

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01240

## IκBα 基因转染抑制脂多糖诱导的小鼠炎症反应

李 泉,俞卫锋\*,邱必军,张金旻,费国雄

第二军医大学东方肝胆外科医院麻醉科,上海 200438

**[摘要]** **目的:**构建携带 SAA3 启动子的 IκBα 表达载体,观察其对 NF-κB 活性及脂多糖(LPS)诱导的小鼠炎症反应的影响,探讨脓毒症的治疗方法。**方法:**离体细胞实验:离体混合培养小鼠肝细胞和库普弗细胞,分为正常组、LPS 处理组和 LPS+基因转染组,LPS 注射 24 h 后,测定各组细胞上清 AST、ALT、LDH 和 TNF-α、IL-6 水平。小鼠在体实验:(1)小鼠随机分为正常组、LPS 处理组和 LPS+基因转染组 3 组(n=10),小鼠腹腔注射 250 μg LPS 或等量生理盐水,24 h 后处死,取血清和肝组织测定 TNF-α、IL-6 水平。(2)小鼠随机分为 LPS 处理组和 LPS+基因转染组(n=21),0、48 h 二次注射 150 μg LPS,首次注射后不同时点(0、2、24、48、50、72、96 h)取肝组织测 NF-κB 和 IκBα 活性,以 0 h 测得值作为正常对照。(3)小鼠随机分为 LPS 处理组和 LPS+基因转染组(n=20),腹腔注射 350 μg LPS 后,继续饲养 96 h,观察各时点(0、12、24、36、48、72、96 h)小鼠生存率。**结果:**与 LPS 组相比,LPS+基因转染组共培养细胞上清中 AST、LDH 和 TNF-α、IL-6 水平均降低,但仍高于正常组(P<0.05)。与 LPS 组相比,LPS+基因转染组肝组织、血清中 TNF-α、IL-6 水平降低(P<0.05);与 LPS 组相比,LPS+基因转染组 2、24、50、72 h 时 NF-κB 活性明显降低,但高于正常对照(P<0.05);LPS 刺激 72、96 h 时 LPS+基因转染组小鼠的存活率高于 LPS 组(P<0.05)。**结论:**以 SAA3 为启动子,IκBα 靶基因能够在肝脏表达,并可有效动态抑制内毒素诱导的小鼠肝脏或全身炎症过激反应。

**[关键词]** NF-κB; IκBα; 基因疗法; 炎症; 脂多糖类

**[中图分类号]** R 631.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)11-1240-05

### Inhibitory effect of IκBα gene on LPS-induced inflammation in mice

LI Quan, YU Wei-feng\*, QIU Bi-jun, ZHANG Jin-min, FEI Guo-xiong

Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To construct IκBα vector carrying SAA3 promoter and to observe its effect on NF-κB activity and LPS-induced inflammation, so as to lay a foundation for treatment of sepsis. **Methods:** Mouse liver cells and kupffer cells were co-cultured and were divided into three groups: control group, LPS group and LPS+ gene transfer group. Twenty-four hours after LPS injection, the levels of AST, ALT, LDH, IL-6 and TNF-α were measured in the supernatants of the each group. For animal experiments: (1) Mice were divided into three groups: control group, LPS group and LPS+ gene transfer group(n=10). The levels of TNF-α and IL-6 were measured in the serum and liver tissues 24 hours after intraperitoneal injection of 250ug LPS or saline. (2) Mice were also divided into two groups: LPS group and LPS+ gene transfer group(n=21). Mice were injected with 150 μg LPS twice at 0 and 48 h, then the activities of NF-κB and IκBα in the liver were measured at 0, 2, 24, 48, 50, 72, and 96 h after the first injection. The values at 0 h were taken as control group. (3) Mice were also divided into another two groups: LPS group and LPS+ gene transfer group(n=20). The survival rates of animals were observed at 0, 2, 24, 48, 50, 72, and 96 h after injection of 350 μg LPS. **Results:** Compared with LPS group, the levels of AST, LDH, TNF-α and IL-6 in the culture supernatants of LPS+ gene transfer group were decreased, but were still higher than those in the control group(P<0.05). Compared with LPS group, the levels of TNF-α and IL-6 in the liver tissues and sera of LPS+ gene transfer group were significantly decreased(P<0.05). Compared with LPS group, the activity of NF-κB in the liver tissues of LPS+ gene transfer group were decreased, but was still significantly higher than that of the control group(P<0.05). Compared with LPS group, LPS+ gene transfer group had higher survival rate at 72 and 96 h(P<0.05). **Conclusion:** IκBα gene can be expressed in the liver with SAA3 promoter, and transfection of IκBα can effectively inhibit endotoxin-induced liver and general inflammation.

**[KEY WORDS]** NF-κB; IκBα; gene therapy; inflammation; lipopolysaccharides

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(11):1240-1244]

**[收稿日期]** 2009-04-07 **[接受日期]** 2009-09-17

**[基金项目]** 上海市科技启明星计划(SN06QA14067). Supported by Shanghai Rising Star Program(SN06QA14067).

**[作者简介]** 李 泉, 博士, 副教授, 副主任医师. E-mail: quanligene@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81875231, E-mail: ywf808@sohu.com

炎性介质的过度释放是导致脓毒症、多器官功能障碍综合征的主要原因<sup>[1-2]</sup>。近年来,抗炎性介质治疗相关的基础研究取得了较大进展<sup>[3-4]</sup>,但临床试验疗效欠佳,可能由于抗炎性介质治疗的有效性和可控性不强所致<sup>[5]</sup>。基因治疗是抗炎治疗的新途径,转染基因可在主要炎症组织中特异表达数天或数周,克服了多种生物制剂半衰期短、靶向性不强的缺点;选择合适的启动子/增强子元件,可使目的基因的表达随炎症反应水平自动调节,达到动态治疗目的<sup>[6-8]</sup>。

核转录因子(nuclear factor kappaB, NF- $\kappa$ B)具有强大的转录调控作用,能诱导多种细胞因子、黏附分子和炎性介质的表达,参与多种与机体防御反应有关基因的表达,是机体内介导组织细胞炎症损伤可诱导基因激活的一个共同通道<sup>[9-11]</sup>。I $\kappa$ B $\alpha$  是 NF- $\kappa$ B 的主要天然抑制蛋白,能够有效抑制 NF- $\kappa$ B 蛋白表达,从而抑制炎症反应<sup>[12-13]</sup>。本研究选择 I $\kappa$ B $\alpha$  作为转染基因,观察 I $\kappa$ B $\alpha$  基因表达对炎症反应的抑制作用及其对内毒素血症的治疗效果,为后续研究奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 质粒 pSAA3-I $\kappa$ B $\alpha$  的构建 I $\kappa$ B $\alpha$  cDNA 由美国北卡罗莱纳大学 Brenner 教授惠赠,利用本室已构建的质粒 pSAA3-CAT<sup>[14]</sup>,将 I $\kappa$ B $\alpha$  cDNA 与之重组构建成质粒 pSAA3-I $\kappa$ B $\alpha$ ,并按常规进行转化、抽提和鉴定。

1.2 小鼠肝脏细胞的分离和混合培养 健康昆明小鼠购自中国科学院实验动物中心,体质量 18~25 g,雌雄不拘。小鼠脱颈处死,取完整肝,用胶原酶消化法<sup>[15]</sup>分离鼠肝细胞,细胞混悬液经 200 目尼龙网过滤,4 $^{\circ}$ C 50 $\times$ g 离心 30 min,沉淀即为肝细胞。上清液中含库普弗细胞,清洗,计数,调整密度为 2 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml,用塑料瓶培养 2~4 h,弃去未贴壁细胞,再用 0.25% 胰酶消化并洗脱贴壁细胞,调整细胞密度至 2 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml。再用 Percoll 密度梯度离心液(Pharmacia 公司,美国)纯化肝细胞、库普弗细胞,鉴定 2 种细胞纯度、活力均大于 95%。将库普弗细胞以 1:10 比例加入含 20% 小牛血清 DMEM 培养液的肝细胞培养瓶中混合培养,培养 24 h 后用于基因转染实验。

1.3 离体细胞和在体动物的基因转染 采用脂质体转染法进行基因转染<sup>[16]</sup>。

1.3.1 细胞转染 取 10  $\mu$ g 质粒 pSAA3-I $\kappa$ B $\alpha$ ,用 HEPES 缓冲液稀释至 50  $\mu$ l(A 液);取 10  $\mu$ l 的 DOTAP 脂质体(Boehringer Mannheim 公司,德国)同样稀释至 50  $\mu$ l(B 液),混合 A 液和 B 液室温静置 10~15 min 可呈现云雾状悬液。生长良好的细胞混合培养液换液后,调整细胞密度至 5 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml,取 2 ml 培养液加入脂质体复合物 100  $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 转染 12 h 换液,调整细胞密度为 10<sup>5</sup>/ml,接种 24 孔板进行实验,经鉴定脂质体转染效率为 20.0%,预实验证明已符合本实验要求。

1.3.2 在体动物的基因转染 取质粒 pSAA3-I $\kappa$ B $\alpha$  100  $\mu$ g 用 HEPES 缓冲液稀释至 100  $\mu$ l(A 液);取 DOTAP 脂质体 100  $\mu$ l 悬液(B 液)。混合 A 和 B 液,室温静置 10~25 min。每只小鼠腹腔注射 200  $\mu$ l 脂质体质粒混合物及 300  $\mu$ l 生理盐水,转染 48 h。

1.4 离体细胞实验 取肝细胞和库普弗细胞混合培养液随机分为 3 组,接种于 24 孔板,每组 24 孔。正常组:加入等量生理盐水;脂多糖(LPS)处理组:给予 LPS 10  $\mu$ g/ml;LPS+基因转染组:细胞行基因转染处理后,加入 LPS 10  $\mu$ g/ml。3 组接种前调整细胞密度为 10<sup>5</sup>/ml,处理并孵育 24 h,取细胞培养上清检测谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)和肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素 6(IL-6)水平。

### 1.5 在体动物实验

1.5.1 基因转染对 TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达的影响 实验分 3 组:正常组、LPS 处理组和 LPS+基因转染组。LPS 处理组参考 Chiao 等<sup>[17]</sup>的内毒素模型,腹腔注射 250  $\mu$ g LPS,并略作改良建立小鼠内毒素模型;LPS+基因转染组在 LPS 处理前,先进行小鼠基因转染处理;正常组注射等量的生理盐水。LPS 注射 24 h 后处死动物,分别取静脉血血清和肝组织测定 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平。

1.5.2 基因转染对 NF- $\kappa$ B 和 I $\kappa$ B $\alpha$  活性的影响 取 LPS 处理组和 LPS+基因转染组小鼠各 21 只,各时间点平均分配动物,0、48 h 两次腹腔注射 150  $\mu$ g LPS,饲养 96 h,首次注射后 0、2、24、48、50、72、96 h 取肝组织测量 NF- $\kappa$ B 和 I $\kappa$ B $\alpha$  活性,0 时点作为正常对照。

1.5.3 基因转染对小鼠生存率的影响 取 LPS 处理组和 LPS+基因转染组小鼠各 20 只,腹腔注射 350  $\mu$ g LPS,饲养 96 h,观察注射后 0、12、24、36、

48、72、96 h 不同时点的小鼠生存率,0 时点作为正常对照。

1.6 各指标的测定方法 AST、ALT、LDH 应用 CX7 全自动生化分析仪(Beckman 公司,美国)测定,TNF- $\alpha$ 、IL-6 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定,试剂盒由军事医学科学院提供。核蛋白提取参考 Schreiber 法<sup>[19]</sup>,采用 Bradford 法蛋白定量,凝胶电泳迁移率改变分析法(EMSA)测定 NF- $\kappa$ B 活性,按美国 Promega 公司试剂盒方法完成。所有样品均加入 4% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中,电压 155 V,电泳约 40 min,取胶、干燥、压片,-70℃ 曝光 20 h 后定影和显影。扫描并定量各泳道影像的密度值,以反映 NF- $\kappa$ B 活性大小。用蛋白免疫印迹分析法

检测 I $\kappa$ B $\alpha$  的表达<sup>[19]</sup>。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用成组 *t* 检验或单因素方差分析,生存率的比较采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 I $\kappa$ B $\alpha$  基因转染对 LPS 刺激肝细胞、库普弗细胞共培养体系的影响 与正常组相比,LPS 组共培养细胞上清中 AST、ALT、LDH 和 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平均升高( $P < 0.01$ );与 LPS 组相比,LPS+基因转染组共培养细胞上清中 AST、LDH 和 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平均降低( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 I $\kappa$ B $\alpha$  基因转染对小鼠肝细胞、库普弗细胞共培养体系炎症因子表达的影响

Tab 1 Effect of I $\kappa$ B $\alpha$  gene transfer on expression of inflammatory factors in cocultured liver cells and kupffer system ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

| Group             | TNF- $\alpha$<br>$\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$ | IL-6<br>$\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$ | ALT<br>$z_B / (\text{U} \cdot \text{ml}^{-1})$ | AST<br>$z_B / (\text{U} \cdot \text{ml}^{-1})$ | LDH<br>$z_B / (\text{U} \cdot \text{ml}^{-1})$ |
|-------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Control           | 1.1 ± 0.7                                                    | 4.6 ± 2.3                                           | 1.9 ± 1.0                                      | 3.8 ± 1.2                                      | 25 ± 9                                         |
| LPS               | 4.1 ± 1.2**                                                  | 12.8 ± 3.0**                                        | 4.1 ± 1.3**                                    | 18.6 ± 4.2**                                   | 78 ± 14**                                      |
| LPS+gene transfer | 2.1 ± 0.9* $\Delta$                                          | 7.5 ± 3.2* $\Delta$                                 | 3.7 ± 1.5*                                     | 12.5 ± 3.6* $\Delta$                           | 47 ± 11* $\Delta$                              |

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs LPS group

2.2 I $\kappa$ B $\alpha$  基因转染对 LPS 刺激小鼠肝组织和血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平的影响 与正常组相比,LPS 组肝组织和血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平均升高( $P <$

0.05);与 LPS 组相比,LPS+基因转染组肝组织、血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平降低( $P < 0.05$ )。具体数据详见表 2。

表 2 I $\kappa$ B $\alpha$  基因转染对 LPS 小鼠肝组织和血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平的影响

Tab 2 Effect of I $\kappa$ B $\alpha$  gene transfer on LPS-induced TNF and IL-6 levels in liver and serum of mice ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

| Group             | Liver $\omega_B / (\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$ |                    | Plasma $\rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$ |                    |
|-------------------|----------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------|--------------------|
|                   | TNF- $\alpha$                                      | IL-6               | TNF- $\alpha$                                      | IL-6               |
| Control           | 0.5 ± 0.3                                          | 3.2 ± 1.1          | 225 ± 36                                           | 448 ± 100          |
| LPS               | 1.3 ± 0.5*                                         | 7.8 ± 2.3*         | 519 ± 87*                                          | 770 ± 113*         |
| LPS+gene transfer | 0.7 ± 0.2 $\Delta$                                 | 4.1 ± 1.7 $\Delta$ | 248 ± 52 $\Delta$                                  | 517 ± 125 $\Delta$ |

\*  $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs LPS group

2.3 I $\kappa$ B $\alpha$  基因转染对 LPS 刺激小鼠肝组织 NF- $\kappa$ B 活性的影响 LPS 处理组 2 次 150  $\mu\text{g}$  LPS 刺激后(2、24、50、72 h)均诱发 NF- $\kappa$ B 活性明显增强( $P < 0.05$ )。与 LPS 组相比,LPS+基因转染组 2、24、50、72 h 各时点 NF- $\kappa$ B 活性明显降低( $P < 0.05$ )。内源性 I $\kappa$ B $\alpha$  表达与 NF- $\kappa$ B 激活在各时点呈反向关系;外源性 I $\kappa$ B $\alpha$  表达在内源性 I $\kappa$ B $\alpha$  表达最弱时点

(2、24、50、72 h)表达最强烈( $P < 0.05$ ,图 1)。

2.4 I $\kappa$ B $\alpha$  基因转染对 LPS 刺激小鼠存活率的影响 与 LPS 组相比,LPS+基因转染组在 LPS 刺激 0、12、24、36、48 h 时两者无统计学差异;而在 72、96 h 各时点,LPS+基因转染组小鼠的存活率高于 LPS 组( $P < 0.05$ )。

具体数据详见表 3。

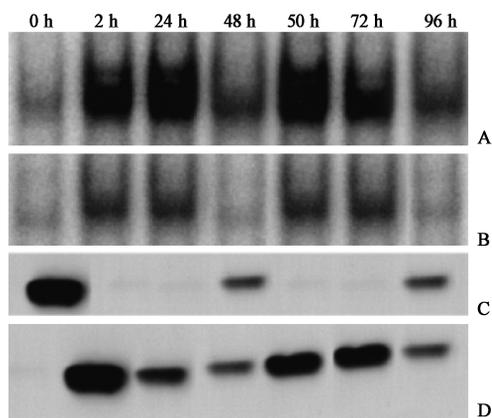


图 1 I $\kappa$ B $\alpha$  基因转染对 LPS 小鼠肝组织 NF- $\kappa$ B 和 I $\kappa$ B $\alpha$  表达的影响

Fig 1 Effect of I $\kappa$ B $\alpha$  gene transfer on LPS-induced NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  levels in liver of mice

A, B are EMSA results of NF- $\kappa$ B; C, D are Western blotting results of I $\kappa$ B $\alpha$ . A, C; LPS group; B, D; LPS+gene transfer group

表 3 I $\kappa$ B $\alpha$  基因转染对 LPS 刺激小鼠存活率的影响  
Tab 3 Effect of I $\kappa$ B $\alpha$  gene transfer on LPS-induced mortality in mice

| Group             | Time after injection <i>t</i> /h |    |    |    |     |    |
|-------------------|----------------------------------|----|----|----|-----|----|
|                   | 0                                | 12 | 24 | 48 | 72  | 96 |
| LPS               | 20                               | 20 | 8  | 6  | 4   | 2  |
| LPS+gene transfer | 20                               | 18 | 14 | 12 | 10* | 8* |

\*  $P < 0.05$  vs LPS group

### 3 讨论

脓毒症时,全身炎症反应所释放的大量致炎细胞因子是造成机体组织脏器损害的主因,对其治疗要求既能及时有效地阻断炎症过激损害,又不致于矫枉过正导致免疫抑制。因此,确保抗炎治疗的有效性、适度性是全身炎症反应治疗的关键<sup>[5-7]</sup>。NF- $\kappa$ B 是控制炎症过激反应的重要环节,以 NF- $\kappa$ B 为靶向的治疗对整个炎症级联瀑布可能具有重要抑制作用<sup>[8-10,20]</sup>。静息状态下,NF- $\kappa$ B 与其抑制蛋白 I $\kappa$ B 结合,驻留在胞质内;细胞受到外界刺激后,I $\kappa$ B 被迅速磷酸化,经过短暂的泛素化修饰后被蛋白酶降解;游离的 NF- $\kappa$ B 进入细胞核内,结合于特定基因的  $\kappa$ B 序列,启动基因转录。I $\kappa$ B 也可进入核内发挥作用,中止 NF- $\kappa$ B 活性并将其运回胞质<sup>[17]</sup>。I $\kappa$ B $\alpha$  是最主要的 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白,所以本研究选择了 I $\kappa$ B $\alpha$  作为转染靶基因,观察 I $\kappa$ B $\alpha$  的转染表达能否控制 NF- $\kappa$ B 活性,从而确保控制炎症反应的有效性。

转基因表达必须选择合适的启动子元件,保证

基因表达的可诱导性、可控性和组织特异性。一些急性相蛋白(如 SAA)表达可被体内炎症信号放大,如小鼠血清淀粉样蛋白,在 LPS 攻击 24 h 后小鼠血清 SAA 蛋白水平倍增 1 000 倍;在体外 20% 的单核细胞上清诱导肝细胞 HepG2, 6 h 达 24 倍,24 h 达 150 倍,48 h 达 375 倍增加 SAA mRNA 表达。因此若将急性相蛋白启动子(如 SAA 启动子/增强子)用于基因治疗中调节重组蛋白的表达,有可能实施对治疗基因适时适度地表达调控。在 SAA 家族中,SAA3 是唯一既能在肝细胞合成,也可以在肝外细胞如巨噬细胞表达的 SAA 蛋白,SAA3 能在网状内皮细胞系统表达的特性对于炎症疾病基因治疗有独特的意义。我们的前期研究结果也证实 SAA3 启动子的可诱导性和可控性<sup>[14]</sup>。因此,本研究选择 SAA3 作为启动子,确保了转基因表达的可诱导性、可控性。

非病毒基因转移要比重组病毒载体的方法更安全。临床接受的基因转移方法是脂质体注射法,包括肌注、静脉注射、腹腔注射。活体内脂质体/DNA 静脉注射、腹腔注射具有巨大的优越性,尤其是靶细胞如库普弗细胞、肝细胞等暴露在血流中。本研究中脂质体转染的剂量、内毒素模型参考了国内外文献<sup>[16-17]</sup>以及前期实验结果<sup>[14]</sup>,选择不同内毒素剂量以方便显示适度的病理学损害和生存率差别。

本研究所采用的腹腔注射小鼠内毒素血症模型,适用于脓毒症肝损伤的研究。以往研究发现,小鼠腹腔注射 LPS 模型中,肝脏的炎症激活最显著,这可能因为肝脏含有的库普弗细胞占体内居留型巨噬细胞总数的 80% 以上<sup>[14]</sup>。肝脏是机体炎症反应的中心器官,急性相反应的生发中心,在脓毒性系统性炎症反应中是维持、推动及调节全身性炎症反应的重要部位,也是较易受损的器官。库普弗细胞、肝细胞的独特解剖位置,决定了它们站在了面临应激条件下肠毒移位的第一线。因此,本研究针对肝脏为中心的抗炎治疗,在有效控制肝脏炎症损害同时成功加强对全身炎症反应的限制,这是该转基因治疗策略对脓毒综合征有效的可能机制之一。

本研究结果表明:(1)I $\kappa$ B $\alpha$  基因转染可以抑制共培养细胞体系的炎症过激反应,从而保护肝细胞;(2)I $\kappa$ B $\alpha$  基因转染可以有效抑制鼠肝和全身炎症过激反应,确保治疗的有效性;(3)I $\kappa$ B $\alpha$  基因转染能有效表达外源性 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白,对内毒素攻击小鼠鼠肝 NF- $\kappa$ B 活性有直接抑制作用,而且 I $\kappa$ B $\alpha$  表达程度与致炎程度成正比,确保治疗的适度性;(4)I $\kappa$ B $\alpha$  基因转染能明显改善内毒素攻击小鼠存活率。因此,本

研究所利用的携带 SAA3 启动子的 I $\kappa$ B $\alpha$  表达载体能够有效控制肝脏为中心的脓毒综合征; I $\kappa$ B $\alpha$  基因能够在肝脏持续表达,并能有效控制肝脏及全身炎症过激反应,减少了组织脏器损伤,降低了内毒素攻击病死率。该基因治疗策略为脓毒症治疗提供了宝贵的新思路、新途径。

(志谢 本研究得到第二军医大学东方肝胆外科研究所苏长青教授的支持和帮助,在此表示衷心感谢!)

## [参考文献]

- [1] Wang Y D, Chen W D, Wang M, Yu D, Forman B M, Huang W. Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response [J]. *Hepatology*, 2008, 48: 1632-1643.
- [2] Kanesaka S, Sasaki J, Kuzume M, Narihara K, Takahashi Y. Effect of direct hemoperfusion using polymyxin B immobilized fiber on inflammatory mediators in patients with severe sepsis and septic shock [J]. *Int J Artif Organs*, 2008, 31: 891-897.
- [3] Castelli G P, Pognani C, Meisner M, Stuani A, Bellomi D, Sgarbi L. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction [J]. *Crit Care*, 2004, 8: R234-R242.
- [4] Aoki T, Kataoka H, Shimamura M, Nakagami H, Wakayama K, Moriwaki T, et al. NF-kappaB is a key mediator of cerebral aneurysm formation [J]. *Circulation*, 2007, 116: 2830-2840.
- [5] Takahashi H, Tsuda Y, Takeuchi D, Kobayashi M, Herndon D N, Suzuki F. Influence of systemic inflammatory response syndrome on host resistance against bacterial infections [J]. *Crit Care Med*, 2004, 32: 1879-1885.
- [6] Turunen P, Puhakka H L, Heikura T, Romppanen E, Inkala M, Leppänen O, et al. Extracellular superoxide dismutase with vaccinia virus anti-inflammatory protein 35K or tissue inhibitor of metalloproteinase-1: Combination gene therapy in the treatment of vein graft stenosis in rabbits [J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17: 405-414.
- [7] Griga T, Wilkens C, Schmiegel W, Folwaczny C, Hagedorn M, Duerig N, et al. Association between the promoter polymorphism T/C at position-159 of the CD14 gene and anti-inflammatory therapy in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Eur J Med Res*, 2005, 10: 183-186.
- [8] Ivanenkov Y A, Balakin K V, Tkachenko S E. New approaches to the treatment of inflammatory disease: focus on small-molecule inhibitors of signal transduction pathways [J]. *Drugs R D*, 2008, 9: 397-434.
- [9] Elsharkawy A M, Mann D A. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis [J]. *Hepatology*, 2007, 46: 590-597.
- [10] Malek R, Borowicz K K, Jargiello M, Czuczwar S J. Role of nuclear factor kappaB in the central nervous system [J]. *Pharmacol Rep*, 2007, 59: 25-33.
- [11] De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB [J]. *Oncogene*, 2006, 25: 6868-6886.
- [12] Gossye V, Haegeman G, De Bosscher K. Therapeutic implications of the nuclear factor-kappa B/nuclear receptor cross-talk [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 4122-4143.
- [13] Yamamoto M, Takeda K. Role of nuclear IkappaB proteins in the regulation of host immune responses [J]. *J Infect Chemother*, 2008, 14: 265-269.
- [14] 李泉, 俞卫锋, 黄晶, 吕欣, 张中军, 王红阳, 等. 炎症诱导性表达载体的表达特性 [J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23: 648-651.
- [15] 俞卫锋, 李泉, 曹云飞, 杨立群, 陆智杰, 孙玉明, 等. 异氟烷保护缺氧肝细胞的能量平衡 [J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23: 614-616.
- [16] Yu W F, Li Q, Cao Y F, Yang L Q, Lu Z J, Sun Y M, et al. Isoflurane preserving energy balance in isolated hepatocytes during *in vitro* anoxia [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2002, 23: 614-616.
- [17] 太光平, 汪仕良, 王斐, 陈渝. 白细胞介素-10 基因转染对活化巨噬细胞炎症介质产生的抑制作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17: 57-58.
- [18] Chiao H, Foster S, Thomas R, Lipton J, Star R A. Alpha-melanocyte-stimulating hormone reduces endotoxin-induced liver inflammation [J]. *J Clin Invest*, 1996, 97: 2038-2044.
- [19] Schreiber E, Matthias P, Müller M M, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 6419.
- [20] Zhong C, Zhou Y, Liu H. Nuclear factor kappaB and anesthetic preconditioning during myocardial ischemia-reperfusion [J]. *Anesthesiology*, 2004, 100: 540-546.
- [21] Bitko V, Garmon N E, Cao T, Estrada B, Oakes J E, Lausch R N, et al. Activation of cytokines and NF-kappa B in corneal epithelial cells infected by respiratory syncytial virus: potential relevance in ocular inflammation and respiratory infection [J]. *BMC Microbiol*, 2004, 4: 28.

[本文编辑] 贾泽军