论著

文章编号:1000-5404(2010)13-1452-04

犬缺血心肌注射肝细胞生长因子致血管新生的效应

袁侨英[1],黄 晶[2],李学军[1],司良毅[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院老年科[1];400010 重庆,重庆医科大学超声影像研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨心肌梗死犬心肌内注射不同剂量肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)基因致血管新生的分子机制。**方法** 16只体质量11~13kg、1.5岁雄性杂种犬用于实验,采用冠状动脉结扎法建立犬心肌梗死(myocardial infarction, MI)动物模型,分为4组:500 μg及1 000 μg HGF裸质粒治疗组、假手术组(Sham组)、MI无干预组($n=4$)。28 d后检测犬缺血心肌中HGF、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、CD31、血小板Ⅷ因子的表达,计算微血管计数,分析血管新生与HGF、VEGF表达的相关性。**结果** HGF基因治疗能上调心肌中CD31、VEGF的表达($P<0.01$),1 000 μg HGF治疗组VEGF、CD31 mRNA相对表达为0.82、0.39,500 μg HGF治疗组VEGF、CD31 mRNA相对表达为0.47、0.21,MI组VEGF mRNA相对表达为0.09,MI组无CD31表达。HGF增加梗死心肌的血管新生,1 000 μg、500 μg HGF治疗组以及MI组MVD分别为(126.4±10.6)、(79.8±6.0)、(21.7±2.5),差异显著($P<0.01$)。血管新生与VEGF及HGF表达呈正相关($P<0.01$),血管新生与VEGF表达均随HGF表达量递增($P<0.05$)。**结论** HGF可能通过自身的促血管新生作用,或促进内源性VEGF分泌,共同增加犬MI后缺血心肌血管新生。

[关键词] 血管新生;HGF;基因;VEGF;分子机制

[中图法分类号] R364.3; R541.02; R394.1 **[文献标志码]** A

Effect of injection with hepatocyte growth factor on angiogenesis in myocardium of dogs with myocardial ischemia

Yuan Qiaoying[1], Huang Jing[2], Li Xuejun[1], Si Liangyi[1] ([1]Department of Geriatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[Abstract] **Objective** To study the molecular mechanism of injection with hepatocyte growth factor (HGF) at different doses on angiogenesis in myocardium of dogs with acute myocardial infarction (MI). **Methods** Sixteen 1.5-year-old male hybrid dogs, weighing 11 – 13 kg, were divided into 500 μg HGF treatment group, 1 000 μg HGF treatment group, sham operation group, and no MI interference group, 4 dogs in each group. Expressions of VEGF, HGF, CD31, and platelet factor Ⅷ in myocardium of dogs with MI were detected, the number of micro blood vessels was calculated, and correlation between angiogenesis and expression of HGF and VEGF was analyzed in 28 d after the model was established. **Results** HGF gene therapy could up-regulate the expression of CD31 and VEGF. The expression of CD31 and VEGF mRNA was 0.82 and 0.39 respectively in 1 000 μg HGF group, and 0.47 and 0.21 respectively in 500 μg HGF group. The expression of VEGF mRNA was 0.09 and no expression of CD31 mRNA was found in MI group. HGF could increase the angiogenesis in infracted myocardium. The microvascular density was 126.4±10.6, 79.8±6.0, and 21.7±2.5/mm^2, respectively, in 1 000 μg HGF group, 500 μg HGF group, and MI group ($P<0.01$). The angiogenesis was positively correlated with the expression of VEGF and HGF ($P<0.01$). The angiogenesis and expression of VEGF increased with the increasing HGF dose. **Conclusion** HGF increases angiogenesis in dogs after myocardial ischemia by promoting formation of blood vessels and secretion of endogenous VEGF.

[Key words] angiogenesis; hepatocyte growth factor; gene; VEGF; molecule mechanism

Corresponding author: Si Liangyi, Tel: 86-23-68754150, E-mail: siliangyi66@163.com

在急性或慢性心肌缺血中,血管新生、冠脉侧支循环的数量是影响梗死大小的重要因素之一。应用外源性血管生长因子及其基因诱导刺激缺血组织血管新生[1,2]、治疗缺血性心脏病已取得了确切的临床疗效[3,4]。采用HGF基因治疗可以通过血管生成挽救濒死心肌,在心肌梗死中起着重要作用,但对于HGF促进血管新生的分子机制研究有待深入[5-7]。我们通过犬心肌缺血模型,初步探讨HGF增加血管新生的分子机制。

[通信作者] 司良毅,电话:(023)68754150,E-mail: siliangyi66@163.com

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

RNA 抽提试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司,RNA PCR Kit 购于 TaKaRa 公司,兔抗大鼠 VEGF、SABC 免疫组化染色试剂盒购于中山生物技术有限公司,DAB 显色试剂盒、兔抗大鼠Ⅷ因子、生物素化羊抗兔 IgG 购于武汉博士德公司,HGF ELISA 检测试剂盒购于中杉金桥公司。VEGF ELISA 检测试剂盒购于上海天呈科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及分组 16 只体质量 11 ~ 13 kg、1.5 岁同种系雄性杂种犬用于实验(购于重庆医科大学实验动物中心)。经预实验探索,用 3% 的戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉后,犬右侧卧位于手术台上,常规消毒铺单,行气管插管术,连接小动物呼吸机正压通气辅助呼吸,潮气量 25 ~ 30 ml/100 g,呼吸频率 16 ~ 20/min,吸呼比 1∶1。取胸骨正中切口开胸暴露心脏,剪开心包悬吊做心包吊床,在左室前下壁分离左冠状动脉前降支第 1 对角支,用 4-0 无创缝合丝线结扎冠脉第 1 对角支以下 0.5 cm 处,造成左室前壁和心尖部缺血,结扎后观察室壁颜色和心电图,若结扎区室壁变白,心电图 ST 段弓背抬高即判定为结扎成功,假手术组动物只穿线不结扎。建立模型后,将上述动物随机分为 4 组(n =4):假手术组(S 组)、心肌梗死组(M 组)、心肌梗死 + HGF 500 μg 组(在左室前下壁及心尖分 5 点进行心肌内注射 HGF 基因 100 μl,共 500 μg)、心肌梗死 + HGF 1 000 μg(每点注射 200 μl,共 1 000 μg)。待心跳稳定后,逐层缝合心包、胸壁,排气关胸。28 d 后麻醉犬后开胸摘取心脏,送液氮保存。

1.2.2 心肌组织总 RNA 提取和 mRNA 分离测定 解剖心脏肉眼大体观察有无心肌撕裂、穿孔、血肿,HE 染色光镜下观察心肌病理形态及微细结构的改变。按 RNA 抽提试剂盒操作步骤抽提 RNA,紫外分光法确定总 RNA 量和纯度,琼脂糖凝胶法鉴定 RNA 完整性。按照 PolyATtract mRNA Isolation System 分离纯化 mRNA。

1.2.3 心肌 CD31 及 VEGF mRNA 表达检测 PCR 反应退火温度分别是 55、57 ℃,最适循环次数均为 38 次,各自内参 β-actin 的反应体系和反应条件与所测指标相同。反应结束后,取 PCR 产物 5 μl 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用 Quantity One 4.40 图像分析系统进行图像扫描分析,分别计算 CD31/β-actin, VEGF/β-actin 值,目的片段与 β-actin 光密度比值作为目的片段 mRNA 的相对含量。

1.2.4 心肌 VEGF 免疫组织化学染色 采用 SABC 免疫组织化学法检测各组心肌石蜡切片中 VEGF 表达;VEGF 免疫组织化学相关抗原抗体浓度为 1∶100;步骤按试剂盒说明书进行。阴性对照不加一抗,采用 PBS 孵育,VEGF 蛋白表达阳性区被染成棕黄色,之后采用彩色病理图文分析系统对 VEGF 染色进行分析,每张切片任选 10 个视野进行面密度值半定量分析。

1.2.5 心肌微血管密度(microvessel density, MVD)测定 采用 SABC 法,抗Ⅷ因子相关抗原抗体浓度为 1∶100;免疫组化步骤按试剂盒说明书进行。镜检与图像分析观察心肌中血管新生的情况,低倍视野下寻找染色清晰、背景对照良好的区域,并计数心肌中的 MVD。Ⅷ因子标记后微血管染为棕黄,微血管判定标准:凡染成棕黄色的数个内皮细胞或内皮细胞簇均为 1 个血管计数,管腔大于 8 个红细胞,有较厚肌层的血管不计数;与邻近的微血管、炎性组织区分明显的棕染内皮细胞或内皮细胞丛也被看作 1 个微血管。

1.2.6 各组犬心肌 HGF 及 VEGF 蛋白表达的检测 准确称量心肌组织 100 mg,均浆后提取蛋白。用 ELISA 试剂盒指示步骤测定各组心肌组织 HGF 及 VEGF 蛋白含量,建立标准曲线,待测品孔每孔加入待测样品 100 μl。将反应板充分混匀后置 37 ℃ 120 min,洗板后加第一抗体工作液 50 μl,将反应板置 37 ℃ 60 min,洗板。随后依次加入酶标抗体工作液、底物工作液、终止液,分别测定 HGF 及 VEGF 蛋白的吸光度值。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 6.12 统计软件,两组间行 t 检验,多组间用方差分析作 q 检验,并采用直线相关与回归分析分析心肌中 EGFP mRNA 表达与 VEGF、HSP70 mRNA 表达的相关性。

2 结果

2.1 质粒抽提结果

经细菌培养扩增,抽提的 HGF 质粒 DNA 经 *Apa* Ⅰ酶切、电泳,得其酶切鉴定图谱。经 *Apa* Ⅰ酶切后质粒 DNA 线性化,显示 1 条带,其大小为 7.6 kb,符合 pcDNA3.0-HGF 的长度,纯化去除污染和毒素。

2.2 病理大体标本

术后 28 d 冠状动脉左前降支(left anterior decending coronary artery, LAD)结扎部位以下,各组均见沿 LAD 走行的左室心肌呈灰白色,形状不规则;除 Sham 组,其他各组动物均可见手术部位心包黏连。MI 模型犬均形成透壁性心肌梗死,累及左室游离壁大部分,梗死区心肌为灰白色菲薄瘢痕组织代替,质硬,有的向外膨出,形成室壁瘤,Sham 组犬心脏形态正常。

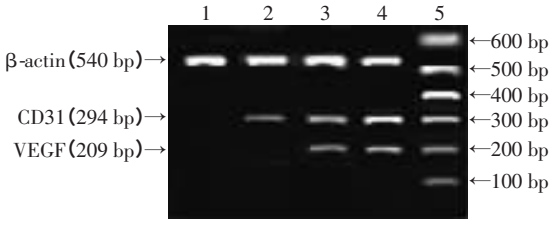
2.3 心肌 HE 染色

MI 组:梗死区心肌细胞和间质组织均发生凝固性坏死,伴有较广泛肌溶解及心肌细胞空泡变性,坏死心肌细胞被嗜伊红浓染纤维组织替代,血管新生极少或不明显,交界区心肌呈现液化性肌溶解表现,心肌细胞坏死、消失;另有部分心肌细胞增生肥大,伴有大量炎症性细胞浸润。S 组:无 MI 发生,心肌纤维结构清楚,排列整齐,无心肌细胞和间质组织坏死,无炎性细胞浸润和大小血管增生。HGF 治疗组:标本均可见明显梗死区,交界区见心肌细胞肥大增生,纤维增生较明显、排列混乱,心肌间质内有较多淋巴细胞浸润,非梗死区心肌细胞代偿性肥大。2 个 HGF 治疗组均可见较明显的新生小血管:500 μg HGF 治疗组血管数量少于 1 000 μg HGF 治疗组。

2.4 各组犬心肌中 CD31 及 VEGF mRNA 的表达

心肌中 CD31 及 VEGF 的扩增片段长度分别是:294 bp 和 209 bp,β-ACTIN 的扩增片段长度别是 540 bp,与预期设计的目的片段长度相同(图 1)。RT-PCR 结果显示:1 000 μg HGF 治疗组 VEGF mRNA 相对表达为 0.82,500 μg HGF 治疗组 VEGF mRNA 相对表达为 0.47,MI 组 VEGF mRNA 相对表达为 0.09;1 000 μg HGF 治疗组 CD31 mRNA 相对表达为 0.39,500 μg HGF 治疗组 CD31 mRNA 相对表达为 0.21,MI 组无 CD31 表达。HGF 基因治疗后能同时上调 CD31 及 VEGF mRNA 的表达。与 MI 组相比,以 1 000 μg HGF 组 CD31 及 VEGF mRNA

的表达最高,其次为500 μg HGF治疗组($P<0.01$),2个HGF治疗组间有显著性差异($P<0.01$)。MI组VEGF mRNA表达极少,未检测到CD31 mRNA的表达,Sham组未检测到CD31及VEGF mRNA的表达。



1:Sham组;2:MI组;3:1000 μg HGF组;4:500 μg HGF组;5:标准

图1 各组犬HGF基因注射部位心肌CD31及VEGF的聚合酶链反应观察

2.5 VEGF免疫组织化学染色分析

2个HGF组犬心肌中均有不同程度的VEGF蛋白表达,VEGF显色良好,在血管内皮细胞细胞质内呈棕褐色,心肌细胞核为蓝色。1 000 μg HGF治疗组的心肌组织中可见大量VEGF阳性反应的棕褐色颗粒,部分沉积在小血管内皮细胞细胞质内,有时可见棕褐色颗粒呈带状围绕血管腔,明显较500 μg HGF治疗组升高($P<0.01$);500 μg HGF治疗组棕褐色颗粒明显比MI组高($P<0.01$);1 000 μg HGF治疗组VEGF密度值是(0.114±0.091);500 μg HGF治疗组VEGF密度值是(0.086±0.065);MI组VEGF密度值是(0.012±0.011)。MI组心梗边缘区仅有少量的VEGF阳性反应的棕褐色颗粒,Sham组未见明显阳性反应的棕褐色颗粒。

2.6 各组犬心肌微血管计数

Ⅷ因子标记的免疫组化染色可更加清楚地显示实验组标本中毛细血管结构,1 000 μg HGF治疗组心梗边缘区可见多量单个血管内皮细胞、单层内皮细胞的毛细血管和较多细小新生毛细血管;500 μg HGF治疗组可见部分新生血管,明显少于1 000 μg HGF治疗组($P<0.01$);2个HGF治疗组间差异有显著意义($P<0.01$);而MI组心梗边缘区仅可见少量单个血管内皮细胞,明显少于2个HGF基因治疗组($P<0.01$);1 000 μg HGF治疗组MVD是(126.4±10.6),500 μg HGF治疗组MVD是(79.8±6.0);MI组MVD是(21.7±2.5)。Sham组未见明显毛细血管新生,未作微血管计数分析。

2.7 ELISA法检测各组犬心肌HGF及VEGF表达量

ELISA检测结果提示:1 000 μg HGF治疗组HGF及VEGF的表达量分别是(2.64±0.70)、(5.41±1.29)ng/g。500 μg HGF治疗组HGF及VEGF的表达量分别是(1.62±0.35)、(3.12±0.75)ng/g。与500 μg HGF治疗组比较,1 000 μg HGF治疗组HGF蛋白表达增加约3.3倍($P<0.01$);MI组及Sham组未检测到HGF蛋白表达。与500 μg HGF治疗组比较,1 000 μg HGF治疗组VEGF蛋白表达增加约3.3倍($P<0.01$)。MI组及sham组未检测到VEGF蛋白表达。

2.8 犬心肌中MVD、EGFP表达与HGF表达的相关性分析结果

直线相关与回归分析表明,500 μg及1 000 μg HGF治疗组犬心肌组织中VEGF表达与HGF表达呈明显正相关,r值分别为0.76、0.75($P<0.05$);心肌组织中MVD也分别与VEGF、HGF表达呈明显正相关,在500 μg HGF治疗组r分别为0.75、0.77($P<0.05$);1 000μg HGF治疗组r分别为0.75、0.77($P<0.05$)。

3 讨论

血管新生是通过血管内皮细胞增殖和迁移,从先前存在的血管处以芽生或非芽生的形式生成新的毛细血管,在维持血流灌注上起重要作用,是增加慢性缺血心肌血流的主要机制。研究表明,HGF是一种间充质合成和分泌的多功能细胞因子,具有多种生物学活性,HGF及其受体广泛分布于血管内皮系统,通过促血管新生增加梗死心肌侧支循环等作用改善MI后心室重塑[8-11]。心肌缺血时,多种因子调控血管新生是一个非常复杂的过程,正是VEGF与其他一些生长因子的协同作用,才促进心肌缺血时血管新生,形成不同程度的侧支循环。VEGF是一种对血管内皮细胞具有高度特异性的肝素结合蛋白,可以促进内皮细胞迁移和增殖;通过多个途径促进血管新生。若增加心肌细胞、血管平滑肌细胞分泌VEGF的量,有利于缺血组织血管的新生、改善心脏功能[6]。VEGF有信号肽结构,分泌受包括HGF在内的一些细胞生长因子促进和调控。因此,HGF除了本身能直接刺激培养的内皮细胞的增殖迁移,还能明显增加平滑肌细胞、胶质细胞中VEGF蛋白及其mRNA表达[12-14],并使VEGF分泌量随细胞培养时间的延长而增加,同时也增加VEGF受体蛋白的表达,通过旁分泌的方式启动血管新生,防止和减轻心肌缺血及坏死,改善心功能。Kitta等[15]在实验中观察到HGF能够增加毛细血管密度,改善缺血心肌的灌注,减少缺血心肌面积,使缺血再灌注损伤小鼠的心肌凋亡与梗死的面积显著降低,改善心功能,中和HGF抗体则使梗死面积明显扩展,增加心力衰竭导致的病死率。

我们的实验结果显示,心肌梗死犬以1 000 μg HGF治疗组血管新生最明显,其次为500 μg HGF治疗组,MI组仅见少量血管新生,而Sham组无明显血管新生。反应血管新生的指标CD31及VEGF mRNA表达也在1 000 μg HGF治疗组最高,表明除了HGF本身的促血管新生作用,也促进内源性VEGF分泌致血管新生。可以推测,HGF基因治疗组至少有2个促进血管新生的有益因素:HGF本身的促血管新生作用;HGF的增加血管新生效应也与增加VEGF表达有关,HGF通过促进VEGF分泌间接促血管新生,并且血管新生作用与HGF表达量呈显著正相关,提示在一定范围内可通过提高HGF治疗量增加血管新生。因血管生成因子的分泌、血管新生作用均是动态过程,本研究将在下一步实验中探讨血管新生的动态过程。

参考文献:

[1] Shyu K G, Wang M T, Wang B W, *et al*. Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1alpha/VP16 hybrid to enhance angiogenesis

in an acute myocardial infarction model in the rat[J]. Cardiovasc Res, 2002, 54(3): 576 – 583.
[2] Markkanen J E, Rissanen T T, Kivela A, *et al*. Growth factor-induced therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in the heart--gene therapy [J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(3): 656 – 664.
[3] Kondo I, Ohmori K, Oshita A, *et al*. Treatment of acute myocardial infarction by hepatocyte growth factor gene transfer: the first demonstration of myocardial transfer of a "functional" gene using ultrasonic microbubble destruction[J]. J Am Coll Cardiol 2004, 44(3): 644 – 653.
[4] Li X, Wang Z, Ran H, *et al*. Experimental research on therapeutic angiogenesis induced by hepatocyte growth factor directed by ultrasound-targeted microbubble destruction in rats[J]. J Ultrasound Med, 2008, 27(3): 453 – 460.
[5] Yamaguchi T, Sawa Y, Miyamoto Y, *et al*. Therapeutic angiogenesis induced by injecting hepatocyte growth factor in ischemic canine hearts [J]. Surg Today, 2005, 35(10): 855 – 860.
[6] 宋明宝, 黄岚, 蒋世忠, 等. 肝细胞生长因子对兔心肌梗死后心肌细胞凋亡及心脏功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(12): 1053 – 1055.
[7] 黑振宇, 王鲁, 金惠铭, VEGF 与原发性肝癌血管新生关系的研究进展[J]. 中国微循环, 2005, 9(4): 292 – 294.
[8] Wojta J, Kaun C, Breuss J M, *et al*. Hepatocyte growth factor increases expression of vascular endothelial growth factor and plasminogen activator inhibitor-1 in human keratinocytes and the vascular endothelial growth factor receptor flk-1 in human endothelial cells[J]. Lab Invest, 1999, 79(4): 427 – 438.
[9] Schwarz E R, Speakmann M T, Patterson M, *et al*. Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat--angiogenesis and angioma formation[J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 35(5): 1323 – 1330.
[10] Azuma J, Taniyama Y, Takeya Y, *et al*. Angiogenic and antifibrotic actions of hepatocyte growth factor improve cardiac dysfunction in porcine ischemic cardiomyopathy[J]. Gene Ther, 2006, 13(16): 1206 – 1213.
[11] Chappell J C, Song J, Klibanov A L, *et al*. Ultrasonic microbubble destruction stimulates therapeutic arteriogenesis *via* the CD18-dependent recruitment of bone marrow-derived cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(6): 1117 – 1122.
[12] Olea F D, Vera-Janave G, Cuniberti L, *et al*. Repeated, but not single, VEGF gene transfer affords protection against ischemic muscle lesions in rabbits with hindlimb ischemia[J]. Gene Ther, 2009, 16(6): 716 – 723.
[13] Miyake Y, Ohmori K, Yoshida J, *et al*. Granulocyte colony-stimulating factor facilitates the angiogenesis induced by ultrasonic microbubble destruction[J]. Ultrasound Med Biol, 2007, 33(11): 1796 – 1804.
[14] 宋明宝, 黄岚, 李爱民, 等. 肝细胞生长因子对兔心肌梗死后心肌细胞的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(14): 1255 – 1257.
[15] Kitta K, Day R M, Ikeda T, *et al*. Hepatocyte growth factor protects cardiac myocytes against oxidative stress-induced apoptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(7): 902 – 910.

(**收稿**:2009-12-03;**修回**:2010-02-17)
(编辑 龙 亮)

(上接 1451 页)

2.2 并发症情况

3 组均发生呼吸道感染、消化道出血、腹泻、电解质紊乱和多脏器功能障碍。大黄组除发生腹泻(19 例)较多外,其余均少于肠外组和肠内组。

3 讨论

神经外科危重患者处于高分解代谢状态。颅脑损伤后 2 周内未给予合理、充足营养支持的患者病死率明显高于早期营养支持患者[4]。营养不良造成组织分解、免疫紊乱,各种并发症发生率明显增加。研究表明早期营养支持对于控制颅内压,降低神经外科危重患者 APACHE Ⅱ 评分效果肯定[1]。在营养支持方式的选择上,目前认为肠内营养较全肠外营养更为安全、有效,肠内营养患者预后更佳[5,6]。但肠内营养存在营养不能完全吸收、昏迷患者胃肠运动受抑制、易发生误吸等并发症[7]。

中药大黄作用广泛,有抗炎、止血、抗病毒等作用。研究证实大黄能改善颅脑及脊髓损伤患者预后[2]。可能是由于大黄使体内液体重新分布,降低颅内压,减轻脑水肿,增加脑血流量[3]。本结果显示,大黄组在治疗第 14 天的营养指标均优于肠外组($P<0.05$),Hb 优于肠内组。以 GOS 评分结果提示大黄组的预后较另 2 组均好($P<0.05$)。而在并发症方面,呼吸道感染、消化道出血、电解质紊乱及多脏器功能障碍等情况在大黄组发生例数较另外 2 组明显减少,这是由于大黄具有收敛作用,能促进胃肠蠕动和内毒素排泄、促进胃肠吸收营养、减少炎性细胞因子和自由基释放、维护肠黏膜屏障和预防细菌移位,有效防治上消化道出血[2,3]。而大黄组腹泻的发生相对单独应用肠外或肠内营养均有所增加,在治疗过程中需注意给予对症治疗并加强护理。

参考文献:

[1] Oertel M F, Hauenschild A, Gruenschlaeger J, *et al*. Parenteral and enteral nutrition in the management of neurosurgical patients in the intensive care unit[J]. J Clin Neurosci, 2009, 16(9): 1161 – 1167.
[2] 李翠莹, 杨继庆, 顾建文. 中药大黄治疗不完全脊髓损伤的临床效果[J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(5): 336.
[3] Gu J W, Hasuo H, Takeya M, *et al*. Effects of emodin on synaptic transmission in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons *in vitro*[J]. Neuropharmacology, 2005, 49(1): 103 – 111.
[4] Cook A M, Peppard A, Magnuson B. Nutrition considerations in traumatic brain injury[J]. Nutr Clin Pract, 2008, 23(6): 608 – 620.
[5] Doig G S, Heighes P T, Simpson F, *et al*. Early enteral nutrition, provided within 24 h of injury or intensive care unit admission, significantly reduces mortality in critically ill patients: a meta-analysis of randomised controlled trials[J]. Intensive Care Med, 2009, 35(12): 2018 – 2027.
[6] Schaefer S E, Burns D L. Nutrition Support in Intensive Care[M]//O Donnell, J M, Nacul F E. Surgical Intensive Care Medicine. Second Edition, Berlin: Springer, 2010: 407 – 417.
[7] Woo S H, Finch C K, Broyles J E, *et al*. Early vs Delayed Enteral Nutrition in Critically Ⅲ Medical Patients[J]. Nutrition in Clinical Practice, 2010, 25(2): 205 – 211.

(**收稿**:2010-04-22;**修回**:2010-06-01)
(编辑 汪勤俭)