DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.011
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
1406 2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)12-1406-04

重组人诱导型一氧化氮合酶在V_{79}成纤维细胞株中的表达及意义探讨

郑 峰[1],黄 岚[1],王 谦[2],赵 刚[1],武晓静[1] ([1]第三军医大学附属新桥医院心血管内科,重庆 400037;[2]北京师范大学生物系,北京 100088)

提 要:目的 观察人诱导型一氧化氮合酶(iNOS)基因转染至V_{79}成纤维细胞株后,iNOS的表达和分泌一氧化氮的情况,以探讨血管壁成纤维细胞分泌一氧化氮的可行性。方法 构建真核表达载体pcDNA$_3$-iNOS,将人iNOS基因转入V_{79}细胞中,经G_{418}筛选,克隆扩增,通过RT-PCR、免疫荧光法进行鉴定。结果 pcDNA$_3$-iNOS基因转染的V_{79}成纤维细胞中有iNOS mRNA的转录,在细胞胞质中可见分泌的iNOS蛋白,iNOS转染组一氧化氮的含量(237.67±27.28)与正常细胞组(78.26±11.77)和空质粒组(84.22±12.67)相比有显著性意义($P<0.001$),但正常细胞组和空质粒组相比无显著性差异($P>0.05$)。结论 iNOS基因可以成功地转入成纤维细胞中并能使转染的成纤维细胞具有分泌NO的功能,从而可能替代血管内皮细胞的部分功能。

关键词:基因转染;诱导型一氧化氮合酶;一氧化氮;成纤维细胞株
中图法分类号:Q754 文献标识码:A

Expression and significance of recombinant human inducible nitric oxide synthase gene in fibroblast cell line V_{79} *in vitro*

ZHENG Feng, HUANG Lan, WANG Qian, ZHAO Gang, WU Xiao-jing (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the expression of nitric oxide synthase (NOS) and secretion of NO by fibroblast cell line V_{79} into which human recombinant inducible NOS (iNOS) was transferred so as to explore the feasibility of NO release by fibroblasts via gene transfer. Methods The eukaryotic expression vector pcDNA$_3$-iNOS was constructed and then transfected into V_{79} cells. After the screening with G_{418} and cloning, the cells were verified with RT-PCR and immunofluorescence staining. V_{79} cells were cultured with the medium containing 100 μmol/L H4B and NO content in the supernatant was quantified with the Griess reaction by using sodium nitrite as standard. Results The expression of iNOS mRNA in V_{79} cells transfected with pcDNA$_3$-iNOS was detected and the NO concentration in the culture supernatant of stable iNOS-expressing V_{79} cells was much higher than control cells and the cells with pcDNA$_3$ plamid transfection, but the control and vector group showed no significant difference ($P>0.05$). Conclusion Recombinant iNOS could be successfully transfected and expressed in fibroblasts after the eukaryotic expression vector transfection, and increase the NO concentration. This gene transfer is possible to substitute endothelial function of NO release.

Key words: gene transfer; inducible nitric oxide synthase; nitric oxide; fibroblast strain

一氧化氮(Nitric oxide, NO)是血管内皮细胞分泌的一种重要的舒血管因子,近年的研究发现它还具有促内皮生长,抑制血小板在血管表面的聚集,抑制平滑肌细胞增殖、迁移,在胶原合成和分泌细胞因子等方面也起调节作用。血管内皮细胞损伤引起NO释放减少是许多心血管疾病的共同的病理基础,促进受损内皮再生,恢复血管周围NO的分泌,在治疗这些疾病中具有重要意义[1]。已有研究将一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)基因转染至血管中膜的血管平滑肌细胞,抑制血管损伤后新内膜的形成。但NOS基因转染成纤维细胞,较少报道。因此,我们设计了本实验,将诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)基因转染V_{79}成纤维细胞株中,观察iNOS的表达和分泌NO的情况,探讨iNOS转染成纤维细胞的可行性,为血管损伤的治疗提供新的途径和实验依据。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970276)
作者简介:郑 峰(1966-),女,内蒙古东胜市人,硕士研究生,主治医师,主要从事冠心病方面的研究。电话:(023)68755000-74601
收稿日期:2001-03-15;修回日期:2001-07-20

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞和质粒载体

大肠杆菌HB101、中国仓鼠肺成纤维细胞株V_{79}细胞由北京师范大学生物系王永潮教授惠赠,含人iNOS cDNA质粒pSPORT-iNOS由Johns Hopkins大学王建明博士惠赠,真核表达载体pcDNA$_3$购自Invitrogen公司。

1.2 主要试剂

限制性核酸内切酶(*Hind* Ⅲ、*Xba* Ⅰ)、Lambda DNA/*Hind* Ⅲ Markers、T_4DNA连接酶为Promega公司产品,Marker DL-2000为TaKaRa产品,四氢叶酸(H_4B)为Sigma公司产品,RPMI 1640培养基、G_{418}、TriZOL RNA提取试剂盒、脂质体转染试剂盒(LipofectAMINE)购自GIBCO BRL公司,DNA回收纯化试剂盒购于北京京师生物公司。

1.3 载体的连接和鉴定

pSPORT-iNOS质粒经*Hind* Ⅲ和*Xbl* Ⅰ双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收3.96 kb编码iNOS cDNA的目的片段。将真核表达载体pcDNA$_3$用*Hind* Ⅲ和*Xbl* Ⅰ双酶切后,回收载体片段。建立如

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

下连接反应体系: 质粒 1 μl, 目的片段 2 μl, T_4DNA 连接酶 1 μl, T_4DNA 连接酶 buffer 1 μl, ddH_2O 5 μl, 总体积 10 μl。置 16 ℃ 过夜。次日取 1/2 体积的连接体系转化感受态细菌 HB101, 经氨苄筛选, 获得阳性菌落, 小量提取重组质粒($pcDNA_3$-iNOS), 用 *Hind* Ⅲ/ *Xba* Ⅰ 酶切鉴定。同时以 T7 和 Sp6 primer 为引物, 在北京赛百盛生物公司 DNA 序列自动分析仪上进行正反两个方向的序列测定。

1.4　细胞转染

在 6 孔板中按 1.5×10^5/ml 接种 V_{79}细胞, 每孔 100 μl, 用 RPMI 1640 培养基加 10% 小牛血清于 37 ℃, 5%CO_2 孵箱培养至细胞达 50% ~ 80% 融合, 转染前用无血清培养基洗 2 次。分别取空载体和表达载体 DNA 1 ~ 2 μg, 加入 100 μl 无血清 1640 培养基中, 室温置 15 min, 另取 Lipofect AMINE 6 μl 加入 100 μl 无血清 1640 培养基中。将以上两种液体混合室温置 15 min 后, 向混合液中加入 800 μl 无血清培养基, 轻微混合, 逐滴加到待转染细胞中。37 ℃培养 5 h, 再在转染细胞中加入含 20% 小牛血清 1640 培养基 1 ml, 继续培养 48 h。选用含 G_{418}(400 μg/ml) 培养基进行细胞传代筛选, 约 2 周克隆形成, 挑选单个克隆扩增培养。

1.5　基因转染的分子生物学鉴定

实验分组: 未转染的 V_{79}细胞为正常细胞组, 转染空质粒的细胞为空质粒转染组, 转染 $pcDNA_3$-iNOS 质粒的细胞为 iNOS 转染组。

1.5.1　RT-PCR 检测 mRNA　分别收集对数生长期的正常细胞组、空质粒转染组和 iNOS 转染组的细胞, 用 TriZOL 试剂盒提取细胞总 RNA。根据人 iNOS 基因序列(1 939 ~ 2 401 bp), 设计上、下游。引物序列[2] 为。

P1: 5′-TCCGAGGCAAACAGCACATTCA-3′;

P2: 5′-GGGTTGGGGGTGTGGTGATGT-3′

引物由北京赛百盛生物公司合成。逆转录反应体系: RNA 保存液 5 μl、10× RT-PCR 缓冲 2.5 μl、25 mmol/L MgCl 2.5 μl、100 mmol/L DTT 0.5 μl、50% 甘油 1.5 μl、上、下游引物各 1 μl(10 pmol)、25 mmol/L dNTP 0.2 μl、ddH_2O 9.8 μl, 混合酶 1 μl。RT-PCR反应程序: 42 ℃逆转录 60 min, 94 ℃变性 5 min 后进行 35 个循环。循环参数: 94 ℃变性 30 s, 55 ℃复性 45 s, 72 ℃延伸 1 min, 末次循环后延伸 7 min。取 RT-PCR 扩增产物 10 μl 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。EB 染色, 紫外灯下观察结果并拍照记录。

1.5.2　NOS 酶蛋白的检测　分别将正常细胞组、空质粒转染组和 iNOS 转染组的细胞按 1.5×10^5/ml 密度接种于内放有盖玻片的培养皿中, 24 h 后取出盖玻片。选用北京中山公司的兔 iNOS 多抗和 FITC 标记山羊抗兔 IgG 按常规方法进行免疫荧光染色以检测转染细胞胞质中 iNOS 蛋白酶。

1.6　NO 含量的测定

分别将对数生长期的正常细胞组、空质粒组和 iNOS 转染组细胞以 1.5×10^5/ml 接种于 6 孔板, 每孔 500 μl, 用含 100 μmol/L H_4B 的 10% 胎牛血清培养基培养, 24 h 后分别取各组培养液 0.5 ml, 根据北京精美公司生产的一氧化氮试剂盒说明书操作测定细胞上清中 NO 含量。

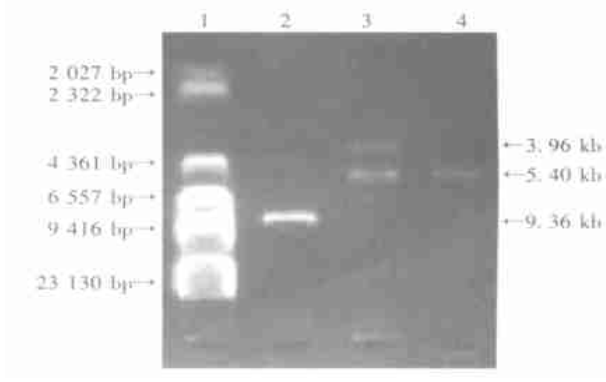
1.7　统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 8.0 for windows 软件进行统计学处理, 组间差异用单因素方差分析。

2　结果

2.1　载体的酶切鉴定

在 0.8% 琼脂糖凝胶中显示空质粒 $pcDNA_3$为 5.4 kb、重组质粒 $pcDNA_3$-iNOS 为 9.36 kb, 重组质粒双酶切(*Hind* Ⅰ / *Xbl* Ⅰ) 后出现两条 DNA 带, 第一条约 5.4 kb, 与空质粒 DNA 带相齐, 是质粒 DNA 带; 第二条约 3.96 kb, 与 iNOS cDNA 片段大小一致, 是目的片段 iNOS cDNA 带。通过重组质粒的酶切和赛百盛公司的测序结果都说明了 iNOS 基因定向插入真核表达载体中, 见图 1。



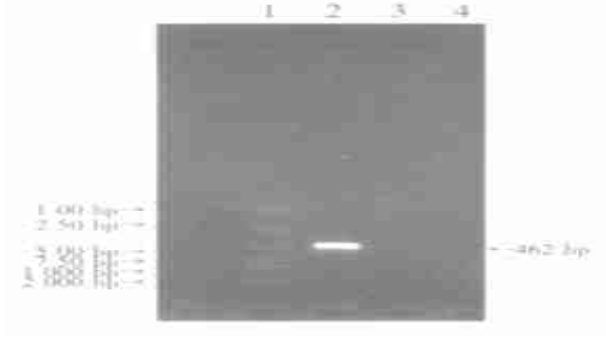
1: Marker, Lambda DNA/*Hind* Ⅲ ladder; 2: $pcDNA_3$-iNOS; 3: $pcDNA_3$-iNOS/*Hind* Ⅲ+*Xbol* Ⅰ; 4: $pcDNA_3$

图 1　**$pcDNA_3$和 $pcDNA_3$-iNOS 的酶切分析**

Fig 1　Restriction analysis of $pcDNA_3$ and recombinant $pcDNA_3$-iNOS plasmid

2.2　RT-PCR

RT-PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中显示, iNOS 转染组扩增出约 462 bp 的 DNA 带, 与引物设计的目的片段大小一致, 说明外源基因已转入 V_{79}细胞中并有 iNOS mRNA 的转录, 而对照组和空质粒组未扩增出 DNA 带, 说明 V_{79}成纤维细胞中在常规细胞培养中无人 iNOS mRNA 的表达, 见图 2。



1: Marker DL-2000; 2: $pcDNA_3$-iNOS; 3: $pcDNA_3$; 4: Negative control

图 2　**$pcDNA_3$和 $pcDNA_3$-iNOS 的 RT-PCR 产物**

Fig 2　Products of $pcDNA_3$ and $pcDNA_3$-iNOS with RT-PC

2.3　免疫荧光结果

FITC 标记的二抗在荧光显微镜下用绿光激发后会产生蓝色的荧光。对照组和空质粒组未有荧光出现, 而 iNOS 转染组用绿光激发后在细胞胞浆内有蓝色的荧光 iNOS 蛋白, 说明转染生成的 iNOS 蛋白酶在细胞胞浆内有明显的表达, 见图 3。而

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

对照组和空质粒组内无 iNOS 蛋白酶的表达。

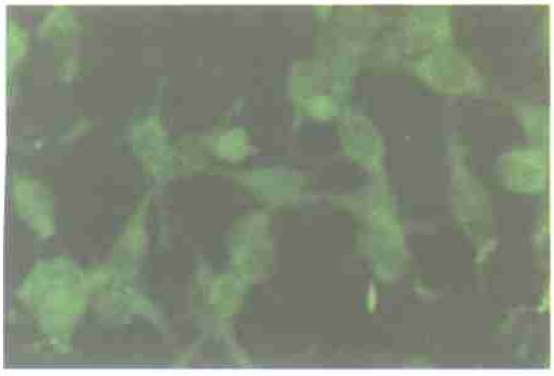


图 3 免疫荧光显示 pcDNA$_3$-iNOS 转染组 iNOS 蛋白酶的产生 (× 400)

Fig 3 iNOS protein expression in V_{79} cells transfected by pcDNA$_3$-iNOS with immunofluorescence staining (× 400)

2.4 细胞分泌 NO 的测定

用 Griess 法测定培养基上清中 NO 代谢产物 NO_2^- 含量，以反映 NO 的生成量。实验结果显示正常细胞组 NO 的含量为 (78.26±11.77)，空质粒组为(84.22±12.67)，两者相比无显著性差异($P>0.05$)，iNOS 转染组 NO 含量为(237.67±27.28)，较前两组明显增加，相比均有非常显著性意义($P<0.01$)。

3 讨论

血管内皮细胞损伤是许多心血管疾病发生的始动因素，如动脉粥样硬化、高血压、再狭窄、心肌缺血及缺血再灌注损伤。Panza 等[3]研究了乙酰胆碱(Ach)扩血管作用在高血压患者和正常血压对照组的差别，发现高血压患者注射 Ach 后血流的增加明显小于正常对照。高血压发生时间越长，这种内皮损伤越明显。Falloon 等[4]采用人皮下动脉离体灌注方法进一步证实原发性高血压患者存在内皮依赖性血管舒张缺陷。同样在对动脉硬化机理的研究中也发现，高胆固醇血症最早引起的是内皮依赖性血管反应的下降，这种改变远远早于血管壁结构的变化。血管成形术后引起的再狭窄与内皮的剥脱也有密切关系。研究表明，术中内皮细胞小面积损伤可以迅速恢复，血管平滑肌细胞(VSMC)增殖反应轻，可不产生内膜增厚；内皮细胞大面积损伤，内皮细胞难以恢复，VSMC 增殖反应明显而持久，可以产生较为严重的内膜增厚和再狭窄[5]。故有人提出，促进损伤内膜的再生，恢复 NO 对血管的保护性功能是治疗这类疾病的一个重要环节。

一氧化氮已广泛应用于临床治疗中。如一氧化氮前体物(L-精氨酸)，一氧化氮供体(硝酸甘油、硝普钠等)在治疗高血压和冠心病中的应用。但其治疗中也存在问题，一氧化氮是一种自由基，半衰期短，在体内仅 3 ~5 s，一氧化氮可迅速被氧化成硝酸盐或亚硝酸盐而失去活性，血管损伤部位很难达到有效的药物浓度，同时这类药物易出现耐药性，若使用过量，NO 还可抑制核糖核苷还原酶而影响 DNA 的复制，产生的过氧亚硝酸根($ONOO^-$)也可对组织细胞造成毒性损伤。

近年来，研究者用基因转染的方法，试图将血管内皮基因产物转染至血管壁的非内皮细胞成份中，起到部分替代内皮功能的作用，克服上述常规治疗的局限性，较确切地模拟机体内的情况。已有研究将 NOS 基因通过腺病毒载体转染至血管平滑肌细胞中，恢复血管 NO 的表达量，抑制血管新内膜的形成[6,7]。但腺病毒在体内可激活机体的免疫系统，引起免疫反应，而且转染是从血管腔通过球囊导管将重组体转染至血管的平滑肌细胞中，操作时血管内血流阻断时间长，技术难度大，因而限制了在临床中的广泛应用。本实验选择成纤维细胞作为 iNOS 基因转染的靶细胞，来探讨血管外膜基因转染的可能性。因为血管外膜的成纤维细胞作为基因转染的靶细胞具有很多独特的优越性：如易获取和体外扩增，易受外源基因的转染并能稳定地表达外源基因，携带外源基因后仍能稳定地植回体内并能分泌，致瘤性低和相对其它细胞安全等[8]。根据文献[9,10]报道，成纤维细胞中缺乏 H_4B 的生物合成，而 H_4B 是保持 iNOS 亚基聚合从而使酶具有催化活性的二聚体所必需的辅助因子，因此，我们将真核表达载体 pcDNA$_3$-iNOS 转染至 V_{79} 成纤维细胞中后，在细胞培养基中加入 H4B 以增加有活性的 iNOS 量。结果发现，i-NOS 转染组细胞胞质内有分泌的 iNOS 蛋白，NO 的含量明显增加，与正常细胞组和空质粒组相比差异有显著性意义(均 $P<0.01$)。说明成纤维细胞可以转染 i-NOS 基因，并且能够表达有活性的 iNOS 蛋白酶，从而增加细胞内 NO 的含量。这样可否设想在许多血管性疾病损伤或捣毁血管内皮后，通过转染内皮细胞部分基因至血管壁外膜的成纤维细胞中，由血管外膜替代行使内皮相应功能，可为治疗血管损伤性疾病提供新途径。由于本实验是在离体细胞株中进行的基因转染，能否成为基因治疗的一种有效的转染途径，还需在动物实验中进一步研究。

参考文献：

[1] Kibbe M, Billiar T, Tzeng E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury[J]. Cardiovasc Res, 1999, 43(3): 650—657.

[2] Reiling N, Ulmer A J, Duchrow M, *et al*. Nitric oxide synthase: mRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(8): 1 941—1 944.

[3] Panza J A, Quyyumi A A, Brush J E, *et al*. Abnormal endothenlium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension[J]. N Eng J Med, 1990, 323(1): 22—27.

[4] Falloon B J, Heagerty A M. *In vitro* perfusion study of human resistance artery function in essential hypertension[J]. Hypertension, 1994, 24(1): 14—23.

[5] De Meyer G R, Bult H, Vstunes L, *et al*. Vasoconstrictor responses after neo-intima formation and endothelial removal in the rabbit carotid artery [J]. Br J Pharmacol, 1994, 112(2): 471—476.

[6] Shears L L, Kibbe M R, Murdock A D, *et al*. Efficient inhibition of intimal hyperplasia by adenovirus-mediated inducible nitric oxide synthase gene

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

transfer to rats and pigs *in vivo*[J]. J Am Coll Surg, 1998, 187(3): 295—306.

[7] Janssens S, Flaherty D, Nong I, *et al*. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats[J]. Circulation, 1998, 97(13): 1 274—1 281.

[8] 曹雪涛, 章卫平, 陈国友, 等. 肿瘤基因治疗的受体细胞研究进展[J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 1995, 28(2): 174—175.

[9] Tzeng E, Yoneyama T, Hatakeyana K, *et al*. Vascular inducible nitric oxide synthase gene therapy: requirement for guanosine triphosphate cyclohydrolase I[J]. Surgery, 1996, 120(2): 315—321.

[10] Tzeng E, Billiar T R, Robbins P D, *et al*. Expression of human inducible nitric oxide synthase in a tetrahydrobiopterin(HB)-dificient cell line: promotes assembly of enzyme subunits into an active dimer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(22): 11 771—11 775.

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(2001)12-1409-01

个案与短篇

一起氯气泄漏事件致人畜中毒流行病学现场调查

Investigation on the accident of cholrine leak: evaluation of the emergency management of casualties

李维民[1], 刘 勇[2], 王仕丽[2] (第三军医大学: [1]高原军事医学系地理学教研室; [2]预防医学系军事毒理学教研室; 重庆 400038)

氯气(Chlorine)为白色烟雾状、带氯味的一种人工合成气体, 是一种重要的化工原料。由于它对人体可造成窒息性中毒, 故是早期化学武器常用的一种毒剂, 现已淘汰。目前做为化工原料, 由于使用保管不当偶发人畜中毒事件, 抢救不力会危及生命。2000 年 11 月 23 日在某直辖市郊区发生一次氯气意外泄漏事故, 导致 316 人受伤害, 其中 26 人住院, 19 只牲畜死亡。现将这次中毒流行病学现场调查分析报告如下。

1 中毒发生及现场抢救情况

2000-11-23 18: 00 左右, 一氯气罐被丢弃于某垃圾场, 21: 00 被拾荒者砸开一洞, 白色烟雾喷出, 拾荒者逃匿。由于风速微小, 23: 00 毒气到达下风向 50 m 处的猪饲养场, 被守夜人发现。此时整个山沟被白雾状毒气笼罩, 猪群出现干咳和惊慌。23: 30 第一头猪死亡, 其它猪出现呼吸困难, 口吐白沫和卧倒不起。23: 50 毒气波及下风向居民区, 部分居民出现中毒症状, 并向派出所报警。干警赶到后边寻找毒源边开始疏散居民, 中毒人员及时送附近医院救治。

2000-11-24 1: 00 市“110”接到报案, 5 min 后人员赶到现场。发现是氯气泄漏后, “110”干警马上赶往附近的某附属医院急诊部求援, 在借用了 2 个常用卫生口罩和部分纱布块后赶回现场。20 min 后找到正在泄漏氯气的氯气罐, 经 2~3 min 堵漏, 发现工具不力无法堵住, 此时进场人员全部干咳不止, 呼吸困难, 头痛厉害而撤出现场, 并急报“120”、“119”, 请“119”消防战士配备面具支援。“119”10 min 后到达, 20 min 后堵住毒源。

现场调查情况: 毒源泄漏时间为 6 h 左右, 染毒区域达 100 多万 m^2, 涉及 3 个自然村(居民点)。接触毒气人员 316 人, 中毒住院 26 人, 罹患率为 8.22%; 其中中度中毒患者 24 人, 占接毒人数 7.59%, 中毒后主要体征为眼痛流泪、流涕, 干咳、呼吸困难, 胸闷、心前区不适, 继之头晕呕吐; 重度中毒者 2 人(即 2 名“110”干警), 占接毒总人数的 0.63%, 中毒后开始时征状同中度者, 但征状迅速加重, 出现头剧烈疼痛、头昏, 胸痛、呼吸困难, 意识模糊, 2 人送院后均有短暂昏迷史; 轻度中毒者只感眼部不适、流泪, 咽部发痒、干咳, 呼吸发紧, 短暂轻微头晕。

毒气泄漏波及养猪场一个, 猪 29 头, 死亡 19 头, 病亡率为 65.52%。猪中毒后的主要体征是首先烦燥不安, 想逃离猪圈。干咳, 呼吸急促, 流泪流涎。继之口吐白沫, 卧倒不起, 全身皮肤发红, 呼吸困难。死亡前抽搐不止, 大小便失禁, 皮肤发紫。

染毒区内毁坏蔬菜(多为小白菜)庄稼(多为胡豆)50 多万 m^2, 占染毒区内总面积的 50%左右。主要表现为植物枝叶和嫩尖部变黄枯萎。

2 讨论

氯气的毒理作用主要是通过刺激呼吸道毛细血管, 使毛细血管壁通透性增强, 整个呼吸道分泌物渗出增多, 使患者出现刺激性咳嗽。致咽喉部水肿疼痛, 胸闷气促, 呼吸困难。严重者形成呼吸窘迫综合症, 呼吸功能衰竭。有的出现肝功能、中枢神经系统损害, 危及生命安全。

氯气作为窒息性毒剂(Choking gases asphyxiants), 在第一、二次世界大战中都有做为化学武器使用的记载[1]。后由于其体积大、不便携带等缺点, 逐渐被淘汰。但窒息性毒剂目前仍是一些国家重点研究的化学武器种类[2]。

由于氯气的中毒途径主要经呼吸道, 故氯气的中毒预防和现场及时抢救显得十分重要, 恰当的防护和及时的抢救可大大降低中毒人数和中毒程度。此次中毒事件的现场预防与抢救给了我们以下启示。

2.1 向全民普及化学中毒防治知识

此次氯气泄漏以后, 2 个拾荒者逃匿, 猪场守夜人不知报警和通知其它人, 事后了解他们均无毒气预防方面的基本知识。在“110”干警怀疑是氯气泄漏后到某附属医院求援时, 值班的医务人员也只给了 2 个一次性卫生口罩和几块纱布, 未告诉干

(下转 1413 页)

作者简介: 李维民(1952—), 男, 河北省顺平县人, 副教授, 主要从事高原卫生勤务、院前急救方面的研究, 发表论文 29 篇。电话: (023)68755734

收稿日期: 2001-03-06; 修回日期: 2001-06-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net