

文章编号:1000-5404(2013)21-2295-06

论著

大鼠骨髓间充质干细胞向膀胱平滑肌细胞分化的标志基因表达受组蛋白乙酰化调控

徐梦遥,王延洲,徐惠成 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

[摘要] 目的 通过骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)与膀胱平滑肌细胞(bladder smooth muscle cells, BSMCs)接触共培养探讨组蛋白乙酰化对 BMSCs 分化能力的影响。方法 分别采用密度梯度离心法和胶原酶消化法培养大鼠 BMSCs 及 BSMCs 至第3代,并对 BMSCs 进行了鉴定;以单独培养的 BMSCs 作为对照组,接触共培养的 BMSCs 为实验组;运用免疫荧光化学染色法分别对2组 BMSCs 中的平滑肌标志蛋白平滑肌 α 肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、平滑肌肌球蛋白重链(smooth muscle-myosin heavy chain, SM-MHC)、Calponin 进行检测,Western blot 检测 α -SMA 蛋白、Calponin 蛋白在 BMSCs 中的表达,并用微球菌核酸酶(micrococcal nuclease, MNase)对平滑肌3个标志基因的启动子区进行了染色质开放性的检测,同时运用了 ChIP 技术分析了 α -SMA、SM-MHC 启动子区组蛋白乙酰化水平对 BMSCs 向平滑肌分化的影响。结果 大鼠原代 BMSCs 流式检测显示 CD29 表达阳性,阳性率为 99.8%, CD31、CD45 表达阴性,阳性率为 6.30%、1.04%;免疫荧光显示平滑肌3种标志蛋白的表达均随时间的延长而增加;Western blot 结果显示随着共培养天数的增加 α -SMA 蛋白、Calponin 蛋白在实验组中的表达相比对照组有明显的增加;MNase 显示实验组的 BMSCs 启动子区染色质对核酸酶的敏感性明显高于对照组,ChIP 显示实验组中 BMSCs 平滑肌标志基因 α -SMA、SM-MHC、Calponin 启动子区 H4 乙酰化水平较未分化前明显增加($P < 0.05$)。结论 组蛋白乙酰化程度的增加促进了 BMSCs 向 BSMCs 分化。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;膀胱平滑肌细胞;组蛋白乙酰化;启动子

[中图分类号] R322.62; R329.2; R394.2

[文献标志码] A

Histone acetylation regulates expression of marker genes in differentiation of rat BMSCs to BSMCs

Xu Mengyao, Wang Yanzhou, Xu Huicheng (Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of histone acetylation on the differentiation capacity of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) directly co-cultured with bladder smooth muscle cells (BSMCs). **Methods** Density gradient centrifugation and collagenase digestion were used to train the rat BMSCs and BSMCs to the 3rd passage. After the cells were identified, BMSCs co-cultured with BSMCs were regarded as experimental cells, while the cells cultured alone as the control cells. Immunofluorescence assay was used to detect the expression of BMSCs landmark proteins, α -smooth muscle actin (α -SMA), smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC), and calponin in the 2 kinds of BMSCs. Western blotting was adopted to detect the protein levels of α -SMA and calponin. Micrococcal nuclease (MNase) was used to detect the promoter regions of the 3 marker genes for open chromatin, while ChIP technical analysis was used to detect the histone acetylation levels in the promoter regions of α -SMA and SM-MHC, and the effects of the levels on BMSCs to smooth muscle differentiation were determined. **Results** Our obtained primary rat BMSCs were positive to CD29 (99.8%), negative to CD31 and CD45 (positive rate of 6.30% and 1.04%). Immunofluorescence assay showed the expression of the 3 BSMCs landmark proteins was increased with time elapsing. Western blotting showed that the protein levels of α -SMA and calponin were significantly higher in experimental cells than in control cells with the elapse of co-culture time. MNase assay displayed that experimental BMSCs had significantly higher chromatin nuclease sensitivity in promoter regions than the control cells. ChIP showed the experimental BMSCs had significantly higher H4 acetylation level in the promoter region of α -SMA, SM-MHC and calponin

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(30801234)

[通信作者] 徐惠成,电话:(023)68765403, E-mail: Xuhuicheng@yahoo.com.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130914.1456.003.html>(2013-09-14)

when compared with the undifferentiated cells ($P < 0.05$). **Conclusion** The enhanced histone acetylation promotes BMSCs differentiation to BSMCs.

[Key words] bone marrow mesenchymal stem cells; bladder smooth muscle cells; histone acetylation, promoter

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (30801234). Corresponding author: Xu Huicheng, Tel: 86-23-68765403, E-mail: Xhuicheng@yahoo.com.cn

压力性尿失禁(stress urinary incontinence, SUI)指咳嗽或喷嚏等腹压增高的情况下出现的不自主的尿液自尿道外口流出^[1-2]。有研究发现,女性患压力性尿失禁的几率与年龄增长呈正相关,年龄越大,患病率越高,平均高发年龄在45~55岁。病因多与盆底松弛、雌激素减少和尿道括约肌退行性变等有关^[3]。间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是治疗括约肌功能障碍型(intrinsic sphincter deficiency, ISD)压力性尿失禁的理想细胞,临床上把BMSCs移植到尿失禁患者的尿道以及排尿相关肌肉的周围,希望通过成体组织细胞对BMSCs的诱导,使干细胞发生向相应成体细胞的分化,以弥补受损肌肉的排尿功能障碍。在表观遗传学中,基因的表达调控不仅受到其上核苷酸携带的遗传密码的调控,基因自身所在的染色质结构空间高级结构对基因的表达也有重要影响^[4]。本实验模仿BMSCs体内生存的微环境从表观遗传学角度来探讨经过接触共培养后乙酰化程度的改变是否增加了BMSCs目的基因启动子区的变化。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

3周龄雌性清洁级SD大白鼠,体质量约100g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

高糖DMEM培养基(HG-DMEM)、胎牛血清(FBS)、DMEM-F12、双抗、胰酶购于HyClone公司,PBS缓冲液(中杉金桥公司),II型胶原酶(Sigma公司),悬挂式细胞培养小室(Transwell, Millipore公司),抗平滑肌 α -肌动蛋白单克隆抗体(α -SMA),抗平滑肌肌球蛋白重链抗体(SM-MHC)、抗Calponin单克隆抗体购于Abcam公司,抗FITC山羊抗小鼠IgG(中杉金桥公司),DAPI(碧云天公司),ReverTraAce- α 逆转录试剂盒、 β -actin(康成公司),SYBRGreen定量PCR试剂盒(TOYOBO公司),GADPH(康成公司)。

1.3 细胞培养

1.3.1 大鼠BMSCs的分离与培养 按照Sun等^[5]的方法分离并培养BMSCs。无菌操作下取大鼠双侧胫骨、股骨,用培养液反复冲洗骨髓腔,1000 r/min,离心5 min,弃上层液,再重悬,缓慢加入1.073 g/mL的等体积Percoll密度梯度离心液,4℃2000 r/min,离心20 min,收集白色云雾状的第2层,PBS洗涤2~3次,1200 r/min,离心10 min去上清,加入DMEM-F12培养液中,含10%胎牛血清和100 U/mL链霉素,100 U/mL青霉

素,以 5×10^5 /mL接种于培养瓶,置37℃的5% CO₂培养箱中培养。24 h后更换培养基,以后每3天换液1次;待细胞接近80%~90%融合时传代。

1.3.2 膀胱平滑肌细胞培养 无菌操作下取雌性大鼠膀胱,眼科剪分离除去膀胱黏膜层和浆膜层,将平滑肌剪成1 mm × 1 mm组织块,37℃下0.25% II型胶原酶消化1 h,100目筛网过滤除去组织块,细胞悬液1000 r/min离心5 min,弃上清;吸管反复轻柔吹打,制成单细胞悬液,加入HG-DMEM培养液中,含10%胎牛血清和100 U/mL青霉素,100 U/mL链霉素,以 5×10^5 /mL接种于培养瓶,置37℃的5% CO₂培养箱中培养;24 h后更换培养基,以后每3天换液1次;待细胞接近80%~90%融合时传代。

1.4 共培养体系建立

1.4.1 接触共培养组 将悬挂式细胞培养小室Transwell下室的多孔膜(1 μ m)向上倒置于大培养皿中,将2代膀胱平滑肌细胞以 2×10^5 均匀种植于膜下室内,培养箱中培养6 h后取出,翻转Transwell,洗去未贴壁细胞,将Transwell放回6孔板中继续培养,每3天换液1次,直至细胞长至单层融合,次日将BMSCs 2×10^5 均匀种植于膜内面,小室内加入BMSCs培养液,置培养箱中培养并计时,每2天换液1次。

1.4.2 混合共培养组 将2代BSMCs加入标记绿色荧光的腺病毒,24 h后在荧光显微镜观察,待BSMCs 80%~90%感染绿色荧光后,取第2代BMSCs,将两种细胞分别消化后,置入已放有小盖玻片的6孔板中贴壁生长,待细胞接近40%~50%融合后,进行免疫荧光检测。

1.5 细胞鉴定

1.5.1 流式细胞仪检测 取 1×10^6 个BMSCs细胞,分别加入流式细胞抗体CD29、CD31、CD45,3种抗体均为FITC标记,均购自Abcam公司。4℃避光孵育30 min,加PBS至150 μ L重悬细胞后用流式细胞仪检测(BD FACSCalibur)并以WinMD 12.9分析软件分析并记录结果。

1.5.2 免疫荧光化学染色 运用免疫细胞化学染色方法检测BMSCs中平滑肌 α -肌动蛋白(α -SMA)、Calponin及平滑肌肌球蛋白(SM-MHC)的表达情况,并检测在共培养的第4天BMSCs中Calponin的表达情况;接触共培养的半透膜在固定前用棉签将Transwell下室内擦净,并用PBS冲洗2次,用4%多聚甲醛固定长有细胞的半透膜及BSMCs爬片,30 min后分别用ddH₂O和PBS漂洗3次;随后0.3% Triton X-100 4℃透化10 min,PBS漂洗3次;5% BSA室温下封闭30 min;按1:200稀释抗 α -SMA单克隆抗体,抗Calponin单克隆抗体,抗SM-MHC抗体,随后4℃孵育过夜,PBS漂洗3次,FITC山羊抗小鼠IgG(1:100稀释)室温避光孵育1 h,PBS漂洗3次,DAPI室温孵育10 min,随后PBS漂洗后水溶胶封片,在激光共聚焦显微镜下观察细胞。

1.6 Western blot 检测

分别将细胞用0.25%的胰酶消化,加入600 μ L细胞裂解液(2×10^6 个细胞,内含磷酸酶抑制剂),置冰上30 min后,4 $^{\circ}$ C、15 000 $\times g$ 离心30 min,上清液即为总蛋白溶解成分。上清液加等量2倍十二烷基硫酸钠上样缓冲液在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后电转膜到醋酸纤维素膜上,用5%脱脂奶粉封闭,分别以兔抗鼠 α -SMA(1:1 000),兔抗鼠SM-MHC(1:1 000),兔抗鼠Calponin(1:1 000)为一抗,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(1:1 000)为二抗进行抗原抗体反应,发光试剂盒显色。

1.7 微球菌核酸酶实验

PCR检测进行不同时间微球菌核酸酶处理的实验组与对照组中3个标志性基因 α -SMA、Calponin、SM-MHC启动子区染色质开放性。3种标志性基因启动子引物均由上海生工合成, α -SMA上、下游序列:5'-CCGCAGTTACAGTGATTC-3'、5'-GCTAAGGGCTTGAGATGA-3'; Calponin上、下游序列:5'-CAGTCA-GCTCCAATACCAA-3'、5'-TTCCAAGCCTGTCCCATT-3'; SM-MHC上、下游序列:5'-CAGATCCGTACAGGGCTAA-3'、5'-TGCCTGG-GACCAATAAC-3'。对实验组与对照组行总DNA提取,后进行Micrococcal Nuclease反应,反应体系为DNA 10 μ L;10 \times Buffer 10 μ L;Micrococcal Nuclease 5 U,补水至100 μ L,分5个时间点37 $^{\circ}$ C反应5~60 min,反应完后加0.5 mol/L EDTA 10 μ L终止反应,酶解产物用酚氯仿抽提。取2 μ L酶解产物为模板进行PCR扩增,反应条件为94 $^{\circ}$ C 5 min变性后进入循环,94 $^{\circ}$ C,30 s \rightarrow 57 $^{\circ}$ C,30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C,30 s,30个循环后72 $^{\circ}$ C 10 min结束反应;取15 μ L PCR反应产物用1%的琼脂糖凝胶电泳;对PCR产物运用凝胶分析软件对DNA的量进行定量分析。

1.8 染色质免疫共沉淀检测

ChIP检测 α -SMA、SM-MHC和Calponin启动子区H4表观遗传修饰状态,引物参见1.6。Transwell上室面取培养组和对照组中BMSCs,用甲醛固定活细胞,超声将DNA打断成不同大小的片段,用目的蛋白质特异性抗体H4免疫沉淀该蛋白质-DNA复合物,复合物65 $^{\circ}$ C解交联,分离纯化DNA,后进行PCR扩增,扩增条件为98 $^{\circ}$ C 30 s,变性94 $^{\circ}$ C 20 s,退火60 $^{\circ}$ C 1 min,延伸60 $^{\circ}$ C 1 min,共40个循环;Q-PCR检测BMSCs分化前后平滑肌标志性基因启动子区乙酰化差异。

1.9 统计学分析

采用SPSS 15.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行配对样本t检验。

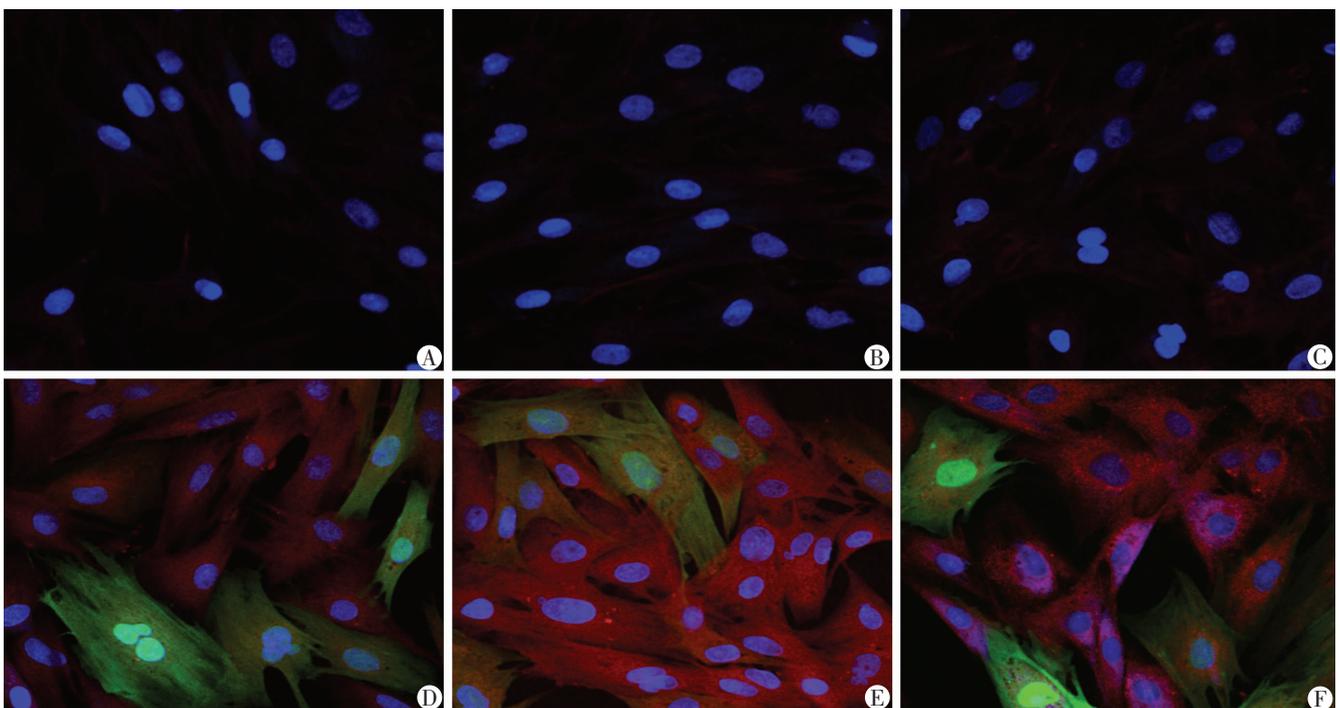
2 结果

2.1 流式细胞仪检测BMSCs表面标记

对BMSCs行流式细胞仪检测发现,BMSCs稳定表达中胚层来源的细胞表面分子CD29,阳性率为99.8%,不表达内皮细胞的特征性表型标志CD31和造血干细胞系的表面标志CD45,阳性率分别6.30%、1.04%,符合干细胞表面标志特征。

2.2 免疫荧光化学染色检测BSCs对BMSCs诱导分化的影响

BMSCs单独培养4 d后, α -SMA、SM-MHC、Calponin在细胞中的表达情况,分别见图1A~C。BMSCs与BSCs共培养4 d后 α -SMA、SM-MHC、Calponin在BMSCs中表达情况见图1~F。免疫荧光染色结果显示,共培养4 d后 α -SMA、SM-MHC、Calponin红色荧光亮度明显高于共培养前,表明 α -SMA、SM-MHC、Calponin蛋白的表达在共培养后明显增加。

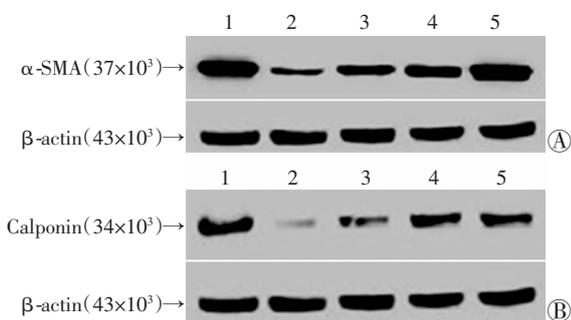


A: BMSCs单独培养4 d后 α -SMA在细胞中的表达; B: BMSCs单独培养4 d后SM-MHC在细胞中的表达; C: BMSCs单独培养4 d后Calponin在细胞中的表达; D: 共培养4 d后 α -SMA在BMSCs细胞中的表达; E: 共培养4 d后SM-MHC在BMSCs细胞中的表达; F: 共培养4 d后Calponin在BMSCs细胞中的表达;绿色为BSCs细胞;红色为BMSCs细胞;蓝色为DAPI免疫荧光染色

图1 共聚焦显微镜下观察BSCs对BMSCs诱导分化的影响 ($\times 400$)

2.3 Western blot 检测 α -SMA、Calponin 在 BMSCs 中的表达

α -SMA 蛋白、Calponin 蛋白在 BMSCs 中本身有少量表达。随着共培养天数的增加,两种蛋白在实验组中的表达相比对照组有明显的增加(图2)。

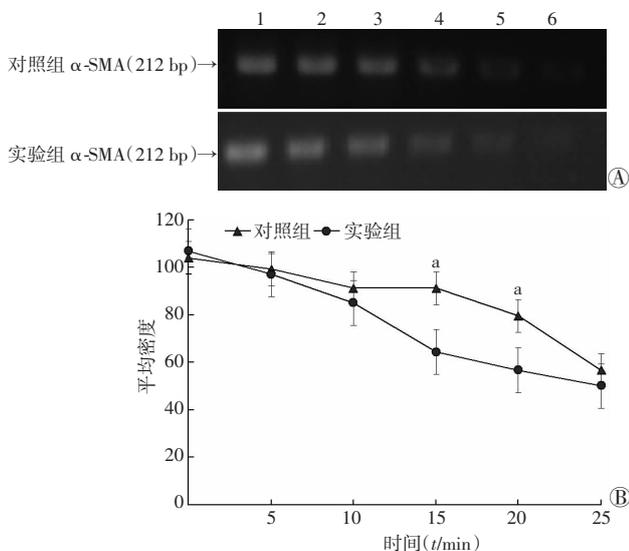


1: BMSCs; 2: BMSCs; 3~5: 两种细胞共培养 2、4、6 d; A: α -SMA; B: Calponin

图2 Western blot 检测 BMSCs、BMSCs 中 α -SMA、Calponin 蛋白表达

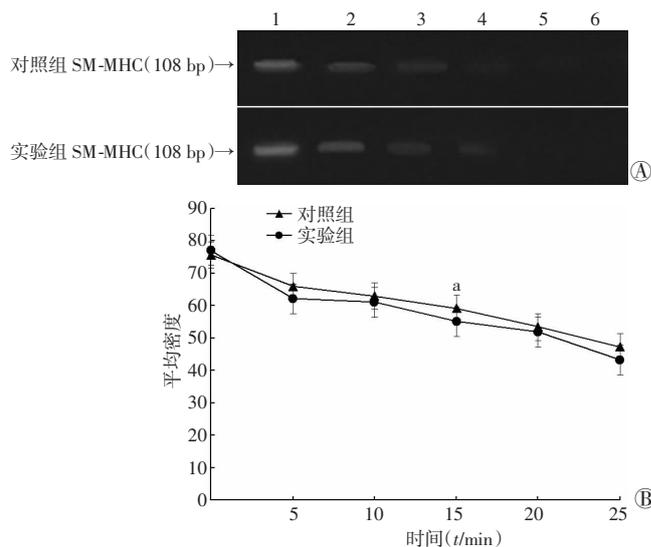
2.4 微球菌核酸酶试验检测 BMSCs α -SMA、SM-MHC 启动子区染色质开放性

以反应 0 min 的 PCR 产物量为参照,在各个处理的时间点上 PCR 产物量与参照的比值来衡量染色质区域对微球菌核酸酶的敏感性;检测 3 个标志性基因 α -SMA、Calponin、SM-MHC 启动子区染色质开放性,电泳结果显示实验组中 α -SMA 在 15 min 和 20 min 时其 PCR 扩增效率明显低于对照组 ($P < 0.05$);实验组中 Calponin 在 15 min 时其 PCR 扩增效率明显低于对照组 ($P < 0.05$);实验组中 SM-MHC 在 15、20 min 和 25 min 时其 PCR 扩增效率明显低于对照组 ($P < 0.05$)。见图 3~5。



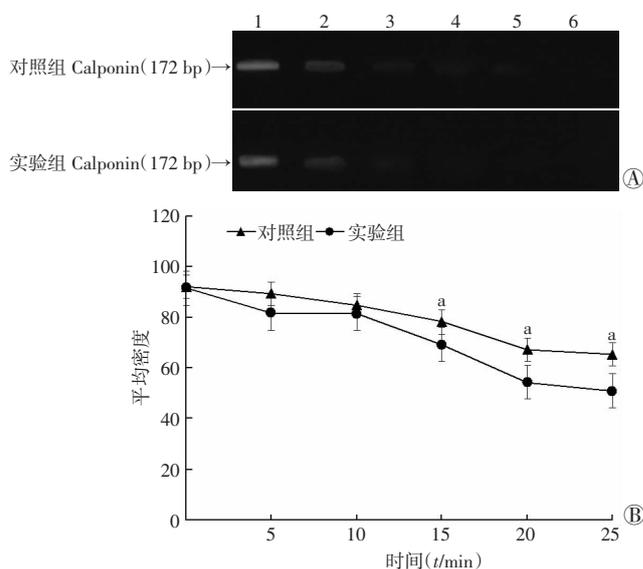
A: 电泳结果 1: 0 min; 2: 5 min; 3: 10 min; 4: 15 min; 5: 20 min; 6: 25 min; B: 平均密度分析; a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图3 微球菌核酸酶实验检测 BMSCs α -SMA 启动子区染色质开放性



A: 电泳结果 1: 0 min; 2: 5 min; 3: 10 min; 4: 15 min; 5: 20 min; 6: 25 min; B: 平均密度分析; a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图4 微球菌核酸酶实验检测 BMSCs SM-MHC 启动子区染色质开放性

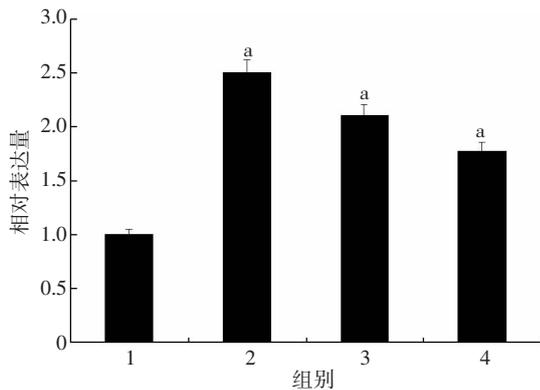


A: 电泳结果 1: 0 min; 2: 5 min; 3: 10 min; 4: 15 min; 5: 20 min; 6: 25 min; B: 平均密度分析; a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图5 微球菌核酸酶实验检测 BMSCs Calponin 启动子区染色质开放性

2.5 ChIP 检测 BMSCs α -SMA、SM-MHC、Calponin 启动子 H4 乙酰化水平

BMSCs 分化后 α -SMA、SM-MHC、Calponin 启动子组蛋白 H4 乙酰化水平见图 6。由图 6 可知 BMSCs 分化后 α -SMA、SM-MHC、Calponin 启动子组蛋白 H4 乙酰化水平平均高于对照组 ($P < 0.05$);即组蛋白 H4 乙酰化使 BMSCs 平滑肌标志性基因启动子区结构松解,促进 BMSCs 向平滑肌的分化。



1:对照组;2:α-SMA 实验组;3:SM-MHC 实验组;4:Calponin 实验组 a: P < 0.05, 与对照组比较

图6 ChIP 检测 BMSCs α-SMA、SM-MHC、Calponin 启动子 H4 乙酰化水平 (Calponin)

3 讨论

微环境在干细胞的定向诱导分化机制中起最主要作用,骨髓间充质干细胞 BMSCs 属于成体干细胞的一种,其特性稳定并具有多向分化潜能,现已是治疗括约肌功能障碍 (intrinsic sphincter deficiency, ISD) 型压力性尿失禁的理想细胞,但临床上通过成体组织细胞对 BMSCs 诱导,希望其能向相应成体细胞分化的疗法并没有获得预期的疗效,究其原因 BMSCs 诱导分化的机制研究较少,很多关键性的问题没有解决直接影响着干细胞在临床上的治疗效果^[5-6]。本实验观察到 MSCs 在体外膀胱平滑肌细胞微环境中可向平滑肌细胞表型分化,提示指导 BMSCs 定向分化的信号存在于平滑肌细胞生存的微环境中,通过一些经典的细胞信号途径、细胞周期以及细胞信号相关途径,从而使细胞在结构、功能等方面发生改变^[7-8]。

近年来表观遗传学的发展为治疗调控异常所产生的多种疾病提供了新思路、新方向。表观遗传作用方式有很多种,组蛋白乙酰化就是其中一种。Kaneda 等^[9] 新近研究表明,基因组转录活跃区域内染色质结构松散,允许转录因子结合,而在非转录活跃区,染色质有更加紧密的结构,从而抑制转录因子的结合。Kulkarni 等^[10] 发现,启动子附近的组蛋白乙酰化水平升高可影响多种生物的可诱导基因的转录起始,染色质和核小体构型的改变在转录的起始过程中起到了重要的调控作用。本研究中运用了 MNase 及 ChIP 检测技术,通过 MNase 实验我们可以初步的判断 BMSCs 是通过其特定基因的组蛋白修饰发生对邻近启动子染色体区空间结构的解聚,来调控邻近基因的表达,通过 ChIP 检测我们可以灵敏的检测目标蛋白与特异 DNA 片段的结合情况,从而了解到某种转录因子与启动子 DNA 直接和间接的相互作用。本研究表明,随着时间的递增,分化后的 BMSCs 3 个标志性基因启动子

区的 PCR 扩增效率明显的低于未分化的 BMSCs,核酸酶敏感性的提高说明启动子开放性增强,使 DNA 双链更容易暴露和解链,因此通过接触共培养可改变启动子染色体区域染色质的敏感性,开启上游抗性基因和下游报告基因的表达,增加外源基因的转化效率和转化频率,与 Kaneda^[9] 和 Kulkarni 等^[10] 国内外其他相关研究结果一致^[11]。Shih 等^[12] 研究深入的发现,组蛋白乙酰化与基因转录活性有着密切的关系:它可使 DNA 与组蛋白间作用减弱,核小体被释放,从而使转录因子和 RNA 聚合酶可以与 DNA 上特异的启动子结合,启动靶基因的转录。本实验运用 ChIP 技术表明了共培养后 BMSCs 的 3 个平滑肌标志性基因启动子组蛋白 H4 的乙酰化水平明显高于分化前,乙酰化水平的升高说明启动子区开放性增强,与 Shih 研究发现相一致。

本课题组前期已发现蛋白去乙酰化酶抑制剂丁酸钠可以引起细胞核内组蛋白的超乙酰化,并证明了组蛋白乙酰化程度的增加能促进 BMSCs 的分化。在真核细胞中,组蛋白乙酰化/去乙酰化对染色质结构及基因转录的调控是一个多层次、多步骤的复杂过程^[13]。BMSCs 向平滑肌分化需要转录调控因子与 BMSCs 中平滑肌标志性基因启动子的结合,其有一定的前提条件,这个条件就是目的基因启动子上组蛋白的乙酰化,组蛋白乙酰化修饰使基因结构发生松解,转录因子才得以与目的基因启动子上顺势作用原件相结合,实现其上下游基因的转录^[14-16]。随着对骨髓间充质干细胞的深化研究以及不断完善间充质干细胞分选、纯化方案,阐明诱导分化的作用机制,从中找到最合适的诱导条件,为骨髓间充质干细胞应用于临床提供更广阔的治疗前景。

参考文献:

- [1] Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells *in vivo* [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, 47(2): 126-131.
- [2] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(9): 726-736.
- [3] Rittfeld G J, Nandoe-Tewarie R D, Vajn K, *et al*. Bone marrow stromal cell-mediated tissue sparing enhances functional repair after spinal cord contusion in adult rats [J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(7): 1561-1575.
- [4] Passier R, van-Laake L W, Mummery C L. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart [J]. *Nature*, 2008, 453(7193): 322-329.
- [5] Kang N, Liu X, Guan Y, *et al*. Effects of co-culturing BMSCs and auricular chondrocytes on the elastic modulus and hypertrophy of tissue engineered cartilage [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(18): 4535-4544.
- [6] Conforti P, Camnasio S, Mutti C, *et al*. Lack of huntingtin promotes neural stem cells differentiation into glial cells while neurons expressing huntingtin with expanded polyglutamine tracts undergo cell death [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 50: 160-170.
- [7] Yu R K, Tsai Y T, Ariga T. Functional roles of gangliosides in neuro-

- development: an overview of recent advances[J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(6): 1230-1244.
- [8] Zhang W B, Cheng M J, Huang Y T, et al. A study *in vitro* on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into endometrial epithelial cells in mice[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2012, 160(2): 185-190.
- [9] Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, et al. Genome-wide histone methylation profile for heart failure [J]. *Genes Cells*, 2009, 14(1): 69-77.
- [10] Kulkarni A, Chavan-Gautam P, Mehendale S, et al. Global DNA methylation patterns in placenta and its association with maternal hypertension in pre-eclampsia[J]. *DNA Cell Biol*, 2011, 30(2): 79-84.
- [11] El-Serafi A T. Epigenetic Modifiers and Stem Cell Differentiation [M]//Hayat E. *Stem Cells and Cancer Stem Cells*, Springer, 2012, 8: 147-154.
- [12] Shih A H, Abdel-Wahab O, Patel J P, et al. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(9): 599-612.
- [13] 朱静, 冯川, 李莉, 等. 干扰组蛋白乙酰化引发间充质干细胞心肌定向分化特定蛋白的异常表达[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(4): 303-306.
- [14] Yang L, Chang N, Liu X, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate to hepatic myofibroblasts by transforming growth factor- β 1 *via* sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(1): 85-97.
- [15] Wan J X, Zou Z H, You D Y, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiation into tubular epithelial-like cells *in vitro* [J]. *Cell Biochem Funct*, 2012, 30(2): 129-138.
- [16] Zhang J F, Zhao F S, Wu G, et al. Therapeutic effect of co-transplantation of neuregulin 1-transfected-Schwann cells and bone marrow stromal cells on spinal cord hemisection syndrome[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 497(2): 128-133.
- (收稿:2013-05-31;修回:2013-06-17)
(编辑 吴培红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2013)21-2300-01

结节性脂膜炎误诊肺结核 1 例

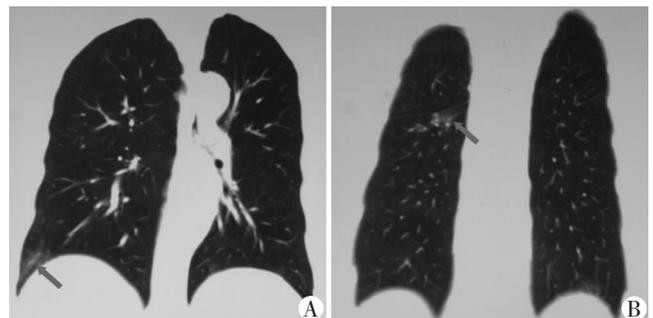
孙芬芬¹, 曹 晖², 曹国强¹ (400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所:呼吸内科¹, 放射科²)

[关键词] 结节性脂膜炎; 肺结核; 误诊
[中图分类号] R586.904 [文献标志码] B

1 临床资料

患者, 女性, 60岁。因“间断发热、头痛伴双下肢、双侧膝踝关节疼痛5d”于2012年6月19日入院。5d前患者无明显诱因出现发热, 体温在38.5℃, 午后或夜间出现畏寒、寒颤后发热, 症状持续2~3h, 出汗后体温逐渐恢复正常。发热时感头部持续性胀痛、双下肢关节疼痛, 左侧足背可见一2cm×2cm大小红斑, 表面皮温稍高、轻压痛, 不影响下肢活动。胸部CT示右肺下叶实变影(图1), 血常规提示:WBC 3.07×10⁹/L、RBC 3.66×10¹²/L、HGB 106g/L、NEU 75.9%, 肝肾功能、降钙素原、真菌1-3- β -D葡聚糖均无异常。6月26日, 结核感染细胞斑点实验(T-SPOT.TB)为阳性; 结核抗原A孔斑点数12, 结核抗原B孔斑点数0(正常值范围均为0~6), ESR 38mm/h, 临床诊断右肺结核。遂给予异烟肼、利福平、吡嗪酰胺、盐酸乙胺丁醇诊断性抗结核治疗, 治疗2d后体温降至正常。7月4日患者诉上腹部不适, 频繁恶心、呕吐, 肝功能显示AST 363.9U/L、ALT 163.6U/L、GGT 41.5U/L、LDH 407.4U/L, 考虑结核药物肝损害, 停止抗结核治疗, 给以保肝、止吐等对症治疗。7月14日再次出现畏寒、发热伴双下肢酸胀不适, 复查胸部CT示右下肺实变灶较前稍增多, 且出现左下肺病灶, 调整抗结核药物为硫酸阿米卡星、异烟肼、盐酸乙胺丁醇、盐酸莫西沙星片的治疗方

案。抗结核治疗2d后体温降至正常, 继续给予抗结核治疗。8月28日患者无明显诱因再次出现发热, 院内会诊认为自身免疫性疾病不能除外, ANA检测示呈弱阳性、胞浆颗粒型、滴度1:100, 尿常规潜血(+~++)。10月16日因怀疑足结核行左足部红斑活检, 提示脂肪间组织慢性炎。之后患者病情反复, 特点如前。期间曾因“不明原因发热”行全身PET/CT检查2次, 均未见异常。9月中旬给予停结核药物观察, 一直持续到2012年10月中旬, 患者至北京协和医院就诊。北京协和医院医生调阅我院病理切片, 结合患者的临床资料综合分析, 诊断为“结节性脂膜炎”, 给予口服激素治疗30mg(5mg/片)口服1次/d, 诊断性治疗, 每周减量1片, 逐渐减量至1片, 口服1周后停药。停药2个月后随访患者未再出现畏寒发热以及双下肢关节疼痛等不适, 故此病例临床诊断为结节性脂膜炎。



A: 右下肺背段; B: 外基底段 ↑: 示斑片状阴影
图1 结节性脂膜炎误诊肺结核患者胸部CT表现

[通信作者] 曹国强, E-mail: cgg1963@163.com
[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1558.022.html> (2013-06-19)