

· 基础研究 ·

## 缺血预适应对大鼠肢体缺血再灌注后小肠损伤的保护效应及 NO 的作用\*

刘 燕<sup>1</sup>, 彭海兵<sup>2</sup>, 张 博<sup>3</sup>, 周洪霞<sup>1</sup>, 杨秀红<sup>1</sup>, 张连元<sup>1</sup>

(1. 河北联合大学基础医学院, 河北唐山 063300; 2. 河北联合大学冀唐学院, 河北唐山 063300; 3. 河北省沧州市中西医结合医院 ICU 061001)

**摘要:**目的 观察缺血预适应(IPC)对肢体缺血再灌注(LIR)后小肠损伤的保护效应,探讨一氧化氮(NO)在该过程中的作用机制。方法 雄性 Wistar 大鼠 52 只,随机分为 4 组( $n=13$ ):假手术(Sham)组,肢体缺血再灌注(IR)组,缺血预适应(IPC)组, $N\omega$ -硝基-L-精氨酸甲酯处理(L-NAME)组,测定各组大鼠血浆和小肠组织二胺氧化酶(DAO)、NO 含量,血浆异硫氰酸荧光素标记的脂多糖(FITC-LPS)浓度,小肠组织丙二醛(MDA)、环磷酸鸟苷(cGMP)的含量;采用免疫组织化学法检测蛋白 P-选择素(P-selection)和凋亡蛋白酶(Caspase-3)的表达情况,利用原位脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)检测各组小肠组织细胞的凋亡情况,使用自动图像分析系统对其结果进行定量分析。结果 IPC 组与 IR 组比较,血浆 DAO 和 FITC-LPS 明显降低,NO 升高( $P<0.01$ ),小肠组织 NO、DAO 和 cGMP 浓度升高,MDA 浓度下降( $P<0.01$ ),小肠组织黏膜上皮细胞 P-selection、Caspase-3 的表达明显下降,AI 降低( $P<0.01$ );L-NAME 组与 IPC 组比较,血浆 NO 浓度明显下降,DAO 和 FITC-LPS 明显升高( $P<0.01$ ),小肠组织 NO、DAO 和 cGMP 浓度明显下降,MDA 浓度升高( $P<0.01$ ),P-selection、Caspase-3 表达均明显上调,AI 明显升高( $P<0.01$ )。结论 IPC 可明显改善 LIR 后小肠黏膜肠通透性升高、组织脂质过氧化损伤及肠细胞凋亡,NO 参与 IPC 的保护效应。

**关键词:**再灌注损伤;一氧化氮;细胞凋亡;缺血预适应;环磷酸鸟苷

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.21.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)21-2500-03

**Protective effect of ischemia preconditioning and the role of nitric oxide on the small intestines injury following hind limbs ischemia reperfusion in rat\***

Liu Yan<sup>1</sup>, Peng Haibing<sup>2</sup>, Zhang Bo<sup>3</sup>, Zhou Hongxia<sup>1</sup>, Yang Xiuhong<sup>1</sup>, Zhang Lianyuan<sup>1</sup>

(1. Basic Medicine College, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Jitang College of Hebei United University, Tangshan, Hebei 063300, China; 3. ICU, Cangzhou Cooperation of Chinese and Western Medicine Hospital, Cangzhou, Hebei 061001, China)

**Abstract: Objective** To observe the protection effect of ischemic preconditioning to small intestines injury after limbs ischemia reperfusion, and investigate the role of nitrogen monoxidum in the process. **Methods** 52 male Wistar rats were randomly divided into Sham group, limbs ischemia-reperfusion (IR) group, IPC + IR group and  $N\omega$ -nitro-L-arginine methylester (L-NAME) group. The value of diamine oxidase (DAO) and nitrogen monoxidum (NO) in plasma and gut tissue, the content of fluorescein isothiocyanate lipopolysaccharide (FITC-LPS) in plasma, and the value of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and malondialdehyde (MDA) in gut tissue were measured, respectively. The expression of P-selection and Caspase-3 were measured by immunohistochemistry. The apoptosis of intestinal cells was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and the results were analysed quantitatively by automatic image analytical system. **Results** Compared with the LIR group, the values of DAO and FITC-LPS in plasma decreased obviously in the IPC group, and the level of NO in plasma increased obviously ( $P<0.01$ ). The values of DAO, NO and cGMP in gut tissue increased obviously, the level of MDA and the expression of Caspase-3 and the apoptosis index (AI) were significantly decreased in IPC group ( $P<0.01$ ). Compared with the IPC group, the value of DAO and FITC-LPS were higher and the level of NO was lower in plasma of the L-NAME group ( $P<0.01$ ). The values of DAO, NO and cGMP in gut tissue obviously decreased, the level of MDA significantly increased, and the expression of Caspase-3 and the AI significantly upregulated in L-NAME group than those in IPC group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** IPC can improve the small intestine injury and the apoptosis following hind limbs ischemia reperfusion which may correlated with the increase in the level of NO.

**Key words:** reperfusion injury; nitric oxide; cyclic guanosine monophosphate; apoptosis; ischemic preconditioning

肢体缺血再灌注(limb ischemia reperfusion, LIR)不仅在受影响的肢体局部造成损伤,甚至可进一步造成包括小肠在内的多组织器官的功能、结构损伤<sup>[1-2]</sup>。缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)是机体对于缺血缺氧而产生的一种内源

性保护机制,其保护作用与减少活性氧的放线粒体膜 ATP 敏感性钾通道、抑制线粒体钙超载、减弱炎症反应等有关<sup>[3-4]</sup>。一氧化氮(NO)是体中一种重要的细胞间信息物质,NO可以调节舒张血管、调节基础血管张力和血压、抑制平滑肌细胞增殖、

\* 基金项目:河北省科技厅计划项目(12277793);唐山市科技局科研基金资助课题(12140209A-27)。 作者简介:刘燕(1980~),讲师,硕士,主要从事肢体缺血再灌注损伤研究。

抗血小板凝聚和多形核白细胞黏附等作用<sup>[5-6]</sup>。有报道 NO 在肢体 IPC 对远端心脏缺血再灌注产生的保护作用中起了重要作用<sup>[7]</sup>。给予 L-精氨酸增加小鼠肠缺血再灌注损伤后肠组织 NO 水平,有助维持肠道屏障完整性<sup>[8]</sup>。本实验对 LIR 大鼠给予双下肢 IPC 处理,并给予非选择性一氧化氮合酶抑制剂 N $\omega$ -硝基-L-精氨酸甲酯(N $\omega$ -nitro-L-arginine methylester, L-NAME)来抑制 NO 的生成,以研究 NO 在 IPC 对大鼠 LIR 后小肠损伤保护过程中的作用。

1 材料与方 法

1.1 动物、试剂及仪器 10 周龄雄性 Wistar 大鼠 52 只,体质量 200~250 g,由河南医科大学实验动物中心提供;NO、MDA 试剂盒购于南京建成生物制品公司;原位脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒、蛋白 P-选择素(P-selection)一抗、凋亡蛋白酶(Caspase-3)一抗、即用型免疫组化试剂盒购于北京中山生物试剂公司;cGMP 免疫检测试剂盒上海中医药大学;血浆异硫氰酸荧光素标记的脂多糖(FITC-LPS)、L-NAME、二胺氧化酶(DAO)购于美国 Sigma 公司。上海产 721 分光光度计、SN-695 型智能免放  $\gamma$  测量仪,美国产 SIGMA-2M/ETM 低温高速离心机。

1.2 模型构建与分组 大鼠术前 12 h 禁食,自由饮水。将 52 只实验大鼠随机分为假手术(Sham)组、肢体缺血再灌注(IR)组、缺血预适应(IPC)组、L-NAME 组,每组 13 只。IR 组:采用止血带法制作大鼠 LIR 模型,用橡皮圈环绕结扎大鼠双后肢根部,并经激光多普勒血流仪监测并证实血流被阻断,4 h 后松解橡皮带恢复血流灌注,再经过 4 h 后放血处死动物;IPC 组:如上法预先阻断双后肢血流 5 min,然后恢复血流灌注 5 min,反复 4 次,其后操作同 IR 组。L-NAME 组:操作同 IPC 组,并于松带前 15 min 经颈外静脉滴注 L-NAME(10 mg/kg),药物溶于生理盐水(4 mL/kg)。Sham 组:模拟性肢体松解橡皮带但不结扎。IR 组、IPC 组和 Sham 组均于松带前 15 min 经颈外静脉滴注生理盐水 4 mL/kg。

1.3 方法 (1) 将构建的模型自大鼠腹主动脉取血,予以抗凝后离心,取上清液,采用放免法测定各组大鼠环磷酸鸟苷(cGMP)浓度,采用生物化学法测定各组 NO、丙二醛(MDA)浓度。大鼠腹主动脉取血处死动物后即刻取小肠组织放入液氮速冻后,-70  $^{\circ}$ C 保存。(2) 小肠悬液的制备及组织 DAO 的测定:称取冻存的小肠组织 200 mg,加入 3 倍体积磷酸缓冲液(0.1 mol/L,pH=7.2),匀浆后 10 000 $\times$ g 离心 30 min,取上清液测定 DAO 活性。(3) FITC-LPS 的测定:每组另取 6 只大鼠,于再灌注 3 h 后麻醉,由空肠始端穿刺注入 FITC-LPS 30  $\mu$ g/kg(FITC-LPS 溶于 1%小牛血清清蛋白),1 h 后有腹主动脉放血处死,收集血液分离血浆,分别在荧光分光光度计上测定荧光强度[激发波长(Ex)=472 nm,发射波长(Em)=499 nm]换算为血浆荧光内毒素浓度。(4) 采用免疫组织化学法

检测 P-selection、Caspase-3 的蛋白表达情况,采用 TUNEL 法测定小肠细胞凋亡。采用 BI-2000 医学图像分析系统软件对小肠组织切片进行分析,低倍镜下以相同外部条件(亮度)摄取图像,每张切片随机选择 6 个视野,得出吸光度(A)值,每张切片取平均值。每个实验组分别随机选取 6 张切片,每张切片计算 6 个高倍视野下的凋亡细胞数和阴性细胞数,凋亡指数=阳性细胞数/(阳性细胞数+阴性细胞数) $\times$ 100%。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间均值采用单因素方差分析,q 检验进行统计学处理,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血浆 NO、DAO、FITC-LPS 浓度的变化 与 Sham 组比较,IR 组血浆中 NO、DAO 和 FITC-LPS 均明显升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ );IPC 组与 IR 组比较,DAO 和 FITC-LPS 明显降低,NO 升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );L-NAME 组与 IPC 组比较,NO 浓度明显下降,DAO 和 FITC-LPS 明显升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ );L-NAME 组与 LIR 组比较,NO 明显下降( $P<0.01$ ),见表 1。

2.2 小肠组织 NO、DAO 和 cGMP 浓度的变化 与 Sham 组比较,IR 组小肠组织中 NO、MDA 明显升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),而 DAO 明显下降,差异有统计学意义( $P<0.01$ );IPC 组与 IR 组比较,NO、cGMP 和 DAO 浓度升高( $P<0.01$ ),组织 NO 和 cGMP 升高水平较一致,MDA 浓度下降,差异有统计学意义( $P<0.01$ );L-NAME 组与 IPC 组比较,NO、cGMP 和 DAO 浓度明显下降,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),组织 NO 和 cGMP 下降水平较一致,MDA 浓度升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ );L-NAME 组与 LIR 组比较,NO 和 cGMP 浓度明显下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。

2.3 小肠组织 P-selection、Caspase-3 和 AI 表达的变化 P-selection 主要于小肠黏膜血管内皮细胞,Caspase-3 免疫组织化学阳性表达主要在小肠黏膜上皮细胞胞浆内或胞膜,可见棕黄色颗粒。TUNEL 法染色阳性表达在细胞核,呈棕黄色(图 1)。BI-2000 医学图像系统分析结果显示,与 Sham 组(0.098 $\pm$ 0.002,2.201 $\pm$ 0.254,2.070 $\pm$ 0.670)比较,IR 组(0.140 $\pm$ 0.002,9.902 $\pm$ 1.042,13.510 $\pm$ 2.890)小肠黏膜上皮细胞 P-selection、Caspase-3 和 AI 表达明显上调,差异有统计学意义( $P<0.01$ );IPC 组(0.132 $\pm$ 0.002,3.991 $\pm$ 0.299,6.910 $\pm$ 1.530)与 IR 组比较,P-selection、Caspase-3 和 AI 的表达明显下降,差异有统计学意义( $P<0.01$ );L-NAME 组(0.142 $\pm$ 0.002,8.210 $\pm$ 0.918,10.760 $\pm$ 2.150)与 IPC 组比较,P-selection 和 Caspase-3 和 AI 明显升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

表 1 各组动物血浆 NO、DAO、FITC-LPS 的变化(n=14, $\bar{x}\pm s$ )

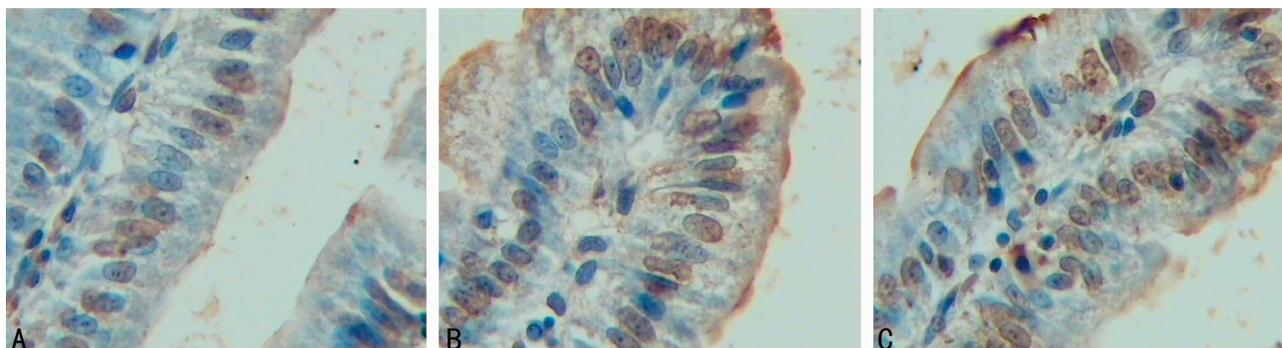
组别	NO( $\mu$ mol/L)	DAO( $\mu$ mol/L)	FITC-LPS( $\mu$ g/L)
Sham 组	28.31 $\pm$ 3.75	0.525 $\pm$ 0.059	20.27 $\pm$ 1.86
IR 组	43.98 $\pm$ 5.40**	1.309 $\pm$ 0.128**	154.35 $\pm$ 8.73**
IPC 组	72.69 $\pm$ 6.47** $\Delta\Delta$	0.748 $\pm$ 0.065** $\Delta\Delta$	64.01 $\pm$ 9.28** $\Delta\Delta$
L-NAME 组	30.69 $\pm$ 3.68 $\Delta\Delta$ **	1.265 $\pm$ 0.096** $\#\#$	148.42 $\pm$ 14.40** $\#\#$

\*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ , 与 Sham 组比较; $\Delta$ :  $P<0.05$ ,  $\Delta\Delta$ :  $P<0.01$ , 与 IR 组比较; $\#$ :  $P<0.05$ ,  $\#\#$ :  $P<0.01$ , 与 IPC 组比较。

表 2 各组动物小肠组织 NO、DAO 和 cGMP 的变化 ( $n=14, \bar{x} \pm s$ )

组别	NO( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )	cGMP( $\text{mmol}/\text{g}$ )	DAO( $\text{u}/\text{mg}$ )	MDA( $\text{nmol}/\text{mg}$ )
Sham 组	0.380 $\pm$ 0.047	0.041 $\pm$ 0.004	0.672 $\pm$ 0.094	0.682 $\pm$ 0.058
IR 组	0.637 $\pm$ 0.074**	0.045 $\pm$ 0.005	0.463 $\pm$ 0.058**	1.443 $\pm$ 0.162**
IPC 组	0.807 $\pm$ 0.101** $\Delta\Delta$	0.084 $\pm$ 0.008** $\Delta\Delta$	0.557 $\pm$ 0.066** $\Delta\Delta$	0.985 $\pm$ 0.152** $\Delta\Delta$
L-NAME 组	0.531 $\pm$ 0.053** $\Delta\#\#$	0.033 $\pm$ 0.003** $\Delta\Delta\#\#$	0.437 $\pm$ 0.045** $\#\#$	1.433 $\pm$ 0.138** $\#\#$

\*:  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与 Sham 组比较;  $\Delta$ :  $P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta$ :  $P < 0.01$ , 与 IR 组比较; #:  $P < 0.05$ ,  $\#\#$ :  $P < 0.01$ , 与 IPC 组比较。



A: IPC 组; B: IR 组; C: L-NAME 组。

图 1 IPC 对大鼠肢体 LIR 后小肠细胞凋亡的影响 (TUNEL 染色,  $\times 400$ )

### 3 讨论

DAO 是肠黏膜上皮细胞的标志酶,检测血浆及组织中 DAO 活性能较敏感的反映肠黏膜损伤情况<sup>[9]</sup>。本研究显示, LIR 组血浆 DAO 活性升高,小肠组织 DAO 活性下降,血浆 FITC-LPS 浓度升高,说明 LIR 后小肠黏膜发生的结构和功能的损伤,小肠黏膜通透性升高,发生了肠道易位及内毒素血症。Caspase-3 是重要的凋亡相关基因,是细胞凋亡蛋白级联反应的必经之路<sup>[10]</sup>。因此,测定 Caspase-3 可反映细胞凋亡的启动程度。本研究中, LIR 组 Caspase-3 表达增多,小肠组织细胞 AI 升高,提示 LIR 后小肠细胞凋亡程度增强。与 LIR 组比较 IPC 组血浆 DAO 活性降低,小肠组织 DAO 活性升高,并且血浆 FITC-LPS 浓度降低,同时, Caspase-3 表达减少,小肠组织细胞 AI 下降,证实了 IPC 具有抗小肠细胞凋亡并改善 LIR 后小肠黏膜结构损伤的作用。

有报道 NO-cGMP 通路参与预适应对心肌缺血的保护作用<sup>[11]</sup>。NO 能激活鸟苷酸环化酶,进而生成 cGMP 调节血管平滑肌细胞浆中的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度产生舒血管作用<sup>[12]</sup>。本结果显示, IPC 组较 IR 组,小肠组织 NO、cGMP 浓度升高,两者升高水平较一致。在大鼠 IPC 的基础上给予 L-NAME,可明显减少 NO 的生成,并且小肠组织 cGMP 水平下降,小肠组织结构损伤和细胞凋亡明显增强,消除了 IPC 的保护作用。提示 IPC 可能通过 NO-cGMP 途径舒张小肠血管平滑肌,改善小肠血流灌注。中性粒细胞的浸润活化在组织缺血再灌注损伤中起了重要作用。内源性 NO 可通过抗血小板和白细胞聚集,清除氧自由基、抑制脂质过氧化等多个环节发挥对小肠缺血-再灌注损伤的保护作用<sup>[13]</sup>。Krauss 等<sup>[14]</sup>在对组织缺血再灌注的研究中发现,给予 L-精氨酸促进 NO 生成,可减轻中性粒细胞与内皮细胞相互作用,减轻脂质过氧化反应。P-selection 是细胞黏附分子中选择家族中的一员, P-selection 与相应配体结合介导白细胞与血管接触,使白细胞在血管壁上缓慢流动,从而启动一系列反应,导致白细胞在炎症反应区域聚集<sup>[15]</sup>。其结果是释放大量的毒性氧自由基,引发脂质过氧化反应,损伤 DNA,导致细胞凋亡的发生,损伤组织结构。本研究中, IPC 明

显降低了 LIR 后小肠 P-selection 的表达,并且小肠组织 MDA 减少,组织脂质过氧化程度降低。而给予 L-NAME 后,小肠 P-selection 的表达和组织脂质过氧化程度升高。提示 IPC 时可在一定程度增加 NO 表达,抑制中性粒细胞黏附、游走和渗出,降低脂质过氧化反应的作用。

综上所述, L-NAME 能阻断 IPC 改善 LIR 导致的肠通透性升高、组织脂质过氧化损伤及肠细胞凋亡等效应,表明 NO 参与了 IPC 的保护效应有关。

### 参考文献:

- [1] 刘燕,彭海兵,高洪波,等. 缺血预适应对肢体缺血/再灌注骨骼肌、小肠和肺损伤的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2010, 26(4): 448-450.
- [2] 刘丽华,卢小青,门秀丽,等. 缺血预适应对大鼠肢体缺血再灌注后肝损伤的影响[J]. 天津医药, 2009, 37(2): 131-133.
- [3] Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application[J]. Atherosclerosis, 2009, 204(2): 334-341.
- [4] Mansour Z, Bouitbir J, Charles AL, et al. Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping[J]. J Vasc Surg, 2012, 55(2): 497-505.
- [5] Park B, Hoffman A, Yang Y, et al. Endothelial nitric oxide synthase affects both early and late collateral arterial adaptation and blood flow recovery after induction of hind limb ischemia in mice[J]. J Vasc Surg, 2010, 51(1): 165-173.
- [6] Abe Y, Hines I, Zibari G, et al. Hepatocellular protection by nitric oxide or nitrite in ischemia and reperfusion injury[J]. Arch Biochem Biophys, 2009, 484(2): 232-237.
- [7] Chen XG, Wu BY, Wang JK, et al. Mechanism of the protective effects of noninvasive limbs pre-(下转第 2510 页)

炎疫苗接种率只有 30%，出生 24 h 内注射乙型肝炎免疫球蛋白的使用就更低(2.7%)。有研究显示，乙型肝炎患者分娩的新生儿出生 24 h 内立即注射乙型肝炎免疫球蛋白及乙型肝炎疫苗，可明显降低乙型肝炎感染率，阻断母婴传播的远期效果，保护率达 95%<sup>[10]</sup>。

本调查发现，配偶互相感染率较高，男女相互感染概率差异无统计学意义( $P>0.05$ )，由于无患者婚前的 HbsAg 感染的相关资料，则对于夫妻及家庭成员间密切接触导致感染的依据不足。110 例乙型肝炎患者男性配偶感染的概率 22.2%，女性配偶感染的概率 20.5%，差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

本区家族聚集性乙型肝炎肝硬化、原发性 HCC 发病率较高。且肝硬化及 HCC 发病较高的主要集中在成年男性患者，因肝病(重症肝炎、肝硬化、HCC)死亡 19 例(16 个家庭)，为 6.4%。而肝硬化、HCC 的发病与 HBV-DNA 的高低成正相关，抗病毒治疗能明显降低肝硬化、HCC 的发病率。本区肝硬化、HCC 的高发病与未规范性抗乙型肝炎病毒治疗相关。经调查 110 例乙型肝炎患者，发现经规范性的抗乙型肝炎病毒治疗 39 例，约 35.4%。其余未经治疗的分析原因依次为：经济因素(经济困难)、疾病危害认识不够、依从性差等。

综上所述，在家族聚集性乙型肝炎的感染与母婴传播有直接的关系，幼年为乙型肝炎病毒感染主要的原因，同时父婴传播、密切接触与之相关。本区家族聚集性乙型肝炎的高感染率在乙型肝炎疫苗接种、乙型肝炎免疫球蛋白的使用相对较低时更为显著。肝硬化、HCC 发病率相对较高，与未规范化的乙型肝炎抗病毒治疗有主要关系<sup>[10]</sup>，未规范化治疗的患者主要与经济因素、疾病认识、依从性相关。应从乙型肝炎人群的管理着手，通过主动及被动免疫开始降低新生儿乙型肝炎的感染，提高当地经济水平、加强人们对对疾病的认识、增加乙型肝炎感染者的依从性有关，要减少家族聚集性乙型肝炎的感染、降低乙型肝炎病毒导致肝病的发病率则需要一个综合性的防治，有待进一步地研究。

#### 参考文献：

[1] Xia GL, Liu CB, Cao HL, et al. Prevalence of hepatitis B

and C virus infections in the general Chinese population. Results from a nationwide cross-sectional seroepidemiologic study of hepatitis A, B, C, D, and E virus infections in China, 1992[J]. International Hepatology Communications, 1996, 5(1): 62-73.

[2] Lau GK. Hepatitis B Infection in China[J]. Clin Liver Dis, 2001, 5(2): 361-380.

[3] Takegoshi K, Zhang W. Hepatitis B virus infections in families in which the mothers are negative but the fathers are positive for HbsAg[J]. Hepatol Res, 2006, 36(2): 75-77.

[4] Araujo NM, Waizbord R, Kay A. Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: How viral, host, and environmental factors shape genotypes and subgenotypes[J]. Infect Genet Evol, 2011, 11(6): 1199-1207.

[5] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56-62.

[6] Edey M, Barraclough K, Johnson DW. Hepatitis B and dialysis[J]. Nephrology(Carlton), 2010, 15: 137-145.

[7] Yu HB, Liu EQ, Lu SM, et al. Treatment with peginterferon versus interferon in Chinese patients with hepatitis B[J]. Biomed Pharmacother, 2010, 64(8): 559-564.

[8] Zoulim F. Therapy of chronic hepatitis B virus infection: inhibition of the viral polymerase and other antiviral strategies[J]. Antiviral Res, 1999, 44(1): 1-30.

[9] Zho Q, Yu G, Yu H. A randomized control trial on interruption of HBV transmission in uterus[J]. Chin Med J, 2003, 116(5): 685-687

[10] El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2012, 142(6): 1264-1273.

(收稿日期: 2013-01-11 修回日期: 2013-04-18)

(上接第 2502 页)

conditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Chin Med J, 2005, 118(20): 1723-1727.

[8] Cintra AE, Martins JL, Patricio FR, et al. Nitric oxide levels in the intestines of mice submitted to ischemia and reperfusion; L-arginine effects[J]. Transplant Proc, 2008, 40(3): 830-835.

[9] Zhang Y, Leng YF, Xue X, et al. Effects of penethylidene hydrochloride in small intestinal damage caused by limb ischemia-reperfusion[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(2): 254-259.

[10] 李小明, 孙志贤. 细胞凋亡中的关键蛋白酶 Caspase-3 [J]. 国外医学: 分子生物学分册, 1999, 21(1): 6-9.

[11] 兰晓莉, 裴著果, 张永学. NO-cGMP 通路在早期心肌缺血预适应中的作用[J]. 华中科技大学学报: 医学版,

2006, 35(6): 731-733.

[12] 吕昀, 柳景华. 硝酸酯类药物的耐药性与预适应保护作用 [J]. 心肺血管病杂志, 2009, 28(6): 440-443.

[13] 李纪鹏, 董光龙, 王为忠, 等. 大鼠小肠缺血再灌注后血中 NO 和 SOD 浓度与肺损伤色相关性研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2008, 11(6): 481-484.

[14] Krauss H, Sosnowski P, Biczysko M, et al. Effects of L-arginine and NG-nitro L-arginine methyl ester(L-NAME) on ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle, small and large intestines[J]. Chin J Physiol, 2011, 54(1): 7-18.

[15] 程青, 陈忠庆, 李军尧, 等. P-选择素和一氧化氮酶在大鼠肾脏缺血预处理中的表达[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(4): 520-522.

(收稿日期: 2013-01-13 修回日期: 2013-03-26)