文章编号:1000-5404(2011)14-1441-05

论著

沉默供体肝脏内核糖体蛋白S3基因减轻大鼠移植肝脏缺血再灌注损伤

陈 新,成名翔,龚建平,陈 勇,涂 兵 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 采用RNA干扰技术沉默供体肝脏内核糖体蛋白S3(ribosomal protein S3, RPS3)基因的表达,观察其对核转录因子kappa B(nuclear factor-kappa B,NF-κB)的影响以及对肝移植后早期缺血再灌注损伤的保护作用。**方法** 构建以腺病毒(Ad)为载体的RPS3基因特异性短发夹RNA(shRNA)表达颗粒,按随机数字表法将实验大鼠分为3组:Ad-RPS3-shRNA组、空白腺病毒对照组(空白对照组)、生理盐水对照组(NS对照组)。于肝移植前48 h分别用Ad-RPS3-shRNA颗粒、空白腺病毒载体、生理盐水处理3组供体大鼠。收集血液及肝脏组织检测血清转氨酶、血浆炎症因子水平、肝脏组织病理改变、炎症因子mRNA、肝组织提取物中NF-κB活性和表达水平指标的变化。**结果** 肝移植后恢复灌注3 h Ad-RPS3-shRNA组大鼠血清ALT水平(725.9±67.3)U/L、AST水平(863.7±72.7)U/L,血浆TNF-α水平(223.7±16.8)ng/L、IL-1β水平(242.5±18.7)ng/L、ICAM-1水平(258.4±24.9)ng/L,Suzuki评分(3.72±0.31),肝组织mRNA水平:TNF-α(0.252±0.026)、IL-1β(0.217±0.028)、ICAM-1(0.226±0.017)、RPS3(0.094±0.007),肝组织NF-κB蛋白水平(0.216±0.022)及其活性(92.4±9.5)均显著低于空白对照组和NS对照组($P<0.01$),而空白对照组、NS对照组比较无统计学差异($P>0.05$);恢复灌注12 h Ad-RPS3-shRNA组各检测指标与3 h变化趋势相同。**结论** 沉默供体肝脏内RPS3基因可显著降低肝脏细胞NF-κB活性和表达量,从而降低炎症因子表达,有效减轻肝移植后早期缺血再灌注损伤。

[关键词] RNAi;NF-κB;核糖体蛋白S3;肝移植;缺血再灌注损伤
[中图法分类号] R394-33;R657.3;R364.12 [文献标志码] A

Silencing ribosome protein S3 gene in donor livers reduces ischemia/reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in rats

Chen Xin, Cheng Mingxiang, Gong Jianping, Chen Yong, Tu Bing (Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To silence ribosome protein S3 (RPS3) gene in donor livers using RNAi technique, and to observe the influence on nuclear factor-kappa B (NF-κB) and the protective effect on early ischemia/reperfusion injury (I/RI) after orthotopic liver transplantation in rats. **Methods** Recombinant adenovirus-RPS3-shRNA granules were constructed. Seventy-two SD rats were randomly divided into three groups: an Ad-RPS3-shRNA group, an Ad-blank-control group, and an NS-control group. Ad-RPS3-shRNA granules, blank adenovirus granules, and normal saline were injected into donor rats in the three groups at 48 h before the donor livers were harvested. The liver tissues and blood samples were harvested in 3 and 12 h after the liver transplantation. Liver function, plasma inflammatory factor level, and liver histopathological change were assessed. Meanwhile, the mRNA levels of inflammatory factors in liver tissues were detected by quantitative RT-PCR. Electrophoretic mobility shift assay and Western blotting were used to assess the activity and level of NF-κB. **Results** At 3 h after reperfusion following liver transplantation, the serum ALT level and serum AST level were 725.9±67.3 U/L and 863.7±72.7 U/L in the Ad-RPS3-shRNA group. The TNF-α, IL-1β and ICAM-1 levels in plasma were 223.7±16.8 ng/L, 242.5±18.7 ng/L and 258.4±24.9 ng/L, while the mRNA levels of TNF-α, IL-1β and ICAM-1 in liver tissues were 0.252±0.026 ng/L, 0.217±0.028 ng/L, and 0.226±0.017 ng/L. Suzuki score was 3.72±0.31, and liver RPS3 mRNA level was 0.094±0.007 ng/L. The liver NF-κB level and activity were 0.216±0.022 and 92.4±9.5, respectively. The above indexes in the

[基金项目] 国家自然科学基金(30772098,30801126);重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5426)
[通信作者] 涂 兵,电话:(023)63693526,E-mail: bing_tu@hotmail.com

Ad-RPS3-shRNA group were significantly lower than those in the Ad-blank-control and the NS-control group ($P<0.01$). There was no statistical difference between the Ad-blank-control group and the NS-control group ($P>0.05$). At 12 h after reperfusion following liver transplantation, the above indexes showed the same change tendency as those at 3 h after reperfusion. **Conclusion** Silencing RPS3 gene in donor livers significantly down-regulates the level and activity of NF-κB, inhibits the over-expression of inflammatory factors, and reduces early I/RI after orthotopic liver transplantation.

[**Key words**] RNAi; NF-κB; ribosomal protein S3; liver transplantation; ischemia/reperfusion injury

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772098, 30801126) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC 2010BB5426). Corresponding author: Tu Bing, Tel: 86-23-63693526, E-mail: bing_tu@hotmail.com

供体肝脏在移植后早期就发生的缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/RI)不仅会影响肝脏生理功能的发挥,甚至可使移植物失功,导致治疗失败。I/RI的分子生物学表现主要为炎症因子过表达、炎症细胞聚集导致细胞凋亡[1-2]。研究发现引起I/RI的原因主要为缺血再灌注阶段核转录因子kappa B(nuclear factor-kappa B, NF-κB)激活后调控炎症因子过度表达,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α, TNF-α)、白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)等[3],这些炎症因子会引起炎症细胞聚集并激活细胞因子间级联反应,从而进一步释放大量损伤性细胞因子直接或间接引起一系列损伤[4-5]。新近发现核糖体蛋白S3(ribosomal protein S3, RPS3)除具有核糖体相关功能外,还是NF-κB的必需功能亚单位。体外实验发现RPS3可以使NF-κB(P65/P65)与DNA结合效率提高70多倍,使NF-κB(P65/P50)与DNA结合效率提高30多倍。缺乏RPS3蛋白使NF-κB信号通路严重受阻,NF-κB依赖的基因不能表达[6-7]。因此,本实验以腺病毒为载体构建RPS3特异性短发夹RNA(shRNA)表达颗粒,沉默供体肝脏内RPS3基因,观察其对NF-κB的影响以及对肝移植后早期I/RI的保护作用,并对其机制作初步探讨。

1 材料与方法

1.1 重组腺病毒颗粒构建

RPS3特异性shRNA腺病毒质粒(Ad-RPS3-shRNA)由Invitrogen公司提供。将此质粒转染人胎肾293细胞(human embryonic kidney-293, HEK-293)合成重组腺病毒转染颗粒,并通过细胞培养逐步扩增。转染24 h后将细胞悬液冻融循环3次,采用CsCl密度梯度离心法提纯浓缩病毒颗粒,空斑形成实验确定病毒滴度,并以空斑形成数(PFU)作为病毒滴度单位[8]。

1.2 实验动物与大鼠肝移植模型构建

成年雄性SD大鼠72只,8~10周龄,体质量250~300 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。参照孙科等[9]介绍的改进Kamada袖套法建立大鼠原位肝移植动物模型。①供体手术:游离门静脉,肝动脉,肝上、肝下下腔静脉及胆管并完成胆管支架插管,用4 ℃平衡盐溶液10 ml灌洗供肝的同时以0 ℃平衡盐溶液灌注大鼠腹腔并保留。连同上述血管一起切取供肝,供肝热缺血时间低于1 min。在4 ℃平衡盐溶液中完成门静脉、肝下下腔静脉袖套准备。②受体手术:切除原肝,原位植入供肝,先完成肝上下腔静脉端端连续缝合及门静脉端端袖套吻合,结束无肝期,无肝期时间为(20±3)min,以此时作为再灌注开始。完成肝下下腔静脉端端袖套吻合,胆管内支架插管端端吻合完成胆道重建。

1.3 实验设计

按随机数字表法将实验大鼠分为3组:Ad-RPS3-shRNA组、空白腺病毒对照组(空白对照组)、生理盐水对照组(NS对照组),每组12对。各组供体大鼠经半开放式乙醚吸入麻醉,并经门静脉分别注入Ad-RPS3-shRNA颗粒1×10^9 PFU、空白腺病毒载体1×10^9 PFU以及等容量的生理盐水。48 h后切取供体肝脏保存于4 ℃ UW液(university of wisconsin)中12 h,后植入受体大鼠[10]。分别于恢复灌注3、12 h处死各组受体大鼠6只,经上腔静脉取血液标本及肝叶相同部位肝脏组织备用。

1.4 肝功、组织病理学及血浆炎症因子检测

全自动生化分析仪(CX7, Beckman, USA)检测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平。肝组织经10%福尔马林固定,石蜡包埋后常规HE染色,光镜下双盲法以Suzuki评分标准对各组织切片评分。从肝细胞空泡样变性、肝血窦阻塞、结构损伤3个方面各给出0~4分,未见明显改变为0分,改变超过60%为4分。酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血浆炎症因子TNF-α、IL-1β、ICAM-1水平。根据ELISA试剂盒说明(Sigma)测定各血样中的炎症因子水平。

1.5 肝组织炎症因子mRNA检测

实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测肝脏组织中TNF-α、IL-1β、ICAM-1的mRNA水平。由超低温保存的肝组织样本中提取总RNA,方法参照RNA抽提试剂盒说明书(Trizol kit)。取1 μg总RNA用于RT-PCR,方法参照逆转录PCR试剂盒。引物序列为:TNF-α上游5′-TATGGCTCAGGGTCCAACTC-3′,下游5′-TGGTCACCAAATCAGCGTTA-3′,扩增产物长度

1 687 bp;IL-1β 上游 5′-GAGCTGAAAGCTCTCCACCTC-3′,下游 5′-CTTTCCTTTGAGGCCCAAGGC-3′,扩增产物长度 2 943 bp;ICAM-1 上游 5′-CTCTGCTCCTGGTCCTGGT-3′,下游 5′-CGTGAATGTGATCTCCTTGG-3′,扩增产物长度 2 602 bp;RPS3 上游 5′-GCCACGTGTTGCTCAGACA-3′,下游 5′-GCTTCTTAGGGGCCAATCTTA-3′,扩增产物长度 855 bp。逆转录反应条件:buffer 10 μl,引物(100 pmol/μl) 1 μl,逆转录混合液 1 μl,模板 RNA 5 μl,DEPC 水 13 μl;25 ℃ 反应 10 min,然后 42 ℃ 60 min,最后 95 ℃ 5 min。PCR 反应条件:buffer 25 μl,引物(25 pmol/μl) 1 μl,*Taq*Man PCR 混合液及 *Taq*Man 探针 5 μl,cDNA 模板1 μl,DEPC 水 20 μl;95 ℃ 反应 10 min,然后以 95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min为 1 个周期,共循环 40 次,最后 72 ℃再次延伸 5 min。同时实时检测荧光信号。

1.6 肝组织 NF-κB 蛋白定量及活性测定

Western blot 法检测肝组织中 NF-κB P65/P50 蛋白表达水平。使用哺乳动物蛋白抽提试剂(50 mmol/L Tris,150 mmol/L NaCl,0.1% SDS,1% sodium deoxycholate,1% Triton X-100,pH 7.2,Pierce)提取肝脏组织总蛋白,并以 Bradford 法确定蛋白浓度。将 10 μl 总蛋白与 1 × loading buffer 加载到 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳中分离蛋白,在 300 mA 电流下于缓冲液中转膜 2 h,后用 3% 脱脂奶粉和 0.1% Tween 20 (USB, Cleveland, OH, USA)于 PBS 液中阻断反应。将膜与抗体共孵育,抗体参照说明稀释(NF-κB 1∶800,β-actin 1∶400,Santa Cruz),加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗。BandScan4.3 对检测结果进行半定量分析,用目标条带与 β-actin 灰度比值表示目标蛋白相对值。凝胶电泳迁移率分析法(EMSA)检测肝组织中 NF-κB P65/P50 活性。按照 EMSA 试剂盒(Viagene)操作大致分以下几步:提取核蛋白,将 2 μl 核蛋白与 0.5 μl NF-κB 探针完成交联反应,在 180 V 条件下于聚丙烯酰胺凝胶中电泳 70 min 后在 0.5 × TBE,390 mA 条件下转膜 40 min,将膜置于紫外灯下 10 cm 处交联 5 min 并阻断,将 15 ml Streptavidin-HRP (1∶750)与膜在室温下共孵育 20 min。BandScan4.3 对检测结果进行分析,以条带灰度值代表 NF-κB 相对活性。

1.7 统计学分析

每份样本检测 3 次取其平均数作为该样本观察值。各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。组间比较采用两独立样本均数的 t 检验。

2 结果

2.1 肝移植后恢复灌注 3、12 h 大鼠血清 ALT、AST 水平

Ad-RPS3-shRNA 组肝移植后恢复灌注 3、12 h 血清 ALT、AST 水平明显低于空白对照组与 NS 对照组($P<0.01$);但空白对照组与 NS 对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。见表 1。

表 1 肝移植后恢复灌注 3、12 h 大鼠血清 ALT、AST 水平

(U/L, $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

指标		Ad-RPS3-shRNA 组	空白对照组	NS 对照组
ALT	3 h	725.9 ± 67.3[a]	1 736.5 ± 173.7	1 472.2 ± 178.4
	12 h	1 842.7 ± 176.6[a]	3 232.6 ± 273.1	3 347.6 ± 293.5
AST	3 h	863.7 ± 72.7[a]	1 874.6 ± 163.7	2 109.3 ± 188.7
	12 h	1 513.4 ± 187.6[a]	3 149.1 ± 282.6	3 662.4 ± 269.6

a:$P<0.01$,分别与空白对照组、NS 对照组比较

2.2 肝脏组织病理改变

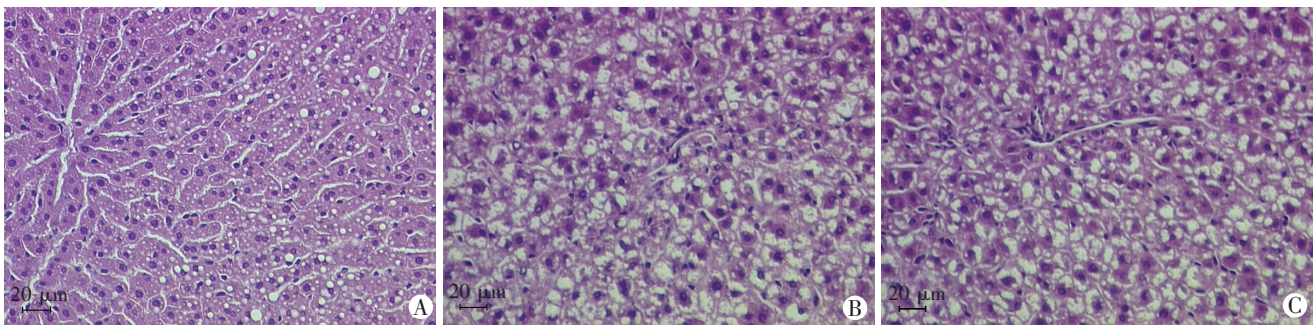
光镜下可见肝移植后恢复灌注 12 h 空白对照组、NS 对照组大鼠肝脏组织表现出较重的肝细胞空泡样变性、结构破坏及肝血窦阻塞;而 Ad-RPS3-shRNA 组各项损伤都较轻;以 Suzuki 评分体系量化肝组织损伤严重程度,Ad-RPS3-shRNA 组 3、12 h 评分均明显低于空白对照组与 NS 对照组($P<0.01$);空白对照组与 NS 对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。见图 1,表 2。

表 2 肝移植后恢复灌注 3、12 h 大鼠肝组织 Suzuki 评分

($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

时间	Ad-RPS3-shRNA 组	空白对照组	NS 对照组
3 h	3.72 ± 0.31[a]	7.93 ± 0.63	8.22 ± 0.61
12 h	3.94 ± 0.34[a]	8.18 ± 0.66	8.25 ± 0.69

a:$P<0.01$,分别与空白对照组、NS 对照组比较



A: Ad-RPS3-shRNA 组;B:空白对照组;C:NS 对照组

图 1 肝移植后恢复灌注 12 h 大鼠肝组织病理改变 (HE)

2.3 血浆炎症因子水平

Ad-RPS3-shRNA组肝移植后恢复灌注3、12 h血浆炎症因子水平明显低于空白对照组与NS对照组($P<0.01$)；空白对照组与NS对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。见表3。

表3 肝移植后恢复灌注3、12 h大鼠血浆TNF-α、IL-1β、ICAM-1水平（ng/L，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

指标		Ad-RPS3-shRNA组	空白对照组	NS对照组
TNF-α	3 h	223.7±16.8[a]	526.4±49.5	517.6±44.9
	12 h	229.8±15.9[a]	512.7±45.0	499.0±43.3
IL-1β	3 h	242.5±18.7[a]	512.8±51.4	489.7±47.7
	12 h	253.7±17.9[a]	524.4±36.2	503.4±43.0
ICAM-1	3 h	258.4±24.9[a]	548.7±48.9	498.6±43.7
	12 h	264.1±22.6[a]	536.3±54.8	514.7±45.1

a：$P<0.01$，分别与空白对照组、NS对照组比较

2.4 肝组织炎症因子及RPS3 mRNA水平

空白对照组、NS对照组肝组织炎症因子mRNA水平显著高于Ad-RPS3-shRNA组($P<0.01$)；而空白对照组、NS对照组各时间点比较无统计学差异($P>0.05$)。同时检测了肝组织RPS3 mRNA水平，结果显示RPS3 mRNA被有效抑制，显著低于空白对照组、NS对照组($P<0.01$)。见表4。

表4 肝移植后恢复灌注3、12 h大鼠肝组织内TNF-α、IL-1β、ICAM-1、RPS3 mRNA水平（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

指标		Ad-RPS3-shRNA组	空白对照组	NS对照组
TNF-α	3 h	0.252±0.026[a]	0.721±0.062	0.716±0.074
	12 h	0.248±0.021[a]	0.716±0.077	0.724±0.068
IL-1β	3 h	0.217±0.028[a]	0.679±0.065	0.696±0.063
	12 h	0.211±0.032[a]	0.663±0.069	0.687±0.057
ICAM-1	3 h	0.226±0.017[a]	0.591±0.071	0.621±0.049
	12 h	0.214±0.019[a]	0.543±0.063	0.617±0.051
RPS3	3 h	0.094±0.007[a]	0.466±0.029	0.438±0.045
	12 h	0.089±0.008[a]	0.449±0.037	0.452±0.035

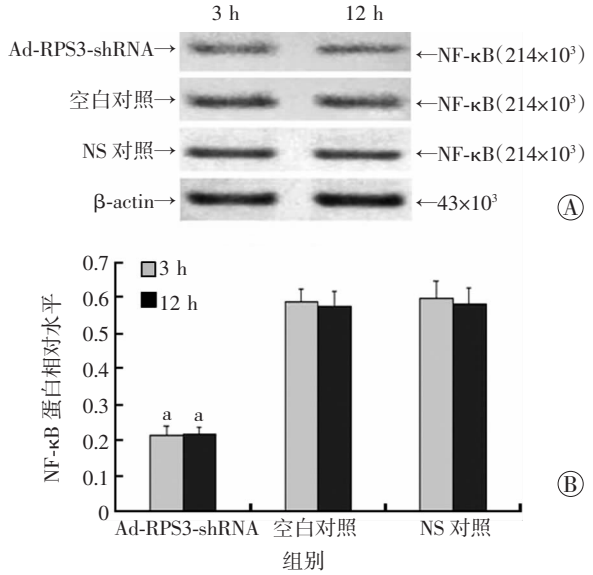
a：$P<0.01$，分别与空白对照组、NS对照组比较

2.5 肝组织NF-κB蛋白水平

Western blot法检测各组大鼠肝组织中NF-κB蛋白水平并以NF-κB与β-actin条带灰度比值作为目标蛋白的相对水平，在Ad-RPS3-shRNA组显著低于空白对照组、NS对照组($P<0.01$)；空白对照组、NS对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。见图2。

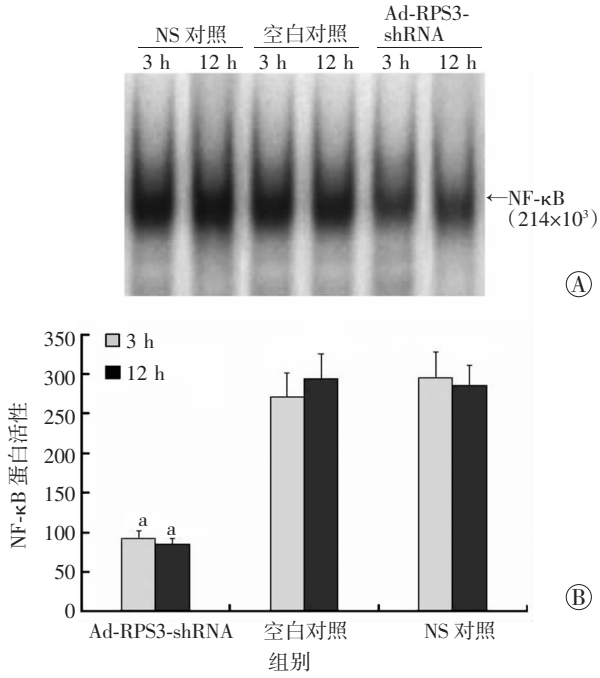
2.6 肝组织NF-κB蛋白活性

EMSA法检测各组大鼠肝组织中NF-κB蛋白活性，以NF-κB条带灰度值作为其活性相对水平，Ad-RPS3-shRNA组显著低于空白对照组、NS对照组($P<0.01$)，空白对照组、NS对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。见图3。



A：Western blot检测结果；B：定量分析　a：$P<0.01$，分别与空白对照组、NS对照组比较

图2 肝移植后恢复灌注3、12 h大鼠肝组织中NF-κB蛋白表达水平



A：EMSA电泳结果；B：定量分析　a：$P<0.01$，分别与空白对照组、NS对照组比较

图3 肝移植后恢复灌注3、12 h时大鼠肝组织中NF-κB蛋白活性

3 讨论

本研究通过构建RPS3特异性shRNA腺病毒表达颗粒，在供体大鼠肝脏内成功抑制RPS3 mRNA后发现，受体大鼠在肝移植后早期血浆ALT、AST水平显著好转；光镜下见较轻的肝细胞空泡样变性，肝血窦阻塞及结构破坏，Suzuki评分也较低。这些改变初步说明

通过沉默 RPS3 表达可以减轻肝移植后早期 I/RI；而先前研究表明：活化的 NF-κB 促进损伤性炎症因子过表达是肝移植后 I/RI 的主要原因[11]。我们推断 RPS3 在 NF-κB 介导的肝移植后 I/RI 信号通路中发挥重要作用。

动物实验发现，肝移植后再灌注 3 h 和 12 h 为 NF-κB 活化高峰，再灌注 24 h 组织损伤表现最明显；在 2 个活化高峰期有大量促炎介质（如 TNF-α、IL-1β、ICAM-1 等）表达增加，这些细胞因子虽然有些不直接或较小的引起肝组织损伤，但可以引起炎症细胞聚集并释放破坏性细胞因子，如 CAM、ROS、GM-CSF、PAF、CXC chemokines、C5a、SLP 等；释放的促炎因子损伤肝细胞、内皮细胞，并进一步吸引炎症细胞，堵塞肝血窦，破坏肝组织[12-13]。因此我们检测了肝移植后再灌注 3 h 和 12 h 血浆 TNF-α、IL-1β、ICAM-1 水平以及肝组织 mRNA 水平；发现 Ad-RPS3-shRNA 组 2 个时间点炎症因子及其 mRNA 均明显低于空白对照组、NS 对照组；说明沉默 RPS3 后炎症因子表达受到抑制。NF-κB 在细胞中主要以 P65/P50 异源二聚体形式存在，并与其 NF-κB 抑制因子（IκB）结合保留在细胞质中[14]；当受到炎症因子 TNF-α、IL-1β、ICAM-1 等的刺激，IκB 被泛素化降解，被释放的 NF-κB 进入细胞核与核酸结合诱导基因转录[15]。最新研究发现 RPS3 是 NF-κB 转录复合体与 DNA 结合的必需结构，缺乏 RPS3 的 NF-κB 不能与 DNA 有效结合并启动基因转录[6,16-17]。我们检测了 NF-κB P65/P50 在肝组织中再灌注 3 h 和 12 h 的表达量及活性，结果表明：沉默 RPS3 后 NF-κB 表达量和活性都受到明显抑制。因此，我们认为：沉默 RPS3 基因可以阻断或减少 NF-κB 与 DNA 结合抑制基因转录，降低损伤性炎症因子表达，减轻移植肝脏 I/RI。

本研究初步探讨了 RPS3 在 NF-κB 介导的肝移植后 I/RI 信号通路中的重要作用，证明了通过沉默 RPS3 基因可以抑制 NF-κB 转录促炎因子，从而对移植肝脏起到保护作用，这可能为肝移植后早期 I/RI 的基因治疗提供新的靶点。

参考文献：

[1] Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury[J]. Transplant Rev (Orlando), 2009, 23(1): 1-10.

[2] Llacuna L, Mari M, Lluis J M, *et al*. Reactive oxygen species mediate liver injury through parenchymal nuclear factor-kappaB inactivation in prolonged ischemia/reperfusion[J]. Am J Pathol, 2009, 174(5): 1776-1785.

[3] Kuboki S, Sakai N, Clarke C, *et al*. The peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, facilitates NF-kappaB binding in hepatocytes and protects against hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. J Hepatol, 2009, 51(2): 296-306.

[4] Saavedra-Lopes M, Ramalho F S, Ramalho L N, *et al*. The protective effect of CAPE on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats[J]. J Surg Res, 2008, 150(2): 271-277.

[5] Kuboki S, Okaya T, Schuster R, *et al*. Hepatocyte NF-kappaB activation is hepatoprotective during ischemia-reperfusion injury and is augmented by ischemic hypothermia[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(1): G201-G207.

[6] Wan F, Anderson D E, Barnitz R A, *et al*. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation[J]. Cell, 2007, 131(5): 927-939.

[7] Ahn E H, Kim D W, Kang H W, *et al*. Transduced PEP-1-ribosomal protein S3 (rpS3) ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice[J]. Toxicology, 2010, 276(3): 192-197.

[8] Luo J, Deng Z L, Luo X, *et al*. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1236-1247.

[9] 孙科，陈勇，刘作金，等. 牛磺酸预处理抑制 IRAK-4 信号通路对大鼠移植肝脏再灌注损伤的保护机制[J]. 第三军医大学学报，2009，31(11)：1017-1020.

[10] Tsoulfas G, Takahashi Y, Liu D, *et al*. Hydrodynamic plasmid DNA gene therapy model in liver transplantation[J]. J Surg Res, 2006, 135(2): 242-249.

[11] Li J D, Peng Y, Peng X Y, *et al*. Suppression of nuclear factor-kappaB activity in Kupffer cells protects rat liver graft from ischemia-reperfusion injury[J]. Transplant Proc, 2010, 42(5): 1582-1586.

[12] Wan F, Lenardo M J. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives[J]. Cell Res, 2010, 20(1): 24-33.

[13] 董晓灵，王曙光，张玉君，等. VEGF 对大鼠 50% 肝脏移植术后血清 HGF、IL-6 浓度的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(11)：1037-1039.

[14] Wang G Y, Chen G H, Li H, *et al*. Rapamycin inhibits activator protein-1 but not nuclear factor-kappaB activity of mature bone marrow-derived dendritic cells[J]. Transplant Proc, 2010, 42(5): 1881-1883.

[15] Robinson S M, Mann D A. Role of nuclear factor kappaB in liver health and disease[J]. Clin Sci (Lond), 2010, 118(12): 691-705.

[16] Yadavilli S, Mayo L D, Higgins M, *et al*. Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain[J]. DNA Repair (Amst), 2009, 8(10): 1215-1224.

[17] Pisarev A V, Kolupaeva V G, Yusupov M M, *et al*. Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes[J]. EMBO J, 2008, 27(11): 1609-1621.

（**收稿**：2010-12-17；**修回**：2011-01-12）

（编辑　汪勤俭）