DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.015
第25卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 17
2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

文章编号:1000-5404(2003)17-1531-05

论著

人心肌营养素-1重组腺病毒载体的构建、纯化及表达

张正丰,廖维宏,杨青峰,李红运 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室,重庆 400042)

提 要:目的 构建人心肌营养素-1重组腺病毒载体,以期用于神经系统退行性疾病及损伤的在体研究。方法 构建穿梭质粒pDC316-huCT1和pDC316-eGFP,CsCl梯度离心制备高纯度的病毒基因组质粒pBHloxdeltaE1,3Cre、pHG140。培养293细胞,$CaCl_2$法质粒共转染293细胞构建并筛选腺病毒AdCMV-huCT1和AdCMV-eGFP。病毒原液转染293细胞及NIH 3T3细胞,PCR、RT-PCR及免疫组化鉴定。CsCl梯度离心纯化病毒,空斑试验检测病毒滴度。纯化病毒注入大鼠颈脊髓,RT-PCR及免疫组化检验AdCMA-huCT的在体表达。结果 采用双质粒共转染293细胞Cre/loxP位点同源重组方法构建了E1和E3缺失的含MCMV启动子、外源基因和SV40 PloyA的AdCMV-huCT1和AdCMV-eGFP载体。经过PCR、RT-PCR和免疫组化证实腺病毒载体构建成功。病毒经过CsCl梯度离心纯化后,AdCMV-huCT1滴度达到3.0×10^{10}pfu。RT-PCR及免疫组化显示AdCMV-huCT1在大鼠脊髓中特异性表达。结论 构建并纯化了体外及体内高效表达的AdCMV-huCT1。

关键词:心肌营养素-1;重组腺病毒;基因治疗
中图法分类号:R373.1;R392.11;R394.2 文献标识码:A

Construction and purification of human cardiotrophin-1 adenovirus vector and its expression *in vitro* and *in vivo*

ZHANG Zheng-feng, LIAO Wei-hong, YANG Qing-feng, LI Hong-yun (Department 3, Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct human cardiotrophin-1 (huCT-1) adenovirus vector for central nervous system (CNS) gene therapy *in vivo*. Methods The huCT-1 and eGFP genes were cloned into shuttle plasmid pDC316 to construct pDC316-huCT-1 and pDC316-eGFP. Virus genome plasmids pBHGloxdeltaE1,3Cre and pHG140 were purified by CsCl banding certification. Recombinant replication-defective adenovirus vectors AdCMV-huCT1 and AdCMV-eGFP were rescued in 293 packaging cells by co-transfection and Cre-mediated recombination of both plasmids pDC316-huCT1 and pBHGloxdelta1,3Cre. The insert gene and its expression were identified by PCR, RT-PCR and immunohistochemistry after recombinant adenovirus transfected 293 cells and NIH 3T3 cells. Recombinant adenovirus vectors were purified by CsCl banding and titrated by plaque forming test. AdCMV-huCT1 expression *in vivo* was analyzed by RT-PCR and immunohistochemistry after transfection of the cervical spinal cord in adult rats. Results We have constructed two recombinant adenoviral vectors: AdCMV-huCT1 and AdCMV-eGFP, containing MCMV promoter, foreign DNA and SV40 PolyA with deletions of E1 and E3 regions. The positive huCT-1 mRNA and protein were identified in AdCMV-huCT1 transfected NIH 3T3 cells and rat cervical spinal cord. The titer of virus stocks was generally up to 3.0×10^{10} plaque forming units (pfu) per milliliter. Conclusion Recombinant purified AdCMV-huCT1 vectors can be highly expressed *in vitro* and *in vivo* and is suitable for CNS gene therapy *in vivo*.

Key words: cardiotrophin-1; adenovirus; gene therapy

心肌营养素-1(Cardiotrophin-1, CT-1)与LIF、CNTF、OSM、IL-6、IL-11同属于IL-6家族[1]。除对心肌细胞的广泛生物学作用外,CT-1对神经系统的作用越来越引起人们的注意。CT-1能长时间的支持运动神经元、多巴胺神经元和交感神经元的存活[2]。已有CT-1联合GDNF促进周围神经再生的报道和CT-1基因治疗大鼠进行性运动神经元病的动物实验[3~5]。本研究利用体内同源重组原理构建huCT-1的重组腺病毒载体并纯化,以期用于神经系统退行性疾病及损伤的在体研究。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、细胞

pBSSK-huCT1[6]:包含huCT-1 cDNA 1-1018(美国Dianne Pennica教授惠赠);pIRES2-eGFP:(Clontech);AdMaxTM Adenovirus Vector Kits:包含穿梭质粒pDC316,Ad5腺病毒基因组质粒pBH-

基金项目:重庆市科委院士基金资助项目(1999-003)
作者简介:张正丰(1968-),男,四川省青川县人,博士,主治医师,主要从事脊柱脊髓损伤方面的研究。电话:(023)68774908
收稿日期:2002-10-14;修回日期:2003-01-11

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

GloxdeltaE1, 3Cre, Ad5 阳性对照质粒 pHG140 (Microbix); pMD18: 为 pMD18-T(Takara)自身连接载体。

大肠杆菌 DH5α (本室保存)。大肠杆菌 Top10F′感受肽(Clontech)。

293 细胞: 人胚胎肾细胞(约 32 代, 本室保存); NIH 3T3 细胞(本室保存)。

1.2 主要试剂

Hind Ⅲ、*Sac*Ⅰ、*Eco*RⅠ、*Bgl*Ⅱ、*Not*Ⅰ 内切酶(Takara); Takara LA Taq (Takara)。Anti huCT-1: mAb IgG (Santa CruZ)。透析卡: Slide-A-Lyzer cassette, MWCO=7 000 (Pierce)

PCR 引物: 自行设计, 上海生工合成。huCT-1 primer: P1, 5′-ACCTCCTCACCAAATAGG-3′ (136-153 of the human CT-1 cDNA sequence; GenBank: U43030)。P2, 5′-TAGAGGCCGCAAACG-3′ (574-560 of the human CT-1 cDNA sequence), 产物 438 bp。eGFP primer: P1, 5′-GCCACAAGTTCAGCGTGTCC-3′。P2, 5′-AGCTCGATGCGGTTCACCAG-3′, 产物 304 bp。

1.3 穿梭质粒的构建及质粒制备

pDC316-huCT1 构建: pBSSK-CT1、pDC316 质粒 *Hind*、*Sac*Ⅰ 双酶切, 回收 CT-1 DNA 及 pDC316 片段, T4 DNA 连接酶连接, 转化 DH5α, 挑取阳性克隆, 细菌培养, 质粒提取, 酶切鉴定。

pDC316-eGFP 构建: 先将 pIRES2-eGFP 用 *Eco*RⅠ、*Not*Ⅰ 酶切, 将 eGFP 克隆入 pMD18。再将 pMD18-eGFP 用 *Eco*RⅠ、*Bgl*Ⅱ 酶切, 将 eGFP 克隆入 pDC316, 命名为 pDC316-eGFP。

pBHloxdeltaE1, 3Cre、pHG140 制备: pBHloxdeltaE1, 3Cre、pHG140 转化 Top10F′, 挑取阳性克隆, 细菌培养, CsCl 离心法制备高纯度质粒, 酶切鉴定。

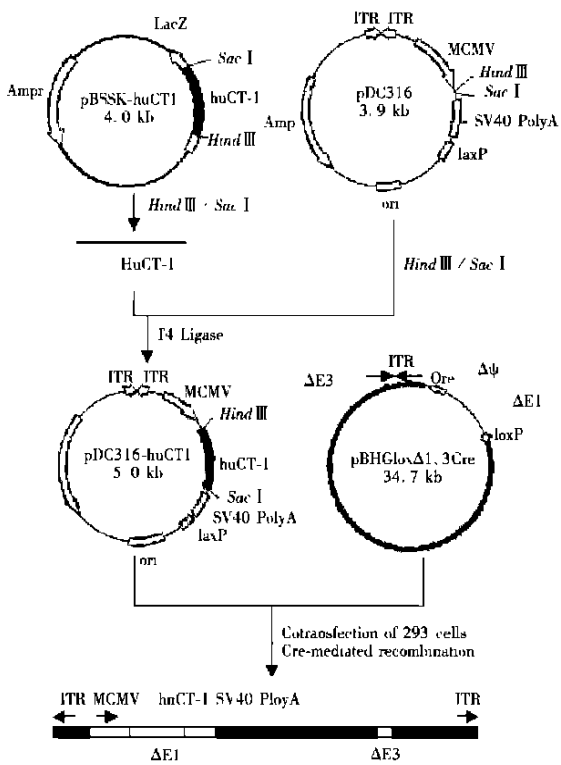


图1 Adv-huCT1的构建

Fig 1 Construction of Adv-huCT1

1.4 质粒共感染细胞构建腺病毒及筛选

构建 3 种腺病毒: AdCMV-huCT1 (pDC316-huCT1+pBHGloxdeltaE1, 3Cre), AdCMV-eGFP (pDC316-eGFP+pBHGloxdeltaE1, 3Cre), 阳性对照 Ad5 (pFG140)。

$CaCl_2$ 共感染细胞: 培养 293 细胞至 70%~80%融合, $CaCl_2$ 法穿梭质粒和 pBHloxdeltaE1, 3Cre 共感染 293 细胞(方法见 Microbix 公司产品说明), 孵育 14 h 后, 弃去培养基, 加入 0.5% 琼脂糖培养基, 培养 5 d 至细胞病理效应(Cyto-phathological effects, cpe)形成, 见图 1。

腺病毒的筛选: 吸出 cpe 加入 PBS 中, 成为病毒原液。37 ℃感染 293 细胞 1 h, 加入 5%HS 培养基培养至 cpe 形成, 吸出培养基为初制病毒液。

1.5 腺病毒体外感染细胞及分析

PCR: 收集初制病毒液感染的 293 细胞, 提取病毒 DNA。以 DNA 为模板, 引物 P1, P2, 进行 PCR 鉴定。反应条件: 94 ℃变性 40 s, 62 ℃退火 50 s, 72 ℃延伸 90 s, 30 个循环。

RT-PCR: NIH 3T3 细胞培养, 初制病毒液 37 ℃感染细胞 1 h, 无血清培养基培养 48 h。Tripure 提取 RNA, M-MLV 逆转录酶作用下, 以 olig(dT)18 为引物将 RNA 反转录为 cDNA。以引物 P1、P2 进行 PCR, 条件同上。

免疫组化: AdCMV-huCT1 转染 NIH 3T3 细胞 48 h, 按 SABC 试剂盒说明进行 Anti-huCT1 细胞免疫组织化学, 荧光观察: AdCMV-eGFP 转染 NIH 3T3 细胞, 48 h 在荧光显微镜蓝色激发荧光下观察细胞 GFP 表达发光。

1.6 腺病毒的纯化—CsCl 梯度离心

293 细胞细胞大量培养, 病毒原液转染。293 细胞 cpe 完全形成后, 用细胞刮匙刮下细胞。离心, 收集细胞沉淀, 细胞冻融和 5%脱氧胆酸钠裂解。离心, 去细胞碎片, 留上清为粗制病毒液(Crude virus liquid, CVL)。第 1 次 CsCl 梯度离心, 在 13 ml 快封管底部加入 0.5 ml 1.5 g/ml CsCl 溶液, 其上小心加入 3.0 ml 1.35 g/ml CsCl 溶液, 再加入 3.0 ml 1.25 g/ml CsCl 溶液, 加入 5 ml 上清, 顶部用 0.1 mol/L Tris-Cl pH 8.0 加满。贝克曼(Beckman)离心机 Tpye 65 转子, 10 ℃, 49×10^3 r/min, 1 h。18 号针头穿刺收集 1.35 g/ml 和 1.25 g/ml CsCl 两层之间的白色病毒层。第 2 次 CsCl 梯度离心, 在 10 ml 超净管中加入病毒和 1.35 g/ml CsCl 溶液至顶部, SW55Ti 转子, 43×10^3 r/min, 10 ℃, 24 h。18 号针头穿刺收集下层白色病毒层。将病毒移入透析卡, 于 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 透析 24 h。吸出后加入终浓度为 10%的甘油, 小份分装, −70 ℃保存。

1.7 病毒滴度-空斑试验

293 细胞在 12 cm^2 培养皿中培养, 生长至 80%融合。纯化病毒液, 用 293 培养液稀释成 10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}和 10^{-10} 4 个稀释度, 分别感染 293 细胞 1 h。中性红琼脂糖培养基覆盖。每天计数空斑 1 次, 直至空斑数目稳定不变为止, 计算滴度。

1.8 腺病毒在大鼠脊髓中的表达

纯化病毒用 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)(病毒稀释液)稀释至 10^7 pfu/ml, 32 只 Wistar 大鼠分为病毒注射组和病毒稀释液注射组。动物腹腔麻醉后, 手术切开 C_2~C_5 处, 暴露椎板, 摘除 C_3 左侧椎板, 切开硬脊膜。用显微注射器于 C_3 外侧素注入 2 μl 病毒液或病毒稀释液, 关闭伤口。1 周、1、2、3 个月后动物取材行 RT-CPR 和组化检验。RT-PCR 实验组动物麻醉后, 快速切除 4 mm 注射区脊髓, Hanks 液漂洗 10 s, 置于 1 ml Trigure 液中,

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

提取 RNA, 以引物 P1、P2 进行 RT-PCT, 条件同上免疫组化实验组动物常规灌注, 脊髓冷冻切片, 进行 Anti-huCT 细胞免疫组织化学染色。

2　结果

2.1　穿梭质粒的构建及质粒制备

穿梭质粒 pDC316-huCT1、pDC316-eGFP 酶切鉴定, 酶切片段正确酶切片段大小一致。pBHGloxdeltaE1, 3Cre、pHG140 转化 Top10F′感受肽, 质粒提取, 经过 CsCl 分层纯化, 去除缺口 DNA 和染色体 DNA。*Hind* Ⅲ酶切鉴定, 大小正确。

2.2　腺病毒构建

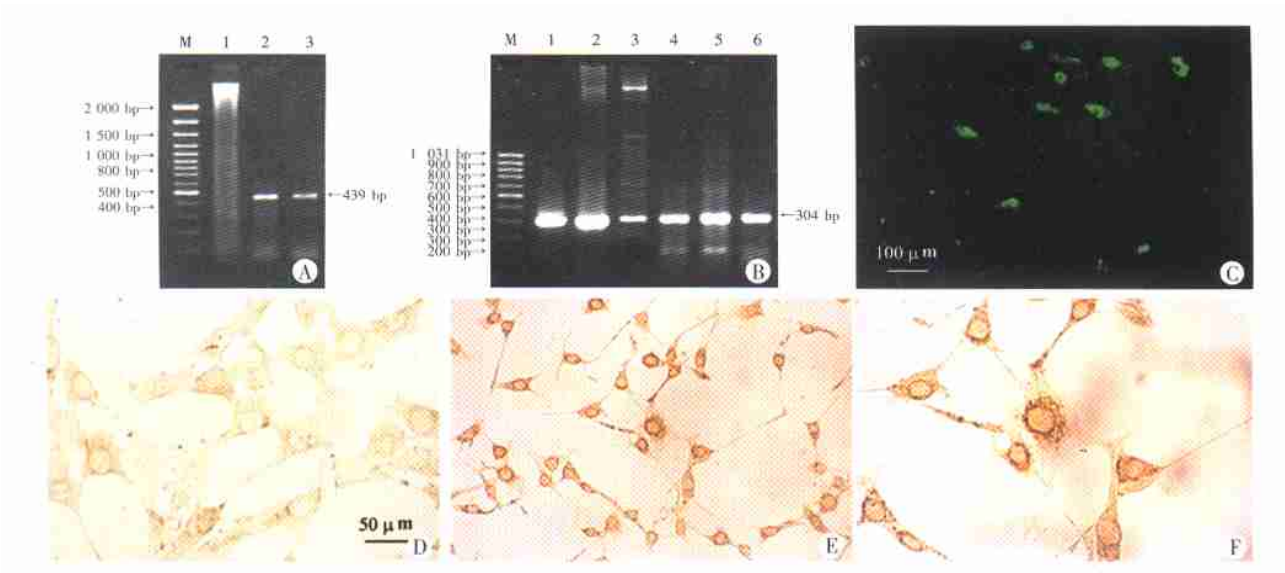
质粒共转染 293 细胞后吸净培养基, 用 10 ml F11＋5%HS＋0.5%琼脂糖培养基覆盖。培养 5 d cpe 出现, 7 d 后病毒斑完全形成。吸出 cpe 独立斑加入 PBS 中, 制成病毒悬液。感染 293 细胞 3 d 后 cpe 形成, 病毒构建成功。

2.3　腺病毒的鉴定

AdCMV-huCT1、AdCMV-eGFP 分别转染 293 细胞和 3T3 细胞。293 细胞 cpe 形成后, 提取病毒 DNA, 以 CT-1 和 eGFP 片段为引物进行 PCR。3T3 细胞转染 48 h 后, 提取细胞的总 RNA 进行 RT-PCR。分别可见有 438 bp 和 304 bp 的特异片段, 见图 2A、B。

AdCMV-huCT1 转染 NIH 3T3 细胞 48 h 后, 按 SABC 试剂盒说明进行细胞免疫组织化学, 结果显示几乎所有细胞 huCT-1 染色阳性, 阳性染色主要位于细胞浆中, 见图 2D、E、F。

AdCMV-eGFP 转染 NIH 3T3 细胞 48 h 后, 在荧光显微镜蓝色激发荧光下可见细胞内有绿色激发荧光, 见图 2C。



A: Adv-huCT1 PCR and RT-PCR. M: marker; 1: Adv-huCT1 DNA. 2: PCR analysis of DNA from Adv-huCT1 transfected 293 cell cpe; 3: RT-PCR analysis of RNA from Adv-huCT1 transfected 3T3 cell. B: Adv-eGFP PCR and RT-PCR. M: marker; 1: pIRES2-eGFP PCR; 2: pMD182-eGFP PCR; 3: pDC316-eGFP PCR; 4: eGFP DNA PCR5: PCR analysis of DNA from Adv-eGFP transfected 293 cell cpe; 6: RT-PCR analysis of RNA from Adv-eGFP transfected 3T3 cell. C: eGFP assay with fluorescent microscope after Adv-eGFP transfected 3T3 cell. D, E, F: huCT-1 immunocytochemistry assay after Adv-huCT1 transfected 3T3 cell. D. control.

图 2　重组腺病毒的鉴定

Fig 2　RAD identification

2.4　病毒纯化

收集 20× 75 cm^2 重组病毒感染的 293 细胞, 细胞裂解除去细胞片。第 1 次 CsCl 梯度离心由上而下为 4 条代层: 白色浓粘的细胞脂质; 淡粉红色分界不清的培养基层; 白色边界略为模糊的细胞蛋白层; 乳白色分界清晰的病毒带层, 约为 250 μl。第 2 次 CsCl 梯度离心后可见清晰的两层: 白色边界略为模糊的细胞蛋白层; 乳白色分界清晰半透明的病毒带层, 约为 120 μl。透析后得到最终纯化病毒 110 μl。

2.5　病毒滴度

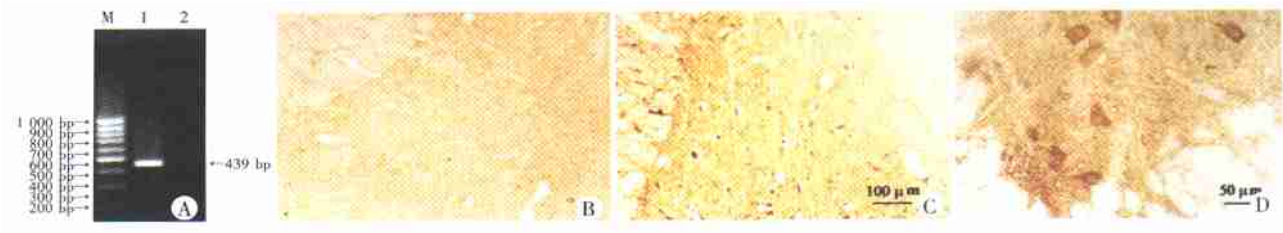
空斑实验的第 3 天, 在暗背景下, 细胞层内的小空斑呈现为针尖状小白点。随着空斑实验孵育时间的延长, 细胞层中的小白点逐渐变为白色的斑点, 1 周时各稀释度的培养皿内形成恒定大小的白色环。纯化病毒液用 293 培养液稀释成 10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}和 10^{-10}四个稀释度, 空斑数目稳定不变为止。计算滴度, AdCMV-huCT1 为 3.0×10^{10}, AdCMV-eGFP 为 4.0×10^{11}。

2.6　AdCMV-huCT1 在脊髓中的表达

腺病毒注入脊髓 1 周、1、2、3 个月后, 快速切取感染区脊髓, 提取总 RNA, RT-PCR 可只有 439 bp 的特异性片段, 而病毒稀释液无特异片段, 见图 3A, 显示 AdCMV-huCT1 感染骨髓后有外源性 CT1 mRNA 表达。

AdCMV-huCT1 感染脊髓 1 周, 1、2、3 个月后, 按 SABC 试剂盒说明进行免疫 huCT1 感染阳性的神经元, 见图 3C、D, 而病毒稀释液无阳性染色细胞, 见图 3B。

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



A: RT-PCR analysis of AdCMV-huCT1 expression; M: Marker; 1: AdCMV-huCT1 group 2: Control;
B: Control group immunoctochemistry; C: AdCMV-huCT1 group immunocytochemistry; D: Control

图3 重组腺病毒在大鼠脊髓中的表达

Fig 3 AdCMV-huCT1 expression in spinal cord in rats

3 讨论

由于腺病毒可感染分裂终末神经元，感染和复制无需整合入宿主细胞的基因组，毒性少，无致瘤作用，因而神经系统疾病的基因治疗多采用腺病毒载体。第一代腺病毒载体将外源基因插入 E1 区或/和 E3 区。E1 缺失载体丧失复制能力，但可在 E1 补偿细胞如 293 细胞中繁殖。腺病毒载体的构建包括外源基因"加入"病毒基因组和病毒包装、增殖两个过程。腺病毒构建因不同的构建体系而方法不同，目前常见两种体系。第一种体系是将外源 DNA 插入一个较小的穿梭质粒中，它包含了腺病毒基因组的左侧末端并 E1 缺失。外源 DNA 通过体外连接或体内共转染 293 细胞同源重组两种方式拯救(Rescue)入腺病毒基因组中。这两种方式对大容量的腺病毒基因组均有妨碍，体外连接的酶切位点极为有限，体内重组的效率极低。另外，病毒基因 DNA 太长，体外操作常有不完全消化、异位断裂或自我连接，引起病毒污染。

另一种体系是双质粒共转染 293 细胞同源重组构建腺病毒，它的穿梭质粒包含腺病毒基因组左侧末端、ITR(Inverted terminal repeat)、包装信号、外源基因的多克隆位点并 E1 缺失，第 2 个质粒包含整个腺病毒基因组并被修饰成非感染性[7]。双质粒共转染 293 细胞后，只能通过重叠腺病毒序列的同源重组才能产生病毒，产生假病毒较少且操作简单。但它们仍然存在重组效率低的缺点，常需要反复传代扩增，多次筛选。为提高重组效率，人们对这个体系又作了两次改进。第 1 次改进在腺病毒基因组质粒中加入了 Cre 基因和 loxP 位点，在穿梭质粒中加入了 loxP 位点。此体系通过 Cre 介导 loxP 导位点特异性重组，使重组效率提高了 30 倍，并可在非 Cre 酶表达的 293 细胞中重组[8]。第 2 次改进在第 1 次的基础上穿梭质粒用头对头(Head to head)的 ITR 连接代替单 ITR 使重组效率提高了 100 倍[9]。

本研究采用的拯救型质粒 pBHGloxdeltaE1，3Cre 来源于 Ad5 腺病毒，经过 pBHG10 至 pBHGloxdelta1，3 发展而来[8,9]。它包含了 Ad5 基因组，缺失 E3 区和包装信号后，用 Cre cassette 代替了 E1 区，并在 pIX 基因 5′端有一个 loxP 位点。穿梭质粒中加入了 loxP 位点，用头对头的 ITR 连接代替单 ITR。生成的 Ad 是 E1 区和 E3 区双缺失，只能在 293 细胞中复制，保证了安全性。E1 区和 E3 区双缺失使腺病毒包装外源基因的容量可达 7～8 kb，有利于重组腺病毒基因组的稳定。采用 Cre/loxP 位点重组体系，不但增加重组效率，并可在非 Cre 表达的 293 细胞中同源重组。由于缺乏包装信号，同源重组时不会产生野生型腺病毒，几乎 100%的重组腺病毒含有外源基因，不需要反复传代扩增，多次筛选。无需对基因组质粒体外操作和线性化，操作简单。

构建的 AdCMV-huCT1 为复制缺陷型重组腺病毒载体，在 huCT1 的开放阅读框适配有 MCMV 启动子和 SV40 多聚腺苷酸尾。它有以下特点：①构建简单；②在含有 E1 序列的细胞中易于大量扩增；③转染效率高；④E1 区被外源基因代替，致病性低；⑤由广谱、强力的 MCMV 启动子调控 huCT1 表达，在神经系统可在神经元和胶质细胞中表达目的基因。经过 PCR、RT-PCR 和免疫组化证实腺病毒载体构建成功。病毒经过 CsCl 梯度离心纯化后，空斑试验病毒滴度达到 3.0×10^{10}，适合进行体内直接基因治疗。

参考文献：

[1] 张正丰. 心肌营养素-1 的研究进展[J]. 国外医学生理、病理与临床分册，2002，22(1)：104－106.

[2] Pennica D, Arce V, Swanson A, *et al*. Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long term survival of spinal motoneurons[J]. Neuron, 1996, 17(1): 63－74.

[3] Arce V, Pollock R A, Philippe J M, *et al*. Synergistic effects of Schawann- and muscle derived factor on motoneuron survival involve GDNF and

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

cardiotrophin-1(CT-1). J Neurosci, 1998, 18(4): 1440—1448.
[4] Mitsumoto H, Klinkosz B, Pioro E P, *et al*. Effects of cardiotrophin-1(CT-1) in a mouse motor neuron disease[J]. Muscle Nerve, 2001, 24(6): 769—777.
[5] Bordet T, Schmalbruch H, Pettmannn B, *et al*. Adenviral cardiotrophin-1 gene transfer protects pmn mice from progressive motor neuronopathy[J]. J Clin Inv, 1999, 104(8): 1077—1085.
[6] Pennica D, Swanson T A, Shaw K J, *et al*. Human cardiotrophin-1: protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization[J]. Cytokine, 1996, 8(12): 183—189.
[7] Bett A J, Haddara W, Prevec L, *et al*. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertion or deletions in early regions 1 and 3[J]. PNAS, 1994, 91(19): 8802—8806.
[8] Ng P, Parks R J, Cummings D T, *et al*. A high efficiency Cre/loxP based system for construction of adenoviral vectors[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(16): 2667—2672.
[9] Ng P, Parks R J, Cummings D T, *et al*. An enhanced system for construction of adenoviral vectors by the two-plasmid recue method[J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(5): 693—699.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2003)17-1535-02

个案与短篇

某医院 1991—2000 年剖宫产率及指征分析

Analysis of cesarean section rate and surgical indications from 1991 to 2000 in our hospital

蒋小亚 （贵阳市妇幼保健院，贵阳 550003）

自 20 世纪 90 年代以来，剖宫产率逐年上升，并仍有继续上升的趋势。故将我院 10 年剖宫产率及指征进行分析，旨在探讨合理掌握剖宫产指征，保障母婴健康。

1 资料与方法

收集 1991 年 1 月至 2000 年 12 月 10 年间，我院住院分娩 25 402例，其中剖宫产 7 618 例，平均剖宫产率 30.42%。1995 年以前剖宫产率为 25%以下，以后剖宫产率逐年增加，到 2000 年剖宫产率达到 47.24%，见表 1。采用回顾性资料分析，得到数据采用 χ^2 检验。

表 1 10 年剖宫产率的变化

年份	分娩总数	例数	剖宫产率(%)
1991	2 506	556	22.19
1992	1 371	278	20.28
1993	1 861	204	10.96
1994	2 865	641	22.37
1995	2 886	715	24.77
1996	2 716	786	28.94
1997	2 581	802	31.07
1998	2 693	983	36.50
1999	2 767	1 162	41.99
2000	3 156	1 491	47.24 *

*：$P<0.01$ *vs* 1991

2 结果

我院 1991 年剖宫产率为 22.19%，1995 年剖宫产率为 24.77%，1991 年至 1995 年 5 年间平均剖宫产率为 20.11%，剖宫产率变化不明显，但到 2000 年剖宫产率达 47.24%，与 1991 年的 22.19%相比差异有极显著性（$P<0.01$）。

剖宫产的指征主要分为：①母亲因素：包括妊娠并发症，内科合并症，高龄初产妇及过期妊娠等。②胎儿因素：包括胎位异常，胎儿窘迫，巨大儿、双胎等。③社会因素：包括不良孕产史，珍贵儿及无任何手术指征。④头盆因素：包括头盆不称，产程异常等。⑤其他因素：包括产前出血（前置胎盘，胎盘早剥），子宫破裂等。见表 2。在这些指征中，胎儿因素为第 1 位，其中又以胎儿窘迫占首位。母亲因素在 1991 年位于第 3 位，2000 年上升到第 2 位。以社会因素为手术指征的剖宫产，1991 年为 5.60%，2000 年达 13.48%，差异有显著性（$P<0.05$）。

表 2 手术指征变化

手术指征	1991 年		2000 年		P
	例	%	例	%	
母亲因素	121	21.48	316	21.19	>0.05
胎儿因素	227	40.97	594	39.84	>0.05
社会因素	31	5.6	201	13.48	<0.05
头盆因素	141	25.45	315	21.13	<0.05
其 它	36	6.14	65	4.36	<0.05
总 计	556	100	1491	100	

围产儿的死亡率并不因剖宫产率的上升有明显下降，1991 年剖宫产率为 22.1%，围产儿死亡 39 例，占 15.56‰(39/2 506)，2000 年剖宫产率上升至 47.24%，围产儿死亡 42 例，占 13.3‰(42/3 156)，两者差异无显著性（$P>0.05$）。

3 讨论

剖宫产率的上升，未使围产儿的死亡率明显下降，1991 年剖宫产率为 22.1%，围产儿死亡 39 例，占 15.56‰(39/2506)，2000 年剖宫产率上升至 47.24%，围产儿死亡 42 例，占 13.3‰(42/3156)，两者差异无显著性（$P>0.05$）。说明剖宫产并不是绝对安全的分娩方式，而产妇在术后有可能发生近期或远期并

（下转 1539 页）

作者简介：蒋小亚(1957—)，女，江西省上饶县人，副主任医师，主要从事妇产科临床方面的研究。电话：(0851)5969675

收稿日期：2003-03-08；修回日期：2003-06-13

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