论著

文章编号:1000-5404(2013)16-1692-06

肝脏持续过表达 IL-15 对 NK/NKT 细胞和 T 细胞数目和活化状态的影响

殷文伟,童师雯,刘俊英,张琼方,胡怀东 (400010 重庆,重庆医科大学病毒性肝炎研究所)

[摘要] **目的** 研究靶向肝脏过表达细胞因子 IL-15 对机体免疫系统的影响。**方法** 构建 IL-15 重组表达质粒 pLIVE-IL-15,采用高压注射的方式尾静脉注射 C57BL/6 小鼠,ELISA 检测小鼠血清中 IL-15 的表达水平,流式检测小鼠脾脏和肝脏淋巴细胞亚群变化。**结果** 成功构建 pLIVE-IL-15 质粒,pLIVE-IL-15 质粒高压注射小鼠后血清中能检测到IL-15 持续表达。与 pLIVE-EGFP 对照组相比,pLIVE-IL-15 质粒注射鼠天然免疫系统 NK 细胞和 NKT 细胞以及获得性免疫系统的 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞数目均显著增加($P<0.05$)。体内过表达 IL-15 促进 NK 细胞高表达 CD69 和 IFN-γ,而 NKT 细胞活化状态改变不明显,IL-15 能显著诱导 $CD8^+$ T 细胞高分泌 IFN-γ($P<0.05$),而对 $CD4^+$ T 细胞 IFN-γ 分泌影响较小。**结论** pLIVE-IL-15 靶向肝脏后能在体内持续表达,并且能调节天然免疫系统和获得性免疫系统反应。

[关键词] IL-15;免疫系统;肝脏;高压注射

[中图法分类号] R322.47;R392.12;R392.2 [文献标志码] A

Effect of persistent over-expression of IL-15 in liver on number and activation state of NK/NKT cells and T cells in mice

Yin Wenwei, Tong Shiwen, Lin Junying, Zhang Qiongfang, Hu Huaidong (Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effect of persistent over-expression of IL-15 in the liver on immune system. Methods Recombinant plasmid pLIVE-IL-15 encoding IL-15 was constructed, and the plasmid of 10 μg was then delivered into the liver of C57BL/6 mice by hydrodynamic tail vein injection. Serum IL-15 was detected by ELISA in 1 and 3 d, and 1, 2, 3 and 4 weeks after injection. Spleen and liver lymphocytes were analyzed by flow cytometry. Results p-LIVE-IL-15 plasmid was successfully constructed, and hydrodynamic injection of the plasmid pLIVE-IL-15 resulted in a persistent expression of IL-15 in the serum, reaching the peak in 1 week and keeping in a high level till in 4 weeks after injection. Compared with pLIVE-EGFP group, pLIVE-IL-15 treatment significantly increased the numbers of innate immune cells (NK cells and NKT cells) and acquired immune cells ($CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells) significantly ($P<0.05$). *In vivo* over-expression of IL-15 enhanced the expression of CD69 and IFN-γ in NK cells, but had no effect on the activation status of NKT cells. IL-15 dramatically stimulated the production of IFN-γ by $CD8^+$ T cells ($P<0.05$), and mildly affected the intracellular expression of IFN-γ by $CD4^+$ T cells. Conclusion Hydrodynamic injection of the plasmid pLIVE-IL-15 results in a persistent and high-level expression of IL-15 in mouse serum, and modulation in the immune responses of innate and acquired immune cells.

[**Key words**] IL-15; immune system; liver; hydrodynamic injection

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171560). Corresponding author: Hu Huaidong, E-mail: hhd0126@163.com

细胞因子是免疫系统中一类重要的调节因子,具有广泛的免疫调节效应,可用于肿瘤和感染性疾病的免疫治疗。在以往的研究中,人们大多采用对机体注射重组细胞因子的方法来研究细胞因子的免疫学活性或者进行免疫治疗研究,但是这通常需要很多的重组蛋白,比较昂贵且需要多次重复注射。近年来,人们采用高压注射包含细胞因子基因序列的重组质粒实现了小鼠在体表达细胞因子[1-2],但表达时间较短,不能实现在体内持续过表达细胞因子,限制了其长期免疫治疗调节研究。

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171560)

[通信作者] 胡怀东,E-mail:hhd0126@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130428.0819.005.html(2013-04-28)

IL-15是一种多能的细胞因子,对免疫系统的天然免疫细胞和获得性免疫细胞都具有重要调节作用[3-4]。已有研究表明,IL-15在骨髓移植[5]、肿瘤免疫治疗[6]、抗HIV感染过程中均发挥重要的免疫调节作用[3,7]。肿瘤、骨髓移植和HIV感染都是属于慢性疾病,需要长期重复注射IL-15来维持IL-15免疫调节效应,因此,探索体内长期持续表达IL-15的方法对于IL-15用于免疫治疗具有重要意义。本研究通过构建pLIVE-IL-15质粒,尾静脉高压注射小鼠,实现了在体内持续高表达IL-15,并观察其对机体免疫系统的影响,以期为今后临床免疫治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

pLIVE vectors从Mirus公司购买,pLIVE-EGFP质粒由本室构建。IL-15基因表达序列由Barbara K. Felber教授(National Cancer Institute-Frederick,Frederick,Maryland,USA)馈赠。IL-15 ELISA检测试剂盒购于武汉华美公司。DNA重组相关试剂。Pfu DNA *Taq*(2.5 U/μL),*Bam*HⅠ(10 U/μL),*ASC*Ⅰ(10 U/μL),Rapid DNA ligation Kit均为Fermentas公司产品。AxyGen公司小抽质粒试剂盒。Promega公司胶回收试剂盒。流式抗体:FITC-anti-CD4,APC-anti-CD8α,FITC-anti-CD69,PE-anti-NK1.1,PE-anti-IFN-γ,PerCP/CY5.5-anti-CD3,PE/CY7-anti-NK1.1,FITC Armenian Hamster IgG1.λ3 isotype control,PE Rat immunoglobulin G1.κ(IgG1) isotype control,所有抗体均订购于BD Bioscience公司。

1.2 pLIVE-IL-15质粒构建

IL-15基因在体内表达受到多方面调控,简单将IL-15基因表达框克隆到载体中进行体内表达,检测不到IL-15蛋白的产生。Barbara K. Felber教授(National Cancer Institute-Frederick,Frederick,Maryland,USA)实验室对IL-15基因表达框进行了优化调整[8],将小鼠IL-15基因的前导肽区序列换成了小鼠GM-CSF的前导肽区序列,并对IL-15的基因序列作了同义突变,实现了IL-15在体内的过表达。前期研究表明通过对小鼠高压注射包含IL-15目的基因的载体可以实现在体内表达IL-15[8],不过,IL-15在体内的表达是短暂的(只能持续3 d)。我们利用pLIVE-vector质粒能实现目的基因持续表达的特点,将经过优化的IL-15基因表达框克隆插入到pLIVE-vector载体中。我们设计了分别含*ASC*Ⅰ和*Bam*HⅠ酶切位点的引物,*ASC*Ⅰ P1:5′-A*GGCGCGCC*ATGTGGCTCCAGAACCTGC-3′,*Bam*HⅠP2:5′-CGA*GGATCC*TTATCACGACGTGTTGATG-3′,斜体代表内切酶识别位点。再通过PCR的方法从Barbara K. Felber教授提供的载体中扩增出IL-15目的基因。对PCR产物和pLIVE-载体双酶切,接着进行连接、转化等步骤将优化的IL-15表达框插入到pLIVE载体中。送样测序鉴定pLIVE-IL-15质粒是否构建成功。

1.3 pLIVE-IL-15质粒高压注射

将10 μg pLIVE-EGFP/pLIVE-IL-15质粒溶于2 mL PBS溶液,通过尾静脉高压注射C57BL/6鼠(SPF级,雄性,6~8周龄,体质量18~23 g,购于中国科学院上海斯莱克实验动物中心。实验操作按重庆医科大学实验动物条例执行),在不同的时间点收集血清用于检测血清中IL-15含量。

1.4 脾脏和肝脏单个核细胞分离及流式检测

小鼠摘眼球放血后脱臼处死,摘取脾脏,200目筛网研磨过滤,转移至15 mL离心管中,750×*g* 10 min离心收集细胞;1 mL RBC裂解液冰浴裂解红细胞2 min后,10 mL PBS溶液终止裂解反应;750×*g* 10 min离心收集细胞,PBS溶液洗1次,即得到脾脏单个核细胞。小鼠摘眼球放血后脱臼处死,摘取肝脏。剪碎肝脏组织,200目筛网研磨过滤,转至50 mL离心管中;50×*g* 1 min,吸取上层液体,750×*g* 10 min离心后弃上清;2 mL 40% Percoll溶液重悬沉淀,轻加于2 mL 70% Percoll溶液,1 260×*g* 20 min离心,后吸取2层Percoll溶液界面的白细胞层;吸取细胞层至15 mL离心管中,加PBS溶液约满管后1 260×*g* 10 min离心收集细胞,PBS溶液洗1次,收集得到的细胞即为肝脏单个核细胞。封闭:10 μL大鼠血清4 ℃封闭20 min;抗体标记:取适量待测的荧光标记抗体,4 ℃避光标记30 min后,PBS溶液洗1次;检测与分析:200~300 μL PBS溶液重悬标记后的细胞,流式细胞仪检测,WinMDI 2.8软件分析所得数据。

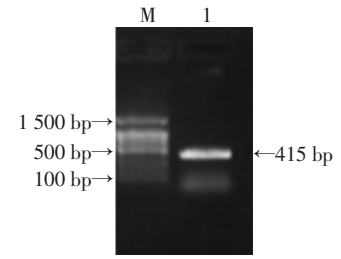
1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0统计学软件对实验数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 pLIVE-IL-15质粒构建

PCR方法鉴定构建的pLIVE-IL-15载体,结果显示IL-15目的基因成功插入到pLIVE载体中(图1)。另外,我们也构建了pLIVE-EGFP对照载体。



M:标准;1:IL-15

图1 PCR方法检测IL-15基因

2.2 pLIVE-IL-15质粒高压注射诱导IL-15持续表达

正常鼠血清中基本检测不到IL-15表达;小鼠高压注射pLIVE-IL-15载体后,血清中IL-15含量显著升高,1周后达到顶峰,检测值约为600 pg/mL,随后逐步下降,稳定在一个比较恒定的水平,我们一直检测到4周,发现血清中仍有较高水平IL-15表达,而对照载体pLIVE-EGFP高压注射后不会显著改变血清中IL-15含量。见图2。

2.3 pLIVE-IL-15质粒持续表达对天然免疫系统的影响

IL-15质粒注射后,小鼠脾脏和肝脏中NK细胞的比例和数目都有大幅度的增长($P<0.05$,图3A、B)。进一步检测发现,NK细胞表面活化标志CD69表达上调(图3C),细胞内IFN-γ分泌增加(图3D)。

对小鼠NKT细胞的检测结果显示:小鼠脾脏和肝脏NKT细胞在高压注射pLIVE-IL-15质粒后数目有大幅度的增长($P<0.05$,图4A),不过,NKT细胞的活化水平(图4B)和IFN-γ(图4C)表达水平并没有增加,这可能与NKT细胞本底活化水平较高有关。

2.4 pLIVE-IL-15质粒持续表达对获得性免疫系统的影响

我们发现IL-15质粒高压注射后,小鼠脾脏和肝脏中$CD4^+$T细胞和$CD8^+$T细胞数目均有显著增长($P<0.05$,图5A、B)。$CD4^+$T细胞IFN-γ的表达在IL-15刺激后只是略有增加(图5C、D),$CD8^+$T细胞分泌IFN-γ的能力要明显高于pLIVE-EGFP对照组($P<0.05$,图5E、F)。

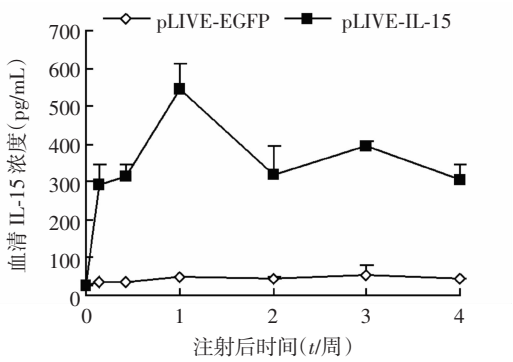
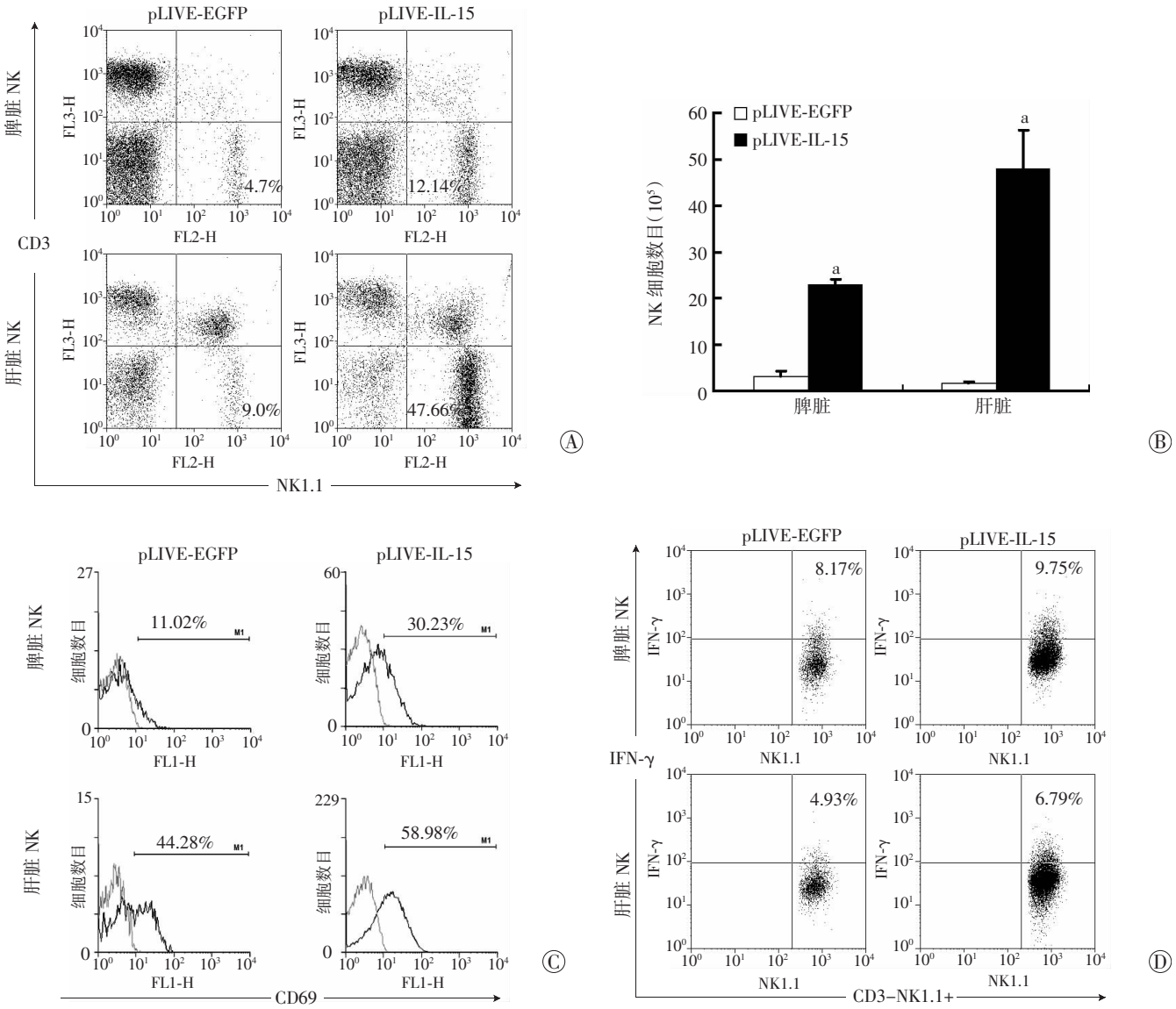
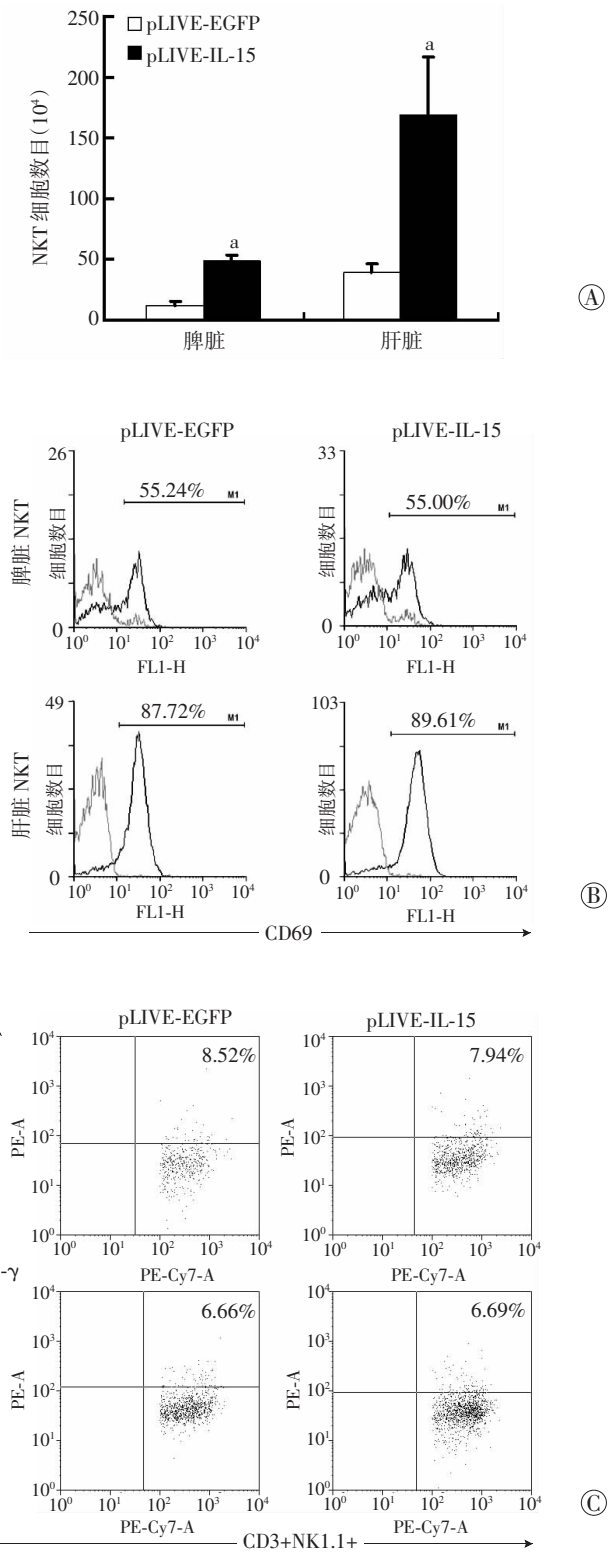


图2 ELISA检测质粒高压注射后小鼠血清中IL-15含量



A:NK1.1+CD3-NK细胞比例;B:NK细胞数对比分析 a:$P<0.05$,与pLIVE-EGFP质粒比较;C:CD69表达;D:NK细胞IFN-γ表达

图3 流式细胞仪检测IL-15对小鼠脾脏和肝脏NK细胞数目和活化状态的影响



A：NK1.1 + CD3 + NKT 细胞数对比分析 a：$P < 0.05$，与 pLIVE-EGFP 质粒比较；B：CD69 表达；C：IFN-γ 表达

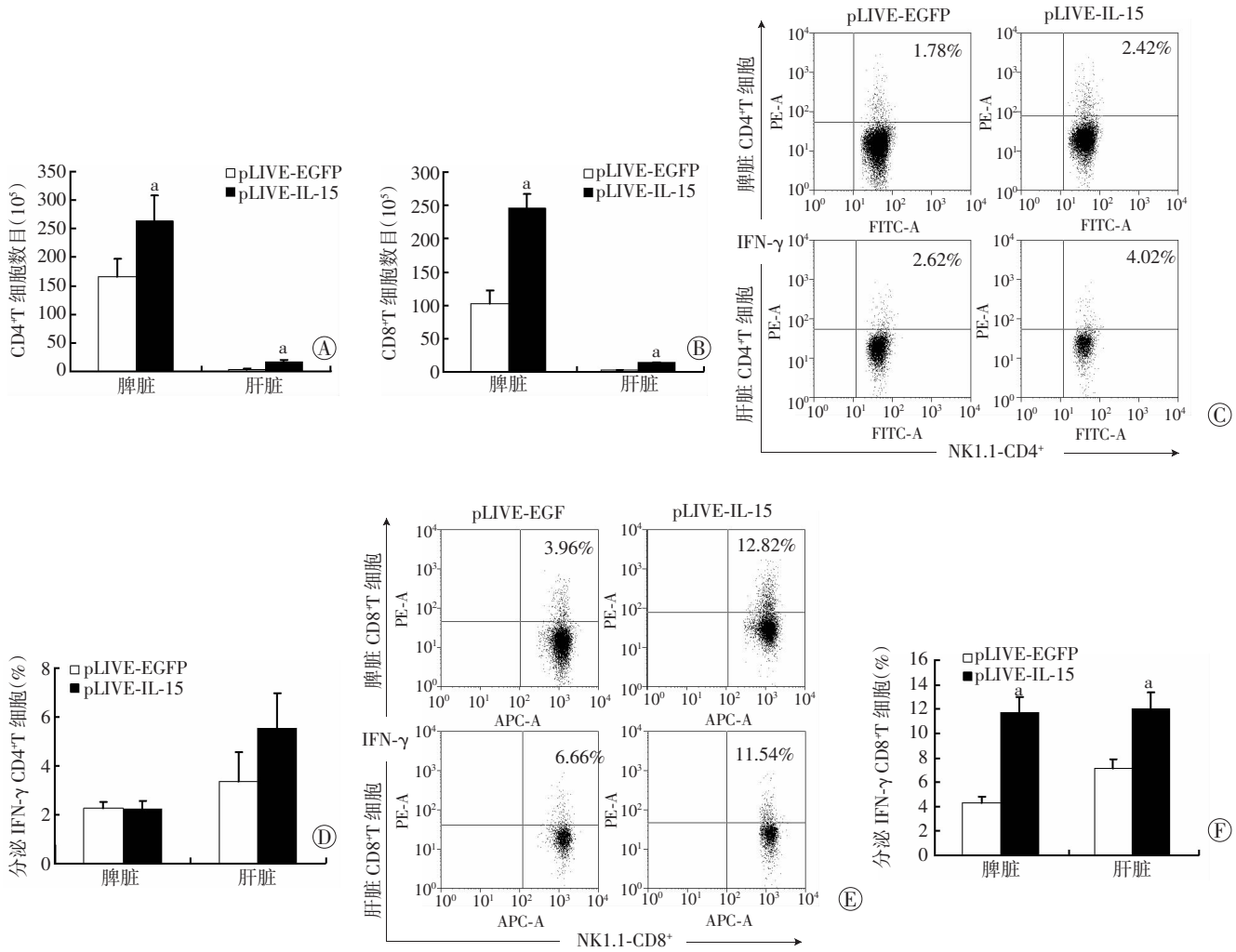
图4 流式细胞仪检测 IL-15 对小鼠脾脏和肝脏 NKT 细胞数目和活化状态的影响

3 讨论

以往大多数的研究均采用对小鼠给予重组蛋白的方式来研究细胞因子的功能，因为细胞因子在血清中半衰期很短并且会被快速清除，所以重复注射细胞因子蛋白不仅昂贵而且很难掌握它的药代动力学规律；另外一种方式就是构建转基因鼠实现细胞因子在体内持续表达，操作起来也比较费时费力。IL-15 mRNA 在很多细胞和组织上均组成型表达，但 IL-15 蛋白表达却受到严格的调控[3, 9]。为了更好地研究 IL-15 在体内的功能，一些实验室构建了优化表达 IL-15 的质粒载体，这些质粒高压注射后能在体内大量表达 IL-15[1, 8]，但 IL-15 表达持续时间比较短，并不适合研究细胞因子对慢性感染疾病的影响。本研究中，我们构建了 pLIVE-IL-15 质粒，我们发现 pLIVE-IL-15 质粒高压注射后能在体内长期表达，4 周后血清中仍能检测到 IL-15 表达。这个结果表明通过高压注射 pLIVE-vector 的方式能够实现体内持续表达有生物学活性的蛋白。本文研究结果提示了以后进行肝脏靶向表达目的蛋白的一种很有效的方式。即可以通过 pLIVE 载体的方式实现包括 IL-15 在内的其他细胞因子在体内持续表达。

细胞因子在体内持续表达，要考虑到它的副作用。很多细胞因子对免疫系统的细胞具有广泛的影响，在体内持续表达可能会严重影响体内的免疫平衡。我们在研究中也发现 IL-15 持续表达导致淋巴细胞大量扩增，脾脏肿大，肝脏组织淋巴细胞增多，甚至有些小鼠会发生死亡。细胞因子在体内持续表达可能也会影响到其受体的表达。细胞因子受体在细胞因子持续刺激下可能会下调表达，进而不会对细胞因子刺激作出反应。在本研究中 IL-15 持续作用是不是导致 IL-15 受体下调还需进一步研究。

前期实验表明 IL-15 的抗病毒能力主要依赖于 NK 细胞[10-11]。本研究中，我们发现 pLIVE-IL-15 质粒高压注射后小鼠脾脏和肝脏中 NK/NKT 细胞均大量扩增。NK 细胞早期活化标志 CD69 和胞内 IFN-γ 在 pLIVE-IL-15 质粒注射后显著上调，这表明 NK 细胞功能得到了增强。不过，pLIVE-IL-15 质粒注射却不能显著促进 NKT 细胞分泌 IFN-γ。最新研究发现，NKT 细胞发育过程中，IL-15 能够促进胸腺 NKT 细胞前体细胞向终末效应 NKT 细胞分化，IL-15 基因缺陷可导致成熟 NKT 细胞功能低下[12]。肿瘤动物模型中 NKT 细胞功能低下，体内过表达 IL-15 能显著提高 NKT 细胞抗



A：CD4⁺T 细胞数对比分析 a：$P<0.05$，与 pLIVE-EGFP 质粒比较；B：CD8⁺T 细胞数对比分析 a：$P<0.05$，与 pLIVE-EGFP 质粒比较；C：CD4⁺T 细胞 IFN-γ 表达；D：CD4⁺T 细胞 IFN-γ 表达；E：CD8⁺T 细胞 IFN-γ 表达；F：CD8⁺T 细胞 IFN-γ 表达对比分析 a：$P<0.05$，与 pLIVE-EGFP 质粒比较

图5 流式细胞仪检测 IL-15 对小鼠脾脏和肝脏 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的影响

肿瘤活性[13]。这些实验表明 IL-15 在 NKT 细胞效应功能获得和恢复中起重要作用。本研究发现 IL-15 并不能进一步显著增强正常机体 NKT 细胞功能，这可能与机体防止淋巴细胞过活化引起自身免疫性疾病相关，其中的负调控机制仍有待深入研究。

IL-15 对 T 细胞自身稳态维持和功能发挥包括 T 细胞增殖，IFN-γ 分泌，效应 T 细胞存活和记忆性 T 细胞产生过程等方面都具有重要作用[3-4]。IL-15 也可以促进活化的 B 细胞增殖和分化[14]。本研究中，我们发现 IL-15 能使体内 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞数目显著增加，上调 CD8⁺T 细胞分泌 IFN-γ，而对 CD4⁺T 细胞分泌 IFN-γ 影响较弱，这可能与之前有研究报道 CD4⁺T 细胞 IL-15 受体表达较少有关。

本研究中，我们发现 IL-15 更多的是扮演免疫细胞“营养因子”的作用，多种免疫细胞在 IL-15 作用下，细胞克隆会大量扩增，但细胞却不会显著活化和过表达效应分子。这提示单独的 IL-15 免疫治疗可能会更好地应用于 HIV 感染以及骨髓移植这样的免疫系统缺陷的疾病，而对一些肿瘤和感染疾病可能更适宜采用 IL-15 与其他具有强烈活化免疫系统的细胞因子如 IL-12、IL-18 联合治疗。

尾静脉高压注射方式虽然可以实现外源基因在肝脏内过表达，但其应用范围较窄，目前主要以小鼠为实验对象。高压注射过程中产生的巨大压力限制了其在临床上的研究推广[15]。基因治疗研究表明腺相关病毒可以携带外源基因感染肝脏，实现外源基因靶向肝脏表达[16]，并且在感染和表达过程中对机体影响较小。进一步实验需要研究携带 IL-15 基因的腺相关病毒感染机体情况及其对机体免疫细胞的影响。

参考文献：

[1] Arina A, Murillo O, Dubrot J, *et al*. Interleukin-15 liver gene transfer

increases the number and function of IKDCs and NK cells [J]. Gene Ther, 2008, 15(7): 473 - 483.
[2] Ortaldo J R, Winkler-Pickett R T, Bere E W Jr, *et al*. *In vivo* hydrodynamic delivery of cDNA encoding IL-2: rapid, sustained redistribution, activation of mouse NK cells, and therapeutic potential in the absence of NKT cells [J]. J Immunol, 2005, 175(2): 693 - 699.
[3] Alpdogan O, van-den-Brink M R. IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency [J]. Trends Immunol, 2005, 26(1): 56 - 64.
[4] Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis[J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24: 657 - 679.
[5] Alpdogan O, Eng J M, Muriglan S J, *et al*. Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation [J]. Blood, 2005, 105(2): 865 - 873.
[6] Waldmann T A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(8): 595 - 601.
[7] Mastroianni C M, d'Ettorre G, Forcina G, *et al*. Teaching tired T cells to fight HIV: time to test IL-15 for immunotherapy? [J]. Trends Immunol, 2004, 25(3): 121 - 125.
[8] Jalah R, Rosati M, Kulkarni V, *et al*. Efficient systemic expression of bioactive IL-15 in mice upon delivery of optimized DNA expression plasmids[J]. DNA Cell Biol, 2007, 26(12): 827 - 840.
[9] Rodrigues L, Bonorino C. Role of IL-15 and IL-21 in viral immunity: applications for vaccines and therapies [J]. Expert Rev Vaccines, 2009, 8(2): 167 - 177.
[10] Gosselin J, Tomolu A, Gallo R C, *et al*. Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response [J]. Blood, 1999, 94(12): 4210 - 4219.
[11] Fawaz L M, Sharif-Askari E, Menezes J. Up-regulation of NK cytotoxic activity *via* IL-15 induction by different viruses: a comparative study [J]. J Immunol, 1999, 163(8): 4473 - 4480.
[12] Gordy L E, Bezbradica J S, Flyak A I, *et al*. IL-15 regulates homeostasis and terminal maturation of NKT cells[J]. J Immunol, 2011, 187(12): 6335 - 6345.
[13] Liu D, Song L, Wei J, *et al*. IL-15 protects NKT cells from inhibition by tumor-associated macrophages and enhances antimetastatic activity [J]. J Clin Invest, 2012, 122(6): 2221 - 2233.
[14] Armitage R J, Macduff B M, Eisenman J, *et al*. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation [J]. J Immunol, 1995, 154(2): 483 - 490.
[15] McKay T R, Rahim A A, Buckley S M, *et al*. Perinatal gene transfer to the liver [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(24): 2528 - 2541.
[16] Hu C, Lipshutz G S. AAV-based neonatal gene therapy for hemophilia A: long-term correction and avoidance of immune responses in mice [J]. Gene Ther, 2012, 19(12): 1166 - 1176.

(**收稿**:2013-02-18;**修回**:2013-04-01)
(编辑 吴培红)

(上接 1691 页)



图 1 先天性皮肤缺损患儿入院时左侧脚踝观察
图 2 先天性皮肤缺损患儿住院治疗 22 d 后左侧脚踝观察

2 讨论

先天性皮肤缺损,又称为皮肤再生不良或先天性皮肤发育不全,是一种罕见的出生时即有的单发或多发的表皮、真皮或直到皮下组织的先天性缺损,病因尚不明确,可能与子宫狭小或胎儿皮肤与羊膜粘连、药物、病毒或毒物有关,也可能与遗传有关[2]。本例患儿表现为双下肢的皮肤缺损,左足面积较大,约占左足 25% 皮肤,患儿父亲有类似患病,可能提示本病与遗传因素有一定关系。该病通过询问病史及细致查体诊断并不困难。

该病目前的治疗主要为积极控制及预防感染,合理处理创面,营养支持,促进创面愈合,预防功能障碍。创面的处理为影响疗程及预后的关键措施,如果处理不当可能影响患儿缺损皮肤愈合,延长疗程,出现并发症,明显增加患者的经济负担。本例患儿病初仅予碘伏消毒、清理坏死组织及无菌纱布覆盖的处理方式使患者创面脓性分泌物迅速增多,此后改变换药方式后取得良好效果。吹氧气可使创面干燥,加强消毒效果,也可减少厌氧菌感染,粒细胞巨噬细胞刺激因子凝胶外敷能更好地促进皮肤的再生,创面周围外涂莫匹罗星可减少局部细菌感染,凡士林纱布性能接近皮脂,可促使创面不浸渍,不干燥,在体表形成适于皮肤和组织生长的环境,促进再生和修复,也可减少再次换药时因粘连引起的出血及再次损伤。该例患儿通过改变创面处理方法后创面愈合良好,皮肤脓性分泌物很快消退,没有再出现局部感染迹象及感染并发症,治疗效果理想。

皮肤为人体天然屏障,新生儿免疫力低下,先天性皮肤缺损极易引起严重感染,局部出现组织溃烂、坏死及全身炎症反应综合征、脓毒症、败血症、严重脱水及感染性休克等严重并发症[3],因此积极有效的控制感染是必要的,而创面的处理也是治疗中重要的环节,同时配合补液营养支持也是促进愈合的有力保障。既往对于创面较大的患者多予植皮的方法处理创面,而近年来也有更多的观点倾向于烧伤湿润处理创面[4]的方法治疗,认为植皮非治疗该病的首选方法[5]。植皮的方式手术创面大、疗程长、费用高,给患儿及家长带来身体及心理上很大的痛苦,新生儿新陈代谢旺盛,组织修复能力强,除了皮损过大、皮损部位特殊血管少、修复能力弱需行植皮治疗,其余可首先考虑予合理清创换药、促表皮生长因子的使用等方法处理创面。

参考文献:

[1] Taifour-Suliman M, Quazi A. Aplasia cutis congenita of the trunk in a Saudi newborn[J]. Br J Plast Surg, 2004, 57(6): 582 - 584.
[2] 杨国亮, 王侠生. 现代皮肤病学[M]. 2 版. 上海: 上海医科大学出版社, 1995: 824 - 825.
[3] Sugiura T, Kouwaki M, Kiyosawa S, *et al*. A case of systemic aplasia cutis congenita: a newly recognized syndrome? [J]. Eur J Pediatr, 2008, 167(4): 409 - 413.
[4] 闫军美, 李三亮, 夏海. 烧伤湿润包扎法治疗新生儿先天性皮肤缺损 3 例[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2011, 25(8): 613 - 614.
[5] 陈建兵, 崔杰, 王顺荣, 等. 新生儿先天性皮肤缺损 17 例[J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23(23): 1826 - 1827, 1829.

(**收稿**:2012-12-21;**修回**:2013-01-31)
(编辑 黄 超)