文章编号:1000-5404(2014)19-1991-05

论著

重组人 p66Shc 腺病毒抑制 HeLa 细胞增殖的机制研究

杨晓姗[1],林雅军[2],魏 洁[2],胡 刚[2],徐 蓉[1],许晓东[3],马桂蕾[1],孙洪范[1] (300192 天津,北京协和医学院中国医学科学院生物医学工程研究所,天津市生物医学材料重点实验室[1];100730 北京,卫生部北京医院:卫生部北京老年医学研究所,卫生部老年医学重点实验室[2],血液科[3])

[摘要] **目的** 探讨重组人 p66Shc 腺病毒(Adeno X-p66Shc)对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的抑制作用及机制。**方法** MTT 法检测细胞活力,DCFH-DA 荧光探针检测活性氧(ROS)生成;ELISA 检测 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)含量;Annexin V-FITC/PI 荧光染色检测细胞凋亡率;Western blot 检测相关蛋白表达;免疫共沉淀检测 p66Shc 与 p53 之间相互作用。**结果** 重组人 p66Shc 腺病毒呈剂量依赖性地抑制 HeLa 细胞增殖($P<0.05$),而 N-乙酰半胱氨酸能够阻断重组人 p66Shc 腺病毒的作用。p66Shc 能引起细胞 ROS 水平显著上升($P<0.05$),同时伴随 8-OHdG 含量的升高($P<0.05$);p66Shc 能引起 p53 蛋白和 CyclinB1 蛋白表达及 p53 磷酸化修饰(p-p53)显著升高($P<0.05$),但免疫共沉淀实验结果显示 p66Shc 与 p53 并非直接结合,提示 p66Shc 通过其他信号分子间接调控 p53 的表达及活性。**结论** 重组人 p66Shc 腺病毒通过使 HeLa 细胞 ROS 水平上升,引起 DNA 氧化损伤,从而诱导 p53 表达及其磷酸化修饰升高抑制 HeLa 细胞增殖。

[关键词] p66Shc;HeLa 细胞;活性氧;p53
[中图法分类号] R73-362; R730.23; R737.33 [文献标志码] A

Recombinant adenovirus of human p66Shc inhibits proliferation in HeLa cells

Yang Xiaoshan[1], Lin Yajun[2], Wei Jie[2], Hu Gang[2], Xu Rong[1], Xu Xiaodong[3], Ma Guilei[1], Sun Hongfan[1] ([1]Institute of Biomedical Engineering, Tianjin Key Laboratory of Biomaterial Research, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin, 300192; [2]Beijing Institute of Geriatrics, Key Laboratory of Geriatrics, [3]Department of Hematology, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing, 100730, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the inhibitory effect of a recombinant adenovirus of human p66Shc (Adeno X-p66Shc) on the proliferation of human cervical cancer HeLa cells and investigate the possible underlying mechanism. **Methods** The Hela cells were infected with Adeno X-LacZ and Adeno X-p66Shc respectively. The cells without infection served as blank control. Cell viability was analyzed by MTT assay. Reactive oxygen species (ROS) was measured by DCFH-DA fluorescent probes and flow cytometry. The levels of 8-OHdG were detected by ELISA assay. Cell apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI staining. Western blotting was used to observe the expression of associated proteins. Co-immunoprecipitation (Co-IP) was used to investigate the possible interaction between p66Shc and p53. **Results** MTT assay showed that the proliferation of HeLa cells was significantly suppressed ($P<0.05$) by Adeno X-p66Shc in a dose-dependent manner, and its inhibition could be blocked by N-acetyl-L-cysteine. Meanwhile, the levels of ROS and 8-OHdG were significantly increased after Adeno X-p66Shc infection ($P<0.05$). The expression of p53, Cyclin B1 and p-p53 was up-regulated with the over-expression of p66Shc, but the result of Co-IP demonstrated that p66Shc and p53 were not directly combined, suggesting the expression and activity of p53 was regulated by other molecular activated by p66Shc. **Conclusion** Adeno X-p66Shc induces ROS generation and DNA oxidative damage, and up-regulates the expression of p53 and p-p53, and thereby inhibits the proliferation of HeLa cells.

[**Key words**] p66Shc; HeLa cells; reactive oxygen species; p53

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81001439). Corresponding author: Sun Hongfan, Tel: 86-20-87890153, E-mail: sunhf@bme.org.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(81001439)
[通信作者] 孙洪范,电话:(020)87890153,E-mail: sunhf@bme.org.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140807.1555.003.html(2014-08-07)

p66Shc是调节体内活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平、诱导细胞凋亡以及与寿命相关的多功能蛋白。研究认为p66Shc可促进线粒体中的活性氧生成,在糖尿病、动脉粥样硬化、内皮功能损伤等与氧化损伤密切相关的疾病的发生、发展中起重要作用[1-3]。p66Shc还可通过抑制MAPK通路发挥细胞增殖抑制作用[4]。在肿瘤细胞中,有研究者认为p66Shc可抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡[5]。为了观察p66Shc对肿瘤细胞的抑制作用,我们将前期构建的人重组p66Shc腺病毒[6]感染人宫颈癌HeLa细胞,观察p66Shc高表达对HeLa细胞增殖的抑制作用及机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

重组人p66Shc腺病毒由本室应用腺病毒构建系统Adeno-X Adenoviral System3(CMV,Clontech公司,美国)自行构建,经酶切及测序鉴定构建成功[6];MTT和DCFH-DA荧光探针(Sigma公司,美国);N-乙酰半胱氨酸(NAC,碧云天生物技术研究所,江苏);人8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)酶联免疫分析试剂盒(北京科盈美科技有限公司,北京);Annexin Ⅴ-FITC/PI凋亡检测试剂盒(Promega公司,美国);Protein A/G Agarose(Santa Cruz公司,美国);p66Shc抗体(BD Biosciences公司,美国);p53、p-p53、Bax和Bcl-2抗体(Cell Signaling Technology公司,美国),其余抗体(Epitomics公司,美国)。人宫颈癌HeLa细胞本室保存;DMEM高糖培养基、胎牛血清(HyClone公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 人宫颈癌HeLa细胞在含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,置于5% CO_2、37 ℃及饱和湿度的培养箱中培养传代。取对数生长期的细胞用于实验。实验分为空白对照组(不感染腺病毒)、阴性对照组(感染Adeno X-LacZ)和治疗组(感染Adeno X-p66Shc)。

1.2.2 MTT比色法测定不同感染剂量下的细胞增殖活性和NAC对其拮抗作用 阴性对照组和治疗组分别设5个感染剂量组(MOI分别为10、50、100、150和200),治疗组增设Adeno X-p66Shc(MOI分别为50、100、150和200)+NAC(2 mmol/L)。感染48 h后,加MTT继续培养4 h,弃培养液,每孔加DMSO 150 μL终止反应,振荡,酶标仪检测各孔570 nm处的光密度值[D(570)]。

1.2.3 DCFH-DA荧光探针结合流式细胞仪检测细胞内ROS水平 细胞接种于6孔板贴壁后,阴性对照组和治疗组按MOI=100分别加入Adeno X-LacZ和Adeno X-p66Shc,感染48 h后2 mL PBS/孔洗涤细胞1次,加入1 mL稀释后的DCFH-DA荧光探针,孵箱内避光孵育30 min。胰酶消化细胞,吹打使细胞分散,离心弃上清。PBS洗涤细胞并离心,用500 μL PBS重悬细胞,吹散细胞后200目滤网过滤,流式细胞仪检测分析。

1.2.4 细胞内8-OHdG含量的测定 细胞接种于6孔板贴壁后,阴性对照组和治疗组按MOI=100分别加入Adeno X-LacZ和Adeno X-p66Shc,感染48 h后按照试剂盒说明书要求,检测并计算待测细胞培养上清及裂解液中8-OHdG含量。

1.2.5 Annexin Ⅴ-FITC/PI荧光染色结合流式细胞仪检测细胞凋亡率 细胞接种于培养瓶中贴壁后,阴性对照组和治疗组按MOI=100分别加入Adeno X-LacZ和Adeno X-p66Shc,感染48 h后收集细胞,分别加入5 μL FITC标记的Annexin Ⅴ和5 μL PI,室温避光孵育后,200目滤网过滤,流式细胞仪检测分析。

1.2.6 Western blot检测相关蛋白表达水平 将对数生长期的HeLa细胞接种于细胞培养瓶中,感染Adeno X-p66Shc 48 h后,消化收集细胞,提取总蛋白,采用Western blot检测各蛋白表达情况。

1.2.7 免疫共沉淀反应 将对数生长期的HeLa细胞接种于75 cm^2细胞培养瓶中,按MOI=100加入Adeno X-p66Shc,感染48 h后在非变性条件下提取总蛋白,将抗p66Shc和抗p53抗体分别加到总蛋白提取物中,用偶联了琼脂糖珠的Protein A/G分离抗原抗体复合物。沸水浴5 min变性,进行Western blot检测。

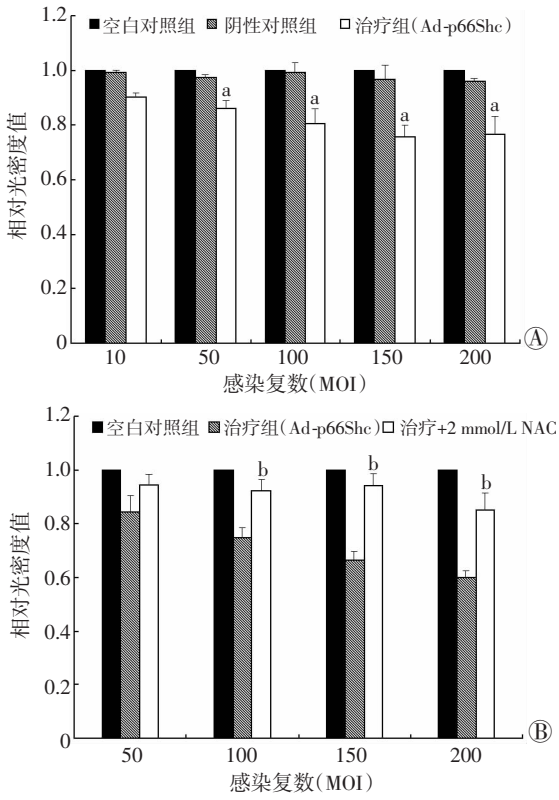
1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 12.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

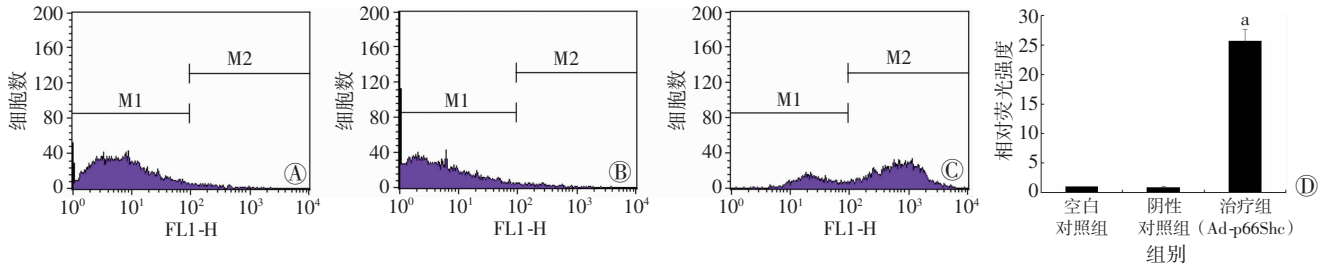
2.1 Adeno X-p66Shc对HeLa细胞增殖的抑制作用

与空白对照组相比,治疗组Adeno X-p66Shc的MOI为50时,HeLa细胞的增殖活性即出现明显下降($P<0.05$),且Adeno X-p66Shc对HeLa细胞增殖的抑制作用随感染剂量的增加而增强。而阴性对照Adeno X-LacZ的各个剂量组和空白对照相比,HeLa细胞的增殖活性均无统计学差异($P>0.05$,图1A)。当应用2 mmol/L NAC与不同浓度Adeno X-p66Shc共同处理HeLa细胞时,Adeno X-p66Shc抑制细胞增殖的作用被阻断($P<0.05$,图1B)。



A: Adeno X-p66Shc对HeLa细胞增殖的抑制作用;B: NAC阻断Adeno X-p66Shc对HeLa细胞增殖的抑制 a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与治疗组(Ad-p66Shc)比较

图1 MTT法检测HeLa细胞的增殖活性



A：空白对照组；B：阴性对照组；C：治疗组（Ad-p66Shc）；D：细胞内 ROS 含量统计分析　a：$P<0.05$，与空白对照组比较

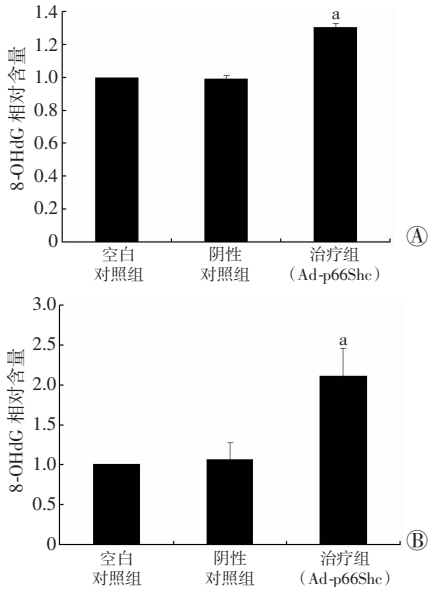
图 2　感染 Adeno X-p66Shc 后 HeLa 细胞的 ROS 水平

2.2　Adeno X-p66Shc 升高 HeLa 细胞内活性氧水平

与空白对照组和阴性对照组相比，Adeno X-p66Shc 感染 HeLa 细胞 48h 后，细胞内 ROS 生成的量显著升高（$P<0.05$），阴性对照组与空白对照组相比无显著差异（$P>0.05$，图 2）。

2.3　Adeno X-p66Shc 升高 8-OHdG 的含量

与空白对照组和阴性对照组相比，Adeno X-p66Shc 感染 HeLa 细胞 48 h 后，细胞培养上清和细胞裂解液中 8-OHdG 的含量显著升高（$P<0.05$，图 3）。



a：$P<0.05$，与空白对照组比较

A：培养上清中 8-OHdG 含量；B：细胞裂解液中 8-OHdG 含量

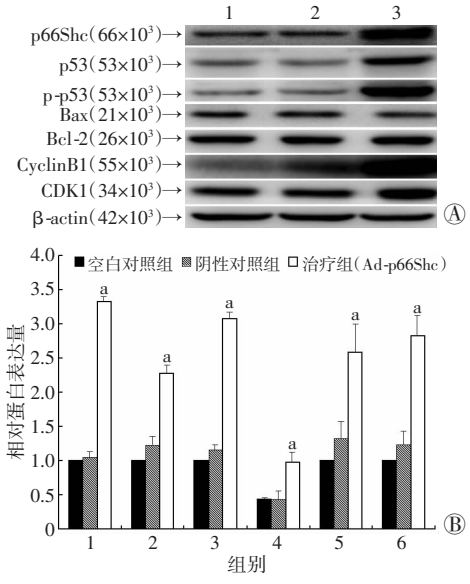
图 3　感染 Adeno X-p66Shc 后 HeLa 细胞的 8-OHdG 水平

2.4　Adeno X-p66Shc 不能诱导 HeLa 细胞凋亡

Annexin V-FITC/PI 荧光染色检测细胞凋亡率结果显示，感染 HeLa 细胞 48 h 后，阴性对照组细胞早期凋亡和晚期凋亡率总和为 3.33%，治疗组细胞早期凋亡和晚期凋亡率总和为 4.77%，与空白对照组细胞凋亡率（1.75%）相比，均无显著性差异（$P>0.05$，图 4）。

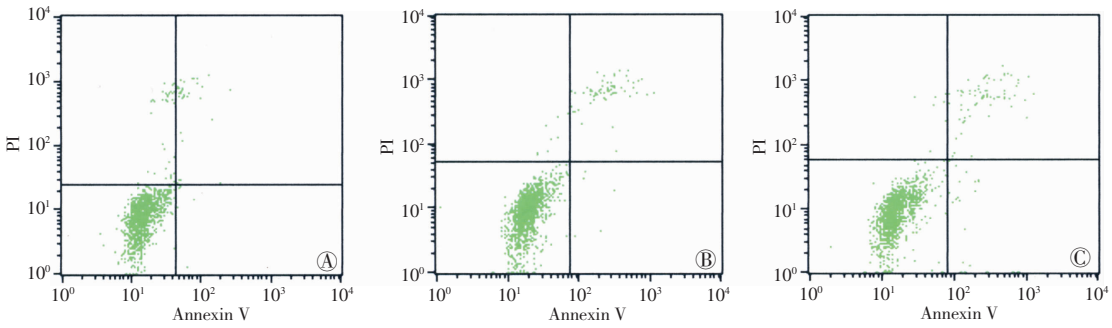
2.5　Adeno X-p66Shc 能够诱导 p53 蛋白表达和磷酸化水平升高

Western blot 检测结果显示：治疗组 HeLa 细胞感染 Adeno X-p66Shc 48 h 后，可见 p66Shc 蛋白高表达，同时 p53 蛋白表达水平及 p-p53 修饰水平显著升高（$P<0.05$），CyclinB1 和 CDK1 表达水平也明显升高（$P<0.05$）。而 Bax 和 Bcl-2 的蛋白表达水平未发生改变（$P>0.05$）。阴性对照组的相关蛋白均无明显改变（$P>0.05$，图 5）。



A：Western blot 检测结果　1：空白对照组；2：阴性对照组；3：治疗组（Ad-p66Shc）；B：半定量分析结果　1：p66Shc；2：p53；3：p-p53；4：p-p53/p53；5：CyclinB1；6：CDK1；a：$P<0.05$，与空白对照组比较

图 5　Western blot 检测细胞中蛋白表达

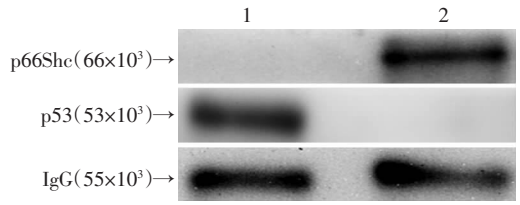


A：空白对照组；B：阴性对照组；C：治疗组（Ad-p66Shc）

图 4　Annexin V-FITC/PI 荧光染色检测细胞凋亡率变化

2.6 免疫共沉淀反应

利用p53抗体进行免疫共沉淀后没有检测到p66Shc的表达,利用p66Shc抗体进行免疫共沉淀后也没有检测到p53的表达(图6)。实验重复3次,结果均一致。



1:anti-p53;2:anti-p66Shc

图6 Western blot检测anti-p53 Co-IP产物中的p66Shc蛋白及anti-p66Shc Co-IP产物中的p53蛋白表达

3 讨论

p66Shc是参与调控细胞氧化应激的关键蛋白,在氧化损伤过程中发挥重要作用,并且与多种疾病,如动脉粥样硬化、内分泌紊乱、肥胖诱发的胰岛素抵抗[7]和酒精肝引起的肝损伤等密切相关[3]。人们对敲除p66Shc基因的小鼠研究发现,p66Shc$^{-/-}$小鼠细胞内ROS水平下降,氧化应激引起的内皮功能损伤程度也降低[8-9]。目前,对p66Shc功能的研究多通过基因突变或敲除降低其表达来阐明低水平p66Shc对机体的作用。本研究则采用前期构建的重组人p66Shc腺病毒[6]感染HeLa细胞,探索高水平表达p66Shc下HeLa细胞的各项功能改变。

实验结果显示,p66Shc腺病毒能够抑制HeLa细胞增殖,并使细胞中ROS水平升高。正常情况下体内ROS水平维持在一个稳定的范围内,ROS升高能造成DNA的氧化损伤,促使细胞发生转化、导致恶性肿瘤的发生[10]。虽然ROS对肿瘤的形成和发展起重要作用,但同时ROS亦具有抗肿瘤作用[11]。NAC是一种抗氧化剂,具有干扰自由基生成和清除已生成自由基的功能[12]。结果显示2 mmol/L NAC可阻断p66Shc腺病毒对HeLa细胞的抑制作用。提示这一抑制作用是通过升高细胞内ROS水平实现的。8-OHdG是ROS攻击DNA后致核酸损伤的特异性标志物[13-14]。实验结果显示p66Shc腺病毒可使HeLa细胞8-OHdG水平显著升高,说明p66Shc通过升高HeLa细胞的ROS水平,导致DNA发生氧化损伤,从而抑制细胞增殖。

p53是生物体内重要的抑癌基因,激活的p53可诱导细胞周期抑制、衰老和凋亡等效应[15]。本研究发现p66Shc腺病毒感染HeLa细胞后,p53表达和磷酸化水平明显升高。文献[16]报道在人肝癌HepG2细胞中,DNA损伤可引起p53蛋白磷酸化,Bax和Bcl-2蛋白表达增多,继而导致细胞凋亡。但是我们的实验结果显示,p66Shc对Bax和Bcl-2的表达并无影响,p66Shc不能诱导HeLa细胞发生凋亡。文献[17-18]报道DNA损伤可以引起p53发生磷酸化,诱导细胞周期阻滞。我们前期研究发现p66Shc能升高CyclinB1和CDK1表达[19],而对其他周期蛋白表达无影响。CyclinB1和CDK1是在G_2期结合促进细胞进入M期的周期调控蛋白[20],CyclinB1是在晚S期和G_2期合成[21],在分裂中期开始降解。提示p66Shc腺病毒能够通过引起HeLa细胞p53磷酸化,升高CyclinB1和CDK1表达,诱导HeLa细胞发生G_2/M期阻滞。我们在研究中发现p66Shc高表达能够引起p53蛋白表达升高,且存在明显的正相关[19]。蛋白质免疫共沉淀结果显示p66Shc与p53并非直接结合,提示p66Shc通过其他信号分子间接调控p53的表达及活性。

综上所述,本研究发现重组人p66Shc腺病毒感染HeLa细胞后,使细胞ROS水平升高,引起DNA氧化损伤,诱导p53表达及活化,使细胞发生G_2/M期阻滞。而p66Shc与p53之间的分子调控还需进一步研究,同时高表达的p66Shc水平是否在其他肿瘤细胞也产生类似的抑制效应值得进一步观察。

参考文献:

[1] Menini S, Amadio L, Oddi G, *et al*. Deletion of p66Shc longevity gene protects against experimental diabetic glomerulopathy by preventing diabetes-induced oxidative stress[J]. Diabetes, 2006, 55(6):1642-1650.

[2] Menini S, Iacobini C, Ricci C, *et al*. Ablation of the gene encoding p66Shc protects mice against AGE-induced glomerulopathy by preventing oxidant-dependent tissue injury and further AGE accumulation[J]. Diabetologia, 2007, 50(9):1997-2007.

[3] Koch O R, Fusco S, Ranieri S C, *et al*. Role of the life span determinant P66(shcA) in ethanol-induced liver damage[J]. Lab Invest, 2008, 88(7): 750-760.

[4] Migliaccio E, Mele S, Salcini A E, *et al*. Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signaling pathway[J]. EMBO J, 1997, 16(4):706-716.

[5] Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, *et al*. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis[J]. Cell, 2005, 122(2):221-233.

[6] 徐蓉, 胡刚, 林雅军, 等. 重组人p66Shc/腺病毒表达载体的构建与表达[J]. 医学分子生物学杂志, 2012, 9(5/6):320-325.

[7] Ranieri S C, Fusco S, Pani G. p66(ShcA): linking mammalian longevity with obesity-induced insulin resistance[J]. Vitam Horm, 2013, 91: 219-241.

[8] Camici G G, Schiavoni M, Francia P, *et al*. Genetic deletion of p66(Shc) adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(12): 5217-5222.

[9] Francia P, delli-Gatti C, Bachschmid M, *et al*. Deletion of p66shc

gene protects against age-related endothelial dysfunction [J]. Circulation, 2004, 110(18): 2889 - 2895.
[10] Lau A T, Wang Y, Chiu J F. Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic[J]. J Cell Biochem, 2008, 104(2):657 - 667.
[11] Tsuzuki T, Nakatsu Y, Nakabeppu Y. Significance of error-avoiding mechanisms for oxidative DNA damage in carcinogenesis[J]. Cancer Sci, 2007, 98(4):465 - 470.
[12] Kelly G S. Clinical applications of N-acetylcysteine[J]. Altern Med Rev, 1998, 3(2):114 - 127.
[13] Michel C, Vincent-Hubert F. Detection of 8-oxodG in dreissena polymorpha gill cells exposed to model contaminants[J]. Mutat Res, 2012, 741(1/2):1 - 6.
[14] Pope M A, David S S. DNA damage recognition and repair by the murine MutY homologue[J]. DNA Repair (Amst), 2005, 4(1):91 - 102.
[15] Heo J I, Oh S J, Kho Y J, *et al*. ATM mediates interdependent activation of p53 and ERK through formation of a ternary complex with p-p53 and p-ERK in response to DNA damage[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(8): 8007 - 8014.
[16] Yang G, Zhou X, Wang J, *et al*. MEHP-induced oxidative DNA damage and apoptosis in HepG2 cells correlates with p53-mediated mitochondria-dependent signaling pathway[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(7):2424 - 2431.
[17] Appella E, Anderson C W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses[J]. Eur J Biochem, 2001, 268(10): 2764 - 2772.
[18] Persons D L, Yazlovitskaya E M, Pelling J C. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin [J]. J Biol Chem, 2000, 275(46):35778 - 35785.
[19] 徐蓉, 胡刚, 林雅军, 等. 人 p66Shc 重组腺病毒抑制 HeLa 细胞增殖的体外研究[J]. 国际生物医学工程杂志, 2013, 36(4): 193 - 197.
[20] Lindqvist A, van-Zon W, Karlsson-Rosenthal C, *et al*. Cyclin B1-Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression[J]. PLoS Biol, 2007, 5(5):e123.
[21] 邹向阳, 李连宏. 细胞周期调控与肿瘤[J]. 国际遗传学杂志, 2006, 29(1): 70 - 73.

(**收稿**:2014-04-22;**修回**:2014-07-01)
(编辑 张 维)

(上接 1986 页)

伤患儿治疗难度大,死亡率高[2]。本例患儿诊断明确,术后逐渐出现少尿、血肌酐、尿素进行性增高,提示急性肾损伤(acute kidney injury, AKI),利用成人 CRRT 机,红细胞预充,联合 CRRT 和 DCRRT 两种模式,治疗过程平稳,患儿对治疗反应好,肾功能完全恢复,并未出现危及生命的并发症发生。

本例患儿 TOF 根治术后合并 AKI,首先接受了 76 h CRRT 治疗,缓慢等渗地清除水和溶质,治疗过程中血流动力学稳定,明显改善了患儿的心肺功能和水钠潴留,有效维持营养状况和电解质平衡。DCRRT 是介于 CRRT 与间歇性血液透析(intermittent hemodialysis,IHD)之间的治疗模式,每天根据患者临床需求确定治疗时间,不需要持续 24 h[3],可减少抗凝剂的使用,降低抗凝剂相关的出血风险,还可以降低对抗菌药物的药代动力学影响、减少营养物质的丢失等,同时又避免了短时的 IHD 治疗模式时血流动力学不稳定的特点。本例患儿 CRRT 治疗 76 h 后尿量虽然有所增加,但体内毒素水平升高,仍伴有水钠潴留和酸碱紊乱,因此我们采用了 DCRRT, 每日治疗 7 ~ 14 h,患儿治疗过程中血流动力学稳定,仍能维持良好的水、电解质和酸碱平衡,低的毒素水平。故我们认为在 CRRT 治疗后患儿病情渐趋平稳,DCRRT 治疗可能是更好的选择,有利于患儿术后的恢复。

至今世界范围内除了欧洲的 Cardio-Renal Pediatric Dialysis Emergency Machine[4] 在临床试验阶段外,还没有婴幼儿专用 CRRT 设备的存在,因此不同的医疗单位会依据自身的条件选择相应的成人 CRRT 设备用于婴幼儿。本例患儿选择金宝 Prisma flex CRRT 机,其可设置最小血流量为 10 mL/min,依据小儿透析所需血流量 3 ~ 5 mL/(kg · min)和患儿体质量,我们设定血流量为 25 ~ 30 mL/min[5]。配套透析器为 M60,预充量为 84 mL,超过患儿血容量 10%,故予红细胞预充,治疗过程患儿血流动力学稳定、耐受良好。这提示在现有条件下,采用成人 CRRT 机,红细胞预充,成人 CRRT 机及配套耗材可以用于婴幼儿 CRRT 治疗。我们选择了以前稀释为主的前-后稀释治疗模式,既可以减少抗凝剂的使用,又可以避免完全前稀释治疗导致的静脉壶堵塞的风险。通过选择普通肝素抗凝,顺利完成了 CRRT 和 DCRRT 治疗,但治疗过程中仍出现了血小板的明显下降,在严密监控下实施枸橼酸抗凝仍可能是小儿 CRRT 治疗抗凝方式的更好选择。

法洛四联症本身及手术均可能引起 AKI。由于小儿本身的特点如有效血管通路建立困难、心血管稳定性差、体外循环预充量占有效循环血容量比例大等,导致其合并 AKI 时 CRRT 在实施技术上更困难、风险更大。因此,合理评估合并有 AKI 危重患儿的疾病状态,掌握 CRRT 应用的指征,结合自身技术条件,合理实施 CRRT 可促进多器官功能恢复并降低死亡率,对危重患儿预后有重要意义。

参考文献:

[1] Slater M B, Anand V, Uleryk E M, *et al*. A systematic review of RIFLE criteria in children, and its application and association with measures of mortality and morbidity[J]. Kidney Int, 2012, 81(8): 791 - 798.
[2] Rosner M H, Okusa M D. Acute kidney injury associated with cardiac surgery[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2006, 1(1): 19 - 32.
[3] 赵光本, 林洪丽, 李龙凯, 等. 日间连续性肾脏替代疗法治疗急性严重低钠血症疗效分析[J]. 中国实用内科杂志, 2010, 30(4): 328 - 330.
[4] Ronco C, Garzotto F, Ricci Z. CA. R. PE. DI. E. M. (Cardio-Renal Pediatric Dialysis Emergency Machine): evolution of continuous renal replacement therapies in infants. A personal journey[J]. Pediatr Nephrol, 2012, 27(8): 1203 - 1211.
[5] Askenazi D J, Goldstein S L, Koralkar R, *et al*. Continuous renal replacement therapy for children ≤10 kg: a report from the prospective pediatric continuous renal replacement therapy registry[J]. J Pediatr, 2013, 162(3): 587 - 592. e3.

(**收稿**:2014-07-28;**修回**:2014-08-29)
(编辑 王 红)