论著

文章编号:1000-5404(2013)16-1726-05

重组慢病毒介导人凝血Ⅸ因子基因感染HUCMSCs的实验研究

李 文,陈 姝 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院血液科)

[摘要] **目的** 探讨慢病毒介导人凝血Ⅸ因子(human clotting factor Ⅸ,hFⅨ)感染人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells,hUCMSCs)后hFⅨ的表达情况。**方法** 重组构建慢病毒载体GV240-hFⅨ-EGFP。以脂质体介导法共转染293T细胞包装生产慢病毒。以不同感染复数(multiple of infection,MOI)感染hUCMSCs,荧光显微镜观察细胞感染效率,流式细胞仪检测验证。以最适MOI感染hUCMSCs,RT-PCR检测hFⅨ mRNA水平,ELISA检测FⅨ蛋白含量(FⅨ:Ag)及一期法检测FIX凝血活性(FⅨ:C)。**结果** 制备出了滴度为2×10^8 TU/mL的重组慢病毒。MOI=10时能高效感染hUCMSCs,感染效率为(92.92±6.32)%。RT-PCR结果示只有转染组有hFⅨ mRNA转录。感染后1 d,hUCMSCs即可有效分泌hFⅨ,在5 d时达到最高峰,FⅨ:Ag为(87.18±0.86)ng/(10^6·24 h),FⅨ:C为(44.3±3.2)%,高水平分泌可至少持续29 d。**结论** 重组GV240-hFⅨ-EGFP慢病毒感染hUCMSCs后能持续高水平分泌具有凝血功能活性的hFⅨ蛋白。

[关键词] 人脐带间充质干细胞;人凝血Ⅸ因子;重组慢病毒感染

[中图法分类号] R331.1;R373;R394.3 [文献标志码] A

Lentiviral vector mediated human clotting factor Ⅸ gene infects human umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro*

Li Wen, Chen Shu (Department of Hematology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] Objective To determine the expression of human clotting factor Ⅸ (hFⅨ) after the recombinant lentiviral vector containing hFⅨ gene infecting human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs). Methods The lentiviral vector GV240-hFⅨ-EGFP containing hFⅨ gene was recombined and transfected with liposome to 293T cells to produce lentiviral particles. hUCMSCs were infected by the plasmid at different multiples of infection (MOI). Fluorescence microscopy was used to measure the transfection efficiency, and flow cytometry was employed to confirm the infection. Then hUCMSCs were infected by recombinant lentivirus at the optimal MOI. The expression of hFⅨ at mRNA and protein levels and its activity were studied by RT-PCR, ELISA and A phase method, respectively. Results Recombinant lentivirus with a titer of 2×10^8 TU/mL were constructed successfully. When MOI was 10, the infection efficiency of recombinant lentivirus was the highest and reached (92.92±6.32)%. RT-PCR showed hFⅨ gene was only expressed in the hUCMSCs transfected with the lentiviral vector GV240-hFⅨ-EGFP, but not with GV240-EGFP. In 1 d after infection, hUCMSCs effectively expressed hFⅨ, and the expression reached the peak in 5 d after infection. ELISA and A phase method test indicated the peak concentration of hFⅨ reached (87.18±0.86) ng/(10^6·24 h) and the clotting factor activity of hFⅨ reached (44.3±3.2)% respectively at 5 d. This stable expression maintained at a high level until 29 d after infection. Conclusion The hUCMSCs transfected by GV240-hFⅨ-EGFP efficiently express hFⅨ protein at a high level and with biological activity.

[**Key words**] human umbilical cord mesenchymal stem cells; human clotting factor Ⅸ; lentiviral vector transfection

Corresponding author: Chen Shu, E-mail: chenshu921@163.com

血友病B目前尚无治愈的方法[1]。但单基因遗传的生理特性,使其成为基因治疗的理想选择[2]。基因疗法可通过转基因细胞在特定部位持久释放所需蛋

[通信作者] 陈 姝, E-mail:chenshu921@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1424.034.html(2013-03-21)

白,可能是治愈血友病的有效方法。既往体外不同体细胞的人凝血Ⅸ因子(human clotting factor Ⅸ,hFⅨ)基因转导实验验证了FⅨ因子的体外表达[3]。然而,转基因治疗血友病动物的实验结果[4]显示,体内高水平表达的FⅨ因子随着时间的延迟都会出现表达量的下降,其原因主要是基因传递系统自身的低效和基因修饰后细胞,转基因后产物引起的免疫原反应介导表达量的下降[5]。正因如此,我们期望构建一种能够持续高效表达且低免疫原性的基因传递系统。本实验选择体外转染的方法,避免了生理因素的影响,构建携带FⅨ基因的慢病毒,将其体外感染人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs),观察其表达情况,以探讨使用hFⅨ修饰的hUCMSCs作为持续性递送治疗水平的hFⅨ的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒 人脐带间充质干细胞(hUCMSCs,重庆干细胞技术有限公司赠送);293T细胞、质粒pcDNA-hFⅨ和大肠杆菌感受态细胞DH5α由重庆医科大学临床检验诊断实验室保存;慢病毒穿梭质粒GV240-GFP,结构质粒pHelper1.0及包膜蛋白质粒pHelper 2.0购自上海吉凯基因技术有限公司。

1.1.2 主要试剂 *Nhe* Ⅰ和*Eco*RⅠ酶(购自NEB公司,美国);In-Fusion试剂盒(购自clontech公司,美国);FBS(购自HyClone公司,美国);L-DMEM培养基(购自GIBCO公司,美国);RT-PCR试剂盒(购自Fermentas公司,加拿大);Plasmid抽提试剂盒(购自Qiagen公司,德国);hFⅨ-ELISA试剂盒(购自R&D公司,美国);Lipofectamine2000试剂盒(购自Invitrogen公司,美国)。总RNA提取试剂盒、*Taq*酶、dNTP、DNA ladder marker、SYBR Master Mixture、引物(购自TaKaRa公司,日本);乏Ⅸ血浆、正常标准血浆、APTT促凝剂(购自Pacific Hemastasis公司,美国);基因测序均由上海美季生物工程技术服务有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 PCR法获得hFⅨ目的基因 登陆GenBank查询人FⅨ基因(NM-000133),在引物设计中引入*Nhe* Ⅰ、*Eco*RⅠ酶切位点设计相应引物:上游引物5′-ACGAGCTGTACAAGGCTATG-CAGCGCGTGAACATGATC-3′,下游引物5′-ATAAGCTTGATAT-CGAATTCTTAAGTGAGCTTTGTTTTTTCC-3′。以pcDNA-hFⅨ为模板,PCR扩增目的基因。获取的hFⅨ基因片段经*Nhe* Ⅰ、*Eco*RⅠ酶切,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带以胶回收试剂盒回收。

1.2.2 重组慢病毒载体质粒的构建 *Nhe* Ⅰ、*Eco*RⅠ酶分别酶切主载体GV240-EGFP和上述PCR产物。纯化后Infusion试剂盒将回收的酶切PCR产物连接,经大肠杆菌DH5α转化。提取单克隆质粒行PCR鉴定,共挑选4个克隆。引物序列:上游5′-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3′,下游5′-CTATGTTGCTC-CTTTTACGCT-3′。其中PCR鉴定为阳性的克隆命名为GV240-hFⅨ,送上海美季生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.3 重组慢病毒的包装、纯化 Plasmid抽提试剂盒分别提取慢病毒载体质粒GV240-hFⅨ-EGFP、pHelper 1.0、pHelper 2.0。脂质体法介导慢病毒载体GV240-hFⅨ 20 μg、pHelper1.0 15 μg、pHelper 2.0 10 μg三质粒共转染293T细胞,出现强绿色荧光表达并有细胞融合时,收集细胞上清液,按照Plus-20离心超滤装置进行病毒浓缩,获得hFⅨ慢病毒。分装后-80 ℃保存。

1.2.4 重组慢病毒的滴度测定 实时定量PCR(RT-qPCR)测定病毒滴度。10倍稀释法稀释病毒原液直到浓度为10^{-4} TU/mL,检测倍比稀释10倍的5个实验组和1个对照组,通过分析实验组之间Ct值的差异得到滴度值(Ct值差异超过2即差异有显著性)。具体方法:用不同浓度的样本1 μL分别感染4×10^4个293T细胞,4 d后用总RNA提取试剂盒提取样本的总RNA,经反转录合成20 μL cDNA,取其中1 μL,根据YBR Master Mixture试剂盒行实时定量PCR测定。引物设计如下:绿色荧光蛋白(GFP)引物:上游5′-TGCTTCAGCCGCTAC-CC-3′,下游5′-AGTTCACCTTGATGCCGTTC-3′;β-actin引物:上游5′-GGCACCCAGCACAATGAAG-3′,下游5′-GGCCGGACT-CGTCATACTC-3′。

1.3 重组GV240-hFⅨ-EGFP慢病毒感染hUCMSCs及最佳MOI值的确定

hUCMSCs接种于96孔板中,待细胞融合度达到30%时,分别按照感染复数(multiplicities of infection, MOI)0、2、5、10、20、50、100,加入滴度1×10^8 TU/mL的GV240-hFⅨ-EGFP慢病毒液,同时加入polybrene增敏液至终浓度10 μg/mL。感染6 h后全量更换新鲜培养液。感染5 d后荧光显微镜观察荧光效率,流式细胞仪检测验证。以获得最适荧光表达效率的MOI值确立为最佳MOI值。

1.4 重组GV240-hFⅨ-EGFP慢病毒感染hUCMSCs的表达检测

1.4.1 hUCMSCs分组感染 将hUCMSCs分3组接种于6孔板,每孔细胞数5×10^4个,待细胞融合度达到30%时,以最佳感染复数(MOI=10)感染hUCMSCs。GV240-hFⅨ-EGFP组为实验组,同时设立GV240-EGFP空载体组和不加病毒的空白对照组。感染6 h后更换新鲜培养液,5 d后观察荧光,荧光显微镜观察荧光直至感染后29 d。

1.4.2 hFⅨ mRNA的表达鉴定 根据总RNA提取试剂盒分别提取各组细胞总RNA,逆转录成cDNA,设计hFⅨ特异性引物,以β-actin引物为内参,进行RT-PCR检测。hFⅨ引物序列:上游引物5′-ATCACTCAAAGCACCCAATCA-3′,下游引物5′-TAGCACTAAGGGTTCGTCCAG-3′,hFⅨ目的片段342 bp;β-actin引物序列:上游引物5′-GACCCAGATCATGTTTGAGACC-3′,下游引物5′-ATCTCCTTCTGCATCCTGTCG-3′,β-actin片段594 bp。

1.4.3 hFⅨ蛋白量及凝血活性的检测 在取样前1 d,取5×10^5细胞,洗涤2次后重悬于培养基中,24 h后收集上清液1 mL,分别吸取1、2、3、5、7、10、14、19、24、29 d的细胞上清液。ELISA法检测FⅨ:Ag(按试剂盒提供的方法进行);一期法检测FⅨ:C,在BE全自动凝血仪上完成(重庆医科大学附属第二医院检验科协助完成)。以标准品血浆稀释度(因子活性)为横坐标,稀释后血浆分别与乏Ⅸ因子血浆混匀测APTT值为

纵坐标作双对数标准曲线。再以待测样本与乏Ⅸ因子血浆混匀测 APTT 值,计算 hFⅨ活性。

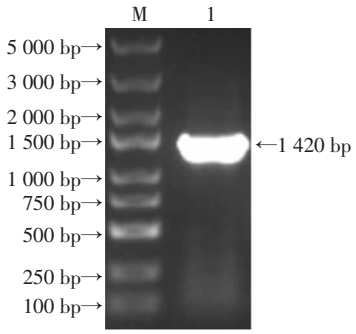
1.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 检验分析。

2 结果

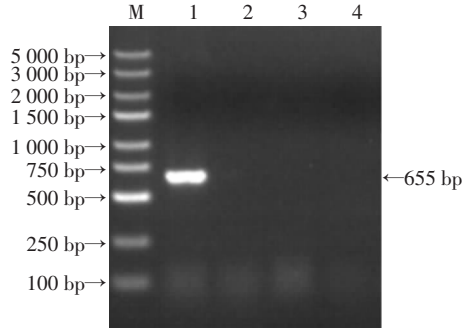
2.1 hFⅨ基因的 PCR 产物电泳分析及重组慢病毒表达载体 GV240-hFⅨ-EGFP 的鉴定

电泳结果示,1 420 bp 处有特异条带,与理论值相同,表明已成功扩增 hFⅨ基因(图 1);hFⅨ与 GV240 慢病毒载体的连接行酶切鉴定,阳性克隆可见一 655 bp 的目的片段,与预计 PCR 产物大小一致,初步确认成功构建慢病毒表达载体(图 2);基因测序阳性克隆结果显示 GV240-hFⅨ-EGFP 序列中 hFⅨ序列与 GenBank 中正常 NM-000133 序列完全一致。



M:Marker;1:hFⅨ基因

图 1 hFⅨ-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果



M:Marker;1:阳性克隆;2~4:阴性克隆

图 2 慢病毒载体 GV240-hFⅨ-EGFP 阳性克隆 PCR 鉴定

2.2 重组 GV240-hFⅨ-EGFP 慢病毒滴度检测

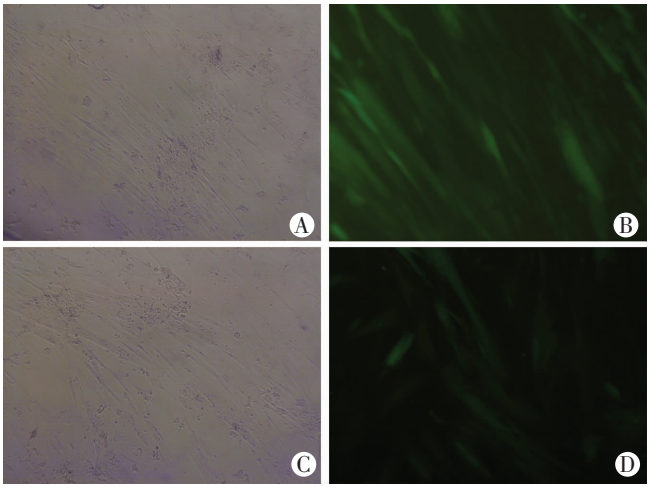
实时定量 PCR 检测倍比稀释 10 倍的 5 个实验组和 1 个对照组,结果见表 1。在本次滴度检测中,10^{-4} μL 组和对照组样品的 Ct 值存在 4 个左右差异,所以认为在 10^{-4} μL 组样品中存在病毒颗粒。假定该组样品含有至少 1 个病毒颗粒,则病毒的滴度为 $1/(1.00\times10^{-4})\times20=2.00\times10^{8}$ TU/mL。由于每组只取 1 μL 的 cDNA 用于 RT-qPCR,该结果只是总量的 1/20,因此最终慢病毒滴度为 2×10^{8} TU/mL,即 1×10^{7} TU/mL×20。

2.3 重组 GV240-hFⅨ-EGFP 慢病毒感染 hUCMSCs 的效率测定

MOI=0、2、5 时,荧光表达率均 <80%;MOI≥10 时荧光表达率较高,均 >90%,且荧光表达强度随病毒滴度的增高而增强,流式细胞仪检测示 MOI 为 10、20、100 时,均可达 90% 以上,感染效率无明显差异。因此 MOI=10 为最佳感染值(92.92±6.32)%。以最佳 MOI 值感染细胞,5 d 时荧光表达最强,29 d 时 hUCMSCs 仍能稳定表达绿色荧光(图 3)。

表 1 实验组和对照组 Ct 值分析

组别	$Ct_{\beta\text{-actin}}$	$Ct_{hF\text{Ⅸ}}$均值	$\Delta Ct = Ct_{hF\text{Ⅸ}}均值 - Ct_{\beta\text{-actin}}$	$\Delta Ct_{对照} - \Delta Ct_{样品}$
对照组	14.10	39.940	25.840	0.000
1 μL 组	14.51	21.335	6.825	19.015
10^{-1} μL 组	14.69	25.140	10.450	15.390
10^{-2} μL 组	14.28	27.800	13.520	12.320
10^{-3} μL 组	14.05	31.635	17.585	8.255
10^{-4} μL 组	13.99	35.350	21.360	4.480

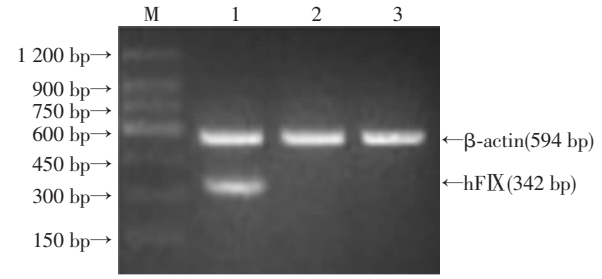


A:感染 5 d 相差显微镜观察;B:感染 5 d 荧光显微镜观察;C:感染 29 d 相差显微镜观察;D:感染 29 d 荧光显微镜观察

图 3 MOI=10 的 GV240-hFⅨ-EGFP 慢病毒感染 hUCMSCs 后各时间点的 EGFP 表达 (×100)

2.4 各组细胞中 hFⅨ mRNA 表达

实验组 RT-PCR 检测结果显示 342 bp 处有 hFⅨ特异条带,而空白组和空载体组未见条带(图 4)。



M:Marker;1:实验组;2:空载体组;3:空白组

图 4 RT-PCR 检测各组细胞 hFⅨ表达

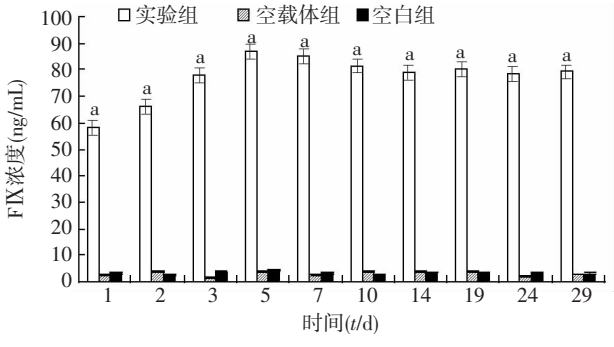
2.5 各组细胞上清液 FⅨ 蛋白量及活性检测

结果显示 FⅨ:C 和 FⅨ:Ag 之间具有良好的一致性。实验组 hUCMSCs 感染后 1 d 即开始有效表达 hFⅨ,并在第 5 天达分泌高峰,FⅨ:Ag 为(87.18±0.86)ng/(10^{6}·24 h),FⅨ:C 为(44.3±3.2)%;该高水平分泌可持续至感染后 29 d(图 5、表 2)。各观察时间段实验组细胞的 hFⅨ蛋白量及凝血活性与空白组和空载体组比较,均显著增高($P<0.05$)。

表 2　一期法测 FⅨ /hUMSCs 细胞在不同时段分泌的 hFⅨ的活性（%，$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	19 d	24 d	29 d
实验组	7.3 ±1.2[a]	10.7 ±2.1[a]	20.7 ±1.5[a]	44.3 ±3.2[a]	35.7 ±2.1[a]	33.0 ±1.7[a]	26.7 ±0.6[a]	28.3 ±1.5[a]	29.7 ±2.1[a]	24.0 ±3.0[a]
空载体组	1.3 ±0.6	1.0 ±0.0	2.0 ±1.0	1.7 ±0.6	2.3 ±1.2	1.7 ±0.6	1.3 ±0.6	1.7 ±0.6	1.3 ±1.2	1.7 ±1.2
空白组	0.7 ±0.6	2.0 ±1.0	1.3 ±0.6	1.3 ±1.2	1.7 ±0.6	1.0 ±0.0	2.3 ±1.2	1.3 ±0.6	2.7 ±1.2	1.0 ±1.0

a：$P<0.05$，与空载体组、空白组比较



a：$P<0.05$，与空载体组和空白组比较

图 5　ELISA 法检测各组细胞上清 hFⅨ表达

3　讨论

基因治疗被认为是目前根治血友病 B 的唯一方法[6]。而理想的基因转移载体和靶细胞是治疗的基础和关键。与其他载体系统相比较，慢病毒载体有其独特的优势[7-9]，已成为基因治疗的理想转移载体。与其他靶细胞相比较，脐带间充质干细胞（hUCMSCs）是一种更为原始，低免疫原性，可诱导分化的多向干细胞[10]，这种细胞基因治疗时不需要 HLA 配型[11]，因而成为遗传性疾病（包括血友病 B）基因治疗的迷人靶细胞[12]。

本研究探讨使用 hFⅨ修饰后的 hUMSCs 作为持续性递送治疗性 hFⅨ的可能。实验中，我们成功通过慢病毒携带 hFⅨ基因高效感染 hUCMSCs。我们发现，只有在 hFⅨ感染组有 hFⅨ mRNA 转录，感染 1 d 后的 hUCMSCs 即可高水平分泌 hFⅨ，5 d 时达最高峰，FⅨ: Ag 为（87.18 ±0.86）ng/（10^6 · 24 h），随后Ⅸ因子水平变化趋于平缓，可至少稳定持续 29 d 以上。乏Ⅸ因子血浆凝血功能实验亦有类似的结果：且 FⅨ: C 和 FⅨ: Ag 之间具有良好的一致性。FⅨ最高活性可达（44.3 ± 3.2）%，表明 HUMSCs 分泌的 FⅨ是正确有活性的，HUMSCs 具有所需的酶去做翻译后修饰，如 Y-羧化，这正是产生生理性 FⅨ所必需的[13]。

实验结果显示，不论是在 mRNA 水平还是蛋白质水平都显著提高了 hFⅨ的表达。可检测到治疗水平的 hFⅨ蛋白（因为只要持续维持循环中因子水平 2% 以上即具有治疗意义，能阻止严重的出血并发症和保护关节功能[14]），且持续时间超过 29 d。结果与前人的报告相比较，结果略好于其他体细胞的报道[15-16]，其原因可能与我们使用的基因传递体系更优化有关，慢病毒载体转染效率更高，HUMSCs 易于转染，增殖活性强且具有 FⅨ转录后翻译修饰所必需的酶系，而结果低于 Follenzi 等[17]肝脏细胞报道的结果，其原因可能肝脏细胞本身就是体内凝血因子最主要的分泌场所，以及与 Follenzi 等[17]增加了能促进目的基因表达的调控元件有关，诸如启动子、增强子、kozak 顺序、内含子等；可能增加了转录和 mRNA 的稳定性，是促进表达的重要调控因子[18]。

综上所述，重组慢病毒携带 hFⅨ基因感染 hUCMSCs 作为持续性分泌 FⅨ的递送平台，是一种有效、值得探索的治疗方法。其一方面 hFⅨ基因易于整合到 hUCMSCs 基因组中，感染后 hUCMSCs/hFⅨ 细胞体外自身能够持续稳定的分泌活性 hFⅨ因子，且表达量并未随时间的延长而下降。另一方面 hUCMSCs 低免疫原性的特点更容易实现体内免疫抑制[19]，为进一步体内移植 hFⅨ/hUCMSCs 治疗血友病 B 奠定了实验基础。但是由于观察时间的有限，尚需要进一步延长观察和更深入的动物模型实验研究论证。

参考文献：

[1] Orlova N A, Kovnir S V, Vorobiev I I, *et al*. Coagulation Factor Ⅸ for Hemophilia B Therapy[J]. Acta Naturae, 2012, 4(2): 62 - 73.
[2] Coppola A, Di-Capua M, Di-Minno M N, *et al*. Treatment of hemophilia: a review of current advances and ongoing issues[J]. J Blood Med, 2010, 1: 183 - 195.
[3] Chuah M K, Nair N, VandenDriessche T. Recent progress in gene therapy for hemophilia[J]. Hum Gene Ther, 2012, 23(6): 557 - 565.
[4] Montgomery R R, Shi Q. Alternative strategies for gene therapy of hemophilia[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2010, 2010: 197 - 202.
[5] Miao C H. Advances in Overcoming Immune Responses following Hemophilia Gene Therapy[J]. J Genet Syndr Gene Ther, 2012, S1: 007.
[6] Franchini M, Mannucci P M. Past, present and future of hemophilia: a narrative review[J]. Orphanet J Rare Dis, 2012, 7: 24.
[7] Johnston J M, Denning G, Doering C B, *et al*. Generation of an optimized lentiviral vector encoding a high-expression factor Ⅷ transgene for gene therapy of hemophilia A[J]. Gene Ther, 2012, 9: 1323 - 1329.
[8] Dagher I, Nguyen T H, Groyer-Picard M T, *et al*. Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates[J]. Hepatology, 2009, 49(3): 950 - 959.
[9] Wang X, Mani P, Sarkar D P, *et al*. *Ex vivo* gene transfer into hepatocytes[J]. Methods Mol Biol, 2009, 481: 117 - 140.
[10] Liras A. Advanced therapies for hemophilia: reality or fantasy[J]. Expert Rev Hematol, 2012, 5(3): 245 - 247.
[11] Cho P S, Messina D J, Hirsh E L, *et al*. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells[J]. Blood, 2008, 111(1): 430 - 438.
[12] Phillips M I, Tang Y. Genetic modification of stem cells for cardiac,

diabetic, and hemophilia transplantation therapies[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012, 111: 285-304.
[13] Arruda V R, Hagstrom J N, Deitch J, *et al*. Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor Ⅸ[J]. Blood, 2001, 97(1): 130-138.
[14] Hedner U, Ginsburg D, Lusher J M, *et al*. Congenital Hemorrhagic Disorders: New Insights into the Pathophysiology and Treatment of Hemophilia[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2000, 2000(1): 241-265.
[15] Chen H, Yao H, Huang L, *et al*. Expression of human factor Ⅸ gene in murine plasma through lentiviral vector-infected haematopoietic stem cells[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33(12): 1196-1201.
[16] de-Castilho-Fernandes A, Fontes A, Gonsales N, *et al*. Stable and high-level production of recombinant Factor Ⅸ in human hepatic cell line[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2011, 58(4): 243-249.
[17] Follenzi A, Sabatino G, Lombardo A, *et al*. Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes *in vivo* improved lentiviral vectors[J]. Hum Gene Ther, 2002, 13(2): 243-260.
[18] Parra G, Bradnam K, Rose A B, *et al*. Comparative and functional analysis of intron-mediated enhancement signals reveals conserved features among plants[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(13): 5328-5337.
[19] Annoni A, Goudy K, Akbarpour M, *et al*. Immune responses in liver-directed lentiviral gene therapy[J]. Translational Research, 2013, 4(161): 230-240.

(**收稿**:2013-01-10;**修回**:2013-03-13)
(编辑 吴培红)

(上接1725页)

提示窦性,电轴右偏,极度顺钟转,考虑心脏反位;行心脏及腹部彩超示:心脏位于右侧,镜面心可能,射血分数70%;肝脏、胆囊位于左侧,胰脾位于右侧,肝胆胰脾双肾未见明显异常。孕妇一般情况尚可,因"珍贵儿"要求行剖宫产终止妊娠,于2013年2月19日10:08以枕左前位娩出一2 650 g活男婴,身长49 cm;于10:10以ROA娩出一活女婴,体质量2 700 g,身长49 cm,Apgar评分均为10-10-10。缝合子宫后,探查内脏:见阑尾、肝脏、胰头位于左侧,胃、脾位于右侧,内脏全部反位。手术顺利,术后恢复好,出院时,新生儿彩超检查各内脏位置正常。

2 讨论

内脏反位是一种罕见的先天性畸形,分全内脏反位和部分内脏反位两种类型。全内脏反位是指全部内脏器官位置呈180度反位,而部分内脏反位是只有部分内脏器官位置相反,多伴有其他复杂畸形。目前内脏反位的确切原因尚不明确,有学者认为与家族遗传、染色体结构畸变有关。沙丽丽[2]通过对某家族中11例全内脏反位患者的系谱分析,证实全内脏反位属于单基因常染色体隐性遗传。也有学者认为与胚胎发育过程中旋转或下降异常有关。陈见美等[3]指出心脏位置异常是原始心管在胚胎时期旋转异常所致,内脏反位则是胚胎时期中肠袢逆转异常引起。Kobayashi等[4]通过超微结构分析表明,内脏旋转不良是胎儿时期纤毛运动障碍时胎儿器官排列失常所致,很多内脏转位者伴有纤毛内动力蛋白臂缺陷。

1928年北京协和医院首次报道了全内脏反位,后陆续有个案报道内脏反位合并内外科疾病的诊断与治疗。内脏反位合并妊娠在国内外文献中报道较少,大多为部分内脏反位,陈见美等[3]报道了1例镜面右位心伴内脏反位并发重度子痫前期妊娠,并得到了成功救治,闫艳红[5]报道了"镜面人"足月妊娠剖宫产的个案。内脏反位合并双胎的报道则更罕见,2005年国内严四军等[6]报道1例镜像右位心合并室间隔及房间隔缺损,顺利妊娠并剖宫产分娩双胎,但缺乏具体临床资料,仅在既往史中描述。国外Pezzolla等[7]报道了1例全内脏反位合并双胎在妊娠3个月时突发急性胆囊炎并成功实施了腹腔镜下胆囊切除术,该年轻孕妇与本例同样为体外受精和胚胎移植后成功妊娠,但缺乏妊娠晚期的随访资料。

本例患者既往因"双侧卵巢子宫内膜异位囊肿"一直未避孕未孕,手术后怀孕亦未成功,遂行体外受精-胚胎移植并成功双胎妊娠,由于患者经过多年不孕治疗,求子心切,自觉胎儿来之不易,最终决定剖宫产终止妊娠。有文献报道[8],IVF-EF双胎与自然妊娠双胎在宫内生长发育、母婴并发症及新生儿结局方面均无明显差异。对全内脏反位合并双胎行剖宫产手术,术前需明确患者各脏器位置,尤其是心脏位置,利于术中麻醉监护,双胎剖宫产术中应把握胎儿娩出技巧,术中可探查腹腔各重要脏器位置,术中及术后应警惕子宫收缩乏力导致的产时、产后出血。

全内脏反位并未改变各器官之间的关系,器官生理功能多属正常,不会对健康、工作、生活产生影响,无须特殊干预,目前尚无确切文献报道内脏反位的孕妇妊娠期出现并发症的概率是否与正常妇女存在差异,新生儿出生后可行超声等检查明确是否存在内脏异位。全内脏反位发生率很低,又无临床症状,临床诊断主要依靠胸片、B超、CT或MRI等影像学检查,其检出具有一定的临床意义,特别是肝、胆系统及阑尾疾病容易误诊,当需要检查、治疗及手术时,临床医师应高度重视,警惕这种少见的解剖变异,减少误诊误治,尽量避免相关医疗事故的发生。

参考文献:

[1] 韩永坚. 临床解剖学丛书: 腹、盆部分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 115.
[2] 沙丽丽. "全内脏反位"症11例之病因探讨[J]. 云南医药, 1991, 12(1): 55-57.
[3] 陈见美, 钟柳英. 镜面右位心伴内脏反位并发重度子痫前期妊娠1例[J]. 广东医学, 2012, 33(2): 159.
[4] Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, *et al*. Hydrocephalus, situs inversus, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase lambda-deficient mice: possible implication for the pathogenesis of immotile cilia syndrome[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(8): 2769-2776.
[5] 闫艳红. "镜面人"足月妊娠剖宫产1例[J]. 中国妇产科临床杂志, 2008, 9(4): 311.
[6] 严四军, 曾祥, 刘燕, 等. 镜像右位心合并室间隔缺损、房间隔缺损1例[J]. 中国误诊学杂志, 2005, 5(13): 2586-2587.
[7] Pezzolla A, Lattarulo S, Disabato M, *et al*. Laparoscopic cholecystectomy for acute cholecystitis in pregnancy: a case report in woman with situs viscerum inversus[J]. Recenti Prog Med, 2012, 103(12): 578-580.
[8] 张蔚琳, 宋英娜, 刘俊涛, 等. 自然妊娠和辅助生育技术妊娠双胎的母婴围产期预后[J]. 中国妇产科临床杂志, 2011, 12(3): 183-186.

(**收稿**:2013-06-12;**修回**:2013-07-08)
(编辑 吴培红)