

自噬的检测方法及评述 *

陈 曦 梁文颖 熊静波[△]

(南方医科大学基础医学院细胞生物学教研室 广东 广州 510515)

摘要 细胞自噬是广泛存在于真核细胞内的一种降解途径,在机体发育过程中、在生理和病理状况下都起重要作用。近年,自噬成为热点研究领域,但少有论文深入分析不同检测方法得来的数据在研究中的不同意义,说明不同检测方法所获的结果的优缺点和适用条件。本文拟对哺乳动物细胞自噬检测方法进行归类、介绍及评述,旨在为研究工作中自噬检测方法的选择和研究结果的解释起帮助作用。

关键词 :自噬 ;单丹(磺)酰戊二胺 ;LC3

中图分类号 :Q2-33 ,Q26 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2012)09-1797-04

Detection Methods of Autophagy and the Assessments*

CHEN Xi, LIANG Wen-ying, XIONG Jing-bo[△]

(Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, 1023 Shatai Road South, Guangzhou, China, 510515)

ABSTRACT: Autophagy is degradation pathway widely existed in eukaryotic cells. It plays an important role in body development and in both physiological and pathological conditions. In recent year, autophagy has become a hot research field, but limited papers do in-depth analysis of the significance of the research data getting from varieties of autophagy assays, and explain the merits ,disadvantages and applicable conditions of the used autophagy assays. In this review, autophagy assays in mammals will be classified, introduced and commented on for the purpose of providing help to the selection and data interpretation of autophagy assays in research.

Key words: Autophagy; Monodansylcadaverine; LC3

Chinese Library Classification: Q2-33, Q26 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1797-04

前言

细胞自噬是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖的降解途径,胞内损伤的蛋白质和细胞器通过自噬作用被降解,产生的氨基酸、脂肪酸等降解产物再被细胞重新利用^[1]。长因子缺乏、氧自由基、DNA 损伤等应激皆可诱导自噬^[2-4]。自噬是一个高度动态的过程,主要包括两个步骤:先是胞内的目标物被膜结构包裹形成自噬小泡以及自噬小泡与溶酶体结合,然后是自噬溶酶体对胞内物质进行降解。自噬的作用很广泛,在细胞生长发育、细胞死亡以及一些人类疾病如肿瘤的发生、发展和治疗反应方面均有重要的作用^[5],但自噬对肿瘤细胞来说是一把“双刃剑”,在不同情况下可以促进肿瘤细胞存活或引发肿瘤细胞死亡^[6]。

现有自噬检测方法主要分为体外检测(包括静态检测、动态检测)和体内检测。静态检测法侧重检测自噬现象是否存在,动态检测法侧重检测自噬的完整过程,体内检测可直接在动物体内观测结果。近年,有关自噬成为研究的热点领域,但少有论文对其所用不同自噬检测方法所获得的研究结果作深入的分析,说明不同检测方法所获的结果的优缺点和适用条件,分析不同方法所获结果在其研究中的意义。本文拟对哺乳动物细胞

自噬检测方法进行归类、介绍及评述,旨在为研究工作中自噬检测方法的选择和研究结果的解释起提示与帮助作用。因大多数自噬相关研究以哺乳动物细胞为研究对象,本文将着重讨论哺乳动物细胞中的自噬检测方法并予以分析评价。

1 自噬的分类及发生过程

1.1 自噬的分类

根据细胞物质运到溶酶体内的途径不同,自噬可分为巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬三类。巨自噬:多数人认为先由内质网来源的单层膜凹陷形成杯状双层膜样的分隔膜,并完全包绕待降解物(如细胞器)形成自噬体,再与溶酶体融合,最后,自噬体内细胞物质被溶酶体酶溶解^[7];微自噬:溶酶体的膜直接包裹长寿命蛋白并在溶酶体内降解。分子伴侣介导的自噬(CMA):胞浆内蛋白结合到分子伴侣后被转运到溶酶体腔中被溶酶体酶消化。CMA的底物是可溶的蛋白分子,CMA降解途径在清除蛋白质时有选择性,而前两者无明显的选择性^[8]。本文主要说明巨自噬。

1.2 自噬的发生过程

自噬的发生可分为四个阶段:①分隔膜的形成:在饥饿、某些激素等因素刺激下,有双层膜的杯状分隔膜开始在待降解物

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目(81071810,81072058)

作者简介 陈曦(1988-),女,博士生,主要研究方向:肿瘤抑制基因与自噬, E-mail: chenxiksb@sina.cn

[△]通讯作者 熊静波, Tel: 020-62789029, Fax: 020-62789029, E-mail: jbxiong@smu.edu.cn

(收稿日期 2011-10-09 接受日期 2011-10-31)

的周围形成。②自噬体的形成:随着分隔膜逐渐延伸,将要被降解的胞浆成分完全包绕隔离形成自噬体。③自噬体的运输、融合:自噬体形成后将其包裹物运输至溶酶体内与溶酶体融合形成自噬溶酶体,这一过程是通过细胞骨架微管网络系统的传输实现的。④自噬溶酶体的裂解:自噬体融合后最终被溶酶体中的水解酶溶解,它首先经过囊泡酸化,达到所需 pH 值后经多种蛋白酶作用使囊内容物降解,降解产物在细胞内可循环利用^[9]。

2 细胞自噬的检测方法

2.1 静态检测方法

不考虑自噬过程中自噬指标的动态变化,仅通过检测自噬体的形成与否来反映自噬现象是否存在。

2.1.1 电子显微镜检测 在电子显微镜下观察样品,判断是否有自噬泡样结构出现。电镜下,发生自噬的细胞可见损伤的细胞器如线粒体的肿胀变性,其周围有空泡状双层膜样结构,或双层膜环绕线粒体形成自噬体,也可见自噬溶酶体内最终不能降解的残体等^[10]。此法以样品中有无自噬泡对自噬进行定性,基于样品中自噬泡的个数或自噬泡的面积对自噬进行定量,但在样品制备过程中可能造成结果误差,如不同切面自噬泡个数不同时从该切面所得结果可能与整个细胞的自噬状况相距较大。另外,需要对自噬泡的结构有明确认识,以免混淆自噬泡和其他类型的液泡。总之,电子显微镜是检测自噬体的直接方法,也是检测自噬体的金标准。尤其适用于第一次发现某个应激条件诱导的自噬^[5],但在定量问题上存在争议。

2.1.2 酸性自噬泡、自噬溶酶体的检测

2.1.2.1 单丹(磺)酰戊二胺(MDC) 自噬囊泡膜上存在自噬体形成依赖的第二个泛素样结合系统(Apg8),MDC 可以与该结构特异性结合,通过 MDC 染色可以观察判断细胞自噬过程是否发生^[11]。经 MDC 染色、带有自噬泡的细胞可用流式细胞仪或荧光显微镜检测^[12],也可使用酶标仪直接检测细胞内 MDC 染料结合量。在紫外光激发下,自噬泡显示为高亮点状蓝色荧光。研究表明,MDC 染色阳性反映自噬体的形成,且细胞内 MDC 阳性的斑点数量与自噬活性相关^[13]。但 MDC 法对检测早期自噬并不特异,只对处于物质降解阶段的晚期自噬有特异性。因此,提倡结合不同的方法对早、晚期自噬进行检测。例如,早期可通过电镜观察到自噬体特征性的双层膜样结构,自噬晚期可用特征性标志物 LC3-II 检测。自噬抑制剂渥曼青霉素(wortmannin)、3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine)可阻断自噬而使 MDC 染色成阴性^[14]。MDC 不但可与自噬体结合,还可与胞浆内所有酸性液泡结合,因此单独使用 MDC 法来说明自噬程度的增强或减弱是不可靠的,应配合其他方法一起检测,例如 Western blotting。MDC 法可以用于定性和定量,但定量标准并不统一,一般分为计算阳性细胞个数和计算阳性自噬体个数两种。建议先将出现一定量自噬体的细胞判定为自噬细胞,再计算自噬细胞在总细胞中的比例。

2.1.2.2 吖啶橙染料(AO) AO 是一种能将 DNA 和细胞质染成亮绿色的细胞渗透性荧光染料,也可进入溶酶体和自噬溶酶体,并被质子化。在低 pH 环境下,AO 发出与酸度成比例的红色荧光。染有 AO 染料的细胞可用流式细胞术或荧光显微镜检测^[15]。荧光显微镜下可见无自噬溶酶体产生的细胞呈现均匀绿

色,存在自噬溶酶体的细胞出现红色。AO 适用于自噬溶酶体及其不能降解的产物残体如脂褐素颗粒的检测。

与 MDC 法一样,AO 染色法不仅可检测自噬溶酶体,还可检测胞内其他酸性泡,因此特异性稍弱,易出现假阳性结果,最好结合其它检测方法综合判断。AO 法的计量方式与 MDC 法类似,都是先判定自噬细胞,在对自噬细胞的个数进行计量。研究中,MDC 比 AO 的用途更广泛,更常见。

2.1.3 LC3 的检测 LC3 是哺乳动物细胞中酵母 ATG8(Aut7/Apg8)基因的同源物,定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,参与自噬体的形成。LC3 在哺乳动物细胞中分为 LC3A、LC3B、LC3C 三种亚型,每种亚型有 I 型和 II 型之分,其中只有 LC3B 与自噬相关^[16]。一般对 LC3 蛋白的检测即指对 LC3B 的检测。通常情况下,细胞内合成的 LC3 经过加工,成为胞质可溶性的 I 型 LC3,常规表达 LC3 蛋白;自噬期间,II 型 LC3 经泛素样加工修饰,与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺结合,形成 II 型 LC3 并聚集到自噬体膜上^[5],其含量的多少与自噬泡数量的多少成正比。因此 LC3-II 可反映自噬活性。LC3-II 蛋白可用不同方法检测,常用的有 Western blotting、免疫荧光、GFP-LC3 检测。

2.1.3.1 Western Blotting 自噬过程中,胞液中的 LC3-I 经脂质化变成 LC3-II 后移动到自噬体膜上。SDS-PAGE 电泳可分离 LC3-II 和 LC3-I。Western blotting 检测 LC3-I/LC3-II 的比值或 LC3-II 的含量改变可间接判断自噬是否发生^[5]。一般认为,LC3-I/LC3-II 的比值检测小于 1 时存在自噬。LC3-II 可随着自噬泡的成熟逐渐降解,因此,在自噬的不同时期使用免疫印迹法所得结果可能不同,所以 LC3-II 的含量检测法不及 LC3-I/LC3-II 的比值测定法用途广泛^[14]。因 LC3 蛋白分子量较小,需注意蛋白降解问题和电泳转膜过程中条件的把握。Western blotting 法一般只用于定性,但也可测量条带灰度进行半定量。

2.1.3.2 免疫荧光 通常情况下,LC3 均匀分布于细胞质中;自噬期间,LC3 聚集到自噬体膜上^[5]。使用特异性抗体与 LC3 结合,在荧光显微镜下观察荧光出现位点来确定自噬是否发生。自噬细胞在荧光显微镜下显示高亮点状或泡状结构。免疫荧光法的缺点是荧光易淬灭,所得结果不如免疫印记直观可靠。

2.1.3.3 GFP-LC3 将编码绿色荧光蛋白(GFP)与 LC3 的质粒转染到细胞中,自噬期间,GFP-LC3 融合荧光蛋白聚集于自噬体膜上,在荧光显微镜下呈现数个或数十个点状或泡状的特异性高亮点。出现高亮点的细胞可认为存在自噬泡。通过计算平均单个细胞内所产生的自噬泡个数或计数显微镜下视野中自噬细胞的个数,可对自噬进行定量^[14]。转染 GFP-LC3 质粒过程本身可能引起细胞自噬,造成细胞基础自噬率上升,GFP-LC3 不适用于非转染细胞,LC3-II 不一定聚集于自噬体膜上,也可能位于自噬前体的膜上;在定量方面,如果细胞中的绿色点状分布过多,计数会有困难。因此,虽然 GFP-LC3 观察法很常用,但因为该方法存在假阳性的可能,且可因转染效率和计数方式的不同容易产生误差,建议结合其他自噬检测试验,比较和综合分析检测结果。

静态检测法可对自噬进行基本的定性和定量测量,但因为不考虑自噬过程中自噬指标的动态变化,因此很难反映自噬的动态过程,在自噬不同阶段,静态检测法检测结果可能差别较

大。

2.2 动态检测方法

将整个自噬过程当做对象的检测方法,也可称作检测自噬通量的检测方法。自噬通量是指自噬的完整过程,包括自噬体将其形成的包裹物运输到溶酶体,并与溶酶体融合形成自噬溶酶体,以及包裹物的降解和再循环。动态检测法可基于测量自噬性蛋白降解的速率,或利用抑制剂捕捉一定时间内的自噬通量,从而记录出随时间增加的自噬体累积量^[14]。自噬通量的检测尤其适用于化学处理、氨基酸饥饿等应激条件诱导的自噬。在用动态检测方法过程中,经常要伴随使用自噬诱导剂和自噬抑制剂。自噬诱导剂通常用来诱导自噬产生。常用的自噬诱导剂如: Lithium Chloride-IMPase 抑制剂; Earle's 平衡盐溶液 - 制造饥饿; Rapamycin-mTOR 抑制剂。自噬抑制剂可作用于自噬途径的某一特定阶段,阻止 LC3-II 在自噬溶酶体阶段的降解而被检测。常用的抑制剂 3-Methyladenine, Wortammin-- 抑制自噬泡的产生^[17,18]; Bafilomycin A1-- 抑制自噬溶酶体的产生^[19]; NH₄Cl, Leupeptin, Chloroquine, E64d, pepstatin A-- 抑制自噬溶酶体的降解^[20-22]。

2.2.1 电子显微镜 在静态检测法的基础上增加自噬抑制剂即可实现动态检测,虽然电镜法可直观反映结果,仍需结合其它技术使观测结果更准确可靠。

2.2.2 LC3 通量的检测 从自噬体生成开始至自噬溶酶体降解释放出降解产物,整个过程中 LC3-I 和 LC3-II 的含量在不断发生变化。自噬体生成时,LC3-I C 端被剪切形成 LC3-II;当自噬进行到功能性自噬时,即自噬体与溶酶体结合形成自噬溶酶体时,自噬体中的成分 LC3-II 会被降解。当功能性自噬发生障碍,一般是自噬小体无法正常降解,这样膜上的 LC3-II 蛋白也无法降解,从而大量积累,影响 LC3-I 和 LC3-II 的比例,或是功能性自噬被大幅度增强,LC3-II 蛋白被快速降解,也影响 LC3-I 和 LC3-II 的比例。检测功能性自噬最好采用测自噬通量的方法,即 LC3 通量的检测。同时还需要一种自噬抑制剂来反映自噬的动态性,从而避免 LC3-II 的降解,这样逐渐积累的 LC3-II 便可提示自噬的增加或晚期自噬的发生。但此法并不适用于所有类型细胞(如人宫颈癌细胞、人胚肾细胞 293)。

2.2.3 蛋白质降解 哺乳动物细胞中有两条主要的途径来降解细胞内蛋白质,即外在和长寿命蛋白的降解途径 -- 溶酶体 ATP 非依赖降解途径,以及异常和短寿命蛋白降解途径 -- 蛋白酶体 ATP 依赖的泛素降解途径。蛋白质降解法主要利用细胞长寿命蛋白来进行检测:用具放射活性的氨基酸标记细胞蛋白,检测被自噬溶酶体降解的底物蛋白(长寿命蛋白)变化,同时用自噬抑制剂 3-Methyladenine 或氨基酸处理细胞标本作为对照^[23]。可在细胞培养液上清中检测残留放射性,放射性越强说明细胞利用的放射标记蛋白越多,自噬现象越明显。由于蛋白质降解尚存在 ATP 依赖的蛋白酶体 - 泛素途径,因此利用蛋白酶体抑制剂等化合物加以阻断,可以避免交互作用影响结果。另一个潜在的问题是:释放出的氨基酸可能发生代谢或再次合成蛋白质。如支链氨基酸在肝细胞中是一种较好的蛋白质水解指示剂,但在肌细胞中则被氧化^[14]。同时,对某一降解途径的抑制反而会引起其它降解途径的增强,这种现象可用细胞的

补偿机制作解释^[24],这也会干扰实验结果。此法虽有缺点,但仍可精确的测量残余放射性蛋白量,因而在众多自噬定量方法中是最准确可靠的一种。

与静态检测相比,动态检测不仅可证明自噬现象的存在,还可通过检测自噬性蛋白的降解速率或自噬体累积量而反映出整个动态过程。然而,动态检测需通过自噬抑制剂实现,部分自噬抑制剂,如 3-Methyladenine,本身对细胞具有一定毒性,部分自噬抑制剂,如针对 PI3K 通路的 Wortammin,是通过影响细胞通路来抑制自噬的,可改变细胞对刺激的反应,因此,在选择自噬抑制剂时需要剂量进行调控并尽量选取两种以上作用原理不同的抑制剂来进行处理。另外,各种抑制剂针对的自噬阶段不同,应根据所要抑制的自噬环节选用合适的抑制剂,结合使用两种以上作用于自噬途径不同阶段的抑制剂会使结果更加可靠。

2.3 体内检测方法

目前已建立 GFP-LC3 转基因小鼠,可通过荧光显微镜检测小鼠体内自噬状况^[25]。此法可实现对体内自噬通量的测定,具有一定实用价值和前景^[21],但目前,涉及自噬体内检测的研究文献不多。仅一种检测方法难以保证体内检测方法结果的准确性,应与电子显微镜等传统方法结合,使结果更加可靠。

3 展望

自噬与细胞生长、发育、死亡及许多人类疾病(如癌症、神经退行性疾病、肝脏疾病、心脏病、感染及免疫性疾病等)有关^[26-29],因此自噬在生命科学中非常重要。近年来,检测细胞自噬的方法不断问世。然而,尚无某一种方法可以绝对准确特异的检测自噬,因此提倡结合使用多种方法以获取可靠数据。将动态和静态检测方法结合,更能有效的说明细胞自噬的诱导发生以及细胞自噬通量的变化。

参考文献(References)

- [1] Gozuacik D, A Kimchi. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism [J]. *Oncogene*, 2004, 23(16): 2891-906
- [2] Hariharan N, P Zhai, J. Sadoshima. Oxidative stress stimulates autophagic flux during ischemia/reperfusion [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(11): 2179-2190
- [3] Weidong Han, Hongming Pan, Yan Chen, et al. EGFR tyrosine kinase inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human lung cancer cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e18691
- [4] Humberto Rodriguez-Rocha, Aracely Garcia-Garcia, Mihalis I, et al. DNA damage and autophagy [J]. *Mutat Res*, 2011, 711(1-2): 158-166
- [5] Chen Y, M.B. Azad, S.B. Gibson. Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(3): 285-295
- [6] Ning Chen, Vassiliki Karantz. Autophagy as a therapeutic target in cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(2): 157-168
- [7] Daniel J, Klionsky. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 1): 7-18
- [8] Majeski A.E, J.F Dice. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2435-2444
- [9] Wang C.W, D.J Klionsky. The molecular mechanism of autophagy [J]. *Mol Med*, 2003, 9(3-4): 65-76

- [10] Wim Martinet, Guido R.Y, De Meyer, et al. In situ detection of starvation-induced autophagy [J]. *J Histochem Cytochem*, 2006,54 (1): 85-96
- [11] Niemann A., A. Takatsuki, H.P. Elsasser, The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe [J]. *J Histochem Cytochem*, 2000,48(2): 251-258
- [12] Jung-Min Eom, Min-Ji Seo, Ji-Young Baek, et al. Alpha-eleostearic acid induces autophagy-dependent cell death through targeting AKT/mTOR and ERK1/2 signal together with the generation of reactive oxygen species [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010,391 (1): 903-908
- [13] Zhong-Ying Shen, Li-Yan Xu, En-Ming Li, et al. Autophagy and endocytosis in the amnion [J]. *J Struct Biol*, 2008,162(2): 197-204
- [14] Daniel J. Klionsky, Hagai Abeliovich, Patrizia Agostinis, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes [J]. *Autophagy*, 2008, 4(2): 151-175
- [15] Chen Y., M.B. Azad, S.B. Gibson. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy [J]. *Cell Death Differ*, 2009,16 (7): 1040-1052
- [16] Hua He, Yongjun Dang, Fangyan Dai, et al. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B [J]. *J Biol Chem*, 2003,278(31): 29278-29287
- [17] Jun-Qiang Zhang, Yu-Min Li, Tao Liu, et al. Antitumor effect of matrine in human hepatoma G2 cells by inducing apoptosis and autophagy[J]. *World J Gastroenterol*, 2010,16(34): 4281-4290
- [18] Munafo D.B, M.I. Colombo. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation[J]. *J Cell Sci*, 2001,114(Pt 20): 3619-3629
- [19] Mizushima N., T. Yoshimori, B. Levine. Methods in mammalian autophagy research [J]. *Cell*, 2010,140(3): 313-326
- [20] Ci-Hui Yan, Zhong-Qin Liang, Zhen-Lun Gu, et al. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells [J]. *Toxicon*, 2006,47(5): 521-530
- [21] Iwai-Kanai E, Yuan H, Huang C, et al. A method to measure cardiac autophagic flux in vivo [J]. *Autophagy*, 2008,4(3): 322-329
- [22] Wen-jie Guo, Si-si Ye, Ning Cao, et al. ROS-mediated autophagy was involved in cancer cell death induced by novel copper(II) complex [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2010, 62(5):577-582
- [23] Klionsky D.J., A.M. Cuervo, P.O. Seglen. Methods for monitoring autophagy from yeast to human [J]. *Autophagy*, 2007,3(3): 181-206
- [24] Udai Bhan Pandey, Zhiping Nie, Yakup Batlevi, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS [J]. *Nature*, 2007,447(7146): 859-863
- [25] Zhenyu Yue, Gay R. Holstein, Brian T. Chait, et al. Using genetic mouse models to study the biology and pathology of autophagy in the central nervous system [J]. *Methods Enzymol*, 2009. 453: p. 159-180
- [26] Xilouri M. , L. Stefanis. Autophagic pathways in Parkinson disease and related disorders [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2011,13: e8
- [27] Tacke F., C. Trautwein. Controlling autophagy: a new concept for clearing liver disease [J]. *Hepatology*, 2011, 53(1): 356-358
- [28] Loos B., A. Lochner, A.M. Engelbrecht. Autophagy in heart disease: A strong hypothesis for an untouched metabolic reserve [J]. *Med Hypotheses*, 2011,77(1): 52-57
- [29] Deretic V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes [J]. *Immunol Rev*, 2011,240(1): 92-104

(上接第 1730 页)

- [11] 熊敏, 吴丹叶, 彭庆雄. 预防机械通气患者鼻饲液反流及误吸的集束化护理实践[J]. *护理实践与研究* 2011,8,14(下) :54-56
Xiong Min, Wu Dan-ye, Peng Qing-xiong. Prevention of mechanical ventilation in patients with nasal fluid reflux aspiration of the cluster-based nursing practice [J]. *Nursing Practice and Research* 2011,8,14 (下) :54-56(In Chinese)
- [12] 师秀红. 早期鼻饲奥美拉唑在重型颅脑损伤后上消化道出血预防的应用[J]. *齐鲁护理杂志* 2010,16,26 :12-13
Shi Xiu-hong. Early nasogastric omeprazole in severe head injury to prevent the application of upper gastrointestinal bleeding[J]. *Journal of Qilu Nursing* 2010,16,26 :12-13(In Chinese)
- [13] 孔令丽. 重度颅脑损伤患者鼻饲护理的研究进展 [J]. *医学信息*, 2011,6,24(6) :56-57
Kong Ling-li. Patients with severe traumatic brain injury research nasal care[J]. *Medical Information* 2011,6,24(6) :56-57(In Chinese)
- [14] 赖玉明, 鄢君平, 凌英. 重型颅脑损伤病人早期鼻饲预防胃肠道并发症的护理[J]. *医学信息* 2010,9,23(9) :252-253
Lai Yu-ming, Yan Jun-ping. Early nasogastric feeding of patients with severe head injury prevention of gastrointestinal complications of care [J]. *Medical Information* 2010,9,23(9) :252-253(In Chinese)
- [15] 冯敏芳. 上消化道出血并发脑梗死患者的护理[J]. *中国实用护理杂志*(下旬版) 2009,4 :18-19
Feng Min-fang. Upper gastrointestinal bleeding in patients with cerebral infarction care [J]. *Chinese Journal of Practical Nursing* 2009,4 :18-19(In Chinese)
- [16] 刘春霞, 王玉霞, 马凤梅. 对鼻饲患者开展舒适护理的临床研究[J]. *中国实用护理杂志*(下旬版) 2008,3:46-48
Liu Chun-xia, Wang Yu-xia, Ma Feng-mei. Comfort care for patients with nasal feeding to carry out clinical research[J]. *Chinese Journal of Practical Nursing* 2008,3:46-48(In Chinese)
- [17] 衣同军. 重型颅脑损伤昏迷患者 181 例鼻饲并发症的预防护理[J]. *中国社区医师(医学专业)* 2010,28 :166-166
Yi Tong-jun. Coma with severe head injury patients 181 cases of nasal complications of preventive care [J]. *Chinese Community Doctors* 2010,28 :166-166(In Chinese)