DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.002

论著

文章编号:1000-5404(2001)12-1386-04

腺病毒介导 IκBα 基因在体外培养 U_{937} 细胞中的表达及效应研究

王明海,太光平,张雅萍,肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 通过构建 IκBα 基因的腺病毒表达载体,并用急性相反应蛋白 SAA_3 启动子来指导目的基因 IκBα 的表达,体外观察在炎性刺激后 IκBα 蛋白的诱导性表达特性及对 NF-κB 活性的调控作用,对炎症介质产生的抑制效应。方法 采用 DNA 重组与同源重组技术,构建含只响应病理信号的启动子-急性相反应蛋白启动子 SAA_3、目的基因 IκBα 的炎症诱导性复制缺陷型重组腺病毒载体(AdIκBα)。应用 AdIκBα,选择在炎症反应中具有代表意义的巨噬细胞,观察 AdIκBα 在体外培养巨噬细胞 U_{937} 中诱导性表达 IκBα(Western blot)、对 NF-κB 活性的调控(EMSA)及体外效应。结果 ① 成功构建炎症诱导性 IκBα 表达质粒(pAdpLpl SAA_3 NLS IκBα),该表达框含 SAA_3 启动子,SV_{40} 大T 抗原核定位信号(NLS),IκBα cDNA 和 ploy A;② pAdpLpL SAA_3 NLS IκBα 质粒与 pJM17 同源重组,脂质体(DOTAP)介导,共转染入 293 细胞。PCR 法筛选阳性克隆,获得重组腺病毒(Ad IκBα);③用 293 细胞扩增 Ad IκBα;采用反复冻融法纯化腺病毒,获得高滴度(5×10^{10} pfu/ml)重组腺病毒;④ 体外实验,用 50 MOI Ad IκBα 预感染体外培养的 U_{937} 细胞,再用 LPS 攻击后,该腺病毒诱导性表达 IκBα 蛋白(Western blot),且表达的 IκBα 能抑制 NF-κB 的活化(EMSA)、下调 LPS 攻击后 TNF-α、IL-6 的产生。结论 该 IκBα 腺病毒表达载体通过调控 NF-κB 活性,可调控炎症介质(TNF-α、IL-6)的产生,用于调理细胞的炎症反应。

关键词:IκBα 基因;SAA_3 启动子;NF-κB;腺病毒;巨噬细胞;TNF-α;IL-6
中图法分类号:R361.3;R644 文献标识码:A

Expression and effects of recombinant adenovirus-meditated IκBα in cultured U_{937} cells

WANG Ming-hai, TAI Guang-ping, ZHANG Ya-ping, XIAO Guang-xia (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective To investigate the expression of IκBα triggered by an acute phase protein promoter SAA_3 (Serum Amyloid A3 gene) after adenoviral transfer in cultured U_{937} cells and its inhibitory effects on the activation of NF-κB in response to inflammatory stimuli, and on the production of other cytokines. Methods A recombinant adenovirus (Ad IκBα) encoding IκBα was constructed by means of homorecombination and then 50 MOI Ad IκBα were used to infect the cultured U_{937} cells, which were challenged with LPS (10 μg/ml) 24 h later. After that, the whole cell proteins and nuclear proteins were extracted respectively and detected with western blot. The NF-κB/DNA binding activity of nuclear proteins was determined with electrophoretic mobility shifty assay (EMSA). The TNF-α and IL-6 productions in the culture supernatant were measured with ELISA. Results ①The inflammatory-induced expressing plasmid (pAdpLpL SAA_3 NLS IκBα) encoding SAA_3 promoter, SV40 large T nucleus location signal (NLS), IκBα cDNA and polyA was constructed successfully. ②DOTAP-mediated gene transfer was used to co-transfect the pAdpLpL SAA_3 NLS IκBα shuttle vector and the recombination plasmid pJM17 into 293 cells. The positive clones were obtained by using PCR to obtain the adenovirus of IκBα gene (Ad IκBα). ③The recombinant virus was amplified in 293 cells and purified with freeze-thaw method for a higher titer (5×10^{10} virus/ml). ④ IκBα protein was induced rapidly in the cultured U_{937} cells after LPS challenge and inhibited the NF-κB ctivation and reduced the productions of TNF-α and IL-6. Conclusion Adenoviral transfer of IκBα can modulate the production of inflammatory cytokines by inhibiting the activation of NF-κB in U_{937} cells after LPS challenge, indicating its therapeutic effects in inflammatory reactions

Key words: IκBα gene; SAA_3 promoter; NF-κB; adenovirus; TNF-α; IL-6

全身性炎症反应,失控性炎症细胞因子、过量炎症介质的产生常见于严重烧伤、感染及多种疾病的危重期,其介导推动全身炎症反应综合征、脓毒症休克及多器官功能衰竭[1]。多种抗细胞因子的治疗措施在动物试验中作用显著,但多中心的临床研究发现疗效不显著或无效。因此迫切需要开发和寻求新的措施调控失控性炎症反应。本研究通过构建 IκBα 基因的腺病毒表达载体,并用急性相反应蛋白 SAA_3 启动子来指导目的基因 IκBα 的表达,体外观察炎性刺激后 IκBα 蛋白的诱导性表达特性及对 NF-κB 活性的调控作用,以及对炎症介质产生的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 表达载体及工具酶

pAdpLpL NLSIκBα 质粒由本研究所太光平博士构建、鉴定并惠赠;pJM17 质粒由 Brighthom 博士惠赠;pCR Ⅱ SAA_3 质粒由 Alan Verary 博士惠赠,工具酶由 Boehriger Mannheim 公司购进。

1.2 炎症诱导性腺病毒表达质粒的构建

采用 DNA 重组技术[2],构建炎症诱导性腺病毒表达载体。依据切图谱设计,pCR Ⅱ SAA_3 质粒 *Xbo*Ⅰ/*Kpn*Ⅰ 酶切产生 2.3、0.4 kb 片段,大量回收 0.4 kb 的 SAA_3 目的 DNA 片段。连接 SAA_3 片段和去线性化载体 pAdpLpLNLSIκBα 片段连接。转化连接子,37 ℃培养过夜,长出的单个单菌落为转化菌菌落。挑单菌落种于 10 ml LB(含 170 μg/ml 氯霉素)中,37 ℃摇菌过夜。收集细菌,小量

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770717)
作者简介:王明海(1964-),男,四川省宜宾市人,博士,主治医师,主要从事严重烧伤感染的防治方面的研究。电话:13883298262
收稿日期:2001-03-09;修回日期:2001-05-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

快速抽提质粒 DNA, 酶切鉴定。依据酶切图谱设计, *EcoR*Ⅰ/*Kpn* Ⅰ/*Hind*Ⅲ酶切产生 0.4、1.8、6.0 kb 的片段为含 SAA_3启动子和 IκBα 基因的表达质粒(pAdpLpL SAA_3NLSIκBα)。

1.3　腺病毒重组

参照文献[3], 同源重组技术, 将 2 μg pAdpLpLSAA_3NLSIκBα 腺病毒表达质粒与 3 μg 腺病毒重组质粒 pJM17(长 40.3 kb)同源重组, 以脂质体 DOTAP 介导, 共转染 60%融合的 293 细胞(为腺病毒 E1 基因转化的人胚肾细胞系, 培养于含 10%胎牛血清的高糖型 DMEM)包装, 10～12 d 出现空斑, 仔细挑取其中 3 个空斑, 用少量灭菌 PBS 溶液悬浮, －70 ℃、25 ℃反复冻融 3 次, 用 293 细胞扩增病毒。36～48 h, 用空斑上清处理的 293 细胞(2/3)出现细胞致病变效应(Cytopathic effect, CPE): 90%～100%的细胞肿胀、变圆, 10%～20%的细胞飘浮。取 370 μl 收集的出现 CPE 的培养上清, 用蛋白酶 K(50 μg/ml、0.5% SDS、20 mmol/L EDTA)于 56 ℃消化 1 h, 用饱和酚/氯仿抽提, 提取腺病毒 DNA 用作 PCR 模板。根据文献设计 IκBα 引物[4] 及 pJM17 引物[3](上海生物化学工程公司合成), 两对引物进行双重扩增。一对引物为腺病毒所特有, 即位于 E_2B 区 3 955～3 980 的 P_1(5-TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3′)和 4 815～4 796 的 P_2(5′-CATCT-GAAC TCAAAGCGTGG-3′), 其扩增长度为 860 bp 的 E_2B 区特异条带。另一对引物为 IκBα 所特有, 引物为 233～254 的 P_3(5′-CATGAAGGA CGAGGAGT ACGAG-3′)及 701～679 的 P_4(5′-GATC-GAGGCTAAGTGCAGACATG-3′), 其扩增长度为 468 bp 的特异条带。PCR 法筛选含目的基因 IκBα 及腺病毒基因的复制缺陷型重组体腺病毒(AdIκBα)。同时扩增出 860 bp 和 468 bp 片断为重组腺病毒(AdIκBα)。

1.4　腺病毒扩增、纯化及滴度测定

用上述经鉴定为阳性的重组体腺病毒, 参照文献[3]方法, 在 293 细胞上进行扩增。收集出现病变效应(CPE)的 293 细胞团, 加少许 PBS 重悬, 反复冻融 3 次, 室温 2 500 r/min 离心 5 min, 取上清加入 10%甘油, 用 0.25 μm 滤膜过滤除菌, 分装后置－70 ℃保存备用。病毒滴度测定: 取病毒液 10× 倍比稀释, 感染 293 细胞, 36～48 h, 观察病毒情况, 取接近 100%细胞病变的病毒稀释度, 代入下列公式计算病毒滴度:

$$\text{病毒滴度(pfu/ml)} = \frac{10^4\times \text{稀释度}\times 10}{0.2\ \text{ml}}$$

设定公式中每个细胞感染 10 个病毒, 36～48 h 内导致细胞完全病变。

1.5　腺病毒感染靶细胞, 内毒素攻击实验

人单核/巨噬细胞系 U_{937}, 传代培养 12～24 h, 实验组给予 50 MOI 的 AdIκBα 病毒稀释液, 24 h 后换液, 用 LPS(10 μg/ml)攻击, 不同时相收集细胞及培养上清。对照组用培养液假处理 24 h 后, 用 LPS(10 mg/ml)攻击, 收集相应时相点的细胞及培养上清。

1.6　目的基因在人单核/巨噬细胞系 U_{937} 中的诱导性表达及其生物学效应

1.6.1　IκBα 蛋白测定　　分别收集各组 LPS 攻击前, 攻击后 15、30 min 及 1、6、12、24 h 细胞, 提取细胞蛋白, 1∶1 500 的兔抗人多克隆 IκBα 抗体(Sigma), Western blot 检测 IκBα 表达[2]。

1.6.2　NF-κB/DNA 结合活性测定　　凝胶电泳迁移率改变分析法(Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)[5,6]。分别收集各组不同时相的 U_{937}细胞, 参照 Andrews 等法[7], 提取细胞核蛋白, Brodford 法定量核蛋白。5 μg 核蛋白与[γ-^{32}P] ATP 标记的 NF-κB 保守序列探针(P_1 5′-AGTTGAGGAACTTTCCCAGGC-3′; P_2 5′-GCCTGGGAAAGTCCCTCAACT-3′)结合, EMSA 检测 NF-κB/DNA 结合活性, 根据滞后带强弱判断 NF-κB 的活化程度。

1.6.3　U_{937}培养上清 TNF-α、IL-6 测定　　ELISA 法。

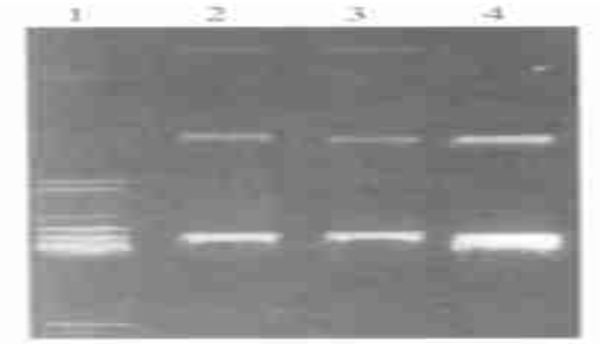
1.7　统计学分析

结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用华西医科大学医学统计程序包 PEMS 进行样本均数 t 检验。

2　结果

2.1　pAdpLpLSAA_3NLSIκBα 表达载体的构建

2.1.1　本研究依据酶切图谱设计, PCR从SAA_3双酶切产生的 SAA_3 片段亚克隆入 pAdLpLNLS IκBα 质粒, 获得 pAdpLpLSSA_3NLSIκBα 表达质粒, 该质粒 *EcoR*Ⅰ/*Kpn*Ⅰ/*Hind*Ⅲ酶切产生 7.3 kb＋1.8 kb＋0.4 kb 的片段, 图谱与理论酶切分子量一致, 见图 1。

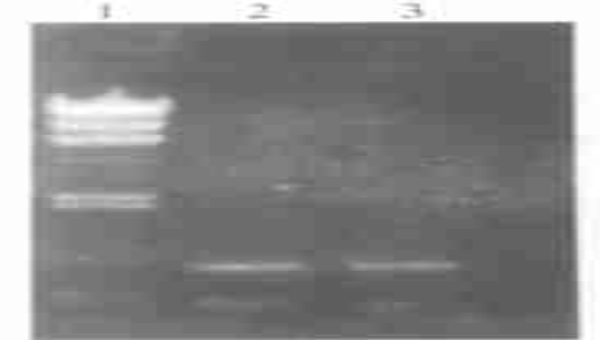


1: λDNA *Hind*Ⅲ maker; 2, 3: *Xba*Ⅰ/*Kpn* Ⅰ/*Hind* Ⅲ; 4: pAdpLpL SAA_3NLSIκBα

图 1　表达载体 **pAdpLpLSAA_3NLSIκBα** 鉴定

Fig 1　Detection of the expression vector of pAdpLpLSAA_3NLSIκBα

2.1.2　腺病毒的同源重组及鉴定　　本研究采用同源重组技术, 将 pAdpLpL SAA_3NLSIκBα 腺病毒表达质粒与腺病毒重组质粒 pJM17 同源重组, 以脂质体 DOTAP 介导, 共转染进入 293 细胞, 包装腺病毒, 双引物共通过 PCR 法筛选、鉴定, 得到 2 个含目的基因 IκBα 的重组体腺病毒(AdIκBα), 见图 2。取克隆 2 大量扩增重组腺病毒(AdIκBα), 用于本实验。



1: λDNA *Hind*Ⅲ Maker; 2: Positive clone; 3: Positive clone

图 2　**AdIκBα** 表达载体鉴定(**PCR**)

Fig 2　Detection of the expression vector of AdIκBα

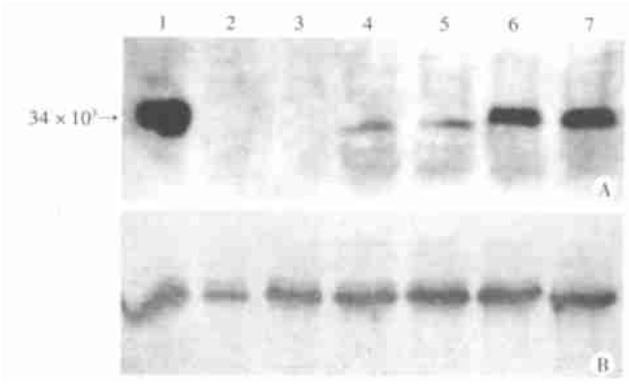
2.1.3　重组腺病毒(AdIκBα)纯化及滴度测定　　重组腺病毒在 293 细胞中繁殖、扩增, 收集病变的 293 细胞, 采取反复冻融的方法, 收集到的重组腺病毒, 经 10 倍稀释, 感染 293 细胞, 36

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

~48 h 后,稀释度为 10^5 以前孔均 100% 出现细胞致病变效应(CPE),计算病毒滴度为:5×10^{10} pfu/ml。

2.2 AdIκBα 在 U_{937} 中的表达及其效应

2.2.1 人单核/巨噬细胞 U_{937} 中 IκBα 蛋白的水平变化 体外培养 U_{937} 细胞,LPS 攻击前后不同时相胞内 IκBα 蛋白水平变化(Western blot),结果见图 3。



1: Without LPS challenge; 2 ~ 7: 15, 30 min; 1, 6, 12, 24 h respectively after LPS challenge

图 3 U_{937} 细胞 LPS 攻击前后,细胞内 IκBα 水平变化(Western blot)

Fig 3 Change of the IκBα protein in the U_{937} cells with(B) or Without(A) Ad IκBα protein before LPS (10 μg/ml) challenge

2.2.2 AdIκBα 预感染对 U_{937} 细胞炎症介质产生的影响 LPS 攻击 U_{937} 细胞,分别收集攻击前及攻击后 6、12、24 h 培养上清,ELISA 测定 TNF-α、IL-6 的产生。结果见表 1、2。

表 1 LPS 攻击巨噬细胞 U_{937} TNF-α 水平测定(ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Content of TNF-α determined with ELISA in AdIκBα pre-infected U_{937} cells(5×10^5 cells/well) after LPS challenge(ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

	n	6 h	12 h	24 h
LPS	6	4.71±2.03	5.59±2.14	6.51±2.5
AdIκBα+LPS	6	2.56±0.94*	2.81±1.06*	2.95±0.92*

*: $P<0.05$ *vs* LPS

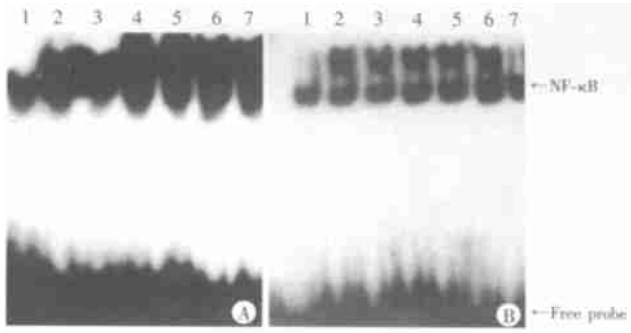
表 2 LPS 攻击巨噬细胞 U_{937} IL-6 水平测定(ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Content of IL-6 determined with ELISA in Ad IκBα pre-infected U_{937} cells(5×10^5 cells/well) after LPS challenge (ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

	n	6 h	12	24 h
LPS	6	6.42±1.33	10.11±2.16	13.29±2.52
AdIκBα+LPS	6	4.45±1.33*	7.19±2.10*	8.08±1.84**

*: $P<0.05$, **$P<0.01$ *vs* LPS

2.2.3 人单核/巨噬细胞系 U_{937} NF-κB 活性变化 体外培养 U_{937},LPS 攻击前及攻击后不同时相,NF-κB/DNA 结合活性变化(EMSA),结果见图 4。



1: Without LPS challenge; 2 ~ 7: 15, 30 min; 1, 6, 12, 24 h respectively after LPS challenge

图 4 U_{937} 细胞 LPS 攻击前后,胞核 NF-κB 活性变化(EMSA)

Fig 4 Activaty of NF-κB in the U_{937} cells with(B) or without(A) Ad IκBα proein before LPS (10 μg/ml) challenge

3 讨论

3.1 重组体腺病毒载体(AdIκBα)的构建及意义

全身性炎症反应综合征(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS)基本特征是炎症介质(TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 等)的失控性表达、释放,诸多促炎因子产生的中心环节是核转录因子 Kappa B (Nuclear factor kappa B, NF-κB)的活化和再活化[1~8]。IκB 蛋白(Inhibition protein of κB)的作用是,胞浆内与 NF-κB 结合,阻止其核转位;胞核内促进 NF-κB 与 DNA 解离。其中 IκBα 研究最多也最重要。NF-κB 活化的关键步骤是 IKK 激酶活化,致 IκBα 磷酸化降解。延长 IκBα 的半衰期可部份抑制 NF-κB 的活化[9],提示提高细胞内 IκBα 蛋白的水平可以抑制 NF-κB 的活化和再活化。为此本研究选择 NF-κB 作为靶目标,构建 IκBα 基因的真核表达腺病毒载体,通过基因转染,以期在胞内适度表达 IκBα 蛋白,抑制 NF-κB 的过度活化,调控炎症介质产生。

急性相反应是生物界较普遍的一种对各种炎性打击(创伤、感染)的应答及保护性反应。大量研究表明,急性相反应的水平,急性相反应产物(SAA, C-RP)的表达与疾病(感染、创伤)的严重程度成正比,随疾病病程的波动而波动,许多急性期蛋白在转录水平及翻译水平等的动态受体内炎症介质如 IL-1、IL-6、TNF-α 的动态调节。而且这些调节既快速又灵敏,一些急性相蛋白(如 SAA)体内炎性信号可以被成百上千倍放大[7]。为适时适度调控目的基因(IκBα)的表达,本研究选择能对病理信号响应的急性相反应蛋白启动子 SAA_3,构建 IκBα 的腺病毒表达质粒 pAdpLpLSAA_3 IκBα,使目的基因的表达随疾病的病理生理信号的改变而改变、炎性反应水平自动控制,从而为可控性表达目的基因 IκBα 提供了可能。本研究采用同源重组技术,将 pAd-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

pLpL SAA_3NLSIκBα 腺病毒表达质粒与腺病毒重组质粒 pJM17 同源重组, 以脂质体 DOTAP 介导, 共转染进入 293 细胞, 得到含目的基因 IκBα 的重组腺病毒 (AdIκBα) 克隆。再用 293 细胞大量扩增重组腺病毒 (AdIκBα), 采用反复冻融法纯化腺病毒, 得到滴度为 5×10^{10} pfu/ml 重组腺病毒, 与文献[3, 10] 报道的滴度 $10^{10}\sim10^{12}$pfu/ml 相近, 为下一步实验提供了保证。

3.2　AdIκBα 在巨噬细胞中的表达及效应

以巨噬细胞为代表的单核/吞噬细胞系统是体内炎症介质级联启动的中心细胞, 炎症反应时, 以TNF-α, IL-1 为主的促炎因子的过度表达、释放, 在失控性炎症反应中占重要地位[1]。同时也是研究炎症反应调控的主要靶细胞, 易被外源基因转染[11]; 其次, 文献证实 SAA_3可在 U_{937}活化后表达, U_{937}细胞胞内包括了 SAA_3 启动子活化所必需的适当的各种正性、负性转录因子及转录表达环境。因此, 研究调控巨噬细胞炎性介质的产生, 对探索全身性炎症反应的防治有十分重要的意义。本结果提示 LPS 攻击体外培养 U_{937}细胞, 胞内 IκBα 蛋白迅速降解、再缓慢重新合成; 而 AdIκBα 预处理, 胞内 IκBα 蛋白于 LPS 攻击初期略有减少, 但很快合成达高峰。证明 Ad IκBα 预感染 U_{937}细胞, 再用 LPS 攻击后, U_{937}细胞诱导性表达了 IκBα 蛋白。

NF-κB 活性变化: LPS 攻击体外培养巨噬细胞, 攻击前及攻击后不同时相胞核蛋白, 与 (γ-^{32}P)ATP 标记的 NF-κB 探针结合, EMSA 测定 NF-κB/DNA 结合活性。结果显示: 对照组, LPS 攻击后 15~30 min, NF-κB 即活化, 1 h 活性显著增强, 6 h 达高峰, 24 h 活性仍高。而实验组 AdIκBα 预感染后 LPS 攻击, NF-κB 轻度活化, 始终维持低活化水平。证明 AdIκBα 预感染 U_{937}细胞, 再用 LPS 攻击后, U_{937}细胞诱导表达的 IκBα 蛋白能抑制 NF-κB 的过度活化, 但不影响 NF-κB 的适度活化。

AdIκBα 预感染对 U_{937}细胞炎症介质产生的影响: U_{937}在 TNF-α、LPS 攻击后, NF-κB 迅速活化, 并上调相关基因(如 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8、等)的表达, 在全身性、失控性炎症反应中发挥重要作用。本实验结果显示: 对照组, LPS 攻击后, TNF-α 及 IL-6 的产生迅速增高。而实验组, LPS 攻击后, U_{937}细胞培养上清 TNF-α、IL-6 的产生缓慢上升, 显著低于对照组($P<0.05$)。证明实验组预感染 AdIκBα 的 U_{937}细胞, LPS 攻击后诱导表达的 IκBα 蛋白, 通过抑制 NF-κB 的过度活化, 下调 TNF-α、IL-6 的产生。本研究结果提示, 该 IκBα 腺病毒表达载体(AdIκBα)通过调控 NF-κB 活性, 可调控炎症介质(TNF-α、IL-6)的产生, 用于调理细胞的炎症反应。

参考文献:

[1] Caller M P. Organ interactions in sepsis[J]. Arch Surg, 1990, 126(1): 28-36.

[2] 金科雁, 黎孟枫 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1993.

[3] Zhang W W, Fang X, Barnch C D, *et al*. Generation and identification of recombinant adenovirus by Liposome-mediated transfection and PCR analysis[J]. Biol Techniques, 1993, 15(5): 868-872.

[4] Haskill S, Beg A A, Tompkins S M, *et al*. Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes IκB-Like activity [J]. Cell, 1991, 65(11): 1 281-1 289.

[5] Bondeson J, Browne K A, Brennan F M, *et al*. Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene tranfer of IκBα into human macrophagesI; Lipopoly saccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor-κB independent[J]. J Immunol, 1999, 162(10): 2 939-2 945.

[6] Liu S F, Ye X B, Malik A B. In vivo inhibition of nuclear factor-κB activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock[J]. J Immunol, 1997, 159(16): 3 976-3 983.

[7] Andrews N C, Fallor D V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(9): 2 499-2 501.

[8] Baeuerle P, Henkel T. Function and activation of NF-κB in immune system [J]. Annu Rev Immunol, 1994, 12(1): 141-179.

[9] Chen Z, Hagler J, Palombello V, *et al*. Singal-induced site-specific phosphorylation targets IκBα to the ubiquitin-proteasome pathway[J]. Genes Dev, 1995, 9(8): 1 586-1 597.

[10] Wrighton C J, Hofer-Warbinek R, Moll T, *et al*. Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of IκBα, an inhibitor of the transcription factor NF-κB[J]. J Exp Med, 1996, 183(9): 1 013-1 022.

[11] Volk H D, Reinde P, Krousch D, *et al*. Monocytye deactivation-rationale for a new therapetic strategy in sepsis[J]. Intensive Care Med, 1996, 22 (Suppl 4): S474-S481.

(编辑　冷怀明)

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期, 减少编排错误, 请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后, 将修改后纯文本格式存入软盘, 并请标明软盘中的文件名、作者姓名, 连同修改稿一并送交本刊编辑部(校外稿件请邮寄)。

(本刊编辑部)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net