

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.10.004

抗人 FXVD6 特异性多肽单克隆功能性抗体制备及生物学作用鉴定

陈雄飞¹,袁俊建¹,张执全¹,郭忠健²,郭尧³,刘汝海¹,李凤山¹

(河北省沧州市中心医院:1. 普外一科;2. 病理科;3. 中心实验室 061001)

[摘要] **目的** 研制抗人转运调节因子(FXYD)6 功能区单克隆抗体库,筛选分泌胞内、胞外区单克隆抗体的杂交瘤细胞株并对鉴定胞外区单克隆抗体生物学作用。**方法** 原核表达并纯化去除跨膜区域 FXVD6 功能区重组蛋白,FXVD6 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠,将免疫后的小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,多次筛选及克隆化,建立稳定分泌抗人 FXVD6 胞外区或胞内区的单克隆抗体杂交瘤。分别应用间接酶联免疫吸附法(ELISA)、Western blot 和免疫组织化学法鉴定抗体特异性及亚型,细胞流式技术筛选可识别天然构象的胞外区单克隆抗体,用腹水诱导法对胞外区单抗进行制备、纯化并检测亲和常数,高表达 FXVD6 的 HepG2 细胞系检测胞外区单抗的功能。**结果** 成功获得分泌抗人 FXVD6 胞外区或胞内区单克隆抗体的杂交瘤细胞库,制备出具有功能阻断性的胞外区单抗。**结论** 制备的抗人 FXVD6 胞外区单抗可抑制 HepG2 细胞的增殖。

[关键词] 转运调节因子 6;单克隆抗体;制备;生物学鉴定

[中图分类号] R73-3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)10-1309-05

Preparation and biological identification of monoclonal and functional antibody against human specific polypeptide FXVD6

CHEN Xiongfei¹,YUAN Junjian¹,ZHANG Zhiquan¹,GUO Zhongjian²,
GUO Yao³,LIU Ruhai¹,LI Fengshan¹

(1. Department of General Surgery;2. Department of Pathology;3. Central Laboratory,
Cangzhou Municipal Central Hospital,Cangzhou,Hebei 061001,China)

[Abstract] **Objective** To study and prepare the monoclonal antibody library against human FXVD6 functional region,to screen the hybridoma cell lines secreting the monoclonal antibodies against intracellular or extracellular region of human FXVD6,and to identify the biological function of monoclonal antibody against extracellular domain. **Methods** FXVD6 functional region recombinant protein which did not contain the trans-membrane region was prokaryotically expressed,purified,and FXVD6 recombinant protein was used to immunize BALB/c mice. Then splenocytes after immunization were fused with myeloma cells SP2/0. After several rounds of screening and cloning,the hybridomas which secreted the antibodies against the extracellular domain or the intracellular domain of human FXVD6 were established. The antibody specificity and subtype were identified with indirect ELISA,western blot and immunohistochemistry. The monoclonal antibodies against the extracellular domain which recognized the native conformation were screened with flow cytometry. The antibody against extracellular region was prepared with the ascites revulsion method and purified. The affinity constants were measured with indirect ELISA. The function of extracellular monoclonal antibody was detected by HepG2 cell line with high expression of FXVD6. **Results** The hybridoma cell library which secreted the monoclonal antibody against extracellular domain or the intracellular domain of human FXVD6 was successfully obtained,and extracellular region monoclonal antibodies with the functional blocking were prepared. **Conclusion** The prepared anti-human FXVD6 extracellular monoclonal antibodies could inhibit HepG2 cell proliferation.

[Key words] FXVD6; monoclonal antibodies; preparation; biological identification

包含转运调节因子(FXYD)结构域的 FXVD6 蛋白作为 FXVD 家族蛋白成员之一,为 I 型跨膜蛋白,通过调节钠、钾泵的活性发挥部分生物学功能^[1],其

在神经元中高表达,利于突触体信号转导^[2],在维持神经元正常形态和功能方面发挥了重要作用^[3],且 FXVD6 与精神分裂症相关^[4]。同时,FXVD6 作为一

种肿瘤相关蛋白,在胆管癌^[5-6]、肝癌^[7]、鼻咽癌^[8]等恶性肿瘤中高表达,可促进人骨肉瘤细胞增殖与侵袭^[9]。为研究 FXYD6 蛋白的组织学分布和生物学作用,并为相关肿瘤的靶向治疗奠定实验基础,本课题组现制备抗人 FXYD6 特异性多肽单克隆功能性抗体库,并对其胞外区单克隆抗体生物学作用进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

人 FXYD6 胞内区-G₄S-FXYD6 胞外区-G₄S-GST-His₆ TAG 基因序列的原核表达质粒、BSA-FXYD6 胞外区偶联蛋白(中国华大基因有限公司合成);大肠杆菌 BL21(中国北京康润诚业生物技术公司);Ni Sepharose 6 Fast Flow 纯化柱(中国 GE Healthcare 生物科学公司);SPF 级 BALB/c 小鼠(中国科学院遗传所动物实验中心);SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞(中国华大基因蛋白生物有限公司);pcDNA3.1-FXYD6 质粒(前期制备);293T 细胞株、HepG2 细胞株(ATCC 中科院生物物理所冻存);胎牛血清,1640 培养基,次黄嘌呤、甲氨喋呤、胸腺嘧啶核苷(HAT)培养基、次黄嘌呤、胸腺嘧啶核苷(HT)培养基、聚乙二醇(美国 Sigma 公司);抗体亚类试剂盒(美国 Southern Biotech 公司);鼠抗 Myc 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白 G(IgG)抗体、鼠单克隆抗体 IgG(中国北京中杉金桥生物技术有限公司);二氨基联苯胺(DAB)试剂盒(中国武汉博士德生物工程有限公司);Western blot 高灵敏度化学发光检测试剂盒(中国北京康为世纪生物有限公司);异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗小鼠 IgG(H+L,中国上海碧云天生物技术有限公司);健康人脑颞叶组织、肝癌组织、正常肝组织(沧州市中心医院病理科留存的石蜡标本)。

1.2 方法

1.2.1 抗原蛋白的表达

将人 FXYD6 胞内区-G₄S-FXYD6 胞外区-G₄S-GST-His₆ TAG 基因序列的原核表达质粒转入表达载体 BL21(DE3),BL21 菌生长至对数期后,0.5 mmol/L 异丙基-β-D 硫代半乳糖(IPTG)诱导,为诱导组,同时设未加 IPTG 的非诱导组,37 °C 培养 4 h,离心收菌,制备蛋白样品,12%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,考马斯亮蓝染色,脱色后观察表达蛋白条带。

1.2.2 抗原蛋白纯化

离心收集 IPTG 诱导后的 BL21 菌,25 mmol/L Tris 150 mmol/L NaCl 的裂解液重悬,冰上超声破碎,离心,分离制备上清液和沉淀,蛋白制品 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色,脱色后发现目的蛋白主要集中在上清液中。上清液流经 Ni-NTA 金属螯合柱行层析纯化,30 mmol/L 咪唑磷酸盐缓冲液(PBS)洗脱杂蛋白,200 mmol/L 咪唑 PBS 洗脱目的蛋白,将目的蛋白超滤换至 PBS 并浓缩。

1.2.3 动物免疫

参照脾内注射方法^[10],选择 6~8

周龄的 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠,脾脏内注射 50 μg 抗原蛋白,免疫 7 d 后,小鼠内眦取血,间接酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测小鼠血清抗体效价,初次免疫 2 周后用抗原蛋白每只 30 μg 腹腔注射冲击免疫达到效价要求的小鼠。

1.2.4 杂交瘤细胞融合、筛选、鉴定

取加强免疫 3 d 后的 BALB/c 小鼠的脾细胞与 SP2/0 小鼠骨髓瘤(1:5),应用聚乙二醇(PEG)细胞融合法进行融合,HAT 培养基筛选融合细胞,有限稀释法筛选阳性克隆,即用 FXYD6 重组蛋白及标签蛋白通过间接 ELISA 法筛选针对重组 FXYD6 抗原有免疫反应的杂交瘤细胞株,同时去除对标签蛋白有免疫反应的杂交瘤细胞株,即得到针对分泌 FXYD6 胞内区或胞外区单抗的杂交瘤细胞株。抗体亚类测定试剂盒检测杂交瘤分泌抗体亚型,应用 BSA-FXYD6 胞外区多肽通过间接 ELISA 方法在分泌 FXYD6 胞内区或胞外区特异性强的单克隆抗杂交瘤中筛选针对其分泌胞外区单抗的细胞株,阳性反应的即为分泌胞外区单抗的杂交瘤细胞株,阴性反应的即为分泌胞内区单抗的杂交瘤细胞株。间接 ELISA 法测定 FXYD6 单抗的特异性与效价,用于特异性鉴定的非相关抗原包括 FXYD1、FXYD2、FXYD3、FXYD4、FXYD5、FXYD7。选取分泌特异性强及效价高的针对胞外区多肽的单克隆杂交瘤行后续实验。

人脑颞叶组织、肝癌、正常肝组织经甲醛固定、石蜡包埋、4 μm 连续切片,常规脱蜡、水化、抗原修复后,在 0.3%过氧化氢溶液中避光 30 min,5%马血清封闭 1 h 后,滴加已筛选出针对胞外区或胞内区的杂交瘤分泌的上清液(1:3 稀释),4 °C 过夜,1:200 的生物素标记马抗小鼠 IgG 37 °C 孵育 1 h,1:200 的辣根过氧化物酶标记链卵白素 37 °C 孵育 40 min,DAB 显色,苏木精复染,逐级脱水,中性树脂封片,显微镜下观察单抗与组织中 FXYD6 结合情况。

1.2.5 阳性杂交瘤染色体数目分析

取对数生长期杂交瘤细胞,终浓度 0.25 μmol/L 秋水仙素处理 2 h,离心收集细胞,37 °C 低渗 KCl 溶液处理 15 min,加入甲醇、冰醋酸固定液(3:1)固定 4 min,离心,弃去上清液。在细胞沉淀中加入固定液,室温静置 30 min 后离心,弃去上清液。重复该步骤。滴加细胞悬液到 4 °C 载玻片上,室温自然干燥后用 10%的 Giemsa 溶液染色 30 min,洗去染液,二甲苯通透、中性树脂封片,镜下观察选择分散良好和完整的中期分裂象并照相,统计染色体平均数目(计数大于或等于 50 个细胞染色体/样品)。

1.2.6 FXYD6 胞外区单克隆抗体制备

BALB/c 小鼠腹腔注射 500 μL 石蜡油,1 周后腹腔注射 1 mL PBS 洗涤并定量 5×10⁵~9×10⁵/mL 分泌胞外区单抗的杂交瘤细胞。1 周后取腹水,离心,应用蛋白 G

亲和层析法纯化抗体,间接 ELISA 法测抗体效价。

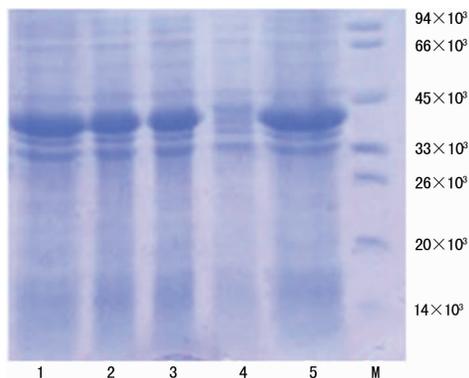
1.2.7 FXYD6 胞外区单克隆抗体功能性检测 取对数生长期的 293T 细胞,以 1×10^5 /mL 接种 24 h 后,瞬时转染质粒 pcDNA3.1-FXYD6 : 2 μ g 质粒 pcDNA3.1-FXYD6 稀释于 500 μ L Opti-MEM 中,另一培养皿加 500 μ L 培养基作对照(未转染组),混匀后加入 2 μ L Lipofectamine 2000 转染试剂,轻柔混匀,室温放置 15 min,6 h 后更换成 DMEM 培养基,再培养 30 h,制备蛋白样品,用 Myc 单抗和胞外区单抗 Western blot 检测真核质粒瞬转后的 293T 细胞 FXYD6 的表达。收集已转染后的 293T 细胞,0.3% BSA 洗涤细胞后加入以 PBS 稀释的胞外区单克隆抗体(1 : 200 PBS 稀释),以小鼠 IgG 作为空白对照,4 $^{\circ}$ C 孵育 45 min,0.3% BSA 洗涤,加入 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L),4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,0.3% BSA 洗涤,细胞重悬于 PBS,行流式细胞仪检测。

取对数生长期高表达 FXYD6 蛋白的 HepG2 细胞^[8],以 4×10^3 /mL,100 μ L 接种于 96 孔板完全培养基中,每孔加入不同浓度的 FXYD6 胞外区单克隆抗体(终浓度分别为 5、10、20 μ g/mL),每组设 3 个复孔,同时设小鼠单抗 IgG 同型对照组,继续培养 24 h 后每孔加入 20 μ L MTT(5 mg/mL),培养 5 h,弃上清液,每孔 200 μ L PBS 洗涤,加入 100 μ L DMSO 溶解蓝紫色结晶颗粒后测定 A_{490} 。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

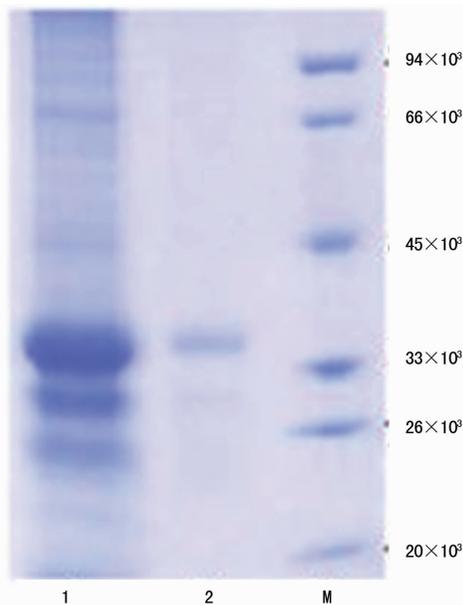
2.1 抗原蛋白诱导表达 经 SDS-PAGE、脱色后,诱导组较非诱导组出现明显的梭形条带,表达出目的蛋白相对分子质量与预期相符,见图 1。



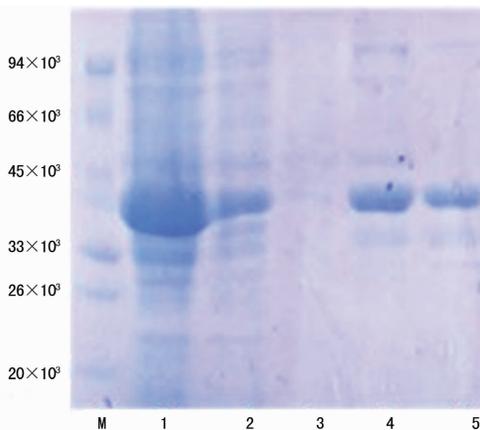
1、2、3、5:诱导组;4:非诱导组;M:蛋白 marker
图 1 FXYD6 抗原蛋白诱导表达

2.2 抗原蛋白的纯化 全菌经超声破碎后,SDS-PAGE 检测目的蛋白主要集中在上清液中(图 2)。因重组蛋白含有 His 标签,选用镍柱纯化目的蛋白,在实验过程中发现目的蛋白与镍柱结合较弱,较低浓度咪唑

就可以将目的蛋白洗脱,确定以 30 mmol/L 咪唑洗脱杂蛋白,高浓度咪唑洗脱目的蛋白,超滤换 PBS 后,目的蛋白经 SDS-PAGE 检测纯度达 90%左右,见图 3。

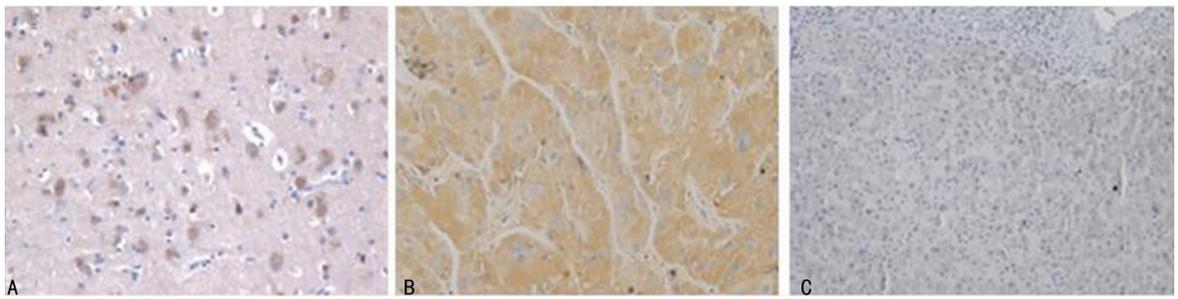


1:上清液;2:沉淀;M:蛋白 marker
图 2 FXYD6 抗原蛋白表达形式



1:上清液;2:穿透液;3:穿透液;4:200 mmol/L 咪唑洗脱液;5:纯化的目的蛋白;M:蛋白 marker
图 3 FXYD6 抗原蛋白纯化

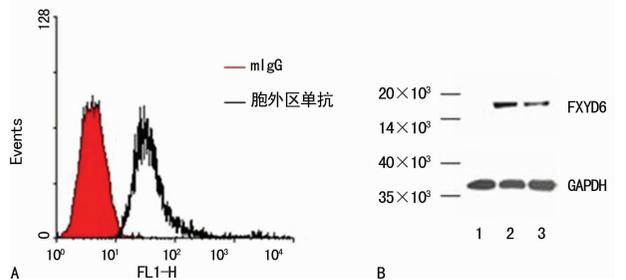
2.3 杂交瘤细胞株的建立及单克隆抗体鉴定 经过 1 年的反复冻存和复苏培养,成功筛选出 3 株稳定分泌效价高、特异性强的 FXYD6 单克隆抗体的杂交瘤,这 3 株阳性杂交瘤行 Giemsa 染色,镜下观察均有 106 条染色体,为脾淋巴细胞和小鼠骨髓瘤细胞染色体数量之和。2 株杂交瘤细胞分泌针对胞内区的单克隆抗体,抗体亚型分别为 IgG2a、IgG2b,轻链均为 k 链;1 株杂交瘤细胞分泌针对胞外区的单克隆抗体,抗体亚型为 IgG1,轻链为 λ 链。制备的 3 株杂交瘤的上清液均可以识别脑组织中的神经元细胞,神经元弥漫着色,细胞核未见着色,而胶质细胞未见明显着色(图 4A),肝癌组织较正常肝组织高表达 FXYD6 蛋白,见图 4B、C。



A. FXYD6 蛋白在神经元细胞中表达($\times 400$); B. FXYD6 蛋白在肝癌细胞中高表达($\times 400$); C. FXYD6 蛋白在正常肝细胞中不表达($\times 100$)

图 4 FXYD6 蛋白在不同组织中的表达(Giemsas 染色)

2.4 FXYD6 胞外区单抗功能性检测 流式细胞实验发现 FXYD6 胞外区单克隆抗体可以特异性识别真核表达载体 pcDNA3.1-FXYD6 瞬转 293T 细胞表达的天然构象人 FXYD6 蛋白(图 5), 真核表达质粒瞬转 293T 细胞后表达的人 FXYD6 蛋白位于 $14 \times 10^3 \sim 20 \times 10^3$ 。FXYD6 胞外区单克隆抗体可以抑制肝癌 HepG2 细胞增殖, 中浓度($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)单抗较低浓度($5 \mu\text{g}/\text{mL}$)单抗对肿瘤细胞增殖有明显的抑制作用, 比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 有一定的浓度依赖性, 然而高浓度($20 \mu\text{g}/\text{mL}$)单抗较中浓度($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)单抗抑制细胞增殖不明显(图 6)。新制备的 FXYD6 胞外区单抗为功能阻断性抗体。



A: FCM 检测; B: Western blot 检测。1: 未转染组; 2、3: 转染组; 2: Myc 单抗; 3: FXYD6 胞外区单抗

图 5 胞外区单克隆抗体特异性识别人 FXYD6 蛋白

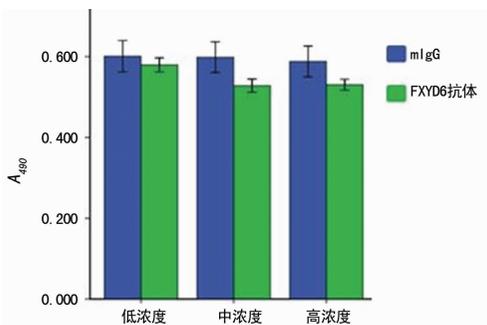


图 6 FXYD6 胞外区单克隆抗体抑制 HepG2 细胞增殖

3 讨论

FXYD 家族蛋白是跨膜蛋白, 因其胞外近跨膜区含较固定的 PFXYD 氨基酸序列而得名^[11]。通过调节不同钠钾泵同工酶发挥部分功能, 而 FXYD2 本身就是 Na, K-ATPase γ 亚基^[12]。部分成员还是肿瘤相关蛋白, 与某些肿瘤的发生、发展相关。FXYD3 在多种肿瘤中高表达, 与直肠癌放疗抵抗、局部复发相关,

是直肠癌患者预后较差的指标^[13]。FXYD5 是表达于多种癌细胞和少量正常细胞表面的糖化膜蛋白, 通过下调 E-钙黏素促进肿瘤细胞侵袭、转移, 其高表达与不良预后密切相关^[14]。FXYD6 蛋白没有糖基化及磷酸化^[11]。本研究通过原核表达制备有效的抗原片段来制备识别天然构象抗原的单克隆抗体, 在对抗原设计时去除蛋白功能区中的跨膜序列; 胞内区、胞外区氨基酸序列串联与 GST 融合表达, 不仅有助于抗原蛋白的正确折叠, 将 FXYD6 胞外区和胞内区序列完全暴露于融合蛋白表面, 提高抗原的免疫原性, 同时也提高目的蛋白可融性, 便于后续蛋白纯化。

大肠杆菌 BL21 表达出的目的蛋白稳定性高, 不易被降解。本实验中构建的人 FXYD6 胞内区-G₄S-FXYD6 胞外区-G₄S-GST-His₆ TAG 基因序列表达载体转入宿主菌 BL21, 诱导获得 FXYD6 重组蛋白可溶性的高效表达。因重组蛋白有 His 标签, 本研究选用镍柱纯化蛋白, 重组蛋白与镍柱结合力较弱, 选用 30 mmol/L 咪唑洗脱杂蛋白, 高浓度咪唑洗脱目的蛋白, 浓缩、超滤换 PBS 液后, 获得高纯度的 FXYD6 重组蛋白。

LIU 等^[15]制备的单抗不能识别天然构象的抗原蛋白, 为非功能性胞外区单抗。基于此, 本研究用纯化的重组 FXYD6 抗原免疫小鼠, 制备针对胞外区或胞内区的单克隆抗体, 同时以期获得识别天然构象功能性胞外区单克隆抗体。本实验采用小鼠直接脾内注射免疫的方法, 此法周期短, 抗原直接接触免疫细胞, 有免疫原性和反应性强的特点^[11]。加强免疫后, 将小鼠骨髓瘤细胞和脾淋巴细胞融合, 筛选出融合的杂交瘤细胞株后再用标签蛋白筛选去除对标签蛋白或串联多肽序列有阳性反应的杂交瘤, 即得到分泌针对 FXYD6 胞内区或胞外区单抗的杂交瘤, BSA-FXYD6 胞外区多肽筛选出分泌胞外区单抗杂交瘤细胞株。在对 FXYD6 胞外区单抗特异性鉴定中发现: 制备的单抗与其他 FXYD 蛋白无明显交叉反应; 可以特异性识别脑组织中的 FXYD6 蛋白。本研究还发现 FXYD6 蛋白在肝癌组织中高表达; FXYD6 胞外区单克隆抗体可以特异性识别天然构象的 FXYD6 蛋白。

近期研究发现 FXYD6 蛋白与多种肿瘤相关, FXYD6 过表达可促进肝癌细胞和骨肉瘤细胞侵袭与

转移^[8,10]。在对 FXYP6 胞外区单抗功能进行研究的实验中,本研究发现其可抑制高表达 FXYP6 蛋白的肝癌 HepG2 细胞增殖,其抑制作用与制备的胞外区单抗有一定的浓度依赖性,胞外区单抗属于阻断性抗体,然而高浓度单抗较中浓度单抗抑制细胞增殖作用无明显差异。

总之,本研究成功制备了分泌针对 FXYP6 胞内区或胞外区的单抗杂交瘤细胞株,并制备了 FXYP6 胞外区功能阻断性单抗,这为研究 FXYP6 蛋白的组织分布、具体作用机制和一些肿瘤的靶向治疗奠定了良好基础。

参考文献

- [1] MIYASHITA T, AKIYAMA K, INAMOTO R, et al. Presence of FXYP6 in the endolymphatic sac epithelia[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 513(1): 47-50.
- [2] BIESEMANN C, GRINBORG M, LUQUET E, et al. Proteomic screening of glutamatergic mouse brain synaptosomes isolated by fluorescence activated sorting[J]. *EMBO J*, 2014, 33(2): 157-170.
- [3] SHIINA N, YAMAGUCHI K, TOKUNAGA M, RNG105 deficiency impairs the dendritic localization of mRNAs for Na⁺/K⁺ ATPase subunit isoforms and leads to the degeneration of neuronal networks[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(38): 12816-12830.
- [4] ZHONG N, ZHANG R, QIU C, et al. A novel replicated association between FXYP6 gene and schizophrenia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405(1): 118-121.
- [5] CHEN X F, SUN M Z, HU Y Z, et al. FXYP6 is a new biomarker of cholangiocarcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(2): 393-398.
- [6] 陈雄飞,周宁新,张红红. FXYP6 在肝门胆管癌中的表达

及临床意义[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2016, 23(11): 1344-1347.

- [7] GAO Q, CHEN X F, DUAN H X, et al. FXYP6: a novel therapeutic target toward hepatocellular carcinoma[J]. *Protein Cell*, 2014, 5(7): 532-543.
- [8] 李征,何翦太. FXYP6 蛋白在鼻咽癌组织中的表达[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2011, 17(4): 252-254, 258.
- [9] LI Z M, ZHANG H Y, WANG Y X, et al. MicroRNA-137 is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration through targeting FXYP6[J]. *J Drug Target*, 2016, 24(2): 102-110.
- [10] 任瑞敏,王云龙,张怡青,等. 利用改良后的脾内免疫和半固体培养基法制备单克隆抗体[J]. *生物技术通报*, 2013(8): 166-169.
- [11] GEERING K. FXYP proteins; new regulators of Na-K-ATPase[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290(2): F241-250.
- [12] GAUT J P, CRIMMINS D L, LOCKWOOD C M, et al. Expression of the Na⁺/K⁺-transporting ATPase gamma subunit FXYP2 in renal tumors[J]. *Mod Pathol*, 2013, 26(5): 716-724.
- [13] LOFTAS P, ARBMAN G, SUN X F, et al. FXYP-3 expression in relation to local recurrence of rectal cancer[J]. *Radiat Oncol J*, 2016, 34(1): 52-58.
- [14] BIASIOTTA A, D'ARCANGELO D, PASSARELLI F, et al. Ion channels expression and function are strongly modified in solid tumors and vascular malformations[J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 285.
- [15] LIU J, ZHOU N X, ZHANG X D. A monoclonal antibody against human FXYP6[J]. *Hybridoma (Larchmt)*, 2011, 30(5): 487-490.

(收稿日期:2017-09-20 修回日期:2017-12-18)

(上接第 1308 页)

- monary bypass; microcirculatory and systemic effects[J]. *Thorac Surg*, 2012, 94(6): 2046-2053.
- [14] BASILE D P. Challenges of targeting vascular stability in acute kidney injury[J]. *Kidney Int*, 2008, 74(3): 257-258.
- [15] GUAN Z, VANBEUSECUM J P, INSCHO E W. Endothelin and the renal microcirculation[J]. *Semin Nephrol*, 2015, 35(2): 145-155.
- [16] ROSNER M H, PORTILLA D, OKUSA M D. Analytic reviews: cardiac surgery as a cause of acute kidney injury: pathogenesis and potential therapies[J]. *J Int Care Med*, 2008, 23(1): 3-18.
- [17] PAROLARI A, ALAMANNI F, GHERLI T, et al. Cardiopulmonary bypass and oxygen consumption: oxygen delivery and hemodynamics[J]. *Ann Thora Surg*, 1999, 67(5): 1320-1327.
- [18] KUMAR A B, SUNEJA M. Cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury [J]. *Anesthesiology*, 2011(114): 964-970.
- [19] 吴平,陈孝文,江黎明,等. 内皮素受体拮抗剂联合内皮源

血管松弛因子防治大鼠缺血性急性肾衰竭[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2004, 5(3): 133-135.

- [20] 郑传东,苟欣. 肾缺血再灌注损伤的内皮素作用的生物学研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2007, 32(2): 218-221.
- [21] BLANES M G, OUBAHA M, RAUTUREAU Y, et al. Phosphorylation of -tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(14): 10660-10669.
- [22] SHU X, KELLER T C S, BEGANDT D, et al. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(23): 4561-4575.
- [23] BHATRAJUA P, CRAWFORD B J, HALL M, et al. Inhaled nitric oxide: current clinical concepts[J]. *Nitric Oxide*, 2015(50): 114-128.
- [24] 兰晓莉,李春艳. 核素显像在肾脏疾病评价中的临床应用[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2015, 29(10): 885-888.

(收稿日期:2017-09-18 修回日期:2017-12-16)