

## · 论著 ·

八肽缩胆囊素对脂多糖诱导血管内皮细胞  
诱生型一氧化氮合酶表达变化的抑制作用

闫骏 谷振勇 王杏云 刘森 徐小虎 丛斌 凌亦凌

**【摘要】** 目的 探讨八肽缩胆囊素(CCK-8)对脂多糖(LPS)诱导血管内皮细胞诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达变化的影响。方法 培养人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 细胞,用 0.01、0.1 和 1 mg/L LPS 处理 2~24 h,用生理盐水、 $10^{-7}$  mol/L CCK-8 和 0.1 mg/L LPS+ $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  mol/L CCK-8 处理 16 h;用比色法检测培养液中一氧化氮(NO)含量、细胞 NOS 活性,免疫细胞化学及蛋白质免疫印迹法检测 iNOS 蛋白表达。结果 与生理盐水处理的对照组比较,LPS 诱导培养液 NO 含量增多、细胞 NOS 活性增高,iNOS 蛋白表达上调;CCK-8 剂量依赖性抑制 LPS 的上述效应,而单独作用对 iNOS 蛋白表达、NOS 活性和 NO 含量均无明显影响。结论 CCK-8 可以明显抑制 LPS 引起 ECV-304 细胞 iNOS 蛋白表达上调,减少 NO 生成。

**【关键词】** 八肽缩胆囊素; 脂多糖; 一氧化氮合酶; 血管内皮细胞

**Inhibitory effect of cholecystokinin octapeptide on lipopolysaccharide-elicited inducible nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells** YAN Jun\*, GU Zhen-yong, WANG Xing-yun, LIU Sen, XU Xiao-hu, CONG Bin, LING Yi-ling. \* Department of Forensic Medicine and Pathophysiology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China (YAN Jun works at Department of Pathophysiology, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

Corresponding author: GU Zhen-yong (Email: zhenyong88@sohu.com)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of cholecystokinin octapeptide (CCK-8) on lipopolysaccharide (LPS)-elicited inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in vascular endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cell line (ECV-304 cells) was stimulated with vehicle (normal saline) or LPS in the presence (0.01, 0.1, 1 mg/L) or absence (0.1 mg/L) of CCK-8 ( $10^{-6}$ – $10^{-8}$  mol/L). Nitric oxide (NO) level and cellular nitric oxide synthase (NOS) activity were determined with spectrophotometrically. The iNOS expression was detected with immunocytochemical technique and Western blot. **Results** Compared with normal saline, LPS significantly induced the upregulation of iNOS protein expression in the cultured ECV-304 cells, and NOS activity in ECV-304 cells and NO level in cultured media were increased. CCK-8 obviously inhibited above-mentioned effect of LPS in a dose-dependent manner. Whereas CCK-8 alone did not showed effect on iNOS protein expression, NO level and cellular NOS activity as compared with those values when vehicle was used. **Conclusion** CCK-8 inhibit LPS-elicited iNOS expression and NO production in ECV-304 cells.

**【Key words】** cholecystokinin octapeptide; lipopolysaccharide; nitric oxide synthase; vascular endothelial cell

研究发现,血管内皮细胞不仅构成血管的机械性保护屏障,还可合成多种血管活性物质如一氧化氮(NO),调节血管的张力和反应性变化<sup>[1]</sup>。已经证实,NO是内皮衍生舒血管因子(EDRF)的主要化学物质,一氧化氮合酶(NOS)是NO生成的限速酶。

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(301351),教育部重点项目基金资助(204016)

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学法医学与病理生理学教研室(闫骏(现在天津市南开医院病理科工作),谷振勇,王杏云,刘森,丛斌,凌亦凌);515031 广东汕头,汕头大学医学院(徐小虎)

通讯作者:谷振勇,医学博士,教授,博士研究生导师(Email: zhenyong88@sohu.com)

作者简介:闫骏(1978-),男(汉族),黑龙江佳木斯人,医学硕士,医师(Email: yanhuang2@163.com)。

在生理条件下,内皮细胞主要存在内皮型一氧化氮合酶(eNOS),NO生成量较少,主要发挥调节血管张力、防止血小板黏附等生理功能;而当内毒素脂多糖(LPS)及促炎细胞因子等刺激血管内皮细胞时,可诱导血管内皮细胞诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达上调,NO生成量明显增多。过量生成的NO及其衍生物过氧亚硝基阴离子均具有细胞毒效应,可导致细胞损伤。在内毒素休克发病过程中,血管内皮细胞NO的生成、释放及其生物学效应异常是血管内皮细胞损伤和内皮功能异常的关键环节<sup>[2,3]</sup>。保护血管内皮已经成为治疗休克的重要途径。

八肽缩胆囊素(CCK-8)是一种分布广泛的神经调节肽,具有抗休克、缓解内毒素休克血管动力学

紊乱和细胞保护作用<sup>[3]</sup>。我们以往研究发现, CCK-8 对内毒素休克时肺循环和体循环血管或内毒素处理离体血管的张力和反应性变化具有明显的调节作用, 可改善 NO 介导的血管内皮依赖性舒张反应降低<sup>[4]</sup>, 抑制 LPS 诱导的肺动脉内皮细胞凋亡, 减少 NO 衍生的强效氧化剂和硝基化因子过氧亚硝基阴离子的生成<sup>[5]</sup>, 提示 CCK-8 的作用可能与其改变血管内皮细胞的 NO 生成、释放或生物学效应有关。迄今为止, CCK-8 对血管内皮细胞 NO 生成变化及 NOS 的影响尚未见报道。本实验中在细胞水平观察 CCK-8 对 LPS 诱导人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 细胞 iNOS 变化的调节作用, 探讨 CCK-8 缓解内毒素休克血管动力学紊乱、减轻血管内皮依赖性舒张反应降低的分子机制。

## 1 材料与方法

**1.1 药品及试剂:** CCK-8 和 LPS 为 Sigma 产品; 细胞培养液 RPMI-1640 为 GIBCO-BRL 产品; NO 和 NOS 试剂盒为南京建成生物公司产品; 兔抗人 iNOS 多克隆抗体(一抗)为美国 Santa Cruz 公司生产; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(二抗)为美国 Vector 公司生产; 免疫组化试剂盒和 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均为北京中山生物公司生产; 其他试剂均为国产分析纯。

**1.2 细胞培养及预处理:** 人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 细胞购自武汉大学动植物特殊菌种保藏中心。细胞复苏之后, 用 RPMI-1640 完全培养液(含体积分数为 10% 的胎牛血清、100 kU/L 青霉素、100 kU/L 链霉素)将细胞数调为  $1 \times 10^5$ /L, 接种于 25 ml 培养瓶中, 在 37 C、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 和 95% 的 O<sub>2</sub> 条件下培养, 3 d 传代 1 次。

细胞传代后 36~48 h, 当细胞长至培养瓶的 80%~90% 时开始给予刺激因素。细胞分为 4 组: ①溶剂对照组(对照组): 培养液中加入生理盐水; ②LPS 组: 培养液中加入终浓度分别为 0.01、0.1 和 1 mg/L 的 LPS; ③CCK-8 组: 培养液中加入终浓度为  $10^{-7}$  mol/L 的 CCK-8; ④LPS+CCK-8 组: 在培养液中同时加入终浓度分别为  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  和  $10^{-8}$  mol/L 的 CCK-8 和 0.1 mg/L 的 LPS。LPS 组动态观察 2~24 h, 其余各组观察 16 h, 每个时间点 4 个复孔。

**1.3 细胞培养上清的收集及细胞匀浆制备:** 将细胞培养液以  $850 \times g$  离心 3 min, 收集上清于试管中, 置于 -70 C 超低温冰箱中冻存备用; 收集细胞, 以细胞裂解液[0.1 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.4,

0.1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT), 0.1 mmol/L 乙二醇四乙酸酯(EGTA), 1  $\mu$ mol/L 抑胃肽 A, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), 2  $\mu$ mol/L 亮抑胃蛋白酶肽]裂解细胞, 冰浴中超声破碎细胞, 于 4 C、 $20\,000 \times g$  离心 60 min, 上清为细胞匀浆, 细胞匀浆蛋白含量用考马斯亮蓝法检测。

## 1.4 观察指标

**1.4.1 细胞 NOS 活性及上清 NO 含量检测:** 采用试剂盒检测, 操作按说明书进行。NOS 活性以每克蛋白中 NOS 活性(kU/g)表示, NO 含量以 NO 的代谢产物 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 表示。

**1.4.2 免疫细胞化学检测 iNOS 蛋白表达:** 按照免疫组化试剂盒说明书操作。ECV-304 细胞于盖玻片上贴壁生长, 加入前述药物处理细胞。用体积分数为 95% 的乙醇固定 30 min, 体积分数为 3% 的过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)室温孵育细胞爬片 10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性。蒸馏水冲洗, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)洗 5 min。正常血清工作液孵育细胞爬片 15 min, 以减少非特异性染色, 然后倾去液体、勿洗。滴加用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4) 1:100 稀释的一抗, 4 C 过夜。0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗 3 次, 每次 3 min。滴加生物素标记的二抗, 37 C 孵育 15 min, 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗 3 次, 每次 3 min。滴加 HRP 标记的链霉卵白素工作液, 37 C 孵育 15 min。0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗 3 次, 每次 3 min。DAB 显色 5 min, 达到要求颜色深度时, 以蒸馏水/自来水终止显色, 中性树胶封片。阴性对照用 PBS 代替一抗, 其余步骤同上。iNOS 免疫细胞化学阳性染色呈棕黄色或黄色。

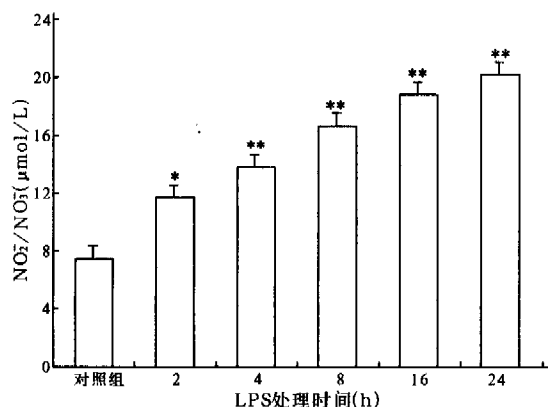
**1.4.3 蛋白质免疫印迹法检测 iNOS 蛋白表达:** 参照文献[6]方法。细胞匀浆蛋白 100  $\mu$ g 与等体积上样缓冲液混匀, 沸水加热 5~10 min 使蛋白变性, 冷却后用微量加样器上样于凝胶加样孔底部。凝胶所加电压为 8 V/cm, 当染料前沿进入分离胶后, 电压提高到 15 V/cm, 继续电泳直至溴酚蓝到达分离胶底部(约需 4 h)。凝胶切角以标注凝胶的方位, 置于转移缓冲液平衡。用去离子水和转移缓冲液浸泡硝酸纤维素膜和滤纸。在转移盘上逐层放置 3 张滤纸、硝酸纤维素膜、凝胶和 3 张滤纸, 确保各层对齐并不留气泡, 将其放入转移盘中, 凝胶侧为负极, 膜侧为正极, 电转移 1.5~2.0 h。凝胶染色以检查蛋白转移效果。滤膜用丽春红 S 染色 5~10 min, 显现蛋白带, 切去蛋白 Marker 区带以及包含目的蛋白的滤

膜,于室温用去离子水漂洗硝酸纤维素滤膜,其间换水数次,置于含有质量分数为 5% 的脱脂奶粉封闭液中,平缓摇动 1~2 h,0.05 mol/L PBS(pH 7.6)漂洗,1:100 稀释的一抗加于滤膜蛋白面上,4℃封闭孵育过夜。一抗孵育完毕后,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)漂洗滤膜 3 次,每次 3 min,其间置于摇床上平缓摇动。将滤膜转移至另一个封接杂交袋中,加入 1:1 000 稀释的二抗,封闭后将滤膜平放在摇床上平缓摇动,37℃孵育 1 h。二抗孵育完毕后,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)漂洗滤膜 4 次,前 3 次每次用时 10 min,最后一次用时 5 min,其间置于摇床上平缓摇动。将漂洗完毕的滤膜置于 DAB 工作液中浸泡显色 5~10 min,当蛋白带的颜色深度达到要求时,以蒸馏水漂洗,终止反应。用数码照相机拍摄滤膜照片,记录实验结果。

**1.5 统计学分析:**数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 11.5 软件进行方差分析和两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

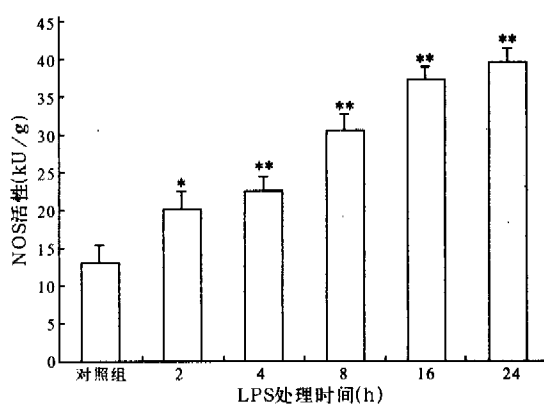
**2 结果**

**2.1 LPS 对 ECV-304 细胞 NO 含量、NOS 活性及 iNOS 蛋白表达的影响(图 1~5,彩色插页图 6):**1 mg/L LPS 处理细胞 2、4、8、16 和 24 h,细胞培养液上清中 NO 含量明显升高,NOS 活性亦明显增强;0.01~1 mg/L LPS 处理 ECV-304 细胞 16 h,细胞培养液上清中 NO 含量明显升高,NOS 活性亦明显增强,各浓度 LPS 处理 ECV-304 细胞的 NO 含量和 NOS 活性与对照组比较差异均有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。对照组 iNOS 蛋白几乎没有表达或表达量极少;0.1 mg/L LPS 处理细胞 16 h,iNOS 表达明显上调,主要分布于细胞浆。



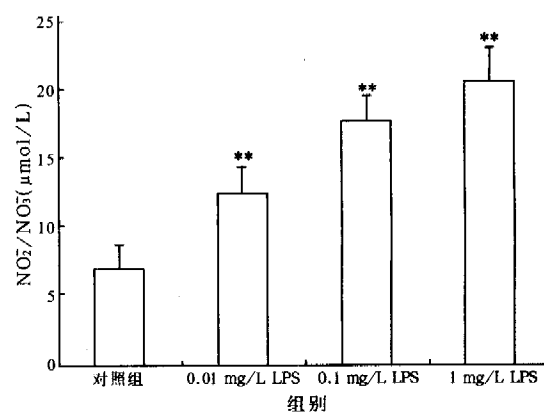
注:与对照组比较:\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

**图 1 1 mg/L LPS 处理 ECV-304 细胞不同时间 NO 含量的变化**  
Figure 1 Changes of NO content in ECV-304 exposed to 1 mg/L LPS for different time



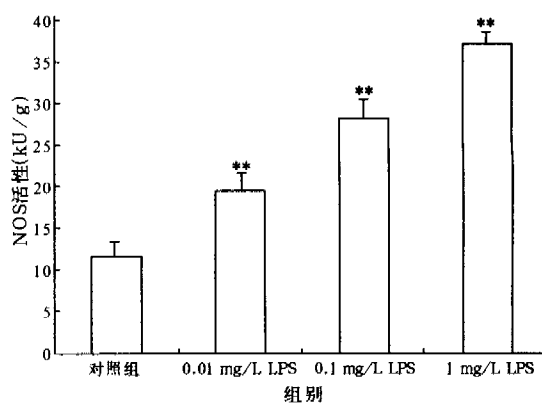
注:与对照组比较:\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

**图 2 1 mg/L LPS 处理 ECV-304 细胞不同时间 NOS 活性变化**  
Figure 2 Changes of NOS content in ECV-304 exposed to 1 mg/L LPS for different time



注:与对照组比较:\*\* $P < 0.01$

**图 3 不同剂量 LPS 处理 ECV-304 细胞 16 h 对 NO 含量的影响**  
Figure 3 Effects of different dose of LPS incubation for 16 hours on NO content different time

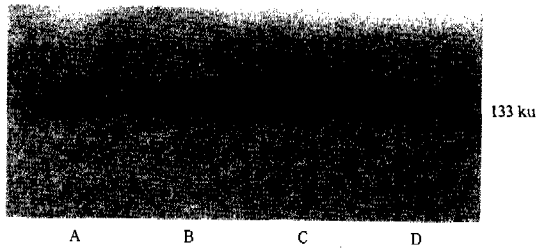


注:与对照组比较:\*\* $P < 0.01$

**图 4 不同剂量 LPS 处理 ECV-304 细胞 16 h 对 NOS 活性的影响**  
Figure 4 Effects of different dose of LPS incubation for 16 hours on NOS content different time

**2.2 CCK-8 对 ECV-304 细胞 NO 含量、NOS 活性及 iNOS 蛋白表达的影响(图 5,彩色插页图 6,图 7,图 8):** $10^{-7}$  mol/L CCK-8 处理细胞 16 h,NO 含量、NOS 活性无明显变化,与对照组比较差异均

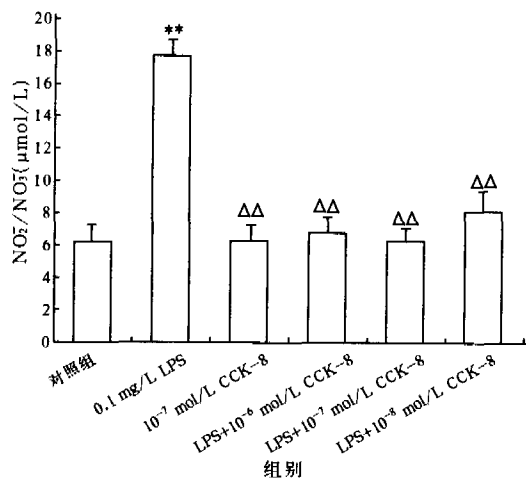
无显著性( $P$ 均 $>0.05$ )。与对照组比较, $10^{-7}$  mol/L CCK-8 处理细胞 16 h iNOS 蛋白表达略微上调,细胞定位没有变化。



A, 对照组; B, CCK-8 组; C, LPS 组; D, LPS+CCK-8 组

图 5 蛋白质免疫印迹法检测各组 16 h 时 ECV-304 细胞 iNOS 蛋白表达

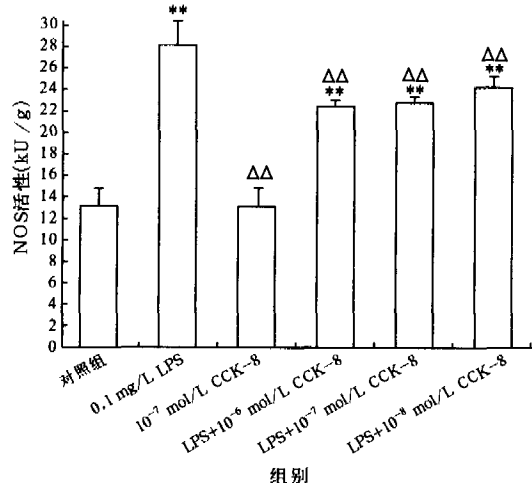
Figure 5 Expression by western blotting of iNOS protein in each group at 16 hours in ECV-304



注:与对照组比较,\* $P<0.01$ ;与 LPS 组比较,△△ $P<0.01$

图 7 不同剂量 CCK-8 对 LPS 处理 ECV-304 细胞 NO 含量的影响

Figure 7 Effects of different dose of CCK-8 incubation for 16 hours on NO content in ECV-304 exposed to LPS



注:与对照组比较,\* $P<0.01$ ;与 LPS 组比较,△△ $P<0.01$

图 8 不同剂量 CCK-8 对 LPS 处理 ECV-304 细胞 NOS 活性的影响

Figure 8 Effects of different dose of CCK-8 incubation for 16 hours on NOS content in ECV-304 exposed to LPS

2.3 CCK-8 和 LPS 对 ECV-304 细胞 NO 含量、NOS 活性及 iNOS 蛋白表达的影响(图 5,彩色插图 6,图 7,图 8); $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  和  $10^{-8}$  mol/L CCK-8 与 0.1 mg/L LPS 共同处理细胞 16 h,NO 含量降低,与 0.1 mg/L LPS 处理时比较差异均有显著性( $P$ 均 $<0.01$ ),而与对照组比较差异则均无显著性( $P$ 均 $>0.05$ );NOS 活性与 0.1 mg/L LPS 处理时比较均明显降低( $P$ 均 $<0.01$ ),与对照组比较均明显增高( $P$ 均 $<0.01$ );iNOS 蛋白表达比 LPS 组明显降低,但高于对照组。

### 3 讨论

本实验中以人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 细胞为靶细胞,首次在培养的血管内皮细胞中观察了 CCK-8 对 LPS 诱导 ECV-304 细胞 iNOS 表达、NOS 活性及 NO 生成变化的影响。结果 1 mg/L LPS 作用 2~24 h,内皮细胞 NO 生成量明显增多,总 NOS 活性明显增强,均呈现时间依赖性。在作用 16 h 时间点,当 LPS 浓度逐渐增加时,ECV-304 细胞 NO 生成量显著增加、NOS 活性明显增强,具有浓度依赖性效应。同时,血管内皮细胞 iNOS 蛋白表达明显上调,表明 iNOS 大量诱导是本阶段 NO 生成增多的主要因素。

单纯加入 CCK-8 作用于静息 ECV-304 细胞时,NO 生成量和 NOS 活性与对照组比较无明显变化,说明 CCK-8 本身对静息状态下的 ECV-304 细胞 NO 生成可能没有明显影响。CCK-8 与 LPS 同时作用于 ECV-304 细胞 16 h 后,血管内皮细胞 NO 生成量与单纯 LPS 作用时比较明显减少,与对照组比较没有明显变化;而 NOS 活性明显降低,与对照组比较却明显增加;同时,iNOS 蛋白表达明显减少。结果提示,CCK-8 可抑制 LPS 长时间刺激血管内皮细胞诱导的 iNOS 蛋白表达上调,这可能是 NOS 活性降低、NO 生成减少的重要原因。研究证实,在 iNOS 基因上游的调控区有核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 结合域<sup>[7]</sup>,LPS 通过诱导 NF- $\kappa$ B 活化、向核内移位,引起 iNOS 基因表达上调<sup>[8]</sup>。NF- $\kappa$ B 为有多向性转录调节的蛋白因子,能与多种炎症介质基因启动子部位  $\kappa$ B 位点发生特异性结合,并增强基因转录<sup>[9,10]</sup>。我们以往的研究发现,CCK-8 可抑制 LPS 诱导 ECV-304 细胞 NF- $\kappa$ B 表达上调,抑制内毒素血症肺组织 NF- $\kappa$ B 活化与向核内移位<sup>[11]</sup>,这可能是 CCK-8 抑制 LPS 诱导 ECV-304 细胞 iNOS 蛋白表达上调及 NO 生成增多的重要分子机制。应当注意,CCK-8 对 LPS 诱导血管内皮细

胞 NOS 活性增强呈部分抑制作用,而且抑制程度不如对 NO 生成的抑制效应明显,提示 CCK-8 对 LPS 诱导血管内皮细胞 NO 生成的调节作用可能还有其他途径,如 CCK-8 可能对细胞精氨酸酶和超氧化物歧化酶(SOD)活性有调节作用,可以改善 NOS 底物代谢或者 NO 的生物学效应。以往研究发现,CCK-8 降低内毒素休克血管壁 NOS 活性、减少 NO 生成量,这与本研究中 CCK-8 抑制 LPS 诱导血管内皮细胞 iNOS 蛋白表达上调一致。

综上所述,CCK-8 可明显抑制 LPS 引起血管内皮细胞 iNOS 蛋白表达上调、减少 NO 生成,这可能是 CCK-8 减少 NO 衍生强效氧化剂和硝基化因子如过氧亚硝基阴离子的生成<sup>[4]</sup>,发挥 CCK-8 保护作用、抑制血管内皮细胞凋亡的机制之一。

#### 参考文献:

- 1 蒋志彬,刘励军,王英,等.一氧化氮吸入对感染性休克并发急性呼吸窘迫综合征患者氧合功能的作用及血流动力学的安全性研究[J].中国危重病急救医学,2000,12:549-551.
- 2 Szabo C, Cuzzocrea S, Zingarelli B, et al. Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock; importance of the activation of poly (ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite [J]. J Clin Invest, 1997, 100: 723-735.

- 3 Cobb J P, Danner R L. Nitric oxide and septic shock [J]. JAMA, 1996, 275: 1192-1196.
- 4 谷振勇,凌亦凌,丛斌,等.八肽胆囊收缩素对脂多糖诱导离体肺动脉反应性变化的影响[J].中国病理生理杂志,1999,15:484-487.
- 5 谷振勇,凌亦凌,王杏云,等.八肽胆囊收缩素对脂多糖诱导肺动脉内皮细胞凋亡的抑制作用[J].中国危重病急救医学,2001,13:724-727.
- 6 颜子颖,王海林,译.金冬雁,校.精编分子生物学[M].北京:科学出版社,1999:366-372.
- 7 Wong H R, Ryan M, Mestri R. The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I- $\kappa$ B degradation and NF- $\kappa$ B nuclear translocation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 231: 257.
- 8 Blackwell T S, Christman J W. The role of nuclear factor- $\kappa$ B in cytokine gene regulation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17: 3-9.
- 9 郭振辉,洪新,毛宝龄,等.核因子- $\kappa$ B 活化在脓毒症急性肺损伤发病中的作用[J].中国危重病急救医学,2000,12:334-337.
- 10 刘振桐.核因子- $\kappa$ B 与全身炎症反应综合征[J].中国危重病急救医学,2000,12:631-632.
- 11 丛斌,凌亦凌,谷振勇,等.八肽胆囊收缩素对内毒素诱导大鼠肺组织 NF- $\kappa$ B 活性增高的抑制作用[J].中国病理生理杂志,2002,18:615-618.

(收稿日期:2005-10-28 修回日期:2006-01-15)

(本文编辑:郭方)

## • 病例报告 •

# 血液灌流串联血液透析救治 1 例中草药中毒致严重肝肾功能衰竭

江琼桂 梁细妹 周梅芳 张月玲

**【关键词】** 血液灌流; 血液透析; 中毒; 肝功能衰竭; 肾功能衰竭

血液灌流(HP)与血液透析(HD)串联是通过吸附和透析的原理,直接从血液中清除药物或毒性,操作简便,疗效明显。我科 2005 年 5 月用 HP 串联 HD 治疗 1 例中草药中毒致严重肝、肾功能衰竭患者,报告如下。

### 1 临床资料

**1.1 病历简介:**患者男性,52 岁。因自服中草药后出现腹痛、腹胀,伴恶心、呕吐、少尿,并逐渐出现黄疸、凝血功能障碍以及肝、肾功能衰竭而入院。肾功能:尿素氮(BUN)23.4 mmol/L、肌酐(Cr)1120  $\mu$ mol/L;肝功能:丙氨酸转氨酶(ALT)401 U/L、天冬氨酸转氨酶(AST)125 U/L;凝血功能:凝血酶原时

作者单位:529030 广东省江门市中心医院

作者简介:江琼桂(1969-),女(汉族),广东台山人,主管护师。

间(PT)18.4 s,活化部分凝血活酶时间(APTT)44.5 s,胆红素 375  $\mu$ mol/L。入院后予 HP 串联 HD,每次灌流 2.5 h;HD 4 h,隔日 1 次;配合对症支持治疗。共治疗 5 次,患者临床症状有明显改善,尿量增加,各项检测指标均明显降低,住院 18 d 出院。

**1.2 操作方法:**用费森尤斯 4008S 透析机、HA330-1 型树脂灌流器、低通量聚砜膜透析器(Lops 1.5),Arrow(USA)16 cm 锁骨下双腔静脉导管建立临时动静脉通路,实施 HP 串联 HD。

### 2 体会

**2.1 治疗前准备:**按操作规程准备灌流器和透析器。上机前及治疗过程中必须严密监测生命体征变化,同时准备好急救物品及药品。本病例用低分子肝素作为抗凝剂,首剂 0.4 ml,考虑患者有凝血功能障碍,没有使用追加量;治疗结束时

按医嘱予以鱼精蛋白 30 mg 中和肝素。

**2.2 注意事项:**严格无菌操作,双腔导管处每日换药,防止因感染、发热而加重病情。严密监测生命体征变化,预见是否有危险发生,及时采取相应措施进行预防和救治。为防止患者因血容量急剧减少而引起的低血压,最好在上机时给予预冲量,或引血时予质量分数为 25% 的葡萄糖 250 ml 从动脉端小枕处输入,补充血容量。因该患者凝血功能障碍,所以在治疗过程中肝素没有使用追加量,但应注意观察透析器及灌流器的血液颜色有否加深,体外循环导管阻力是否增大。跨膜压与静脉压增大较快均提示有凝血发生,应及时输入生理盐水或使用追加量肝素,以确保治疗顺利完成。注意回血的技巧,并处理好双腔导管封管。

(收稿日期:2005-11-20)

(本文编辑:李银平)

## 脓毒症早期大鼠肾脏细胞凋亡及炎症细胞因子的变化

(正文见89页)

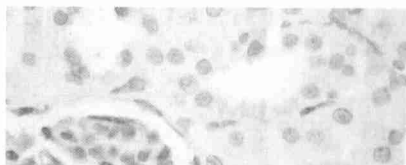


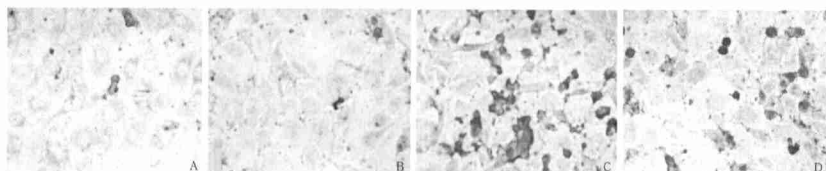
图3 致伤组伤后3 h凋亡细胞 (TUNEL, ×400)  
Figure 3 Apoptotic cell in injury group  
3 hours after injury (TUNEL, ×400)



图4 致伤组伤后48 h肾组织病理学变化 (HE, ×100)  
Figure 4 Pathological change of renal tissue in injury group  
48 hours after injury (HE, ×100)

## 八肽缩胆囊素对脂多糖诱导血管内皮细胞诱生型一氧化氮合酶表达变化的抑制作用

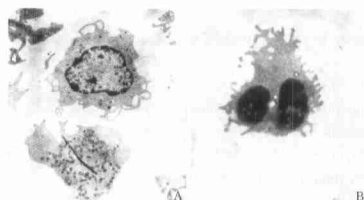
(正文见96页)



A: 对照组, B: CCK-8组, C: LPS组, D: LPS+CCK-8组  
图6 免疫细胞化学法检测iNOS蛋白表达 (DAB, ×200)  
Figure 6 Expression of iNOS detected by immunocytochemistry (DAB, ×200)

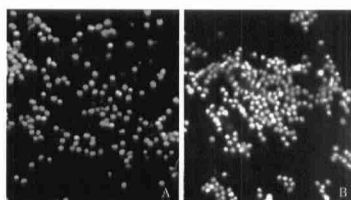
## 多器官功能障碍综合征患者外周血单个核细胞凋亡的研究

(正文见101页)



A: 正常PBMCs(×4000), B: 凋亡PBMCs(×1000)

图1 电镜下PBMCs (醋酸铀-枸橼酸铅)  
Figure 1 PBMCs under electron microscope  
(uranylacetate and lead citrate double staining)



A: 正常PBMCs, B: 凋亡PBMCs

图2 荧光显微镜下PBMCs (AO-EB, ×400)  
Figure 2 PBMCs under fluorescence microscope  
(AO-EB, ×400)

## 己酮可可碱对内毒素诱导大鼠心肌细胞细胞间黏附分子-1表达的影响及其机制

(正文见109页)



图4 空白对照组NF-κB p65表达 (DAB, ×200)  
Figure 4 Expression of NF-κB p65 in myocytes in black control group (DAB, ×200)

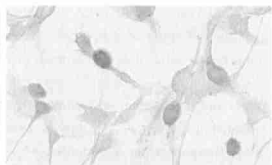


图5 100 μg/L LPS刺激1 h心肌细胞NF-κB p65表达 (DAB, ×200)  
Figure 5 Expression of NF-κB p65 in myocytes at 1 hour induced by 100 μg/L of LPS (DAB, ×200)



图6 100 μg/L LPS+PTX 200 mg/L共同作用1 h心肌细胞NF-κB p65表达 (DAB, ×200)  
Figure 6 Expression of NF-κB p65 in myocytes at 1 hour induced by 100 μg/L LPS+PTX 200 mg/L (DAB, ×200)