

· 论著 ·

亚低温预处理对谷氨酸诱导原代大鼠
皮质神经细胞损伤的保护作用

薄丰山 王迪芬 刘文悦 付江泉

【摘要】 目的 观察亚低温预处理对体外环境下培养大鼠大脑皮质细胞发生类缺血/再灌注(I/R)损伤的保护作用;比较亚低温单用或联合药物预处理的保护作用。方法 选择出生 24 h 内 SD 大鼠的大脑皮质细胞,体外培养至第 3 天,用阿糖胞苷(2.5 mg/L)培养基换液 1 次;培养 6 d 后随机分为空白对照组、谷氨酸损伤组(加入含 200 μ mol/L 谷氨酸的无血清培养基作用 0.5 h)、亚低温预处理组(谷氨酸损伤前 1 d 于 33.5 $^{\circ}$ C 低温下培养 24 h)、亚低温联合依达拉奉预处理组和亚低温联合丙泊酚预处理组(谷氨酸损伤前 1 d 分别更换为 100 μ mol/L 依达拉奉培养基和 3 mg/L 丙泊酚培养基后,再低温培养 24 h)。各组更换正常培养基 24 h 后检测细胞存活率〔四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法〕、细胞凋亡率、c-fos 蛋白表达,苏木素-伊红(HE)染色后显微镜下观察细胞形态改变,轴-铅染色后透射电镜下观察细胞超微结构改变。结果 谷氨酸损伤组细胞存活率明显低于空白对照组[(0.20 \pm 0.02)%比(0.97 \pm 0.03)%, P <0.01],细胞凋亡率和 c-fos 蛋白表达均明显高于空白对照组[细胞凋亡率:(9.85 \pm 0.76)%比(0.94 \pm 0.20)%,c-fos(ng/L):6.96 \pm 0.75 比 1.65 \pm 0.59,均 P <0.01]。亚低温预处理可明显逆转谷氨酸损伤细胞的存活率、凋亡率及 c-fos 水平,且以亚低温联合丙泊酚预处理作用最为明显[存活率:(0.80 \pm 0.04)%比(0.20 \pm 0.02)%,凋亡率:(2.26 \pm 0.54)%比(9.85 \pm 0.76)%,c-fos(ng/L):2.98 \pm 0.46 比 6.96 \pm 0.75,均 P <0.01]。显微镜下观察细胞形态发现,空白对照组大部分细胞形态大致正常;谷氨酸损伤组较多细胞质呈深红色,核呈蓝黑色,固缩状态,轴突萎缩明显,个别细胞突起断裂,细胞数量锐减;各预处理组细胞数量减少不明显,可见少量凋亡细胞。透射电镜下观察细胞超微结构发现,空白对照组神经细胞超微结构无明显改变;谷氨酸损伤组细胞质内细胞器数量明显减少,线粒体严重肿胀、嵴消失,呈空泡化或固缩,粗面内质网严重扩张,核膜局部出现囊样改变,甚至溶解断裂,染色质浓缩、凝集在核膜周边;各预处理组病理改变较谷氨酸损伤组明显减轻。结论 亚低温预处理能降低体外培养谷氨酸对大鼠大脑皮质神经细胞的损伤,且亚低温联合丙泊酚预处理组的保护作用更好。

【关键词】 亚低温; 预处理; 谷氨酸; 脑皮质细胞; 依达拉奉; 丙泊酚; 脑保护

The protective effect of mild hypothermia pretreatment against injury to primary cultured cortical neurons induced of rat by glutamate Bo Fengshan*, Wang Difen, Liu Wenyue, Fu Jiangquan. *Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China
Corresponding author: Wang Difen, Email: 1078666485@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of mild hypothermia preconditioning against ischemia/reperfusion (I/R) injury of cultured primary cortical rats neurons, and to compare the protective effect of mild hypothermia only and with its combination with drugs. **Methods** Cortical neurons of neonatal Sprague-Dawley (SD) rat within 24 hours after birth were harvested and cultured in vitro. On the 3rd day, the cells were cultured in a medium containing 2.5 mg/L cytosine arabinoside to inhibit the growth of glial cells and fibroblast. Having cultured for 6 days they were randomly divided into blank control group, glutamate damaged group (cultured with 200 μ mol/L glutamate for 0.5 hour after washing), mild hypothermia preconditioning group (cultured under 33.5 $^{\circ}$ C for 24 hours before injury induced by glutamate), mild hypothermia combining with edaravone preconditioning group, and the hypothermia combining with propofol preconditioning group (medium containing 100 μ mol/L edaravone and 3 mg/L propofol). They were cultured under 33.5 $^{\circ}$ C for 24 hours before injury induced by glutamate. After 24 hours of culturing in various medium, apoptosis ratio was observed by flow cytometry. Cell surviving rate was determined with methylthiazoletrazolium (MTT), c-fos protein expression was assayed, and morphologic change of cells with hematoxylin-eosin (HE) staining under the microscope, and ultrastructure changes were observed after uranyl acetate and lead citrate staining under transmission electron microscope. **Results** The apoptosis ratio and c-fos protein in glutamate damaged group were significantly higher than those in blank control group [apoptosis ratio: (9.85 \pm 0.76)% vs. (0.94 \pm 0.20)%, c-fos

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.04.013

基金项目:贵州省科技计划基金项目(20103079);贵州省贵阳市科学技术计划基金项目(2010116)

作者单位:550004 贵州,贵阳医学院附属医院重症医学科〔薄丰山(现在解放军第一〇七医院麻醉科工作)、

王迪芬、付江泉〕;河北沧州市人民医院急诊 ICU(刘文悦)

通信作者:王迪芬,Email:1078666485@qq.com

(ng/L): 6.96 ± 0.75 vs. 1.65 ± 0.59 , both $P < 0.01$], the cell surviving rate was significantly lower than that in blank control group [(0.20 ± 0.02)% vs. (0.97 ± 0.03)%, $P < 0.01$]. Mild hypothermia preconditioning reversed surviving rate, apoptosis ratio and c-fos protein, and the effect of hypothermia combining with propofol preconditioning was obviously better [cell surviving rate: (0.80 ± 0.04)% vs. (0.20 ± 0.02)%, apoptosis ratio: (2.26 ± 0.54)% vs. (9.85 ± 0.76)%, c-fos (ng/L): 2.98 ± 0.46 vs. 6.96 ± 0.75 , all $P < 0.01$]. The morphology of cortical neurons in blank control group was normal. Most of the cells in glutamate damaged group showed bluish black cytoplasm with pyknic nuclei, with crimped axons and of them were fractured, and cell number was obviously decreased. In each pre-conditional groups, decrease in cell number was unobvious, and only a few cells showed apoptosis. Under transmission electron microscope, it was found that cell membrane, mitochondria and rough endoplasmic reticulum were intact in blank control group, but with reduction in organelles, severely swollen mitochondria, even with formation of vacuole or pyknosis, serious dilation of rough endoplasmic reticulum, with loss of cristae with loss of vacuoles or pyknosis, and marked dilatation of internal reticular endoplasm, and loss of cristae with vacuolation and chromatin were observed under electron microscope in glutamate damaged group. Compared with the glutamate damaged group, these pathologic changes were markedly alleviated in protected groups. **Conclusions** Mild hypothermia preconditioning can inhibit glutamate-induced injury to cortical neurons. The protective effect of mild hypothermia combined with propofol is better.

[Key words] Mild hypothermia; Pretreatment; Glutamate; Cortical neurons; Edaravone; Propofol; Protection of brain

国际上将低温分为轻度(33~35℃)、中度(28~32℃)、深度(17~27℃)、超低温(16℃以下)4种。但32℃以下的低温容易引起低血压、心律失常和凝血障碍等严重并发症,从而限制了其在临床中的应用。Busto等^[1]首次提出了全身亚低温(32~35℃)的脑保护作用显著,随后相关研究人员将亚低温引入各动物实验和临床试验,结果显示亚低温能减轻重要器官损害程度,修复器官功能,同时减少并发症的发生^[2-4],目前亚低温在心肺复苏和外科领域中应用广泛。

有学者在动物实验中发现,用亚低温预处理大鼠局灶性脑缺血,可以减轻脑缺血/再灌注(IR)损伤^[5]。有研究显示,脑中心体温每降低1℃,脑代谢率降低6%~7%,脑缺血区的氧供得以改善,颅内压也降低^[6]。亚低温预处理能提高成体神经元存活率已在很多实验中得到证实,而亚低温对体外培养的神经细胞是否同样具有保护作用未见报道。本课题组将体外培养的大脑神经细胞引入亚低温干预,检测亚低温预处理对脑保护作用是否有效,对比联合丙泊酚^[7]和依达拉奉^[8-9]预处理的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂: 出生24h内SD大鼠〔由贵阳医学院实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(黔)2002-0001〕;胎牛血清(天津市灏洋生物制品科技有限公司);DMEM/F12培养基(美国英杰公司);依达拉奉(南京先声东元制药有限公司);丙泊酚(英国阿斯利康公司);四甲基偶氮唑盐(MTT)细胞增殖细胞毒性检测试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物科技发展有限公司);大鼠c-fos酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国R&D公司)。

1.2 大鼠大脑皮质神经细胞原代培养: 取新生的SD大鼠双侧大脑皮质,剪成1mm×1mm×1mm左右的小块,经胰蛋白酶消化后,调整细胞密度为(1~10)×10⁵个/L,接种于培养板、盖玻片、培养瓶中,置于33.5℃、5%CO₂培养箱中孵育;第3天用阿糖胞苷(浓度为2.5mg/L)培养基换液,以抑制非皮质神经细胞生长,减少其对检验结果的干扰;第6天进行实验分组。

1.3 实验分组: 随机分为空白对照组(A组)、谷氨酸损伤组(B组)、亚低温预处理组(C组)、亚低温联合依达拉奉预处理组(D组)、亚低温联合丙泊酚预处理组(E组)5组。

1.4 亚低温及药物预处理: 将脑皮质神经细胞置于孵箱中培养6d,C组更换培养基后放入33.5℃CO₂孵箱中培养24h;D、E组分别更换为含100μmol/L依达拉奉或3mg/L丙泊酚培养基。然后将细胞置入33.5℃CO₂孵箱中继续培养24h。

1.5 谷氨酸毒性神经细胞损伤模型的建立: 将各组培养7d的神经细胞去掉原培养基,使用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗2遍后,A组加入正常培养基,B、C、D、E组加入含谷氨酸(终浓度200μmol/L)的无血清培养基作用0.5h,加入细胞培养基。

1.6 检测指标及方法: 各组细胞生长至第9天时用于检测。

1.6.1 神经细胞存活率: 采用MTT法,按照细胞增殖细胞毒性检测试剂盒使用说明在酶标仪中测量吸光度(A)值,计算神经细胞的存活率。

1.6.2 膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啉(Annexin V-FITC/PI)双染法检测细胞早期凋亡: 取各组已接种培养瓶的神经皮质细胞,制成悬浮细胞,

按照试剂盒说明书用流式细胞仪测定细胞凋亡率。

1.6.3 c-fos 蛋白检测: 去掉培养基, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 用巴士吹打管吹打细胞至细胞膜破裂, 离心后取上清液, 按照试剂盒说明书加入检测试剂, 在波长 450 nm 处测定各孔的 A 值, 根据标准曲线换算出各样本的 c-fos 浓度。

1.6.4 神经细胞形态学改变: 用 PBS 清洗盖玻片 3 次, 无水乙醇固定细胞, 置于 PBS 中清洗; 苏木素染色神经细胞; 用蒸馏水冲洗掉残留在细胞外的苏木素后置于伊红中染色; 封片后光镜下观察细胞的形态学改变。

1.6.5 透射电镜下观察神经细胞超微结构: 取各组已接种培养瓶的神经皮质细胞, 饿酸固定, 环氧树脂包埋, 轴 - 铅染色, 透射电镜下观察。

1.7 统计学处理: 使用 SPSS 18.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析中的最小显著差异法 (LSD) 进行检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经细胞存活率(表 1): 谷氨酸损伤组神经细胞存活率较空白对照组明显降低 ($P < 0.01$)。与谷氨酸损伤组比较, 各预处理组细胞存活率明显升高 (均 $P < 0.01$); 其中亚低温联合丙泊酚预处理组明显高于亚低温和亚低温联合依达拉奉预处理组 (均 $P < 0.05$), 且接近空白对照组水平。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率: 图 1 右下象限代表早期凋亡细胞, 左下象限代表正常活细胞, 右上象限代表晚期凋亡细胞, 左上象限代表细胞死亡后的碎片。表 1 结果显示, 谷氨酸损伤组细胞早期凋亡率较空白对照组明显升高 ($P < 0.01$)。各预处理组细胞早期凋亡率均较谷氨酸损伤组明显降低 (均 $P < 0.01$); 其中亚低温联合丙泊酚预处理组降低更为明显 (均 $P < 0.05$)。

表 1 各组体外培养乳鼠大脑皮质神经细胞存活率、早期凋亡率及 c-fos 蛋白比较 ($\bar{x} \pm s$)

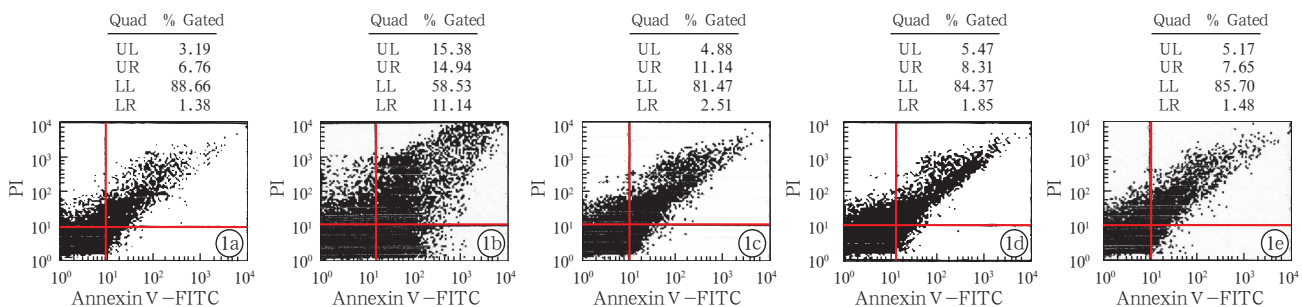
组别	样本数	细胞存活率(%)	早期凋亡率(%)	c-fos 蛋白(ng/L)
A 组	8	0.97 ± 0.03	0.94 ± 0.20	1.65 ± 0.59
B 组	8	0.20 ± 0.02 ^a	9.85 ± 0.76 ^a	6.96 ± 0.75 ^a
C 组	8	0.63 ± 0.03 ^b	2.78 ± 0.47 ^b	4.76 ± 0.47 ^b
D 组	8	0.67 ± 0.03 ^{bc}	2.58 ± 0.51 ^{bc}	3.95 ± 0.41 ^{bc}
E 组	8	0.80 ± 0.04 ^{bcd}	2.26 ± 0.54 ^{bcd}	2.98 ± 0.46 ^{bcd}

注: A 组为空白对照组, B 组为谷氨酸损伤组, C 组为亚低温预处理组, D 组为亚低温联合依达拉奉预处理组, E 组为亚低温联合丙泊酚预处理组; 与 A 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.01$; 与 C 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 D 组比较, ^d $P < 0.05$

2.3 c-fos 蛋白(表 1): 谷氨酸损伤组 c-fos 蛋白水平较空白对照组明显升高 ($P < 0.01$)。与谷氨酸损伤组比较, 各预处理组 c-fos 蛋白水平均明显降低 (均 $P < 0.01$); 其中亚低温联合丙泊酚预处理组较亚低温和亚低温联合依达拉奉预处理组降低更为明显 (均 $P < 0.05$)。

2.4 细胞形态改变(图 2): 在高倍光镜下观察到空白对照组细胞形态大部分正常, 极少数细胞胞质呈深红色, 细胞核呈蓝黑色; 而谷氨酸损伤组神经细胞大部分胞质呈深红色, 细胞核呈蓝黑色, 同样放大倍数的光镜下能观察到的细胞数量明显减少; 而其余 3 组除能见到少数细胞呈现凋亡状态外, 大部分细胞病理形态改变不明显。

2.5 细胞超微结构改变(图 3): 透射电镜下空白对照组大部分神经细胞膜完整, 细胞器基本完整; 而谷氨酸损伤组神经细胞内细胞器数量锐减, 线粒体严重肿胀、嵴消失, 表现为空泡化或固缩状态; 细胞核膜局部可见囊性变, 呈溶解状态或断裂状态, 染色质浓缩, 靠近核膜聚集; 各预处理组神经细胞的细胞器超微结构改变明显减轻, 大部分细胞线粒体结构完整, 少数线粒体发生髓样化、空泡化改变, 粗面内质网结构无明显异常, 核膜规整无异样。



注: a 为空白对照组, b 为谷氨酸损伤组, c 为亚低温预处理组, d 为亚低温联合依达拉奉预处理组, e 为亚低温联合丙泊酚预处理组, Annexin V-FITC 为膜联蛋白 V - 异硫氰酸荧光素, PI 为碘化丙啶; 右下象限(LR)为早期凋亡细胞, 左下象限(LL)为正常活细胞, 右上象限(UR)为晚期凋亡细胞, 左上象限(UL)为细胞死亡后的碎片

图 1 流式细胞仪检测各组乳鼠大脑皮质神经细胞早期凋亡情况

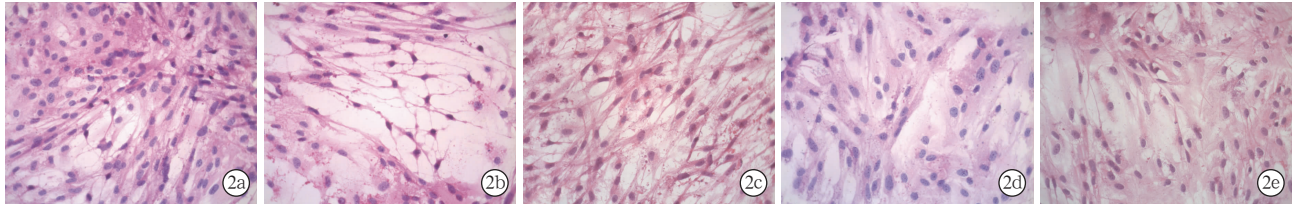


图 2 光镜下观察各组体外培养乳鼠大脑皮质神经细胞形态学改变 空白对照组(a)大部分细胞形态基本正常,胞质呈淡红色,核呈蓝色;极少数细胞胞质呈深红色,核呈蓝黑色,核固缩。谷氨酸损伤组(b)可见较多细胞胞质呈深红色,核呈蓝黑色,核固缩,细胞数量明显减少。亚低温预处理组(c)、亚低温联合依达拉奉预处理组(d)、亚低温联合丙泊酚预处理组(e)细胞数量均减少不明显,细胞基本联成网状 HE 高倍放大

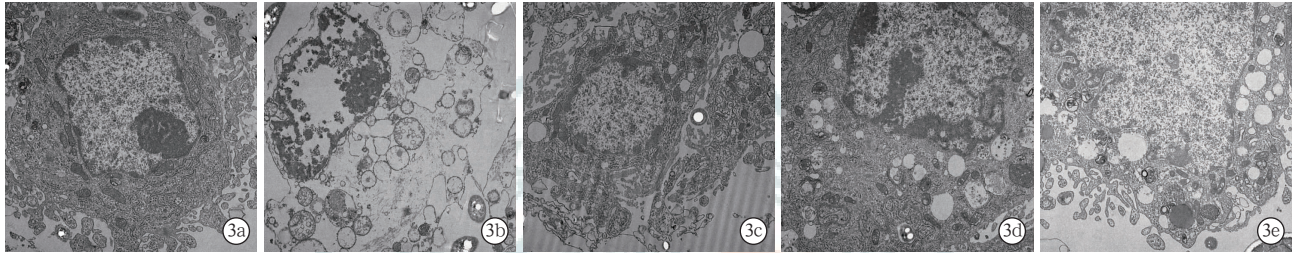


图 3 透射电镜下观察各组体外培养乳鼠大脑皮质神经细胞超微结构改变 空白对照组(a)细胞器形态大致完整;谷氨酸损伤组(b)细胞质内细胞器数量明显减少,线粒体出现严重肿胀、嵴消失,呈空泡样或固缩;亚低温预处理组(c)、亚低温联合依达拉奉预处理组(d)、亚低温联合丙泊酚预处理组(e)病理改变较谷氨酸损伤组(b)明显减轻,粗面内质网结构基本完整,核膜完整 铀-铅染色 $\times 2000$

3 讨论

脑 I/R 损伤机制中除有氧自由基、细胞内钙超载、中性粒细胞活化、ATP 生成障碍外,更重要的是兴奋性氨基酸(EAA)的神经毒性作用^[10]。作为 EAA 中最主要的氨基酸——谷氨酸,过量的谷氨酸作用于树突受体导致突触后神经元过度兴奋,通过渗透性损伤和钙依赖性损伤机制,导致神经细胞损伤甚至死亡^[11]。不同浓度谷氨酸诱导的体外培养的神经元细胞表现为不同的结局:发生神经细胞坏死需要高浓度谷氨酸长时间的作用,而凋亡则需要低浓度谷氨酸短时间的作用^[12]。

神经元于伤后 0.5 ~ 1.0 h 起表达 c-fos 蛋白,随时间延长而呈现增强,最强至伤后 72 h;神经胶质细胞同样在伤后开始表达 c-fos 蛋白,表达的高峰时间在伤后 12 ~ 24 h,72 h 后逐渐减弱^[13]。研究证实疼痛、缺氧、寒冷等伤害性刺激时,c-fos 蛋白可以作为神经系统伤害性的标志物^[14]。c-fos 蛋白的双重作用表现为:参与神经细胞的凋亡和修复保护作用,这两种作用与防御系统是否被抑制有关,抑制时表现为凋亡作用,未被抑制时表现为对周围神经细胞的修复作用^[15-16]。有学者给实验动物实施了 4 h 时长的 33 °C 全身亚低温预处理,观察到缺血性锥体细胞损害明显减轻,增强表达的 Bcl-2 蛋白减弱凋亡促进蛋白 Bax 的表达,而减缓细胞凋亡^[17];高凌云等^[18]实验研究也得到相似结果。类似的大鼠脑缺血模型的

研究中,丙泊酚预处理 30 min,在大脑的不同部位 c-fos 表达量是不同的,表达最少的部位是前脑皮质、海马回和齿状回,推测丙泊酚抑制了 EAA 的释放,c-fos 基因表达被有效抑制,从而发挥神经保护作用^[19]。c-fos 在正常的中枢神经中呈低水平表达,发挥细胞的保护修复作用,Phillips 和 Belardo^[20]在大鼠海马损伤的研究中发现,c-fos 过度表达部位神经细胞凋亡明显增多,而过度表达的 c-fos 启动凋亡程序,不能修复神经反而产生继发性损伤^[15-16]。本研究中的 5 个实验组中均能检测到 c-fos 的蛋白表达,尤其是谷氨酸损伤组的浓度最高,同是该组细胞的早期凋亡率最高,推测过度表达的 c-fos 没有发挥神经细胞的修复保护作用,反而启动了凋亡程序,促进了细胞的死亡。

在缺血性脑损伤的发病机制中,氧自由基的毒性作用在众多的研究中被证实。损伤机制之一是 EAA 介导的 Ca^{2+} 通道开放,导致大量的 Ca^{2+} 内流,细胞内聚集过多的 Ca^{2+} ,导致花生四烯酸代谢水平增高,引发连锁反应,产生大量自由基,导致神经损伤。具有亲脂基团小分子依达拉奉与羟基基团结合,降低细胞内自由基浓度,削弱羟自由基对细胞的损伤^[21];依达拉奉对花生四烯酸、白细胞三烯的过氧化作用有着较强的抑制作用^[22];有效的抑制氧自由基,避免后续的损伤性病理变化,发挥神经保护作用^[23]。在本实验中,从细胞凋亡率、细胞存活率和 c-fos 蛋

白表达结果中可以观察到,亚低温联合依达拉奉预处理组比谷氨酸损伤组有着更强的保护作用,其保护作用强于单纯亚低温预处理组。

丙泊酚的神经保护作用可能与减弱缺血缺氧性损伤所导致的 ATP、钙和钾等离子的改变^[24]以及抑制脂质过氧化的抗氧化作用^[25]有关。在前脑缺血模型中,产生脑电爆发性抑制剂量的丙泊酚可影响非天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)依赖性凋亡相关基因表达,进而降低神经元的死亡数目,其脑保护作用可持续至缺血后 4 周^[26]。本研究结果显示,亚低温复合丙泊酚预处理组神经保护作用最强,作为微弱的亚低温触发神经元细胞表达产生微量的 c-fos 蛋白,通过调控相关机制,发挥神经修复保护作用,而丙泊酚则抑制 c-fos 过度表达,避免启动促凋亡机制,相加效应明显。

亚低温对体外培养的大脑皮质神经细胞能降低谷氨酸作用的损害,亚低温复合丙泊酚预处理的保护作用在所有实验组中优势明显。减轻谷氨酸的损害作用稍强的亚低温复合依达拉奉预处理组,却没有表现出相加效应,是否与样本量过少或亚低温降低了细胞新陈代谢减缓药物消除有关,有待于进一步探究。

参考文献

- [1] Busto R, Dietrich WD, Globus MY, et al. Small differences in intracerebral brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1987, 7(6):729-738.
- [2] 韩奕,李春盛. 4℃生理盐水诱导低温对猪心搏骤停复苏后肾脏的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(2):76-79.
- [3] 任文博,刘振林,赵玉军. 亚低温脑保护在重型创伤性颅脑损伤治疗中的应用[J]. *现代诊断与治疗*, 2012, 23(12):2102-2103.
- [4] 只达石,张赛,肖绪林,等. 亚低温对急性重型颅脑损伤病人治疗机理及临床疗效研究 [J]. *中华神经外科杂志*, 2001, 17(5):316-320.
- [5] 杨家斐,余新光,周定标,等. 亚低温预处理对大鼠局灶性脑缺血的保护作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20(2):185.
- [6] Farag E, Manno EM, Kurz A. Use of hypothermia for traumatic brain injury: point of view [J]. *Minerva Anesthesiol*, 2011, 77(3):366-370.
- [7] 刘辉,王迪芬,付江泉. 异丙酚和依达拉奉对脑缺血/再灌注损伤保护作用的研究比较 [J]. *中国危重病急救医学*, 2008, 20(11):691-692.
- [8] 王蔚,丁新生,肖杭,等. 依达拉奉对原代海马神经元缺氧复氧损伤的保护作用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2007, 27(4):389-393, 封 4.

- [9] 姚娜,王迪芬,宋曦,等. 依达拉奉联合异丙酚预处理对大鼠离体脑皮质细胞缺血/再灌注损伤保护作用的研究 [J]. *中国危重病急救医学*, 2012, 24(5):286-289.
- [10] Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Ann Neurol*, 1986, 19(2):105-111.
- [11] 肖献忠. 病理生理学[M]. 北京:高等教育出版社, 2004:104.
- [12] Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, et al. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(16):7162-7166.
- [13] Dragunow M, Robertson HA. Brain injury induces c-fos protein(s) in nerve and glial-like cells in adult mammalian brain [J]. *Brain Res*, 1988, 455(2):295-299.
- [14] 尹彦珍,王政伟,潘宁玲. 丙泊酚对脑缺血再灌注后 c-fos 表达的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2003, 19(11):682.
- [15] Morgan JJ, Curran T. Immediate-early genes: ten years on [J]. *Trends Neurosci*, 1995, 18(2):66-67.
- [16] Baille V, Lallemand G, Carpentier P, et al. c-fos antisense oligonucleotide prevents delayed induction of hsp70 mRNA after soman-induced seizures[J]. *Neuroreport*, 1997, 8(8):1819-1822.
- [17] 董瑞国,孙茂军,袁宝强,等. 全身亚低温对脑缺血再灌注海马 CA1 区 Bcl-2, Bax 表达影响的动态变化[J]. *徐州医学院学报*, 2003, 23(5):391-395.
- [18] 高凌云,张洪,许国英,等. 脑温不同对大鼠缺血脑组织 c-fos 和 bcl-2 表达的影响[J]. *河南实用神经疾病杂志*, 2001, 4(5):5-7.
- [19] 马文涛,杨来启,杨喜民,等. 急性应激诱导即刻早期基因 c-fos 表达的观察[J]. *解放军预防医学杂志*, 2003, 21(1):66.
- [20] Phillips LL, Belardo ET. Expression of c-fos in the hippocampus following mild and moderate fluid percussion brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 1992, 9(4):323-333.
- [21] Edaravone Acute Infarction Study Group. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2003, 15(3):222-229.
- [22] Watanabe T, Egawa M. Effects of an antistroke agent MCI-186 on cerebral arachidonate cascade [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 271(3):1624-1629.
- [23] 高传生,陈信东,王萍萍,等. 依达拉奉联合七叶皂苷钠治疗脑出血的临床观察 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2012, 19(1):36-38.
- [24] Amorim P, Chambers G, Cottrell J, et al. Propofol reduces neuronal transmission damage and attenuates the changes in calcium, potassium, and sodium during hyperthermic anoxia in the rat hippocampal slice [J]. *Anesthesiology*, 1995, 83(6):1254-1265.
- [25] Ergün R, Akdemir G, Sen S, et al. Neuroprotective effects of propofol following global cerebral ischemia in rats [J]. *Neurosurv Rev*, 2002, 25(1-2):95-98.
- [26] Engelhard K, Werner C, Eberspächer E, et al. Influence of propofol on neuronal damage and apoptotic factors after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats: a long-term observation[J]. *Anesthesiology*, 2004, 101(4):912-917.

(收稿日期:2013-12-09)

(本文编辑:李银平)

更正

本刊 2014 年第 2 期第一作者杨宏富文章“舒芬太尼对重症监护病房危重患者镇痛/镇静治疗的多中心随机对照临床研究”中第 10 位作者“孙立冬”应改为“孙立东”,作者单位为解放军第一五五中心医院,特此更正。

(本文编辑部)