文章编号:1000-5404(2011)16-1667-05

论著

少突胶质细胞相关 microRNA 差异性调控大脑和小脑神经前体细胞的增殖

贺雪莲[1,2*],于 洋[2*],周永杰[3],何 立[2],陈 祥[2,4],肖 岚[5],鲁 青[2,6],王 凡[1] (610041 成都,四川大学:基础与法医学院解剖教研室[1],华西第二医院发育干细胞研究所[2],华西医院移植工程与移植免疫卫生部重点实验室[3],生命科学学院[4];400038 重庆,第三军医大学基础医学部组织与胚胎学教研室,重庆市神经科学重点实验室[5];Department of Developmental Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, 75390 TX[6])

[摘要] **目的** 探讨少突胶质细胞相关 microRNA(miRNA)对中枢神经系统神经前体细胞增殖的作用。**方法** 利用 Dicer1loxp/loxp 基因型小鼠和 Olig1-Cre 品系小鼠杂交获得 miRNA 加工酶 Dicer 基因条件性敲除小鼠,再用免疫荧光染色和 BrdU 标记等技术检测这种 Dicer 条件性敲除小鼠大脑和小脑中神经前体细胞的增殖,以及脊髓中新生神经元的变化情况。**结果** Dicer 条件性敲除小鼠大脑中神经前体细胞增殖加快,而小脑中增殖细胞数目较正常小鼠减少(12%, $P<0.05$)。此外脊髓中神经元的数目并未受到影响。**结论** 少突胶质细胞相关 miRNA 对中枢神经系统的胶质细胞的发生和增殖具有时空特异性或差异性调节作用。

[关键词] miRNA;少突胶质细胞;细胞增殖;基因敲除
[中图法分类号] R322.81;R329.28;R394-33 [文献标志码] A

Oligodendrocyte-related miRNAs differentially regulate proliferation in neural progenitor cells from mouse cerebrum and cerebellum

He Xuelian[1,2], Yu Yang[2], Zhou Yongjie[3], He Li[2], Chen Xiang[2,4], Xiao Lan[5], Lu Qing[2,6], Wang Fan[1] ([1]Department of Anatomy, College of Pre-Clinical and Forensic Medicine, Sichuan University; [2]West China Developmental and Stem Cell Institute, Sichuan University West China Women's and Children's Hospital, Chengdu, Sichuan Province, 610041; [3]Laboratory of Transplant Engineering and Immunology, West China Hospital; [4]School of Life Science, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041; [5]Department of Histology and Embryology, Chongqing Key Laboratory of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medial University, Chongqing, 400038, China; [6]Department of Developmental Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, 75390 TX, USA)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of oligodendrocyte-related microRNAs (miRNAs) on the proliferation of neural progenitor cells in the central nerve system. **Methods** Heterozygous mice (Olig1-Cre) were crossed with mice ($Dicer1^{loxp/loxp}$) to obtain crossbred mice (Olig1-$Cre^{+/-}$; $Dicer1^{loxp/wt}$), and the crossbred mice were then bred with mice ($Dicer1^{loxp/loxp}$) to produce Dicer-CKO mice (Olig1-$Cre^{+/-}$; $Dicer1^{loxp/loxp}$). The Dicer-CKO mice were subject to immunohistochemical assay and BrdU labeling to evaluate the proliferation in oligodendrocyte precursor cells in the cerebrum and cerebellum and the change in the neuron number of the spinal cord. **Results** The proliferation of oligodendrocyte precursor cells was increased in the cerebral cortex but decreased in the cerebellum in the Dicer-CKO mice, while the number of neurons in the spinal cord had no change. **Conclusion** Oligodendrocyte-related miRNAs regulate the proliferation of neural progenitor cells differentially in the cerebrum and cerebellum.

[**Key words**] miRNA; oligodendrocyte; precursor proliferation; gene knockout

Supported by the National Basic Research Program of China (973 Programm, 2010CB529403) and the National Natural Science Foundation of China (30870801). He Xuelian and Yu Yang are the first author who contributed equally to the article. Corresponding author: Lu Qing, Tel: 86-28-85502853, E-mail: qrichard.lu@utsouthwestern.edu, Wang Fan, Tel:86-28-85502798, E-mail: fanwang518@163.com

少突胶质细胞是中枢神经系统髓鞘形成细胞,在中枢神经系统的发育和功能稳定方面发挥着极其重要的作用。少突胶质细胞髓鞘再生障碍会导致神经的退化和降解,导致中枢神经脱髓鞘疾病如多发性硬化症和脑白质营养不良症等。了解控制少突胶质细胞发育和髓鞘生成的分子机制髓鞘修复有重要意义[1]。

在神经发育过程中,多能神经干细胞首先发育为少突胶质细胞前体(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)[2-3],进而分化为成熟少突胶质细胞并生成髓

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2010CB529403);国家自然科学基金(30870801)
* 同等贡献者
[通信作者] 鲁 青,电话:(028)85502853,E-mail: qrichard.lu@utsouthwestern.edu
王 凡,电话:(028)85502798,E-mail: fanwang518@163.com

鞘的过程受多种信号通路如 Shh、Wnt、Bmp 和 Notch 等的调节[4-5]。这些信号通路一般最终通过转录因子与 DNA 结合或改变染色质结构来调节转录事件从而控制少突胶质细胞的发育分化。因此,对少突胶质细胞系发育的转录调节已经成为了解促进少突胶质细胞前体细胞发育机制的关键[6-8]。但迄今对少突胶质细胞发育和髓鞘生成的分子机制还知之甚少。

近年来小非编码微小 RNA(microRNAs,miRNAs)介导的转录后调控已经成为多种生理和疾病过程(如细胞增殖,分化,凋亡,应激反应和肿瘤生成等)的主要调控点。我们也首次发现 miRNAs 对大脑髓鞘形成和细胞命运决定方面发挥了重要作用[10-11],但目前还不清楚 miRNAs 对中枢神经系统神经前体细胞生长发育的影响。本研究通过特异性敲除少突胶质细胞系中大多数 miRNAs 生物合成所必需的酶基因 Dicer1,观察大脑、小脑中神经前体细胞的增殖,以及脊髓中新生神经元的变化情况。旨在阐明胶质细胞系 miRNAs 对 CNS 不同区域神经前体细胞增殖能力的调节作用。

1 材料与方法

1.1 动物和组织处理

Dicer$^{loxp/loxp}$基因型的小鼠购买于 Jackson 实验室(品系名称为:B6.cgDicer1^{tm1bdh}/J)[12]。所有动物实验通过了美国德州大学西南医学中心和四川大学实验动物委员会的批准和认可,饲养条件为 SPF 级。

将 Olig1cre 杂合子的小鼠和 Dicer$^{loxp/loxp}$的小鼠杂交以获得 Olig1-Cre +/−; Dicer$^{loxp/wt}$的后代,再用这种后代和 Dicer$^{loxp/loxp}$的小鼠杂交即可获得 Dicer1 敲除(Olig1-Cre +/−;Dicer$^{loxp/loxp}$)的小鼠,而 Olig1-Cre +/−;Dicer$^{loxp/wt}$的小鼠发育情况和野生型小鼠一样正常。

1.2 RT-PCR 鉴定动物基因型

Dicer 基因分型引物为 5′-CCTGACAGTGACGGTCCAAAG-3′ 和 5′-CATGACTCTTCAACTCAAACT-3′,带有 Loxp 位点的等位基因 PCR 产物 420 bp,野生型等位基因的 PCR 产物为 351 bp;Cre 基因分型引物序列为:5′-CACCCTGTTACGTATAGCCG-3′和 5′-GAGTCATCCTTAGCGCCGTA-3′;内参引物为:5′-CCTAGGCAC-CAGGGTGTGAT-3′和 5′-TCACGGTTGGCCTTAGGGTT-3′。PCR Tm 值为 60 ℃,反应 30 个循环。

Dicer1$^{loxp/loxp}$、Olig1-Cre 基因型小鼠为目的基因条件性敲除的突变小鼠,Dicer1$^{loxp/wt}$、Olig1-Cre 基因型小鼠为对照组小鼠。每组实验每个基因型至少取 3 只出生后 2 周的小鼠(雌雄不拘)进行重复。

1.3 免疫组化与 BrdU 标记

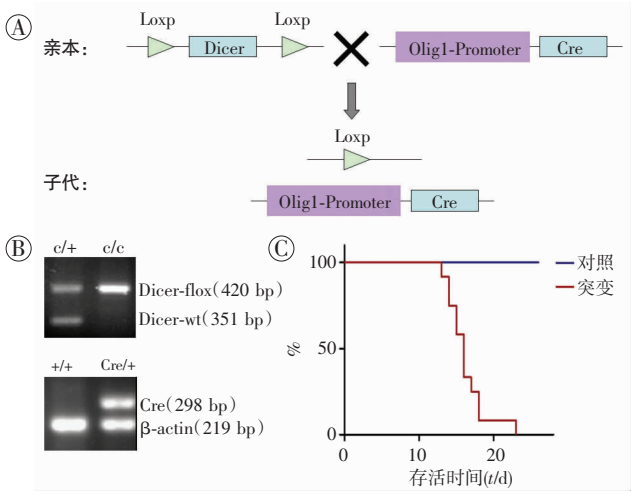
小鼠取材前腹腔注射 100 mg/kg 的 BrdU,3 h 后收样用于 BrdU 掺入标记实验。脑组织在 4% 的多聚甲醛溶液中固定 3 h 后采取振动切片的方式处理。30 μm 的脑冠状切片用含有 5% 山羊血清和 0.1% Triton X-100 的 PBS 溶液封闭,一抗(Olig2(Millipore),NeuN (Millipore) 和 BrdU (BD Bioscience),4 度孵育过夜,二抗(Jackson lab Immunoresearch)常温下震荡孵育2 h,DAPI (1:20 000, Sigma)振荡孵育 15 min。

脊髓在 4% 的多聚甲醛溶液中固定 1 h 后用含有 20% 蔗糖的 PBS 溶液脱水,用 OCT 在干冰上包埋。18 μm 冰冻切片的免疫荧光处理方法同上。封片后用 Nikon Eclipse 80i 正置荧光显微镜和 Zeiss 共聚焦显微镜采集分析。BrdU 或 Oig2 阳性细胞比例是基于其与 DAPI 阳性细胞总数的比值。结果利用 SPSS V 17.0 进行 t 检验。

2 结果

2.1 少突胶质细胞系中条件性敲除(CKO)Dicer 小鼠模型的获得

利用少突胶质细胞 Olig1 特异性敲掉 Dicer 基因小鼠制备策略(图 1A),通过 PCR 方法鉴定新生小鼠的基因型(图 1B),最终得到目的小鼠(Dicer1$^{loxp/loxp}$、Olig1-Cre),它们的出生符合孟德尔遗传规律,但是出现明显的震颤和共济失调,而且与对照组的小鼠相比,它们的生存能力更差,并且在出生后 3 周左右就会死亡(图 1C)。



A:通过 Dicer1$^{loxp/loxp}$基因型的小鼠和 Olig1-Cre 品系的小鼠杂交,以获得目的小鼠(Dicer1$^{loxp/loxp}$,Olig1-Cre +/−)示意图;B:凝胶电泳结果;C:生存分析

图 1 目的转基因小鼠的获得及小鼠的存活情况

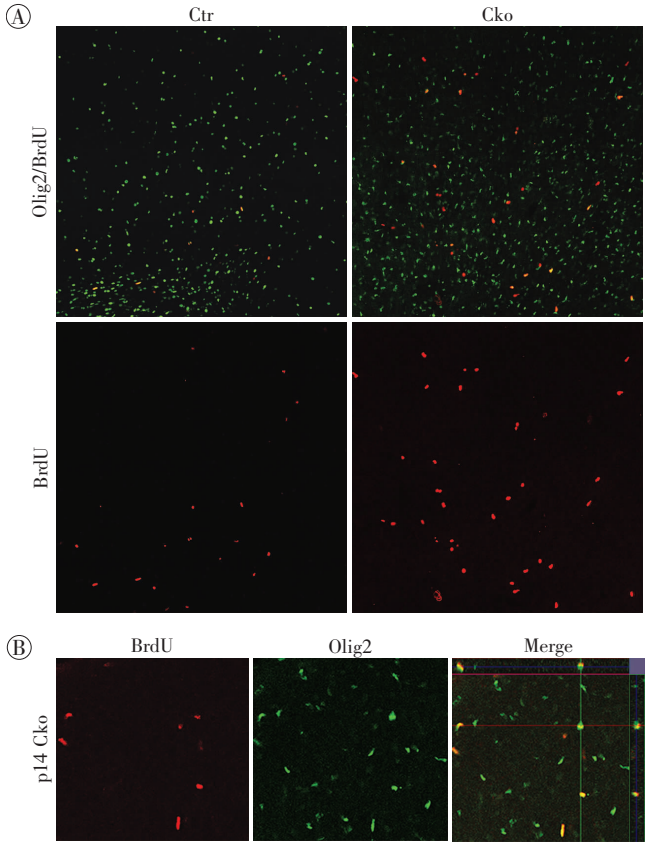
2.2 少突胶质细胞系中特异性敲除 Dicer 促进大脑和脊髓 OPC 的增殖

在出生后 21 d Dicer 条件性突变小鼠的大脑皮层中,我们观察到 BrdU^{+}和 Olig^{2+}的细胞数目明显增加,出生后 21 d 的突变小鼠(DicerCko)大脑皮层中少突胶质细胞系分子标记物 Olig2(绿色)大量增加,BrdU 阳性的细胞(红色)数目也显著增加($P<0.01$),说明 Dicer 的条件性缺失促进细胞增殖(图 2A)。突变小鼠大脑皮层中几乎所有(>96%)BrdU 阳性的细胞都是 Olig2 阳性的,而非神经元或星形胶质细胞系。与之相对的是,对照小鼠大脑皮层中 BrdU 阳性细胞数目很少,而且只有很小部分表达 Olig2(<10%)。我们进一步运用 Z-stack 技术,验证 Olig2 和 BrdU 存在亚细胞共定位,第 14 天 Dicer 突变小鼠皮层中增殖细胞(BrdU 阳性细胞)同时表达 Olig2(图 2B)。

2.3 少突胶质细胞系中特异性敲除 Dicer 对神经元数目没有影响

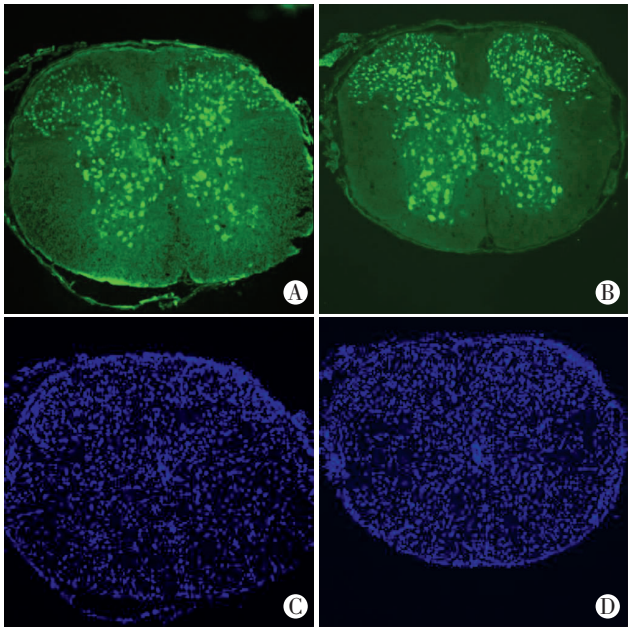
为了探究在少突胶质细胞系中特异性的敲除 Dicer 基因后

神经元的数目变化情况，免疫组化结果显示神经元特异标记物 NeuroN 与 DAPI（细胞总数）的比例在突变鼠与野生型小鼠的脊髓中相比没有明显的区别（图 3）。



A：免疫组织荧光观察（×10）；B：激光共聚焦显微镜观察（×20）

图 2　小鼠大脑皮层 olig2 与 BrdU 的免疫荧光双标鉴定

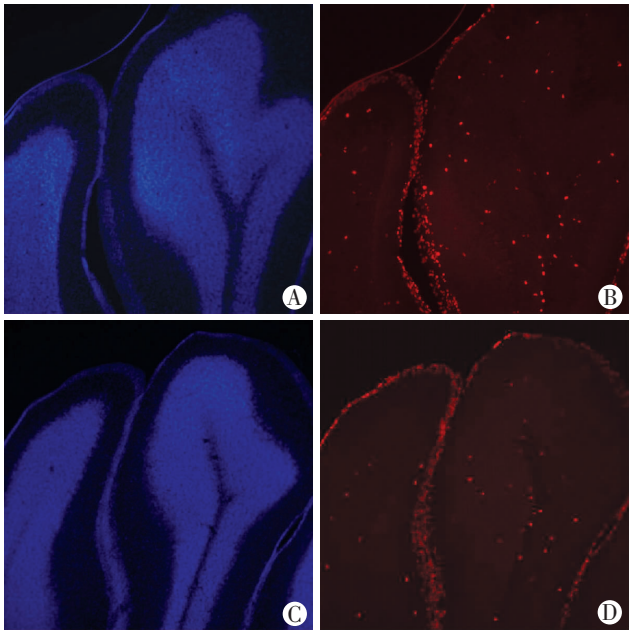


A，C：对照组的 NeuroN 与 DAPI 免疫标记；B，D：突变组的 NeuroN 与 DAPI 免疫标记 NeuroN（绿色）：神经元特异性标记物；DAPI（蓝色）：细胞核

图 3　小鼠脊髓 NeuroN 的免疫荧光鉴定　（荧光显微镜 × 10）

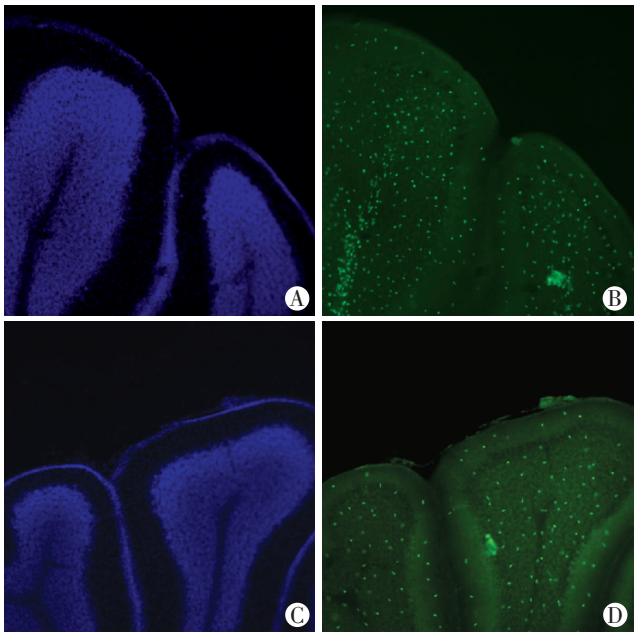
2.4　少突胶质细胞系中特异性敲除 Dicer 抑制小脑 OPC 的增殖

我们通过免疫组化方法和 BrdU 浸入实验分别检测第 14 天小鼠小脑细胞总数和新增细胞数量的变化。结果发现，野生型和突变鼠小脑中的细胞总数差别不大，但是在突变鼠小脑中新增细胞和 Olig2 阳性细胞数量与野生型的相比明显减少（图 4、5）。这说明在少突胶质细胞系中特异性的敲除 Dicer 后，发育期小脑中的少突胶质细胞系增殖降低。



A、B：对照组的 DAPI 与 BrdU 免疫标记；C，D：突变组的 DAPI 与 BrdU 免疫标记 蓝色部分是用 DAPI 对所有细胞的细胞核进行染色；红色部分是 BrdU 掺入实验，对新增殖细胞进行标记

图 4　小鼠小脑 BrdU 的免疫荧光鉴定　（荧光显微镜 ×10）



A、B：对照组的 DAPI 与 Olig2 免疫标记；C、D：突变组的 DAPI 与 Olig2 免疫标记 Olig2（绿色）：少突胶质细胞系标记物；DAPI（蓝色）：细胞核

图 5　小鼠小脑 Olig2 的免疫荧光鉴定　（荧光显微镜 ×10）

3 讨论

3.1 miRNAs是少突胶质细胞分化和髓鞘化过程的重要的调控子

miRNAs是一类小的非编码RNA(~22nt),它们能够通过抑制翻译和降解靶mRNA两种方式来实现对基因表达的转录后负调节。miRNAs开始时被转录成长的转录子(pri-miRNAs),紧接着被一种核RNase酶复合物(Drosha/DGCR8)剪接形成pre-miRNAs,然后从细胞核运到胞浆,并经过Dicer酶加工,成为成熟的miRNAs。成熟的miRNAs与RNA诱导的沉默复合物(RISC)结合后就能够执行转录后的抑制功能。在miRNAs 5′端有一小段序列与靶mRNAs 3′端非编码区(3′UTR)互补,从而赋予了miRNAs能够具有调节多种靶基因的潜能[9]。近年研究发现,许多的生物学过程的研究都涉及到miRNA[13]。我们的工作提供了这样一种证据:在脊椎动物的中枢神经系统中,miRNAs特别是miR-219和miR-338是少突胶质细胞分化和髓鞘生成过程中关键的调节子。我们的研究表明miRNAs不仅对生成髓鞘的少突胶质细胞形成是必需的,而且能够促进他们的前体细胞分化成成熟的少突胶质细胞。这些发现挑战miRNAs在发育过程中起辅助作用的观念。

在少突胶质细胞系细胞中通过选择性敲除促进miRNAs成熟的Dicer1酶来抑制miRNAs的成熟,能够引起中枢神经系统中严重的髓鞘生成缺陷。在缺失Dicer1的情况下,虽然少突胶质细胞增殖速度加快了,但他们不能够进一步分化成为成熟的能够生成髓鞘的少突胶质细胞。这些观察表明miRNAs能够抑制少突胶质细胞的扩增,但是能够促进他们的分化。因此,在OPC转化成为成熟少突胶质细胞这个过程中,由Dicer1介导生成的成熟miRNAs是关键的调节物。

3.2 miRNA对少突胶质细胞和神经元发育的调控作用

Olig基因不但影响少突胶质细胞发育和中枢神经系统髓鞘形成,它们与神经元的发育和生理功能也密切相关。例如Olig基因异位表达会导致神经元凋亡,Olig基因的拷贝数增加也可能和唐氏综合征的部分表型相关[14]。脊髓早期表达Olig基因的神经祖细胞会分化成部分运动神经元。由于Dicer的敲除会导致Olig2阳性细胞在大脑和脊髓中增加,而这些增殖的细胞并未分化产生髓鞘,因此我们在本课题中分析这些增加的Olig2阳性细胞在脊髓中是否生成神经元。根据我们对NeuN的染色结果,脊髓神经元总体数目并未发生变化,说明少突胶质细胞特异的Dicer基因敲除不影响神经元的生成。用运动神经元特异性分子标记或磷酸化Olig2蛋白抗体进行进一步细化分析可以更清晰的理解miRNA对Olig2阳性细胞分化命运的影响。本研究中也未分析大脑皮层神经元的变化,未来对皮层神经元和突变小鼠行为学的研究可以帮助我们了解Dicer突变小鼠是否产生唐氏综合征部分表型。

3.3 miRNA在大脑和小脑细胞增殖过程中的不同作用

Olig基因对神经元的发育施加了多种影响。如过表达Olig基因会导致神经元的凋亡[11],而脊髓中部分运动神经元和少突胶质细胞在起源上都来自于一类表达Olig蛋白的祖细胞[15]。由于以往的结果显示,用Olig1-Cre敲除Dicer的小鼠模型中,Olig2阳性的细胞数目在大脑和脊髓中增多。本研究中,Dicer敲除会导致大脑Olig2阳性细胞增殖加快、细胞增多,而小脑细胞增殖速度却会减缓。这说明miRNA在大脑和小脑中,对细胞增殖的调控发挥了不同作用,反映Dicer的区域特异性功能。由于BrdU没有与Olig2进行共染色,目前还不清楚小脑中的增殖细胞是否属于少突胶质细胞系。下一步的研究将利用更多的分子标记物(Olig2,PDGFRa,Zic1等)与BrdU共染,分析增殖细胞的起源和分化命运。

综上,该研究说明少突胶质细胞前体中特异性敲除Dicer会导致大脑和小脑神经前体细胞增殖异常,其中在大脑中Dicer缺失会导致细胞增殖加速,而小脑中Dicer缺失则会导致细胞增殖缓慢,说明少突胶质细胞相关的miRNA在中枢神经系统不同区域的发育过程中发挥了不同的调控功能,这是否与不同脑区的miRNA不同或是其他因素,相关的分子机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Emery B. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination [J]. Science, 2010, 330(6005): 779-782.

[2] 陈鹏慧, 蔡文琴, 王丽雁. 大鼠少突胶质细胞前体细胞的生后发育特点及围生期电生理特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(19): 1783-1786.

[3] 陈鹏慧, 蔡文琴, 王丽雁,等. NG2胶质细胞在成年大鼠脑内的分布及形态特征[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(1): 31-34.

[4] Colello R J, Pott U. Signals that initiate myelination in the developing mammalian nervous system[J]. Mol Neurobiol, 1997, 15(1): 83-100.

[5] Lu Q R, Yuk D, Alberta J A, *et al*. Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system[J]. Neuron, 2000, 25(2): 317-329.

[6] Ross S E, Greenberg M E, Stiles C D. Basic helix-loop-helix factors in cortical development[J]. Neuron, 2003, 39(1): 13-25.

[7] Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, *et al*. Sox10 a novel transcriptional modulator in glial cells[J]. J Neurosci, 1998, 18(1): 237-250.

[8] He Y, Dupree J, Wang J, *et al*. The transcription factor Yin Yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation[J]. Neuron, 2007, 55(2): 217-230.
[9] Liu N, Olson E N. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development[J]. Dev Cell, 2010, 18(4): 510-525.
[10] Zhao X, He X, Han X, *et al*. MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation[J]. Neuron, 2010, 65(5): 612-626.
[11] Kosik K S. The neuronal microRNA system[J]. Nat Rev Neurosci, 2006, 7(12): 911-920.
[12] Harfe B D, McManus M T, Mansfield J H, *et al*. The RNaseⅢ enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(31): 10898-10903.
[13] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
[14] Lu Q R, Sun T, Zhu Z, *et al*. Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection[J]. Cell, 2002, 109(1): 75-86.
[15] Lu Q R, Cai L, Rowitch D, *et al*. Ectopic expression of Olig1 promotes oligodendrocyte formation and reduces neuronal survival in developing mouse cortex[J]. Nat Neurosci, 2001, 4(10): 973-974.

(**收稿**:2011-03-29;**修回**:2011-04-30)
(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2011)16-1671-01

个案与短篇

结肠回盲部巨大息肉尼龙圈套结扎术后穿孔1例

陈 静,廖化禹,龙庆林,陈 磊 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所)

[**关键词**] 结肠息肉;尼龙圈套
[**中图法分类号**] R656.9 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,男性,69岁,因"5个月前出现解暗红色血便1次,量约30 g"就诊,外院行肠镜诊断:(1)慢性结肠炎;(2)结肠息肉。因患者之后未再便血,故未处理。2个月前患者感下腹坠胀、大便次数增多于2011年3月13日就诊于我院。既往有乙肝病史20年,高血压病史7年,入科后完善相关检查后行肠镜下肠息肉切除术,术中见:回盲部见3 cm大小息肉样肿块,表面黏膜充血肿胀,考虑息肉太大,直接切除容易出血,予以尼龙圈套器套扎蒂部以期择日再行电凝切除(图1)。于息肉顶端及基底取活检以明确性质。因患者术中发现息肉较大,嘱其绝对卧床休息,并给予止血药物,术后5 h左右患者突感右中下腹轻微胀痛不适,随即解鲜血便一次,量约250 ml。查体:右中下腹轻度压痛、反跳痛及肌紧张,听诊肠鸣音5~6次/min,立即行腹部立卧位片示右侧膈下游离积气可能性大。经普外科急会诊后建议立即剖腹探查,术中见回盲部直径约3.5 cm大小包块,质韧,表面光,未浸及浆膜层,根部可见尼龙圈固定,盲肠前壁近息肉基底部见一0.5 cm大小的穿孔。术中诊断为:盲肠穿孔、回盲部包块待查。行根治性右半结肠切除术。术后送病理活检报告示:结肠腺瘤性息肉。患者恢复可,术后10 d痊愈出院。

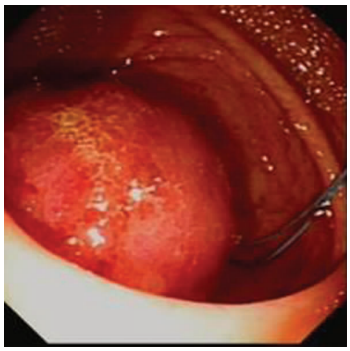


图1 回盲部直径约3 cm息肉尼龙圈套器套扎治疗观察

2 讨论

消化道息肉的大小并非是内镜下切除的绝对禁忌证。但是息肉越大,出血穿孔的风险就越大。文献[1-2]报道尼龙圈套器的应用能显著降低手术并发症的发生,尼龙圈结扎术是通过尼龙圈的结扎使病灶组织的血液供应中断,导致被结扎组织缺血而达到缓慢切割的目的,通常组织发生坏死的时间为1~4 d,在切割的同时伴有周边组织的增生黏连。尼龙圈一般于术后7~10 d缓慢自然脱落[3]。该方法相对直接电凝切除更安全,尤其是对直接电切有较高穿孔风险的巨大广基息肉,但缺点是不能获得完整的病理组织。由于该方法为缓慢切割,还被广泛用于消化道固有肌层来源的平滑肌瘤、间质瘤的切除[4]。此病例治疗过程中考虑到息肉较大,仅仅行尼龙圈套扎并未电凝切除,术后5 h患者出现穿孔的表现,手术中发现穿孔部位位于息肉基底部附近,可能与套扎过低,使过多的黏膜套扎坏死而导致出血、穿孔有关,但术后5 h即发现穿孔,与通常报道的套扎后组织坏死时间相比显得过短,实为少见。

[**通信作者**] 陈 磊,E-mail: chenlei1977603@126.com

参考文献:

[1] 张轶群, 姚礼庆, 徐美东, 等. 结直肠大息肉的内镜下治疗[J]. 中华消化内镜杂志, 2005, 22(1): 60-62.
[2] 李连勇, 袁群, 曹艳菊, 等. 经内镜尼龙圈套扎预防结肠息肉高频电切除后出血[J]. 现代消化及介入诊疗, 2010, 15(3): 171-172.
[3] 索标, 苏派林, 张永红. 在内镜下尼龙圈结扎消化道大息肉及间质瘤治疗中的应用[J]. 临床消化病杂志, 2008, 20(6): 371-373.
[4] 孙思予, 王占辉, 夏玉亭, 等. 内镜下圈套结扎在治疗上消化道小平滑肌瘤中的应用[J]. 中华消化内镜杂志, 2003, 20(2): 88-90.

(**收稿**:2011-05-05;**修回**:2011-05-27)
(编辑 王 红)