

文章编号:1000-5404(2013)01-0029-05

论著

微流控电融合芯片的研制及其在体细胞重编程中的应用

吴畏^{1,2},徐海伟^{1,2},屈娅^{1,2},张小玲^{2,3},胡宁^{2,3},阴正勤^{1,2} (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心¹,视觉损伤与再生修复重庆市重点实验室²;400030 重庆,重庆大学生物工程学院³)

[摘要] **目的** 开发高通量的细胞电融合平台,并通过此平台将小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)与体细胞融合,探讨融合细胞的多能性。**方法** 本实验室自主研发微流控芯片,将转染了绿色荧光的 mESCs 与转染了红色荧光的 NIH3T3 细胞进行电融合,并计算其排队率与融合率。通过流式细胞仪筛选出表达两种荧光的融合细胞,观察融合细胞的表型。RT-PCR 检测 NIH3T3、mESC 以及融合细胞的多能性基因(Nanog、OCT4、SOX2 和 LIN28)mRNA 的表达水平。**结果** 自主研发了微流控芯片,构建了高通量的细胞电融合平台,通过此平台将 mESCs 与 NIH3T3 进行电融合,其排队率为(44.35 ± 10.99)%,融合率为(59.88 ± 20.03)%,融合细胞可形成类似于 ESC 样的克隆。RT-PCR 法结果显示 mESC 和融合细胞均表达多能性基因 Nanog、OCT4、SOX2 和 LIN28 mRNA,而 NIH3T3 不表达。**结论** 通过自主研发的微流控芯片,可实现 mESCs 与 NIH3T3 的高效融合,使体细胞重编程为多能性干细胞。

[关键词] 电融合;体细胞重编程;微流控芯片;胚胎干细胞

[中图分类号] Q319; R394-33; R394.3

[文献标志码] A

Development of microfluid cell electro-fusion chip and its application in somatic cell reprogramming

Wu Wei^{1,2}, Xu Haiwei^{1,2}, Qu Ya^{1,2}, Zhang Xiaoling^{2,3}, Hu Ning^{2,3}, Yin Zhengqin^{1,2} (¹Department of Ophthalmology, ²Key Lab of Visual Damage and Regeneration & Restoration of Chongqing, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; ³College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400030, China)

[Abstract] **Objective** To establish a high throughput cell electro-fusion platform, by which to fuse mouse embryonic stem cells (mESCs) with somatic cells, and to explore the pluripotency of the fused cells. **Methods** With the microfluid chip developed by our lab, we fused the mESCs carrying GFP with NIH3T3 cells carrying RFP, and explored the alignment efficiency and electro-fusion efficiency. The fused cells were sorted by flow cytometry (FACS) and observed under a microscope. The mRNA levels of Nanog, Oct4, Sox2 and Lin28 in the three types of cells were detected by RT-PCR. **Results** A high throughput cell electro-fusion platform was developed. The alignment and electro-fusion efficiencies of mESCs and NIH3T3 fused cells were (44.35 ± 10.99)% and (59.88 ± 20.03)%, respectively. The fused cells can form embryonic stem cell-like clones. The RT-PCR results showed mESCs and fused cells rather than NIH3T3 cells could express Nanog, Oct4, Sox2 and Lin28. **Conclusion** Using the microfluid chip developed by our lab, the mESCs and NIH3T3 cells can be fused efficiently to reprogram somatic cells as pluripotent stem cells.

[Key words] electro-fusion; somatic cells reprogramming; microfluid chips; embryonic stem cells

Supported by the Starting Fund for Returned Overseas Scholars of Chongqing (CSTC2011jjzt0137) and the National Natural Science Foundation of China (31071299). Corresponding author: Yin Zhengqin, Tel: 86-23-68754401, E-mail: qinzyin@yahoo.com.cn

已分化的体细胞可以通过重编程来改变其命运,在一定条件下可以转化为其他类型的细胞,甚至回到

多能状态。而由患者自身体细胞重编程而来的诱导性多能性干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC),可作为细胞移植的种子细胞使用,避免了使用胚胎干细胞所面临的伦理学障碍,并且在疾病模型的制备和药物筛选领域有广阔应用前景^[1]。目前,体细胞重编程的方法主要有4种:体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)、特定因子诱导、干细胞提取物

[基金项目] 重庆市留学回国人员启动基金(CSTC2011jjzt0137);国家自然科学基金(31071299)

[通信作者] 阴正勤,电话:(023)68754401, E-mail: qinzyin@yahoo.com.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121030.1756.010.html> (2012-10-30)

共培养和细胞融合^[1-2]。其中细胞融合耗时最短,可在1~2 d内激活体细胞的多能性基因;重编程效率也最高(可达70%左右),这有利于研究体细胞重编程的机制^[3]。然而,较低的融合效率也在一定程度上限制了该方法的应用。随着微制造技术的发展,电融合芯片应运而生,与传统的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)诱导的细胞融合和仙台病毒诱导的细胞融合相比,电融合操作简单、无化学毒性、对细胞损伤小、可在显微镜下直观观察融合过程、融合率也更高^[4]。本实验室结合前期工作基础^[5-7],自主研发了一种微流控电融合芯片^[8],本研究对该芯片进一步加工改良,通过改良的电融合芯片将体细胞和小鼠胚胎干细胞进行融合,初步探讨融合细胞的多能性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞来源 129 小鼠胚胎干细胞/GFP 购自广州 Cyagen 公司,该细胞系能够稳定表达 GFP 报告基因。饲养层细胞 ICR 小鼠胚胎成纤维细胞购自广州 Cyagen 公司。小鼠成纤维细胞系 NIH3T3 由第三军医大学西南医院全军眼科中心实验室冻存,已由 pZLENU-tagRFP 慢病毒转染后稳定表达 RFP 报告基因。

1.1.2 主要试剂和仪器 细胞培养基 H-DMEM(Hyclone 产品),胰蛋白酶、EDTA、胎牛血清(Gibco 产品),129 小鼠胚胎干细胞完全培养基、0.1% 明胶溶液(Cyagen 产品),RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒(TIANGEN 产品),2 × PCR Taq mix(东盛产品)电脉冲介质缓冲液(Eppendorf 产品),CO₂ 培养箱(NuAire 产品),相差倒置显微镜(Leica 产品),BD FACS AriaII cell sorter 流式细胞仪。

1.2 方 法

1.2.1 电融合芯片的研发 2011 年,本实验室自主研发了一种拥有交错式微电极阵列的细胞电融合芯片^[8],该芯片的电极间凹陷区可以使细胞排队,却因为达不到细胞电穿孔所需的电场阈值而不能进行融合,所以影响了融合效率。本实验在此基础上进行了加工改良,采用电场聚焦效应,融合区用绝缘材料隔开,使电场集中在融合区内,从而增强了融合区对细胞的吸附作用,可望提高细胞排队率,并使电场集中,使细胞更容易穿孔融合。

该芯片尺寸为 3 cm(长) × 2 cm(宽),包含由垂直侧壁构成的 S 形微通道(即工作通道),基底为绝缘体上的硅(silicon-on-insulator, SOI)。使用垂直侧壁能够沿着通道深度方向产生均匀电场,这样可以使融合只需要较低的电压。相对的垂直侧壁包含 22 500 对相对的宽度为 20 μm 的离散微电极,每个离散的垂直侧壁电极占据微通道的整个深度(35 μm)。每个侧壁相邻的微电极被一个垂直的二氧化硅-多晶硅-二氧化硅/硅组成的微结构隔离。每个微结构的宽度和深度分别为 60 μm 和 35 μm。微电极与微结构共平面,形成微通道的垂直侧壁。微通道的宽度和整个长度分别为 60 μm 和 1.8 × 10⁶ μm。微通道的末端都连接了两个直径为 2 mm 的流通池。

1.2.2 细胞培养 将 NIH3T3/RFP 细胞培养于 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)高糖培养基中(含 10% 胎牛血清),在 37 ℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养,3~4 d 左右按照 1:3~1:5 比例传代。用 0.1% 明胶溶液包被 6 孔板,复苏饲养层细胞 ICR 小鼠胚胎成纤维细胞,每 1 管饲养层细胞平均接种于已包被过明胶的 6 孔板中的 5 孔,37 ℃、5% CO₂ 孵育 8 h 后可接种 mESCs/GFP。用 129 小鼠胚胎干细胞完全培养基培养 mESCs/GFP,次日换液,根据克隆数量大小及多少,刚复苏的细胞传代比例一般为 1:1 或者 1:2,此后传代比例为 1:5~1:7。

1.2.3 细胞电融合及筛选 收集状态较好的等量的 mESC/GFP 细胞和 NIH3T3/RFP 细胞,混合后离心后弃上清,每次沿管壁加入 200 μL 电脉冲介质缓冲液(pluse medium, PM),清洗 3 次,再加入 2 mL PM 液重悬细胞,吸取 50 μL 混合悬浮液加载到芯片上,进行观察,在绿色激发光与蓝色激发光下可以观察到发红色荧光的 NIH3T3 细胞与发绿色荧光的 mESC 细胞,施加排队信号(幅度 4 V,频率 1 MHz),持续时间 30 s,发现当细胞可以较好排队时,施加融合脉冲信号(幅度 9 V,脉宽 50 μs,脉冲个数 3 个,脉冲间隔 1 s),完成后施加挤压正弦信号(幅度 4 V,频率 1 MHz),发现两种细胞异源融合现象,重复实验。

融合后的混合细胞收集至离心管,离心去除 PM 缓冲液后用 PBS 重悬,调整至合适细胞浓度,经过滤网过滤后经流式细胞仪分选。双荧光细胞接种于 96 孔板内,每孔 2 个,100 μL 胚胎干细胞完全培养基培养 5 d 至克隆形成,低比例逐步传代扩增至六孔板。

1.2.4 细胞排队率及融合率分析 分别对携带不同荧光的细胞进行分析计数。根据以下公式得到细胞排队率和融合率。计算公式如下。

$$\text{细胞排队率} = \frac{\text{视野内两两排队的细胞数}}{\text{视野内细胞总数}}$$

$$\text{细胞融合率} = \frac{\text{视野内两两排队细胞中融合细胞数}}{\text{视野内两两排队的细胞总数}}$$

1.2.5 RT-PCR 法检测多能性基因(Nanog、OCT4、SOX2 和 LIN28)mRNA 的水平 使用 TIANGEN 总 RNA 抽提试剂盒按照说明书方法分别提取第 5、10、15、23 代的融合细胞和融合前 mESC/GFP、NIH3T3/RFP 细胞的总 RNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并测定样品 D(260);D(280)值和浓度,确保比值介于 1.8~2.0。用 Oligo(dT)引物将抽提的细胞总 RNA 逆转录成 cDNA,再行 RT-PCR。引物设计参照 GeneBank 的基因序列,引物序列及扩增长度如下表所示。

表 1 引物序列及扩增长度

名称	引物序列	产物大小(bp)
Oct4	上游: 5'-GCCCGAAGAGAAAGCGAAC-3'	115
	下游: 5'-GCTGATTGGCGATGTGACTGA-3'	
Nanog	上游: 5'-GCCCAGCTGTGTGCACTCAAGG-3'	207
	下游: 5'-CACTGGTGTGAGCCCTTCTGA-3'	
Sox2	上游: 5'-CGAAGTGGAGAGGGGAGAG-3'	124
	下游: 5'-GTCGTTTCGCTGCCGAGATT-3'	
Lin28	上游: 5'-CCTGCTGTAGCGTGTGCTTG-3'	176
	下游: 5'-GGGGGAGAGGGGAGACAAGA-3'	
GAPDH	上游: 5'-GCCCATCACCATCTTCCAGAG-3'	159
	下游: 5'-GAAGGGCGGAGATGATGAC-3'	

扩增条件为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 20 s; 循环 35 圈, 72 °C 延伸 10 min。取 15 μL 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, Bio-Rad 凝胶成像分析系统采集荧光信号。

1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 计算机统计软件进行统计处理, 不同细胞融合方法之间排队率、融合率的比较采用独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞电融合平台

细胞电融合实验平台主要由细胞电融合芯片、融合信号发生装置、图像采集系统 3 大部分构成。细胞电融合芯片是该系统的核心, 可以在显微镜下对细胞融合过程进行实时观察、拍摄。融合信号发生装置可以产生可变的正弦交流电压、电脉冲分别用于细胞排队和诱导细胞穿孔, 随后, 一组衰减的正弦交流电压促进细胞融合 (图 1)。在此电融合平台上进行细胞融合, 排队率为 (44.35 ± 10.99)%, 融合率为 (59.88 ± 20.03)%。

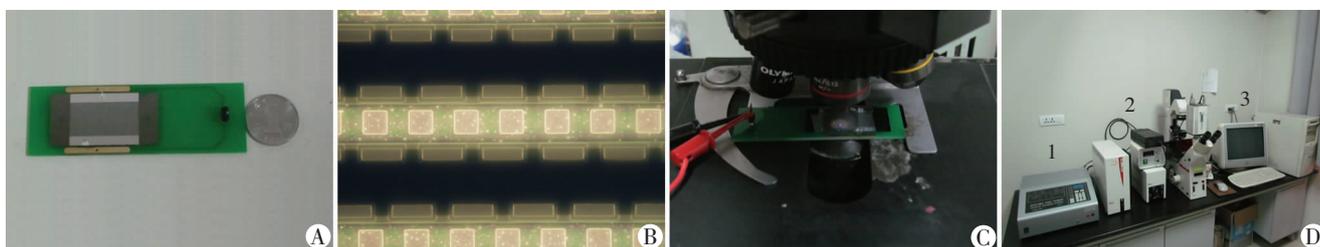
改进之前的细胞电融合平台排队率为 (35.49 ± 9.32)%, 融合率为 (60.09 ± 28.28)%, 而传统的细胞融合方法 (如 PEG、仙台病毒诱导的细胞融合) 融合率只有 2% 左右, 由此可见改进后的细胞电融合平台在排队效率方面有显著提高 ($P < 0.05$)。

2.2 细胞排队率和融合率分析

实验中对 mESC 和 NIH3T3 细胞融合过程进行记录, 观察到配对细胞融合后, 对细胞排队率和融合率进行计算。在采用本实验室自行研制的细胞电融合平台进行的 10 次 mESC 和 NIH3T3 细胞的电融合实验中, 细胞排队率为 (44.35 ± 10.99)%, 融合率为 (59.88 ± 20.03)%。

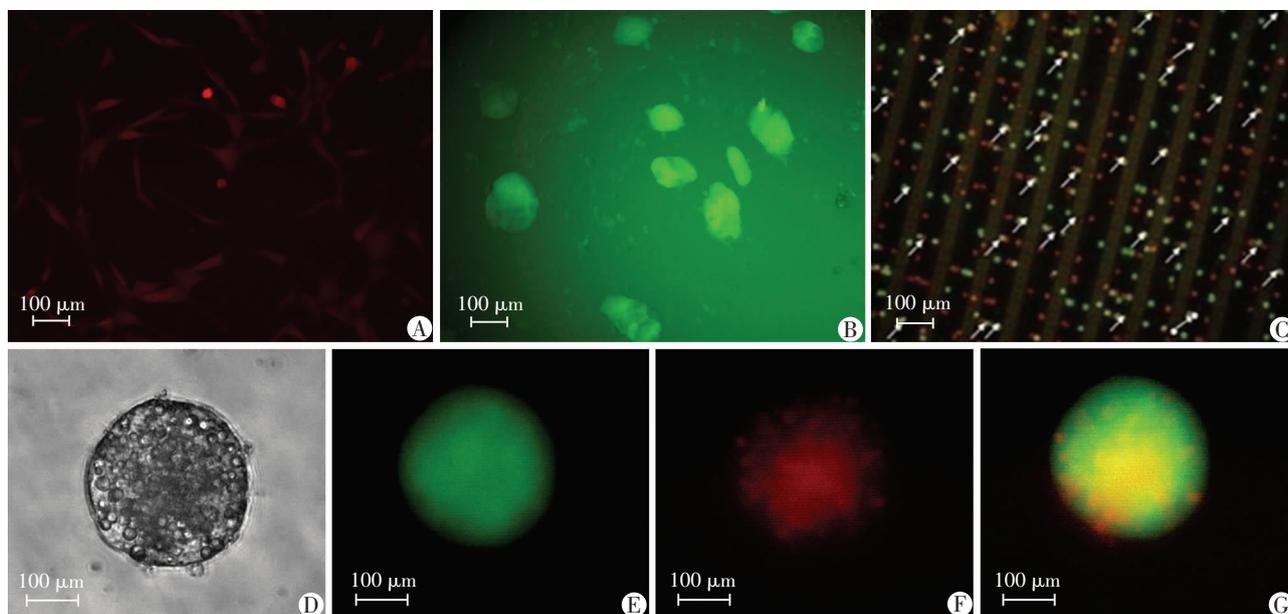
2.3 融合细胞的生长特点

经流式细胞仪筛选出的融合细胞在连续扩增 24 代的过程中均可形成类似于胚胎干细胞样克隆, 形态典型, 边界清楚, 折光性强, 克隆内可见大量密集排列的单细胞, 能同时表达绿色和红色荧光, 生长速度与胚胎干细胞类似, 而融合前的 NIH3T3/RFP 细胞贴壁生长, 呈梭形或不规则三角形生长, 成纤维状, 胞体膨大, 伸出 2~3 个长突起, 无法形成克隆, 且只能表达红色荧光 (图 2)。



A: 设计研发的细胞电融合芯片图 (以一角硬币为对照); B: 400 倍显微镜下细胞电融合芯片; C: 显微镜下直接观察细胞融合过程; D: 细胞电融合实验平台 1: 细胞电融合信号发生装置; 2: LEICA DMIRE2 倒置荧光显微镜系统 (电融合芯片位于显微镜载物台上); 3: 计算机 (Petium® 4 CPU 2.66 GHz, 1.00 GB DDR, ST 380011A)

图 1 细胞电融合实验平台观察



A: 融合前的 NIH3T3/RFP 细胞, 带有红色荧光; B: 融合前的 mESC/GFP 细胞, 带有绿色荧光; C: 融合时的图片, 箭头分别示带有 NIH3T3/RFP 和 mESC/GFP 细胞的排队、融合情况; D: 融合细胞呈胚胎干细胞样克隆状生长; E: 融合细胞的绿色荧光图像; F: 融合细胞的红色荧光图像; G: 两种荧光融合图像

图 2 细胞融合前后观察 (荧光显微镜)

2.4 RT-PCR 检测多能性基因 (Nanog、OCT4、SOX2 和 LIN28) mRNA 的水平

RT-PCR 结果显示各代的融合细胞均能稳定地表达 4 种多能性基因 Nanog、OCT4、SOX2 和 LIN28 mRNA, 与胚胎干细胞类似, 而 NIH3T3/RFP 四种多能性基因都不能表达 (图 3)。

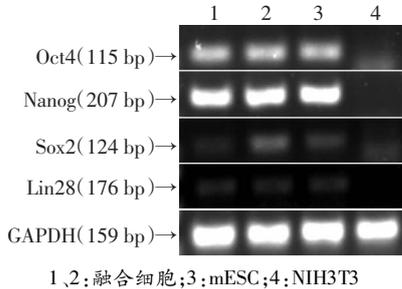


图3 RT-PCR 检测融合细胞多能性基因表达

3 讨论

2006年, Yamanaka 等^[9]通过转染 4 种转录因子 Oct4, Sox2, Klf4 和 C-Myc 将小鼠尾部成纤维细胞重编程为诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC), 使得体细胞重编程得到广泛关注。然而, 该方法效率非常低, 只有 0.01% ~ 0.1%, 且需要花费 3 ~ 4 周的时间。体细胞核移植技术难度较大, 且核移植的效率较低, 因此也不适合进行大规模分子研究^[10]。干细胞提取物共培养也存在耗时长 (4 周左右), 重编程效率不稳定等问题^[11]。相比而言, 细胞融合可以迅速 (1 d 内) 高效 (70% 左右) 地使体细胞去分化, 并且细胞融合后的异核体不会发生细胞分裂, 这十分有利于研究异核体中多能性基因再次激活的主动机制^[10]。但传统的细胞融合方法 (如 PEG、仙台病毒诱导的细胞融合) 融合率在 2% 左右, 限制了该方法的应用。1978 年, Zimmermann 等^[12]在实验中利用电脉冲方法成功诱导细胞融合, 开创了电场诱导技术。其后的几年里, 很多科学家在电场诱导技术的研究上投入了大量的精力, 并取得了大量的突破性进展。例如, 实现了植物原生质体融合, 并将这种新的融合手段的应用推广到动物、植物、微生物和真菌的原生质体融合研究, 实现了这一技术的突破性发展^[13-15]。2009 年, Voldman 等^[16]采用新型的细胞电融合芯片, 使得细胞融合的成功率从 10% 以下提高到大约 50%, 远远高于其他融合技术。但该芯片对于进行融合的亲本细胞大小有限制, 使得该芯片不能广泛用于细胞融合。

2011 年, 本实验室自主研发了一种拥有致密微电极阵列的细胞电融合芯片, 能够通过控制双向电泳装置和电穿孔, 使大量细胞同时高效精确地配对和电融合, 融合率高达 30% ~ 40%, 并且该芯片使用了交错式梳齿状电极, 亲本细胞在电场力的作用下被吸附到电极上排队融合, 而对细胞融合区的大小没有限制, 所

以不同大小的细胞同样也能进行融合^[8], 但该芯片在通道同一侧的两相邻梳齿状电极之间存在一凹陷区, 在进样过程中有部分细胞会进入该区域, 该区域的较低电场可以使细胞排队。但是由于该区域电场强度较低, 无法完成细胞融合, 这将影响系统的电融合效率。因此, 本研究在梳齿状微电极阵列的基础上进行了加工改良, 采用电场聚焦效应, 融合区用绝缘材料隔开, 使电场集中在融合区内, 增强了融合区对细胞的吸附作用, 提高了有效的细胞排队率, 并且电场集中, 也更容易使细胞穿孔融合, 提高了整体的融合效率。亲本细胞电融合后, 通过流式细胞仪分选, 在连续扩增 24 代的过程中均可形成类似于胚胎干细胞样克隆, 形态典型, 边界清楚, 折光性强, 克隆内可见大量密集排列的单细胞。分别提取第 5、10、15、23 代的融合细胞和融合前 mESC/GFP、NIH3T3/RFP 细胞的 RNA, 进行 RT-PCR 检测发现各代的融合细胞均能稳定地表达 4 种多能性基因 mRNA, 与胚胎干细胞类似, 而作为对照的 NIH3T3/RFP 细胞则不能表达多能性基因 mRNA, 可以推测融合细胞发生了多能性基因的再次活化, 从而表现出与胚胎干细胞类似的表型。目前普遍认为在重编程过程中, 体细胞多能性基因的激活是关键。而这些多能性基因又受到了各种表观遗传学修饰以及一些细胞信号通路的调控。这些表观遗传学的修饰包括: 染色质重塑、组蛋白修饰和 DNA 甲基化, 其中 DNA 甲基化修饰在调控这些多能性基因表达方面发挥了重要作用^[17]。DNA 甲基化能够抑制基因的表达, 去甲基化则会去除该抑制效应, 激活基因的表达。Bhutani^[3]发现体细胞的多能性基因启动子是呈高度甲基化状态的, 而通过细胞融合将体细胞重编程后体细胞的多能性基因启动子发生了去甲基化, 激活了多能性基因, 由此证实了 DNA 甲基化修饰在体细胞重编程过程中发挥了重要作用, 但具体的去甲基化机制尚需进一步研究来证实。利用本实验室自主开发的高通量细胞电融合平台, 能够实现 mESCs 与 NIH3T3 的高效融合, 并且融合细胞能够成功使体细胞重编程, 将有利于深入研究体细胞重编程机制。

参考文献:

- [1] Patel M, Yang S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells[J]. Stem Cell Rev, 2010, 6(3): 367-380.
- [2] Hasegawa K, Zhang P, Wei Z, et al. Comparison of reprogramming efficiency between transduction of reprogramming factors, cell-cell fusion, and cytoplasm fusion[J]. Stem Cells, 2010, 28(8): 1338-1348.
- [3] Bhutani N, Brady J J, Damian M, et al. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation [J]. Nature, 2010, 463(7284): 1042-1047.
- [4] 屈妮, 徐海伟, 阴正勤. 电融合技术进展及其在干细胞研究中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(7): 80-85.

- [5] Zhao Z Q, Zheng X L, Xiong J G, *et al.* A 3-d microelectrodes array microchip applied to cell fusion [J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2005, 2: 1282 - 1285.
- [6] 胡宁, 杨军, 侯文生, 等. 基于 SOI 基底的高通量细胞电融合芯片 [J]. *高等学校化学学报*, 2009, 30(1): 42 - 45.
- [7] 夏斌, 杨军, 胡宁, 等. 基于 MEMS 细胞电融合芯片的设计及试验研究 [J]. *传感器与微系统*, 2009, 28(2): 45 - 47.
- [8] Qu Y, Hu N, Xu H W, *et al.* Somatic and stem cell pairing and fusion using a microfluidic array device [J]. *Microfluid Nanofluid*, 2011, 11(5): 633 - 641.
- [9] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663 - 676.
- [10] Yamanaka S, Blau H M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches [J]. *Nature*, 2010, 465(7299): 704 - 712.
- [11] Rajasingh J, Lambers E, Hamada H, *et al.* Cell-free embryonic stem cell extract-mediated derivation of multipotent stem cells from NIH3T3 fibroblasts for functional and anatomical ischemic tissue repair [J]. *Circ Res*, 2008, 102(11): e107 - e117.
- [12] Zimmermann U, Pilwat G. The relevance of electric field induced changes in the membrane structure to basic membrane research and clinical therapeutics and diagnosis [C]. Abstract IV-19-(H) of the 6th International Biophysics Congress, Kyoto, 1978: 140.
- [13] Van-Wert S L, Saunders J A. Electrofusion and electroporation of plants [J]. *Plant Physical*, 1992, 99(2): 365 - 367.
- [14] Zimmermann U, Buchner K H, Arnold W M. Electrofusion of cells: Recent developments and relevance for evolution [M]//Allen M J, Usherwood P N R. *Charge and Field Effects in Biosystems*. Abacus Press, 1984: 293 - 318.
- [15] Zimmermann U, Vienken J, Pilwat G, *et al.* Electro-fusion of cells: principles and potential for the future [J]. *Ciba Found Symp*, 1984, 103: 60 - 85.
- [16] Skelley A M, Kirak O, Suh H, *et al.* Microfluidic control of cell pairing and fusion [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(2): 147 - 152.
- [17] Deng W. AID in reprogramming: quick and efficient; identification of a key enzyme called AID, and its activity in DNA demethylation, may help to overcome a pivotal epigenetic barrier in reprogramming somatic cells toward pluripotency [J]. *Bioessays*, 2010, 32(5): 385 - 387.
- (收稿:2012-07-27;修回:2012-09-05)
(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2013)01-0033-01

个案与短篇

直肠侧向发育型肿瘤肠镜检查误诊为直肠癌 1 例

樊超强, 于 劲, 宋元鲲, 王 雷 (400037 重庆, 第三军医大学新桥医院消化内科)

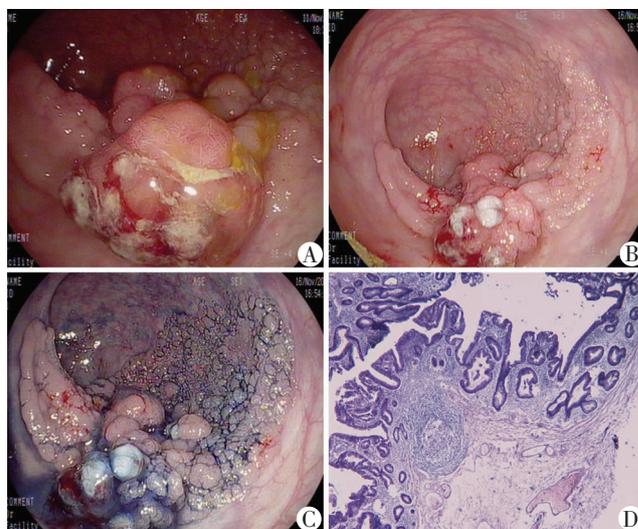
[关键词] 侧向发育型肿瘤; 肠镜

[中图分类号] R735.3 [文献标志码] B

1 临床资料

患者, 男性, 81 岁, 因“间断血便 1 周, 为少量鲜血附着于黄色大便表面”于 2010 年 11 月 9 日以“便血原因待查”收住我科。入院后肛门指检: 直肠后壁触及一约 2 cm 扁平包块, 质地柔软, 活动差, 边界不清, 退出可见指套血染。入院后相关检查: 血红蛋白 10^9 g/L, 大便隐血实验 (免疫法) 阳性, 肝功能和肿瘤标志物均正常。为进一步诊断, 2010 年 11 月 11 日行电子结肠镜检查, 肠镜下所见肠腔清洁度较差, 见较多粪水和少量粪渣, 于直肠距肛门 6 ~ 10 cm 见一不规则隆起性病变, 表面呈结节样改变, 部分黏膜溃烂, 覆着污秽苔, 累及管腔环周约 1/2, 活检感觉质地脆, 镜身通过无阻力 (图 1A), 诊断直肠癌。经普通外科会诊后, 2010 年 11 月 15 日转至普通外科, 拟行手术治疗。术前活检病理提示: 直肠腺瘤, 轻 ~ 中度非典型增生。由于病理诊断未见癌细胞, 普外科医师为了慎重, 再次嘱患者复查肠镜。2010 年 11 月 16 日肠镜检查显示: 直肠距肛门 6 ~ 11 cm 见一侧向生长息肉, 表面结节样隆起, 靛胭脂染色可见病变边界清楚, 表面腺窝开口呈 III 型和 IV 型为主, 表面部分糜烂, 病变面积约 5 cm × 6 cm (图 1B、C), 诊断为直肠侧向发育肿

瘤, 结节混合型。建议患者行直肠病变内镜黏膜下剥离术, 但患者及家属要求行外科手术。2011 年 11 月 25 日在全麻下开腹行直肠肿瘤切除术, 术后病理诊断: 直肠绒毛状-管状腺瘤, 局部中-重度非典型增生 (图 1D)。患者术后 2 周痊愈出院。



A: 术前肠镜检查见直肠包块; B: 复查肠镜见直肠侧向发育肿瘤; C: 靛胭脂染色观察; D: 术后病理观察 (HE × 20)

图 1 直肠侧向发育型肿瘤肠镜检查误诊为直肠癌患者术前与术后电子结肠镜、病理观察

[通信作者] 王 雷, E-mail: wangl28@medmail.com.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121219.1739.005.html> (2012-12-19)

(下转 49 页)