DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.024
第25卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 5
430 2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)05-0430-04

结直肠癌腹腔转移与CK20 mRNA、CD44v6和P53表达及意义

孙念绪,王德虎,张 超 (第三军医大学附属西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 研究结直肠癌腹腔转移与CK20 mRNA、CD44v6和P53的表达及意义。方法 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术,对50例结直肠癌进行腹腔渗液CK20 mRNA测定,并且对癌组织行免疫组化检测CD44v6和P53。结果 CK20 mRNA阳性表达与癌组织中P53和CD44v6之间存在显著性差异。结论 检测腹腔渗液中的CK20 mRNA并结合癌组织中P53和CD44v6的检测,对于预测结直肠癌腹腔转移和指导术后治疗具有重要参考价值。

关键词:结直肠癌;CK20 mRNA;CD44v6;P53
中图法分类号:R394.3;R73-37;R735.3 文献标识码:A

The association of the expressions of CK20 mRNA, CD44v6 and P53 with abdominal cavity metastasis of colorectal cancer and the related significance

SUN Nian-xu, WANG De-hu, ZHANG Chao (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the association of abdominal cavity metastasis of colorectal cancer with the expressions of CK20 mRNA, CD44v6 and P53 and the related significance. Methods CK20 mRNA in peritoneal fluid was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and proteins of CD44v6 and P53 in cancer tissues were examined immunohistochemically in 50 cases of colorectal cancer. Results Significant correlation was found between CK20 mRNA and the expressions of CD44v6 and P53 in cancer tissues. Conclusion The detection of CK20 mRNA in peritoneal fluid plus examination of CD44v6 and P53 in cancer tissues are helpful for the prediction of abdominal cavity metastasis of colorectal cancer and post-operation treatment.

Key words: colorectal cancer; CK20mRNA; CD44v6; P53

转移和侵袭是恶性肿瘤的重要特征,也是肿瘤患者死亡的主要原因,临床上80%以上的患者死于晚期侵袭和转移[1]。本研究运用RT-PCR方法检测腹腔渗液中的CK20 mRNA,作为腹腔微转移的诊断,并运用免疫组化(Immunohistochemiotry, IHC)方法,对结直肠癌组织的CD44v6、P53表达进行检测,探讨这些因子在结直肠癌组织中的表达与结直肠癌腹腔微转移、生物学行为之间的关系,以早期预测结直肠癌患者的复发和转移。检测结直肠癌腹腔渗液中的CK20 mRNA及检查癌组织中P53和CD44v6对于预测腹腔微转移状况,指导临床治疗具有重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

收集我院1998年9月至1999年10月住院的结直肠癌手术患者50例,其中男性28例,女性22例,年龄20~77岁,平均54.0岁。高分化腺癌13例,中分化腺癌24例,低分化和粘液腺癌13例。按Dukes分期法:DukesA期9例,B期19例,C期14例,D期8例。对照组10例,皆为同期住院患者,其中溃疡性结肠炎4例,结肠息肉6例,男性3例,女性7例,年龄24~65岁,平均30.2岁。腹腔液收集方法:开腹后取病人头高脚低位,目的使腹腔液引流到盆腔便于收集,然后用空针抽取腹腔液5 ml,将其置于低温冰箱内保存待测。

1.2 检测项目及方法

1.2.1 结直肠癌及良性对照组CD44v6、P53表达的检测 免疫组化SP试剂盒购于美国DAKO公司,CD44v6单克隆抗体购于福州迈新公司,P53单克隆抗体购于美国DAKO公司。

标本10%甲醛固定,石蜡包埋组织5 μm厚度连续切片,分别行CD44v6、P53免疫组化染色,常规脱蜡、水化,1% H_2O_2 甲醇封闭内源性过氧化物酶30 min,分别加入一抗,4 ℃过夜,二抗,室温孵育10 min,三抗,室温孵育10 min,上述各步骤间均用PBS液振洗3次,每次3 min,DAB显色,苏木素复染,常规脱水、透明、封片,加入一抗前采用微波炉抗原修复。取已知阳性的肝癌、乳腺癌组织作阳性对照,PBS代替一抗作阴性对照。

免疫组化部分由两人分别在显微镜下观察标本,然后复核

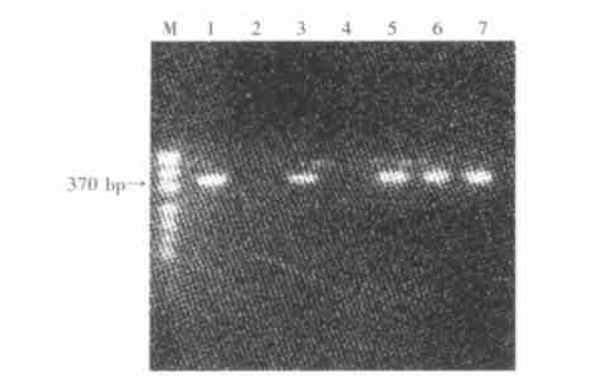
作者简介:孙念绪(1954-),男,河北省肃宁县人,硕士,副教授,主要从事胃肠道肿瘤方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68754247

收稿日期:2002-03-27;修回日期:2002-09-05

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

观察结果。SP 免疫组化染色阳性为棕黄色。CD44v6 定位于细胞膜; P53 定位于细胞核。参照 Garcia[3] 的判断方法确定阳性反应细胞半定量分级: 0 级无染色; 1 级局部浅棕黄色; 2 级深棕色着色< 25%或浅棕黄色着色< 80%; 3 级深棕黄色着色 25% ~ 50%或浅棕黄色着色> 80%; 4 级深棕黄色着色> 50%≥2 级为阳性,< 2 级为阴性。

1.2.2　腹腔渗液标本 CK20 mRNA 的检测[2]　RT-PCR 试剂盒购于美国 Promega Corp; RNA 提取试剂 Tripure 德国宝灵曼; CK20 mRNA 引物上海生物工程公司合成, 上引物碱基序列为: 5′-CAG GAC CAC GGT GGA CTA TGG-3′, 分子质量(MW): 6 459.2, 加入去核酶水 204 ml, 稀释为 25 pmol/μl; 下引物碱基序列为: 5′-GAT CAG CTT CCA CTG TTA GAC G-3′/分子质量(MW): 6 706.4, 加入去核酶水 179 ml, 稀释为 25 pmol/μl。



M: Maker; Lane 1-7: CK20 mRNA expressions of 7 patients. Among them, lane 2, 4 are negative and the other lanes are positive

图 1　结直肠癌患者腹腔渗液 **CK20 mRNA** 的表达

Fig 1　Expression of CK20 mRNA in ascites from patients with colorectal cancer

腹腔液离心(2 000 r/min) 10 min, 去上清, 沉淀中如有较多的红细胞则用蒸馏水洗涤 2 次, 以促使红细胞溶解、破裂, 然后离心, 弃上清液, 沉淀细胞提取总 mRNA, 设阴性对照, RT-PCR 一步法扩增, 去核酶水代替 CK20 mRNA 上、下游引物作阴性对照, PCR 循环参数 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 共 35 个周期。扩增产物与 marker 行 2%琼脂糖凝胶电泳、溴乙啶染色, 紫外光下照相记录。

RT-PCR 部分电泳条带分析位于 370 碱基处有清晰、明亮条带者为阳性, 无此条带者为阴性。

1.3　统计学处理

用 Excel 软件, 率的比较采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　结直肠癌组织中 CD44v6 表达与 Dukes 的关系

结直肠癌组织 CD44v6 阳性表达率为 64.0%(32/50), 对照组阳性率为 10.0%(1/10)。两组比较有显著性差异($P<0.01$), Dukes A、B、C 和 D 期的阳性率分别为 44.4%(4/9)、31.6%(6/19)、100.0%(14/14)和 100.0%(8/8), 与对照组比均有显著性差异($P<0.01$), 其中 C 和 D 期均显著高于 A 和 B 期($P<0.01$)。

2.2　结超肠癌组织中 P53 表达与 Dukces 的关系

结直肠癌组织中 P53 阳性表达率为 62.0%(31/50), 良性病变组阳性率为 0.0(0/10), 两者有显著性差异($P<0.01$), Dukes A、B、C 和 D 期的阳性率分别为: 44.4%(4/9)、42.1%(8/19)、85.7%(12/14)和 87.5%(7/8), 同对照组比较均有显著差异($P<0.05$), 其中 C 与 D 期的阳性率均显著高于 A 和 B 期($P<0.05$)。

2.3　直肠癌组织中 CD44v6 表达与分化程度的关系

CD44v6 在高分化、中分化、低分化和粘液腺癌组的阳性表达率分别是 61.5%(8/13), 58.3%(14/24), 76.9%(10/13), 良性病变组阳性率为 10.0%(1/10), 各病变类型组与良性病变组比均有显著差异($P<0.01$), 相互之间无显著性差异($P>0.05$)。

2.4　结直肠癌组织中 P53 表达与肿瘤分化程度的关系

P53 在高分化、中分化、低分化和粘液腺癌组的阳性表达率分别为 46.2%(6/13)、54.2%(13/24)、92.3%(12/13), 良性病变组阳性率为 0.0(0/10)。各病理类型组与良性病变组比均有显著性差异(P 均<0.01), 低分化和粘液腺癌组显著高于高分化及中分化腺癌组($P<0.05$)。高分化及中分化腺癌组无显著差异($P>0.05$)。

2.5　结直肠癌腹腔液 CK20 mRNA 检测结果

50 例结直肠癌患者, 腹腔液 CK20 mRNA 表达阳性率 52.0%(26/50), 对照组 10 例, 均为阴性。其中 Dukes A、B、C 和 D 期的表达阳性分别为 11.1%(1/9)、31.6%(6/19)、78.6%(11/14)、100.0%(8/8)。A 和 B, C 和 D 之间比较无显著差异($P>0.05$), A 和 B 期与 C 和 D 期之间比差异显著($P<0.01$)。高分化、中分化、低分化和粘液腺癌组的阳性率分别为 15.4%(2/13)、50.0%(12/24)、92.3%(12/13), 各病理类型组间比差异显著($P<0.01$)。

2.6　结直肠癌组织 CD44v6、P53 表达与腹腔微转移的关系

CD44v6 在结直肠癌腹腔 CK20 mRNA 阳性组和阴性组的阳性表达率分别为 64.5%(22/34)和 25.0%(4/16), 腹腔液阳性组显著高于阴性组($P<0.01$)。

P53 在结直肠癌腹腔 CK20 mRNA 阳性组和阴性组的阳性率分别为 61.8%(21/34)、31.3%(5/16), 腹腔液阳性组的阳性率显著高于其阴性组($P<0.05$)。

3　讨论

3.1　结直肠癌患者腹腔微转移的检测及其临床意义

许多研究表明, 结直肠癌的微转移与患者术后复发和预后密切相关。骆成玉等[4] 通过对 54 例大肠癌患者的研究发现, 术中门静脉血的微转移率高达 75.9%, Hillaire 等[5] 对 21 例肝癌患者研究发现, 术前外周血 9 例有微转移的患者术后有 4 例发现有远处转移, 而术前外周血 12 例无微转移的患者术后无一例出现远处转移, 且两者有统计学意义($P<0.05$)。这就提示我们, 恶性肿瘤的患者, 术后复发是治疗失败的主要原因。微转移是转移灶的萌芽阶段, 患者此时癌细

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

胞尚未定植某一组织器官，但由于机体自身的防御性屏障作用，癌细胞处于休眠状态，随着病情的发展，当癌细胞冲破机体自身防御屏障时开始生长。由于初时转移灶的体积小，生长部分的瘤细胞所占比例就大，对抗癌药物的敏感性则高，此时施以辅助治疗，可以将微转移扼杀在转移形成的摇篮中，这对减少术后复发、转移，争取良好的预后有重要的作用。我们所采用的肿瘤标志物 CK20 具有严格的上皮特异性分布，正常组织不表达 CK20。RT-PCR 方法具有较高的敏感性，可检测出浓度为 $10^6 \sim 10^7$ 的肿瘤细胞[6]，尤其适用于微量肿瘤细胞的检测。本研究检测了 50 例结直肠癌患者的腹腔渗液，阳性率为 52.0%(26/50)，Dukes A、B、C 及 D 期的阳性率分别为 11.1%(1/9)、31.6%(6/19)、78.6%(11/14)和 100.0%(8/8)。这表明，随着癌肿的进展，腹腔微转移明显增加，统计学处理显示 C 和 D 期患者显著高于 A 和 B 期的患者($P<0.01$)，腹腔微转移同病理类型之间也存在显著差异($P<0.01$)。不难看出，随着肿瘤的进展，腹腔转移的概率大大增加，临床据此应采取必要的治疗措施。

3.2 CD44v6 基因在结直肠癌中的表达及其临床意义

CD44v6 分子是一多种细胞均可表达的跨膜糖蛋白，参与细胞与间质的相互作用，介导细胞与细胞的粘附[6]。多数研究表明，CD44 基因的表达与肿瘤转移具有显著的相关性，尤其是 CD44v 在某些转移性肿瘤的选择性表达及其与细胞骨架的相互作用在肿瘤发展和转移过程中起着重要的作用。CD44 基因被认为是肿瘤转移的促进因素，其中 CD44v 起着重要的作用[7]。Herrtich 等[8]研究发现 CD44v6 外显子在肿瘤浸润中有增强的高频率表达，推测 CD44v6 的表达有可能促使肿瘤细胞浸润和转移。Rodriguez 等[9]研究 58 例结肠肿瘤发现，CD44v6 的表达率是 80.0%，大多数正常组织仅表达 CD44v6，参与转移有关的变异体都普遍存在于结肠癌中，v6 变异体的表达与结肠肿瘤远处转移有关。我们在对 50 例大肠癌的研究中也得到类似的结论，CD44v6 阳性表达率为 64.0%(32/50)，对照组组阳性率为 10.0%(1/10)，两者有显著性差异($P<0.01$)，A、B、C 和 D 期均显著高于对照组($P<0.05$)，其中 C 和D 期的阳性表达率均显著高于 A 和 B 期($P<0.01$)，A 和 B 期间及 C 和 D 期间无显著性差异($P>0.05$)。CD44v6 在高分化、中分化、低分化和粘液腺癌组的阳性表达率差异均不显著($P>0.05$)。CD44v6 在腹腔液阳性组和阴性组的阳性表达率分别为 64.5%%(22/34)和 25%(4/16)，前者显著高于后者($P<0.01$)。提示CD44v6 高表达易发生腹腔转移。

3.3 P53 在结直肠癌表达的检测及其临床意义

p53 基因是肿瘤抑制基因，其表达产物为 P53 蛋白，分子质量为 53×10^3，阳性反应位于细胞核，具有阻止细胞的不正常增殖和诱导细胞程序性死亡的作用，P53 与 DNA 特殊序列连结成核磷酸蛋白，具有维持基因组 DNA 稳定的功能[10]。突变型 P53 蛋白半衰期长而异常积聚，常规免疫组化可检出，突变的 P53 蛋白丧失抑制细胞增殖的能力，从而引起细胞恶性转化和浸润[11]。

本研究结果显示，P53 在结直肠癌中的阳性表达率为 62.0%(31/50)，显著高于对照组 0.0(0/10)($P<0.01$)，且 C 和 D 期的阳性率显著高于 A 和 B 期(P 均<0.05)，低分化和粘液腺癌组显著高于高分化和中分化腺癌组，这说明 P53 的高表达同分化程度有关。P53 在腹腔阳性组和阴性组的阳性表达率分别为 61.8%(21/34)和 31.3%(5/16)，两者相比差异显著，这说明 P53 的高表达同腹腔转移相关。这亦间接说明 p53 基因突变在肿瘤发生、发展及腹腔转移中起到了重要作用。

3.4 CD44v6、P53 在结直肠癌中的协同表达

恶性肿瘤的发生是一个长期的、多因素、分阶段的过程，单个基因的改变不能造成细胞完全恶性转化，而是需要多基因的改变，包括几个癌基因的激活和两个或更多肿瘤抑制基因的丧失，在结直肠癌中由正常上皮向结直肠腺癌的转变过程中，ras 基因突变在早期腺瘤向中期腺瘤的转变过程中起着重要的作用，而 p53 基因突变在晚期腺瘤向结肠腺癌的转变过程中起着重要的作用[12]。研究表明，绝大多数结直肠肿瘤存在 CD44v6 的表达，且与患者预后相关。我们在对结直肠癌组织 CD44v6、P53 的研究中发现：52.0%(26/50)患者 CD44v6、P53 同时出现表达阳性。表明恶性肿瘤的发生是多基因性的，在致癌因素的作用下，某些癌基因激活和抑癌基因突变、失活，致使细胞增殖、分化失控而导致癌变。采用检测腹腔液中 CK20 mRNA 和肿瘤组织中 P53、CD44v6，对于预测患者预后和指导临床治疗都具有重要参考价值。

参考文献：

[1] 高 进. 癌的侵袭与转移[M]. 北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1996.69.

[2] 郭君其. 大肠癌微转移的研究现状及进展[J]. 国外医学肿瘤学分册，1997，24(5)：281－282.

[3] Garcia R L，Coltrera M D，Grwn A M. Analysis of proliferative grade using anti PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed，emdedded tissues：comparison with flow cytometric analysis[J]. Am J Pathol，1989，134(4)，733－739.

[4] 骆成玉，李世拥. 大肠癌患者门静脉血癌细胞的检测及临床意义[J]. 中华外科杂志，1999，37(4)：214－215.

[5] Hillaire S，Barbu V，Boucher E，*et al*. Albumin messenger RNA as a marker of circulating hepatocytes in hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology，1994，106(1)：239－242.

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

[6] Moll R, Lowe A, Laufer J, *et al*. Cytokeratin 20 in human carcinomas [J]. Am J Pathol, 1992, 140(2): 427—447.
[7] Datta Y H, Adams P T, Drobyki W R, *et al*. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. J Clin Oncol, 1994, 12(3): 475—482.
[8] Herrtich P, Pals S, Ponta H. CD44 in colon cancer[J]. Eur J Cancer, 1995, 31A(7—8): 1110—1112.
[9] Rodriguez C, Monges C, Rouanet P, *et al*. CD44 expression patterns in breast and colon tumors: a PCR based study of splice variants[J]. Int J Cancer, 1995, 64(5): 347—354.
[10] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B. p53 mutations in human cancers [J]. Science, 1991, 253(5015): 49—53.
[11] Merri A J, Potten S S, Kemp C J, *et al*. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53 deficient mice[J]. Cancer Res, 1994, 54(3): 614—617.
[12] 武忠弼. 病理学[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 358.

（编辑　冯崇英）

（上接 426 页）

以 0.25% 胰酶将细胞消化下来, 以多头细胞收集器反复冲洗细胞后, 抽滤至 49 型玻璃纤维膜上, 烤干, 将滤膜放入闪烁杯内加闪烁液(二甲苯 ppo、popop), 放置 3 h, 上机检测。

1.3　激光共聚焦显微镜测细胞内游离钙[5]

以 2.5×10^4 个/ml 细胞密度接种于 24 孔板内玻片上, 给予谷氨酸后, 不同时相点制样过程如下: 以无血清培养液冲洗玻片 3 次, 取 100 μl Fluo-3/AM 探针(5 μmol/L, 第四军医大学李云庆教授惠赠)滴于波片中央, 37 ℃避光孵育 1 h, 以无血清培养液冲洗后, 用共聚焦显微镜测定。

1.4　统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 来表示, 采用第三军医大学数学教研室 GW-BASIC 统计程序包内 FISD 程序处理。

2　结果

2.1　谷氨酸毒性损伤致 PC12 细胞钙内流结果

谷氨酸毒性组^{45}Ca 内流的 Bq 值具有时间效应关系, 见表 1。

表 1　谷氨酸毒性损伤致 **PC12** 细胞钙内流变化（$n=4$, $\bar{x}\pm s$）

	^{45}Ca Bq		
	1 h	4 h	24 h
对照组	370.25±40.45	474.5±36.93	593.5±56.26
谷氨酸组	1446.75±103.78*	1808.5±148.14*#	2804.25±344.74*#○

*: $P<0.05$ 与对照组比较; #: $P<0.05$ 与 1 h 比较; ○: $P<0.05$ 与 4 h 比较

2.2　共聚焦显微镜测游离钙结果观察

正常 PC12 细胞普遍为低荧光强度细胞, 谷氨酸组 1 h 时相 PC12 细胞 60% 为低荧光强度 40% 为中荧光强度, 随着时间延长, 中高荧光强度细胞所占比例增大, 细胞荧光强度值, 见表 2。

表 2　谷氨酸毒性损伤致 **PC12** 细胞游离钙流变化（$n=4$, $\bar{x}\pm s$）

	荧光强度		
	1 h	4 h	24 h
对照组	69.05±17.82		
谷氨酸组	128.72±42.95*	174.58±41.14*#	200.62±32.49*#

*: $P<0.05$ 与对照组比较; ○: $P<0.05$ 与 1 h 比较; ×: $P<0.05$ 与 4 h 比较

3　讨论

钙超载是导致神经细胞死亡的"最后共同通路"[6,7], 而具有生物活性的是细胞内的游离钙, 细胞内游离钙的增加通常是细胞外钙的内流或细胞内钙库释放所致, 钙通道及钙释放通道在细胞内游离钙的变化中担任调节平衡作用[8]。神经系统损伤后, 多有谷氨酸释放, 它具有兴奋性神经毒性, 可作用于 NMDA 受体, 引起受体门控钙通道的开放, 游离钙增加进一步加重损伤, 因此谷氨酸在神经细胞继发性损害中起重要作用。

本实验液闪计数结果显示: 谷氨酸毒性致 PC12 细胞损伤后^{45}Ca 的内流有以下特点: 随着时间延长, ^{45}Ca 内流增加, 具有时间效应关系。钙内流是由于谷氨酸作用于 NMDA 受体, 引起受体门控钙通道开放所致。激光聚焦显微镜结果提示: 谷氨酸毒性致 PC12 细胞损伤后游离钙增加也具有时间效应关系。但两者的时间效应关系曲线不同, 在 4 h 和 24 h 时相 PC12 细胞游离钙的升高幅度大于^{45}Ca 内流增加的幅度, 由此可以推测此时细胞内钙库钙释放参与了细胞内游离钙的升高。我们据此可作以下推测: 谷氨酸作用于 PC12 细胞后早期钙内流导致细胞内游离钙增加, 随即细胞能量代谢发生障碍, 引起了线粒体、内质网等膜性结构的损害, 进而引起钙释放通道开放, 促使以结合钙形式存在的细胞内钙库释放出游离钙, 游离钙的进一步升高加重了细胞损伤。

关键词: 谷氨酸; PC12 细胞; 钙
中图法分类号: R741.02　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 王　尧, 杜子威. 神经生物化学与分子生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 78—120.
[2] Rameau G A, Akaneya Y, Chiu L. Role of NMDA receptor functional domains in excitcitory cell death[J]. Neuropharmacology, 2000, 39(12): 2255—2266.
[3] Shafter T J, Atchison W D. Transmitter, ion channel and receptor proptrities of PC12 cells: a model for neurotoxi cological studies[J]. Neurotoxicology, 1991, 11(1-3): 473—489.
[4] Geanne M A, Diane B, Glauce S B. Effects of Gangliosides, Ouabain and Arachidonic acid on glutmated cytotoxicity in PC12 cells[J]. Biol pharm Bull, 1997, 20(2): 149-152.
[5] 龙开平, 王春梅. 用激光共聚焦显微镜测量大鼠 DRG 细胞内游离钙变化[J]. 第四军医大学学报, 1997, 18(专): 82—84.
[6] Choi D W J. Excitotoxic cell death[J]. J Neurobiol, 1992, 23(4—6): 126.
[7] Paschen W. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved[J]? Brain Res Bull, 2001, 53(4): 409—413.
[8] 张均田, 郑永芳. 细胞内钙和钙通道[A]. 见: 韩济生. 神经生物学经要[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993. 163—167.
[9] The European study group on nimodipine in severe head injury. A multicenter trial of the efficacy of nimodipine on outcome after severe head injury[J]. J Neurosurg, 1994, 80: 795—805.

（编辑　郭建秀）

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