

# $\alpha v \beta 3$ 靶向荧光剂术中近红外显影精准切除膀胱癌

刘玉伟 孙 闯

**摘要 目的** 合成膀胱癌特异性探针用于近红外(near-infrared, NIR)引导下的膀胱肿瘤术中导航切除。**方法** 将吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)与精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartic acid, RGD)通过化学偶合以制备膀胱癌特异性探针 ICG-RGD。通过 MTT 法测定 ICG-RGD 的细胞毒性。体内、体外实验检测 ICG-RGD 的特异性。通过近红外(near-infrared, NIR)荧光成像指导手术切除病灶并检测残留肿瘤。**结果** 在体内实验中,与 NIR 探针偶合的以整合素  $\alpha v \beta 3$  为靶点的可快速清除的 RGD 肽可高度特异且敏感地检测膀胱癌、肿瘤残留量并限定肿瘤边界。膀胱癌特异性探针 ICG-RGD 具有良好的光学稳定性和生物兼容性,可被膀胱癌细胞特异性摄取。在肿瘤内滞留时间可达 48h,最大肿瘤背景比为 9.8。通过 NIR 成像下的术中导航技术可清晰显示肿瘤边缘并发现和切除  $<0.5\text{mm}$  的微小肿瘤灶。**结论** 本研究所构建的肿瘤特异性探针 ICG-RGD 在动物模型中可有效地协助外科医生在 NIR 荧光成像引导下对膀胱肿瘤的精确切除。

**关键词** 近红外 影像引导治疗 吲哚花青绿 肿瘤靶向治疗 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸

中图分类号 R737.14

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.07.035

**Intraoperative Near-infrared Imaging for Precise Resection of Bladder Cancer by  $\alpha v \beta 3$  Targeting Fluorescent Agent.** Liu Yuwei, Sun Chuang. The Forth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang 150001, China

**Abstract Objective** To synthesize a bladder cancer (BC) - specific probe for near-infrared (NIR) imaging-guided surgery. **Methods** Indocyanine green (ICG) was conjugated chemically with arginine-glycine-aspartic acid (RGD). Toxicity of synthesized ICG-RGD was detected through MTT assay. Specificity of ICG-RGD was assessed in mice injected with MB49 BC cell line subcutaneously. Guided by NIR imaging, we surgically removed subcutaneous BC and detected tumor residuals. **Results** ICG-RGD was cleared fast *in vivo*. ICG-RGD detected BC and tumor residuals specifically and sensitively through targeting integrin  $\alpha v \beta 3$  in mouse model. ICG-RGD was optically stable, biocompatible and absorbed by BC cells specifically. The retention time of ICG-RGD in tumor was 48 h. The highest tumor-to-background ratio (TBR) was 9.8. Tumor margin was showed clearly by intra-operative NIR imaging through which minimal tumor lesions less than 0.5mm were detected and resected. **Conclusion** ICG-RGD, a BC-specific probe established by us, may assist surgical resection of BC precisely through NIR fluorescent imaging.

**Key words** Near-infrared; Image-guided therapy; ICG; Tumor targeting; RGD

膀胱癌是最常见的恶性肿瘤之一,对整个人类癌症负担有重大贡献<sup>[1,2]</sup>。在中国,膀胱癌的发生率已经达到 80.5/10 万人,且仍在增加<sup>[1]</sup>。对于原发性膀胱癌,手术治疗通常为首选,如经尿道切除术(transurethral resection, TUR)和根治性膀胱切除术<sup>[3]</sup>。尽管手术策略不断被优化以改进治疗效果,膀胱癌的复发率仍然很高。一年复发率可达 15%~61%,5 年复发率可达 78%<sup>[4,5]</sup>。

对于早期非肌层浸润性膀胱癌,膀胱镜引导的 TUR 仍是首选治疗方式<sup>[4]</sup>。然而,传统的白光膀胱镜(white-light cystoscopy, WLC)难以确定膀胱癌,尤其是在平坦肿瘤的确切边缘,这将导致肿瘤残留并增

加复发率。长期随访结果证实,与 WLC 比较,5-氨基乙酰丙酸(hexaminolevulinate, HAL)介导的蓝光荧光膀胱镜(blue-light fluorescence cystoscopy, BLFC)可提高膀胱的检出率并降低复发率<sup>[6]</sup>,但由于 HAL 特异性较低,其假阳性率可达 30%<sup>[7]</sup>。因此,临床工作中亟需具有高度肿瘤特异性的新型荧光剂用以术中指导并切除膀胱癌。

近年来,大量基础和临床研究已报道多种可用于术中成像引导肿瘤切除的 NIR 荧光剂<sup>[8,9]</sup>。与常规可见光比较,近红外光谱(通常定义为 650~900nm)介导的外科手术具有组织穿透能力强,正常组织无自发荧光,信号与背景比高,手术室无干扰等固有优势<sup>[10,11]</sup>。多项研究表明,基于 NIR 药物的术中成像可以有效的在肝癌,乳腺癌和卵巢癌等癌症中观察到直径  $<2\text{mm}$  的微肿瘤灶<sup>[12-14]</sup>。但是应

用 NIR 荧光成像引导的膀胱癌切除术尚未有深入的研究。

本研究中,笔者合成具有肿瘤特异性的靶向低分子荧光探针 ICG - RGD,用以术中成像并精确切除膀胱癌。RGD 是一种肽配体,可以与整合素  $\alpha v\beta 3$  特异性结合<sup>[15,16]</sup>。有研究表明  $\alpha v\beta 3$  在多种类型的肿瘤中过表达,并且在调节肿瘤生长,转移和血管生成中起关键作用<sup>[17,18]</sup>。因此,在临床实验中, $\alpha v\beta 3$  已成为研发新型肿瘤成像方法的分子靶点<sup>[19,20]</sup>。目前 ICG 是美国和中国食品和药物管理局唯一批准的 NIR 荧光染料。本研究使用 NIR 成像系统,在小鼠的皮下和原位膀胱癌模型中验证了新开发的 ICG - RGD 靶向剂的功效。结果表明,基于 ICG - RGD 靶向剂的 NIR 成像策略在客观指导泌尿外科医师精确切除膀胱癌方面具有良好的应用前景。

### 材料与方法

1. 主要实验材料及仪器:5 周龄 BABL/c 裸鼠(由北京维通利华实验动物科技有限公司提供);MB49 细胞系(由上海斯信生物科技有限公司提供);ICG(AAT Bioquest, 3599 - 32 - 4);RGD(Apeptide, 99896 - 85 - 2);胎牛血清(澳大利亚 Gibco 公司);MTT 检测试剂盒(上海贝博生物);正置荧光显微镜(Olympus, BX51)UV - vis 分光光度计(美国 PerkinElmer 公司);核磁共振成像系统(Aspect M3, 以色列 Aspect Imaging 公司);NIR 成像系统(自主研发);白光膀胱镜(Olympus, CYF - 2);酶标仪(Bio - tek, HF240);IVIS 光谱成像系统(美国 PerkinElmer 公司)。

2. 实验方法:(1) ICG - RGD 的合成与表达:将 2.8mg 1 - 乙基 - (3 - 二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC · HCl)和 1.5mg N - 羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于 0.5ml 水中,用以激发 10mg ICG。室温下,在黑暗的环境中搅拌 3h,将溶液与溶解在硼酸钠缓冲液中的 RGD 混合。将混合物置于室温下,在黑暗中搅拌过夜。通过薄层色谱证实中间产物为 ICG - NHS,然后过滤纯化粗产物 ICG - RGD。在 UV - vis 分光光度计和 NIR 光谱系统上记录 ICG - RGD 的吸光度和荧光光谱。而后进行稳定性分析,将 ICG - RGD(50 $\mu$ g)加入到胎牛血清(FBS, 1ml)中,并通过 UV - Vis 光谱法在 48h 内,多个时间点监测其在 760nm 波长处的光吸收。同时监测 FBS 对照溶液中 ICG 的光吸收,并与其做比对。(2) 细胞毒性测定:用 MTT 法评估 ICG - RGD 的细胞毒性。将 MB49

细胞(小鼠尿路上皮癌细胞系)以 10000 个细胞/孔接种到 96 孔板中,每孔 200 $\mu$ l 培养液。待 24h 贴壁后,吸出培养液,PBS 洗涤细胞,每孔加入用含有不同浓度的 ICG - RGD 的新鲜培养液。培养 24h 后,用 PBS 洗涤细胞,然后每孔加入 100 $\mu$ l 培养液中(含 0.5mg/L MTT)培养 4h。除去上清液,每孔加入 200 $\mu$ l 二甲基亚砷溶解析出的晶体,并使用酶标仪在 490nm 波长处测定其吸光度。(3) 皮下膀胱癌小鼠模型建立及体内荧光成像:用近交系雌性 BABL/c 裸鼠(5 周龄)及 MB49 细胞系建立膀胱癌皮下瘤模型。将 75 $\mu$ l 细胞悬液(约含  $2 \times 10^6$  个 MB49 细胞)注射到小鼠的腋下。每天观察肿瘤的生长情况,并通过磁共振成像(MRI)检查,直到其肿瘤大小适合于进行体内实验。选择 10 只小鼠并将其随机分成 2 组。分别静脉注射 ICG 和 ICG - RGD 探针(150 $\mu$ l, 含 ICG 0.2mg/ml)。将小鼠用 3% 异氟烷/空气混合物麻醉,在随后的 48h 内的多个时间点(0、0.5、1、2、3、6、8、12、24、36h)获得小鼠体内荧光成像,使用 IVIS 光谱成像系统(美国 PerkinElmer 公司)记录 ICG 和 ICG - RGD 在肿瘤中的荧光强度。(4) 磁共振成像:进行诊断性 MRI 扫描以确认膀胱癌小鼠模型的建立。参数设置为  $T_1/T_2$  加权自旋回波序列,切片厚度为 0.8 ~ 1.0mm,矩阵为 256  $\times$  256,窗宽为 19119,窗位级为 9733。(5) 近红外荧光成像指导手术和肿瘤残留的验证:荷瘤小鼠术前 8h 通过尾静脉注射 ICG - RGD。随后处死小鼠并在 NIR 成像系统的引导下进行肿瘤术中导航切除。手术期间,通过 NIR 实时成像将荧光强度高的组织逐一切除。将切下的组织冷冻、切片,而后在体式显微镜下观察并进行组织学检查。

3. 统计学方法:数据采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析,实验均重复 3 次,结果采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. ICG - RGD 的合成与表达:合成低分子 ICG - RGD 的化学式和模拟三维结构如图 1A 和图 1B 所示。吸光度和荧光光谱分析表明,ICG - RGD 分别在 778nm 波长和 822nm 波长处显示出与 ICG 相似的吸收和激发峰(图 1C)。光致发光量子产率与 ICG 相同。此外,其表现出良好的胎牛血清稳定性。在 48h 内连续观察中,吸光度下降少于 10%(图 1D)。

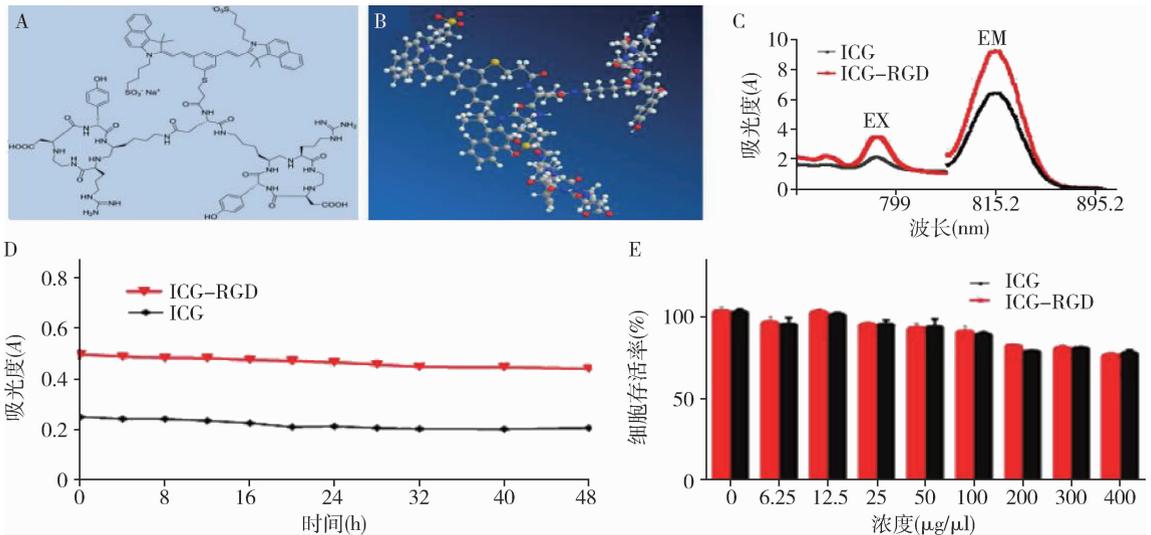


图1 ICG-RGD的合成与表达

A. ICG-RGD的化学结构; B. ICG-RGD的化学结构; C. ICG-RGD的可见吸收光谱;  
D. 不同时间点的吸光度; E. 不同时间点对MB49细胞中ICG-RGD的MTT测定

2. ICG-RGD细胞毒性及摄取: MTT法测定获得ICG-RGD生物相容性并确保可以在体内使用的安全剂量。图1E显示, ICG-RGD与ICG在所有浓度水平比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ), 当浓度达到 $400 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 时, 细胞存活率仍超过80%。这表明ICG-RGD具有与FDA批准的ICG相当的生物安全

性, 可以安全地用于体内NIR成像。与常规ICG相比较, 结合了RGD肽的荧光探针具有更好的与肿瘤细胞靶向结合的能力。通过荧光显微镜显像发现ICG-RGD被小鼠尿路上皮癌MB49细胞内在化(图2A~图2C), 而ICG的内化量少于ICG-RGD(图2D~图2F), 这与笔者的预期结果相符。

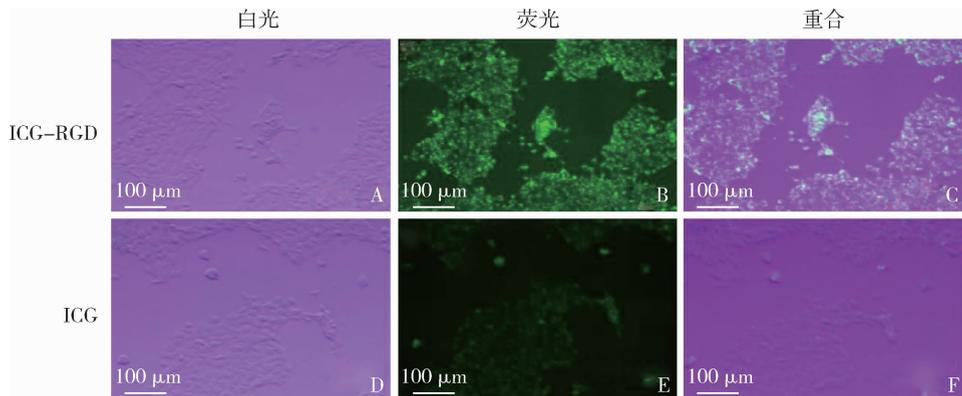


图2 MB49细胞被ICG-RGD、ICG内在化后的显微镜下对比图像

A~C. MB49细胞被ICG-RGD内在化后在白光显微镜、荧光显微镜下及重合后图像;  
D~F. MB49细胞被ICG内在化后在白光显微镜、荧光显微镜下及重合后图像

3. 体内荧光成像和ICG-RGD生物分布: 使用皮下注射膀胱癌细胞的裸鼠模型来验证ICG-RGD的体内表现。磁共振扫描,  $T_1$ 和 $T_2$ 加权均作为荷瘤小鼠的诊断程序进行, 由经验丰富的放射科医师和泌尿科医师阅片, 以确保模型建立成功(图3)。然后, 在多个观察时间点进行连续荧光成像, 以评估膀胱癌小鼠模型中ICG-RGD的肿瘤特异性(图4)。在8h时

间点后, 注射ICG-RGD的小鼠(图4B)与注射ICG的小鼠(图4A)相比较, 肿瘤部位(白色箭头)显示出更好的光学对比度。在初始分布期( $< 3\text{h}$ )后, ICG和ICG-RGD二者在肿瘤和腹部区域的累积均相对较高, 但8h后, ICG逐渐被肝脏及消化系统外泌排出, 而ICG-RGD在肿瘤内的停留时间长达12h以上。定量比较同时证实, 所有时间点, ICG-RGD比ICG

在肿瘤中具有更好的信号强度和肿瘤背景比 (tumor - to - background ratio, TBR) (图 4C 和图 4D), 这表明 ICG - RGD 在体内具有优异的与膀胱癌细胞靶向结合的能力。这些在体内连续的观察还表明, 最好的手术窗口是注射 ICG - RGD 后 8h, 此时 TBR 剖面达到峰值 (最大 TBR, ICG - RGD vs ICG:  $9.9 \pm 0.8$  vs  $7.5 \pm 0.7$ ,  $P < 0.05$ )。

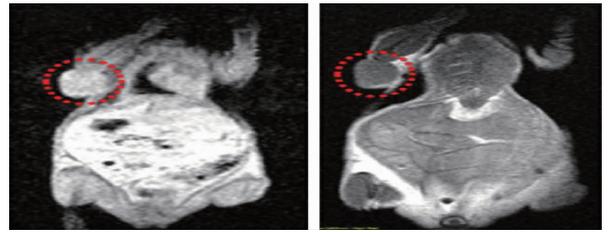


图 3 小鼠皮下肿瘤的 MRI 鉴定 (红色圆圈内所示)

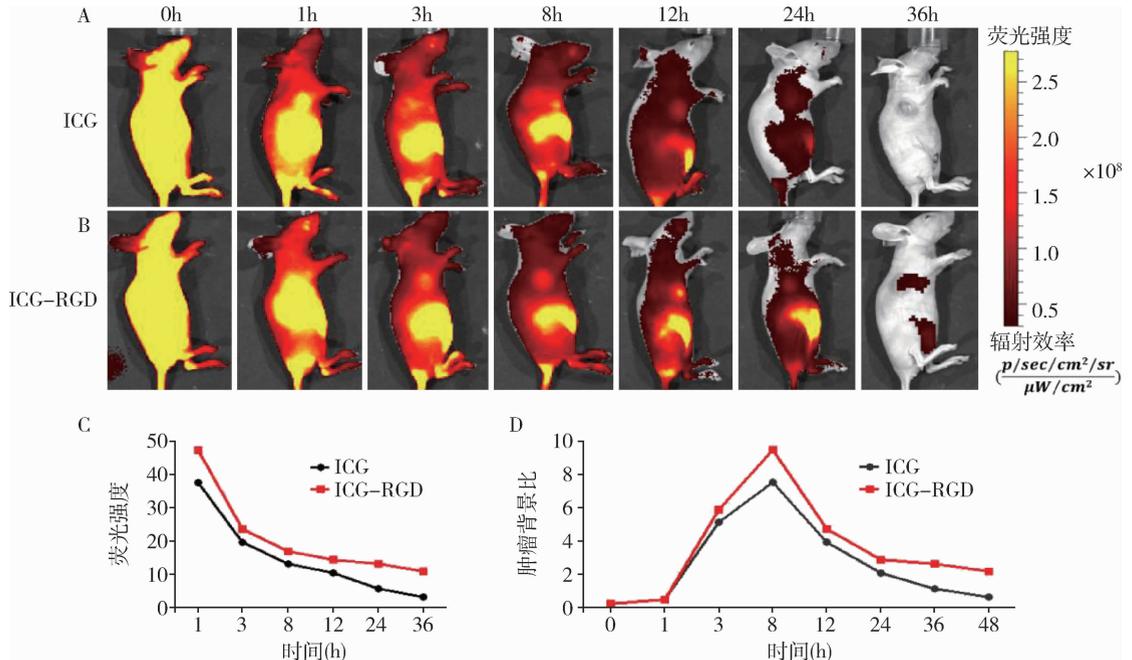


图 4 小鼠体内荧光成像及 ICG - RGD 生物分布

A、B. 使用 IVIS 给药 ICG - RGD 和 ICG 后膀胱癌异种移植物的体内连续观察 (48h); C. 定量显示 ICG - RGD 累积的肿瘤部位的荧光强度; D. 两个探针的 TBR 谱的比较

4. 膀胱癌小鼠模型的术中切除: 在皮下膀胱癌小鼠模型中通过 NIR 成像引导切除膀胱癌来验证 ICG - RGD 的可行性。该过程通过使用 NIR 成像系统进行。该系统最初用于乳腺癌手术中前哨淋巴结 (sentinel lymph node, SLN) 活检的术中导航, 采用 ICG 精确定位 SLN 手术。由于所设计的 ICG - RGD 与 ICG 具有类似的激发和发射光谱, 因此该系统非常适用于 ICG - RGD 的膀胱癌切除手术。小鼠尾静脉注射 ICG - RGD (0.2mg/ml, 150 $\mu$ l) 8h 后, 采用超高光学对比度照射肿瘤 (图 5A1 ~ 图 5A3)。疑似残留物在手术中可被有效识别, 直径在 1 ~ 2mm 的残留物也可以精确定位和切除 (图 5B2, 红色箭头)。然后从该组织中取出样品片, 并在 NIR 荧光显微镜下观察以鉴定具有高 ICG - RGD 积累的区域 (图 5D1 ~ 5D3)。之后, 用 HE 染色高积累面积进行组织学分

析。值得注意的是切开皮肤后从小鼠腹部发出的荧光 (图 5B3 和图 5C3), 笔者认为这很可能是排泄在肠内的 ICG - RGD。

5. 组织学分析: 从 NIR 荧光图像所示的肿瘤与相邻正常组织之间的边界区域获得冷冻切片, 然后用 HE 法染色。在 NIR 荧光成像的指导下, 外科医生确实可以发现皮下小鼠模型的肿瘤边界 (图 6)。

### 讨 论

本研究中, 笔者研发了一种 NIR 低分子探针, 将 RGD 和 ICG 结合用于术中肿瘤特异性成像引导的膀胱癌切除, 并通过体内异种移植模型评估了所提出的 ICG - RGD 的可行性。在皮下小鼠模型上进行的 ICG - RGD 荧光成像引导的手术, 证明了使用肿瘤靶向探针可以实现客观和精准的膀胱癌切除术。

光学成像技术已经广泛应用于膀胱癌手术中。

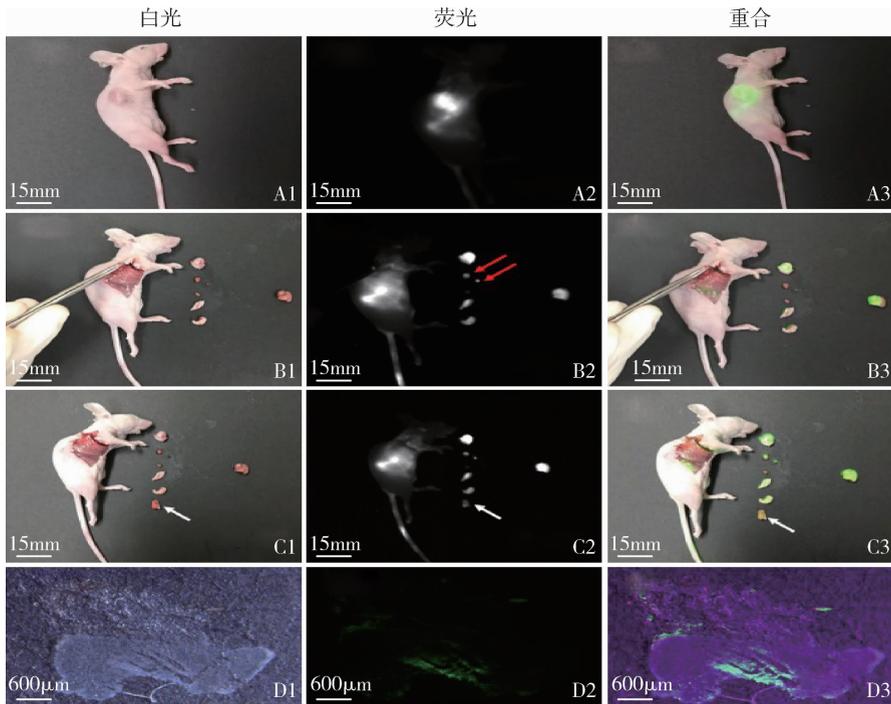


图 5 NIR 成像指导下的术中肿瘤边缘清晰度和肿瘤残留检测

A1 ~ A3. 以超高光学对比度照射肿瘤; B1 ~ B3. 外科医生逐渐去除肿瘤组织, 红色箭头显示 1 ~ 2mm 的残留肿瘤组织; C1 ~ C3. 外科医生将所有肿瘤残留物去除 (白色箭头); D1 ~ D3. 切除的组织标本在 NIR 荧光显微镜中的验证

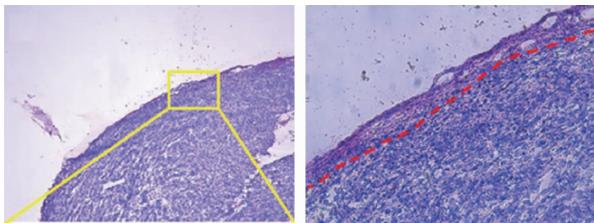


图 6 切除的肿瘤组织 HE 染色及肿瘤边界  
红色虚线所示

非肌层浸润性膀胱癌的微创经尿道切除术中, 传统的白光膀胱镜和以 5 - 氨基乙酰丙酸为光敏剂介导的蓝光荧光膀胱镜均是有价值的临床工具。然而, 随机临床试验和 Meta 分析表明, 二者在引导外科医生实现精准膀胱癌切除术时仍然受到敏感度和特异性的限制, 这通常被认为是术后复发率高的原因。因此, 笔者合成了 ICG - RGD 探针, 将更高敏感度的 NIR 荧光染料 (ICG), 与整合素  $\alpha v \beta 3$  受体靶向肽 (RGD) 结合, 以获得更好的特异性。两种成分都已应用于临床, 因此笔者所合成的低分子探针具有优异的生物相容性和极大的临床应用潜力。

与 ICG 相比, ICG - RGD 表现出更好的肿瘤细胞特异性 (图 3)。体内生物分布显像所示, 使用 ICG - RGD 的最大 TBR 高达  $9.9 \pm 0.8$ , 这明显优于 ICG (图

5)。此外, 术中成像指导的膀胱癌手术证明, 所设计的探针可以有效地帮助外科医生定位肿瘤及确定肿瘤的边缘, 并且在手术期间持续检查是否有肿瘤残留。基于 NIR 成像的高敏感度, 术中可精准地将在 1 ~ 2mm 的肿瘤微量残留物进行可视化及切除 (图 6), 且与临床手术视野相似 (15cm  $\times$  15cm)。所有这些均揭示了在膀胱癌手术中使用 ICG - RGD 的益处, 并意味着其潜在的临床应用价值。

此外在研究过程中笔者发现, 切除的组织在可疑的肿瘤区域与其相邻的正常组织之间仍然表现出很强的 NIR 荧光对比。这个结果可以指导外科医生或病理医师从正确的位置取出冷冻切片, 而不是随机切割标本进行组织学分析。这可以进一步节省实际临床应用中的操作时间。在本研究中所使用的近红外成像系统为开放手术专用, 但已有多篇文献报道 NIR 成像系统在各种内镜操作中的成功应用。提高术中应用 ICG - RGD 和 NIR 荧光膀胱镜经尿道微创切除膀胱癌的疗效仍然需要进一步的仪器开发和广泛的体内研究。笔者会在今后的研究中进一步探究这些问题。

参考文献

- 1 Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *Ca - cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115 - 132
- 2 Voltaggio L, Cimino - Mathews A, Bishop JA, et al. Current con-

- cepts in the diagnosis and pathobiology of intraepithelial neoplasia; a review by organ system[J]. *Ca - cancer J Clin*, 2016, 66(5):408 - 436
- 3 Dalbagni G. Bladder cancer; restaging TUR reduces recurrence and progression risk[J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 7(12):649 - 650
  - 4 Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, *et al*. EAU guidelines on non - muscle - invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013 [J]. *Eur Urol*, 2008, 54(2):303 - 314
  - 5 Pan Y, Volkmer JP, Mach KE, *et al*. Endoscopic molecular imaging of human bladder cancer using a CD47 antibody[J]. *SCI Transl Med*, 2014, 6(260):260
  - 6 Witjes JA, Redorta JP, Jacqmin D, *et al*. Hexaminolevulinate - Guided Fluorescence Cystoscopy in the diagnosis and follow - up of patients with non - muscle - invasive bladder cancer: review of the evidence and recommendations[J]. *Eur Urol*, 2010, 57(4):607 - 614
  - 7 Penkoff H, Dajc - Sommerer E, Zumbraegel A, *et al*. Detection and clinical outcome of urinary bladder cancer with 5 - aminolevulinic acid - induced fluorescence cystoscopy [J]. *Cancer*, 2011, 117(5):938 - 947
  - 8 Saccomano M, Dullin C, Alves F, *et al*. Preclinical evaluation of near - infrared (NIR) fluorescently labeled Cetuximab as a potential tool for fluorescence - guided surgery [J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(10):2277 - 2289
  - 9 Vahrmeijer AL, Hutteman M, Jr VDV, *et al*. Image - guided cancer surgery using near - infrared fluorescence [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(9):507 - 518
  - 10 Wada H, Hyun H, Vargas C, *et al*. Pancreas - targeted NIR fluorophores for dual - channel image - guided abdominal surgery [J]. *Theranostics* 2015, 5(1):1 - 11
  - 11 Liang X, Shang W, Chi C, *et al*. Dye - conjugated single - walled carbon nanotubes induce photothermal therapy under the guidance of near - infrared imaging [J]. *Cancer Lett*, 2016, 383(2):243 - 249
  - 12 Zeng C, Shang W, Wang K, *et al*. Intraoperative identification of liver cancer microfoci using a targeted near - infrared fluorescent probe for imaging - guided surgery [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:21959
  - 13 Hill TK, Kelkar SS, Wojtynek NE, *et al*. Near infrared fluorescent nanoparticles derived from hyaluronic acid improve tumor contrast for image - guided surgery [J]. *Theranostics*, 2016, 6(13):2314 - 2328
  - 14 Lee JY, Thawani JP, Pierce J, *et al*. Intraoperative near - infrared optical imaging can localize gadolinium - enhancing gliomas during surgery [J]. *Neurosurgery*, 2016, 79(6):856 - 871
  - 15 Chen H, Niu G, Wu H, *et al*. Clinical application of radiolabeled RGD peptides for PET imaging of integrin  $\alpha\beta 3$  [J]. *Theranostics*, 2016, 6(1):78 - 92
  - 16 Wang Y, Xiao W, Zhang Y, *et al*. Optimization of RGD containing cyclic peptides against  $\alpha\beta 3$  integrin [J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(2):232 - 240
  - 17 Oudart JB, Doué M, Vautrin A, *et al*. The anti - tumor NC1 domain of collagen XIX inhibits the FAK/PI<sub>3</sub>K/Akt/mTOR signaling pathway through  $\alpha\beta 3$  integrin interaction [J]. *Oncotarget*, 2015, 7(2):1516 - 1528
  - 18 Ma P, Yu H, Zhang X, *et al*. Increased active tumor targeting by an  $\alpha\beta 3$  - targeting and cell - penetrating bifunctional peptide - mediated dendrimer - based conjugate [J]. *Pharm Res*, 2016, 34(1):1 - 15
  - 19 Terry SY, Abiraj K, Frielink C, *et al*. Imaging integrin  $\alpha\beta 3$  on blood vessels with 111In - RGD2 in head and neck tumor xenografts [J]. *J Nucl Med*, 2014, 55(2):281 - 286
  - 20 Wenk CH, Ponce F, Guillermet S, *et al*. Near - infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti -  $\alpha\beta 3$  integrin molecular probe [J]. *Cancer Lett*, 2013, 334(2):188 - 195

(收稿日期:2017 - 10 - 12)

(修回日期:2017 - 10 - 22)

(上接第 148 页)

- 5 杨萌萌,张宇,赵妍,等. 热射病致多器官功能障碍综合征的研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(2):188 - 192
- 6 赵佳佳,周京江,胡婕,等. 影响劳力性热射病预后的危险因素分析[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(9):515 - 518
- 7 苗利辉,宋青,刘辉,等. 热射病患者胃肠道功能障碍与病情严重程度及预后的关系 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27(8):635 - 638
- 8 Wang YH, Liu TT, Kung WM, *et al*. Expression of aquaporins in intestine after heat stroke [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(8):8742 - 8753
- 9 Casa DJ, McDermott BP, Lee EC, *et al*. Cold water immersion: the gold standard for exertional heatstroke treatment [J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 2007, 35(3):141 - 149
- 10 Pease S, Bouadma L, Kermarrec N, *et al*. Early organ dysfunction course, cooling time and outcome in classic heatstroke [J]. *Intensive Care Med*, 2009, 35(8):1454 - 1458
- 11 陈怡,黄蕾,李洁廉,等. 体能训练致热射病并发多器官功能障碍的营养治疗 [J]. *西南国防医药*, 2014, 24(11):1226 - 1228
- 12 于红卫,冯岩梅,孟庆华. 能量代谢测定系统(代谢车)临床应用的研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2006, 9(21):1817 - 1818, 1820
- 13 冯金周,曾俊,孙明伟,等. 间接能量测定系统在重型颅脑损伤治疗中的应用及其临床意义 [J]. *实用医院临床杂志*, 2015, 12(3):31 - 34
- 14 刘菁,李倩,姚俊英,等. 间接能量测定法监测指导危重症患者营养治疗的对比研究 [J]. *现代医药卫生*, 2013, 29(17):2567 - 2568
- 15 秦启红,钮丹叶,刘军,等. 代谢车在重度烧伤病人能量代谢测定中的应用 [J]. *肠外与肠内营养*, 2016, 23(6):332 - 335
- 16 Aliasgharzadeh S, Mahdavi R, Asghari JM, *et al*. Comparison of indirect calorimetry and predictive equations in estimating resting metabolic rate in underweight females [J]. *Iran J Public Health*, 2015, 44(6):822 - 829
- 17 江玲芝,孙仁华,徐云祥,等. 代谢车在成人急性自发性脑出血危重症患者营养支持中的价值 [J]. *浙江临床医学*, 2016, 18(11):2006 - 2008
- 18 张会云,李锐,王勇强,等. 代谢车指导多器官功能障碍综合征患者的营养支持治疗 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28(8):741 - 743
- 19 Schlein KM, Coulter SP. Best practices for determining resting energy expenditure in critically ill adults [J]. *Nutr Clin Pract*, 2014, 29(1):44 - 55

(收稿日期:2017 - 10 - 20)

(修回日期:2017 - 10 - 30)