

· 基础研究 ·

# 急性肝损伤大鼠肝组织 Caspase-3 和 Caspase-8 的表达及其相关性研究\*

王树芳<sup>1</sup>, 李萌<sup>1</sup>, 徐海英<sup>2</sup>, 邢雪琨<sup>1</sup>, 黄青松<sup>3</sup>, 李永海<sup>1</sup>

(1. 新乡医学院生命科学技术系, 河南新乡 453003; 2. 黄河科技学院微生物教研室 450063; 3. 新乡医学院微生物教研室, 河南新乡 453003)

**摘要:**目的 观察银杏叶提取物(GBE)对硫代乙酰胺(TAA)所致肝损伤大鼠的肝脏保护作用及其对肝组织 Caspase-3、Caspase-8 表达的影响。方法 将 70 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组( $n=10$ )、模型组( $n=15$ )及 GBE 组( $n=45$ ), GBE 组再分为 GBE 低剂量组( $n=15$ )、GBE 中剂量组( $n=15$ )及 GBE 高剂量组( $n=15$ )。GBE 低、中、高剂量组大鼠分别灌服 GBE 50、100、200 mg/kg, 1 次/d, 连续 30 d; 正常对照组及模型组大鼠灌服生理盐水。模型组及 GBE 低、中、高剂量组大鼠于灌服第 28 天用 TAA(300 mg/kg)行腹腔注射, 隔天注射 1 次, 共 3 次; 正常对照组大鼠腹腔注射生理盐水。所有大鼠均于末次注射后 24、48、72 h 采血, 检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平。用逆转录 PCR 检测大鼠肝组织 Caspase-3、Caspase-8 mRNA 的表达情况, 并对 Caspase-3、Caspase-8 的活性进行检测。结果 与正常对照组比较, 模型组大鼠血清 ALT、AST 水平明显升高, 肝组织 Caspase-3、Caspase-8 mRNA 水平上调; 而与模型组比较, GBE 组大鼠血清 ALT、AST 水平明显降低, 肝组织 Caspase-3、Caspase-8 mRNA 水平下调。结论 GBE 可通过调节 Caspase-3、Caspase-8 的表达抑制急性肝功能衰竭患者的肝细胞凋亡, 从而对肝损伤发挥保护作用。

**关键词:** 肝功能衰竭, 急性; 银杏; 硫代乙酰胺; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.02.014

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)02-0163-04

## Expression of Caspase-3 and Caspase-8 in

### hepatic tissue of rats with acute hepatic injury and the correlation research\*

Wang Shufang<sup>1</sup>, Li Meng<sup>1</sup>, Xu Haiying<sup>2</sup>, Xing Xuekun<sup>1</sup>, Huang Qingsong<sup>3</sup>, Li Yonghai<sup>1</sup>

(1. Department of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang, He'nan 453003, China;

2. Department of Microbiology, Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou, He'nan 450063, China;

3. Department of Microbiology, Xinxiang Medical University, Xinxiang, He'nan 453003, China)

**Abstract: Objective** To observe the protective effect of ginkgo biloba extract(GBE) on thioacetamide(TAA)-induced hepatic injury in rats and its impact on the expression of Caspase-3 and Caspase-8 in hepatic tissue. **Methods** Seventy Wistar rats were randomly divided into normal control group( $n=10$ ), model group( $n=15$ ) and GBE group( $n=45$ ), and the GBE group was subdivided into GBE low-dose group( $n=15$ ), GBE medium-dose group( $n=15$ ) and GBE high-dose group( $n=15$ ). Rats in the GBE low-, medium- and high-dose group were fed with GBE 50, 100, 200 mg/kg, respectively, once a day for 30 consecutive days, while rats in the normal control group and model group were fed with physiological saline. On the 28<sup>th</sup> day of feeding, rats in model group and GBE low-, medium-, high-dose group were intraperitoneally injected with TAA(300 mg/kg) every other day with total of 3 times, while rats in normal control group with physiological saline. Blood collection was conducted in all rats at 24, 48 and 72 h after last injection, and levels of serum alanine aminotransferase(ALT) and aspartate aminotransferase(AST) were detected. Reverse transcriptase-PCR was utilized to assay the expression of Caspase-3, Caspase-8 mRNA in hepatic tissue of rats and activities of Caspase-3, Caspase-8 were measured. **Results** Compared to normal control group, levels of serum ALT, AST and Caspase-3, Caspase-8 mRNA expression in hepatic tissue of rats in model group were significantly increased, however, when compared to model group, those in GBE group were significantly decreased. **Conclusion** GBE can inhibit apoptosis of hepatocytes in patients with acute liver failure via regulation of Caspase-3, Caspase-8 expression and play a protective role in hepatic injury.

**Key words:** liver failure, acute; ginkgo biloba; thioacetamide; caspases; rats

急性肝功能衰竭可在急性或慢性肝病、肝肿瘤、外伤性肝脏手术后、中毒症及其他器官衰竭等疾病过程中发生<sup>[1]</sup>。起病急、进展快、并发症多、治疗难度大及病死率高是急性肝功能衰竭的主要特点, 肝移植是目前惟一有效的治疗手段, 但诸多因素制约了肝移植的广泛开展。因此, 如何保护肝脏功能、预防

和治疗急性肝功能衰竭成为各国学者所关注的热点之一。急性肝损伤动物模型的建立是研究急性肝功能衰竭发病及预防的前提条件。肝损伤的发生及其预防可能与细胞凋亡有关, 其中, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteinyI aspartate specific protease, Caspase)-8 被称为凋亡途径中的起始 Caspase<sup>[2-3]</sup>, 它可直

接激活下游效应 Caspases, 如 Caspase-3、Caspase-6 及 Caspase-7<sup>[4]</sup>。Caspase-8 还可通过激活线粒体而促细胞色素 C 的释放, 进而募集和激活 Caspase-9, 活化的 Caspase-9 又激活其他凋亡执行分子, 最终导致细胞凋亡<sup>[5]</sup>。本研究旨在通过建立大鼠急性肝功能衰竭模型, 以银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GBE)对急性肝功能衰竭大鼠进行干预, 检测大鼠肝组织 Caspase-3 和 Caspase-8 在 mRNA 水平的表达情况以及肝脏中酶的活性变化, 以探讨 GBE 的疗效及其作用机制。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 70 只, 体质量 220~250 g, 由新乡医学院实验动物中心提供。硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)购于国药集团化学试剂沈阳有限公司; GBE(含黄酮苷 24.37%、银杏内酯 6.12%)购自陕西中鑫生物技术有限公司; Trizol 试剂盒、莫洛尼鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus, M-MLV)逆转录酶试剂盒及 PCR 所用试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司; 丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)检测试剂盒购自南京建成科技有限公司; Caspase-3 和 Caspase-8 活性检测试剂盒购自碧云天生物科技有限公司。Caspase-3、Caspase-8 及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

**1.2 动物分组及处理** 将 Wistar 大鼠饲养 1 周后, 随机分为正常对照组( $n=10$ )、模型组( $n=15$ )及 GBE 组( $n=45$ ), GBE 组再分为 GBE 低剂量组( $n=15$ )、GBE 中剂量组( $n=15$ )及 GBE 高剂量组( $n=15$ )。GBE 低、中、高剂量组大鼠分别灌服 GBE 50、100、200 mg/kg, 1 次/d, 连续 30 d; 正常对照组及模型组大鼠灌服等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续 30 d。模型组及 GBE 低、中、高剂量组大鼠于灌服第 28 天用 TAA(300 mg/kg)行腹腔注射, 隔天注射 1 次, 共 3 次; 正常对照组大鼠腹腔注射等体积的生理盐水。5 组大鼠均于末次注射 24、48、72 h 后行腹主动脉采血, 处死大鼠, 并立即取其肝组织待检。

**1.3 大鼠血清 ALT、AST 的检测** 大鼠腹主动脉采血, 待血液充分凝固后, 室温离心 10 min(离心半径 8 cm, 2 500 r/min), 将血清转移至新 EP(eppendorf)管内备用。检测 ALT 和 AST 活性, 严格按试剂盒说明书进行操作。

**1.4 大鼠肝组织 Caspase-3 和 Caspase-8 mRNA 的检测** 采用 Trizol 法提取大鼠肝组织总 RNA, 方法按说明书操作, 用紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 按逆转录试剂盒说明合成 cDNA。采用逆转录 PCR(reverse transcriptase-PCR, RT-PCR)技术分析各组大鼠肝组织 Caspase-3 和 Caspase-8 在 mRNA 水平的表达情况, GAPDH mRNA 作为内参。

Caspase-3 上游引物序列: 5'-TGG CCC TGA AAT ACG AAG TC-3', 下游引物序列: 5'-ACC CGT CCC TTG AAT TTC TC-3', 扩增产物长度为 402 bp; Caspase-8 上游引物序列: 5'-GGA AGG ATC GAC GAT TAC GA-3', 下游引物序列: 5'-TGC AGC AGA TGA AGC AGT CT-3', 扩增产物长度为 430 bp; GAPDH 上游引物序列: 5'-ATG GGA AGC TGG TCA TCA AC-3', 下游引物序列: 5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT-3', 扩增产物长度为 440 bp。上述引物扩增条件均为: 94 °C 预变性 5 min 后, 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统自动扫描。将 Caspase-3、Caspase-8 mRNA 吸光度(absorbance, A)值分别与 GAPDH mRNA 的 A 值相比, 其比值作为 Caspase-3 和 Caspase-8 mRNA 的相对表达水平。

**1.5 大鼠肝组织 Caspase-3 和 Caspase-8 活性的检测** 取大鼠肝脏组织 10 mg, 加入 100  $\mu$ L 裂解液匀浆, 低温离心, 收集上清液, 根据试剂盒提供的标准品测定标准曲线; 取部分样品采用酶标仪检测 405 nm 处的 A 值( $A_{405}$ )。另取部分样品用 Bradford 法测定大鼠肝组织总蛋白质浓度, 最后根据标准曲线以及样品、空白对照组的  $A_{405}$ , 计算 Caspase-3 和 Caspase-8 活性。

**1.6 统计学处理** 应用 SPSS16.0 软件进行统计学分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠血清 AST、ALT 水平的变化** 与正常对照组比较, 模型组大鼠血清 ALT、AST 明显升高( $P < 0.01$ ), 且 ALT、AST 均在肝功能衰竭 48 h 后达峰值, 而后下降; 与模型组比较, GBE 低剂量组大鼠血清 AST、ALT 降低( $P < 0.05$ ), GBE 中、高剂量组大鼠血清 AST、ALT 水平均明显降低( $P < 0.01$ ), 见表 1、2。

**2.2 大鼠肝组织 Caspase-3、Caspase-8 mRNA 的表达水平** 与正常对照组比较, 模型组各时间点大鼠肝组织 Caspase-3、Caspase-8 mRNA 水平均明显升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, GBE 中剂量组大鼠肝组织 Caspase-3、Caspase-8 mRNA 水平明显降低( $P < 0.05$ ), GBE 高剂量组大鼠肝组织 Caspase-3、Caspase-8 mRNA 水平也显著降低( $P < 0.05$ ), 见表 3、4。

**2.3 Caspase-3 和 Caspase-8 活性的检测** 与正常对照组比较, 模型组大鼠肝组织 Caspase-3、Caspase-8 活性明显升高( $P < 0.05$ ), 在 24、48、72 h 时间点检测, Caspase-3、Caspase-8 活性有递减趋势; 与模型组比较, GBE 中、高剂量组大鼠肝组织 Caspase-3、Caspase-8 活性明显降低, 结果以 nmol/g 表示, 见表 5、6。

表 1 GBE 对急性肝损伤大鼠血清 ALT 的影响( $\bar{x} \pm s$ , U/L)

组别	n	24 h	48 h	72 h
正常对照组	10	46.38 $\pm$ 12.05	45.66 $\pm$ 10.33	48.23 $\pm$ 11.78
模型组	15	812.45 $\pm$ 165.67*	1 132.48 $\pm$ 170.53*	953.06 $\pm$ 160.99*
GBE 组				
低剂量	15	789.02 $\pm$ 167.35#	1 043.24 $\pm$ 159.86#	820.67 $\pm$ 154.76#
中剂量	15	602.86 $\pm$ 98.75 $\Delta$	738.79 $\pm$ 126.35 $\Delta$	637.63 $\pm$ 76.88 $\Delta$
高剂量	15	368.86 $\pm$ 45.39 $\Delta$	515.35 $\pm$ 66.73 $\Delta$	380.12 $\pm$ 58.16 $\Delta$

\*:  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; #:  $P < 0.05$ ,  $\Delta$ :  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

表 2 GBE 对急性肝损伤大鼠血清 AST 的影响( $\bar{x}\pm s$ , U/L)

组别	n	24 h	48 h	72 h
正常对照组	10	143.15±25.86	141.38±26.66	143.08±28.31
模型组	15	1 652.18±365.33*	1 998.42±384.56*	1 865.00±346.85*
GBE 组				
低剂量	15	1 560.01±263.54#	1 820.56±309.81#	1 600.48±285.06#
中剂量	15	1 203.84±79.51 $\Delta$	1 487.29±168.23 $\Delta$	1 283.57±129.36 $\Delta$
高剂量	15	723.65±70.31 $\Delta$	1 008.51±86.49 $\Delta$	718.82±57.81 $\Delta$

\*:  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; #:  $P < 0.05$ ,  $\Delta$ :  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

表 3 大鼠肝组织 Caspase-3 mRNA 的表达( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	24 h	48 h	72 h
正常对照组	10	0.35±0.07	0.36±0.09	0.37±0.03
模型组	15	0.89±0.12*	0.75±0.07*	0.52±0.08**
GBE 组				
低剂量	15	0.90±0.13	0.74±0.08	0.49±0.07
中剂量	15	0.76±0.08#	0.59±0.03#	0.42±0.05
高剂量	15	0.58±0.03 $\Delta$	0.46±0.05 $\Delta$	0.32±0.05 $\Delta$

\*:  $P < 0.01$ , \*\*:  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较; #:  $P < 0.05$ ,  $\Delta$ :  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

表 4 大鼠肝组织 Caspase-8 mRNA 的表达( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	24 h	48 h	72 h
正常对照组	10	0.30±0.01	0.34±0.01	0.31±0.03
模型组	15	0.93±0.14*	0.74±0.09*	0.48±0.04**
GBE 组				
低剂量	15	0.94±0.09	0.72±0.06	0.44±0.01
中剂量	15	0.73±0.05 $\Delta$	0.55±0.02 $\Delta$	0.36±0.01#
高剂量	15	0.61±0.07 $\Delta$	0.45±0.04 $\Delta$	0.32±0.02 $\Delta$

\*:  $P < 0.01$ , \*\*:  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较; #:  $P < 0.05$ ,  $\Delta$ :  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

表 5 大鼠肝组织 Caspase-3 活性变化(nmol/g)

组别	n	24 h	48 h	72 h
正常对照组	10	2.15±0.67	2.36±0.64	2.28±0.97
模型组	15	9.98±2.16*	9.64±1.87*	7.48±1.49*
GBE 组				
低剂量	15	9.82±1.58	8.93±1.06	7.03±1.25
中剂量	15	8.83±1.06#	6.67±1.12 $\Delta$	4.85±1.02 $\Delta$
高剂量	15	6.61±1.94 $\Delta$	5.12±1.44 $\Delta$	3.47±1.16 $\Delta$

\*:  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; #:  $P < 0.05$ ,  $\Delta$ :  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

表 6 各组大鼠肝组织 Caspase-8 活性变化(nmol/g)

组别	n	24 h	48 h	72 h
正常对照组	10	2.38±0.26	2.63±0.15	2.37±0.38
模型组	15	10.83±3.31*	8.62±1.93*	5.07±0.93*

续表 6 各组大鼠肝组织 Caspase-8 活性变化(nmol/g)

组别	n	24 h	48 h	72 h
GBE 组				
低剂量	15	9.91±3.54	8.63±1.46	4.87±1.16
中剂量	15	7.78±2.13 $\Delta$	5.76±1.48 $\Delta$	3.82±1.06#
高剂量	15	5.45±2.25 $\Delta$	4.23±1.65 $\Delta$	3.05±0.81 $\Delta$

\*:  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; #:  $P < 0.05$ ,  $\Delta$ :  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

### 3 讨 论

急性肝损伤能引发大规模肝细胞死亡和严重功能障碍, 最终导致肝性脑病和多器官衰竭的发生, 当患者病情进展而不能进行肝移植治疗时, 则后果严重。目前认为, 肝细胞以坏死和凋亡的形式死亡, 这将引起炎症反应和肝功能低下, 使肝脏清除毒性物质的能力明显降低。阻止或延缓患者肝功能衰竭进程能有效降低急性肝功能衰竭所致的病死率<sup>[6]</sup>。

Caspase-8 被称为凋亡途径中的起始 Caspase, 自杀相关因子(factor associated suicide, Fas)的死亡结构域相关蛋白(fas-associated protein with death domain, FADD)的死亡效应结构域(death effector domain, DED)与 Caspase-8 前体的 DED 结合, 募集 Caspase-8 前体到 Fas 信号复合体, 切割并激活 Caspase-8, 活化的 Caspase-8 直接激活下游效应 Caspases<sup>[7-8]</sup>, 如 Caspase-3、Caspase-6 和 Caspase-7<sup>[9]</sup>。另外, Caspase-8 还可激活线粒体, 导致细胞色素 C 释放。在 ATP 存在的情况下, 细胞色素 C 可与凋亡蛋白酶活化因子-1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)结合, 进而募集和激活 Caspase-9, Caspase-9 又激活凋亡执行分子 Caspase-3、Caspase-7<sup>[10-11]</sup>, 活化的 Caspase-3 是激活 Caspase-2、Caspase-6、Caspase-8 及 Caspase-10 所必须的, 它们将进一步激活下游分子, 从而导致细胞死亡<sup>[12-15]</sup>。

本实验中, 模型组大鼠肝组织 Caspase-3、Caspase-8 在 mRNA 水平均表达上调, 其酶活性均升高, 说明肝损伤后凋亡分子 Caspase-3 和 Caspase-8 被激活, TAA 可导致肝细胞凋亡, 但 Caspase-8 是以何种途径激活 Caspase-3, 还有待进一步研究。与模型组比较, GBE 组大鼠肝组织 Caspase-3 和 Caspase-8 在 mRNA 水平有下调趋势, 酶活性也下降, 且随着 GBE 剂量的增加, 下调趋势更明显, 这可能是 GBE 通过一定途径在 mRNA 水平对 Caspase-8 发挥负调控作用, 进而影响凋亡分子 Caspase-3 的表达和活性, 从而达到预防和缓解肝损伤的效果。

综上所述, Caspase-3 和 Caspase-8 参与了肝功能衰竭过程中的肝细胞凋亡, GBE 可抑制早期肝功能衰竭大鼠的肝细胞

凋亡,但具体通过何种途径调节 Caspase-3、Caspase-8 的表达,还需进一步研究。总之,GBE 对肝脏具有保护作用,为临床治疗提供了一个药物筛选方向,也为临床肝脏疾病的预防与治疗提供了理论基础。

#### 参考文献:

- [1] Xu JK, Li YM, Ye PJ. The effects of ischemia-reperfusion injury and hepatic artery ischemia on CD14 expression in canine auto-transplantation livers[J]. 南京医科大学学报:英文版,2008,22(3):164-167.
- [2] Oberst A, Pop C, Tremblay AG, et al. Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in caspase-8 activation[J]. J Biol Chem, 2010, 285(22):16632-16642.
- [3] Sun SY. Understanding the role of the death receptor 5/FADD/caspase-8 death signaling in cancer metastasis[J]. Mol Cell Pharmacol, 2011, 3(1):31-34.
- [4] Wu Y, Wang D, Wang X, et al. Caspase 3 is activated through caspase 8 instead of caspase 9 during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in HeLa cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2011, 27(5):539-546.
- [5] Kuida K. Caspase-9[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2000, 32(2):121-124.
- [6] Cauli O, Rodrigo R, Boix J, et al. Acute liver failure-induced death of rats is delayed or prevented by blocking NMDA receptors in brain[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 295(3):503-511.
- [7] von Haefen C, Wendt J, Semini G, et al. Synthetic glycosidated phospholipids induce apoptosis through activation of FADD, caspase-8 and the mitochondrial death pathway[J]. Apoptosis, 2011, 16(6):636-651.
- [8] Wang L, Yang JK, Kabaleeswaran V, et al. The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations[J]. Nat Struct Mol Biol, 2010, 17(11):1324-1329.
- [9] Welz PS, Wullaert A, Vlantis K, et al. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation[J]. Nature, 2011, 477(7364):330-334.
- [10] Monnier PP, D'Onofrio PM, Magharious M, et al. Involvement of caspase-6 and caspase-8 in neuronal apoptosis and the regenerative failure of injured retinal ganglion cells[J]. J Neurosci, 2011, 31(29):10494-10505.
- [11] Yuan SJ, Yu XC, Asara JM, et al. The holo-apoptosome: activation of procaspase-9 and interactions with caspase-3[J]. Structure, 2011, 19(8):1084-1096.
- [12] Kim BM, Hong SH. Sequential caspase-2 and caspase-8 activation is essential for saikosaponin a-induced apoptosis of human colon carcinoma cell lines[J]. Apoptosis, 2011, 16(2):184-197.
- [13] Oberst A, Green DR. It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(11):757-763.
- [14] Mc Guire C, Volckaert T, Wolke U, et al. Oligodendrocyte-specific FADD deletion protects mice from autoimmune-mediated demyelination[J]. J Immunol, 2010, 185(12):7646-7653.
- [15] von Haefen C, Wendt J, Semini G, et al. Synthetic glycosidated phospholipids induce apoptosis through activation of FADD, caspase-8 and the mitochondrial death pathway[J]. Apoptosis, 2011, 16(6):636-651.
- (收稿日期:2012-03-15 修回日期:2012-09-30)
- (上接第 162 页)
- [13] Tanriverdi F, Senyurek H, Unluhizarci K, et al. High risk of hypopituitarism after traumatic brain injury: a prospective investigation of anterior pituitary function in the acute phase and 12 months after trauma[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(6):2105-2111.
- [14] Van den Berghe G, Wouters PJ, Bouillon R, et al. Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: insulin dose versus glycemic control[J]. Crit Care Med, 2003, 31(2):359-366.
- [15] 郭延召, 许樟荣. 应激性高血糖的临床研究进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2011, 10(4):293-296.
- [16] 孙石平, 朱涛, 余云湖, 等. 重型颅脑创伤患者血清 COR、ACTH 及血糖的变化[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2011, 10(5):404-407.
- [17] Sharma HS, Patnaik R, Patnaik S, et al. Antibodies to dynorphin a (1-17) attenuate closed head injury induced blood-brain barrier disruption, brain edema formation and brain pathology in the rat[J]. Acta Neurochir Suppl, 2010, 106:301-306.
- [18] Clark WM, Coull BM, Karukin M, et al. Randomized trial of cervene, a  $\mu$  receptor-selective opioid antagonist, in acute ischemic stroke[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 1996, 6(1):35-40.
- [19] 朱海兵, 温预关, 黄河清. 盐酸纳美芬的药理作用及临床应用[J]. 广州医药, 2008, 39(4):1-4.
- [20] Sharma HS, Nyberg F, Gordh T, et al. Topical application of dynorphin A (1-17) antibodies attenuates neuronal nitric oxide synthase up-regulation, edema formation, and cell injury following focal trauma to the rat spinal cord[J]. Acta Neurochir Suppl, 2006, 96:309-315.
- [21] 张琳, 张骅. 盐酸纳美芬的临床应用进展[J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(3):431.
- (收稿日期:2012-09-07 修回日期:2012-11-28)