论著

文章编号:1000-5404(2014)04-0346-05

RNAi 抑制 NANOG 表达对肝癌细胞 HepG2 中 MDR1 表达及阿霉素敏感性的影响

周嘉嘉,陈汝福,邓小耿,周 雨,周泉波,张 杰,伍耀豪,曾乐祥,邱荣林 (510120 广州,中山大学孙逸仙纪念医院外科)

[摘要] **目的** 探讨抑制 NANOG 表达对肝癌细胞 HepG2 中多药耐药基因 1 (multidrug resistance gene 1, MDR1)表达及阿霉素敏感性的影响。**方法** 将靶向 NANOG 基因的特异性 siRNA 转染肝癌细胞 HepG2,Real-time PCR 和 Western blot 检测 siRNA 沉默 NANOG 基因后 NANOG、MDR1 mRNA 和蛋白的表达,平板克隆形成实验检测沉默 NANOG 基因后对细胞增殖能力的影响,流式细胞术检测沉默 NANOG 基因后对细胞周期的影响,CCK-8 法检测沉默 NANOG 基因后 HepG2 细胞对阿霉素的敏感性情况。**结果** 靶向 NANOG 基因特异性 siRNA 转染肝癌细胞 HepG2 后,能有效抑制 NANOG mRNA和蛋白表达,与 Mock 组比值分别为(0.32±0.05)和(0.38±0.08);与 Mock 组比较,沉默 NANOG 基因后,细胞克隆形成率下降[(8.51±3.63)% *vs* (17.13±2.24)%, $P<0.05$],进入 G_0/G_1 期的细胞比例增多[(75.33±8.21)% *vs* (57.81±5.05)%, $P<0.05$],HepG2 细胞对阿霉素的敏感性增强($P<0.05$),HepG2 细胞内 MDR1 mRNA 和蛋白表达下降,与 Mock 组比值分别为(0.35±0.06)和(0.41±0.08)。**结论** 抑制 NANOG 表达可引起肝癌细胞 HepG2 中 MDR1 的表达下调并增强细胞对阿霉素的敏感性。

[关键词] 肝癌;NANOG;阿霉素;多药耐药基因 1;化疗敏感性
[中图法分类号] R73-36;R735.7;R979.14 [文献标志码] A

RNAi knockdown of NANOG inhibits MDR1 expression and promotes doxorubicin sensitivity in human hepatoma HepG2 cells

Zhou Jiajia, Chen Rufu, Deng Xiaogeng, Zhou Yu, Zhou Quanbo, Zhang Jie, Wu Yaohao, Zeng Lexiang, Qiu Ronglin
(Department of Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province, 510120, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the effect of NANOG knockdown on multidrug resistance gene 1 (MDR1) expression and doxorubicin chemosensitivity of human hepatocarcinoma HepG2 cells. Methods Transient transfection of the specific siRNA targeting NANOG gene into HepG2 cells was performed. The expression of NANOG and MDR1 at mRNA and protein levels was detected by real-time PCR and Western blotting. The influence of NANOG knockdown on cell proliferation ability was examined by colony formation assay. The influence on cell cycle was tested by flow cytometry. The doxorubicin chemosensitivity of HepG2 cells was detected by CCK-8 assay. Results Transfection of the specific siRNA targeting NANOG gene into HepG2 cells could effectively inhibit the expression of NANOG mRNA and protein, with the ratio of siRNA group to mock group of 0.32±0.05 and 0.38±0.08, respectively. Compared with mock group, the siRNA-mediated silencing of NANOG gene in HepG2 cells resulted in decreased cell clone formation rate [(8.51±3.63)% *vs* (17.13±2.24)%, $P<0.05$], increased proportion of cells in G_0/G_1 phase [(75.33±8.21)% *vs* (57.81±5.05)%, $P<0.05$], and increased chemosensitivity to doxorubicin ($P<0.05$). Furthermore, knockdown of NANOG gene caused the down-regulation of MDR1 mRNA and protein expression, with the ratio of siRNA group to mock group of 0.35±0.06 and 0.41±0.08, respectively. Conclusion Inhibition of NANOG expression in HepG2 cells causes down-regulation of MDR1 expression and enhances the chemosensitivity of cells to doxorubicin.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; NANOG; doxorubicin; multidrug resistance gene 1; chemosensitivity

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30872485) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81000889). Corresponding author: Chen Rufu, Tel: 86-20-81332020, E-mail: chenrf63@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30872485);国家自然科学基金青年基金(81000889)
[通信作者] 陈汝福,电话:(020)81332020;E-mail:chenrf63@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131121.1718.007.html(2013-11-21)

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤之一,发病率高,其相关病死率在我国排第2位。目前肝癌治疗是以手术为主、联合化疗等的综合治疗,但化疗耐药现象在临床上很常见,影响肝癌患者疗效及预后。近年来提出的肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)理论认为肿瘤内一小部分具有干细胞特性的癌细胞是肿瘤形成、复发、转移及化疗耐药的根源[1]。干细胞因子 NANOG 协同 OCT4、SOX2 共同维持着胚胎干细胞的干性,被认为是全能性或多能性干细胞的标记物之一[2],研究发现 NANOG 在乳腺癌、前列腺癌、结肠癌等异常表达,可能与肿瘤复发、转移、耐药等有关[3-5]。本研究应用 RNA 干扰(RNAi)敲除肝癌细胞 HepG2 中 NANOG 的表达,探讨抑制 NANOG 表达对肝癌细胞阿霉素敏感性及多药耐药基因 1(multidrug resistance gene 1, MDR1)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株及 siRNA

人肝癌细胞株 HepG2 由本实验室保存,在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中培养,置于 37 ℃、5% CO_2 和相对湿度 95% 的恒温培养箱中,1 ~ 2 d 换液。siRNA 由美国 Ambion 公司网上在线设计工具(www. ambion. com/techlib/misc/siRNA_finder. html)设计完成,按照文献[6]原则以确保沉默效率。siRNA 干扰序列靶点为 NANOG:5′- CCAGACCTGGAACAATTCA-3′;GFP:5′-ACTACCTGTTCCATGGCCA -3′;由广州锐博生物公司合成。

1.2 主要试剂及来源

RPMI1640 培养基及胰蛋白酶购自 Gibco 公司;NANOG、MDR1 兔抗人单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology 公司;总 RNA 提取试剂 Trizol、脂质体 2000 (Lipofectamine™ 2000)均购自 Invitrogen 公司;Real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;阿霉素(doxorubicin, DOX)购自齐鲁制药公司;碘化丙啶(propidium iodide,PI)购自 Sigma 公司;CCK-8 试剂购自日本同仁化学研究所。

1.3 细胞转染

取对数生长期 HepG2 细胞,接种于 6 孔培养板中,培养 24 h 后待细胞融合达 80% ~85% 时进行细胞转染。转染前 2 h 更换不含血清的新鲜培养基。实验分组:A 组,单纯的脂质体 2000 处理组(以下简称 Mock 组);B 组,脂质体 2000 转染 GFP-siRNA 组(以下简称 siGFP 组);C 组,脂质体 2000 转染 NANOG-siRNA 组(以下简称 siNANOG 组)。按脂质体 2000 转染试剂盒说明书进行细胞转染,24 ~48 h 后收集细胞进行后续实验。如接种在 96 孔板中,按说明书相应地调整细胞数及转染试剂量。

1.4 Real-time PCR 检测

细胞转染 24 h 后,Trizol 法提取各组细胞总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度。按 Real-time PCR 试剂盒操作说明书合成 cDNA。Nanog 上游引物:5′-ACCTGGTGCACCCAATCCTGG-3′;下游引物 5′-CCCCAGCAGCTTCCAAGGCAG-3′;MDR1 上游引物:5′-CCGAGCACACCTGGGCATCG-3′;MDR1 下游引物:5′-GGCCTCCTTTGCTGCCCTCAC-3′;β-actin 上游引物:5′-TGGGCCTCGTCGCCCACATA-3′;下游引物:5′-GTCGTCGACAACGGCTCCGG-3′;β-actin-F。PCR 反应条件:95 ℃ 20 s,95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,70 ℃ 10 s,35 个循环。所有标本重复检测 3 次,计算出 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算分析。

1.5 Western blot 检测

细胞转染 48 h 后,按说明书提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。配制 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,各上样孔加入 25 μg 蛋白样品,电泳后转印至硝酸纤维素膜(PVDF)膜上。PVDF 膜以 50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h。分别加入 NANOG、MDR1 兔抗人单克隆一抗(1∶1 000)于 4 ℃孵育过夜。经 TBST 漂洗 3 次后,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔Ⅱ抗(1∶5 000),室温孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次,ECL 化学发光法试剂盒显影、曝光。经 Bio-Rad 公司图形分析软件 Quantity One 对图片进行分析并测定灰度值。

1.6 平板克隆形成实验

细胞转染 24 h 后,将细胞用胰酶消化后吹散成单细胞悬液,取 500 个细胞接种于培养皿中,每组设 3 个重复孔。于 37 ℃、5% CO_2 和相对湿度 95% 的恒温培养箱中培养 7 d。用多聚甲醛固定,1% 结晶紫染色。显微镜下计算克隆形成数(含有 10 个细胞以上的集落为 1 个克隆),克隆形成率(%) = 克隆形成数/接种细胞数 × 100%。

1.7 阿霉素敏感性检测

取对数生长期 HepG2 细胞,接种于 96 孔板,培养 24 h 后待细胞融合达 85% 左右时进行细胞转染。细胞转染后 24 h,加入 DOX 溶液至终浓度为 1 μg/mL 和 5 μg/mL,每组设 5 个平行孔,继续培养 24 h 和 48 h,更换为不含血清的新鲜培养基,并加入 10 μL CCK-8 试剂。置于 37 ℃孵育 2 h,用酶标仪测定 450 nm 的光密度值[$D(450)$],CCK-8 法检测细胞存活率。

1.8 流式细胞术检测

细胞转染 48 h 后,收集细胞,用 PBS 制备成单细胞悬液,用 750 mL/L 乙醇 4 ℃固定过夜,固定后细胞经 PBS 洗涤 2 次。避光条件下加入 PI 染液,室温孵育 30 min,用流式细胞仪分析样品测定细胞周期。

1.9 统计学处理

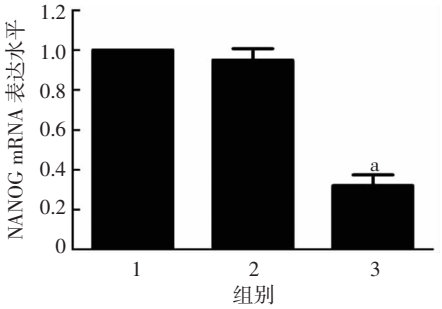
数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD 法)。

2 结果

2.1 RNAi 对 NANOG 表达的影响

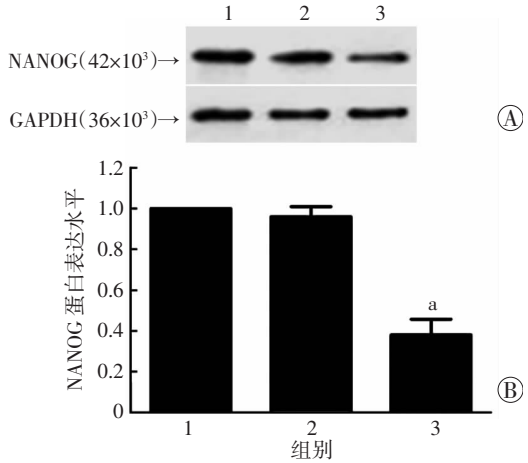
Real-time PCR 检测显示,采用 RNAi 抑制 NANOG 表达后 siNANOG 组细胞 NANOG mRNA 表达水平均较 Mock 组明显下降,比值为(0.32 ± 0.05),差异有统计学意义($P < 0.05$);siGFP

组与Mock组相比NANOG mRNA表达水平则无明显差异,比值为(0.95±0.06)($P>0.05$),见图1。Western blot结果显示,siNANOG组的NANOG蛋白表达水平较Mock组明显下降,灰度比值为(0.38±0.08),差异有统计学意义($P<0.05$);siGFP组与Mock组的NANOG蛋白表达水平则无明显差异,灰度比值为(0.96±0.05)($P>0.05$)。见图2。



1:Mock组;2:siGFP组;3:siNANOG组;a:$P<0.05$,与Mock组、siGFP组比较

图1 Real-time PCR检测各组RNAi抑制HepG2细胞中NANOG mRNA的表达

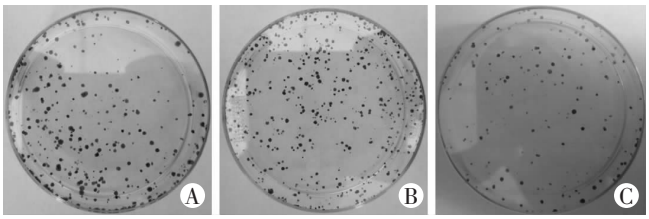


A:Western blot检测结果;B:半定量分析结果 1:Mock组;2:siGFP组;3:siNANOG组;a:$P<0.05$,与Mock组、siGFP组比较

图2 Western blot检测各组RNAi抑制HepG2细胞中NANOG蛋白的表达

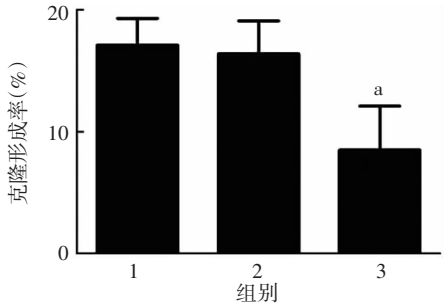
2.2 NANOG对细胞克隆形成的影响

各组克隆形成率:Mock组为(17.13±2.24)%,siGFP组为(16.40±2.74)%,siNANOG组为(8.51±3.63)%。siNANOG组细胞克隆形成率低于Mock组,差异有统计学意义($P<0.05$);siGFP组与Mock组细胞克隆形成率无明显差异($P>0.05$)。见图3、4。



A:Mock组;B:siGFP组;C:siNANOG组

图3 显微镜观察各组细胞克隆形成数变化 (结晶紫)

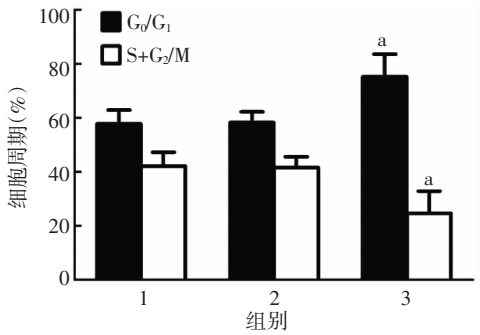


1:Mock组;2:siGFP组;3:siNANOG组;a:$P<0.05$,与Mock组、siGFP组比较

图4 平板克隆形成实验检测各组抑制NANOG表达对HepG2细胞克隆形成率的影响

2.3 NANOG对细胞周期的影响

流式细胞术检测结果显示,与Mock组细胞G_0/G_1期(57.81±5.05%)相比,siNANOG组细胞G_0/G_1期百分比升高,为(75.33±8.21)%,$S+G_2/M$期细胞数则相应减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。siGFP组与Mock组细胞G_0/G_1期百分比无明显差异($P>0.05$)。见图5。



1:Mock组;2:siGFP组;3:siNANOG组;a:$P<0.05$,与Mock组、siGFP组比较

图5 流式细胞术检测各组HepG2细胞的细胞周期变化

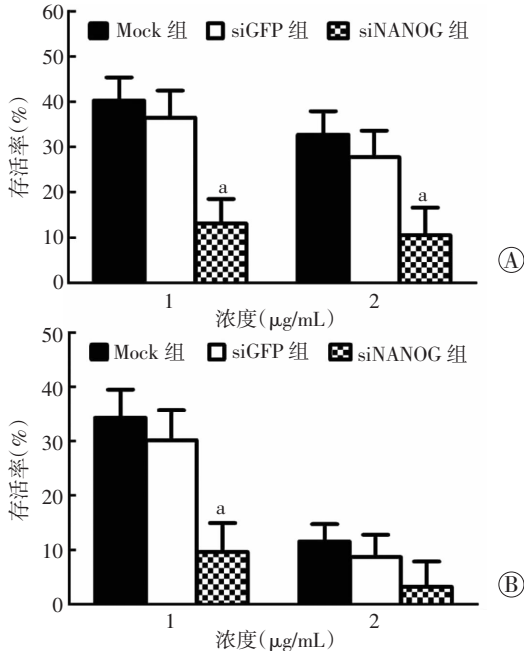
2.4 NANOG对细胞阿霉素敏感性的影响

CCK-8法检测结果显示,siNANOG组细胞在阿霉素1 μg/mL及5 μg/mL处理24 h后细胞存活率分别为(13.14±5.41)%和(10.51±6.15)%,均低于Mock组[(40.31±5.08)%、(32.76±5.22)%],差异有统计学意义($P<0.05$);siGFP组与Mock组相比无显著差异($P>0.05$),见图6A。siNANOG组细胞在阿霉素1 μg/mL处理48 h后细胞存活率(9.67±5.33)%低于Mock组(34.35±5.17)%,差异有统计学意义($P<0.05$);siNANOG组细胞在阿霉素5 μg/mL处理48 h后细胞存活率(3.23±4.65)%与Mock组(11.54±3.21)%相比无显著差异($P>0.05$),siGFP组与Mock组相比均无显著差异($P>0.05$),见图6B。表明RNAi抑制NANOG表达后HepG2细胞对阿霉素的敏感性增强。

2.5 NANOG对MDR1表达的影响

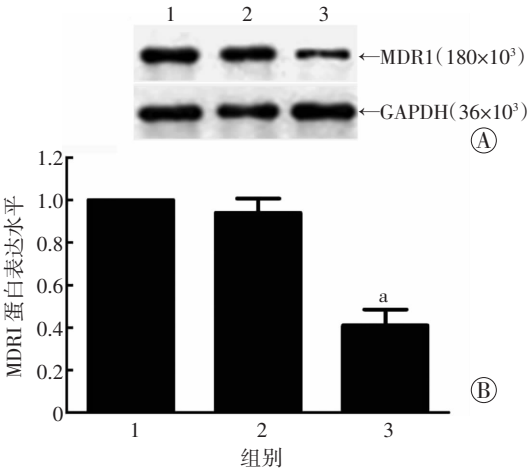
Real-time PCR检测显示,采用siRNA抑制NANOG表达后siNANOG组细胞MDR1 mRNA表达水平均较Mock组明显下降,比值为(0.35±0.06),差异有统计学意义($P<0.05$);siGFP组与Mock组相比MDR1 mRNA表达水平则无明显差异,比值

为(0.93 ± 0.05)($P > 0.05$)。Western blot 结果显示,siNANOG 组的 MDR1 蛋白表达水平较 Mock 组明显下降,灰度比值为(0.41 ± 0.08),差异有统计学意义($P < 0.05$);siGFP 组与 Mock 组的 MDR1 蛋白表达水平则无明显差异,灰度比值为(0.94 ± 0.08)($P > 0.05$),见图 7。表明 RNAi 抑制 NANOG 表达后降低 HepG2 细胞中 MDR1 mRNA 和蛋白的表达。



A:24 h ;B:48 h 1:1 μg/mL; 2:5 μg/mL;a:$P < 0.05$,与 Mock 组、siGFP 组比较

图 6 CCK-8 法检测不同浓度阿霉素作用不同时间后各组 HepG2 细胞存活率变化



A: Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 1: Mock 组;2: siGFP 组;3: siNANOG 组;a:$P < 0.05$,与 Mock 组、siGFP 组比较

图 7 Western blot 检测 RNAi 抑制 NANOG 表达后 HepG2 细胞中 MDR1 蛋白的表达

3 讨论

肿瘤耐药是临床上肿瘤化疗失败的主要原因。CSC 理论为肿瘤耐药研究及治疗提供了新思路:CSC 可能是肿瘤复发及化疗耐药的源头,抑制 CSC 有望从根本上提升抗肿瘤疗效。目前已从乳腺癌、胶质瘤等中鉴定并分离到 CSC[4,7-8],HCC 中也存在肝癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs)[9-10],可能是 HCC 化疗耐药的重要原因。NANOG 是近年来发现的一个维持 ESCs 自我更新和多向分化潜能的重要转录因子[2,11]。NANOG 异常表达与肿瘤发生、发展及 CSC 生物学特性相关:将 NANOG 基因转入造血干细胞后,导致 γδT 细胞恶性肿瘤的发生[12];RNAi 敲除 NANOG 可抑制乳腺癌及前列腺癌细胞增殖,阻止肿瘤进展[5];以 NANOG 为分子标记物分选出干细胞样肝癌细胞,具有 LCSC 相似的生物学特性,表明 NANOG 与 LCSC 关系密切[13]。通过阿霉素耐药而富集的 K562/A02 细胞表现出某些干细胞特性,伴随 NANOG 高表达[14],提示 NANOG 表达可能与肿瘤干细胞或肿瘤细胞的化疗耐药有关。

为验证“NANOG 是否参与肝癌细胞化疗耐药”的假设,本研究采用 RNAi 下调肝癌细胞 HepG2 中 NANOG 的表达,观察 HepG2 细胞生物学行为的变化,结果显示 RNAi 下调 NANOG 表达,可抑制细胞增殖并阻滞细胞周期于 G_0/G_1 期,与其他学者研究结果一致[5,15]。进一步采用 CCK-8 法检测 HepG2 细胞对阿霉素的敏感性,发现当 RNAi 下调 NANOG 表达后,HepG2 细胞对阿霉素的敏感性增强,与阴性对照组及 Mock 对照组相比差异有统计学意义,表明抑制 NANOG 表达可降低肝癌细胞 HepG2 对阿霉素的耐药性,提示 NANOG 表达可能参与调控 HepG2 细胞的阿霉素耐药性。研究表明,MDR1 的异常表达是多种恶性肿瘤化疗失败的重要原因[16],采用以 MDR1 为靶基因的 RNAi 技术可以逆转肝癌细胞 HepG2 对柔红霉素的耐药性[17]。为进一步验证 MDR1 是否在 NANOG 调控阿霉素耐药中起作用,我们检测了 HepG2 细胞中 MDR1 mRNA 和蛋白的表达,发现当 RNAi 下调 NANOG 表达后,HepG2 细胞中 MDR1 mRNA 和蛋白表达水平也出现下降,表明抑制 NANOG 表达可下调 HepG2 细胞中 MDR1 基因的表达,提示 MDR1 可能是 NANOG 调控 HepG2 细胞阿霉素耐药的重要原因。那么,NANOG 是通过何种机制参与调控 MDR1 基因的表达?目前仍不清楚,其具体分子机制有待深入研究。

总之,本研究基于靶向 NANOG 的 RNAi 技术初步证实抑制 NANOG 表达可以增强肝癌细胞 HepG2 对阿霉素的敏感性,可能与敲除 NANOG 后 MDR1 基因表达下调有关。然而,NANOG 参与调控 MDR1 基因表达的作用机制仍有待研究,深入探讨这 2 种基因与 CSC 的关系,将有助于弄清肿瘤耐药机制,为指导临床

预后及靶向治疗提供科学的实验依据。

参考文献：

[1] Clarke M F, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve[J]. Cell, 2006, 124(6): 1111 – 1115.

[2] Boyer L A, Lee T I, Cole M F, *et al*. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells[J]. Cell, 2005, 122(6): 947 – 956.

[3] Ezeh U I, Turek P J, Reijo R A, *et al*. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma[J]. Cancer, 2005, 104(10): 2255 – 2265.

[4] Gu G, Yuan J, Wills M, *et al*. Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor *in vivo*[J]. Cancer Res, 2007, 67(10): 4807 – 4815.

[5] Jeter C R, Badeaux M, Choy G, *et al*. Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development[J]. Stem Cells, 2009, 27(5): 993 – 1005.

[6] Reynolds A, Leake D, Boese Q, *et al*. Rational siRNA design for RNA interference[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(3): 326 – 330.

[7] Yu F, Yao H, Zhu P, *et al*. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells[J]. Cell, 2007, 131(6): 1109 – 1123.

[8] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, *et al*. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5821 – 5828.

[9] Rountree C B, Mishra L, Willenbring H. Stem cells in liver diseases and cancer: recent advances on the path to new therapies[J]. Hepatology, 2012, 55(1): 298 – 306.

[10] Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, *et al*. Discrete nature of EpCAM + and CD90$^+$ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2013, 57(4): 1484 – 1497.

[11] Silva J, Nichols J, Theunissen T W, *et al*. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state[J]. Cell, 2009, 138(4): 722 – 737.

[12] Tanaka Y, Era T, Nishikawa S, *et al*. Forced expression of Nanog in hematopoietic stem cells results in a gammadeltaT-cell disorder[J]. Blood, 2007, 110(1): 107 – 115.

[13] Shan J, Shen J, Liu L, *et al*. Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2012, 56(3): 1004 – 1014.

[14] Xin H, Kong Y, Jiang X, *et al*. Multi-drug-resistant cells enriched from chronic myeloid leukemia cells by Doxorubicin possess tumor-initiating-cell properties[J]. J Pharmacol Sci, 2013, 122(4): 299 – 304.

[15] Han J, Zhang F, Yu M, *et al*. RNA interference-mediated silencing of NANOG reduces cell proliferation and induces G_0/G_1 cell cycle arrest in breast cancer cells[J]. Cancer Lett, 2012, 321(1): 80 – 88.

[16] Ho G T, Moodie F M, Satsangi J. Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease?[J]. Gut, 2003, 52(5): 759 – 766.

[17] 潘光栋，严律南，王新平，等. RNA干扰逆转肝细胞癌多药耐药[J]. 第三军医大学学报，2008，30(1)：35 – 38.

（**收稿**：2013-09-11；**修回**：2013-10-18）

（编辑　邓强庭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2014)04-0350-01

宫内大量胎骨残留致不孕1例

田　畦，肖松舒，薛　敏　（410013 长沙，中南大学湘雅三医院妇产科）

[**关键词**] 胎骨残留；宫腔镜；不孕症

[**中图法分类号**] R711.6　　[**文献标志码**] B

胎骨残留是少见的并发症，多继发于中期妊娠钳刮术后，少量胎骨残留即可导致继发不孕，国内外文献偶有报道，多可通过宫腔镜诊断治疗。现报告1例我院诊治的胎骨残留患者，其宫腔镜下可见近乎完整的大量胎儿骨骼残留，类似病例中极为罕见。

1　临床资料

患者，女性，30岁，G_3P_0，因“中期妊娠引产术后不孕9年”，拟行体外受精-胚胎移植（IVF-ET）术，要求行宫腔镜检查于2011年10月25日就诊。患者于2002年6月因“妊娠15周”在当地医院行引产术，具体情况不详，术后月经规则，10～15/28～30 d，经量中等，无痛经。术后性生活正常，未避孕，一直未孕，男方精液检查正常。

妇科检查：外阴发育正常，阴道通畅，阴道内少量白色无异味分泌物，宫颈大小正常，光滑，质地中等，子宫前位，大小正常，质地中等，活动度好，双侧附件区未扪及明显异常。B超：子宫前位，宫体49 mm×37 mm×45 mm，宫体中部后壁内膜下可见一范围约2.2 cm×1.0 cm×0.7 cm强回声后伴声影。宫腔镜检查：宫腔深6.5 cm，内膜薄，毛糙，充血。腔内充满条块状、棒状、片状灰白色骨骼样组织，较粗者大小约10 mm×3 mm。诊断：宫腔内胎骨残留（图1）。遂在B超监护宫腔镜下以微型钳将胎骨逐一取出，共取出16片残留胎骨，包括颅骨、肋骨、肩胛骨、股骨、肱骨、脊椎等，形状大小不等，镜下清除至无明显残留组织，宫腔平整，术后探宫深8.5 cm。病理检查：（宫腔）增生期改变子宫内膜，轻度慢性炎症，部分骨组织。

（下转368页）

[**通信作者**] 薛　敏，E-mail：xuemin5908@sina.com

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140102.1433.012.html(2014-01-02)