论著

文章编号:1000-5404(2012)14-1392-05

慢病毒介导HLA-G转基因小鼠的建立

王露露,刘 勤,周晓杨,刘昌峨,王 勇,魏 泓 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部实验动物学教研室)

[摘要] **目的** 以慢病毒作为载体建立HLA-G转基因小鼠,为研究HLA-G与移植免疫提供模型动物。**方法** 利用FUW载体,构建含有HLA-G编码序列的慢病毒表达载体FUW-HLA-G。用磷酸钙沉淀法将包装质粒psPAX2、PMD2.G与重组慢病毒载体质粒FUW-HLA-G共转染293FT细胞,包装成慢病毒。通过同步转染含有绿色荧光标记基因的慢病毒质粒FUGW为参照,测定FUW-HLA-G病毒液的滴度。用显微注射法将浓缩后的病毒液注射至FVB/N小鼠1-细胞期胚胎透明带下,建立HLA-G转基因小鼠。PCR鉴定转基因小鼠的基因整合,用RT-PCR检测转基因在转录水平的表达,用Western blot检测HLA-G蛋白的表达。**结果** 载体*Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ双酶切结果和测序结果显示重组的慢病毒质粒与所设计的序列一致。浓缩和纯化后的病毒液滴度达到10^9 TU/ml以上,符合用慢病毒制备转基因小鼠的要求。PCR筛选出阳性鼠6只,RT-PCR与Western blot检测结果表明HLA-G基因在F0和F1代转基因小鼠中均有表达。**结论** 通过慢病毒介导的基因转移,成功建立了表达人HLA-G蛋白的转基因小鼠,为研究HLA-G的功能及其在器官或组织移植中的效应提供了动物模型。

[关键词] HLA-G;慢病毒;转基因小鼠
[中图法分类号] R-332;R373;R394-33 [文献标志码] A

Preparation of lentivirus-mediated HLA-G transgenic mice

Wang Lulu, Liu Qin, Zhou Xiaoyang, Liu Chang'e, Wang Yong, Wei Hong (Department of Laboratory Animal Science, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To provide the animal model for studying HLA-G and transplantation immunity by generating HLA-G transgenic mice with lentivirus as a vector. Methods A lentivirus expression vector, FUW-HLA-G containing HLA-G encoding sequences, was constructed and 293FT cells were transfected with packaged plasmids (psPAX2 and pMD2.G) and recombinant lentivus vector plasmid FUW-HLA-G, and packed into lentivirus. Synchronically transfected lentivus vector plasmid FUGW containing green fluorescence-marked gene was used as a control. Titer of the FUW-HLA-G viral suspension was measured. The concentrated FUW-HLA-G viral suspension was injected into the vitellary membrane of mice murine 1-cell eggs to generate HLA-G transgenic mice. Genetic interaction in the generated HLA-G transgenic mice was identified by PCR, transcriptional expression level of transgenic gene was measured by RT-PCR and expression of HLA-G protein was detected by Western blotting. Results Double *Bam*HⅠ and *Eco*RⅠ digestion and sequencing showed that the sequences of recombinant lentivirus vector, FUW-HLA-G, were identical with its designed sequences. The concentrated and purified biological titre of FUW-HLA-G viral suspension reached over 1×10^9 TU/ml, which met the requirements of generating lentivirus transgenic mice. Six mice with positive FUW-HLA-G were screened by PCR. RT-PCR and Western blotting showed that the HLA-G was expressed in F0 and F1 transgenic mice. Conclusion Transgenic mice expressing HLA-G are successfully generated by lentivirus mediated gene transfer, which can thus provide an animal model for studying the function of HLA-G and its efficiency in organ or tissue transplantation.

[**Key words**] HLA-G;lentiviral vector;transgenic mice

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30700076). Corresponding author: Wang Yong, Tel: 86-23-68753882, E-mail: yongw7528@gmail.com; Wei Hong, Tel: 86-23-68752330, E-mail: weihong63528@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30700076)
[通信作者] 王 勇,电话:(023)68753882,E-mail:yongw7528@gmail.com
魏 泓,电话:(023)68752330,E-mail:weihong63528@163.com

妊娠过程相当于一次成功的同种异体移植,母胎免疫耐受现象涉及诸多因素,其中具有免疫调控效应的 HLA-G 分子起到了重要作用[1]。人类白细胞抗原-G(HLA-G)是 MHC-Ⅰ类非经典分子。它在正常生理条件下,表达于妊娠期的绒毛外的细胞滋养层、胸腺髓质间上皮细胞、眼球等免疫赦免区;在病理条件下也有一定的表达,如肿瘤组织、病毒侵染细胞、皮肤炎症组织等[2-3]。在移植免疫中,HLA-G 的作用受到越来越多的关注。HLA-G 具有抑制免疫细胞的功能,它能抑制自然杀伤细胞(natural killer cell,NK)的活性、细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte,CTL)介导的细胞裂解以及 T 细胞增殖反应[4],而这些免疫细胞的功能状态决定了移植物的命运。因此,若能建立一个全身正常表达 HLA-G 的转基因动物,则为研究 HLA-G 对移植免疫排斥反应的调控效应提供重要的动物模型。

慢病毒介导的基因转移是目前最有效的转基因动物制备方法之一,并有效应用于不同种属的转基因动物,尤其是转基因大动物的制备[5]。本实验利用慢病毒表达系统,通过构建表达 HLA-G 基因的重组慢病毒载体,建立 HLA-G 转基因小鼠,为后续有关移植免疫的研究提供了重要工具,并为进一步利用慢病毒制备人 HLA-G 转基因猪奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ,NEB 公司产品。Ex *Taq* DNA 聚合酶、T_4 DNA 连接酶、PMD18-T Vector 试剂盒、Prime Script RT-PCR Kit 试剂盒、Wide Range DNA Marker (500 ~ 12 000),TaKaRa 公司。DH5α 感受态细胞、组织 DNA 提取试剂盒、Maker V,北京天根生物技术有限公司。质粒小/中量提取试剂盒、DNA 回收试剂盒,美国 Omega 公司。胎牛血清、小牛血清,杭州四季青生物工程公司。磷酸钙转染试剂为 2 mol/L $CaCl_2$,0.22 μm 滤器过滤后 4 ℃贮存备用;2 × HBS (8.0 g NaCl、0.37 g KCl、201 mg $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$、1.0 g 葡萄糖、5.0 g HEPES 溶于 500 ml 水中,调 pH 值到 7.05,过滤后 4 ℃贮存备用)。293FT 细胞,慢病毒载体质粒 FUGW 和 FUW,慢病毒包装质粒 psPAX2 和 pMD2.G 由本实验室保存。M-2、M-16 小鼠胚胎培养基,购自美国 Chemico 公司。透明质酸酶(美国 Sigma 公司)以 300 μg/ml溶解于 M-2 培养液中。30% 丙烯酰胺溶液、10% 过硫酸铵、TEMED 购自上海生物工程有限公司。HLA-G 抗体[HLA class Ⅰ(YTH862.2); sc-59206]为 SANTA CRUZ 产品。QuickTiter™ Lentiviral Quantitation Kit 购自美国 Cell Biolabs 公司。RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。

1.2 实验动物

近交系小鼠 FVB/N 由第三军医大学实验动物中心提供。

1.3 载体的构建

以包含人 HLA-G 全长 ORF 的质粒(购自广州复能基因公司)为模板,通过设计引物对 HLA-G 编码序列进行扩增。在上、下游引物的 5′末端分别加上 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ酶切位点。上游引物:5′-GCGGATCCACCATGGTGGTCATGGCACCCCGAA-3′(划线部分为 *Bam*HⅠ酶切位点);下游引物:5′-GCGAATTCCTAATCTGAGCTCTTCTTC-3′(划线部分为 *Eco*RⅠ酶切位点),引物由上海生物工程有限公司合成。用 Ex *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,反应体系为 20 μl,反应程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s;55 ℃ 30 s;72 ℃ 90 s;30 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物经 DNA 回收试剂盒回收后,用 PMD18-T Vector 试剂盒 TA 克隆,转化至 DH5α 感受态细胞中,挑选阳性克隆,提取重组质粒 PMD18T-HLA-G 并测序验证。用 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ分别双酶切 PMD18T-HLA-G 重组质粒和慢病毒载体质粒 FUW,回收 FUW 的 9 194 bp 片段和 HLA-G 的 1 026 bp 片段。用 T_4 DNA 连接酶将 FUW 和 HLA-G 回收的片段连接重组,将重组产物转化至感受态细胞,获得 HLA-G 慢病毒表达重组载体 FUW-HLA-G。

1.4 慢病毒的包装

慢病毒的包装参照文献[6]进行。进行细胞转染前 1 d,在 10 cm 培养皿中铺(2 ~ 3) × 10^6 293FT 细胞;第 2 天观察细胞生长情况,在到达 60% ~ 70% 汇合时开始转染。将 6 μg 质粒 PMD2.G、15 μg 质粒 psPAX2 和 20 μg FUW-HLA-G 质粒混匀于无菌去离子水中至终体积 1 095 μl;再加入 2 mol/L 的 $CaCl_2$ 155 μl 和 2 × HBS 1 250 μl,边滴加边混匀,滴加完毕后静置1 ~ 2 min,待磷酸钙沉淀形成。之后轻轻滴加到含有 293FT 细胞的 10 cm 培养皿中;培养 7 ~ 11 h 后吸去上清,加入 10 ml 新鲜的含 10% 小牛血清的 DMEM,继续培养;在 48 h 后收集上清,1 000 r/min 离心 10 min,用 0.45 μm 滤器过滤;把含有重组慢病毒的过滤液以 20 000 × *g* 离心 6 h,弃去上清,用 HBSS 重悬沉淀;将重悬液置于含有 20% 蔗糖的 HBSS 溶液上 50 000 × *g* 离心 2 h,弃去上清;用适量 HBSS 重悬沉淀后,分装并存放于 -70 ℃备用。同时将含有绿色荧光蛋白标记基因的慢病毒载体质粒 FUGW 按照上述方法同时进行包装作为对照。最后,通过 QuickTiter™ Lentiviral Quantitation Kit 试剂盒分别检测 FUW-HLA-G 和 FUGW 病毒悬液的物理滴度,通过细胞流式分析(FACS)检测 FUGW 慢病毒悬液的生物滴度。用两种病毒物理滴度的比值乘以 FUGW 病毒的生物滴度,即可较准确地估算出重组慢病毒 FUW-HLA-G 的生物滴度,公式如下:FUW-HLA-G 生物滴度(TU/ml) = (FUW-HLA-G 物理滴度/FUGW 物理滴度) × FUGW 生物滴度。

1.5 制备转基因小鼠

转基因小鼠的制备参照文献[7]进行。取 4 ~ 6 周龄性成熟的 FVB/N 雌鼠,腹腔注射 PMSG 和 HCG 进行超数排卵后得到 1-细胞受精卵。利用显微操作仪将浓缩后的重组慢病毒悬液注入受精卵的卵周隙,以实现慢病毒对胚胎细胞的感染。注射后第 2 天,选取分裂良好的 2-细胞胚胎移植于假孕母鼠输卵管内[8]。

1.6 基因组 DNA 的提取和 PCR 鉴定

剪取 0.5 cm 长的小鼠尾巴组织,用组织 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,PCR 法对转基因小鼠进行阳性筛选。PCR 检测上游引物序列为 5′-TGACTGGTATTCTTAACTATGTT-

GCTCC-3′,下游引物序列为5′-AGGGAGATCCGACTCGTCTGA-3′,产物长度为537 bp。反应条件为:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s;60 ℃ 30 s;72 ℃ 60 s;30个循环;72 ℃ 5 min。

1.7 RT-PCR检测FUW-HLA-G载体的表达

分别取3只F0代和F1代阳性转基因小鼠的背部皮肤各1 cm^2,经液氮充分研磨后,用Trizol提取小鼠皮肤RNA,再用Prime Script RT-PCR Kit试剂盒反转录为cDNA。然后以cDNA为模板进行PCR,引物序列和反应条件同1.6。

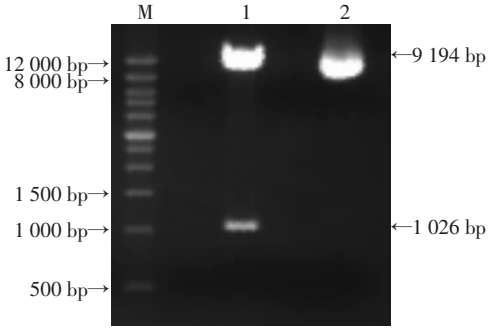
1.8 Western blot检测

参照文献[9]进行。分别提取3只F0代和F1代阳性转基因小鼠的背部皮肤各1 cm^2,提取总蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,将蛋白条带转移到NC膜上,置于5%的脱脂奶粉封闭液中于37 ℃温育2 h,之后加入稀释的大鼠抗人HLA-G多克隆抗体(1∶200),4 ℃孵育过夜,用PBST洗膜4次,每次10 min。然后加入1∶20 000辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠IgG多克隆抗体,室温下于摇床孵育1 h。弃去二抗,加3 ml PBST,上摇床洗涤,洗膜4次,每次5 min。将膜置于化学发光剂中,用X线胶片曝光。

2 结果

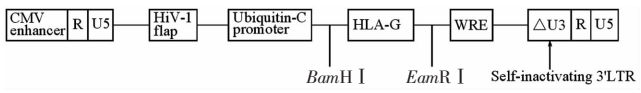
2.1 FUW-HLA-G慢病毒表达载体的鉴定与测序

用*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ双酶切鉴定FUW-HLA-G慢病毒载体,得到约为9 194 bp和1 026 bp两个片段(图1),与预期结果相符合。将慢病毒载体FUW-HLA-G送至上海生物工程有限公司测序,结果与设计一致(图2)。



M:Wide Range DNA标准;1:*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ双酶切FUW-HLA-G结果;2:FUW-HLA-G质粒

图1 FUW-HLA-G慢病毒载体的鉴定



主要元件有Flap-1:来自HIV-1基因组,可提高原病毒整合率以及病毒滴度;WRE:转录后调控元件(来自Wooduck virus基因组,可提高转基因表达水平);Ubiquitin-C promoter:泛素基因启动子序列,广泛性表达的非特异性启动子;HLA-G:编码序列

图2 FUW-HLA-G慢病毒载体结构图谱

2.2 慢病毒载体的制备和滴度的测定

因为本实验构建的载体不含有标记基因,为了更准确地测定重组慢病毒的滴度,我们将含有绿色荧光蛋白标记基因的慢病毒载体FUGW和无标记基因的重组慢病毒载体FUW-HLA-G同步进行包装。感染48 h后,在荧光显微镜下观察到含有绿色荧光标记基因的细胞大量表达绿色荧光蛋白,转染的效率85%以上(图3)。用浓缩后的FUGW病毒悬液稀释1 000倍后转染293FT细胞,通过流式细胞仪分析荧光细胞百分比,获得含FUGW慢病毒载体的病毒悬液的生物滴度。利用QuickTiter™ Lentiviral Quantitation Kit试剂盒,通过酶联免疫吸附实验(ELISA)检测慢病毒标志性外壳蛋白P24的表达含量,分别得到FUW-HLA-G和FUGW病毒液物理滴度。计算FUW-HLA-G慢病毒悬液的生物滴度为(0.986 ~ 3.429) × 10^9 TU/ml,达到10^9 TU/ml水平,能满足慢病毒感染小鼠胚胎的要求。

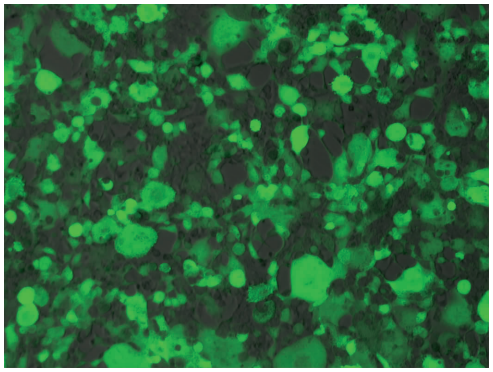


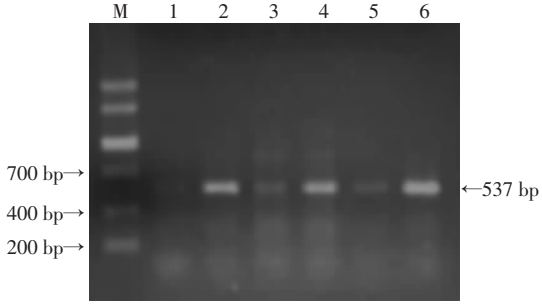
图3 慢病毒载体FUW-HLA-G转染后病毒包装细胞荧光显微镜观察 (×100)

2.3 转基因小鼠的制备与鉴定

通过显微注射仪将浓缩后的病毒液注入到小鼠1-细胞受精卵卵周隙,共注射169枚受精卵,有143枚发育至2-细胞,将2-细胞期的受精卵移植到5只假孕母鼠的输卵管内,其中有3只怀孕,共产仔14只。利用小鼠尾部组织的基因组DNA为模板,用针对慢病毒载体中WRE元件的引物进行PCR检测,PCR产物的预期大小为537 bp。结果表明,14只小鼠中有6只小鼠为PCR阳性。

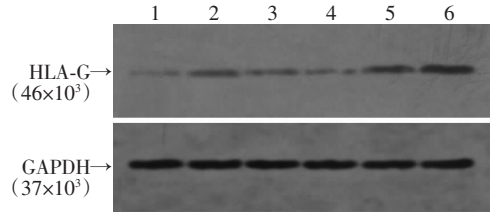
2.4 转基因小鼠表达检测

为了检测转基因小鼠中HLA-G基因的表达,分别提取3只F0代和3只F1代转基因阳性鼠的皮肤RNA。通过RT-PCR检测FUW-HLA-G慢病毒载体在mRNA水平上的表达,结果发现6只转基因阳性小鼠中均有HLA-G基因的表达(图4)。为在蛋白水平检测HLA-G基因在转基因小鼠中的表达,提取相同小鼠的皮肤总蛋白,利用大鼠抗人HLA-G多克隆抗体为一抗,进行Western blot检测,并以GAPDH基因的表达为内参照,结果表明6只转基因阳性小鼠中均有HLA-G蛋白的表达(图5),但个体之间的蛋白表达水平存在一定的差异。



M:标准;1 ~ 3:F0代小鼠;4 ~ 6:F1代小鼠

图4 RT-PCR检测转基因小鼠皮肤中HLA-G基因的表达



1、2、3:F0 代小鼠;4、5、6:F1 代小鼠

图 5 Western blot 检测转基因小鼠皮肤中 HLA-G 蛋白的表达

3 讨论

自从克隆出 HLA-G 基因后,对 HLA-G 功能及性质的研究日益深入。对于其功能人们已经基本达成共识:HLA-G 是一种免疫耐受分子,无论在母胎界面、肿瘤组织还是在移植物,它的表达都伴随着免疫抑制。HLA-G 属于非经典的 HLA-Ⅰ类抗原,选择性表达于胎儿细胞滋养层[10-11]。HLA-G 抗原是 NK 细胞及 CTL 细胞表面抑制性受体(KIR)的配体[12]。NK 细胞属于淋巴细胞系,具有细胞毒性作用,无需抗原预先致敏就能够自发性杀伤异体(种)移植物。当 HLA-G 抗原与 NK 或 CTL 细胞表面抑制性受体结合后,可向细胞内传递抑制性信号,抑制 NK 或 CTL 的细胞毒性作用[4]。根据这一原理,Sasaki 等[13]利用质粒转染技术将人类全长 HLA-G 基因导入猪动脉内皮细胞,发现表达 HLA-G 的猪内皮细胞成功逃避了人 NK 细胞的杀伤作用。Lila 等[14]在心脏移植研究中发现,表达 HLA-G 的移植物很少出现急性排斥反应,几乎不发生慢性排斥反应。

HLA-G 对移植免疫的调控是一个错综复杂的生理过程,且 HLA-G 蛋白为非水溶性的跨膜分子,为了在动物机体水平研究 HLA-G 对异体(异种)移植免疫排斥反应的调控效应,本实验通过慢病毒介导的转基因技术,成功构建了表达人 HLA-G 基因的转基因小鼠,为通过载体移植模型研究 HLA-G 对异体(种)移植免疫反应的调控效应提供了动物模型。初步表达检测表明,人 HLA-G 基因在小鼠皮肤呈现明显的表达,且 F0 代与 F1 代均呈表达阳性,提示转基因的表达具备可遗传性。由于本实验采用的载体为人泛素 C 基因(human ubiquitin C promoter,hUBC)启动子驱动下的泛表达载体,因此理论上 HLA-G 基因应在转基因小鼠的所有组织中均有表达,但其表达的组织分布需要进一步的实验研究。

HLA-G 是跨膜蛋白分子,其作用靶点为人 NK 细胞,其正常生理性表达部位是人体滋养层细胞。尽管本实验通过转基因技术使其在小鼠全身组织表达,但由于 HLA-G 为跨膜蛋白分子,且其生物学效应有种属限制,因此 HLA-G 转基因小鼠理论上其生长、繁育性能与正常小鼠无显著差异。目前,通过连续 3 代的繁育、饲养,HLA-G 转基因小鼠的生长、发育及繁殖性能无明显可见的异常。当然,HLA-G 蛋白于小鼠全身性表达后其生物学效应及其对小鼠表型的影响有待深入的后续研究。

由 HIV-1(人类免疫缺陷Ⅰ型病毒)逆转录病毒基因组改造而来的慢病毒载体,不但能有效整合于宿主基因组中,还能有效感染处于静息期的非分裂细胞,是迄今为止制备转基因动物最有效的载体系统之一。通过该病毒载体导入的外源基因可在动物体内有效表达,并可稳定传代[15]。2002 年,Lois 等[15]首次报道了慢病毒载体在转基因动物研制中的有效性。鉴于慢病毒载体在转基因动物制备中的有效性,我们实验室建立了慢病毒载体的三质粒包装系统,优化了病毒浓缩技术流程,于 2008 年通过该技术制备了绿色荧光转基因小鼠[16]。将慢病毒悬液通过卵周隙显微注射(PSI)导入动物胚胎的透明带下,以实现慢病毒对胚胎的感染进而获得转基因动物,是目前利用慢病毒制备转基因动物的通用方法。我们的数据及前期研究均表明,通过该途径制备转基因动物的效率与慢病毒的滴度密切相关,只要当病毒悬液的滴度达到 1×10^9 TU/ml 以上时才能高效率地获得转基因动物[16]。由于本实验构建的 FUW-HLA-G 载体不含有标记基因,不能通过细胞流式分析(FACS)直接测定重组慢病毒悬液对细胞的感染能力(即生物滴度 TU)。为了更准确地测定 FUW-HLA-G 慢病毒悬液的生物滴度,我们将含有标记基因的 FUGW 和不含标记基因的 FUW-HLA-G 两个慢病毒载体质粒同步包装成慢病毒颗粒。先利用试剂盒通过 ELISA 反应测定 FUW-HLA-G 和 FUGW 病毒液的物理滴度,然后通过细胞流式分析检测 FUGW 病毒的生物滴度,以此来推算本实验构建的 FUW-HLA-G 病毒的生物滴度。通过这种方法算出的 FUW-HLA-G 病毒液滴度在 1×10^9 TU/ml 以上。通过胚胎透明带注射得到新生仔鼠转基因阳性率为 42.86%(6/14),转基因小鼠的总体研制效率(阳性个体数/注射胚胎总数)达到 3.55%(6/169),与利用通过流式检测具备相近生物滴度的 FUGW 慢病毒制备绿色荧光转基因小鼠的效率相当(首建小鼠阳性率 60.8%,73/120;总体研制效 5.0%,73/1 453)[16-17]。表明,在没有标记基因的情况下,我们用本实验推算病毒滴度的方法可行。

综上所述,HLA-G 是与移植免疫相关的新分子,本实验用慢病毒表达系统,通过构建含有 HLA-G 片段的慢病毒载体,高效地建立了 HLA-G 转基因小鼠。用 PCR 对转基因小鼠基因组 DNA 验证后,又随机对转基因 F0、F1 代的部分阳性鼠的皮肤用 RT-PCR 和 West-

ern blot验证了HLA-G在mRNA和蛋白水平上都有表达,表明我们成功地建立了HLA-G转基因小鼠。对以后研究HLA-G基因和移植免疫提供了动物模型。

参考文献:

[1] Hunt J S, Petroff M G, McIntire R H, *et al*. HLA-G and immune tolerance in pregnancy[J]. FASEB J, 2005, 19(7): 681-693.

[2] Carosella E D, Moreau P, Lemaoult J, *et al*. HLA-G: from biology to clinical benefits [J]. Trends Immunol, 2008, 29(3): 125-132.

[3] Blanco O, Tirado I, Mu oz-Fernandez R, *et al*. Human decidual stromal cells express HLA-G: effects of cytokines and decidualization[J]. Hum Reprod, 2008, 23(1): 144-152.

[4] Morandi F, Raffaghello L, Bianchi G, *et al*. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class Ⅰ-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens[J]. Stem Cells, 2008, 36(5): 1275-1287.

[5] Pfeifer A. Lentiviral transgenesis [J]. Transgenic Res, 2004, 13(6): 513-522.

[6] Tiscornia G, Singer O, Verma I M. Production and purification of lentiviral vectors [J]. Nature Protocls, 2006, 1(1): 241-245.

[7] 纳吉, 格特森斯坦, 文特斯藤, 等. 小鼠胚胎操作实验手册[M]. 孙青原,陈大元,译. 北京:化学工业出版社,2006: 251-256.

[8] Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, *et al*. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors[J]. EMBO Rep, 2003, 4(11): 1054-1060.

[9] Wang Y, Ni Y, Wei H, *et al*. Stable skin-specific overexpression of human CTLA4-Ig in transgenic mice through seven generations[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2006, 38(3): 171-178.

[10] Menier C, Rouas-Freiss N, Favier B, *et al*. Recent advances on the non-classical major histocompatibility complex class Ⅰ HLA-G molecule[J]. Tissue Antigens, 2010, 75(3): 201-206.

[11] Hviid T V F. HLA-G polymorphism, soluble HLA-G and early and late pregnancy complications[J]. J Reprod Immunol, 2011, 90(2): 137.

[12] Apps R, Sharkey A, Gardner L, *et al*. *Ex vivo* functional responses to HLA-G differ between blood and decidual NK cells [J]. Mol Hum Reprod, 2011, 17(9): 577-586.

[13] Sasaki H, Xu X C, Smith D M, *et al*. HLA-G expression protects porcine endothelial cells against natural killer cell-mediated xenogeneic cytotoxicity[J]. Transplantion, 1999, 67(1): 31-37.

[14] Lila N, Carpentier A, Amrein C, *et al*. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance [J]. Lancet, 2000, 355(9221): 2138.

[15] Lois C, Hong E J, Pease S, *et al*. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors[J]. Science, 2002, 295(5556): 868-872.

[16] 刘勤, 张晋宇, 王露露, 等. 慢病毒载体介导的增强型绿色荧光蛋白转基因小鼠的建立[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 885-889.

[17] Wang Y, Song Y T, Liu Q, *et al*. Quantitative analysis of lentiviral transgene expression in mice over seven generations[J]. Transgenic Res, 2010, 19(5): 775-784.

(**收稿**:2011-12-29;**修回**:2012-03-27)

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2012)14-1396-01

54例川崎病患者早期识别与诊断的临床分析

罗晓南[1],刘 凤[2],江 荣[2] (230601 合肥,安徽医学高等专科学校教育教学研究室[1];230601 合肥,安徽省立儿童医院儿科[2])

[**关键词**] 川崎病;临床表现;早期诊断;治疗

[**中图法分类号**] R725.512 [**文献标志码**] B

川崎病(Kawasaki disease,KD)是一种病因不明的以全身血管炎为主要病理改变的急性发热出疹性疾病,临床表现多样,冠状动脉病变(coronaryarterylesion,CAL)是急性期最严重的并发症,也是儿童期获得性心脏病的首要原因[1-5],并且与成年后冠状动脉阻塞和动脉硬化具有一定相关性[2-3]。因此,其早期的识别与诊断有重要的意义。临床上目前有应用常规M型超声以及联合应用定量组织速度成像和组织追踪成像来诊断评价KD[4],但是对基层医院传统的诊断方法仍有一定意义。本研究对我科收治的54例KD患儿临床资料及早期识别诊断进行了分析总结,探讨KD早期诊断的可能性,减少误诊漏诊。对于疑诊KD,争取早期治疗,减少冠脉损害的发生。

1 临床资料

1.1 一般资料

2010年1-12月本院收治KD患儿共54例,均符合日本川崎病研究委员会2002年修订第5版诊断标准[4]。其中男性34例,女性20例。年龄1个月至10岁,中位数2.6岁,其中1~3岁最多见,占本组病例的57.41%。全年均有散发病例,无明显季节差异。主要临床表现见表1。

表1 54例KD患儿的临床表现

临床表现	发生[例(%)]	出现时间	持续时间(d)
发热>5 d	54 (100.0)	第1~5天	5~15
多形性皮疹	51 (94.4)	第2~3天	1~5
结合膜充血	52 (96.2)	第2~3天	2~5
口腔黏膜改变	53 (98.1)	第2~3天	5~13
指(趾)脱皮	39 (72.2)	第7~14天	5~10
颈部淋巴结肿大	53 (98.1)	第1~3天	7~14
肛周潮红脱皮	23 (42.6)	第2~7天	2~5
卡瘢红	20 (37.0)	第2~3天	7~8

1.2 实验室与辅助检查

实验室检查表明53例(98.1%)患儿出现血沉增快,44例(88.9%)患者出现白细胞数升高,主要为中性粒细胞。其他常

(下转1400页)

[**通信作者**] 罗晓南,E-mail: pfmao@qq.com