维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0177-05

小脑延髓池注射胆红素溶液建立新生大鼠胆红素脑病模型的评价

胡 影[1],田巧红[2],华子瑜[1],徐天鹤[1]

(1. 重庆医科大学附属儿童医院新生儿内科,重庆 400014;2. 四川省人民医院儿科,成都 610072)

【摘 要】目的:探讨采用小脑延髓池注射胆红素溶液建立新生足月及早产大鼠胆红素脑病模型的可行性,并检测其发生凋亡的高峰时间。方法:选用7日龄新生SD大鼠30只,随机分为生理盐水对照组,模型1组,模型2组,模型3组,模型4组。新生大鼠在乙醚麻醉下于小脑延髓池处注射胆红素溶液(10mg/ml),并分别于注药后12、24、48、72h断头取脑,生理盐水对照组注射生理盐水后于24h后取脑。行HE染色,尼氏染色,TUNEL及Bax和Bcl-2免疫组织化学染色法检测实验大鼠海马神经细胞凋亡及坏死现象。早产新生大鼠通过对孕21d的SD母鼠剖宫产术后获得,由代乳鼠喂养至7d,经小脑延髓池注射胆红素溶液,观察早产鼠的神经行为改变。结果:注药后,新生足月及早产大鼠皆出现不同程度的神经行为异常;HE染色示模型组海马神经细胞有不同程度的凋亡和坏死表现;尼氏染色可见模型组锥体细胞胞体及树突内尼氏体减少,甚至溶解消失;TUNEL法显示模型组海马神经细胞凋亡于给药后12h明显升高,24h左右达到高峰。免疫组化检测出的Bax蛋白表达阳性率于给药后24h左右达到高峰,而Bcl-2蛋白表达阳性率于给药后24h左右降至最低。结论:经小脑延髓池注射胆红素溶液建立新生大鼠胆红素脑病模型的方法简单可靠,胆红素引发的神经细胞凋亡高峰时间为24h。预防胆红素脑病的发生至关重要。

【关键词】胆红素脑病;胆红素神经毒性;新生大鼠;早产大鼠;小脑延髓池注射

【中国图书分类法分类号】R722 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-16

Evaluation of a new approach that inject bilirubin solution into cerebellomedullary cistern to establish bilirubin encephalopathy model in neonatal mouse

HU Ying, et al

(*Department of Neonatology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the feasihility of animal model of bilirubin encephalopathy by injecting bilirubin solution into cerebellomedullary cistern of neonatal full-term and premature mice. *Methods*: Thirty 7-day-old mice were randomly divided into 5 groups: control group, model group 1, model group2, model group3, and model group4. Bilirubin solution was injected into the cerebellomedullary cistern in model groups (bilirubin 20μg/g bodyweight), while equal volume of normal saline was injected into the cerebellomedullary cistern in control group. The mice in model groups were sacrificed at the time of 12h, 24h, 48 and 72h after injection, respectively, and those in control group were sacrificed at 24h after injection. The apoptosis and necrosis of neurocytes, the expressions of Bcl-2 and Bax proteins were detected by HE stain, immunohistochemical method and TUNEL in the hippocampus, respectively. Preterm mice were delivered by cesarean section at 21 days gestation and fed by surrogate mother mouse until 7 days old. Bilirubin solution was injected into their cerebellomedullary cistern. The mice's abnormal behaviors were observed. *Results*: The mice of model groups and preterm group appeared abnormal behaviors in different degree. Under light microscope, the neurocytes in their hippocampus appear apoptosis and necrosis. The nissl body in pyramidal cell body and dendron decreased, even dissolved to disappear. TUNEL showed that the apoptosis rate in the hippocampus increased obviously at 12h post-injection, reached the peak at 24h post-injection. The positive rate of Bax protein in the hippocampus reached the peak at 24h post-injection, while the positive rate of Bcl-2 protein decreased to the lowest. *Conclsions*: The method that injecting bilirubin solution into neonatal mice' cerebellomedullary cistern to set up the animal model of bilirubin encephalopathy is simple and feasible. The peak time of neurocytes' apoptosis in hippocampus was 24h post-injection. It's crucial to prevent bilirubin encephalopathy as early as possible.

【Key words】 Bilirubin encephalopathy; Bilirubin neurotoxicity; Neonatal mouse; Premature mouse; Inject into cerebellomedullary cistern

作者介绍:胡 影(1982-),女,硕士,

研究方向:新生儿黄疸。

通讯作者:华子瑜,女,副教授,E-mail:ziyu_h@yahoo.com.cn。

维普资讯 http://www.cqvip.com

黄疸是新生儿时期常见临床现象，胆红素脑病是其严重的并发症，重者可引起死亡，幸存者常遗留听力损伤、学习障碍、智力低下，甚至“核黄疸四联症”等神经系统后遗症[1]。国内多采用新生豚鼠经腹腔注射胆红素溶液制作胆红素脑病模型[2]。预实验发现该方法引出异常神经行为活动及脑组织黄染现象的稳定性欠佳。故本研究采用新生大鼠小脑延髓池注射胆红素溶液的方法制作胆红素脑病的动物模型。该方法受血脑屏障功能状态的影响较小，可更直接地研究胆红素的神经毒性。由于临床上发现早产儿更容易发生胆红素脑病，建立早产鼠胆红素脑病模型用于研究早产对胆红素神经毒性的影响则尤为必要。

1 材料与方法

1.1 新生早产及足月大鼠的获取与喂养

SD 成年大鼠，按雌雄 1:1 合笼过夜，次日晨观察发现阴道栓即为孕期第 0 天，孕期满 21d 者[3]即行剖宫产取得早产新生大鼠（足月孕期为 22~23d）。剖腹后快速从子宫内取出幼仔，用止血钳夹闭脐带约 10s 防止出血；再用纱布吸尽幼仔的口鼻羊水；必要时可用拇指进行胸外按压，手法轻柔；然后将其转运到一个预热的（37℃）水浴内并吸氧数分钟，用柔软的橡皮管对大鼠的手足作轻柔的触觉刺激，直到规则的自主呼吸建立并且幼仔的皮肤转为粉红，即可停止复苏。于近日生育的母鼠处带乳，选择性情温顺的母鼠，代乳前将母鼠的垫料与新生大鼠混合，使新生鼠带有代乳鼠的味道后再合笼（避免食仔现象），喂养新生鼠至第 7d。

新生足月大鼠由 SD 孕鼠足月自然分娩，母鼠喂养至第 7d。

1.2 动物模型的制作

1.2.1 配制胆红素溶液[4] 避光称取晶体胆红素（sigma 公司）5mg 溶于 50μl 0.5mol/L NaOH 中，加入双蒸水 450μl，用 0.5mol/L HCl 调节 pH 至 8.5。

1.2.2 实验动物的分组 日龄 7d 的新生足月大鼠 30 只，完全随机分为 5 组，每组 6 只。其中 1 组为生理盐水对照组，其余 4 组为模型组。分别于注射胆红素后 12、24、48、72h 断头取脑。

1.2.3 动物模型制作 于乙醚吸入麻醉后，向早产及模型组足月新生大鼠小脑延髓池内注射胆红素溶液（20μg 胆红素/g 体重）。早产鼠注射后观察神经行为改变，模型组足月新生大鼠分别于注射后 12、24、48、72h 断头取脑。对照组经小脑延髓池注射生理盐水 0.02ml，于注射后 24h 断头取脑。

1.3 动物模型的鉴定

1.3.1 观察实验动物的一般情况和神经行为变化 主要观察新生大鼠的呼吸、心率、体重变化以及神经行为改变，如是否出现俯伏、侧卧、爬行不稳、转圈、四肢颤动、活动减少、吃奶困难。大体解剖证实大脑、小脑及延髓皆有胆红素黄染现象且无明显损伤出血灶。

1.3.2 光镜观察脑组织石蜡切片病理变化 脑组织立即固定于 10%的甲醛溶液中，从视交叉处连续冠状位切取厚约 2mm 的脑组织。常规石蜡包埋，切片（片厚约 5~7μm），HE 染色及尼氏染色观察海马神经细胞的病理变化。

1.3.3 TUNEL 法染色检测海马凋亡神经细胞 原位细胞凋亡检测试剂盒购于德国 Roche 公司。具体操作详见说明书，以细胞核内有棕色颗粒者为阳性细胞。每张切片在 10×40 倍显微镜下随机 5 个视野观察海马细胞，计数其阳性细胞数，求其均值。

1.3.4 免疫组织化学染色检测海马神经细胞 Bax 与 Bcl-2 蛋白的表达（SABC 法） 具体操作详见说明书，以细胞浆内出现棕黄色为阳性反应细胞，每张切片在 10×40 倍显微镜下随机 5 个视野观察海马细胞，计数其阳性细胞光密度值，求其均值。

1.4 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS10.0 软件进行分析，多组间采用方差分析，用 q 检验进行两两比较。不同变量间的相互关系用直线相关分析。以 $P<0.05$ 作为显著性标准。

2 结 果

2.1 实验大鼠的一般情况

模型组大鼠共 30 只，于给药后 24h 内密切观察，皆出现不同程度的神经行为异常：10 例症状较轻者出现俯伏、活动减少、对外界刺激反应迟钝；6 例症状较重者出现步态不稳、转圈；6 例症状更重者出现四肢颤动、呼吸节律欠规则；8 例最重者出现翻滚、呼吸节律欠规则、对外界刺激无明显逃避反应。模型组大鼠断头解剖证实大脑、小脑、延髓均有不同程度的胆红素黄染且无明显损伤出血灶。早产新生大鼠出现与足月模型组大鼠相似的神经行为改变。

2.2 光镜观察脑组织石蜡切片病理变化

2.2.1 HE 染色 模型组大鼠脑组织可见黄染，海马神经细胞发生不同程度的凋亡和坏死，细胞和血管周围间隙变大，其中以模型二组为甚。400 倍下观察，坏死神经细胞表现为细胞肿胀、胞浆空化、核溶解消失。凋亡神经细胞表现为细胞体积变小，核染色质浓缩，边集，碎裂。对照组大鼠海马神经细胞形态结构基本正常，仅偶见凋亡神经细胞。

2.2.2 尼氏染色 对照组大鼠海马结构完整，细胞层次清晰，神经细胞胞浆内有均匀蓝染的尼氏体颗

维普资讯 http://www.cqvip.com

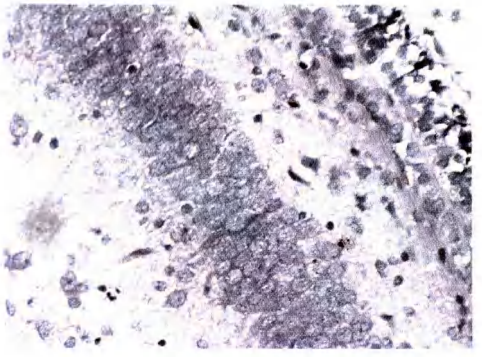


图 1 对照组 HE 染色(×400)

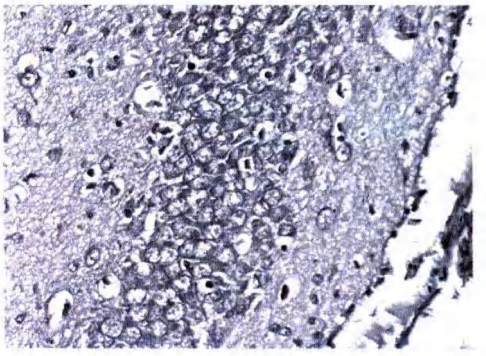


图 2 模型 2 组 HE 染色(×400)

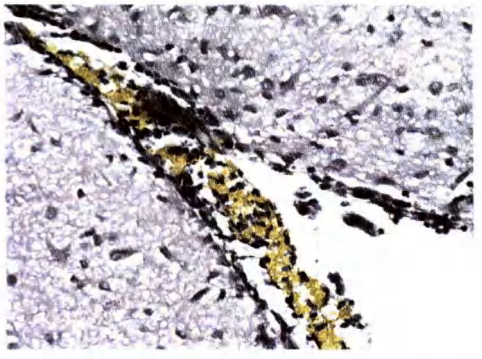


图 3 模型组脑组织可见黄染(HE×400)

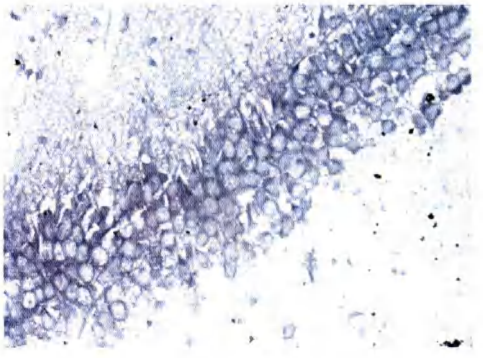


图 4 对照组尼氏染色(×400)

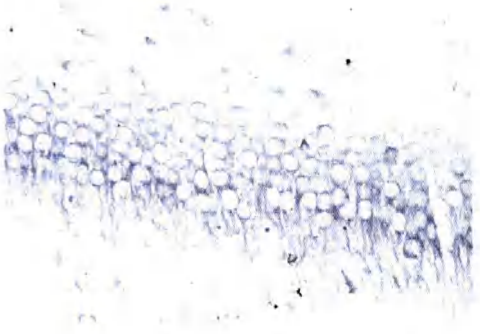


图 5 模型 2 组尼氏染色(×400)

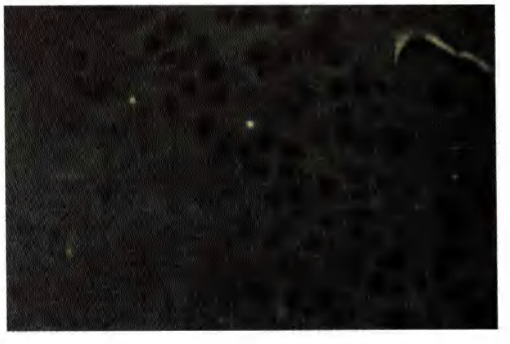


图 6 对照组 TUNEL 荧光(×400)

粒。模型组海马可见不同程度的病变,表现为锥体细胞胞体及树突内尼氏体减少,溶解消失。

2.3 TUNEL 法染色检测海马凋亡神经细胞

结果见表 1,图 10~12,与对照组相比较,胆红素脑病新生大鼠模型海马神经细胞 TUNEL 阳性数于给药后 12h 明显升高,24h 左右达到高峰,之后逐渐降低,但于 72h 后仍明显高于对照组。

2.4 免疫组化染色检测海马神经细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达

结果见表 2,图 9~13,与对照组相比较,胆红素脑病模型新生大鼠海马神经细胞 Bax 蛋白表达阳性率于给药后 12h 明显升高,24h 达到高峰,以后逐渐降低,至给药后 72h 仍明显高于对照组。与对照组相比,胆红素脑病模型新生大鼠海马神经细胞

表 1 TUNEL法检测胆红素脑病模型新生大鼠注射胆红素后不同时点海马神经细胞 TUNEL 阳性数($x \pm s$,n=6)

组别	对照组	模型 1 组(12h)	模型 2 组(24h)	模型 3 组(48h)	模型 4 组(72h)
TUNEL(+)	$17.1 \pm 0.79^{\blacktriangle\blacktriangle}$	$26.8 \pm 2.15^{\blacktriangle\blacktriangle\star\star}$	$47.8 \pm 8.10^{\star\star}$	$33.8 \pm 3.86^{\blacktriangle\star\star}$	$30.3 \pm 5.01^{\blacktriangle\star\star}$

注:①与对照组相比较:$^{\star}P<0.05$,$^{\star\star}P<0.01$;②与模型 2 组相比较:$^{\blacktriangle}P<0.05$,$^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$;③每组动物:6 只

维普资讯 http://www.cqvip.com

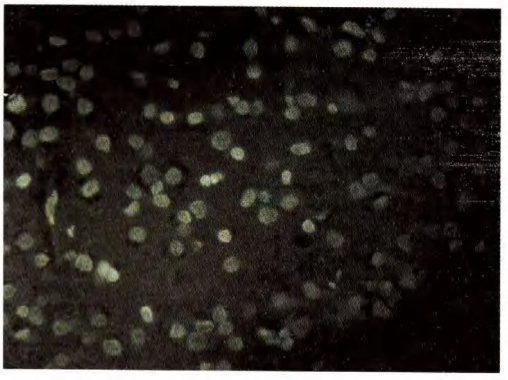


图 7 模型 2 组 TUNEL 荧光(×400)

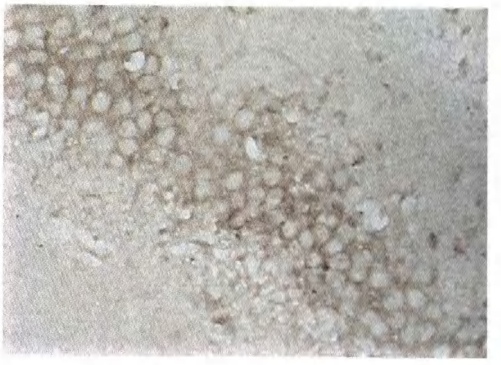


图 10 模型 2 组海马的 Bax 蛋白表达(SABC×400)

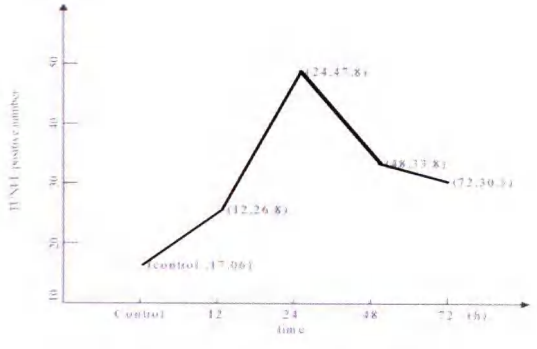


图 8 胆红素脑病模型新生大鼠海马神经细胞 TUNEL 阳性数的动态变化

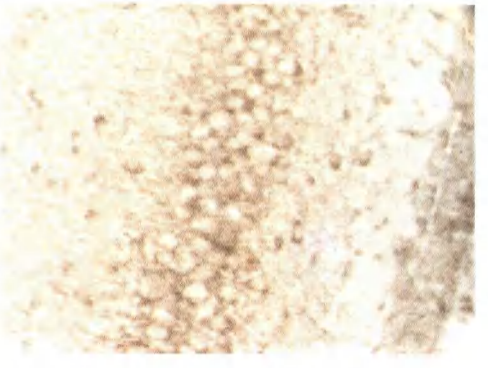


图 11 正常组海马的 Bcl-2 蛋白表达(SABC×400)



图 9 对照组海马的 Bax 蛋白表达(SABC×400)



图 12 模型 2 组海马的 Bcl-2 蛋白表达(SABC×400)

Bcl-2 蛋白表达阳性率于给药后 12h 明显降低,24 小时左右达到最低水平,以后逐渐升高,至给药后 72h 仍明显低于对照组。

3 讨 论

对胆红素脑病的实验研究,国外学者多以体

表 2 免疫组化染色检测胆红素脑病模型新生大鼠给药后不同时点海马神经细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达变化($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	对照组	模型 1 组(12h)	模型 2 组(24h)	模型 3 组(48h)	模型 4 组(72h)
Bax(+)	3309.89 ± 859.8**	5311.27 ± 944.0**	6977.98 ± 402.6*	5361.69 ± 820.3**	4688.10 ± 516.8**
Bcl-2(+)	5922.32 ± 289.6$^{\triangle\triangle}$	3789.34 ± 369.2$^{\blacktriangle\blacktriangle\triangle}$	3096.46 ± 126.3$^{\blacktriangle\blacktriangle\triangle\triangle}$	4526.60 ± 375.6$^{\blacktriangle\blacktriangle\triangle\triangle}$	4922.15 ± 520.1$^{\blacktriangle\triangle\triangle}$

注:①Bax 蛋白表达阳性,与对照组相比: $^{\star}P<0.01$;与模型 2 组相比: $^{\star}P<0.01$;②Bcl-2 蛋白表达阳性,与对照组相比: $^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$, $^{\blacktriangle}P<0.05$;与模型 2 组相比, $^{\triangle\triangle}P<0.01$. $^{\triangle}P<0.05$;③每组动物:6 只

维普资讯 http://www.cqvip.com

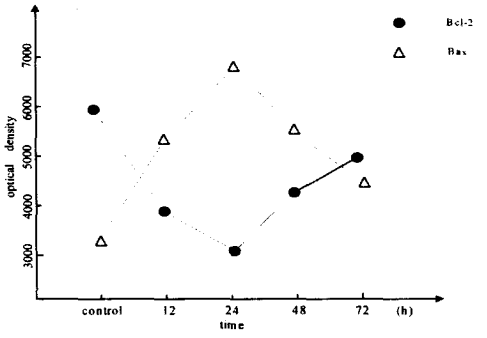


图 13 胆红素脑病模型新生大鼠海马神经细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的动态变化

外培养的神经细胞和先天性 G-6-PD 缺陷的 Gunn 大鼠作为对象来研究胆红素神经毒性作用；而国内侧重于患儿的血、脑脊液中各相关生化指标及各种临床治疗措施的对比研究。1997 年，国内学者[4]建立了新生豚鼠经腹腔注射胆红素溶液制作胆红素脑病模型的方法。因为受血脑屏障功能状态的影响，此方法引出异常神经行为活动及脑组织黄染现象的稳定性欠佳。因此，本研究采用经新生大鼠小脑延髓池注射胆红素溶液的方法制作胆红素脑病的动物模型。该方法受血脑屏障功能状态的影响较小，可更直接地研究胆红素的神经毒性。既往研究证实：基底核、海马回、小脑皆为胆红素神经毒性作用的敏感部位[5]。海马是边缘系统的重要组成部分，与学习和记忆功能又有非常密切的关系[6]。因此本实验中，以海马为研究对象。预实验中，设计了注射胆红素溶液的 4 个剂量组：5、10、20、30 μg/g 体重。结果发现当注射剂量为 20 μg/g 体重时，新生大鼠既出现较明显的神经行为异常，又具有一定的存活时间，因此确定为正式实验的注射量。由于在临床工作中，早产新生儿往往更容易发生胆红素脑病，因此建立早产鼠的胆红素脑病模型对深入研究胆红素神经毒性机制也极其重要。

本实验发现，对照组大鼠一般情况好且无明显神经行为异常。光镜下海马神经细胞形态结构基本正常。模型组足月新生鼠和早产新生鼠均出现不同程度的神经行为异常，如呼吸不规则、进食少、反应差、甚至抽搐，与临床胆红素脑病的表现类似。大体解剖证实无明显出血损伤灶，光镜下可见脑组织胆红素黄染，海马神经细胞发生不同程度的凋亡和坏死。说明足月新生大鼠和早产鼠的胆红素脑病模型制作成功，可用于实验研究。

在高胆红素血症的神经元损伤中同时存在着坏死和凋亡。在损伤的早期，凋亡是胆红素诱发细胞死亡的一个重要方式，而后期的神经病理改变是以突出的神经元缺失，反应性星形细胞增多以及坏死为特征[7]。在本实验中，通过 HE 染色，尼氏染色，光镜观察也进一步证实了该现象。

程序性细胞死亡取决于一系列因素的联合作用。与体外暴露于 UCB 的细胞株不同，用体内实验证明胆红素诱发凋亡情况的一个最大挑战是组织中凋亡细胞极迅速的清除率，只有极少数的凋亡细胞可以在某个时刻被观察到。因此，检测多个时间点对于探测体内程序性细胞死亡十分重要[8]。本实验 TUNEL 法[9]检测凋亡其结果显示，新生大鼠海马神经细胞凋亡数于注射胆红素后 12h 明显升高，24h 左右达到高峰，以后逐渐降低，至 72h 仍与对照组有显著性差异。该结果提示，经小脑延髓池注射胆红素溶液后 12h，模型新生大鼠海马区已存在明显的神经细胞凋亡现象，凋亡率的逐渐升高也提示胆红素在逐渐侵润过程中不断导致更多的神经细胞发生凋亡。故胆红素脑病一旦发生，尤其是在已经出现了较明显的神经系统症状时，海马已经出现明显的神经细胞凋亡及坏死现象，此时治疗效果则相当有限。

线粒体是多种细胞凋亡过程中的重要角色，胆红素通过影响线粒体的通透性而释放细胞色素 C，再作用于 Caspase，产生一系列瀑布式级联放大反应，从而导致神经细胞凋亡的发生[10]。Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡过程中具有重要的调控作用，是一个重要的凋亡决定子。其抗凋亡蛋白成员（Bcl-2、Bcl-xl、Mcl-1、A1、Boo 和 Bcl-w）和促凋亡蛋白成员（Bax、Bcl-xs、Bak、Bad、Bik、Bim、Bid、Hrk 和 Bok）之间协同作用共同决定细胞是否进入凋亡程序。Bax 和 Bcl-2 蛋白在细胞凋亡中起着重要作用。其比值决定着细胞受到凋亡因素刺激后的生存与死亡[11]。本实验结果显示 Bax 和 Bcl-2 蛋白阳性表达早在小脑延髓池注射胆红素溶液后 12h 已有显著变化，其比值于 24h 达到高峰。随即，细胞进入不可逆的凋亡过程。提示凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 蛋白参与介导了胆红素神经毒性的发生，并进一步说明了预防胆红素脑病发生的重要性。

因此，临床工作中积极防止胆红素脑病的发生极为重要，尤其是早产、低出生体重儿、严重感染等

（下转第 244 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

物质的特性,选用合适的栓塞物质及术式并充分栓塞病变区域的血管是避免复发和并发症发生的主要措施。

3.3 应用 0 号手术线段栓塞意义

0 号手术线段栓塞可用于实体性肿瘤、动脉出血及术前的栓塞治疗等方面,具有良好的生物相容性,无毒、无抗原性,注射容易,栓塞作用持久,栓塞后不引起化学免疫作用,且不吸收,在出血局部机化,对靶血管产生栓塞效果持久,同时也降低了患者治疗费用。

综上所述,支气管动脉栓塞治疗大咯血止血率为 76.7%～96.0%[7],是一种可靠有效的急症止血方法,支气管动脉造影及栓塞治疗难治性大咯血,是一种有效的检查及治疗手段。本方法损伤小、并发症少、恢复快,对于部分病例可达到根治的效果,治疗后可有效地控制出血,也可为病情稳定后采取进一步的根治性治疗措施争取时间、创造条件。对于咯血反复发作、内科治疗效果不佳、不适合外科手术的患者是一个较好的选择。

参 考 文 献

[1] Remy J,Arnaud A,Fardou H,et al. Treatment of hemoptysis by embolization of bronchial arteries[J]. Radiology,1977;122(1):33-37.

[2] 彭建扬,徐荆煌,翁志成,等.大咯血的支气管动脉栓塞治疗[J].介入放射学杂志,2007;16(1):57-59.

[3] Woong Y,Jac K K,Yun H K,et al.Bronchial and Nonbronchial SystemicArtery Embolization for Life-threatening Hemoptysis:A comprehensive Review[J]. Radiographics,2002;22(6):1395-1490.

[4] 林丹曦,顾建平,高 伟.支气管动脉栓塞术抢救急性大咯血的临床价值[J]. 中华急诊医学杂志,2002;11(1):50-51.

[5] Lu Px,Cai XM.Comparision of bronchial artery embolization and local infusion with reptilase plus artery embolization in the treatment of massive hemoptysis due to tuberculosis[J]. Chin J Med Imaging Technol,2003;19(8):1035-1037.

[6] 陈义雄,陈绿娇,陈建业,等.支气管动脉栓塞治疗大咯血的疗效分析[J]. 介入放射学杂志,2005;14(2):195-196.

[7] Yoon W.Embolic agents used for bronchial artery embolisation in massive haemoptysis[J]. Expert Opin Pharmacotuer,2004;5(2):361.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 181 页)

高危险新生儿更要密切观察,积极诊治。早期针对凋亡进行干预治疗可望抑制神经细胞凋亡进一步发展,从而减轻胆红素的神经毒性作用。由于实验结果提示凋亡持续时间较长,故在临床治疗时应注意保证疗程足够、长期随访和康复训练,以利于改善预后。在今后的研究中,我们将利用该模型继续探讨早产、缺氧等危险因素影响胆红素神经毒性的途径,以期为胆红素脑病的合理防治提供更为有效的措施。

参 考 文 献

[1] Gourley GR. Bilirubin metabolism and kernicterus[J]. Adv Pediatr,1997;44:173-229.

[2] 贲晓明,陈舜年,秦玉明,等.兴奋性氨基酸受体拮抗剂对胆红素神经毒性的影响[J].中华儿科杂志,2000;38(3):144-146.

[3] Xu Feng,Fok Tai Fai,Jane Yin.Hyperoxia-induced lung injury in premature rat:description of a suitable model for the study of lung diseases in newborns[J]. Chin Med J,1998;111(7):619-614.

[4] 陈舜年,贲晓明,李佩红.胆红素脑病动物模型制作与鉴定[J].新生儿科杂志,1997;12(4):166-168.

[5] Ahdab-Barmada M,Moossy J. The neuropathology of kernicterus in the premature neonate:diagnostic problems[J]. J Neuropathol Exp Neurol,1984;43(1):45-56.

[6] Rossato JI. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory[J]. Learn Mem,2007;14(1):36-46.

[7] Watchko JF. Bilirubin induced apoptosis in vitro: insights for kernicterus[J]. Pediatr Res,2005;57(2):177-178.

[8] Erik H,Thor WD,Runar A,et al. Synergistic Protection of a General Caspase Inhibitor and MK-801 in Bilirubin-Induced Cell Death in Human NT2-N Neurons[J]. Pediatric Research,2006;59(1):72-73.

[9] Keshavan P,Schwemberger SJ. Unconjugated bilirubin induces apoptosis in colon cancer cells by triggering mitochondrial depolarization[J]. Int J Cancer,2004;112(3):433-445.

[10] Rodrigues CM,Sola S,Silva R. Bilirubin and amloid-beta peptida induced cytochrome C release through mitocondrial membrane permeabilization[J]. Mol Med,2000;6(11):936-946.

[11] Zhang TJ,Hang J.Hippocampus bcl-2 and bax expression and neuronal apoptosis after moderate hypothermic cardiopulmonary bypass in rats[J]. Anesth Analg,2006;102(4):1018-1025.

(责任编辑:冉明会)