DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.005
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
1622 2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)18-1622-05

反义GFAP对人恶性胶质瘤细胞系CHG-5增殖及分化的影响

赵 雯[1],史景泉[1],卞修武[1],万 瑛[2],卢佳友[1] (第三军医大学:[1]西南医院病理科,[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察抑制内源性胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)基因表达对恶性胶质瘤细胞生物学特性的影响,为进一步深入研究GFAP基因在胶质瘤恶性转化及诱导分化治疗中的作用提供实验基础。方法 构建反义GFAP逆转录病毒表达载体,经包装后以病毒上清感染人恶性胶质瘤细胞系CHG-5;采用RT-PCR、原位杂交以及免疫细胞化学方法检测GFAP基因及其蛋白的表达;并通过形态学、细胞生长曲线、软琼脂克隆形成及流式细胞分析等观察抑制GFAP基因表达后CHG-5细胞形态、增殖和细胞周期进程的变化。结果 反义逆病毒感染后CHG-5细胞GFAP mRNA及其蛋白表达显著减弱甚至缺失,瘤细胞异型性增加,细胞增殖速度加快,体外成瘤能力增强,S期、G_2/M期细胞比例升高。结论 抑制内源性GFAP基因表达可使CHG-5细胞呈现更为恶性的表型,提示GFAP基因在调控胶质瘤细胞分化程度及恶性生物学行为方面具有重要作用。

关键词:胶质瘤;胶质纤维酸性蛋白;逆转录病毒;基因表达;细胞培养
中图法分类号:R341;R730.23;R730.264 文献标识码:A

Effects of antisense GFAP retrovirus on cell proliferation and differentiation of human glioma cell line

ZHAO Wen[1], SHI Jing-quan[1], BIAN Xiu-wu[1], WAN Ying[2], LU Jia-you[1]([1]Institute of Pathology, Southwest Hospital, [2]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of suppression glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene expression on the biological features of human malignant glioma cells *in vitro*. Methods A recombinant retrovirus expression vector containing 1.1 Kb GFAP cDNA in the antisense orientation was constructed. The human glioma cell line, CHG-5, was infected with the suspension of this retrovirus after its packing and concentrating. RT-PCR, *in situ* hybridization as well as immunocytochemical method were employed to identify the expression of GFAP gene and its protein. The infected and control glioma cells were analyzed for the alterations of cell cycle progression, morphology, and cell growth features by using flowcytometry, cloning-formation on soft agar and other methods. Results The expression of GFAP mRNA and its protein were reduced or even eliminated in CHG-5 cells infected with antisense GFAP retrovirus. In contrast to the control, GFAP-negative CHG-5 cells demonstrated profound morphological alterations and marked cellular atypia. Cell proliferation rate and their tumorigenecity *in vitro* were also enhanced. Cell cycle analysis results revealed that cell proportion of S and G_2/M phases was increased significantly. Conclusion These results illustrate that suppression GFAP gene expression has affected CHG-5 glioma cell morphology, and enhanced their growth and tumorigenesity. The data also suggest that GFAP gene might play a key role in determination of differentiation and certain malignant biological features of glioma cells.

Key words: glioma; glial fibrillary acidic protein; retrovirus; gene expression; cell culture

胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)是主要存在于星形胶质细胞的一种中间丝结构蛋白,参与维持星形细胞形态并与其发育和分化密切相关。尽管近年来人们对GFAP表达与胶质细胞分化和瘤细胞生物学特性的关系、GFAP基因结构和功能状态在恶性胶质瘤诱导分化过程中的作用有了一定的新认识[1~3],但其确切功能及意义仍不十分清楚。本研究通过构建反义GFAP逆转录病毒表达载体,从反向

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970268)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39970268)
作者简介:赵 雯(1969-),女,山西省太原市人,博士,副主任医师,主要从事肿瘤诱导分化与基因治疗方面的研究。电话:(023)68752246
通信作者:卞修武,E-mail:bianxiuwu@263.net
收稿日期:2003-08-22;修回日期:2003-10-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

遗传学角度观察特异性封闭内源性 GFAP 基因表达后胶质瘤细胞形态、增殖、细胞周期及体外成瘤性的变化, 为进一步深入理解 GFAP 基因功能状态与瘤细胞恶性行为的关系及其在胶质瘤诱导分化治疗中的意义提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　细胞培养及分组

人恶性胶质瘤细胞系 CHG-5 由本所自行建系[4], 按常规方法, 即用含 10%胎牛血清(杭州四季青公司)的 RPMI1640 培养基(Gibco), 添加适量 HEPES(终浓度 10 mmol/L)、抗生素(100 单位/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素)及 3%谷氨酰胺, 置 37 ℃、5%CO_2 混合气体孵箱中培养。细胞换液时间 2~3 d, 3~5 d 传代, 传代前以 0.25%胰蛋白酶消化 2~5 min。将细胞分为反义 GFAP 感染组、pLXSN 空载体感染对照组和空白对照组用于感染后各项指标的检测。

1.2　反义 GFAP 逆病毒表达载体的构建、病毒包装与滴度测定

含 GFAP 基因第一外显子起始密码区 1.1 kb cDNA 片段的 pBR322 质粒源自美国纽约大学医学中心, 由本校新桥医院脑外科黄其林博士馈赠; 逆病毒表达载体 pLXSN 由大坪医院姚建忠博士馈赠, 本校全军免疫学研究所提供病毒包装细胞 PA317; DNA 分子量标准品 λDNA/*Hind* Ⅲ+ *Eco*RⅠ, 限制性内切酶 *Hind* Ⅲ、*Sal*Ⅰ、*Eco*RⅠ、*Xho*Ⅰ及 T4 连接酶均购自 Promega 公司; 质粒 DNA 纯化和凝胶 DNA 片段回收试剂盒购自 Omega 公司。脂质体 DOTAP Reagent、新霉素同源物 G418 购自 Roche 公司, 均按说明书并参考文献[5]方法进行操作。

质粒构建的主要策略为: 先用 *Hind* Ⅲ和 *Sal*Ⅰ酶切, 将 GFAP 片段反向克隆至过渡载体 pBluescript sk-; 再分别以 *Eco*RⅠ和 *Xho*Ⅰ酶切重组的过渡质粒和 pLXSN, 电泳回收之 DNA 及载体片段经 T4 连接酶连接, 筛选的阳性重组子(命名为 pLX-asGFAP)通过酶切电泳及 DNA 序列分析进行鉴定。

采用脂质体转染法分别将 pLX-asGFAP 和 pLXSN 导入 PA317 细胞, 以含 G418(400~800 μg/ml)的筛选培养基筛选 15~20 d, 挑选 4 个适宜大小的抗性克隆扩增至 90%汇合, 收集培养上清进行常规病毒滴度测定; 选择滴度高者进行浓缩用于进一步感染。

1.3　反义 GFAP 逆病毒感染 CHG-5 胶质瘤细胞

CHG-5 细胞以 1∶3 分传, 至 50%~60%汇合时分别取 1 ml pLX-asGFAP 和 pLXSN 浓缩病毒上清, 滴加于细胞表面并使之分布均匀, 37 ℃孵育 3 h 后补充适量培养基继续培养至完全汇合; 如此重复感染 3 次, 于末次感染传代后 12、24、48、72 h 收集细胞进行检测。

1.4　鉴定病毒 DNA 在 CHG-5 细胞中的整合

采用 Tripure 法(Roche)分别提取各组细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA 后进行 PCR 扩增、电泳分析 Neo 基因表达。Neo 基因引物: 上游 5′-CGAGGCAGCGCGGCTATCGT-3′, 下游为 5′-ACGT-GCTCGCTCGATGCGAT-3′, 扩增片段长 240 bp。PCR 反应条件为: 94 ℃预变性 5 min, 接由 94 ℃变性 1 min、52 ℃退火 50 s、72 ℃延伸 1 min 组成的 35 个循环, 最后 72 ℃延伸 10 min; 以 β-actin 基因作为内参照。逆转录酶及 PCR 试剂盒均购自 Promega 公司。

1.5　GFAP 基因及其蛋白表达的检测

1.5.1　RT-PCR 及原位杂交检测 GFAP mRNA 表达　细胞总 RNA 提取、逆转录和 PCR 扩增步骤及条件同上。GFAP 引物: 上游 5′-CTGAATTCTGCTGGCTTCAAGG-3′, 下游 5′-CTAAGC TTGCTCTGCGTTGCGG-3′, 由上海生工公司合成。

地高辛(Dig)末端标记试剂盒、抗 Dig 抗体及显色剂 NBT/BCIP 购自 Roche 公司, 原位杂交试剂盒购自武汉博士德公司, 参照说明书进行操作。阳性对照采用不含 GFAP 探针的预杂交液或于杂交前以 20 μg/ml RNase A, 37 ℃作用 30 min 进行杂交, 染色结果以细胞出现明确紫蓝色判定为反应阳性。

1.5.2　免疫细胞化学染色检测 GFAP 蛋白表达　采用 S-P 法, 鼠抗人 GFAP 单克隆抗体(1∶100)及试剂盒均为 DAKO 公司产品, 阴性对照采用 PBS 代替一抗进行反应, 以胞浆内出现明确棕黄色为阳性结果。

1.6　细胞生长曲线及群体倍增时间测定

指数生长期细胞按 1×10^5 个/ml 密度接种于 6 孔培养板中, 每组设 3 个复孔。完全贴壁后每日以 0.4%台盼蓝排除试验计数活细胞平均数(每孔重复计数 3 次取均值), 共测 3 d, 绘制细胞生长曲线并按公式计算群体倍增时间。

群体倍增时间(h)=细胞处理后培养时间(t)×log2/(log 处理后细胞数−log 处理前细胞数)

1.7　细胞软琼脂克隆形成分析

于 6 孔培养板内加入以 RPMI 164010%小牛血清培养基稀释的琼脂, 底琼脂浓度为 0.5%, 顶琼脂浓度为 0.3%。将上述各组细胞分别以 3×10^3 个密度接种, 每组设 3 个复孔, 于 37 ℃, 5% CO_2 孵箱中培养 2 周, 记录≥20 个细胞的克隆数。计算克隆形成率:

$$\text{克隆形成率}=\frac{\text{克隆形成数目}}{\text{接种细胞数}}\times100\%$$

1.8　细胞周期检测

分别收集各组细胞, 0.01 mol/L PBS 洗涤后调节细胞密度为 1×10^5 个/ml, 70%冰乙醇充分固定, 加入 RNase 37 ℃温育 30 min, 碘化丙啶(100 μg/ml)染色 2 h, 以 FACStarplus 型流式细胞仪(Becton Dickinson Inc.)检测细胞周期。每样本随机测定 10^4 个细胞, 以 Becton Dickinson Inc. Cell-fit 软件系统分析结果。

1.9　统计学分析

计量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 专用数理统计分析软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　pLX-asGFAP 重组质粒的鉴定及病毒滴度测定结果

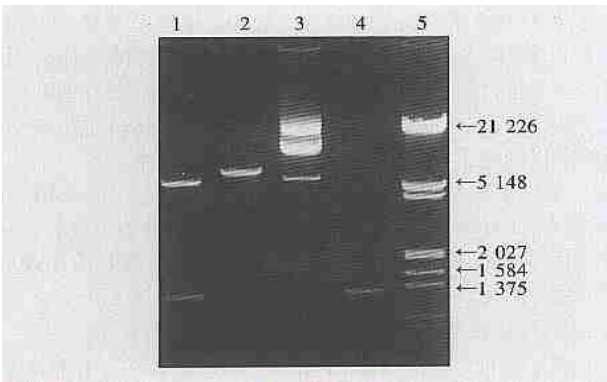
重组 pLX-asGFAP 经酶切、电泳鉴定, 1.1 kb GFAP 插入片段成功分离(图 1); DNA 序列分析表明插入片段的序列及方向完全正确。收集病毒上清, 经浓缩后测定滴度 pLX-asGFAP 为 4.1×10^5 cfu/ml, pLXSN 为 6.0×10^5 cfu/ml。

2.2　细胞形态学变化

对照组 CHG-5 细胞呈多角形或短梭形, 有 2~3 个突起, 胞

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

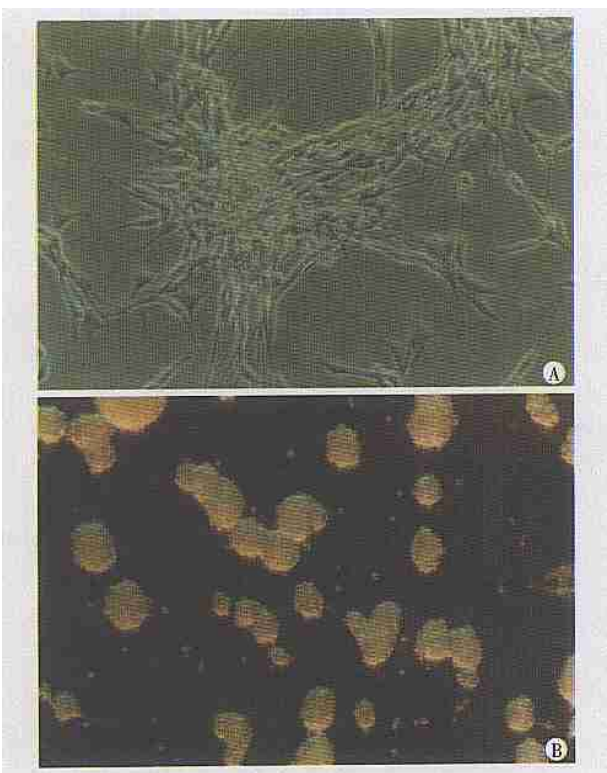
体小而核大居中(图2A)。pLX-asGFAP逆病毒感染后细胞呈三角、立方或不规则等多种形态,胞突明显回缩,部分细胞甚至无突起形成;核显著增大,几乎占据整个胞浆部分,核浆比例增大;细胞增殖旺盛,排列密集,常于短时间内汇合并呈高度重叠的复层生长,多易聚集形成团状球体(图2B)。空载体组感染初期CHG-5细胞折光性略低,胞浆内颗粒状物质增多,但继续培养与对照组区别不大。



1: *Eco*RⅠ/*Xho*Ⅰ digested pLXSN-asGFAP; 2: *Eco*RⅠ digested pLXSN-asGFAP; 3: pLXSN-asGFAP recon; 4: Fragment of GFAP; 5: λDNA/*Hind*Ⅲ+ *Eco*RⅠ

图1 重组pLX-asGFAP酶切鉴定

Fig 1 Identification of recombin ant pLX-asGFAP



A: Control (Inverted microscope× 100); B: Infected with anti-GFAP retrovirus (Phase contrast microscope× 100)

图2 CHG-5细胞

Fig 2 Control CHG-5 cells

2.3 病毒DNA在CHG-5细胞中的整合

经PCR扩增*Neo*基因,反义感染组可获得与设计一致的片段,而对照组细胞不能扩增出*Neo*基因条带,表明病毒DNA成功整合入靶细胞。

2.4 GFAP mRNA表达

RT-PCR结果显示两对照组CHG-5细胞可扩增出GFAP特异性条带,而反义GFAP组的扩增条带十分微弱甚至不可见。原位杂交示对照组部分细胞呈GFAP阳性反应,阳性信号定位于胞浆和部分胞核;反义逆病毒感染后CHG-5细胞GFAP mRNA阳性表达减弱,部分细胞呈阴性反应(图3)。

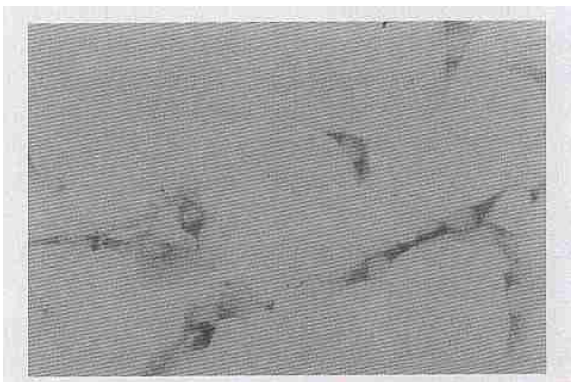


图3 反义逆病毒感染的CHG-5细胞,GFAP mRNA呈弱阳性或阴性表达 (ISH× 200)

Fig 3 Weakor even negative expression of GFAP mRNA in CHG-5 cells infected with anti-GFAP retrovirus (ISH× 200)

2.5 GFAP蛋白表达

对照组部分CHG-5细胞GFAP于胞浆内呈阳性棕黄色反应,表达面积相对较大;而反义感染后GFAP棕黄色信号明显减弱,仅见散在的、极少量细胞呈微弱阳性(图4)。

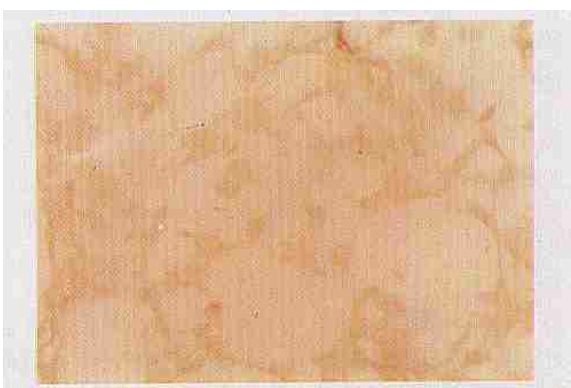


图4 反义逆病毒感染的CHG-5细胞GFAP蛋白表达呈阴性 (ICC× 200)

Fig 4 Negative expression of GFAP protein in CHG-5 cells infected with anti-GFAP retrovirus by immunocytochemical staining (ICC× 200)

2.6 细胞生长曲线及群体倍增时间变化

如表1所示:反义逆病毒感染CHG-5细胞12 h,细胞计数略增加,但与对照组相比差异无统计学意义;24~48 h后细胞

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生长速度明显加快, 72 h 细胞数较对照组增加极为显著($P<0.01$)。细胞平均群体倍增时间较对照组显著缩短(16.28 h *vs* 29.68 h)。空载体组 CHG-5 细胞数在感染后 24 h 略有减少, 但与空白对照组相比无统计学差异。

表 1　反义 GFAP 逆病毒感染 CHG-5 后细胞数($\times 10^5$/ml)及活细胞百分率变化[($\bar{x}\pm s$)%]

Tab 1　Changes of CHG-5 cell numbers ($\times 10^5$/ml) and viable cell percentage after antisense GFAP retrovirus infection[($\bar{x}\pm s$)%]

Group	12 h	24 h	48 h	72 h
Control	2.0±0.19(93)	2.6±0.61(94)	5.7±1.20(91)	11.1±1.44(90)
pLXSN	1.8±0.38(90)	2.3±1.63(89)	5.5±0.75(88)	10.9±1.26(89)
anti-GFAP	2.1±0.41(88)	3.4±0.76(90) **△△	8.2±1.37(89) **△△	19.8±3.06(86) **△△

**: $P<0.01$, *vs* control; △△: $P<0.01$ *vs* pLXSN

2.7　细胞克隆形成率测定结果

各组 CHG-5 细胞均能在软琼脂内形成克隆, 与空载体组及对照组相比, 反义 GFAP 组 CHG-5 细胞克隆形成率的增加具有显著统计学意义($P<0.01$, 图 5)。

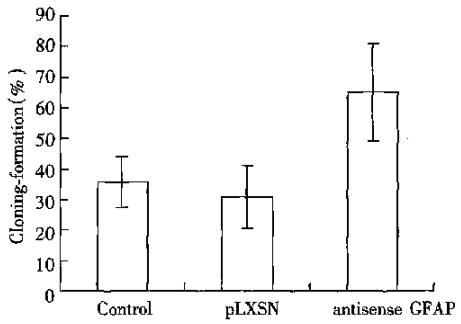


图 5　反义 GFAP 逆病毒感染 CHG-5 后细胞软琼脂克隆形成率变化

Fig 5　Changes of cloning-formation on soft agar of CHG-5 cells after antisense GFAP retrovirus infection

2.8　细胞周期分析结果

与对照组相比, 反义 GFAP 逆病毒感染 CHG-5 细胞 24～48 h 后 S 期和 G_2/M 期细胞比例增多, G_0/G_1 期细胞减少(表 2)。

表 2　反义 GFAP 逆病毒感染 CHG-5 后细胞周期检测结果[($\bar{x}\pm s$)%]

Tab 2　Analysis of cell cycle after antisense GFAP retrovirus infection[($\bar{x}\pm s$)%]

Time of infection (h)	Control			pLXSN			antisense GFAP		
	G_0/G_1	S	G_2/M	G_0/G_1	S	G_2/M	G_0/G_1	S	G_2/M
12	49.8±7.5	44.1±5.0	8.0±4.4	48.7±7.1	40.2±8.3	13.3±3.1	47.5±6.7	41.6±5.2	11.5±3.6
24	56.3±14.2	41.2±9.3	3.8±0.8	57.6±6.8	38.7±5.7	5.1±2.6	42.1±7.6 *△	49.2±4.8 *△	8.8±2.7 **△△
48	45.1±9.7	45.4±8.9	9.5±4.1	47.6±9.1	42.0±4.9	11.1±4.5	25.3±5.5 **△△	64.8±9.4 **△△	9.7±4.2
72	52.6±13.8	39.3±4.4	10.8±2.8	49.0±8.2	42.5±11.4	9.5±3.8	32.2±5.2 **△△	56.5±7.9 **△△	11.3±5.6 *△

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$, *vs* pLXSN

3　讨论

人 GFAP 基因位于 17 号染色体(17q21), 与肿瘤相关基因 nm23、erbB-2 等相邻。GFAP 型中间丝除提供星形细胞形态结构性支撑外, 还具有参与细胞内骨架重组、桥接细胞核和质膜的主要蛋白成分、维持脑内髓鞘形成以及作为细胞信号转导通路等作用[2,6]。GFAP 表达与星形细胞的发育和分化有密切关系, 随着星形细胞的成熟, GFAP 表达逐渐增强, 因此, 国内外学者已将 GFAP 作为星形细胞及其肿瘤的特异性分化标记物[2,6,7]。

有关 GFAP 的其他功能及机制尚不清楚。本实验针对 GFAP 的基因结构特点及其在胶质瘤中的表达规律, 将含编码 GFAP 基因第一外显子起始密码区的长约 1.1 kb 的 cDNA 片段反向插入逆转录病毒载体, 通过病毒 DNA 整合到 CHG-5 胶质瘤细胞基因组中, 合成反义 RNA, 特异性封闭 GFAP 基因表达。结果显示反义逆病毒感染的 CHG-5 细胞经 RT-PCR 扩增未见到特异性的 GFAP 表达条带, 且原位杂交及免疫细胞化学检测均显示绝大多数细胞 GFAP mRNA 及其蛋白表达显著降低甚至不表达, 表明反义基因封闭有效。进一步的观测发现反义感染后的 CHG-5 细胞形态发生明显改变, 多数细胞丧失锚着依赖生长特性, 易聚集形成细胞球体; 细胞增殖速度加快, 群体倍增时间大为缩短。这些结果提示在有效封闭内源性 GFAP 基因及其蛋白表达后, CHG-5 细胞呈现更为恶性的表型, 且进展更为迅速。此外, 肿瘤细胞在软琼脂中的克隆性生长与其在体内的致瘤能力具有较高的一致性, 并可反映细胞的独立生存和主动移动能力, 是检测转化、肿瘤细胞恶性程度的常用指标。我们观察到反义组 CHG-5 细胞体外成瘤能力显著增高, 形成克隆的数目及大小远远超过其它两组, 更进一步提示了反义组 CHG-5 细胞的恶性演进。

肿瘤细胞的增殖分化有赖于细胞的周期活动, 其中, G_0 期细胞为暂时游离于增殖周期以外的静止态细胞, 是肿瘤复发的来源; G_1 期主要进行 RNA 和核糖体的大量、持续合成, 并且还合成 DNA 诱导物以及 DNA 复制所需的前提物质。本实验中反义 GFAP 逆病毒感染 CHG-5 细胞后, S 期和 G_2/M 期细胞比例增多, 而 G_0/G_1 期细胞比例减少, 表明封闭 GFAP 表达可通过使

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

大量瘤细胞进入 S 期进行 DNA 复制，以及进入 G_2/M 期完成有丝分裂，从而促进细胞的增殖生长；而 G_0/G_1 期细胞减少也提示 GFAP 表达的减弱或缺失可刺激处于非增殖状态的静止瘤细胞进入细胞周期，可能与胶质瘤复发有关。

近年来一些研究表明，改变 GFAP 基因及其表达状态对星形细胞及其来源的肿瘤的生物学特性有重要影响[8,9]。GFAP 基因敲除小鼠的星形细胞高表达祖细胞标志物 nestin，且这种细胞中间丝形成减少，生长时饱和密度增高，提示 GFAP 表达的丧失能使星形细胞向恶性表型转化；而将 GFAP 基因导入不表达 GFAP 的髓母细胞瘤瘤细胞中，细胞生长受抑，形态显著改变并向星形细胞分化；GFAP 重新获得表达，表达程度与肿瘤增殖、分化呈明显负相关，且瘤细胞对抗癌药物的敏感性提高。本实验结果进一步丰富了上述论证，证实作为星形细胞特异的中间丝蛋白，GFAP 的基因功能状态不仅在维持正常星形细胞形态结构及成熟方面十分重要，而且在调控胶质瘤细胞的分化程度和恶性行为方面具有决定性作用。同时，也提示我们 GFAP 基因本身有可能作为胶质瘤的抑制基因而发挥效应，通过诱导分化或基因治疗等策略增强 GFAP 基因表达将对恶性胶质瘤的治疗具有重要意义。

参考文献：

[1] Messing A, Brenner M. GFAP: functional implications gleaned from studies of genetically engineered mice[J]. Glia, 2003, 43(1): 87—90.
[2] 卞修武. 胶质纤维酸性蛋白基因调控及其在胶质瘤诱导分化中的作用[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(3): 222—223.
[3] Tysnes B B, Mahesparan R. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets[J]. J Neurooncol, 2001, 53(2): 129—147.
[4] 陈自强, 卞修武, 辛 榕, 等. 人脑胶质瘤细胞系 CHG-5 的建立及其生物学特性分析[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(12): 880—883.
[5] F. 奥斯伯, R. 布伦特, R. E. 金斯顿, 等. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 274—326.
[6] Pekny M. Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice[J]. Prog Brain Res, 2001, 132(4): 23—30.
[7] Eng L F, Ghirnikar R S, Lee Y L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969—2000)[J]. Neurochem Res, 2000, 25(9—10): 1439—1451.
[8] Elobeid A, Bongcam-Rudloff E, Westermark B, *et al*. Effects of inducible glial fibrillary acidic protein on glioma cell motility and proliferation[J]. J Neurosci Res, 2000, 60(2): 245—256.
[9] Pekny M, Eliasson C, Chien C L, *et al*. GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density[J]. Exp Cell Res, 1998, 239(2): 332—343.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)18-1626-01

采用微创技术救治高血压性脑出血双侧脑疝形成患者的疗效

Effects of tiny-initiating sugery on the patients with intracerebral hemorrhage with both-side brain hernia

耿黎明，苗今乐，牟艳春，许建军，陈丽华，马 飞，许雪琴 （中国人民解放军第 404 医院神经内科，威海 264200）

重症高血压性脑出血并双侧脑疝形成病死率几乎 100%，本研究应用颅内血肿微创碎吸清除技术（微创术）治疗 8 例高血压性脑出血并发双侧脑疝形成疗效满意，结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

筛选 2000 年 1 月至 2003 年 12 月我科住院病人 8 例，男性 7 例，女性 1 例，年龄 52～84 岁，平均 68 岁。诊断为高血压性脑出血，均据入院时颅脑 CT 计算血肿量 100～145 ml，平均为 126 ml。出血部位：内囊型 5 例，脑叶出血 3 例，其中 2 例破入脑室。

作者简介：耿黎明（1961— ），男，山东省威海市人，硕士，副主任医师，主要从事神经内科临床方面的研究。发表论文 18 篇。电话：13386302327

收稿日期：2003-12-05；修回日期：2004-03-09

钻颅手术时间：4 例在发病 4 h，3 例在发病 8 h，1 例发病 10 h，8 例均在出现脑疝的 2 h 内完成。脑疝形成前后 2 例血压 260/130 mmHg 以上，6 例在 240～260/120～130 mmHg 之间，2 例为 210～240/110～120 mmHg。3 例以意识丧失 2～3 h 入院，2 例入院后 2 h 内发生意识丧失，1 例入院后 10 h 发生。Glasgow-pittsburgh 昏迷观察表评分 8 例均在 8～10 分。8 例意识障碍开始时出血侧瞳孔散大固定对光反射消失，之后均出现对侧瞳孔散大对光反射消失，5 例双侧肢体为痉挛性瘫痪，3 例呈迟缓性瘫痪，4 例双侧病理征阳性，3 例双侧病理征均阴性，1 例患侧病理征阳性。

1.2 救治方法

①手术器械：YL-1 型颅内血肿微创碎吸穿刺针。②血肿定位：根据 CT 片选择血肿最大层面并避开重要功能区及大血管，用自制的血肿定位器（专利号 ZL01261632）作血肿穿刺点定位。

（下转 1630 页）

1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net