文章编号:1000-5404(2011)13-1333-05

论著

Oligo基因芯片筛选视网膜慢性高眼压损伤差异表达基因的初步数据分析

崔 馨[1],贺翔鸽[1],谢 琳[1],葛成国[2],喻 红[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:眼科[1],泌尿外科[2])

【摘要】 **目的** 采用35 000点的高密度Oligo基因芯片对大鼠慢性高眼压导致视网膜损害的6个时间点(7、35、60、90、180、360 d)的基因表达情况加以研究,探讨慢性高眼压影响下视网膜基因表达改变的情况。**方法** 将基因分成"活动"基因和"差异"基因:在"活动"基因中,要求6个时间点中最大Ratio值/最小Ratio值的比值大于2。将差异基因再分为高、低表达及过表达基因,每一类基因按照其生物学功能进行功能检索、分组。对与轴突生长、导向、突触形成相关基因的功能进行初步探讨。**结果** 差异表达基因1 692个:高表达的基因719个(Ratio≥2),包括6个过表达基因(Ratio≥7);低表达的基因973个(Ratio≤0.5)。719个高表达基因中,功能完全未知者占54%,其余功能已知或部分已知者共分为14组,在损伤过程中所占比例最大的是代谢和物质转运组。轴突生长、导向及突触形成相关的基因,抑制轴突生长的基因及神经元的迁移、轴突的生长相关基因在损伤过程中均有呈高表达。**结论** 建立了大鼠慢性高眼压损伤视网膜差异基因表达库,差异表达基因在慢性高眼压视网膜损害中可能有重要的意义。

【关键词】 基因芯片;视网膜;慢性高眼压;数据分析
【中图法分类号】 R774.1;R446.9;R394.3 【文献标志码】 A

Differential expression in retina of chronic high intraocular pressure SD rats by large-scale Oligo microarray

Cui Xin[1], He Xiangge[1], Xie Lin[1], Ge Chengguo[2], Yu Hong[1] ([1] Department of Ophthalmology, [2] Department of Urinary Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the differentially expressed genes in the retina of SD rats with chronic high intraocular pressure (IOP) by a large-scale Oligo microarray. **Methods** After the high IOP SD rat model was established, the rats were sacrificed in 7, 35, 60, 90, 180 and 360 d respectively, and their retina was resected for total RNA. After large-scale Oligo microarray, the obtained genes were identified as "active" or "differentiated" for the subsequent analysis. Active genes were those which were expressed and had no obvious change in all above-mentioned 6 time points. "Differentiated" gene must be "active", and the difference between the maximum and minimum of the 6 time points was greater than 2-fold change (≥2 or ≤0.5). Among the total 35 000 genes on the gene chip, the differential genes were divided to higher expressed (Ratio ≥2) and lower expressed genes (Ratio≤0.5), and were further categorized according to their functions. Some important genes facilitating to axon growth, orientation and guidance were further analyzed. **Results** There were 1 692 genes identified as differentiated, with 719 genes of high expression (Ratio ≥2), including 6 of over-expression (Ratio ≥7), and with 973 genes of low expression (Ratio ≤0.5). Among the highly expressed 719 genes, there were 54% with no idea about their functions, and the left with known or partially known functions were categorized into 14 groups. During the retinal injury repairing, the genes related to protein synthesis, material transduction and metabolism were most significant, and the genes facilitating to axon growth, orientation and guidance, related to suppress axon growth and neuron migration were also significant. **Conclusion** A differential genes bank of chronic high IOP injury of SD rat retina is established, and these differential genes might play vital roles in the retinal injury induced by high IOP.

【**Key words**】 gene chip; retina; chronic high intraocular pressure; data analysis

Supported by the National Nature Science Foundation of China(30801273). Corresponding author: Cui Xin, E-mail: cuixin5316@163.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30801273)
【通信作者】 崔 馨,E-mail:cuixin5316@163.com

青光眼是一组以视神经凹陷性萎缩和视野缺陷为共同特征的疾病,高眼压是其最主要的危险因素[1]。本研究采用532-二极管激光光凝小梁网和角巩缘照射的方法升高眼压构建青光眼动物模型模拟青光眼的视网膜视神经损害,然后利用北京博奥生物公司(生物芯片北京国家工程研究中心)35 000点的大鼠Oligo芯片,对慢性高眼压损伤大鼠视网膜6个不同时间点的基因表达情况进行研究,对获得的数据主要采用系统聚类分析、基因表达调控网络分析及统计分析中常用的方法(χ^2分析)等进行分析,旨在从整体上初步了解慢性高眼压视网膜损伤基因表达的特点。

1 材料与方法

1.1 高眼压动物模型的构建

1.1.1 实验器材 532-二极管激光(Alcon公司,美国);Tono-PenXL眼压计(Medtronic SALON公司,美国);Zeiss光学手术显微镜(Zeiss,德国)。

1.1.2 高眼压动物模型的构建[2] 麻醉后将大鼠俯卧位固定于手术台上,右眼结膜囊内0.4%倍诺喜眼液2次,眼表面麻醉,在光学手术显微镜下,532-二极管激光行左眼角膜缘小梁网和角膜缘颞侧及颞上、颞下3条巩膜浅层静脉血管光凝,功率0.45W/0.7 s,双眼滴润舒眼液1次;第2天观察结膜有无充血,角膜有无水肿,前房反映情况;第3天再次观察结膜,角膜,前房等情况,全身麻醉后,测量眼压,如实验眼眼压高于24 mmHg,则不做处理,眼压低于24 mmHg,则于第7天后重复激光光凝,然后动物房寄养观察6个月至实验结束。

1.2 Oligo基因芯片筛选大鼠视网膜慢性高眼压损伤差异基因

1.2.1 组织RNA抽提与标记 实验用昆明小鼠由第三军医大学实验动物中心提供,建模成功后,选择7、35、60、90、180、360 d 6个时相点。实验组将来自不同动物同一时间点的视网膜组织混合,研为匀浆,用Tripure试剂(Roche公司)提取总RNA,通过异丙醇沉淀法浓缩RNA,并进一步采用RNeasy mini spin column试剂盒(Qiagen公司)对总RNA进行过柱纯化,最后用分光光度计定量,甲醛变性胶电泳质检,对照组由各时间点全脑总RNA等量混合而成,用SuperScript Ⅱ反转录酶将实验组和对照组总RNA分别转录为cDNA,转录过程中用标有Cy5、Cy3的dNTP分别掺入实验眼和对照眼的cDNA,荧光交换实验则分别用Cy5、Cy3标记对照组和实验组[3]。

1.2.2 芯片杂交与清洗 小鼠高密度Oligo基因芯片由北京博奥生物有限责任公司提供,共有16 500条70 mer长度的Oligo DNA,将标记的DNA溶于30 μl杂交液中(3×SSC,0.2% SDS,5×D-Denhart's,25%甲酰胺),于42 ℃杂交过液,杂交结束后,先在42 ℃左右含有0.2% SDS,2×SSC的溶液中洗5 min,而后在0.2×SSC中室温洗5 min,玻片甩开后即可用于扫描。

1.2.3 芯片扫描 图像采集与数据分析:芯片用Scan array express双通道激光扫描仪(Packard Bioscience公司)进行扫描,采用Genepix pro 4.0图像分析软件(Axon Instruments公司)对芯片像进行分析,把图像转化为数字信号,然后对芯片的数据用Lowess方法进行归一化;利用Eisen的Cluster和Tree view软件作分层聚类分析。

1.3 芯片数据可靠性验证

采用荧光定量RT- PCR验证。随机选取10个差异表达的基因,根据GenBank序列号获取全长cDNA序列,由北京博奥生物技术有限公司设计并合成上下游引物。SYBRGreen荧光实时定量RT-PCR反应在ABIPRISM 7000序列检测仪上进行。各样品的目的基因和管家基因分别进行Real-time PCR反应。根据绘制的梯度稀释DNA标准曲线,各样品目的基因和管家基因的浓度结果直接由机器生成。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因的浓度,即为此样品受检基因校正后的相对含量。

1.4 分析方法

1.4.1 数据筛选

1.4.1.1 数据初步处理 首先将芯片图像信号转换为数字信号,得到35 000个基因(存在重复基因)表达的数据。然后对数据用非线性方法进行标准化处理,得到12组芯片数据,这样芯片上的每一个基因会得到荧光交换前后的2个光密度比值(Ratio值),只有在2次杂交实验中变化趋势相同的基因才被认为是真正有差异表达的基因。进而将同一基因荧光交换前后的2个Ratio值取其几何平均数作为该基因表达的Ratio值,然后再删除荧光信号弱的基因以及芯片上的阴性对照、内标、外标等冗余的数据。本研究选用的基因芯片上还有2个看家基因,每个看家基因重复点样,取其算术平均值作为每个看家基因的Ratio值。

1.4.1.2 "活动"基因和"差异"基因的筛选 统计分析前,先将基因分成"活动"基因和"差异"基因。标准如下:"活动"基因:在6个时间点(7、35、60、90、180、360 d)中都有表达的基因。有表达的点包括表达没显著改变、上调、下调、开和关基因。"差异"基因:首先必须为"活动"基因,还要求6个时间点中最大Ratio值/最小Ratio值的比值大于2。

1.4.2 主要分析方法

1.4.2.1 功能分布分析(χ^2分析) χ^2分析用于说明某个功能在各个聚类族中的分布与总体是否相同,若不同则说明该功能在各个族中的分布为非随机的。对某一功能,$\chi^2=\sum_{i=1}^{r}\frac{(n_i-pN_i)^2}{pN_i}$,其中$n_i$为在第$i$个聚类族中具有该功能的基因数目,$p$为具有该功能的基因在所研究的基因中的比例,即为总体率,N_i为第i个聚类族的基因总数,r为聚类数。$\chi^2\sim\chi^2(r-1)$,当该χ^2值大于临界值时,认为该功能在各个族中的分布不全相同。

1.4.2.2 基因调控网络分析 首先求得所分析基因的相关系数,计算基因之间的相关系数矩阵,根据基因间的相关程度,对基因之间的相似程度进行分类,并利用Matlab软件展现基因之间的网络关系。

2 结果

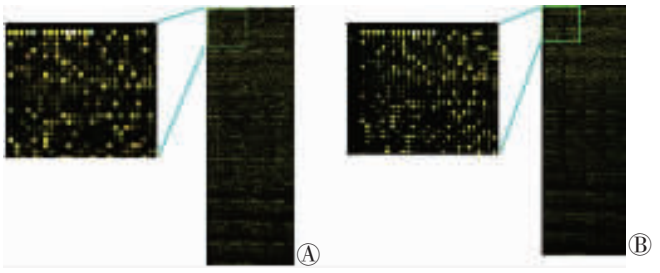
2.1 眼压情况

实验前眼压范围:实验眼(左眼)(17.1±3.7) mmHg,对照眼(右眼)(17.0±3.4) mmHg,双眼眼压无明显差异($P>0.05$);实验后:实验眼眼内压均值升高。激光光凝术7 d后,大

鼠眼内压升高,于 35 d 时达到眼压峰值($P<0.05$),高眼压状态持续至 90 d($P<0.05$),然后眼压水平逐渐下降,360 d 时眼压基本恢复到正常范围。

2.2 高密度芯片杂交结果

Cy5 标记的各处理组和 Cy3 标记的对照组的 cDNA 和芯片上的探针阵列进行竞争性杂交,在激光共聚焦扫描的图像上,如果某一基因在处理组中的表达高于对照样本,则芯片上该点上结合的 Cy5 的量多于 Cy3 ,在扫描结果中显示为红色,反之则显示为绿色,如果大致相等则显示为黄色。见图 1。



A 35d-Cy5/MIX-Cy3 B 35d-Cy3/MIX-Cy5

图 1 大鼠 532-二极管激光光凝术后 35 d 与 MIX 样品芯片杂交假色重叠图

2.3 基因芯片数据可靠性验证结果

10 个验证结果中,只有 1 号 AK051011 是不吻合的,其余都呈现一致趋势。两组数值的表达趋势基本一致(表 1)。

表 1 10 个基因在 532-二极管激光光凝术后 7 d 大鼠视网膜中表达的 Ratio 值

基因	RT-PCR 结果	基因芯片结果
AK051011	0.9418	4.386 5
AK002700	2.4553	2.113 7
NM033541	1.7833	3.267 5
XM489729	2.1131	2.651 2
NM011225	0.7896	0.386 9
NM007952	0.7404	0.422 1
NM015744	0.4914	0.356 1
NM013697	0.0235	0.011 6
NM032003	0.5964	0.185 9
AK018397	0.9833	0.191 4

2.4 差异基因功能分析

对筛选出的 1692 个差异基因功能按文献检索进行分类,考虑到 1 个基因可能存在多个功能,采用了重复计数(多次统计)。这些差异基因的功能及比例分别为细胞凋亡 1%,生物合成 4%,细胞黏附 2%,细胞周期 2%,分化 1%,细胞生长 2%,发育 3%,新陈代谢 6%,神经生长 2%,应激反应 2%,信号转导 8%,转录调控 7%,功能未知 60%。

2.5 差异基因的表达情况分类

将 Ratio≥2 或者 Ratio≤0.5 的基因定义为差异基因,其中 Ratio≥2 的称为高表达基因,Ratio≤0.5 的基因称为低表达基因 2 > Ratio > 0.5 的基因称作无差异基因。

2.5.1 高表达(包括过表达)基因差异基因分类结果 在 35 000 个基因中,至少在 1 个时间点上高表达的有 719 个,见表 2。功能及比例分别为细胞凋亡 1%,生物合成 5%,细胞黏附 3%,细胞周期 2%,细胞分化 1%,细胞生长 1%,发育 3%,新陈代谢 5%,神经生长 2%,应激反应 2%,信号转导 7%,转录调控 6%,物质转运 8%,功能未知 54%。

2.5.2 低表达差异基因分类结果 至少在 1 个时间点上低表达的有 973 个。功能及比例分别为细胞凋亡 1%,生物合成 2%,细胞黏附 2%,细胞周期 2%,细胞分化 1%,细胞生长 2%,发育 2%,新陈代谢 5%,神经生长 8%,应激反应 1%,信号转导 2%,转录调控 9%,物质转运 7%,功能未知 56%。

2.5.3 高眼压损伤不同时间点不同基因功能表达情况 损伤后 7 d:排在首位的是应激反应基因,其次是与细胞周期相关的基因,与组织损伤修复的基因簇所占的比例较小;损伤后 35 d:凋亡相关基因占重要地位,物质合成相关基因所占比例较小。有大量的损伤、修复基因表达上调或下调;损伤后 60 ~ 90 d:与物质合成和转运、代谢相关的基因所占比例较大。与轴突生长、诱导及神经特异性功能相关的基因也占到一定比例;损伤后 180 ~ 360 d:大量有利于损伤修复和再生的基因表达上调,如物质合成和转运、代谢相关的基因及与轴突生长、诱导及神经特异性功能相关的基因所占比例均较大。

3 讨论

视网膜的结构非常复杂,成年哺乳动物的视网膜内有 55 种神经元及多种胶质细胞;各种神经细胞发出的纤维交错纵横,形成多种类型的有序立体的突触联系,构成复杂、精确的神经信息传递网络[4]。要挖掘基因芯片海量数据中所包含的巨大生理信息,要求有相应的数学统计分析方法来对其进行处理。我们利用相关统计学分析方法得到以下的初步信息。

3.1 建立慢性高眼压损伤条件下的差异表达基因库

功能未知基因占 54%,本研究中,我们利用高通量

表 2 慢性高眼压大鼠高密度 Oligo 基因芯片中过表达基因的名称、编号及功能信息

基因名称	核苷酸号	基因说明号	基因全称及其他名称	基因库号	基因功能分类代码
Cart	M200003793	NM_013732	cocaine and amphetamine regulated transcript	CA321344	1,3
Agxt2l1	M200006336	NM_027907	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	—	12
Zfp36l2	M200016261	NM_001001806	zinc finger protein	BC028330	14
Elk1	M300001040	NM_007922	ELK1, member of ETS oncogene family	X87257	4,6,12
Oas1c	M200013122	NM_033541	2′-5′ oligoadenylate synthetase 1C	—	14
Q9CYS6	M200014785	XM_484890	PREDICTED: RIKEN cDNA 2810459M11 gene	—	14

基因功能分类代码:1:凋亡;2:生物合成;3:细胞黏附;4:细胞周期;5:分化;6:细胞生长;7:发育;8:新陈代谢;9:神经生长;10:应激反应;11:信号转导;12:转录;13:物质运输;14:功能不详

的 Oligo 芯片，建立了高眼压损伤条件下差异基因的表达库，在高眼压损伤因素条件下，共找出视网膜差异表达基因 1 692 个。其中有 719 个高表达基因（功能未知者 54%），973 个低表达基因。说明我们对这一病理过程的了解还有许多工作要做，在这 54% 的未知基因中一定有我们未知的新基因和 EST 片段，其功能有待进一步研究。

3.2 信号转导相关基因高表达

在高眼压视网膜损伤差异表达的基因中，排在前 2 位的是信号转导相关的基因如 Ddr1、Dapk1、Fert2、Zfp96 等，以及调节转录相关的基因如 Mllt3、Atf2、Bmil、Zfp148 等，视网膜损伤后正是依靠这些高表达丰度基因来精确地传导信号、调控转录，促使神经细胞分化、增殖、迁移，促进轴突生长及突触形成[5]。

3.3 物质合成和转运、代谢相关的基因在损伤修复期间的表达情况

物质合成和转运、代谢相关基因占 30% 损伤期间呈现高、低表达的基因中，前两位为与物质合成、转运及代谢相关的基因，与损伤后视网膜有炎症反应及再生修复期间对物质合成和能量代谢需求旺盛相吻合。E2f1、Ckn1 等与信号转导、细胞周期调控相关，在损伤过程中为高表达。细胞周期调控相关的 Ccnt2、Cdk11、Nat6 等被损伤修复过程激活而表达升高，可能与 CNS 自身修复机制密切相关。

3.4 与神经轴突生长及突触形成相关的基因在损伤修复过程中起到关键作用

CNS 中精确而复杂的轴突生长、靶向诱导和阻碍机制使得再生的轴突难以穿越损伤区域，继而无法到达靶区形成正确的突触联系。在本研究中，与轴突生长、诱导或者阻碍相关的基因呈现差异表达。Ptn 有促进神经轴突生长和细胞分化等作用，在发育早期广泛表达[6]。Efnb3 是新近发现的一种 EPH 家族受体的配体，与轴突生长导向和神经元定向迁移相关[7]。Nrp 在血管生成和神经的发育过程中发挥其重要作用[8]。Dbn1 是神经组织中特异性表达的神经丝结合蛋白，能调节细胞骨架重排、树突棘的结构的形成[9]，本研究发现其在各个时间点均有高水平的表达，推测其在视网膜、视神经的突触损伤修复过程中可能起到非常关键的作用。上述 4 个基因可能与视神经轴突生长、诱导、突触形成的调节相关。阻碍轴突生长的基因 Rtn4（Nogo-A）在损伤 35 d 时表达增高，该基因有强烈的抑制轴突再生的作用[10]，其高表达可能是视神经轴突再生的重要障碍因素。Mdk（midkine）在神经系统和多个组织器官内广泛表达[11]，有促使神经元迁移、促进轴突生长及细胞存活的作用，在视网膜缺血损伤后有高表达。在我们的研究中发现 Mdk 在视网膜慢性高眼压损伤后高表达，推测 Mdk 可能在视网膜修复过程中促进神经元存活、诱导轴突再生。其中在损伤期间高表达的基因还有少突胶质细胞迁移以及髓鞘形成相关的 Tm4sf8、细胞黏附分子 BAI1-associated protein 1 及部分功能未知的基因。在 CNS 中特异性高表达的基因，通常具有器官或组织特异性功能，此类基因的功能目前尚不甚清楚，但推测其在视网膜损伤过程中可能存在特殊的作用。

3.5 其他高表达基因的情况

一些肿瘤相关的基因在发育、损伤过程中呈现差异表达，如 BG075908、BG074692，目前此类基因的功能尚不清楚。从现有的报道看，从肿瘤研究中首先报道的基因，经究证实常与细胞周期调控、转录调控、信号转导及细胞增殖、分化等方面相关[12]，过度表达基因包括与转录相关的 Agxt2l1、Elk1，和凋亡、细胞连接相关的 Cart 以及功能未知的基因 3 个。其具体生物学功能尚需证实。

3.6 慢性高眼压损伤后不同时间点视网膜差异基因表达情况

损伤后 7 d：主要是损伤后细胞破坏和组织应激反应；基因表达变化倾向于细胞的破坏和死亡。排在首位的是应激反应基因，其次是与细胞周期相关的基因。本时期内组织的修复尚未完全启动，故与组织损伤修复的基因簇所占比例较小。

损伤后 35 d：本时间点大鼠眼压达到峰值。这段时间仍以组织的损伤为主，神经节细胞数量明显减少与细胞凋亡相关。同时发现凋亡相关基因占重要地位，与物质合成相关的基因所占比例较小。可见本时期的变化仍以细胞损伤为主。此时的眼压值为整个损伤后阶段眼压的高峰值，也是基因表达的高峰期，大量的损伤、修复相关基因表达上调或下调，说明修复与破坏的力量在进行积极的抗争。此阶段应为影响伤后修复进程和转归的重要时期。

损伤后 60 ~ 90 d：为组织修复增生旺盛的时期，损伤力度在下降，趋向于修复与再生。与物质合成和转运、代谢相关的基因所占比例增大，表明在损伤、修复过程中有大量新物质在合成。活跃的物质运输是足够的能量供应的重要保障。同时，与轴突生长、诱导及神经特异性功能相关的基因占到一定的比例。可以将此时期视为一个损伤后的慢性修复期。

损伤后 180 ~ 360 d：仍以组织修复与再生为主。眼压开始下降，一直持续到 180 d 左右基本恢复到正常水平。大量有利于损伤修复和再生的基因表达上调，如物质合成和转运、代谢相关的基因及与轴突生长、诱导及神经特异性功能相关的基因，构成了机体与损伤抗争的主要力量。临床上经常观察到的现象是：青光眼患者的眼压虽降到正常值，但视神经损害仍在继续。从病理结果上看，360 d 时视神经纤维密度较之 180 d 时仍在减少。故严格地说，这段时间内组织的损伤仍在持续进展。

从上述的芯片初步数据分析中可以看到：视网膜损伤后，部分基因高表达的同时，一些不利于再生的基因也会被激活。研究青光眼慢性高眼压视网膜、视神经损伤过程中所有参与基因的表达情况，可以全面了解高眼压损伤因素条件下基因表达的整体和动态过程，打破单一基因功能研究的模式，转向基因调控网络的探寻，为视网膜、视神经乃至整个中枢神经损伤修复的机制提供研究思路。

参考文献：

[1] 周晓晴，钟一声. 青光眼视神经保护的研究进展[J]. 国际眼科杂志，2008，8(1)：97－101.
[2] 崔馨，贺翔鸽，许建涛，等. 532-二极管激光光凝法诱导大鼠青光眼慢性高眼压模型的研究[J]. 激光杂志，2006，27(3)：79－81.
[3] 宋业纯，杨辉，刘仕勇，等. 高密度Oligo基因芯片筛选小鼠嗅球发育相关基因的研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(9)：841－843.
[4] Liu M，Duggan J，Salt T E，*et al*. Dendritic changes in visual pathways in glaucoma and other neurodegenerative conditions[J]. Exp Eye Res，2011，92(4)：244－250.
[5] Garrity P A. Neuroscience：Feel the light[J]. Nature，2010，468(7326)：900－901.
[6] Adachi T，Yasuda H，Aida K，*et al*. Regulation of extracellular-superoxide dismutase in rat retina pericytes[J]. Redox Rep，2010，15(6)：250－258.
[7] Shi Y，Wu X，Gong Y，*et al*. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on retinal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Curr Eye Res，2010，35(10)：930－937.
[8] Mansoor S，Gupta N，Luczy-Bachman G，*et al*. Protective effects of memantine and epicatechin on catechol-induced toxicity on Müller cells in vitro[J]. Toxicology，2010，271(3)：107－114.
[9] Muramatsu T. Midkine，a heparin-binding cytokine with multiple roles in development，repair and diseases[J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci，2010，86(4)：410－425.
[10] Zeng K，Xu H，Chen K，*et al*. Effects of taurine on glutamate uptake and degradation in Müller cells under diabetic conditions via antioxidant mechanism[J]. Mol Cell Neurosci，2010，45(2)：192－199.
[11] Kipnis J，Cardon M，Avidan H，*et al*. Dopamine，through the extracellular signal-regulated kinase pathway，downregulates $CD4^+CD25^+$ regulatory T-cell activity：implications for neurodegeneration[J]. J Neurosci，2004，24(27)：6133－6143.
[12] Hafeez B B，Zhong W，Weichert J，*et al*. Genetic Ablation of PKC Epsilon Inhibits Prostate Cancer Development and Metastasis in Transgenic Mouse Model of Prostate Adenocarcinoma[J]. Cancer Res，2011，71(6)：2318－2327.

（收稿：2010-12-26 修回：2011-03-02）
（编辑 王小寒）

文章编号：1000-5404(2011)13-1337-02

经验交流

经PTCD窦道胆道金属支架置入术治疗恶性梗阻性黄疸临床疗效分析

王 华，汪 涛 （610083 成都，成都军区总医院全军腹部外科中心）

【关键词】 PTCD；胆道支架；恶性梗阻性黄疸
【中图法分类号】 R657.43 【文献标志码】 B

恶性梗阻性黄疸系由恶性肿瘤引起的胆道梗阻而致皮肤巩膜黄染，常见于肝门胆管癌、肝癌、胰头癌、壶腹癌、胃癌肝转移等造成的肝胆管受压。若黄疸得不到及时改善，肝功能、肾功能、凝血机制会迅速恶化，危及患者生命。姑息性胆肠吻合术作为减黄手段创伤大、费用高，难以为患者接受。自2005年起，我科开展经皮经肝胆道引流（percutaneous transhepatic cholangial drainage，PTCD）联合记忆型胆道金属支架置入术姑息性治疗恶性胆道梗阻，疗效较好。本研究回顾性分析2008年1月至2009年10月60例PTCD联合胆道支架置入术患者的临床资料，探讨其操作技术方法及临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组患者60例，男性34例，女性26例，年龄38～81岁，平均58.4岁。入选标准：①自愿参加本项临床研究与观察以及出院后长期随访。②术前均经B超、CT、MRCP、PTC或穿刺病理活检证实为无法手术切除或高龄患者不愿手术的肝门部恶性梗阻性黄疸。③术前检查出凝血时间、肝功能、黄疸指数等，均有不同程度升高；血清总胆红素（449.6±189.1）μmol/L，碱性磷酸酶为268～1 054（623±286）U/L；丙氨酸转氨酶为61～155（137±74）U/L。（4）PTCD以及支架置入一次或多次，最终成功；一次失败后经ERCP置入成功者排除。本组胆管癌23例、胰头癌14例、胆囊癌6例、肝门区转移癌17例。外引流材料为台湾BIOTEQ公司生产的亲水性涂层猪尾巴导管，支架为南京微创医学科技有限公司的MTN型记忆合金胆道支架，放射机型号为SIEMENS DSA 1250 mA。

1.2 操作方法

第1步：超声引导下PTC根据B超探查结果以及肝内胆管扩张情况选择穿刺靶点。靶点尽可能达到肝外胆管，不要与肝外胆管角度过锐。局部麻醉后，用18G穿刺针穿刺，抵达靶点，拔出针芯，置入引导丝至肝门部，扩皮，将F7猪尾管顺引导丝置入，接引流袋，固定。在无超声引导条件的医院，此步可在DSA下完成。第2步：胆道支架置入。PTCD术后1～3 d，观察无胆管出血和胆管炎、漏胆等并发症。患者平卧位，先经PTCD引流管造影，显示梗阻部位位于（胆总管下端、中段、肝总管平面、肝门部、左肝管、右肝管），经PTCD管送入导丝（根据患者胆道梗阻具体情况术中决定导丝进入长度）至胆管内，调整导丝方向，通过狭窄，再循导丝走行再次送入PTCD管至狭窄段远端，注入造影剂顺利进入肠道，并显示梗阻段长度，退出PTCD

（下转1345页）

【通信作者】 王 华，E-mail：weimin-wangyi@163.com