

论著·基础研究

肾上腺髓质素及其结合蛋白改善梗阻性黄疸大鼠肠黏膜屏障功能的作用*

唐永梁¹, 郭勇², 杨俊涛^{1△}

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所肝胆外科, 重庆 400042;

2. 重庆市长寿区人民医院肝胆外科 401220)

摘要:目的 观察肾上腺髓质素(AM)及 AM 结合蛋白(AMBP-1)对梗阻性黄疸后肠黏膜屏障的保护作用。方法 将雄性 SD 大鼠 24 只,分为 3 组($n=8$):假手术(Sham)组、梗阻性黄疸对照(Vehicle)组、梗阻性黄疸治疗(AM/AMBP-1)组。于胆道结扎术后第 6 天,经股静脉输入 AM 和 AMBP-1,24 h 后取材检测各项指标。用异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-D)检测肠黏膜通透性,用 ELISA 试剂盒检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平,采用原位脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)检测小肠组织细胞的凋亡情况,采用免疫印迹法检测小肠组织 cleaved caspase-3 的蛋白表达情况,光镜下采用 Chiu's 评分法评测小肠黏膜损伤情况。结果 Vehicle 组较 Sham 组大鼠肠黏膜通透性增高($P<0.05$),血清 TNF- α 的水平增高($P<0.05$),cleaved caspase-3 的蛋白表达及凋亡指数增加($P<0.05$),肠黏膜损伤评分增加($P<0.05$)。AM/AMBP-1 组与 Vehicle 组比较,肠黏膜通透性有明显改善($P<0.05$),血清 TNF- α 的水平降低($P<0.05$),cleaved caspase-3 的蛋白表达减少($P<0.05$),凋亡指数下降($P<0.05$),肠黏膜损伤 Chiu's 评分降低($P<0.05$)。结论 AM 与 AMBP-1 可以明显改善梗阻性黄疸大鼠肠黏膜的高通透性状态,降低小肠组织的细胞凋亡,减轻全身炎症反应,具有保护肠黏膜屏障作用。

关键词:肾上腺髓质素;肾上腺髓质素结合蛋白;黄疸,阻塞性;肠黏膜屏障

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.16.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)16-2028-03

Improvement effect of adrenomedullin and its binding protein-1 on intestinal mucosal barrier function in obstructive jaundice rat*

Tang Yongliang¹, Guo Yong², Yang Juntao¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Daping Hospital and Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Changshou District People's Hospital, Chongqing 401220, China)

Abstract: Objective To observe the protection effect of adrenomedullin(AM) and adrenomedullin binding protein-1 (AMBP-1) on the intestinal mucosal barrier after obstructive jaundice. **Methods** 24 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into the Sham group, obstructive jaundice control group(Vehicle) and AM/AMBP-1 treatment group($n=8$). Obstructive jaundice was induced in adult rats(180–220 g) by common bile duct ligation(CBDL). On 6 d after CBDL, the rats were administered through femoral vein with AM/AMBP-1(24/80 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Blood and tissue samples were collected at 24 h after administered AM/AMBP-1 for various measurements. The intestinal permeability of all rats was measured by fluorescein isothiocyanate-dextran(FITC-D). Serum concentration of TNF- α was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The apoptosis of intestinal cells was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL). The expression of cleaved caspase-3 was measured by Western blot. The injury condition in the small intestinal mucosa was assessed by the Chiu's scoring under microscope. **Results** Compared with the Sham group, the permeability of intestinal mucosa in the Vehicle group was increased ($P<0.05$) and serum TNF- α level was increased obviously ($P<0.05$). The expression of cleaved caspase-3 protein, the apoptosis index(AI) and the Chiu's score were increased in the Vehicle control group($P<0.05$). Compared with the Vehicle control group, the permeability of intestinal mucosa was significantly improved ($P<0.05$), serum TNF- α was decreased in the AM/AMBP-1 group($P<0.05$). The expression of cleaved caspase-3, the AI index and Chiu's score were significantly decreased in the AM/AMBP-1 group($P<0.05$). **Conclusion** AM and AMBP-1 can significantly improve the high permeability state of the intestinal mucosa in obstructive jaundice rat, reduce the apoptosis of the small intestinal tissue, alleviate the systemic inflammatory reaction and have the protective effect on the intestinal mucosal barrier.

Key words: adrenomedullin; adrenomedullin binding protein-1; jaundice, obstructive; intestinal mucosal barrier

梗阻性黄疸是临床上一种常见的病理状态,其病因包括结石、肿瘤、炎症、畸形等。目前主要治疗措施包括使用外科手术、内镜、超声介入等方法进行减黄治疗,虽然这些方法均比较成熟,但仍伴有较高的并发症及病死率,尤以脓毒血症和多器

官衰竭为主要致死原因^[1]。而肠黏膜屏障受损,通透性增高,是导致脓毒血症、多器官衰竭的重要因素。因此,研究梗阻性黄疸时肠黏膜屏障损伤的有效防治方法及其机制具有重要临床意义。

* 基金项目:教育部留学归国人员科研启动基金资助项目(2011)。 作者简介:唐永梁(1984—),硕士,住院医师,主要从事梗阻性黄疸诊治。 △ 通讯作者,E-mail:juntaoyang6@gmail.com。

肾上腺髓质素(adrenomedullin, AM)是 1993 年被日本学者 Kitamura 等^[2]在检测嗜铬细胞瘤中的血小板环磷酸腺苷(cAMP)提升情况时分离出来的活性多肽,广泛分布于全身多个组织器官。大量研究发现其具有多种生理调节功能,包括扩张血管、降低血压、调节水盐代谢、抑制细胞凋亡等功能。1999 年发现的肾上腺髓质素结合蛋白(adrenomedullin binding protein-1, AMBP-1)^[3],可以通过与细胞表面的黏附分子结合,促进 AM 与其受体结合,具有明显增加 AM 活性的作用^[4]。研究发现,补充 AM 和 AMBP-1 能明显改善肠道缺血再灌注动物肠黏膜通透性^[5]。实验表明,静脉给予 AM 和 AMBP-1,可以明显减轻梗阻性黄疸并发脓毒症大鼠组织器官损伤及全身炎症反应^[6]。然而,其是否能够改善梗阻性黄疸后肠黏膜屏障功能,目前仍不清楚。本研究旨在观察 AM 和 AMBP-1 对梗阻性黄疸大鼠肠黏膜屏障的作用,以便为梗阻性黄疸继发性脓毒血症的防治提供新的思路。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 24 只,体质量为(200±20)g,购于第三军医大学大坪医院实验动物中心。

1.2 仪器与试剂 AM 购自美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司;AMBP-1 由美国纽约 Feinstein 医学研究所王平教授惠赠;异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-D)购自美国 Sigma 公司;大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒购自深圳欣博盛生物科技有限公司;原位脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)试剂盒购自美国 Roche 公司;兔抗大鼠 cleaved caspase-3 一抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司;微量注射泵(Typ:8714827)为德国 B. Braun Melsungen AG 公司产品;Synergy HT 多功能酶标检测仪为美国 Bio-Tek 公司产品;Eclipse Ti-S 显微镜为日本 Nikon 公司产品;ImageJ2x 软件为美国国立卫生研究院产品。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及模型建立 将 24 只实验大鼠分为 3 组:假手术组(Sham 组)、梗阻性黄疸对照组(Vehicle 组),梗阻性黄疸治疗组(AM/AMBP-1 组),每组 8 只。胆总管结扎(common bile duct ligation, CBDL)大鼠模型制备:3%戊巴比妥钠腹腔内注入麻醉,上腹部正中切口进腹,胰腺上方近十二指肠肠处双重结扎胆总管,并于两结扎线之间切断。Sham 组除不结扎和切断胆总管外,其余同上。术后实验大鼠自由饮水进食。术后第 6 天,对实验动物麻醉后,梗阻性黄疸大鼠进行股静脉插管,将 AM(24 μ g/kg)和 AMBP-1(80 μ g/kg)溶于 1 mL 生理盐水,经微量注射泵 30 min 匀速持续注入 AM/AMBP-1 组大鼠,Vehicle 组予以泵注射用人血清蛋白(104 μ g/kg)。24 h 后处死实验动物,收集静脉血及末端回肠组织备用。

1.3.2 肠黏膜通透性检测 采用荧光分光光度法测定血浆 FITC-D 水平,具体按照文献^[7]方法,于处死动物前,近回盲瓣 5 cm 的末端回肠两端约 10 cm 进行结扎,再向结扎段肠腔内注入 0.5 mL FITC-D 溶液(0.1 mmol/L PBS 液配制为 pH 7.2, 20 mg/mL),操作过程中注意勿损伤肠系膜血管,并防止 FITC-D 液体泄漏,30 min 后立即取门静脉血 2 mL,4 $^{\circ}$ C 下 3 000 \times g 离心 10 min,分离血浆,取血浆 200 μ L 用荧光分光光度计测定荧光强度,其中激发波长 480 nm,发射波长为 520 nm,根据标准曲线换算成 FITC-D 的血浆水平。以门静脉血 FITC-D 的荧光强度表示肠黏膜通透性。

1.3.3 血清 TNF- α 测定 取下腔静脉血 2 mL,3 000 \times g 离心 5 min,分离提取血清,严格按照大鼠 ELISA 试剂盒说明书

要求检测细胞因子 TNF- α 水平。

1.3.4 小肠组织细胞凋亡检测 取末端回肠组织进行石蜡切片,根据 TUNEL 试剂盒操作说明,对小肠组织细胞的凋亡进行检测。用显微镜进行观察,每个标本在 400 倍显微镜下随机选择 5 个视野进行计数,计数阳性细胞数(棕色)和总细胞数(蓝色),计算细胞凋亡指数为(阳性细胞数/总细胞数) \times 100。

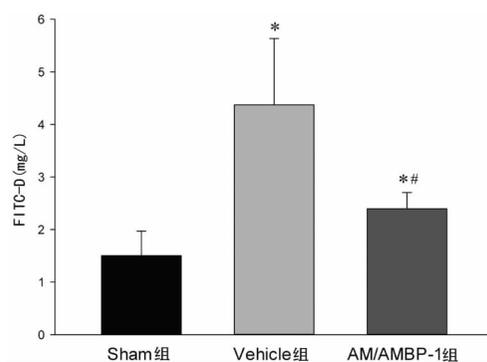
1.3.5 小肠组织 cleaved caspase-3 表达检测 采用免疫印迹法(Western blot)检测,取末端回肠组织,加入组织裂解液裂解后,匀浆,4 $^{\circ}$ C 12 000 \times g 离心 15 min。采用考马斯亮蓝法进行蛋白定量,100 $^{\circ}$ C 煮沸样本 5 min,冰上冷却后 10 000 \times g 离心 30 s,取上清液进行 SDS-PAGE,然后 50 V 转膜 2 h。含 6% 脱脂奶粉 PBS 溶液室温封闭 PVDF 膜 1 h,4 $^{\circ}$ C 过夜,一抗室温孵育 1 h, PBS 液洗膜后,加入二抗室温孵育 1 h,洗膜后即 ECL 显色曝光。经过电脑扫描成像,采用 ImageJ2x 软件分析相应蛋白条带的灰度值。以 β -actin 表达水平为内参。

1.3.6 肠黏膜形态学观察 取末端回肠组织常规石蜡切片,行 HE 染色,所有切片结果采用双盲法,每个切片随机取 5 个视野(\times 200),由两个病理科医师随机独立阅片评分,并取平均值计分。采用 Chiu's 评分法^[8]评价肠黏膜损伤程度:0 分为正常黏膜绒毛;1 分为绒毛顶端上皮间隙增大;2 分为上皮层与固有层中度分离;3 分为绒毛两侧有大量分离伴部分绒毛顶端破损;4 分为绒毛破损伴固有层毛细血管暴露;5 分为固有层破坏、出血、溃疡。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肠黏膜通透性检测 Vehicle 组大鼠门静脉血浆 FITC-D 水平[(4.373 \pm 1.262)mg/L]较 Sham 组[(1.504 \pm 0.465)mg/L]增高($P<0.05$),而经过 AM 和 AMBP-1 治疗后,AM/AMBP-1 组血浆 FITC-D 水平为(2.395 \pm 0.309)mg/L,较 Vehicle 组大鼠肠黏膜通透性得以明显改善($P<0.05$),见图 1。



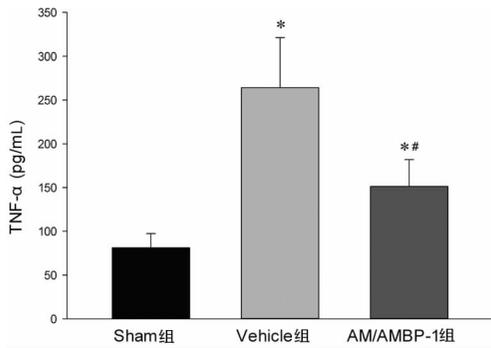
*: $P<0.05$,与 Sham 组比较;#: $P<0.05$,与 Vehicle 组比较。

图 1 3 组大鼠门静脉血浆 FITC-D 水平比较

2.2 3 组大鼠血清 TNF- α 水平比较 Vehicle 组大鼠血清 TNF- α 水平[(264.103 \pm 57.069)pg/mL]与 Sham 组[(81.243 \pm 16.250)pg/mL]比较有明显升高($P<0.05$),AM/AMBP-1 组血清 TNF- α 水平[(151.207 \pm 30.833)pg/mL]较 Vehicle 组明显降低($P<0.05$),见图 2。

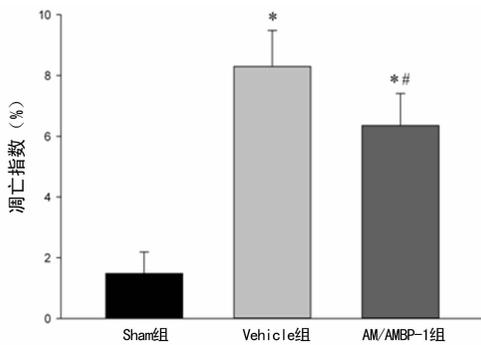
2.3 3 组大鼠小肠组织细胞凋亡指数比较 Vehicle 组大鼠小肠组织细胞凋亡指数[(8.300 \pm 1.183)%]较 Sham 组[(1.482 \pm 0.704)%]明显增加($P<0.05$),与 Vehicle 组大鼠比较,AM/AMBP-1 组凋亡指数[(6.354 \pm 1.054)%]降低

($P < 0.05$)。见图 3。



*: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; #: $P < 0.05$, 与 Vehicle 组比较。

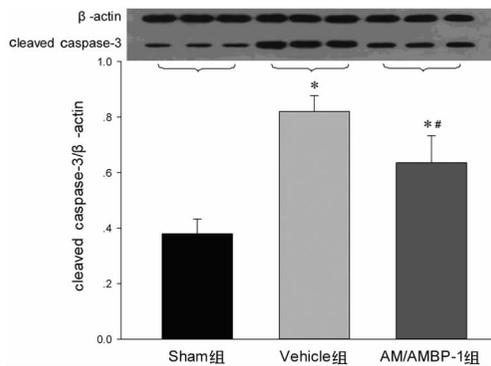
图 2 3组大鼠血清 TNF- α 水平比较



*: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; #: $P < 0.05$, 与 Vehicle 组比较。

图 3 3组大鼠小肠组织细胞凋亡指数比较

2.4 3组大鼠小肠组织 cleaved caspase-3 的蛋白表达水平比较 Vehicle 组大鼠小肠组织 cleaved caspase-3 表达水平 (0.820 ± 0.057) 较 Sham 组 (0.380 ± 0.053) 显著增加 ($P < 0.05$); 而 AM/AMBP-1 组 cleaved caspase-3 蛋白表达 (0.663 ± 0.098) 较 Vehicle 组明显减少 ($P < 0.05$), 见图 4。

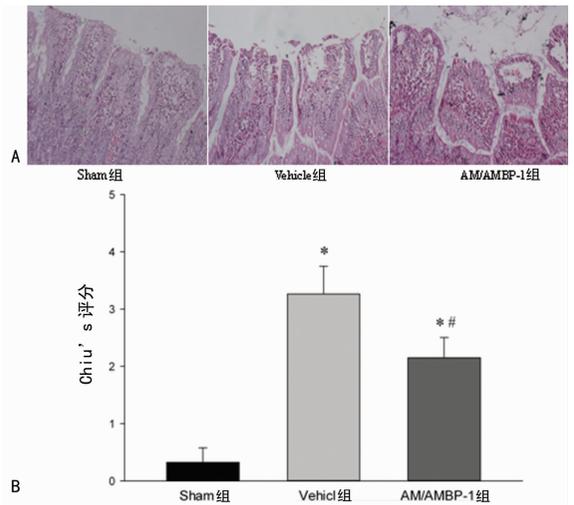


*: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; #: $P < 0.05$, 与 Vehicle 组比较。

图 4 3组大鼠小肠组织 cleaved caspase-3 蛋白表达水平比较

2.5 3组大鼠小肠组织病理学改变比较 光镜下 Sham 组大鼠肠黏膜形态完整, 绒毛结构清晰, 排列整齐, 部分绒毛顶端上皮间隙略增宽, Chiu's 评分 (0.325 ± 0.255) 分。Vehicle 组大鼠肠黏膜结构紊乱, 绒毛完整性部分被破坏, 上皮细胞脱落, 上皮层与固有层分离, 固有层暴露、出血, Chiu's 评分 (3.263 ± 0.484) 分。AM/AMBP-1 组大鼠肠黏膜完整性及绒毛破损情况较 Vehicle 组大鼠均有明显改善, 上皮间隙扩张, 部分绒毛顶端破损, Chiu's 评分 (2.150 ± 0.351) 分。经统计分析, Vehicle 组大鼠较 Sham 组大鼠肠黏膜损伤明显 ($P < 0.05$), 而

AM/AMBP-1 组大鼠肠黏膜损伤有所改善 ($P < 0.05$), 见图 5。



A: HE 染色 $\times 200$; B: Chiu's 评分; *: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; #: $P < 0.05$, 与 Vehicle 组比较。

图 5 3组大鼠肠黏膜损伤的病理学改变比较

3 讨论

肠屏障功能受损、肠黏膜通透性增加, 以及肠道细菌移位和肝脏 Kupffer 细胞吞噬功能的降低, 是梗阻性黄疸患者容易发生脓毒症和器官损害的主要发病机制。临床资料显示, 对梗阻性黄疸患者进行外科手术处理, 将加剧机体病理、生理紊乱, 加重肠屏障功能受损程度, 进而增加术后感染及并发症的发生率^[9]。因此, 在外科解决胆道梗阻问题的同时, 如何改善肠屏障功能, 降低肠黏膜高通透性状态, 对于防治肠源性感染, 降低术后脓毒症, 减轻多器官损害显得极为重要。

AM 作为一种多功能活性肽, 与其结合蛋白 AMBP-1 的联合应用, 对于肠道缺血再灌注损伤大鼠的肠屏障功能, 已经被证实具有明显的改善作用^[5]。作者在梗阻性黄疸合并脓毒症动物实验中发现, 补充 AM 及 AMBP-1 可明显减少大鼠肠、肝、肺组织髓过氧化物酶的表达, 降低血清促炎性细胞因子 TNF- α 及白细胞介素-6 (IL-6) 的水平, 并且, 大鼠 7 d 存活率由 21% 增加至 53%^[6], 表明补充 AM 及 AMBP-1 改善了组织器官损伤以及全身炎症反应, 但是其作用机制并不清楚。本研究通过观察经肠道吸收进入循环系统的 FD-4 水平, 发现通过外源性补充 AM 和 AMBP-1, 可以明显改善梗阻性黄疸状态下肠黏膜通透性, 同时发现血清促炎性细胞因子 TNF- α 水平亦有明显降低, 进而提示 AM 及 AMBP-1 可以通过改善肠黏膜屏障功能, 以减少全身炎症反应。

对于梗阻性黄疸时肠黏膜通透性增加的确切机制, 近年的研究发现可能与肠黏膜细胞增殖与凋亡失衡^[10-11], 以及紧密连接蛋白的改变有关^[12-13]。此外, 氧化应激损害也可以通过促进肠黏膜细胞凋亡、分解紧密连接蛋白等途径, 使肠黏膜的通透性增加^[13-14]。本研究通过对小肠组织细胞凋亡情况的检测, 发现通过外源性补充 AM 及 AMBP-1, 可以使肠组织细胞凋亡指数得以改善, 而凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 在 AM 及 AMBP-1 治疗后, 表达也有明显降低。以上结果表明 AM 及 AMBP-1 可以通过抑制梗阻性黄疸时小肠组织细胞的凋亡, 改善肠黏膜屏障功能。而 AM 和 AMBP-1 通过改善肠黏膜通透性, 改善全身炎症反应, 降低促炎性细胞因子 TNF- α 的产生, 阻断其级联效应, 又可以进一步抑制肠黏膜上皮细胞凋亡。

总之,本实验结果表明,补充 AM 及 AMBP-1 对梗阻性黄疸大鼠的肠屏障功能具有保护作用,这可能为梗阻性黄疸后肠源性感染的防治提供新的思路。但是,在具体分子机制中,AM 及 AMBP-1 是否通过 cAMP/PKA 或 Akt-GSK 等作用途径抑制细胞凋亡^[15-16],尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Sewnath ME, Karsten TM, Prins MH, et al. A meta-analysis on the efficacy of preoperative biliary drainage for tumors causing obstructive jaundice[J]. *Ann Surg*, 2002, 236(1):17-27.
- [2] Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 192(2):553-560.
- [3] Elsasser TH, Kahl S, Martinez A, et al. Adrenomedullin binding protein in the plasma of multiple species: characterization by radioligand blotting [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(10):4908-4911.
- [4] Pio R, Martinez A, Unsworth EJ, et al. Complement factor H is a serum-binding protein for adrenomedullin, and the resulting complex modulates the bioactivities of both partners[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(15):12292-12300.
- [5] Higuchi S, Wu R, Zhou M, et al. Gut hyperpermeability after ischemia and reperfusion: attenuation with adrenomedullin and its binding protein treatment [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2008, 1(5):409-418.
- [6] Yang J, Wu R, Zhou M, et al. Human adrenomedullin and its binding protein ameliorate sepsis-induced organ injury and mortality in jaundiced rats[J]. *Peptides*, 2010, 31(5):872-877.
- [7] Fujiyoshi N, Feketeova E, Lu Q, et al. Amiloride moderates increased gut permeability and diminishes mesenteric lymph-mediated priming of neutrophils in trauma/hemorrhagic shock[J]. *Surgery*, 2006, 140(5):810-817.
- [8] Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal

lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal [J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4):478-483.

- [9] Parks RW, Halliday MI, McCrory DC, et al. Host immune responses and intestinal permeability in patients with jaundice [J]. *Bri J Surg*, 2003, 90(2):239-245.
- [10] Bemelmans MH, Gouma DJ, Greve JW, et al. Cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6 in experimental biliary obstruction in mice[J]. *Hepatology*, 1992, 15(6):1132-1136.
- [11] Assimakopoulos SF, Scopa CD, Zervoudakis G, et al. Bombesin and neurotensin reduce endotoxemia, intestinal oxidative stress, and apoptosis in experimental obstructive jaundice[J]. *Ann Surg*, 2005, 241(1):159-167.
- [12] Yang R, Harada T, Li J, et al. Bile modulates intestinal epithelial barrier function via an extracellular signal related kinase 1/2 dependent mechanism [J]. *Intensive Care Med*, 2005, 31(5):709-717.
- [13] Lutgendorff F, Nijmeijer RM, Sandstrom PA, et al. Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis[J]. *PloS One*, 2009, 4(2):e4512.
- [14] Wang N, Yu H, Ma J, et al. Evidence for tight junction protein disruption in intestinal mucosa of malignant obstructive jaundice patients [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2010, 45(2):191-199.
- [15] Yin H, Chao L, Chao J. Adrenomedullin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion through activation of Akt-GSK signaling[J]. *Hypertension*, 2004, 43(1):109-116.
- [16] Wang SM, Yang WL. Circulating hormone adrenomedullin and its binding protein protect neural cells from hypoxia-induced apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(5):361-367.

(收稿日期:2013-11-08 修回日期:2014-02-22)

(上接第 2027 页)

- 中国实用儿科杂志, 2006, 21(9):650-653.
- [5] 张善纲, 范建中, 徐军, 等. 脑损伤认知障碍康复评定的进展[J]. *国外医学:物理医学与康复学分册*, 2004, 24(4):183-185.
- [6] 卓豫, 吴宝明, 王景周, 等. 一种全程控制的大鼠穿梭箱主动回避反应实验系统及其应用[J]. *重庆医学*, 2006, 35(10):926-927.
- [7] Tomobe K, Fujii H, Sun B, et al. Modulation of infection-induced inflammation and locomotive deficit and longevity in senescence-accelerated mice-prone (SAMP8) model by the oligomerized polyphenol oligonol[J]. *Biomed Pharmacother*, 2007, 61(7):427-434.
- [8] 王君明, 朱新瑞. 何首乌提取物抗抑郁活性研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2012, 35(7):449-451, 455.
- [9] 李桂琼, 柯大智. 参附注射液对 β 淀粉样蛋白所致阿尔茨

海默病大鼠认知行为和脑组织氧化应激的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(2):156-158.

- [10] Erickson MA, Hansen K, Banks WA. Inflammation-induced dysfunction of the low-density lipoprotein receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier: protection by the antioxidant N-acetylcysteine[J]. *Brain Behav Immun*, 2012, 26(7):1085-1094.
- [11] Seshia SS, Bingham WT, Kirkham FJ, et al. Nontraumatic coma in children and adolescents: diagnosis and management[J]. *Neurol Clin*, 2011, 29(4):1007-1043.
- [12] Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(15):6185-6205.

(收稿日期:2013-12-20 修回日期:2014-02-23)