DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.008
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
516 2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)05-0516-05

逆转录病毒载体介导HPV16E7对人关节软骨细胞的转化及其生长特性

何清义,李起鸿 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 研究HPV16E7(human papillomavirus 16 E7)基因片段对人关节软骨细胞的转化作用以及转化细胞的生长特性。方法 利用含HPV16E7基因的逆转录病毒载体pLXSN转染人关节软骨细胞,检测HPV16E7基因的整合与表达,并用生长曲线、血清依赖试验,电镜及流式细胞仪细胞周期时相观察,了解转化细胞与正常软骨细胞的生长特性。结果 挑选出了能够在体外长期培养的经HPV16E7转化的细胞克隆,已传代50代,PCR及RT-PCR证实HPV16E7已与宿主细胞基因组成功整合及转录,转化细胞的生长速度要高于正常软骨细胞,二者都对血清有较大程度的依赖,转化细胞的核质比大,核仁明显,S期细胞数显著高于正常软骨细胞。结论 经HPV16E7基因转化的人关节软骨细胞增殖能力强,可连续传代达50代。

关键词:基因转化;软骨细胞;HPV16E7基因;逆转录载体
中图法分类号:R329.2;R373.9;R394 文献标识码:A

Transformation of human articular chondrocytes with retroviral vector mediated human papillomavirus tye16 E7 gene and growth features of transformed cells

HE Qing-yi, LI Qi-hong (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of human papilomavirus type 16 E7 (HPV16E7) gene in the transformation of human articular chondrocytes (HACs) and to explore the growth characteristics of transformed chondrocytes in comparison with normal ones. Methods HACs were transfected with retroviral vector pLXSN containing HPV16E7 gene. The integration of HPV16E7 with host genome and its transcription were checked. The growth characteristics of transformed and normal chondrocytes were observed with growth curve and serum dependent test as well as electron microscopy and cell cycle. Results HPV16E7-transformed HACs clones which able to be cultured *in vitro* for long term were isolated and expanded. Until now, 50 passages of transformed cells have been achieved. The integration of HPV16E7 gene with host genome and its transcription were confirmed with PCR and RT-PCR. The growth rate and nuclear-cytoplasmic ratio was higher in transformed chondrocytes than normal ones. More cells in S phase were seen in transformed chondrocyte culture than in that of normal. Both of these cell types depended on blood serum to reach confluence. Conclusion HACs with HPV16E7 gene integration possess high ability in proliferation and can survive for a long period *in vitro* with subculture of 50 passages.

Key words: transformation; chondrocytes; HPV16E7 gene; retroviral vector

种子细胞是组织工程的关键问题之一[1,2]。体外培养的软骨细胞为有限增殖,一般传代到第5代左右,细胞就会出现老化甚至凋亡[3]。因此,如何防止细胞老化以及能够从分离的少量软骨组织经体外培养获得大量的种子细胞是软骨组织工程亟须解决的重要问题。目前,国内、外对包括肝细胞、肌腱细胞、角朊细胞和兔的软骨细胞等建立了标准细胞系(或称作永生化细胞 immortalized cell)[4~7],但尚未见有人关节软骨细胞标准细胞系的报道,为此,我们拟对这一问题作初步探讨。利用含人类乳头瘤病毒16型E7基因片段(Human papillomavirus 16 E7, HPV16E7)的逆转录病毒载体pLXSN通过电穿孔技术转入PA317包装细胞中,经G418筛选,获取稳定产毒的包装细胞,利用其分泌的病毒上清去转染人关节软骨细胞,获得了能够长期培养的转化的人关节软骨细胞克隆。

1 材料与方法

1.1 逆转录病毒的包装

用电穿孔(Electroporation)转染技术(电容975 μF,电压220 V)把含HPV16E7(长300 bp)的逆转录病毒载体pLXSN(含抗新霉素筛选标记neor)转入包装细胞系PA317中,G_{418}(400 μg/ml)筛选后,挑取阳性克隆,扩大增殖培养,收集分泌的病毒上清,以NIH-3T3为靶细胞,测定其病毒滴度。

1.2 人关节软骨细胞的培养

取6个月大流产胎儿的四肢大关节的表层透明关节软骨,用锋利的手术刀切成1 mm×1 mm×1 mm的小碎片,Hanks平衡缓冲液冲洗,随后分别用透明质酸酶(质量体积分数0.01%),胰酶(质量体积分数0.2%)和胶原酶(质量体积分数0.2%)顺序消化,得到原代细胞,悬浮于含体积分数为10%的胎牛血清(FCS),青霉素100 U/ml,链霉素100 μg/ml的DMEM/F—12(1∶1)完全培养液(Hyclone),培养1周后,按(2~3)×10^4 cells/cm^2的密度接种入培养瓶,2~3 d左右换液,取第3代关节软骨细胞相差倒置镜下照相。

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830100)
作者简介:何清义(1973—),男,重庆市巴县人,博士研究生,主治医师,主要从事组织工程方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754000-730076
通信作者:李起鸿,电话:(023)68754483
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

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

1.3　人关节软骨细胞的基因转染及筛选

取第 3 代软骨细胞接种入 12 孔板以及 3.5 cm 培养皿, 培养至 50%汇合, 取步骤 1 的病毒上清 0.2 ml, 加入 polybrene(一种多价阳离子, 有利于靶细胞的转染, Sigma 公司)至 8 μg/ml, 37 ℃培养 48~72 h 后, 换成 DMEM/F—12 完全培养液, 继续培养到细胞接近 70%~80%汇合时, 用 G_{418}(500 μg/ml)进行筛选, 设未转染的正常软骨细胞为对照, G_{418}筛选 30 d 左右(最长筛选 37 d), 有抗性克隆出现, 用克隆环挑取该抗性克隆, 扩大增殖培养。

1.4　HPV16E7 的 PCR 及 RT-PCR 分析

分别用酚-氯仿法和 Tripure 液(Roche 公司)提取第 3 代正常软骨细胞及第 20 代、第 30 代转化软骨细胞的 DNA 和 RNA, PCR 及 RT-PCR 反应的 HPV16E7 引物由上海生工合成。

HPV16E7 上游引物: 5′ GGGAATTC ATGCATGGAGATACACCTAC-3′

下游引物: 5′GGCAAGCTTATGGTTTCTGAGAACAGATGG-3′

PCR 及 RT-PCR 均在美国 PE 公司的 PERKIN ELMER 2000 上进行, 其中 RT-PCR 用 Roche 公司的高保真 Titan one Tube RT-PCR 试剂盒来操作, 以出现 300 bp 的特异性条带为阳性。

1.5　细胞生长曲线及血清依赖试验

取第 3 代正常软骨细胞及第 20 代转化软骨细胞, 用 DMEM/F—12(1∶1)完全培养液制成细胞悬液, 细胞计数后接种入两个 96 孔培养板, 每孔 2 500 个细胞, 从接种的第 2 天开始以噻唑蓝(MTT)比色法测定细胞的生长状况, 每天测定 8 孔, 每种细胞各 4 孔, 每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl, 37 ℃孵育 4 h, 终止培养, 吸弃孔内培养上清, 每孔加入 150 μl 二甲亚砜(DMSO)37 ℃放置 15 min, 振荡 5 min, 选择 492 nm 波长在酶联免疫检测仪(PERKIN ELMER, Bio Assay Reader HTS 7000)上测定各孔的光吸收值。设与试验孔平行, 但不加细胞只加培养液的空白对照孔, 其余步骤同上。以时间(t/d)为横轴, 光吸收值(A_{492} nm)为纵轴绘制细胞生长曲线。血清依赖试验: 各试验孔的培养液为含 10%, 5%, 2.5%, 0%四个胎牛血清(FCS)梯度, 每孔种植 2 000 个细胞, 其余检测及曲线绘制同上。

1.6　电镜观察

取第 3 代正常软骨细胞与第 20 代转化软骨细胞消化后, 细胞计数各 5×10^6 个, 离心后弃上清, 4 ℃预冷的 2%戊二醛固定 2 h, 然后用金属探针拨离细胞团块, 移入青霉素小瓶中, 4 ℃预冷的 PBS 漂洗 3 次, 脱水、浸透、包埋、切片及染色, 透射电镜观察。

1.7　流式细胞仪检测细胞周期及 DNA 的合成情况

取 80%汇合的第 3 代正常软骨细胞以及第 20 代转化软骨细胞, 以质量体积分数为 0.25%胰酶消化后制成细胞悬液, 1 000 r/min 离心 10 min 弃上清, 继用 PBS 吹打洗涤细胞 2 次, 每次均1 000 r/min, 10 min, 弃 PBS, 用吸管轻轻吹打细胞团块, 使其分散, 然后轻轻滴加入 70%乙醇中(4 ℃预冷)固定 30 min, 轻轻振摇, 防止出现细胞团块, 碘化丙啶(50 μg/ml)避光染色 30 min, 送入流式细胞仪中 488 nm 氩激光检测, 电脑分析, 并打印结果。

1.8　统计学处理

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各数据经方差齐性检验, 各实验组计量资料与对照组均为正态分布数据, 根据对应时相点采用 t 检验进行统计学分析。

2　结果

2.1　培养细胞的观察

倒置显微镜下见正常人关节细胞呈梭形或多角形, 细胞排列整齐, 细胞核较明显, 见图 1, 随着培养代数的增加, 细胞形态渐变为梭形, 排列较紊乱, 传代培养到 5~6 代时, 细胞出现明显老化现象, 细胞变圆, 飘浮, 不能贴壁, 大部分细胞死亡, 余下的细胞形态不规则, 并且不能增殖。

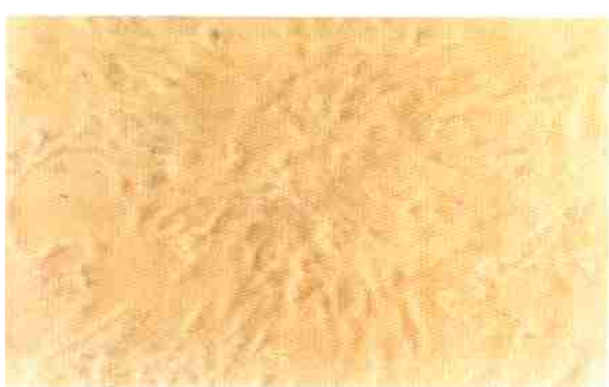


图 1　第 3 代正常关节软骨细胞, 呈三角形或多角形, 细胞排列整齐　(倒置显微镜× 100)

Fig 1　Normal chondrocytes at the 3rd passage with triangle or polygonal shapes in well arrangement　(IM× 100)

2.2　人关节软骨细胞的转化

PA317 分泌病毒上清滴度为 5×10^6 CFU/ml, 取 0.2 ml 该病毒上清转染第 3 代软骨细胞, 500 μg/ml G_{418}筛选, 于 30 d 左右(28~37 d)出现抗性细胞团, 其中心部的细胞变为圆形, 细胞之间有融合现象, 周围的细胞为梭形或多角形, 放射状排列, 见图 2, 而空白对照组的细胞于 1 周左右全部死亡。用克隆环挑取此抗性克隆, 扩大增殖培养, 第 20 代转化的人关节软骨细胞仍为梭形或多角形, 细胞排列较整齐, 与正常软骨细胞相似, 见图 3, 扩大增殖培养的细胞克隆传代至 50 代仍有增殖能力, 并且细胞之间有接触抑制特性, 细胞完全汇合后并未出现多层累积现象。



Round cells are seen in the middle of clone, and radiantly-arranged fusiform or polygonal cells in peripheral zone. Arrow indicates fused cells

图 2　转化关节软骨细胞的抗性克隆　(倒置显微镜× 100)

Fig 2　Resistant clones of transformed chondrocytes after G418 selection　(IM× 100)

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



图 3 梭形的转化关节软骨细胞排列规则,仍有接触抑制性 (倒置显微镜× 100)

Fig 3 Fusiform transformed chondrocytes in regular arrangement and showing growth contact inhibition (IM× 100)

2.3 HPV16E7 基因的 PCR 及 RT-PCR 结果

PCR 显示,第 20 代及第 30 代转化细胞均有 300 bp 的 HPV16E7 阳性扩增片段出现,而正常细胞和未加酶组为阴性,表明转染的 HPV16E7 基因片段已与宿主细胞基因组整合。利用 Roche 公司的高保真 Titan one RT-PCR 试剂盒逆转录出 300 bp 的特异性条带,表明 HPV16E7 不但已与宿主基因组整合并且已经成功转录出 HPV16E7 的 mRNA,见图 4。

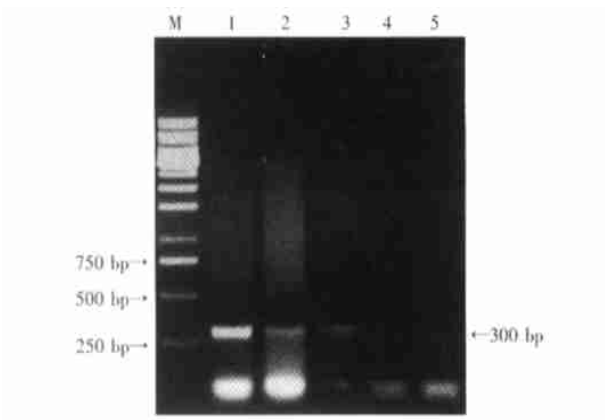


图 4 HPV16E7 转染人关节软骨细胞 RT-PCR 结果

Fig 4 RT-PCR of HPV16E7-transformed HACs

M: GeneRulerTM 1 kb DNA marker; 1—3: mRNA bands of the 20th, and two 30th passage transformed chondrocytes. Positive band is 300 bp (HPV 16E7); 4 5: mRNA bands of normal chondrocytes and negative control without AMV enzyme

2.4 生长曲线和血清依赖分析

正常关节软骨细胞与转化的关节软骨细胞的生长曲线较为相似,都于接种后的第 2~7 天进入增殖活跃的指数生长期,细胞倍增时间都大约为 48 h 左右见图 5,于接种后的第 7 天细胞增殖到达峰值,如继续培养下去,细胞增殖反而下降(第 8 天)。

各对应时相点进行 t 检验,各时相组 P 值都小于 0.05,转化细胞在各个时相点的 MTT 光吸收值都要显著高于正常软骨细胞($P<0.05$),说明在相同的细胞接种密度及时相点,转化细胞的饱和密度(Saturation density)要显著高于正常细胞。

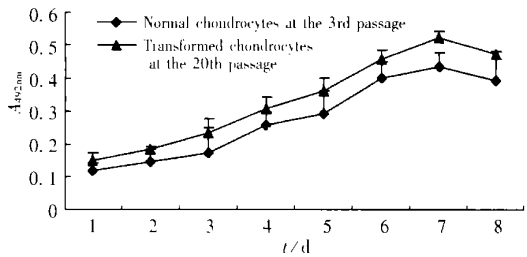


图 5 第 3 代正常软骨细胞与第 20 代转化软骨细胞的生长曲线

Fig 5 Growth curves of normal chondrocytes at the 3rd passage and the transformed chondrocytes at the 20th passage

从第 3 代正常软骨细胞和第 20 代转化软骨细胞的血清依赖生长曲线分析,可看出二者对血清都有较大程度的依赖。从 0%FCS→2.5%FCS→5%FCS→10%FCS 四个血清梯度,细胞的增殖也逐渐增强,见图 6。

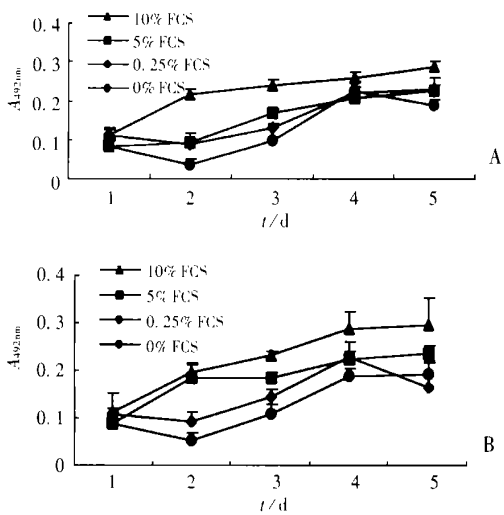


图 6 第 3 代正常软骨细胞与第 20 代转化软骨细胞血清依赖试验

Fig 6 Serum dependent test for normal chondrocytes at the 3rd passage(A) and the transformed ones at the 20th passage(B)

2.5 电镜观察

正常软骨细胞的核质比小,粗面型内质网、线粒体不发达,见图 7;转化软骨细胞的核质比大,核仁明显,主要为常染色质,粗面内质网丰富、线粒体发达,说明转化软骨细胞分裂、增殖活跃,见图 8。

2.6 细胞周期的流式细胞仪检查

流式细胞仪检查发现二者的细胞染色体核型均为二倍体,并且转化软骨细胞的 S 期细胞数(13.08%)显著高于正常软骨细胞(2.09%),说明经 HPV16E7 转化的软骨细胞 DNA 合成较为活跃。

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

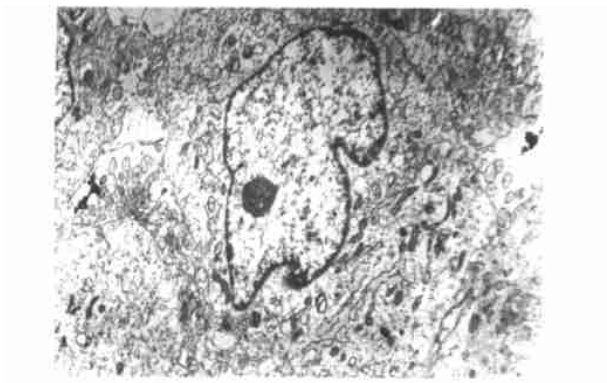


图 7　第 3 代正常软骨细胞的核质比小, 粗面内质网、线粒体不发达, 箭头指示为线粒体　(TEM× 3 000)

Fig 7　Normal chondrocytes at the 3rd passage with lower nuclear—cytoplasmic ratio, and undeveloped rough endoplasmic reticulum and mitochondria (Arrow)　(TEM× 3 000)

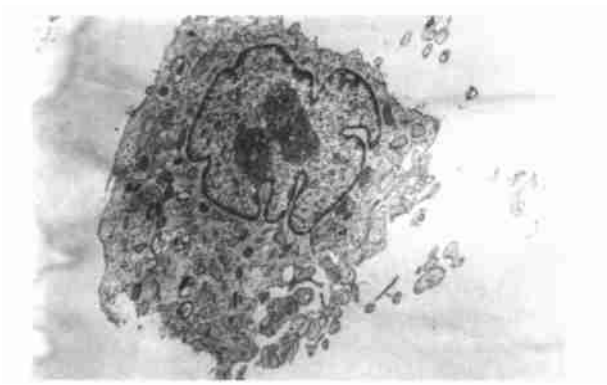


图 8　20 代转化软骨细胞的核质比大, 双核仁明显, 主要为常染色质, 粗面内质网丰富、线粒体发达箭头指示为线粒体　(TEM× 3 000)

Fig 8　HPV16E7-transformed chondrocytes at the 20th passage with higher nuclear-cytoplasmic ratio, clear double nucleoli containing normal chromatin, rich rough endoplasmic reticulum and developed mitochondria (Arrow)　(TEM× 3 000)

3　讨论

种子细胞是组织工程的基本要素, 但某些种子细胞(特别是软骨细胞、神经细胞等)在体外培养过程中增殖能力低, 代谢缓慢, 体外培养对密度高度依赖, 经过一段时间后, 细胞极易老化, 因而难以从少量的组织经体外分离培养获得大量的组织细胞。为解决这一难题, 需要从基因水平上对种子细胞进行改造, 使种子细胞能够长期培养且表型又较稳定, 从而为细胞库及组织工程提供标准细胞。

利用基因转染技术能使体外增殖能力有限的正常细胞在体外长期培养甚至发生"永生化"转化。目前, 采用较多的是把原癌基因转入靶细胞, 使靶细胞获得持续增殖的能力, 这些原癌基因包括猿猴病毒 40 大 T 抗原(Simian virus 40 large T antigen, SV40LTAg), HPV16E7 和/或 E6, 腺病毒 E1A/E1B 等[8~10], 其中利用 HPV16E7 和/或 E6 已使包括肺动脉内皮细胞, 胸主动脉平滑肌细胞, 支气管上皮细胞, 唾液腺细胞及成纤维细胞永生化[11]。本实验利用转染含 HPV16E7 的逆转录病毒载体 pLXSN 体外转化人关节软骨细胞, 分离了可长期培养的、表型基本稳定的转化的人关节软骨细胞。

物质的结构决定其功能。HPV16E7 蛋白的结构决定了它的转化功能, HPV16E7 基因片段长 292bp, 其编码的产物 E7 蛋白含 98 个氨基酸, 其氨基末端第Ⅱ保守区(Conserved domain, CDⅡ)中从第 17 号脯氨酸(pro17)到第 26 号谷氨酸(glu26)的一段为关键区域, 这一区域能够与视网膜母细胞瘤基因的产物(Product of retinoblastoma gene, pRb)结合, 使 pRb-E2F 复合物解体, 活性 E2F 释放出来[12]。E2F 是一种重要的转录因子, 能够结合于与细胞周期有关基因的调节区段(称为细胞周期盒 cell cycle box), 使与 DNA 合成有关的酶基因(如 DNA 合成酶, DNA 连接酶等)获得表达; E2F 也可与一些基因启动子结合, 促使与细胞生长有关的一些基因(如 C-myc, B-myb, cdc2, 胸苷激酶基因等)表达。上述活动启动了 DNA 复制, 细胞周期突破 G_1/S 期关卡(check point), 由 G_1 期进入 S 期, 靶细胞的细胞周期因而不断循环下去并使细胞处于持续增殖的状态[13, 14]。本实验中转化细胞的生长曲线显示细胞增殖活跃, 流式细胞仪分析其细胞周期提示细胞数在 S 期较多(相对于正常软骨细胞), 说明 DNA 合成相对活跃。另有研究表明, E7 蛋白与 p107 和 p130 的结合也在细胞周期的调控中起重要作用[14]。

本实验研究发现 HPV16E7 已与宿主细胞基因组整合, 并成功转录出相应的 mRNA, 到目前为止, 转化软骨细胞传代已达 50 代, 而正常关节软骨细胞于 5~6 代就会老化甚至死亡。因此, 转化软骨细胞能够在体外长期培养与 HPV16E7 基因密切相关。生长曲线提示转化细胞的生长速度要高于正常软骨细胞, 电镜观察显示转化软骨细胞的核质比大, 核仁明显, 主要为常染色质, 粗面型内质网丰富、线粒体发达, 说明转化软骨细胞分裂、增殖活跃。流式细胞仪检查发现转化软骨细胞的 S 期细胞数(13.08%)显著高于正常软骨细胞(2.09%), 说明经 HPV16E7 转化的软骨细胞 DNA 合成较为活跃。

本实验为转化软骨细胞的初步研究, 很多地方尚待完善, 如 HPV16E7 转化的第 20 代人关节细胞, 预试验表明Ⅱ型胶原表达阴性, 并且 HPV16E7 与宿主基因组属随机整合, 没有一个特殊的整合位点, 因此, 对转化软骨细胞表型的维持、诱导, 在裸鼠上的致瘤性以及软骨形成能力的观察等都在进一步的实验中。

参考文献:

[1] Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering [J]. Science, 1993, 260(5110): 920—926.

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

[2] Yang S Y, Ahn S T, Rhie J W, *et al*. Platelet supernatant promotes proliferation of auricular chondrocytes and formation of chondrocyte mass[J]. Ann Plast Surg, 2000, 44(4): 405—411.
[3] Gibson G, Lin D L, Roque M. Apoptosis of terminally differentiated chondrocytes in culture[J]. Exp cell Res, 1997, 233(2): 372—382.
[4] 吴根生, 陈秋燕, 孙宗棠, 等. SV40 T 抗原介导的人胚肝细胞的体外永生化及其机制探讨[J]. 中华肿瘤杂志, 1993, 15(6): 415—418.
[5] 杨志明, 解慧琪, 项 舟, 等. 转化人胚肌腱细胞的体外培养及生物学特性研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 1999, 13(2): 99—104.
[6] 苏映军, 陈 壁, 汤朝武, 等. SV40 病毒对体外培养的人角朊细胞的转化[J]. 第四军医大学学报, 1999, 20(5): 382—385.
[7] Steimberg N, Viengchareun S, Biehlmann F, *et al*. SV40 Large T antigen expression driven by Col2a1 regulatory sequences immortalizes articular chondrocytes but dose not allow stalibization of type II collagen expression [J]. Exp Cell Res, 1999, 249(2): 248—259.
[8] Kim B H, Sung S R, Choi E H, *et al*. Dedifferentiation of conditionally immortalized hepatocytes with long—term in vitro passage[J]. Exp Mol Med, 2000, 32(1): 29—37.
[9] Oram J F, Mendez A J, Lymp J, *et al*. Reduction in apolipoprotein—mediated removal of cellular lipids by immortalization of human fibroblasts and its reversion by cAMP: lack of effect with Tangier disease cells[J]. J Lipid Res, 1999, 40(10): 1 769—1 781.
[10] Lee W P, Liao Y, Robinson D, *et al*. Axl-gas6 interaction counteracts E1A-mediated cell growth suppression and proapoptotic activity[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(12): 8 075—8 082.
[11] Pace M C, Chambliss K L, German Z, *et al*. Establishment of an immortalized fetal intrapulmonary artery endothelial cell line[J]. Am J Physiol, 1999, 277(Lung Cell Mol Physiol 21): L106—L112.
[12] Mansur C P, Androphy E J. Cellular transformation by papillomavirus oncoprotein[J]. Biochimica Biophysica Acta, 1993, 1155(3): 323—345.
[13] Munger K, Jones D L. Analysis of the p53 mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein[J]. J Virol, 1997, 71(4): 2 905—2 912.
[14] Morozov A, Shiyanov P, Barr E, *et al*. Accumulation of human papillomavirus type 16 E7 protein bypasses G1 arrest induced by serum deprivation and by the cell cycle inhibitor p21[J]. J Virol, 1997, 71(5): 3 451—3 457.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)05-0520-01

妊娠晚期并发肠梗阻 1 例

A case of pregnancy's later period accompanied with ileus

申 勇 （成都市龙泉驿区第一人民医院, 成都 610100）

患者 22 岁, 孕 1 产 0, 孕 39^{+3} 周。因停经 9^{+} 月, 阵发性腹痛伴呕吐 3 d, 于 1996 年 7 月 3 日入院。患者停经后无明显早孕反应及其它不适, 入院前 3 d, 无明原因出现恶心、呕吐数次（胃内容物）, 随后伴腹部阵发性疼痛并进行性加重, 进食即吐, 3 d 来, 小便正常, 肛门未排气排便。患者曾于 1994 年 5 月患慢性盆腔炎而入院治愈, 但随后仍常出现反复下腹隐痛。

身体检查: T 36.5 ℃, P90 次/min, R21 次/min, BP15/10 kPa, 急性痛苦病容, 心肺无异常; 腹部膨隆, 左上腹偶见肠形, 右中下腹有压痛, 肠鸣音 5～6 次/min, 未听到高调及气过水声。产检: 宫高 32 cm, 腹围 94 cm, 胎方位 LO, 胎心音 148 次/min, 律齐, 无宫缩; 骨盆外测量各径线值均正常; 肛查: 内骨盆正常, 宫口未开。实验室检查: 血红蛋白 112 g/L, 白细胞 13×10^{9}/L, 中性多核细胞 0.80, 淋巴细胞 0.20; CO_2-CP16 mmol/L; Na^{+} 139 mmol/L, K^{+} 3.96 mmol/L Cl^{-} 108.1 mmol/L, Ca^{2+} 2.16 mmol/L; Mg^{2+} 0.84 mmol/L。B 超检查提示: ①头位正常晚孕单活胎; ②阑尾不显示; ③右中下腹肠管扩张, 内径 3.6 cm。临床诊断: 孕 1 产 0 39^{+3} 周宫内孕 LO 单活胎并发肠梗阻。

患者于 7 月 4 日在持硬膜外麻醉下行剖腹取胎腹腔探查术: 取脐下正中线切口约 10 cm 开腹, 行子宫下段横形切口约 8 cm, 羊水 I°, 约 1 000 ml, 胎儿以 LOP 娩一活男婴, Apgar 评分 10 分, 缝合子宫切口; 再行腹腔探查: 见距回盲部 20 cm 处回肠被直径长 3.5 cm 粘连带压迫, 其近端肠管高度扩张, 远端肠管呈暗红色; 行松解切断粘连带, 解除梗阻, 并行肠腔减压术, 排列肠管, 关闭腹腔; 术后给予输液、抗生素及对症治疗, 7 d 后母子痊愈出院。

讨论

妊娠并发肠梗阻较罕见, 多是由于妊娠子宫增大挤压肠袢, 使无症状的肠粘连因受压或扭转而形成肠梗阻; 亦或因先天性肠系膜根部距离过短, 受逐渐增大子宫的推挤时, 由于肠管活动受限, 过度牵拉和挤压, 亦可使小肠扭转, 发生机械性肠梗阻, 当先天性异常、炎症、肿瘤或手术使肠管狭窄, 肠管以外粘连或肿物压迫使肠腔变小, 肠内异物使肠腔堵塞, 以及绞窄性疝, 肠套叠等都可发生机械性肠梗阻。该例是由于子宫增大, 推挤肠腔, 加之曾有慢性盆腔炎史, 导致粘连带压迫肠腔而形成机械性肠梗阻, 引起一系列胃肠道症状; 值得注意的是: ①该腹痛要与临产时宫缩腹痛相鉴别; ②呕吐应与临产时宫缩引起的反应性呕吐相区别; ③不要因足月孕膨隆的腹部而掩盖腹部膨胀, 肠腔积气等; ④注意过去史询问。晚期妊娠并发肠梗阻虽属罕见, 孕妇出现急腹痛时, 特别是腹痛突然发作, 随后出现阵发性, 继而转为持续性腹痛, 要特别警惕, 做到细致的鉴别诊断, 即时正确的处理, 是保证孕妇顺利生产、胎儿平安降生的关键。

关键词: 妊娠; 肠梗阻; 腹腔探查术
中图法分类号: R714.255 文献标识码: B

参考文献:

[1] 王淑贞 主编. 实用妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 313.

（编辑 薛国文）

作者简介: 申 勇(1959—), 女, 四川省成都市人, 主治医师, 主要从事妇产科方面的研究。电话: (028)4873123

收稿日期: 2000-12-11; 修回日期: 2001-10-21

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