

[文章编号] 1671-587X(2012)02-0192-05

## 骨骼肌特异性表达猪 FS I - I 转基因猪胚胎成纤维细胞 克隆的构建与鉴定

袁 婷, 刘 帅, 李小平, 唐成程, 韩晓蕾, 逢大欣, 欧阳红生  
(吉林大学畜牧兽医学院 动物胚胎工程吉林省重点实验室, 吉林 长春 130062)

[摘 要] 目的: 构建骨骼肌特异性表达猪 FS I - I 真核表达载体, 转染猪胚胎成纤维细胞并筛选整合有 FS I - I 基因的细胞克隆, 为研究 FS I - I 对猪骨骼肌的影响奠定基础。方法: 通过 RT-PCR 方法从猪骨骼肌中扩增 FS A(包含 FS N 端和结构域 FS I)和结构域 FS I; 利用 PCR 方法分别从鼠基因组、人血液基因组和 pcDNA3.1(+ )载体上扩增出 MCK 增强子、ACTA1 启动子和 BGHpolyA。将上述 4 个片段分别连接到真核表达载体 pGKneotpAlox2 上, 构建骨骼肌特异性表达 FS I - I(包含 FS N 端和 2 个连续 FS I 结构域)的载体 pGK-MCK-ACTA1-FS I - I-BGHpolyA; 用 FuGENE<sup>®</sup> HD 转染猪胚胎成纤维细胞, 经药物 G418 筛选和 PCR 鉴定阳性克隆。结果: 成功构建骨骼肌特异性表达猪 FS I - I 的表达载体 pGK-MCK-ACTA1 promoter-FS I - I-BGHpolyA, 并成功整合到猪胚胎成纤维细胞的基因组中, 获得了整合有目的基因 FS I - I 的猪胚胎成纤维细胞克隆。结论: 获得了骨骼肌特异性表达猪 FS I - I 的猪胚胎成纤维细胞克隆, 为通过核移植方法获得表达 FS I - I 转基因猪提供了供体细胞。

[关键词] 卵泡抑素; 猪胚胎成纤维细胞; 真核表达

[中图分类号] S852 [文献标志码] A

## Construction and identification of skeletal muscle-specific FS I - I expression transgenic porcine embryonic fibroblast lines

YUAN Ting, LIU Shuai, LI Xiao-ping, TANG Cheng-cheng, HAN Xiao-lei, PANG Da-xin, OUYANG Hong-sheng  
(Jilin Provincial Key Laboratory of Animal Embryo Engineering, College of Animal Science and  
Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

**Abstract:** **Objective** To construct the skeletal muscle-specific FS I - I eukaryotic expression vector and identify the integration of FS I - I gene in porcine embryonic fibroblasts, and to provide a basis for study on the effect of FS I - I on skeletal muscle. **Methods** The FS A (containing FS N and FS I) and FS I were amplified by RT-PCR from porcine skeletal muscle; the MCK enhancer, ACTA1 promoter and BGHpolyA were amplified by PCR from mouse genome, human genome and pcDNA3.1(+), respectively. The four fragments mentioned above were subcloned into the eukaryotic expression vector pGKneotpAlox2, and then the vector was transfected into porcine embryonic fibroblasts using the FuGENE<sup>®</sup> HD reagent, according to the manufacturer's protocol. The cells were selected with G418 antibiotic and identified by PCR amplification. **Results** The FS I - I skeletal muscle-specific expression vector was successfully constructed and integrated to the genome of the porcine fibroblasts and the clone cells integrating the FS I - I gene were obtained. **Conclusion** The porcine fibroblast clone expressing FS I - I is obtained and it should be of great value to the construction of FS I - I transgenic swine.

**Key words:** follistatin; porcine embryonic fibroblasts; eukaryotic expression

[收稿日期] 2011-09-28

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (30871841)

[作者简介] 袁 婷 (1986-), 女, 四川省长宁县人, 在读理学硕士, 主要从事分子生物学和细胞生物学的研究。

[通信作者] 欧阳红生 (Tel: 0431-87963175, E-mail: biotech64@163.com)

肌生成抑制素(myostatin, MSTN)属于转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor-beta, TGF- $\beta$ )超家族成员,主要是负调控骨骼肌的生长,也是目前已知的最强的骨骼肌生长抑制物<sup>[1]</sup>。研究<sup>[1-2]</sup>表明:敲除小鼠 MSTN 基因或者抑制 MSTN 的活性,则可显著促进肌肉细胞增殖,对于治疗肌进行性营养不良症、肌肉萎缩等肌肉相关疾病有重要意义。卵泡抑素(follistatin, FS)是1987年由Robertson和Ueno分别从猪和牛的卵泡液中分离获得的富含半胱氨酸的单链糖蛋白,也称FSH抑制蛋白(FSH-suppressing protein, FSP)<sup>[3]</sup>。随后研究发现FS也是激活素(activin)结合蛋白,抑制激活素在体内的多种生理功能。研究<sup>[4]</sup>表明:FS能与MSTN的5'端特异性结合,抑制MSTN与其受体ActR II B结合,阻断下游信号传导,从而导致转基因小鼠肌肉增生肥大。此外,最近研究<sup>[5]</sup>表明:在小鼠体内过表达FS可显著调节由于疾病或者损伤导致的骨骼肌的异常状态。由于激活素在机体内具有双重作用<sup>[6]</sup>,所以抑制激活素的活性则会导致骨骼肌的生理活动异常,且影响机体的正常生理功能。研究<sup>[7-8]</sup>表明:FSI-I转基因小鼠相比FS全长的转基因小鼠,其骨骼肌重量显著上升,在体外与激活素A的结合率也显著下降。目前对人及小鼠FS各结构域功能的研究已有很多,但在家畜方面特别是猪的研究还未见详细报道,本实验为进一步研究增加FSI结构域是否对猪骨骼肌的生长有显著调节作用,克隆了猪FSI-I基因片段,并以人骨骼肌 $\alpha$ -肌动蛋白(human skeletal  $\alpha$ -actin)上游调控元件作为启动子,构建了整合了FSI-I基因的猪胚胎成纤维细胞,为制备骨骼肌特异性表达FSI-I转基因猪提供前提条件,为今后研究FSI-I对猪肌肉生长的影响奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌种和细胞

*E. coli* DH5 $\alpha$ 、质粒 pcDNA 3.1(+), pGKneotPA lox2、pBluescript II (+)和猪胚胎成纤维细胞均由本实验室保存。

### 1.2 工具酶与主要试剂

各种限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶购于 MBI 公司; 2 $\times$  Taq Plus PCR Master Mixture 购于 TIANGEN(北京)公司; pMD18-T Simple 载体购于 TaKaRa(大连)公司; 质粒回收试剂盒、凝胶

回收试剂盒购于杭州博日有限公司; FuGENE<sup>®</sup> HD 为 Roche 公司产品; G418 购于 Amresco 公司; 高糖 DMEM、谷氨酰胺和非必须氨基酸购于 Gibco 公司; 胎牛血清购于 PAA 公司。

### 1.3 引物设计与合成

根据 MCK 增强子序列, ACTA 1 启动子基因序列, 质粒 pcDNA 3.1(+ )上的 BGHpolyA 基因序列和 Follistatin 基因序列设计引物(表 1)。引物均由南京金斯瑞公司合成。

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of primers

Fragment name	Primer name and sequence (5'-3')
MCK	MCK-F: CTAGCTAGCA <u>TG</u> CCCACTACGGGTCTAGG
	MCK-R: CTAGCTAGCCCTTGATCCACCAGGGACA
ACTA 1	PRO-F: CTAGCTAGCGGCAGCAAATTTCTACCTTC
	PRO-R: CCATCGATAGGCTTCACTGGCGCTGTC
FS A	FSA-F: CCATCGATGAATGGTCCGTCCTCAAGCACCAG
	FSA-R: CGTCGACTTTTACATTTGCCTTGGTACTGG
FSI	FSI-F: CCTCGAGTGCAGAACGTGGACTGTGG
	FSI-R: CGTCGAGTTTACATTTGCCTTGGTACTGG
BGH	BGH-F: GCCTCGAGTCGACTGTGCCTTCTAG
	BGH-R: GGGTACCATTAAATCGCCTCAGAAGCCATAG

Underline area: restriction site.

### 1.4 各元件 PCR 产物的获得与连接

1.4.1 FS A 和 FSI 基因的获得 取新鲜猪卵巢置于液氮中冷冻并进行研磨后提取总 RNA, 按反转录酶说明书进行。FS A(包括 FS N 和 FSI 结构域)和 FSI 分别用表 1 的引物进行 PCR 扩增。FS A 的 PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。FSI 的 PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。将所获得的 FS A 和 FSI 片段分别与 pMD18-T Simple 载体连接、转化, 分别构建 FS A 和 FSI 的克隆质粒, 经酶切鉴定后送北京天根生物有限公司测序。

1.4.2 MCK 增强子、ACTA1 启动子和 BGHpolyA 的扩增 分别提取鼠尾基因组 DNA 和人血液基因组 DNA, 扩增 MCK 增强子和 ACTA1 启动子; PCR 法从质粒 pcDNA 3.1(+ )扩增 BGHpolyA, 引物见表 1。将所获得的 MCK、ACTA 1 和 BGHpolyA 片段分别与 pMD18-T Simple 载体连接、转化, 分别构建 MCK、ACTA1 和 BGHpolyA 的克隆质粒, 经酶切鉴定后

送北京天根生物有限公司测序。

### 1.5 FS I-I 骨骼肌特异表达载体的构建

用 *Nhe* I 和 *Cla* I 双酶切 ACTA1 启动子的回收产物, 与同样酶切处理的 pGKneotpA lox2 载体进行连接, 构建 pGK-ACTA1 重组质粒; 用 *Nhe* I 单酶切 MCK 增强子的回收产物, 与同样酶切处理的重组质粒 pGK-ACTA1 进行连接, 构建 pGK-MCK-ACTA1 重组质粒。用 *Cla* I 和 *Sal* I 双酶切 FS A 片段的回收产物, 与同样酶切处理的 pBlueScript II (+) 载体进行连接, 构建 pBS-FS A 重组质粒; 用 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切 FS I 片段的回收产物, 与同样酶切处理的重组质粒 PBS-FS A 载体进行连接, 构建重组质粒 PBS-FS I-I; 用 *Xho* I 和 *Kpn* I 双酶切 BGHpolyA 片段的回收产物, 与同样酶切处理的重组质粒 PBS-FS I-I 进行连接, 构建重组质粒 PBS-FS I-I-BGH。

重组质粒 PBS-FS I-I-BGH 和重组质粒 pGK-MCK-ACTA1 用 *Cla* I 和 *Kpn* I 双酶切, 将片段 FS I-I-BGH 与 pGK-MCK-ACTA1 连接转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态, 氨苄青霉素筛选培养, 挑取阳性克隆后提取质粒, 获得表达载体 pGK-MCK-ACTA1-FS I-I-BGHpolyA, 对重组质粒进行酶切和 DNA 测序鉴定。

### 1.6 转染

重组质粒 pGK-MCK-ACTA1-FS I-I-BGHpolyA 经 *Apa*I 酶切回收后, 取 5  $\mu$ g 转染猪胚胎成纤维细胞。将猪胚胎成纤维细胞接种于 60 mm 培养皿中, 待细胞生长至 85%~90% 时, 在 250  $\mu$ L 的无血清无双抗的培养基中加入 5  $\mu$ g 质粒和 20  $\mu$ L FuGENE<sup>®</sup> HD, 混匀, 室温静置 15 min 后, 将混合物加入 60 mm 培养皿中, 将培养皿放入 39  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育培养。

### 1.7 阳性克隆的鉴定

转染 48 h 后, 在含有 G418(350 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 的选择培养基中加压筛选 8 d, 获得具有抗生素抗性的阳性细胞克隆, 扩增培养。取少量细胞用 NP40 裂解进行 PCR 鉴定, 将鉴定阳性的细胞扩大培养冻存, 留作核移植供体细胞。

## 2 结果

### 2.1 FS A、FS I、MCK、ACTA1 及 BGHpolyA 的克隆

通过 RT-PCR 扩增, 获得 513 bp 的 FS A 片段和 228 bp 的 FS I 片段(图 1), 经测序鉴定与

GenBank 中猪 FS cDNA 进行 Blast 比对, 结果表明序列一致性为 100%。通过 PCR 扩增, 获得 262 bp 的 BGHpolyA 序列、221 bp 的 MCK 序列以及 2 051 bp 的 ACTA1 序列(图 1), 获得的 DNA 片段, 大小与预期结果一致, 经测序鉴定正确。

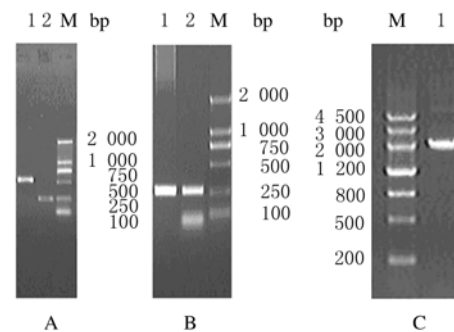


图 1 FS A、FS I、MCK、ACTA1 及 BGHpolyA 的 PCR 扩增  
Fig. 1 PCR amplification of FS A, FS I, MCK, ACTA1 and BGHpolyA

A. Lane 1: FS A; Lane 2: FS I; M: DNA marker (DL 2 000).  
B. Lane 1: BGHpolyA; Lane 2: MCK; M: DNA marker (DL 2 000).  
C. Lane 1: ACTA1; M: DNA marker (Marker III).

### 2.2 FS I-I 肌肉特异性表达载体 pGK-FS I-I 的构建与鉴定

2.2.1 pGK-FS I-I 载体的构建 构建的 pGK-FS I-I 载体以 MCK 为增强子, ACTA1 为启动子, BGHpolyA 为终止信号, Neomycine 是 G418 筛选标记。见图 2。

2.2.2 pGK-FS I-I 载体的酶切鉴定结果 重组质粒 pGK-MCK-ACTA1-FS I-I-BGHpolyA 经 *Cla* I 和 *Kpn* I 双酶切后理论上可切出 987 bp 的片段和 7 925 bp 的片段, 电泳图片符合理论要求, 载体构建成功。见图 3。

### 2.3 阳性克隆的鉴定

在含有 G418 的选择培养基中筛选 8 d, 获得具有抗生素抗性的阳性细胞克隆, 以细胞裂解液作为模板扩增出 FS I-I 基因(723 bp)和 Neo 基因(428 bp)片段, 说明所得到的阳性细胞的基因组已经插入了目的片段。见图 4。

## 3 讨论

FS 是一种广泛存在的单链糖蛋白, 作为性激素调节肽家族的成员, 除了参与调节 FSH 分泌以外, 还通过与 TGF- $\beta$  超家族结合抑制其效应(如激活素、MSTN), 在生命体内发挥着广泛的生物学

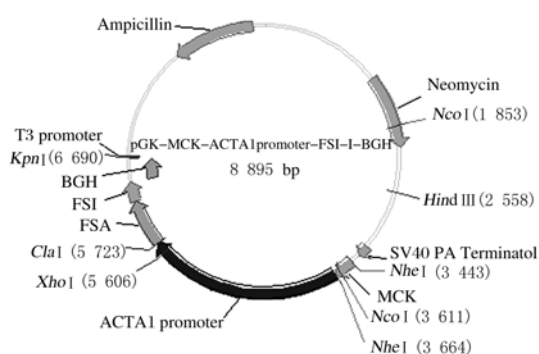


图2 重组质粒 pGK-MCK-ACTA1-FS I - I -BGHpolyA 的构建

Fig.2 Construction of recombinant plasmid pGK-MCK-ACTA1-FS I - I -BGHpolyA

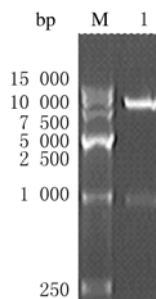


图3 重组质粒 pGK-MCK-ACTA1-FS I - I -BGHpolyA 的酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pGK-MCK-ACTA1-FS I - I -BGHpolyA by enzyme digestion

M: DNA marker (DL 15 000); Lane 1: pGK-MCK-ACTA1-FS I - I -BGHpolyA.

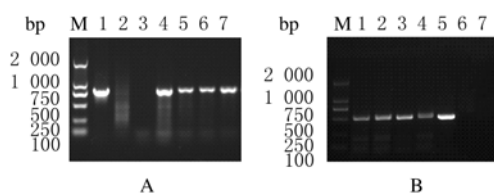


图4 阳性克隆的鉴定

Fig.4 Identification of positive clone cells

A: PCR products of the FS I - I gene; M: DNA marker (DL 2 000); Lane 1: Positive control; Lane 2: Negative control; Lane 3: Water control; Lane 4-7: Clone cells. B: PCR products of the Neo gene; M: DNA marker (DL 2 000); Lane 1-4: Clone cells; Lane 5: Positive control; Lane 6: Negative control; Lane 7: Water control.

作用。FS 不仅通过与激活素结合, 对卵母细胞的成熟和卵泡发育<sup>[9]</sup>、精子的生成<sup>[10]</sup>、胚胎发育与分化等起着重要的调节作用, 还可与 MSTN 结合抑制 MSTN 的抑肌作用, 促进肌肉的生长, 可用

于治疗一些肌肉相关疾病, 如肌萎缩症。

MSTN 作为目前已知的抑制骨骼肌生长的最强抑制剂, 通过生物技术方法来阻断 MSTN 的抑肌作用可以广泛有效地促进骨骼肌生长。MSTN 前肽、FS、卵泡抑素相关基因产物 (follistatin-related gene product, FLRG) 和 MSTN 抗体等都可以与 MSTN 结合, 从而抑制其活性, 促进肌肉生长。在生物体内, FS 作为一种自然的激素对 TGF- $\beta$  超家族成员具有抑制作用, 包括激活素 A 和 MSTN<sup>[11]</sup>。FS 能与 MSTN 的 C 端竞争性结合, 抑制 Smad 信号通路, 导致 Smad2/3 不能被激活, 从而导致 MSTN 的生理功能失活, 进而得到促进猪肌肉持续生长效果。虽然 FS 与 MSTN 和激活素 A 的结合方式相似, 但 FS 与 MSTN 结合时不需结构域 FS II 的参与, 而结构域 FS I 是必要的<sup>[12]</sup>。最近研究<sup>[11]</sup>表明: FS 的第 192 位的 Arg 在 FS 与激活素 A 结合中发挥了重要作用。所以本实验构建了包含 FS N 和 2 个连续的 FS I 的真核表达载体, 为了研究 FS I - I 在猪骨骼肌中对骨骼肌的影响情况, 选择了人骨骼肌  $\alpha$  肌动蛋白上游调控元件作为启动子, 使其在骨骼肌中特异性表达。本研究所构建的载体经酶切与测序鉴定正确, 将载体转入猪胚胎成纤维细胞, 所获得克隆细胞经 PCR 鉴定 Neo 基因与目的基因 FS I - I, 获得整合了 FS I - I 基因的胚胎成纤维细胞, 为以后利用核移植技术生产肌肉特异性表达 FS I - I 转基因猪奠定了基础, 为研究 FS I - I 对猪骨骼肌生长的影响提供了实验依据。

#### [参考文献]

- [1] Joulia-Ekaza D, Cabello G. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312 (13): 2401-2414.
- [2] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member [J]. *Nature*, 1997, 387 (6628): 83-90.
- [3] Ueno, N, Ling N, Ying SY, et al. Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35, 000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84 (23): 8282-8286.
- [4] Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(16): 9306-9311.
- [5] Zhu J, Li Y, Lu A, et al. Follistatin improves skeletal muscle healing after injury and disease through an interaction

- with muscle regeneration, angiogenesis, and fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2011, 179 (2): 915-930.
- [6] Hedger MP, Winnall WR, Phillips DJ, et al. The regulation and functions of activin and follistatin in inflammation and immunity [J]. *Vitam Horm*, 2011, 85: 255-297.
- [7] Schneyer AL, Sidis Y, Gulati A, et al. Differential antagonism of activin, myostatin and growth and differentiation factor 11 by wild-type and mutant follistatin [J]. *Endocrinology*, 2008, 149 (9): 4589-4595.
- [8] Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, et al. Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice [J]. *FASEB J*, 2008, 22 (2): 477-487.
- [9] Silva CC, Knight PG. Modulatory actions of activin-A and follistatin on the developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes [J]. *Biol Reprod*, 1998, 58 (2): 558-565.
- [10] Boitani C, Stefanini M, Fragale A, et al. Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis development [J]. *Endocrinology*, 1995, 136(12): 5438-5444.
- [11] Thompson TB, Lerch TF, Cook RW, et al. The structure of the follistatin: activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding [J]. *Dev Cell*, 2005, 9(4): 535-543.
- [12] Cash JN, Rejon CA, McPherron AC, et al. The structure of myostatin: follistatin 288: insights into receptor utilization and heparin binding [J]. *EMBO J*, 2009, 28 (17): 2662-2676.

## 多发性骨髓瘤嗜水气单胞菌感染致败血症并死亡 1 例报告

吉林大学第一医院肿瘤中心(吉林 长春 130021) 孙 沙, 康丽花, 杨 岩, 宋艳秋

### 1 临床资料

患者, 男性, 46 岁, 就诊前 7 个月诊断为多发性骨髓瘤Ⅲ期 B (IgG-LAM 型), 行 VTD、VAD、MPT 方案化疗, 疾病部分缓解, 口服沙利度胺维持治疗, 因再次出现骨痛 10 d 入本院。入院查体: 左侧髂骨压痛, 双下肢无水肿。实验室检查: 白细胞  $4.2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , 血红蛋白  $73 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 血小板  $106 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。肾功能正常。免疫球蛋白定量: IgG  $131.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , IgA  $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , IgM  $0.17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。血清游离轻链:  $\lambda$  轻链  $166.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\kappa$  轻链  $13.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\kappa/\lambda$ : 0.08; 24 h 尿轻链: KAP 轻链  $5.20 \text{ mg}/24 \text{ h}$ , LAM 轻链  $70 \text{ mg}/24 \text{ h}$ 。骨髓象: 原浆加幼浆细胞占 16%。诊断多发性骨髓瘤Ⅲ期 B (IgG-LAM 型) 疾病进展, 给予 VTD 方案治疗, 同时口服拜阿司匹林  $100 \text{ mg}/\text{日}$  及支持对症治疗。应用万珂第 3 天晚患者自述双侧小腿肿胀感, 右侧为著, 伴疼痛, 外观正常。次日凌晨出现高热, 体温  $40.4^\circ\text{C}$ , 下肢疼痛未见缓解, 并且肿胀加重, 足背动脉搏动减弱, 皮温略高。立即取血培养, 应用亚胺培南-西司他丁钠(泰能)  $1.0 \text{ g}$ 、每 6 h 1 次静脉滴注抗感染、降温及支持对症治疗。急检血常规: 白细胞  $2.1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , 中性粒细胞绝对值  $1.24 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , 红细胞  $2.23 \times 10^{12} \text{ L}^{-1}$ , 血红蛋白  $71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 血小板  $67 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。凝血常规: PT  $21.1 \text{ s}$ , FIB、APTT 正常。当日上午行双下肢血管彩超未见异常。肺部 CT: 右肺中叶、左肺舌叶、双肺下叶少许炎变。下午患者下肢肿胀进一步加重, 异常疼痛, 皮肤颜色正常。复查血管彩超: 右侧股浅静脉下段不完全栓塞声像, 腘静脉完全栓塞, 右侧腘窝处低回声肿块, 可能为血肿或组织水肿, 右侧小腿下段皮下组织淋巴水肿, 右侧小腿肌组织肿胀。同时患者出现呼吸困难, 面色潮红, 体温再次升高至  $40^\circ\text{C}$ 。呼吸频率  $30 \text{ min}^{-1}$ , 听诊未闻及干湿罗音。血气分析: pH 7.4, 氧分压  $76 \text{ mmHg}$ , 二氧化碳分压  $20 \text{ mmHg}$ 。D-二聚体  $9.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , FDP  $15.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。肺动脉 CTA: 未见肺动脉栓塞。给予强心、利尿、低分子肝素等治疗, 呼吸困难无缓解, 双下肢肿胀进一步加重, 皮肤苍白、发亮, 出现“胀裂样”剧痛, 应用吗啡无缓解, 双下肢皮肤呈红色花斑状, 很快蔓延至全身, 右小腿水疱增多, 呼吸频率  $40 \sim 50 \text{ min}^{-1}$ , 心率  $200 \text{ min}^{-1}$ , 血压  $100/70 \text{ mmHg}$ 。复查血气: pH 7.32, 氧分压  $106 \text{ mmHg}$ , 二氧化碳分压  $11 \text{ mmHg}$ , 患者家属放弃进一步抢救, 2 h 后患者临床死亡。患者死亡 2 d 后血培养结果回报: 嗜水气单胞菌, 对亚胺培南、美罗培南敏感。死亡诊断为嗜水气单胞菌败血症。

### 2 讨 论

该患者从出现症状到死亡不足 24 h, 其原因: 首先考虑感染。多发性骨髓瘤患者免疫功能极低, 感染是患者最常见的并发症, 而且是导致患者死亡的主要原因。一般情况下, 经过积极的抗感染治疗, 感染均能得到有效控制。本例患者出现发热后立即给予亚胺培南-西司他丁钠抗感染治疗, 用药剂量为每日  $4.0 \text{ g}$ , 剂量足够。但病情仍急剧进展, 无法用一般的细菌感染解释。结合患者死亡后血培养结果回报(嗜水气单胞菌), 患者临床表现与嗜水气单胞菌败血症症状非常符合。本例多发性骨髓瘤患者存在免疫缺陷, 嗜水气单胞菌感染致败血症后, 虽及时应用亚胺培南-西司他丁钠抗感染治疗, 但在亚胺培南-西司他丁钠未发挥最大疗效前, 嗜水气单胞菌致病因子外毒素已导致患者病情迅速进展以致死亡。其次, 考虑万珂毒副作用。本例患者出现上述表现, 与应用万珂后严重和少见毒副作用, 如严重肺损伤、Sweet 综合征和皮损有相似之处。但本例患者呼吸困难非低氧血症, 肺部 CT 未见感染性病变, 不存在严重肺损伤。而下肢皮肤组织改变与万珂所致皮损及 Sweet 综合征亦不同。再次, 考虑肺栓塞。本例患者为多发性骨髓瘤疾病进展, 应用万珂、沙利度胺和糖皮质激素等药物均有诱发血栓的风险, 该患者突发下肢肿胀、疼痛, 呼吸困难, 而后出现皮肤黏膜改变, 不排除血栓形成, 甚至 DIC 的可能性。但临床上患者未见出血症状及循环衰竭, 动态观察其凝血常规和血常规也不支持 DIC。肺动脉 CTA 结果未见肺动脉栓塞。虽然怀疑右下肢静脉血栓但无法解释患者顽固的呼吸困难。因此, 血栓事件并不是导致患者死亡的原因。