

异丁司特对脂多糖诱导小鼠急性呼吸窘迫综合征的保护作用及机制^{*}

新疆医科大学第六附属医院 杨春辉 宋媛 林强*, 乌鲁木齐 830000

摘要 目的:探讨异丁司特(AV-411)对脂多糖(LPS)诱导的急性呼吸窘迫综合征(ARDS)小鼠的保护作用及作用机制。方法:将24只BALB/c小鼠随机分为正常组、模型组及治疗组,每组8只。模型组和治疗组小鼠尾静脉注射LPS诱导建立ARDS小鼠模型,造模成功后治疗组小鼠给予15mg/kgAV-411灌胃,正常组及模型组小鼠用等量生理盐水灌胃,3组均3次/d,治疗15d后处死。经苏木素-伊红(HE)染色观察3组小鼠肺组织病理变化;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测3组小鼠肺泡灌洗液中白介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-10(IL-10)等炎症因子水平;采用实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)及免疫蛋白印迹(WB)检测AV-411对组织Toll样受体4(TLR4)表达影响及3组小鼠肺组织中IL-1β、TNF-α、IL-10、核因子κB的抑制蛋白(IκB-α)的mRNA及蛋白表达水平。结果:治疗组小鼠肺泡、肺泡隔结缔组织炎性细胞浸润较模型组显著减少;与模型组比较,治疗组小鼠肺组织中TLR4蛋白及TLR4 mRNA表达水平显著降低,肺泡灌洗液中IL-1β、TNF-α水平显著降低,IL-10、IκB-α水平升高;肺组织IL-1β、TNF-α的mRNA及蛋白表达量显著降低(均P<0.05)。结论:AV-411可能通过诱导ARDS小鼠肺组织TLR4表达降低,抑制IκB-α蛋白降解及相关炎症因子表达,发挥对ARDS小鼠的治疗作用。

关键词 异丁司特;急性呼吸窘迫综合征;脂多糖;Toll样受体4

中图分类号 R563.8 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzz20200618

Protective effect and mechanism of Ibudilast on LPS-induced acute respiratory distress syndrome in mice YANG Chun-hui, SONG Yuan, LIN Qiang*. Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, 830000, China

Abstract Objective: To investigate the protective effect and mechanism of Ibudilast (AV-411) on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS) in mice. Methods: Twenty-four BALB/c mice were randomly divided into normal group, model group and treatment group, 8 rats each. Mice in the model group and the treatment group were induced by injecting LPS to establish the ARDS model. After modeling, mice in the treatment group were given 15 mg/kg AV-411 for 15 days, and the rest two groups were given the same amount of normal saline, mice in 3 groups were given three times per day, and were killed after 15 days of treatment. The morphological changes of lung tissues were observed by HE staining. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to test the content of interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting were employed to detect mRNA and protein expression levels of IL-1β, TNF-α, IL-10 and inhibitor of NFκB-α (IκB-α). Results: HE staining showed that AV-411 effectively relieved the pathological changes in the treatment group and the inflammatory cells infiltration was significantly reduced as compared with the model group. The mRNA and protein levels of TLR4, IL-1β, TNF-α in lung tissues of ARDS mice in the treatment group were significantly decreased as compared with those in the model group. Besides, AV-411 promoted the expression of IL-10 and IκB-α protein in lung tissues of mice in the treatment group, which was significantly different from the model group, but had no effect on the expression level of IκB-α mRNA. The tendency of IL-1β, TNF-α and IL-10 levels in BALF was consistent with mRNA levels in lung tissues. Conclusion: AV-411 may inhibit the degradation of IκB-α and the expression of inflammatory factors by inducing the expression of TLR4 in lung tissues in ARDS mice.

Key words AV-411; Acute respiratory distress syndrome; LPS; TLR4

*基金项目:新疆医科大学科研创新基金(No:XYDCX201653);
新疆维吾尔自治区自然科学基金(No:2018D01C416)

*通信作者:林强,E-mail:endeavor86@163.com

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是基于急性肺损伤(acute lung injury, ALI)由多种诱因造成的以非心原性肺水肿和顽固性低氧血症为主要特征的全身炎症反应,临床主要表现为进行性呼吸困难、难治性低氧血症、双肺弥漫性浸润阴影等,病死率较高^[1,2]。研究表明革兰阴性菌及其内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)感染诱导的 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)过度应答,下游核因子 κB(nuclear factor kappa B, NF-κB)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)/应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK)等信号分子及炎症介质的异常表达是造成 ALI 并诱发多系统脏器功能衰竭(multiple systemic organ failure, MSOF)甚至死亡的主要因素^[3,4]。异丁司特^[5](ibudilast, AV-411)是一种新型的非甾体抗炎类药物,已被普遍应用于治疗哮喘和神经系统疾病中,本研究初步探究 AV-411 对 ARDS 小鼠的保护作用及机制,为临床靶向治疗 ARDS 提供新的依据。

材料与方法

材料 选取 SPF 级 4~6 周龄成年雄性 BALB/c 小鼠 24 只,实验动物购自新疆医科大学实验动物中心,动物饲养及实验过程符合《关于善待实验动物的指导性意见》等相关规定;LPS 购自北京索莱宝科技有限公司;AV-411 购自厦门慧嘉生物科技有限公司,临用前溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose sodium, CMC)至浓度为 0.3 mg/mL;RIPA 裂解液、聚氰基丙烯酸正丁酯(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒均购自上海碧云天公司;TLR4、IκB-α、白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素-10(Interleukin-10, IL-10)一抗及辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 等均购自北京博奥森公司;TRIzol(Invitrogen);反转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TAKARA 公司;IL-1β、TNF-α、IL-10、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自美国 Abcam 公司;实验用检测引物由生工生物科技有限公司设计并合成,引物序列见表 1。

ARDS 模型制备及分组 将小鼠随机分为正常组、模型组及治疗组,每组 8 只,模型组及治疗组小

表 1 qRT-PCR 实验引物序列

名称	序列(5'→3')	长度/bp
GAPDH	Forward: CGAGAAATATGACAACCTCCCTCA	23
	Reverse: CAGCCCCAGCATCAAAGGTAGGA	23
TLR4	Forward: CTGAAAATGTGCCTCAAAACA	22
	Reverse: AGCTCTAAGTACTTCAGGTTGT	22
IκB-α	Forward: CCTGAAACGTTGATCCCCGAC	21
	Reverse: GATTTCGGAGCCTCAGTTCAA	22
IL-1β	Forward: AGTCGCTTCTTGGACGAC	21
	Reverse: TCCGAGGCCTATGGGACTCGG	21
IL-10	Forward: TCAACGTAGITCCCACGGCTA	21
	Reverse: AAGCTTCGGCAATAGCCCCGCT	21

鼠尾静脉注射 5 μg/g LPS,正常组小鼠平行给予尾静脉注射等体积无菌生理盐水,ARDS 造模方法参照 Hagiwara 等^[6]文献报道,造模成功评判标准为动脉血氧分压(PaO₂)/吸入氧浓度(FiO₂)<300 mmHg,并联合观察小鼠生存状态及组织切片病理分析评估 ARDS 模型有效性。造模成功后治疗组小鼠给予 15 mg/kg AV-411 灌胃,3 次/d,持续 15 d。同时正常组与模型组大鼠灌胃等量 0.5% CMC。治疗结束后收集小鼠肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)、肺组织等标本进行后续指标检测。

观察肺组织病理变化 将处死的小鼠左肺固定于 4% 多聚甲醛固定液中,4℃ 避光固定 2~3 d,常规脱水、石蜡包埋处理,行冠状面连续 5 μm 切片,组织切片经苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色处理后于光学显微镜下拍照观察,病理学分析参照美国胸科协会(American Thoracic Society, ATS)对 ALI 的评定系统^[7],分别从肺泡出血、肺泡腔或血管壁中性粒细胞浸润、肺泡壁厚度及是否形成透明膜 4 个方面评判 3 组小鼠肺组织病理状态。

检测肺泡灌洗液中相关蛋白表达水平 15 d 后处死小鼠,行仰卧位固定小鼠,沿腹正中线打开胸腔并给予右肺门结扎处理,分离气管,以 2 mm 外径头皮针导管插入左主支气管内,将 pH 7.4 常温生理盐水缓慢推注灌洗小鼠肺部,以每次灌洗液回收率>80% 为标准,重复灌洗 3 次,收集各组小鼠 BALF。收集到的 BALF 经 4℃, 4 000 转/min, 离心 10 min, 取上清转移至 EP 管内, 参照 ELISA 检测试剂盒说明书检测各组小鼠 BALF 中 IL-1β、TNF-α、IL-10 等炎性因子表达水平。

检测相关因子 mRNA 表达水平 取各组小鼠右肺上叶组织 30 mg, 剪碎置于研钵中, 加入液氮快

速研磨成粉末状,采用 TRIzol 搅拌研磨充分溶解粉末,参照 TRIzol 试剂盒说明书提取各组小鼠肺组织总 RNA。取 5 μg 总 RNA 参照 TAKARA 逆转录试剂盒逆转获得 cDNA,经核酸定量仪定量检测后取 100 ng cDNA,参照实时定量聚合酶链反应(quantitative real time-polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒说明书检测相关因子 mRNA 表达水平。qRT-PCR 反应条件如下:预变性 95°C, 5 min; 扩增循环 95°C, 1 min; 55°C, 2 min, 72°C, 1 min, 共 40 次循环; 溶解曲线 95°C, 15 s; 60°C, 1 min; 95°C, 15 s。每个样品配置 4 个副孔,实验同时做阴性对照排除 PCR 污染及引物二聚体干扰。收集采集到的荧光信号 Ct 值,采用相对定量分析法计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, 分析相关 mRNA 表达水平。

检测肺组织中相关蛋白表达水平 取各组小鼠右肺叶组织 50 mg,充分匀浆,加入含 1 mmol/L 磷酸酶抑制剂的裂解液冰浴裂解,每 10 min 上下颠倒混匀 5 次,共 30 min。裂解完成后将离心置于 4°C, 12 000 转/min, 离心 15 min, 取上清定量检测蛋白浓度,定量方法参照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书。取各组等量蛋白 1:1 加入 1 × loading buffer 沸水浴 5 min。行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),分离并转移目的蛋白于聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,经常规抗体孵育后于凝胶成像仪曝光并采集图像,对各组蛋白条带进行灰度分析。

统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 统计学软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用 t 检

验,不同组间比较采用单因素方差分析。所有实验均行 3 次重复实验取均值后进行数据分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

肺组织病理变化 正常组小鼠精神状态正常,呼吸及活动无异常,而模型组与治疗组小鼠出现呼吸急促、体虚无力、精力衰退、活动力减弱等症状,氧合指数($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)均 $< 300 \text{ mmHg}$ 。肉眼观察模型组小鼠肺组织存在明显肿胀、瘀血、颜色发暗等现象。光学显微镜下可见模型组小鼠肺泡腔实变、局灶性肺间质出血,肺泡及肺泡隔的结缔组织内大量炎性细胞浸润,说明 ARDS 模型建立有效。AV-411 灌胃治疗 15 d 后,治疗组小鼠肺组织肺泡完整,间质出血显著减少,肺泡及肺泡隔结缔组织内炎性细胞浸润减弱,表明 AV-411 可有效缓解 ARDS 小鼠肺组织病理变化,见图 1。

肺组织中 TLR4 表达差异 与正常组比较,模型组和治疗组小鼠肺组织中 TLR4 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高(均 $P < 0.05$);而与模型组比较,治疗组小鼠肺组织中 TLR4 蛋白及 TLR4 mRNA 表达水平显著降低(均 $P < 0.05$),见图 2。

BALF 中炎性因子水平比较 与正常组比较,模型组与治疗组小鼠 BALF 中的 IL-1 β 及 TNF- α 水平显著升高,IL-10 水平显著降低(均 $P < 0.05$);且治疗组 IL-1 β 及 TNF- α 水平较模型组低,IL-10 水平较模型组高(均 $P < 0.05$),见表 2。

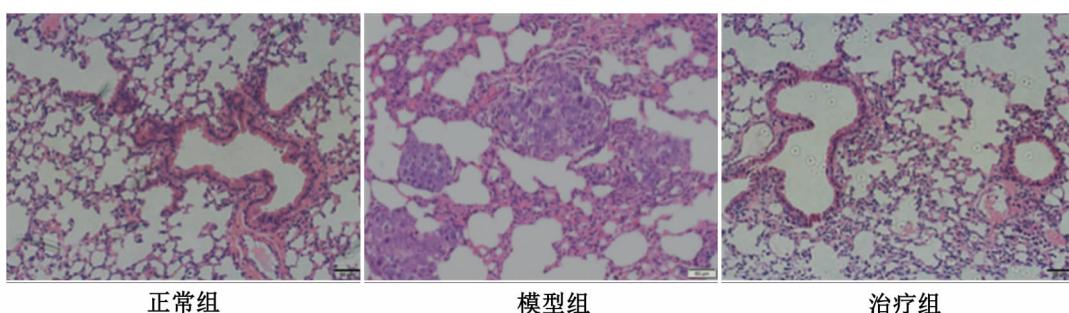
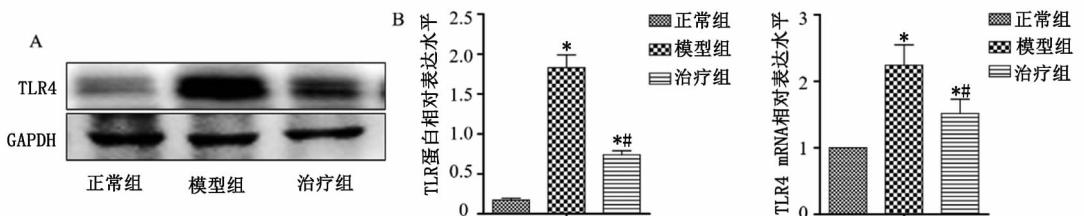


图 1 3 组小鼠肺组织病理变化(HE, $\times 200$)



注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$

图 2 Western Blot 与 qRT-PCR 检测 AV-411 对小鼠肺组织 TLR4 表达的影响

表 2 3 组小鼠 BALF 中炎性因子水平比较

组别	只	(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)		
		IL-1 β	TNF- α	IL-10
正常组	8	36.8 \pm 4.7	187.6 \pm 19.0	262.5 \pm 31.0
模型组	8	169.4 \pm 17.4*	574.6 \pm 31.3*	105.4 \pm 10.8*
治疗组	8	95.1 \pm 7.3**#	309.1 \pm 22.7**#	188.0 \pm 16.3**#

注:与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, **# $P < 0.05$

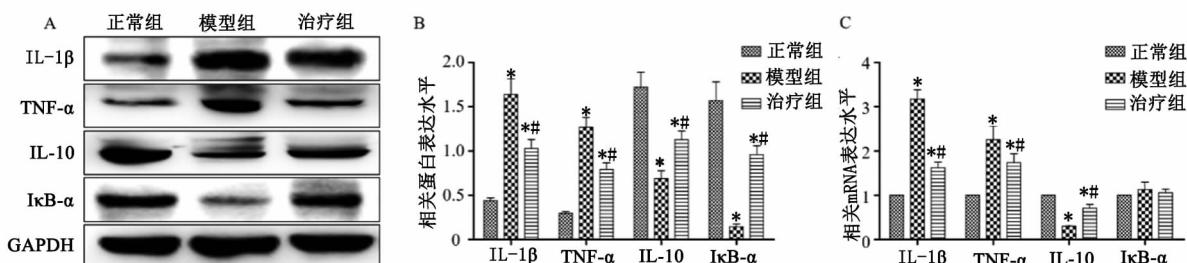
小鼠肺组织中相关蛋白表达 与正常组比较, 模型组小鼠肺组织 IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达显著升高, IL-10、I κ B- α 蛋白表达水平显著降低(均 $P < 0.05$); 与模型组比较, 治疗组肺组织 IL-1 β 、TNF- α 蛋白水平更低, IL-10、I κ B- α 蛋白水平更高, IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 表达水平更低, IL-10 的 mRNA 更高(均 $P < 0.05$), 其中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 的 mRNA 水平变化趋势与蛋白水平一致。而 3 组小鼠肺组织中 I κ B- α 的 mRNA 表达水平比较, 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 见图 3。

讨 论

精确调控 ARDS 发病过程中的炎性介质表达、减弱炎症反应对肺组织结构和肺功能的破坏、维持呼吸系统功能, 在 ARDS 的治疗中显得尤为重要^[8~10]。过度的炎症反应造成的肺血管内皮细胞损伤在 ARDS 进程中发挥重要作用, TLR4 是首个被发现的由胞外高赖氨酸富集区域、跨膜区域和胞内 TIR Toll/IL-1 受体区域组成的 TLR 相关蛋白^[11,12], 在 LPS 所致炎症反应信号转导通路中识别并向胞内传到 LPS 信号, 诱导免疫反应的发生。在 LPS 诱导 ARDS 小鼠模型中, TLR4 促使 LPS 直接作用于内皮细胞^[13], 进一步引发细胞及肺功能的改变。白三烯 TLR4 特异性拮抗剂 AV-411 在以往的报道中显示出具有抑制炎性介质释放、减弱支气管损伤和抑制神经根疼痛的作用^[14]。但其与 LPS 诱导 ARDS 小鼠模型相关炎性介质级联反应间的关系未见报道, 本研究初步探讨了 AV-411 对缓解 LPS 致小鼠

肺损伤、抑制小鼠体内炎症反应发生的可行性及其作用机制, 为靶向治疗 ARDS 提供了新的思路。

本研究通过构建 LPS 诱导 ARDS 小鼠模型, 观察造模组小鼠生存及活动状态、氧合指数指标分析、肺组织病理切片 HE 染色等方法验证 ARDS 模型建立的有效性, 同时, 病理学组织切片结果显示 AV-411 可通过有效抑制肺泡出血、肺泡腔实变及炎性细胞浸润缓解 LPS 致小鼠肺损伤, 其中治疗组小鼠肺组织肺泡隔结缔组织炎性细胞的退行性减少可能与 AV-411 靶向抑制 ARDS 小鼠炎症反应有关。研究表明 LPS 经 TLR4 信号跨膜递承是诱发 ALI 及组织炎症反应的关键^[15]。本研究显示 AV-411 可有效阻断治疗组小鼠肺组织 TLR4 mRNA 的生成及 TLR4 蛋白表达。另一方面 LPS 进入细胞后与 NF- κ B、JNK/SAPK 等下游炎症相关信号通路的激活相关^[16]。本研究中 AV-411 促进组织水平 I κ B- α 的积聚而对 I κ B- α mRNA 表达无影响。查阅以往文献可知, TLR4 胞内含 TIR 的结构域能与衔接蛋白 MyD88 相互作用并激活下游 I κ B 激酶^[17], 促使 I κ B- α 等发生磷酸化并降解, 由此提示 AV-411 促进治疗组小鼠肺组织 I κ B- α 蛋白表达, 而对 I κ B- α mRNA 表达无影响的作用机制可能是通过抑制细胞膜 TLR4 的表达, 进而抑制 TLR4 造成的 I κ B- α 的降解实现的, 与前期报道相符^[18]。另一方面, I κ B- α 的积聚会直接抑制 NF- κ B 的核移位及表达^[19]。AV-411 能够抑制治疗组小鼠促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 的表达同时促进抗炎因子 IL-10 的合成, 同时收集各组小鼠 BALF, ELISA 结果显示 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 在 BALF 中含量变化与组织水平检测结果一致。而这些炎性介质基因启动子均与 NF- κ B 存在靶向结合位点, NF- κ B 的分布及表达会直接导致这些炎性介质的异常表达。以上结果证明了 AV-411 能够通过干扰 TLR4 的表达抑制 NF- κ B 及下游炎症级联反应, 最终达到对 ARDS 小鼠的治疗作用。



注:与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, **# $P < 0.05$

图 3 AV-411 对小鼠肺组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、I κ B- α 表达的影响

参考文献

- 1 Kor DJ, Carter RE, Park PK, et al. Effect of Aspirin on Development of ARDS in At-Risk Patients Presenting to the Emergency Department: The LIPS-A Randomized Clinical Trial [J]. JAMA, 2016, 315(22): 2406-2414.
- 2 段亚楠,米婷.急性呼吸窘迫综合征患者血清 IL-18 和组织因子水平与预后的关系[J].内科急危重症杂志,2020,26(2):119-121.
- 3 Li X, He S, Zhou X, et al. Lyn Delivers Bacteria to Lysosomes for Eradication through TLR2-Initiated Autophagy Related Phagocytosis [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(1):e1005363.
- 4 Li H, Zhou X, Tan H, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of acid-aspiration-induced ALI/ARDS [J]. Oncotarget, 2017, 9(2):1772-1784.
- 5 Worley MJ, Heinzerling KG, Roche DJ, et al. Ibdilast attenuates subjective effects of methamphetamine in a placebo-controlled inpatient study [J]. Drug Alcohol Depend, 2016, 162(9):245-250.
- 6 Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, et al. High-dose intravenous immunoglobulin G improves systemic inflammation in a rat model of CLP-induced sepsis [J]. Intensive Care Med, 2008, 34(10):1812-1819.
- 7 Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(5):725-738.
- 8 王秀岩,徐思成,刘光明,等.有创-无创序贯性机械通气治疗急性呼吸窘迫综合征的时机探讨[J].中华危重病急救医学,2014,26(5):330-334.
- 9 Turner RB, Rouse S, Elbarbry F, et al. Azithromycin Pharmacokinetics in Adults With Acute Respiratory Distress Syndrome Undergoing Treatment With Extracorporeal-Membrane Oxygenation [J]. Ann Pharmacother, 2016, 50(1):72-73.
- 10 马英霞,王泽芬,陈李容.急性呼吸窘迫综合征患者呼气末正压治疗方案选择及对血液动力学影响[J].内科急危重症杂志,2019,25(2):136-138.
- 11 Feng Y, Cui Y, Gao JL, et al. Resveratrol attenuates neuronal autophagy and inflammatory injury by inhibiting the TLR4/NF-κB signaling pathway in experimental traumatic brain injury [J]. Int J Mol Med, 2016, 37(4):921-930.
- 12 朱滨,吴叶顺.脓毒症导致 ALI/ARDS 患者外周血 TLR4 及血清 TNF-α、SP-A 的变化及相关性分析 [J]. 中国医药指南, 2017, 15(31):1-2.
- 13 Stefanie Z, Ulmer AJ, Shoichi K, et al. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS [J]. Cardiovasc Res, 2002, 56(1):126-134.
- 14 Fox RJ, Coffey CS, Cudkowicz ME, et al. Design, Rationale, and Baseline Characteristics of the Randomized Double-Blind Phase II Clinical Trial of Ibdilast in Progressive Multiple Sclerosis [J]. Contemp Clin Trials, 2016, 50(7):166-177.
- 15 Loganathan R, Nazeer M, Goda V, et al. Genetic variants of TLR4 and TLR9 are risk factors for chronic Helicobacter pylori infection in South Indian Tamils [J]. Hum Immunol, 2017, 78(2):216-220.
- 16 郭龙,张春媚,高勇,等. ARDS 发病机制的相关信号通路研究进展 [J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(9):1647-1650.
- 17 Akhter N, Hasan A, Shenouda S, et al. TLR4/MyD88 -mediated CCL2 production by lipopolysaccharide (endotoxin): Implications for metabolic inflammation [J]. J Diabetes Metab Disord, 2018, 17(1):77-84.
- 18 Ruiz-Pérez D, Benito J, Polo G, et al. The Effects of the Toll-Like Receptor 4 Antagonist Ibdilast on Sevoflurane's Minimum Alveolar Concentration and the Delayed Remifentanil-Induced Increase in the Minimum Alveolar Concentration in Rats [J]. Anesth Analg, 2016, 122(5):1370-1376.
- 19 Sari AN, Korkmaz B, Serin MS, et al. Effects of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, on lipopolysaccharide-induced changes in MyD88/TAK1/IKKβ/IκB-α/NF-κB pathway and circulating miR-150, miR-223, and miR-297 levels in a rat model of septic shock [J]. Inflamm Res, 2014, 63(9):741-756.

(2019-09-16 收稿 2020-11-26 修回)

(上接第 504 页)

参考文献

- 1 Perkins GD, Jacobs IG, Nadkarni VM, et al. Cardiac arrest and cardiopulmonary Resuscitation outcome reports: update of the Utstein Resuscitation Registry Templates for out-of-Hospital Cardiac Arrest: a statement for healthcare Professionals from a task force of the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, European Resuscitation Council, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, Heart and Stroke Foundation Of Canada, Inter-American Heart Foundation, Resuscitation Council of Southern Africa, Resuscitation Council of Asia); and the American Heart Association Emergency Cardiovascular care Committee and the Council on Cardiopulmonary, Critical Care, perioperative and Resuscitation [J]. Circulation, 2015, 132(13):1286-1300.
- 2 陈衍红,杨杰,李晓娟,等.重症监护病房优化治疗对心肺复苏患者脑复苏的疗效分析[J].内科急危重症杂志,2018,24(1):62-63.
- 3 俞慧,周从阳,万筱明,等.亚低温治疗对心搏骤停患者预后影响的 Meta 分析 [J]. 重庆医学, 2018, 47(28):3680-3683.
- 4 曾瑞峰,丁邦晗,赖芳,等.电针针刺足三里治疗复苏后综合征患者的临床研究 [J]. 中国中医急症, 2018, 27(9):1560-1566.
- 5 韩林,高旸,王旭慧,等.醒脑开窍针刺法对脑缺血再灌注大鼠海马神经元 KATP 通道细胞电生理的调控研究 [J]. 天津中医药, 2019, 36(3):269-274.
- 6 Vondrakova D, Kruger A, Janotka M, et al. Association of neuron-specific enolase values with outcomes in cardiac arrest survivors is dependent on the time of sample collection [J]. Crit Care, 2017, 21(1):172.
- 7 Storm C. Biomarkers after resuscitation: Relevance in daily clinical practice for prognosis estimation and definition of therapeutic goals [J]. Med Klin Intensivmed Notfmed, 2019, 114(4):313-318.
- 8 Park JH, Oh JH, Choi SP, et al. Neurologic outcome after out-of-hospital cardiac arrest could be predicted with the help of bispectral-index during early targeted temperature management [J]. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2018, 26(1):59.

(2019-05-06 收稿 2020-11-16 修回)