

• 论著 •

血必净注射液对脂多糖诱导大鼠肾脏微血管内皮细胞组织因子表达的影响及机制探讨

李 鑫, 马晓春

(中国医科大学附属第一医院重症医学科, 辽宁 沈阳 110001)

【摘要】 目的 观察血必净注射液对脂多糖(LPS)诱导大鼠肾脏微血管内皮细胞(RMECs)组织因子(TF)表达的影响,并探讨其可能机制。**方法** 采用胰酶消化法原代培养大鼠 RMECs,用Ⅳ因子相关抗原免疫荧光法鉴定。取生长良好的 3、4 代细胞,分为对照组、LPS 刺激组和血必净治疗组;采用透射电镜观察各组细胞形态,应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测细胞内 TF mRNA 和内皮素(ET)mRNA 表达,用免疫荧光法检测核转录因子- κ B(NF- κ B)活化程度。**结果** 与对照组比较,10 mg/L LPS 刺激组电镜下可见细胞粗面内质网和高尔基体空泡变性明显;LPS(1~100 mg/L)刺激组 TF mRNA 和 ET mRNA 表达均随浓度增加显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$),NF- κ B 核移位明显;血必净(12.5、25.0、50.0 g/L)治疗组较 LPS 刺激组细胞形态明显改善,TF mRNA 和 ET mRNA 表达均明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),未观察到 NF- κ B 核移位。**结论** LPS 可呈剂量依赖性诱导 TF mRNA 和 ET mRNA 表达;血必净注射液可通过降低 TF mRNA 表达来抑制 LPS 诱导的微血管内皮细胞凝血系统的启动,其保护作用的机制可能与降低 ET mRNA 表达并抑制 NF- κ B 活化有关。

【关键词】 血必净注射液; 内毒素; 组织因子; 内皮素; 核转录因子- κ B

中图分类号: R285.5; Q344.13 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.04.008

Effect of Xuebijing injection (血必净注射液) on expression of tissue factor in renal micro-vascular endothelial cells induced by lipopolysaccharide and the possible mechanisms LI Xin, MA Xiao-chun. Critical Medicine Department, the First Hospital, Affiliated to Chinese Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China

Corresponding author: MA Xiao-chun, Email: xcma2972@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Xuebijing injection (血必净注射液) on the expression of tissue factor (TF) in renal micro-vascular endothelial cells (RMECs) induced by lipopolysaccharide (LPS) and to explore the possible mechanisms. **Methods** RMECs were isolated by means of the trypsin digestion technique, and cultured 2 to 4 passages after identification with FⅣ-related antigen immunofluorescence. The healthy cells of the third and fourth passages were collected, and they were divided into three groups: the control group, the LPS stimulating groups and the Xuebijing treated groups in various dosages. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was adopted to measure TF mRNA and endothelin (ET) mRNA expression in the cells. Immunofluorescence analysis was performed to evaluate the activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B). Transmission electron microscope was applied to observe the morphology of the cells. **Results** Compared with the control group, obvious degeneration of rough endoplasmic reticulum and golgiosome was observed in the cells that were cultured with 10 mg/L LPS by electron microscope. LPS (1 - 100 mg/L) increased TF mRNA and ET mRNA expression significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). NF- κ B apparently translocated from cytoplasm to the nucleus in the LPS stimulated groups. Xuebijing injection (12.5, 25.0, 50.0 g/L) significantly decreased TF mRNA and ET mRNA expression ($P<0.05$ or $P<0.01$), and activation of NF- κ B was not observed in the Xuebijing treated groups. **Conclusion** LPS increases TF mRNA and ET mRNA expression in a dose-dependent manner. Xuebijing injection inhibits the initial process of coagulation by decreasing the LPS-induced TF mRNA expression in the micro-vascular endothelial cells. The possible mechanisms may be related to the reduction of ET mRNA expression and the inhibition of the activation of NF- κ B.

【Key words】 Xuebijing injection; lipopolysaccharide; tissue factor; endothelin; nuclear factor- κ B

基金项目: 辽宁省教育厅基金项目(2008836)

通信作者: 马晓春, Email: xcma2972@sina.com

作者简介: 李 鑫(1983-), 女(汉族), 辽宁省人, 硕士研究生。

脓毒症时炎症介质过度释放与凝血和抗凝系统紊乱引起的血管内广泛微血栓形成是多器官功能障碍发生的重要机制。在脓毒症致急性肾损伤(AKI)的发生发展中,肾脏内皮细胞不仅被激活释放大炎症介质,同时也是炎症介质攻击的主要靶细胞^[1]。内皮素(ET)是最强烈的缩血管物质,内皮细胞粗面内质网是 ET 最重要的合成部位^[2],在应激、休克、创伤等情况下,ET 迅速释放而发挥其效能^[3],ET 含量增加是内皮损伤的重要标志。组织因子(TF)是启动外源性凝血系统的重要因子,可由激活的内皮细胞转录合成,而且其启动子区域有调控转录的核转录因子- κ B(NF- κ B)样结合位点^[4]。能否通过保护内皮细胞阻断凝血途径的启动来抑制血栓形成进而保护肾脏功能的研究还未见报道。本研究中以体外培养的肾脏微血管内皮细胞(RMECs)为模型,观察血必净注射液对脂多糖(LPS)诱导大鼠 RMECs 中 TF 表达的影响,探讨其可能机制,从而对脓毒症时肾脏保护治疗提供理论基础和新的方向。

1 材料与方法

1.1 RMECs 的分离与培养:参照 Green 的三步梯度筛网法^[5]分离肾血管球。选择 3~8 日龄 Wistar 大鼠(由中国医科大学实验动物中心提供),处死后开腹取双肾,将肾皮质剪碎置于磷酸盐缓冲液(PBS)中,收集肾血管球,经消化、离心、加含胎牛血清的 DMEM 培养液重悬后将肾血管球置于培养瓶,CO₂ 培养箱中孵育(37℃)。待细胞融合成单层时用胰酶和乙二胺四乙酸(EDTA)传代,取生长良好的 3、4 代细胞用于实验。

1.2 RMECs 的鉴定:倒置显微镜下观察分离培养的细胞,胰酶和 EDTA 消化收集细胞,戊二醛固定后作为透射电镜观察标本。胰酶消化细胞后,将细胞接种于 24 孔板中,经 PBS 清洗 3 次,多聚甲醛水溶液(pH 值 7.4)固定,曲通 X-100 作用、牛血清白蛋白封闭后加入 1:100 抗鼠 κ B 因子相关抗原多克隆抗体、加藻红蛋白(PE)标记驴抗兔 IgG、孵育等步骤后,荧光显微镜下检测。

1.3 分组和处理:将细胞分为:①对照组;②浓度效应组:不同浓度 LPS(1、10、100 mg/L)作用 24 h;③时间效应组:LPS(10 mg/L)分别作用 0、3、6、12、24 h;④血必净治疗组:不同浓度的血必净注射液(12.5、25.0、50.0 g/L)分别在 LPS 刺激前 1 h 加入各组细胞。血必净注射液由天津红日药业股份有限公司提供。

1.4 TF mRNA 和 ET mRNA 表达检测:①细胞

总 RNA 提取:按照 TRIzol 法对各组细胞提取总 RNA,沉淀用焦碳酸二乙酯(DEPC)水稀释后紫外分光光度计检测吸光度值(A_{260}/A_{280} 比值)和 RNA 浓度。②反转录:小离心管(EP 管)经 DEPC 水处理并高压灭菌后作为聚合酶链反应(PCR)管,反应体系 10 μ l。反应条件:30℃ 10 min,50℃ 25 min,99℃ 5 min,5℃ 5 min,反应结束后将样品-20℃ 保存备用。③PCR 扩增产物:按 Gene Bank 提供的方法,用 Primer Premier 5 软件设计 TF、ET 和三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物序列,由大连宝生物公司合成。PCR 反应总体积 25 μ l。TF mRNA 目的片段扩增条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,58.1℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 个循环后 72℃ 延伸 7 min。ET mRNA 目的片段扩增条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,58.8℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,32 个循环,72℃ 延伸 7 min。GAPDH mRNA 扩增条件分别与 TF mRNA 和 ET mRNA 一致,且分别与两者同时进行 PCR 反应。取 PCR 反应产物 3 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳分离,以鉴定扩增目的片段大小,凝胶成像仪采集图像并分析灰度,计算 TF、ET 与 GAPDH 的比值,以此作为各组 TF mRNA 和 ET mRNA 的相对表达量。

1.5 免疫荧光法检测 NF- κ B 活化情况:实验分为 10 mg/L LPS 刺激组和血必净 25.0 g/L 治疗组。

1.6 统计学分析:实验数据以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 13.0 软件进行数据处理,行 t 检验、SNK- q 检验和单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RMECs 鉴定:RMECs 培养 3~4 d 后在倒置显微镜下可见贴壁生长的散在集落(彩色插页图 1a),细胞以多角形或梭形为主;6 d 时可见细胞单层融合铺满培养瓶,呈铺路石状(彩色插页图 1b);传代后的细胞有相互接触连接形成血管的趋势(彩色插页图 1c)。免疫荧光法检测可见 RMECs 呈多角形,胞质 κ B 因子相关抗原表达呈强阳性,说明分离培养的细胞为 RMECs(彩色插页图 1d)。

2.2 透射电镜下观察各组细胞形态:透射电镜下可见对照组 RMECs 细胞表面有微绒毛,细胞形态良好,胞质内存在大量粗面内质网和线粒体(彩色插页图 2a),形态学上符合 RMECs 具有合成诸多复杂蛋白质的功能。LPS 10 mg/L 作用 24 h 后细胞失去正常形态,肿胀明显,核膜皱缩,粗面内质网及线粒体空泡变性明显(彩色插页图 2b)。血必净 25.0 g/L

治疗组细胞形态规则,未见粗面内质网空泡变性,线粒体空泡变性较 LPS 刺激组减轻(彩色插页图 2c)。

2.3 不同浓度 LPS 对 TF mRNA 和 ET mRNA 表达的影响(图 3):随着 LPS 浓度增高,TF mRNA 和 ET mRNA 表达逐渐上调,与相应对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

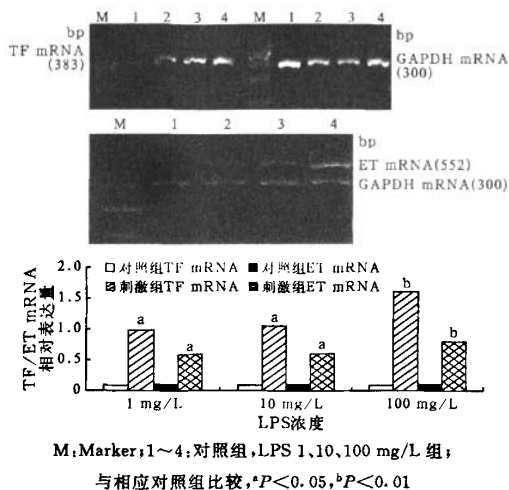


图 3 不同浓度 LPS 对 TF mRNA 和 ET mRNA 表达的影响

2.4 不同浓度血必净注射液对 TF mRNA 和 ET mRNA 表达的影响(图 4):随着血必净注射液浓度的增高,TF mRNA 和 ET mRNA 表达逐渐下调,与 LPS 刺激组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但不同浓度血必净治疗组间比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

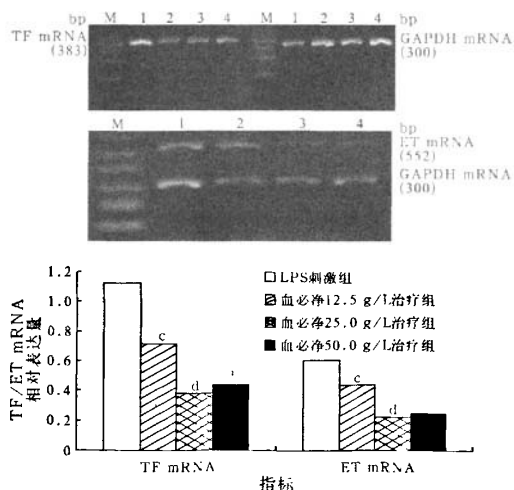


图 4 不同浓度血必净注射液对 TF mRNA 和 ET mRNA 表达的影响

2.5 血必净注射液对 LPS 作用不同时间 TF mRNA 和 ET mRNA 表达的影响(图 5~6):10 mg/L 的 LPS 作用 3 h 时 TF mRNA 达到高峰,至 24 h 仍然处于较高水平,与 0 h 时比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。血必净 25.0 g/L 治疗组在 6、12、24 h 时 TF mRNA 表达均较 LPS 刺激组显著下调(P 均 < 0.05),且在 3 h 时则尤为显著($P < 0.01$)。10 mg/L LPS 刺激组在 3、6、12、24 h 时均高水平表达 ET mRNA,与 0 h 时比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。血必净 25.0 g/L 治疗组各时间点 ET mRNA 表达均较 LPS 刺激组显著下调,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。

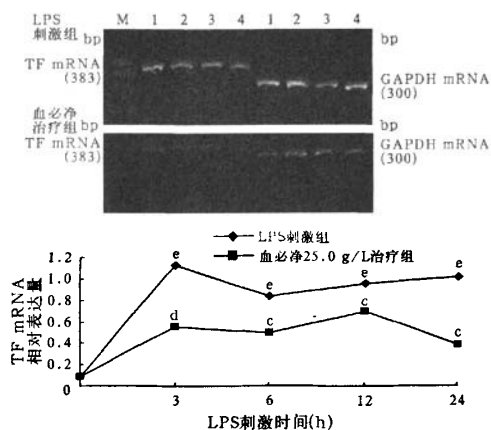


图 5 血必净注射液对 LPS 刺激不同时间 TF mRNA 表达的影响

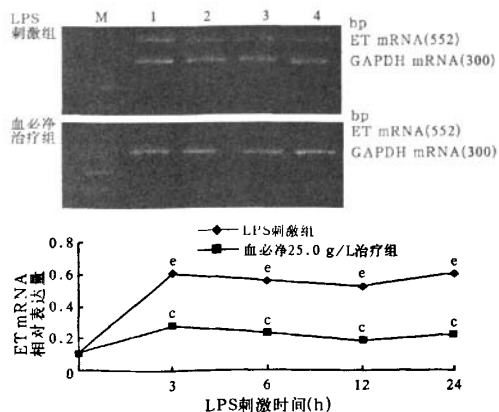
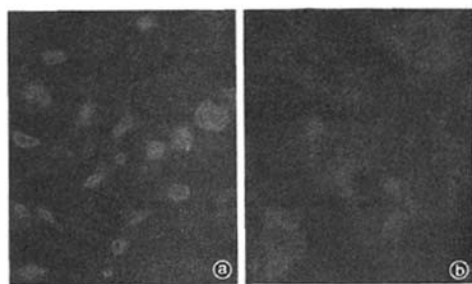


图 6 血必净注射液对 LPS 刺激不同时间 ET mRNA 表达的影响

2.6 NF- κ B 活化情况(图 7):10 mg/L 的 LPS 刺激细胞 30 min 后可明显观察到 NF- κ B 由胞质移位到胞核,血必净 25.0 g/L 治疗组未见到此现象。



①: LPS 刺激组; ②: 血必净 25.0 g/L 治疗组

图 7 各组大鼠 RMECs 中 NF-κB 核移位情况(间接免疫荧光, ×400)

3 讨论

目前数据显示,有 15%~20% 的重症监护病房(ICU)患者存在 AKI^[6],其中脓毒症所致的约占 50%,半数以上进展为急性肾功能衰竭的患者病死率接近 75%^[7]。至今人们对脓毒症 AKI 发生发展的机制知之甚少,激活的内皮细胞可以启动炎症和凝血级联反应,这是脓毒症时包括 AKI 在内的多器官功能障碍的中心环节^[8],故抑制内皮细胞活化并保护其功能的完整性是阻断脓毒症 AKI 发生发展的重要途径。

正常血管内皮具有强大的内分泌功能,同时也是抗原呈递细胞。内皮细胞可以被内毒素等激活,参与免疫应答和炎症反应的调控过程。内皮细胞也是炎症介质攻击的重要靶细胞,在兔体内注射 LPS 后,可观察到主动脉内皮细胞空泡形成和内皮的剥离及脱落^[9]。肾脏是 ET 主要的合成场所,当内皮细胞损伤时,ET 大量释放,可作为内皮损伤的标志之一。本研究显示中等浓度的 LPS 作用于体外分离培养的 RMECs,其内皮细胞粗面内质网及线粒体空泡变性明显;并发现 LPS 可呈剂量依赖性引起内皮损伤,致 ET 转录合成增加。说明在 LPS 的刺激下内皮细胞的形态和功能均受损。在内毒素等因素的刺激下,内皮细胞可以诱发表达 TF,引起凝血系统的启动。在灵长类脓毒症动物模型中,TF 大量表达于内皮细胞、中性粒细胞和激活的血小板表面^[10]。临床观察显示凝血功能明显异常的患者血清 TF 水平显著升高,并与内皮损伤并存^[11]。除此之外,TF 还有信号转导功能,参与炎症反应的病理过程^[12],说明 TF 在脓毒症凝血功能紊乱和炎症级联反应中发挥着重要作用。内毒素和细胞因子引起 TF 表达的信号转导途径与 NF-κB 的活化密切相关,有研究显示阻断 NF-κB 的活化可以使 TF 的表达受抑制^[13]。本研究结果与文献报道一致,表明 LPS 可呈

剂量依赖性诱导 RMECs 生成 TF mRNA,刺激 3 h 时 TF mRNA 和 ET mRNA 均达到高峰,且 24 h 内持续高水平表达,各时间点之间无明显差异。说明 LPS 对微血管内皮的损伤作用强烈而持久。另外,有研究显示,外源性的 TF 和 FⅢa 均能作为损伤因素引起 ET 的合成增加^[14-15],引起内皮的进一步损伤,二者的正反馈作用是 LPS 诱导内皮损伤的后续放大效应。

血必净注射液的主要成分是赤芍、川芎、丹参、红花、当归,具有拮抗内毒素的作用^[16]。动物实验表明,血必净注射液可延长脓毒症大鼠血浆凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间,从而缓解脓毒症早期血液的高凝状态,改善微循环^[17];除此之外,还可降低脓毒症早期大鼠肝、肺组织血栓调节蛋白及内皮蛋白 C 受体 mRNA 表达增幅,上调脓毒症后期(术后 48 h)两者的 mRNA 表达,从而发挥保护内皮细胞的作用^[18]。在临床研究方面,血必净注射液能降低重度颅脑损伤患者血浆 ET 水平,降低缺血、缺氧损害^[19];亦有研究显示,血必净注射液可缩短创伤后 T 淋巴细胞辅助/抑制免疫炎症调节网络紊乱或抑制的持续时间,调节免疫功能^[20]。在本研究血必净浓度效应实验中发现,25.0 g/L 的血必净注射液能有效维持内皮细胞形态的完整性,并且下调 TF mRNA 和 ET mRNA 表达的作用最明显,说明血必净注射液并非呈剂量依赖性发挥治疗作用;同时在时间效应实验中发现,血必净 3 h 治疗组较 LPS 刺激组 TF mRNA 下降更为明显,说明越早应用血必净注射液治疗越能更加有效抑制凝血系统的启动。在随后的 6 h、12 h 中,血必净治疗组 TF mRNA 的转录合成始终处于明显的抑制状态,到 24 h 达到更低水平,说明血必净注射液需要早期持续应用才能达到理想的治疗效果。进一步探讨血必净注射液下调 LPS 诱导 RMECs 表达 TF mRNA 的机制时发现,LPS 刺激 RMECs 30 min 后 NF-κB 由胞质向胞核移位明显,血必净治疗组未观察到此现象,说明血必净注射液可能通过阻断 NF-κB 的活化抑制其转录合成。但还有研究显示,LPS 诱导 TF mRNA 表达还与核转录因子激活蛋白(AP-1)和 Sp1 有关^[21]。故血必净注射液的具体治疗作用机制仍需进一步探讨。

综上所述,血必净注射液能有效抑制 LPS 诱导的 RMECs 活化和损伤,对内皮细胞具有保护作用,同时可阻断凝血系统的启动,为脓毒症 AKI 的临床治疗提供了新的途径。

参考文献

- [1] Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome [J]. *Blood*, 2003, 101 (10): 3765-3777.
- [2] Suga S, Yasui N, Yoshihara F, et al. Endothelin A receptor blockade and endothelin B receptor blockade improve hypokalemic nephropathy by different mechanisms [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(2): 397-406.
- [3] Iskit AB, Guc O. Effects of endothelin and nitric oxide on organ injury, mesenteric ischemia, and survival in experimental models of septic shock [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(10): 953-957.
- [4] Parry GC, Mackman N. Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15(5): 612-621.
- [5] Green DF, Hwang KH, Ryan US, et al. Culture of endothelial cells from baboon and human glomeruli [J]. *Kidney Int*, 1992, 41(6): 1506-1516.
- [6] Wan L, Bagshaw SM, Langenberg C, et al. Pathophysiology of septic acute kidney injury: what do we really know [J]? *Crit Care Med*, 2008, 36(4 Suppl): S198-203.
- [7] Chagnon F, Vaidya VS, Plante GE, et al. Modulation of aquaporin-2/vasopressin2 receptor kidney expression and tubular injury after endotoxin (lipopolysaccharide) challenge [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(11): 3054-3061.
- [8] Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, et al. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(3): 536-545.
- [9] Leclerc J, Pu Q, Corseaux D, et al. A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28(11): 3672-3678.
- [10] Lupu C, Westmuckett AD, Peer G, et al. Tissue factor dependent coagulation is preferentially up-regulated within arterial branching areas in a baboon model of *Escherichia coli* sepsis [J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(4): 1161-1172.
- [11] Huerta-Zepeda A, Cabello-Gutiérrez C, Cime-Castillo J, et al. Crosstalk between coagulation and inflammation during Dengue virus infection [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 99(5): 936-943.
- [12] Versteeg HH, Peppelenbosch MP, Spek CA. The pleiotropic effects of tissue factor: a possible role for factor VIIa-induced intracellular signaling [J]? *Thromb Haemost*, 2001, 86(6): 1353-1359.
- [13] Xie TX, Aldape KD, Gong W, et al. Aberrant NF-kappaB activity is critical in focal necrosis formation of human glioblastoma by regulation of the expression of tissue factor [J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(1): 5-15.
- [14] Asakura H, Okudaira M, Yoshida T, et al. Induction of vasoactive substances differs in LPS-induced and TF-induced DIC models in rats [J]. *Thromb Haemost*, 2002, 88(4): 663-667.
- [15] Sethi AS, Lees DM, Douthwaite JA, et al. Factor VIIa stimulates endothelin-1 synthesis in TNF-primed endothelial cells by activation of protease-activated receptor 2 [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2005, 108(3): 255-263.
- [16] 王今达, 雪琳. 细菌、内毒素、炎性介质并治——治疗重症脓毒症的新对策 [J]. *中国危重病急救医学*, 1998, 10(6): 323-325.
- [17] 李银平, 郑贵军, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠活化蛋白 C 及凝血功能的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(6): 361-364.
- [18] 李银平, 乔佑杰, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠血栓调节蛋白及内皮蛋白 C 受体基因表达的影响 [J]. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(6): 365-368.
- [19] 周忠东, 陆远强, 杨林, 等. 血必净注射液对严重创伤患者外周血 T 淋巴细胞亚群变化的干预研究 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(2): 108-110.
- [20] 雷鸣, 姜晓冬, 王大鹏. 血必净注射液对重度颅脑损伤患者血浆内皮素影响的研究及临床意义 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(4): 225-228.
- [21] Hirata Y, Masuda Y, Kakutani H, et al. Sp1 is an essential transcription factor for LPS-induced tissue factor expression in THP-1 monocytic cells, and nobletin represses the expression through inhibition of NF-κB, AP-1, and Sp1 activation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(7): 1504-1514.

(收稿日期: 2009-06-07)

(本文编辑: 李银平)

• 消息 •

第六次全国危重病与机械通气治疗学术交流会暨全国机械通气技术临床应用新进展高级培训班通知

中华医学会继续教育部将于 2009 年 9 月中旬在北京召开第六次全国危重病与机械通气治疗学术交流会暨全国机械通气技术临床应用新进展高级培训班(国家继续教育项目编号 2009-03-02-084), 欢迎各级医院有关人员参加征文或报名参会。

会议日期: 报到日期 2009 年 9 月 18 日, 会期: 19—21 日。

会议地点: 众品鑫酒店新楼(复兴路 26 号, 解放军总医院正门辅路往东 150 m); 电话: 010-88272999(总机)。

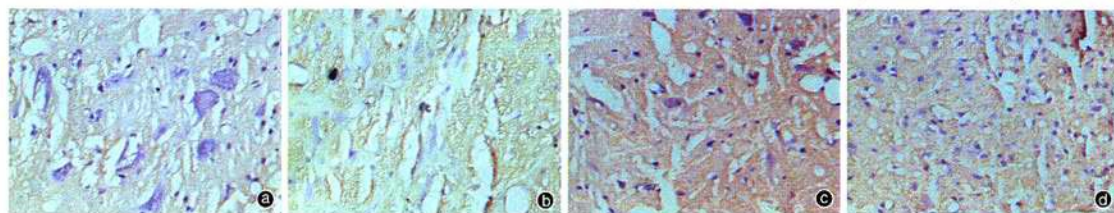
主要内容: 会议将邀请知名的危重病及机械通气专家就机械通气治疗领域(无创和有创技术)的理论和实践中的新进展、热点难点问题、不同类型的危重病患者机械通气问题, 机械通气治疗关键技术、疑难危重病及肺部疾病诊疗进行重点培训、示教和深入探讨。授课专家及讲学内容请在中华医学会网(www.cma.org.cn)继续教育栏目查找。

征文内容与要求: 危重病的诊疗, 机械通气问题, 病例报道等。全文 2 000 字左右, 或 600 字左右摘要 1 份, 务必注明工作单位、科室、姓名及邮编。来稿请寄 100710 北京东四西大街 42 号 中华医学会继续教育部“机械通气会议”梁鸿收。Email: jxjy@vip.163.com, 欢迎使用 Email 投稿(务必注明会议名称)。征文截止日期: 邮局: 8 月 20 日前, Email: 8 月 31 日前。每位代表需交纳会务费 980 元, 住宿费 150 元/d。请于会议 1 周前办理好报名后直接参会。联系方式: 杨桂芳: 010-88820399, 51798200; 梁鸿: 010-85158402; 短信报名: 13611002300。

(中华医学会继续教育部)

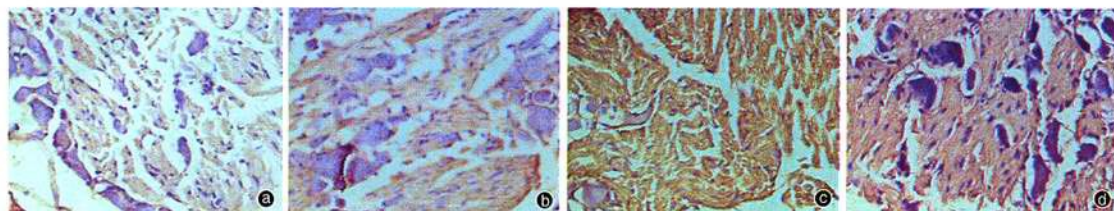
针刺内关穴对心肌缺血/再灌注损伤大鼠脊髓背角和背根神经节内5-羟色胺表达的影响

(正文见195页)



①:正常对照组; ②:假手术组; ③:模型组; ④:针刺组

图1 各组大鼠脊髓背角内5-HT阳性表达(免疫组化, ×400)

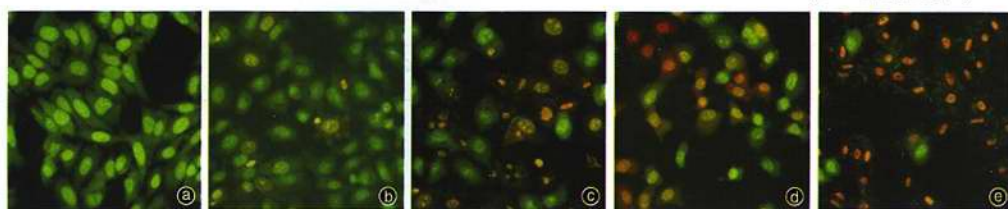


①:正常对照组; ②:假手术组; ③:模型组; ④:针刺组

图2 各组大鼠DRG内5-HT阳性表达(免疫组化, ×400)

归肝经中药对肝癌HepG2细胞增殖抑制及凋亡诱导作用的研究

(正文见199页)

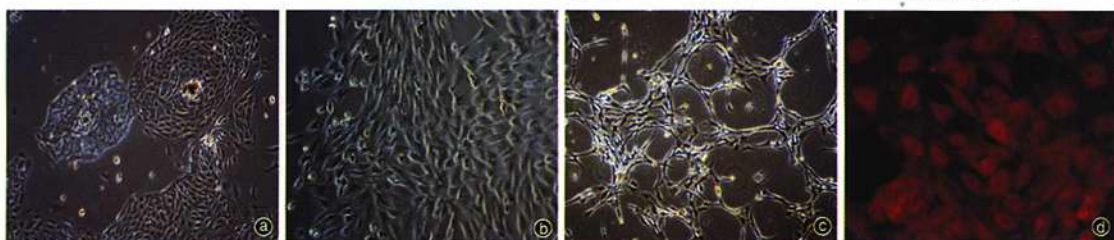


①:对照; ②:白花蛇舌草; ③:丹参; ④:水蛭; ⑤:莪术

图1 不同归肝经中药IC50药物浓度处理48 h后HepG2细胞凋亡情况(AO/EB双染, ×400)

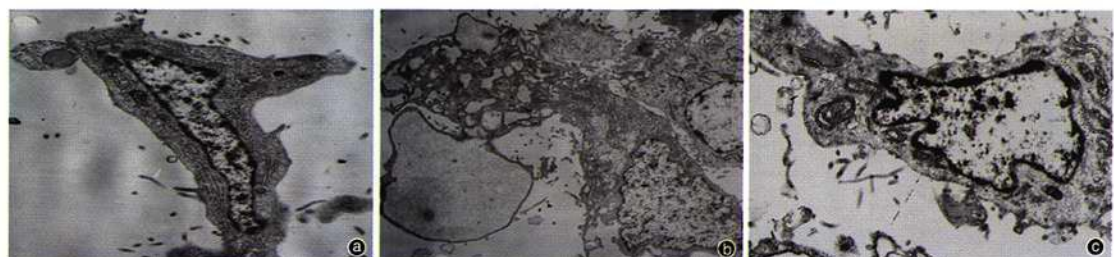
血必净注射液对脂多糖诱导大鼠肾脏微血管内皮细胞组织因子表达的影响及机制探讨

(正文见218页)



①:培养3~4 d; ②:培养6 d; ③:传代后; ④:分离培养后(间接免疫荧光)

图1 倒置显微镜下观察原代分离培养大鼠RMECs不同阶段的变化(×400)



①:对照组(×3000); ②:10 mg/L LPS作用24 h组(×5000); ③:血必净25.0 g/L治疗组(×7000)

图2 透射电镜下观察各组大鼠RMECs形态学变化(铀-铅双染)