3%、98.7%、98.1%;而 CD14、CD34、CD45、HLA-DR 阳性表达率均低于 2%,与文献报道一致[9-12],符合 MSCs 免疫表型特征和干细胞的基本特征。

近年研究发现 MSCs 不仅具有多向分化潜能,还易于外源基因转染并能稳定表达外源基因;但我们先前构建的真核表达质粒转染 FL-MSCs 细胞的效率异常低下,远远达不到对其进行重新编程的条件;而腺病毒(ADV)载体是能高效表达外源基因的转移载体[12-14],本实验在筛选腺病毒载体时,发现腺病毒 5 型(AD5 型)对 FL-MSCs 具有较高的感染效率,可达到 90% ~95% 左右,可满足我们下游研究外源目的基因生物学功能的基本要求,因此本研究选用了 AD5 作为本研究目的基因载体。

通过酶切与酶连同源重组法,构建重组的 PDX1 与 NKX6.1 双基因表达腺病毒载体(pAd5-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1),首先将目的基因 NKX6.1 亚克隆入穿梭载体 pShuttle-CMV-GFP 的多克隆位点,后用 PDX1 基因片段替换 GFP 基因,两目的基因分别位于双基因表达腺病毒载体 pAd5 的两个 CMV 启动子下游;进一步酶切下穿梭载体中含目的基因的片段酶连到腺病毒 pADxsi 骨架载体上;脂质体法转染 293 细胞,在 293 细胞成功进行包装和扩增;于转染后 6 d 细胞开始变圆、脱落,即出现所谓的细胞病变效应(CPE),表明质粒转染成功并在 293 细胞内成功包装。7 d 后收获病毒,取 1/3 ~1/2 第 1 代病毒上清液再转染 50% ~70% 汇合的 293 细胞,再转染 3 ~4 d 即可出现明显细胞病变。重复上述过程 3 ~4 次即可获得大量具有稳定感染性的重组腺病毒 ADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1。

293 细胞是由人胚胎肾细胞经 AD5-DNA 片段转染后发生转化而形成,它基因组中整合了 E1 区片段[15,16],在病毒感染后,其 E1 区基因片段与 E1 区缺失腺病毒互补,从而启动腺病毒自我复制能力,包装形成活性病毒颗粒 ADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1。在病毒包装与扩增过程中需要注意的是:293 细胞株对细胞密度比较敏感,当细胞密度超过 70% 时,一些细胞可能会丢失它们的表型而失去包装病毒的能力。因此在培养时选择合适的细胞密度有助于病毒生产。293 细胞在健康状态时呈拉网状并贴壁形成单层细胞,随着病毒的增殖,细胞变圆脱落,据此,可以大致判断重组腺病毒载体在 293 细胞中的包装情况。在 293 细胞中进行大量扩增后至第 4 代腺病毒,病毒滴度达 3.8×10^9 pfu/ml,经氯化铯密度梯度离心纯化后,病毒滴度为 2.1×10^{11} pfu/ml,已能满足本实验需要。

经过酶切与 PCR 鉴定表明该重组腺病毒载体含有目的基因 PDX1 与 NKX6.1 片段,进一步进行测序表明载体含有两个目的基因,且插入的顺序完全正确。为进一步证实活性病毒 ADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 能高效感染 FL-MSCs 及目的基因在 FL-MSCs 内稳定表达,本研究通过活性病毒 ADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 感染 FL-MSCs 后,通过 RT-PCR、免疫细胞化学与间接荧光法等证实,重组腺病毒 5 型 ADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 对 FL-MSCs 细胞具有很高的感染力,MOI 为 100 时有 90% 以上的细胞被感染,说明构建的 ADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 重组腺病毒对 FL-MSCs 感染性强;同时 PDX1 与 NKX6.1 目的基因在 FL-MSCs 内高效而且稳定表达,且其表达产物能特异地定位于细胞核内,提示所构建的腺病毒 ADxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 具有特定的生物学活性,可以高效感染目的细胞。这为进一步研究 PDX1 与 NKX6.1 目的基因对 FL-MSCs 重新编程,诱导 FL-MSCs 定向分化发育等生物学功能等方面的变化奠定了良好的基础。

参考文献：

[1] Hald J, Sprinkel A E, Ray M, *et al*. Generation and characterization of Ptf1a antiserum and localization of Ptf1a in relation to Nkx6.1 and Pdx1 during the earliest stages of mouse pancreas development[J]. J Histochem Cytochem, 2008, 56(6): 587-595.

[2] Vedtofte L, Bodvarsdottir T B, Karlsen A E, *et al*. Developmental biology of the Psammomys obesus pancreas: cloning and expression of the Neurogenin-3 gene[J]. J Histochem Cytochem, 2007, 55(1): 97-104.

[3] Babu D A, Chakrabarti S K, Garmey J C, *et al*. Pdx1 and BETA2/NeuroD1 participate in a transcriptional complex that mediates short-range DNA looping at the insulin gene[J]. J Biol Chem, 2008, 283(13): 8164-8172.

[4] Heller R S, Jenny M, Collombat P, *et al*. Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development[J]. Dev Biol, 2005, 286(1): 217-224.

[5] Ye D Z, Tai M H, Linning K D, *et al*. MafA expression and insulin promoter activity are Induced by nicotinamide and related compounds in INS-1 pancreatic beta-cells[J]. Diabetes, 2006, 55(3): 742-750.

[6] Serafimidis I, Rakatzi I, Episkopou V, *et al*. Novel effectors of directed and Ngn3-mediated differentiation of mouse embryonic stem cells into endocrine pancreas progenitors[J]. Stem Cells, 2008, 26(1): 3-16.

[7] Ling L, Nurcombe V, Cool S M. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells[J]. Gene, 2009, 433(1-2):1-7.

[8] Kolonin M G, Simmons P J. Combinatorial stem cell mobilization[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(3):252-253.

[9] 王多，张雷，邵素霞，等. connexin43基因体外转染大鼠L6骨骼肌成肌细胞的研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(19)：1821-1823.

[10] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, *et al*. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells[J]. Nature, 2008, 455(7213): 627-632.

[11] 张卫泽，樊艳，陈永清，等. 血管紧张素Ⅱ诱导成人脂肪间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(19)：1795-1798

[12] 王磊，吴绮思，罗春丽，等. hepaCAM基因对膀胱癌细胞体外生物学的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(21)：2051-2054.

[13] Veronika S. Urbán, Judit Kiss, János Kovács, *et al*. Mesenchymal Stem Cells Cooperate with Bone Marrow Cells in Therapy of Diabetes[J]. Stem Cells, 2008, 26(1): 244-253.

[14] Dong Q Y, Chen L, Gao G Q, *et al*. Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat[J]. Clin Invest Med, 2008, 31(6): E328-E337.

[15] 闫国和，杨余亮，侯爱莲，等. PDGF-A基因逆转录病毒载体的构建及其在猪骨髓间充质干细胞中表达的研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(21)：2024-2028.

[16] Boumaza I, Srinivasan S, Witt W T, *et al*. Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained 0normoglycemia[J]. J Autoimmun, 2009, 32(1): 33-42.

（收稿：2009-08-01；修回：2009-10-07）

（编辑 张 维）

（上接341页）

2 讨论

无动性缄默症又名Monte-Cristo综合征，无皮质综合征，昏迷-觉醒综合征，由Cairns先在1941年报道。无动性缄默主要表现为患者对外界刺激无意识反应，四肢不能动，出现不典型去脑强直姿势，肌肉松弛，无锥体束征，无目的睁眼或眼球运动，觉醒-睡眠周期保留或过度睡眠，伴自主神经功能紊乱，如体温高、心律或呼吸节律不规则、多汗、尿便潴留或失禁[1]。无动性缄默症可分为两型，损害主要位于前额叶-边缘系统者为Ⅰ型（AMS-Ⅰ型），由于上行网状激活系统未受破坏，故觉醒-睡眠周期存在，觉醒时眼开闭自如，眼球有追物动作，但毫无表情活动，对疼痛刺激无痛苦表情；损害主要位于中脑-间脑者为Ⅱ型（AMS-Ⅱ型），表现为过度睡眠，刺激后易醒，常伴瞳孔改变，眼球运动障碍及不典型去脑强直等间脑或中脑损害症状。引起无动性缄默症的原因包括中毒、炎性脱髓鞘、双侧后循环血管闭塞、药物等[2]。本例患者症状及体征均符合无动性缄默症Ⅰ型的表现，故诊断为无动性缄默症。MRI结果显示双侧脑室扩大提示白质萎缩（图1A），异常高信号均在白质区域（图1B），故其结构损伤位于广泛大脑白质，结合患者长期大量饮酒史，考虑其为慢性酒精损害（如酒精所致神经系统营养障碍、酒精代谢产物等）引起。单侧局限性脑萎缩引起无动性缄默症可能性小，考虑广泛性脑白质病变（包括胼胝体）引起本症。对于广泛脑白质病变为何引起无动性缄默症的原因尚不清楚，由于大脑白质由神经纤维及支持组织构成，若出现病变多表现为智能、精神障碍，如皮层下动脉硬化性脑病。胼胝体位于大脑半球纵裂的底部，连接左右两侧大脑半球的横行神经纤维束，对两侧大脑半球间信息起传导作用，病变时同样表现为偏执、抑郁、情感淡漠、记忆缺失等精神智能障碍，患者损害部位主要为广泛白质区域，包括皮质下及室周白质、胼胝体等部位，而中脑、间脑及大脑皮质未见明显病灶，与传统无动性缄默病变部位（前额叶-边缘系统或中脑、间脑）有所不同，可能与损害了前额叶-边缘系统-中脑网状结构上行激活系统与皮质的联系纤维有关。目前国内外报道该症的病变部位有双侧前扣带回、额叶、间脑、中脑等，但均认为其基本机制为中脑、间脑网状结构及边缘系统相关结构的损害。

患者入院后经积极治疗1个月，疗效不佳，提示预后不良，最近有报道奥氮平注射治疗本病有一定疗效[3]，但需多中心、随机对照临床试验证实。

参考文献：

[1] Shetty A C, Morris J, O'Mahony P. Akinetic mutism--not coma[J]. Age Ageing, 2009, 38(3): 350-351.

[2] Cavanna A E, Bertero L, Cavanna S, *et al*. Persistent akinetic mutism after bilateral paramedian thalamic infarction[J]. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2009, 21(3): 351.

[3] Spiegel D R, Casella D P, Callender D M, *et al*. Treatment of akinetic mutism with intramuscular olanzapine: a case series[J]. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2008, 20(1): 93-95.

（收稿：2009-11-13；修回：2009-12-29）

（编辑 汪勤俭）