

PQQ 对巨噬细胞炎症抑制及机制的初步研究

刘海霞,蔡秀丽,金冬,张广芹,温传俊

(南京师范大学生命科学学院,分子细胞生物学研究所,江苏 南京 210023)

[摘要] 探讨吡咯喹啉醌(PQQ)对 LPS 诱导的巨噬细胞炎症因子基因表达的影响及机制. 培养 RAW264.7 细胞、BMDM 细胞和 THP-1 细胞,分为对照组和实验处理组,用 MTT 方法检测 PQQ 对细胞增殖的影响,并分别用 RT-qPCR 和 Western Blot 检测各炎症因子的基因及蛋白表达情况. PQQ 预处理能使 LPS 诱导的炎症因子表达量下降,并使 P-P65 蛋白表达下降,Nrf2 蛋白表达增加. PQQ 预处理降低细胞内炎症反应,这一过程可能通过增加 Nrf2 表达和抑制 NF- κ B 表达而发挥作用.

[关键词] PQQ, LPS, 炎症因子, Nrf2, NF- κ B

[中图分类号] Q28 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2017)03-0133-05

Preliminary Study of PQQ on LPS-Induced Macrophage

Liu Haixia, Cai Xiuli, Jin Dong, Zhang Guangqin, Wen Chuanjun

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Institute of Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: To investigate the effects of pyrroloquinoline quinone (PQQ) on the expression of inflammatory factors in LPS-induced of macrophages. Cultured RAW264.7 cells, BMDM cells and THP-1 cells were divided into the control and PQQ-treated groups, respectively. MTT method was used to detect the cell proliferation. The expression of each inflammatory factor at mRNA and protein levels was detected by RT-qPCR and Western Blot analysis. PQQ pretreatment caused a significant decrease in the expression of inflammatory factors, the expression of P-P65 protein and consequently an increase in the expression of Nrf2 protein. PQQ pretreatment reduces the intracellular inflammatory response, which may attribute to an increase in the expression of Nrf2 and resultant inhibition of the expression of NF- κ B.

Key words: PQQ, LPS, inflammatory factor, Nrf2, NF- κ B

吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quinine, PQQ)是一种带负电荷的、水溶性的复合物,具有氧化还原作用的醌类^[1],并具有清除自由基的作用^[2]. 在生物体内可发挥多种生物学作用,如促进动物的生长发育、细胞增殖、保护神经细胞并促进其生长因子的分泌^[3]. 最近有研究发现, PQQ 抑制类风湿性关节炎和神经胶质细胞的炎症^[4],由此推测, PQQ 对 LPS 诱导的炎症反应也有相同的作用. 炎症反应是一种保护免疫系统的应激反应,过度强烈的炎症反应会导致全身炎症反应综合征^[5]. 巨噬细胞是一类广泛分布于全身组织中的免疫细胞,活化后可产生多种炎症因子,其中脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是最主要的病原相关分子^[6]. 因此如何抑制 LPS 诱导产生的炎症具有重要的临床意义. 本实验以 LPS 诱导的巨噬细胞为研究对象,观察研究了 PQQ 对其炎症反应的抑制作用,并初步探讨了其作用机制.

1 材料与方法

1.1 实验材料

胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)和高糖 DMEM、AMEM 培养基购自 Gibco 生物公司;100 U/mL 青霉素(Penicillin)、100 U/mL 链霉素(Streptomycin)和胰蛋白酶购自维森特公司;抗体均购自 CST 公司;反转录试剂盒和 RT-qPCR 试剂盒均购自 Takara 公司;兔抗人 GAPDH 多克隆抗体购自巴傲得公司;MTS 购自 Promega 公司;小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)、人急性单核细胞白血病单核细胞株(THP-1)、

收稿日期:2016-10-05.

基金项目:国家自然科学基金(2012104GZ30057).

通讯联系人:温传俊,副教授,研究方向:肿瘤分子细胞生物学. E-mail: wenchuanjun@hotmail.com

小鼠骨髓来源巨噬细胞(bone marrow derived macrophages, BMDM)为原代分离细胞。

1.2 实验方法

1.2.1 RAW264.7 细胞培养

将液氮中的 RAW264.7 细胞株取出,在 42 ℃ 水浴锅中快速晃动至融化。在超净工作台中吸取细胞悬液到含有适量 DMEM 完全培养液(含有 10% FBS、DMEM、双抗),交叉交叉法混匀细胞,置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待约 8 h 后,弃培养基, PBS 洗去未贴壁细胞,加入新鲜培养液。当细胞密度达到 80% 左右,胰酶消化传代。

1.2.2 THP-1 细胞培养

将液氮中的 THP-1 细胞株取出,在 42 ℃ 水浴锅中快速晃动至融化。在超净工作台中吸取细胞悬液到离心管中,放入离心机中 1 000 r/min 离心 3 min,在超净工作台中弃去上清,加入 1 mL 含 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素的 RPMI 1640 完全培养基,混匀细胞,将其加入含有 7 mL 培养基的 10 cm 皿中,混匀细胞,置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。此后每天添加 2 mL 培养液。当细胞密度达到 90% 左右,离心弃去培养液,加入新鲜培养基混匀,按 1:3 进行传代培养。

1.2.3 BMDM 细胞的获取和培养

(1)收集 L929 细胞培养上清的方法:AMEM 培养基(含 10% FBS)于 37 ℃、5% 的 CO₂ 孵箱中培养 L929 细胞 4 d,收集细胞上清,最后利用滤器(0.22 μmol/L)过滤后备用。

(2)分离小鼠骨髓:首先将周龄 8 w~10 w 的 C57BL/6 小鼠颈椎脱臼处死,放置在 75% 的乙醇消毒 5 min,放入超净工作台,暴露和分离小鼠股骨及胫骨,并放在含有冰的 PBS 的 10 cm 皿中,将小鼠肌肉组织切除,剪掉关节面暴露骨髓腔,用注射器吸取 AMEM(10% FBS)冲洗骨髓腔,1 000 r/min 离心 5 min 后收集骨髓。

(3)L929 细胞培养上清诱导分化巨噬细胞:将 L929 细胞上清与含 AMDM(10% FBS)1:4 比例充分混匀,然后加入离心管吹打收集的小鼠骨髓使其成为单细胞悬液,最后将细胞悬液铺于细胞培养皿中,交叉交叉混匀,放置 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中培养,培养过程中的第 3 d(不洗)、第 5 d 更换新鲜完全培养基,第 7 d 获得成熟的 BMDM^[8]。

1.2.4 MTT 检测细胞增殖

取对数生长期的细胞接种于 96 孔板中,分 6 组实验。每组设 5 个复孔,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。培养 24 h,弃去培养液, PBS 清洗一遍,每孔加入 100 μL DMEM 完全培养液和 20 μL MTS/PMS (20:3)混合液,继续培养 4 h,在酶标仪上于 490 nm 处测定各孔的光吸收值(OD 值)。

1.2.5 RNA 提取以及 RT-qPCR 分析

利用 Trizol 试剂按照说明书提取 RNA,用 DEPC 水溶解并用 NanoDrop 分光光度计测定合格后,按照 Takara 反转录试剂盒说明书反转录得到 cDNA,并检测 mRNA 的表达水平。

1.2.6 蛋白提取以及 Western blot 分析

吸去培养基,用 1×PBS 洗 2 次,加入含有 1 mmol/L PMSF 和 cocktail 的 RIPA 裂解液置冰上裂解细胞 30 min,每隔 5 min 摇晃一次,充分裂解细胞,收集于 1.5 mL EP 管中,12 000 r/min 离心 10 min,将上清转移至新的 1.5 mL EP 管,加入 5×Sample Buffer 充分混匀,95 ℃煮样 10 min。10%、12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶恒压 80 V 电泳,等 marker 在分离胶微散开,将电压改为 120 V。恒流 330 mA,90 min 转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭膜 120 min,一抗 4 ℃ 孵育过夜,37 ℃ 孵育相应二抗 1 h~2 h,利用 ECL 显色并用化学发光成像系统显示目的条带。

1.2.7 统计学处理

采用 Image J 软件对 Western blot 结果进行灰度分析,采用 Origin 8.0 软件对实验数据进行统计学分析并作图,组间差异用单因素方差分析进行比较,检验 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 实验结果

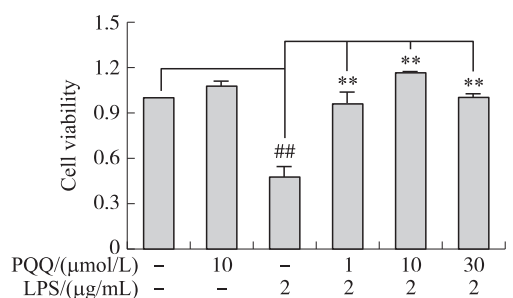
2.1 PQQ 预处理对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的生长作用

各组加药处理 24 h, MTT 检测细胞增殖情况,如图 1 所示。实验中,加入 10 μmol/L PQQ 对 RAW264.7

生长有一定促进作用,这说明 PQQ 对细胞生长无害;只加入 LPS 组,24 h 后细胞活力显著低于对照组 ($P<0.05$);而加入一定浓度 PQQ 预处理 1 h 后再加入 LPS 刺激 24 h,在 PQQ 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞活力均极显著地高于 LPS 单独处理组 ($P<0.01$),提示 PQQ 预处理对 LPS 诱发的细胞生长抑制有一定的缓解作用。

2.2 PQQ 预处理对 LPS 诱导 THP-1 细胞炎症因子基因表达的影响

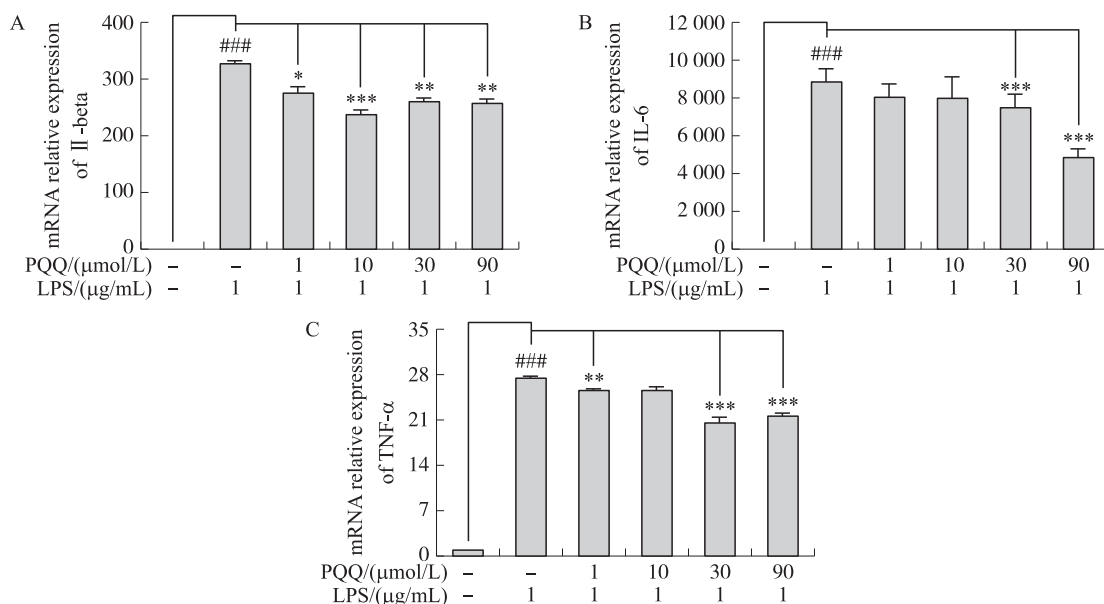
利用 Q-PCR 检测 THP-1 细胞中炎症因子的表达。如图 2 所示,在空白对照组,THP-1 细胞中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达水平较低,为 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 24 h 后,IL-6、TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达水平均显著增加;而在 PQQ 预处理 1 h 后再加入 LPS 刺激 24 h,当 PQQ 为 1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 和 90 $\mu\text{mol/L}$ 时,分别使 LPS 诱导的 IL-1 β mRNA、TNF- α 和 IL-6 表达水平明显下降,提示 PQQ 可显著抑制 LPS 诱导的 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达量的增加。



#;与空白对照组相比 ($P<0.05$), ** :与 LPS 组相比 ($P<0.01$)

#;compared with control NC ($P<0.05$), ** :compared with LPS group ($P<0.01$)

图 1 PQQ 预处理对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的生长作用
Fig. 1 The protective effect of PQQ pretreatment on LPS-induced cell growth



A:THP-1 细胞 IL-1 β mRNA 的表达;B:THP-1 细胞 TNF- α 的表达;C:THP-1 细胞 IL-6 的表达.###:与空白对照组相比 ($P<0.001$), * :与 LPS 组相比 ($P<0.05$), ** :与 LPS 组相比 ($P<0.01$), *** :与 LPS 组相比 ($P<0.001$)

A.The expression of IL-1 β mRNA in THP-1 cells. B.The expression of TNF- α mRNA in THP-1 cells. C.The expression of IL-6 mRNA in THP-1 cells. ###:compared with control NC ($P<0.001$), * :compared with LPS group ($P<0.05$), ** :compared with LPS group, *** :compared with LPS group ($P<0.001$)

图 2 PQQ 预处理对 LPS 诱导 THP-1 细胞炎症因子基因表达的影响

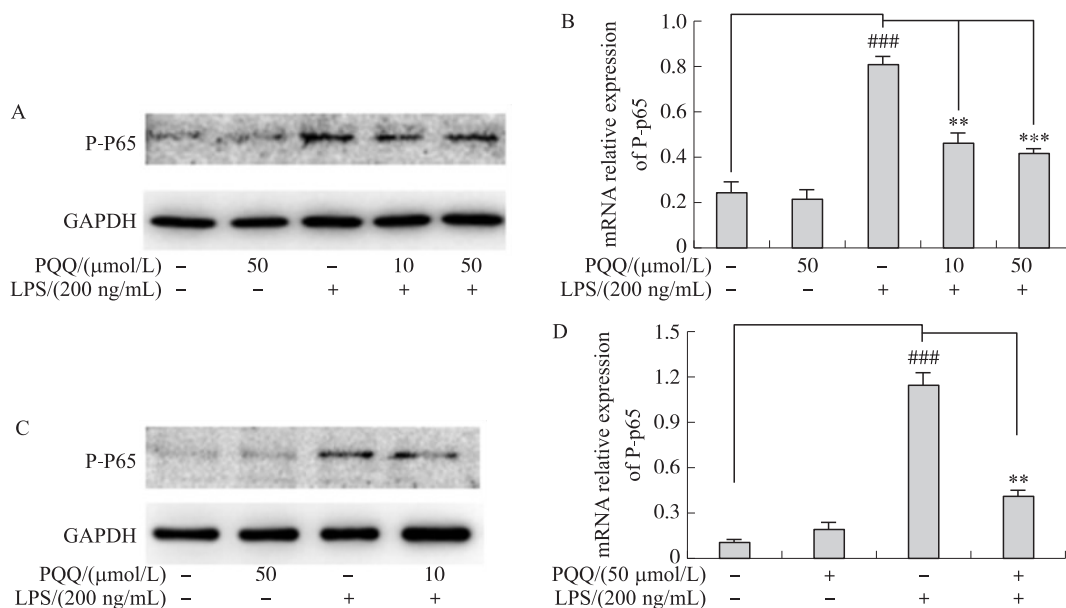
Fig. 2 Effects of PQQ pretreatment on expression of inflammatory factors in LPS-induced THP-1 Cells

2.3 PQQ 对 LPS 诱导 THP-1、BMDM 细胞 NF- κ B p65 蛋白表达的影响

在 THP-1 细胞中利用 Western Blot 检测细胞中 NF- κ B p65 蛋白的表达。如图 4 A、B 所示,在空白对照组和只有 PQQ 组中,THP-1 细胞中 P-P65 表达水平较低,加入 200 ng/mL LPS 刺激 30 min 后,P-P65 表达水平均极显著增加;而在 PQQ 预处理 1 h 后加入 LPS 刺激 30 min,10 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQQ 均可阻断 LPS 诱导的 P-P65 表达增加,其中以 PQQ 为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时作用更明显。

在 BMDM 细胞中利用 Western Blot 检测细胞中 NF- κ B p65 蛋白的表达。如图 3C、D 所示,在空白对照组和 PQQ 组,BMDM 细胞中 P-P65 表达水平较低,加入 200 ng/mL LPS 刺激 30 min 后,P-P65 表达水平均极显著增加;而在 50 $\mu\text{mol/L}$ PQQ 预处理 1 h 后加入 200 ng/mL LPS 刺激 30 min 后,P-P65 表达与 LPS 组

相比极显著下降。



A. PQQ 处理 THP-1 细胞 1 h 后加 LPS 刺激 30 min, Western blot 分析 P-P65 的蛋白表达; B. 灰度分析 P-P65/GAPDH 相对表达量; C. PQQ 处理 BMDM 细胞 1 h 后加 LPS 刺激 30 min, Western blot 分析 P-P65 的蛋白表达; D. 灰度分析 P-P65/GAPDH 的相对表达量。###: 与空白对照组相比 ($P < 0.001$); **: 与 LPS 组相比 ($P < 0.01$); ***: 与 LPS 组相比 ($P < 0.001$)

A. THP-1 cells were stimulated with LPS for 30 min after treated by PQQ for 1 h, and the protein level of p-p65 was analyzed by Western blot. B. The ratio of p-p65/GAPDH was analyzed by gray level. C. BMDM cells were stimulated with LPS for 30 min after treated by PQQ for 1 h, and the protein level of p-p65 was analyzed by Western blot. D. The ratio of p-p65/GAPDH was analyzed by gray level. ###: compared with control NC ($P < 0.001$), **: compared with LPS group, ***: compared with LPS group ($P < 0.001$)

图 3 PQQ 对 LPS 诱导 THP-1、BMDM 细胞 NF-κB p65 蛋白表达的影响

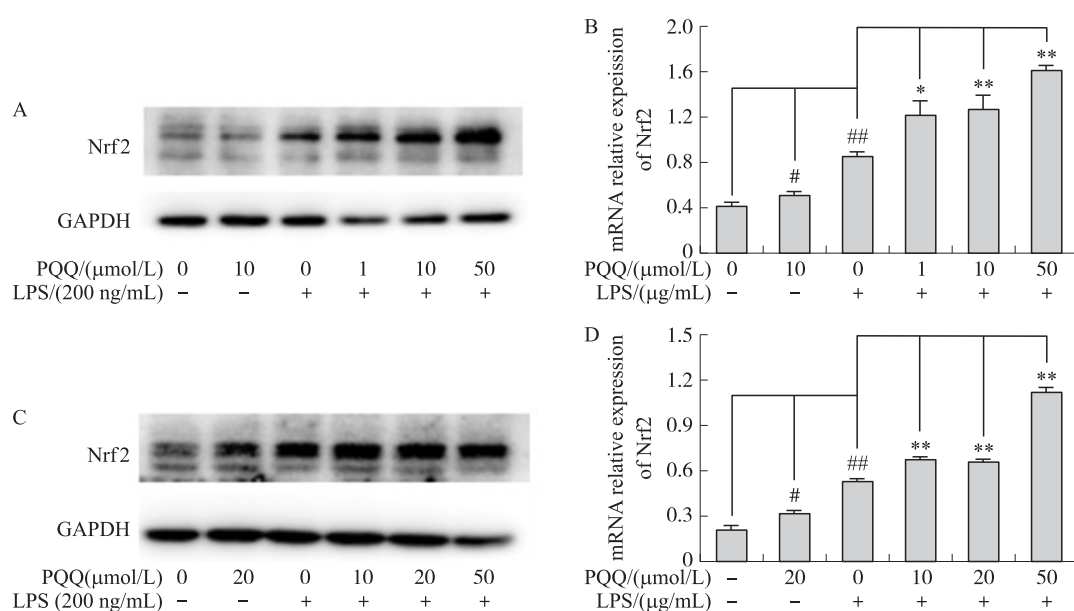
Fig. 3 Effect of PQQ on the expression of NF-κB p65 protein in LPS-induced THP-1 cells

2.4 PQQ 预处理对 LPS 诱导 THP-1、RAW264.7 细胞 Nrf2 蛋白表达的影响

Nrf2, CNC (cap'n collar) 家族成员, 包括碱性亮氨酸拉链区域, Nrf2 连接于相解毒/抗氧化酶和相关应激反应蛋白启动区的抗氧化反应元件部位, 参与这些基因的调控. 有研究表明, Nrf2 可以抵抗炎症刺激, 抑制细胞组织受到炎症损伤. 所以接下来检测了 PQQ 作用与 LPS 诱导的巨噬细胞里 Nrf2 的蛋白表达情况. 如图 4A、B 所示, 只加入 10 μM PQQ 组与空白对照组相比, Nrf2 的表达显著增加, LPS 组其表达量也比空白对照组极显著增加. 而加入 PQQ 预处理 1 h、加入 LPS 刺激 24 h 后, PQQ 浓度依赖地引起 LPS 刺激诱导的 Nrf2 表达量增加. 如图 4C、D 所示, 只加入 20 μmol/L PQQ 组与空白对照组相比, Nrf2 的表达极显著增加, LPS 组其表达量也比空白对照组极显著增加. 而加入 PQQ 预处理 1 h、加入 LPS 刺激 24 h 后, 当 PQQ 浓度为 10 μmol/L、20 μmol/L、50 μmol/L 时, Nrf2 表达量比 LPS 组极显著增加. 由此可见, 加 LPS 能促进细胞 Nrf2 的表达, 而 PQQ 预处理可以进一步促进 LPS 诱导的 Nrf2 的表达.

3 讨论

革兰氏阴性菌常引起感染性休克, 内毒素激活宿主的免疫系统, 产生大量的细胞因子和内源性介质, 作用于机体器官, 导致组织细胞代谢紊乱, 并出现功能性紊乱, 最后甚至引起器官衰竭. 巨噬细胞是体内免疫重要细胞, 在体内免疫反应中起重要的作用, 它通过激活机体的免疫系统, 释放细胞因子^[9], 参与炎症反应. 转录因子 NF-κB 是炎症的关键调节剂, 被激活后可以诱导多种基因的表达, 从而产生多种细胞因子参与炎症反应, 也可抑制 ARE 依赖性基因的转录. ARE 可与 Nrf2 结合, 从而启动目标基因转录. 在生理条件下, NF-κB 是无活性的, 并通过绑定其抑制激酶, 核因子 κB 激酶亚基 β (IKK-β) 蛋白的抑制剂在细胞质中整合. 在病理条件如氧化应激、细菌内毒素和细胞因子, NF-κB 可以被激活^[10]. Nrf2, CNC (cap'n collar) 家族成员, 包括碱性亮氨酸拉链区域^[11], Nrf2 连接于相解毒/抗氧化酶和相关应激反应蛋白启动区的抗氧化反应元件部位, 参与这些基因的调控. 有研究表明, Nrf2 可以抵抗炎症刺激, 抑制细胞组织受到



A. PQQ 处理 THP-1 细胞 1 h 后 LPS 刺激 24 h, Western blot 分析 Nrf2 的蛋白表达; B. 灰度分析其 Nrf2/GAPDH 相对表达量; C. PQQ 处理 RAW264.7 细胞 1 h 后 LPS 刺激 24 h, Western blot 分析 Nrf2 的蛋白表达; D. 灰度分析其 Nrf2/GAPDH 相对表达量。#: 与空白对照组相比 ($P < 0.05$); *: 与 LPS 组相比 ($P < 0.05$); **: 与 LPS 组相比 ($P < 0.01$)

A. THP-1 cells were stimulated with LPS for 24 h after treated by PQQ for 1 h, and the protein level of Nrf2 was analyzed by Western blot. B. The ratio of Nrf2/GAPDH was analyzed by gray level. C. RAW264.7 cells were stimulated with LPS for 24 h after treated by PQQ for 1 h, and the protein level of Nrf2 was analyzed by Western blot. D. The ratio of Nrf2/GAPDH was analyzed by gray level. #: compared with control NC ($P < 0.05$), *: compared with LPS group ($P < 0.05$), **: compared with LPS group ($P < 0.01$)

图 4 PQQ 预处理对 LPS 诱导 THP-1 细胞 Nrf2 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of PQQ on the expression of Nrf2 protein in LPS-induced THP-1 cells

炎症损伤^[12-13]。此外,在小鼠原代培养的星形胶质细胞中,NF- κ B 的活性和促炎细胞因子的表达在 Nrf2 敲除星形胶质细胞中比在野生型星形胶质细胞中显著更多^[14]。因此功能 Nrf2 系统是重要的调节神经炎症响应氧化应激通过激活 NF- κ B 和大脑中的下游促炎细胞因子^[14]。由此看出 Nrf2 在炎症调节中与 NF- κ B 有着密切的联系。所以本实验检测了 PQQ 作用与 LPS 诱导的巨噬细胞中 NF- κ B 和 Nrf2 的蛋白表达情况。实验结果表明,PQQ 可以抑制 THP-1 细胞炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的释放,说明 PQQ 具有抗炎效应与抑制炎症细胞因子产生有关。PQQ 可以降低 LPS 诱导的 THP-1 细胞的 NF- κ B 表达,表明 PQQ 可通过抑制 LPS 诱导的 THP-1 细胞 NF- κ B p65 蛋白的表达,而减少炎症因子的大量释放。PQQ 还可以增加 LPS 诱导的 THP-1 细胞 Nrf2 的表达。说明 PQQ 可以通过增加 Nrf2 表达抵抗炎症刺激,抑制细胞组织受到损伤。但 PQQ 是否通过 Nrf2 作用于 NF- κ B,还需要进一步探索。

[参考文献]

- [1] ZHANG Y H, FEUSTEL P J, KIMELBERG H K, et al. Neuroprotection by pyrroloquinoline quinone (PQQ) in reversible middle cerebral artery occlusion in the adult rat [J]. Brain research, 2006, 1094 (1): 200.
- [2] GALLOP P M, HENSON E, PAZ M A, et al. Acid-promoted tautomeric lactonization and oxidation-reduction of pyrroloquinoline quinone (PQQ) [J]. Biochemical and biophysical research communications, 1989, 163 (2): 755-763.
- [3] MATSUSHITA K, TOYAMA H, YAMADA M, et al. Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2002, 58 (1): 13-22.
- [4] LIU Z, SUN C, TAO R, et al. Pyrroloquinoline quinone decelerates rheumatoid arthritis progression by inhibiting inflammatory responses and joint destruction via modulating NF- κ B and MAPK pathways [J]. Inflammation, 2016, 39 (1): 248.
- [5] MARKWART R, CONDOTTA S A, REQUARDT R P, et al. Immunosuppression after sepsis: systemic inflammation and sepsis induce a loss of naïve T-Cells but no enduring cell-autonomous defects in T-Cell function [J]. Plos One, 2014, 9 (12): e115094.

(下转第 143 页)

- 178-201.
- [7] OHTSUKI S,TERASAKI T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain;importance for cns drug discovery and development[J]. Pharmaceutical research,2007,24(9):1745-1758.
- [8] OBERMEIER B,DANEMAN R,RANSOHOFF R M. Development,maintenance and disruption of the blood-brain barrier[J]. Nat Med,2013,19(12):1584-1596.
- [9] PERSIDSKY Y,RAMIREZ S H,HAORAH J,et al. Blood-brain barrier:structural components and function under physiologic and pathologic conditions[J]. Journal of neuroimmune pharmacology,2006,1(3):223.
- [10] BETZ A L,GOLDSTEIN G W. Primary culture of capillary endothelium from rat brain[J]. *In vitro* cellular and developmental biology-plant,1981,17(4):353-362.
- [11] ABBOTT N J,HUGHES C C,REVEST P A,et al. Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture:towards an in vitro blood-brain barrier[J]. Journal of cell science,1992,103(1):23-37.
- [12] NAKAGAWA S,DELI M A,NAKAO S,et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells[J]. Cell Mol Neurobiol,2007,27(6):687-694.
- [13] 许熊飞,李润平,李泉,等. 大鼠脑微血管内皮细胞的分离与原代培养[J]. 中国细胞生物学学报,2005,27(1):84-88.
- [14] NAVONE S E,MARFIA G,INVERNICI G,et al. Isolation and expansion of human and mouse brain microvascular endothelial cells[J]. Nature protocols,2013,8(9):1680.
- [15] WU Z,HOFMAN F M,ZLOKOVIC B V. A simple method for isolation and characterization of mouse brain microvascular endothelial cells[J]. Journal of neuroscience methods,2003,130(1):53-63.
- [16] 林娜,王安平. 小鼠脑血管内皮细胞的分离和培养[J]. 南昌大学学报(医学版),2003,43(6):52-53.
- [17] 朱玉珍,武文,田野苹,等. 小鼠脑微血管内皮细胞的原代培养与纯化[J]. 解剖学杂志,2007,30(5):530-533.
- [18] 张畅斌,陆茵,李沧海,等. 小鼠脑微血管内皮细胞的培养及其生物学行为初探[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版),2012,28(2):139-142.
- [19] 徐剑文,王玮,康仲涵,等. 小鼠脑微血管内皮细胞的体外培养[J]. 福建医科大学学报(自然版),2000,34(3):215-217.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第 137 页)

- [6] AMIOT F,FITTING C,TRACEY K J,et al. Lipopolysaccharide-induced cytokine cascade and lethality in LT alpha/TNF alpha[J]. Molecular medicine,1997,3(12):864-875.
- [7] LEE A K,SUNG S H,KIM Y C,et al. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase,TNF-alpha and COX-2 expression by saquinone effects on I-kappaBalpha phosphorylation,C/EBP and AP-1 activation[J]. British journal of pharmacology,2003,139(1):11.
- [8] WEISCHENFELDT J,PORSE B. Bone Marrow-Derived Macrophages(BMM):isolation and applications[J]. Cold spring harbor protocols,2008(12):5 080.
- [9] RITTIRSCH D,FLIERL M A,WARD P A. Harmful molecular mechanisms in sepsis[J]. Nature reviews immunology,2008,8(10):776-787.
- [10] CHEN F,CASTRANOVA V,SHI X,et al. New insights into the role of nuclear factor- κ B,a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases[J]. Clinical chemistry,1999,45(1):7-17.
- [11] LEE J M,JOHNSON J A. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism[J]. Journal of biochemistry and molecular biology,2004,37(2):139.
- [12] ARISAWA T,TAHARA T,SHIBATA T,et al. The relationship between Helicobacter pylori infection and promoter polymorphism of the Nrf2 gene in chronic gastritis[J]. International journal of molecular medicine,2007,19(19):143-148.
- [13] MA Q. Multiorgan autoimmune inflammation,enhanced lymphoproliferation,and impaired homeostasis of reactive oxygen species in mice lacking the antioxidant-activated transcription factor Nrf2[J]. American journal of pathology,2006,168(6):1 960.
- [14] ZHANG L,WANG H. Targeting the NF-E2-related factor 2 pathway;a novel strategy for traumatic brain injury[J]. Molecular neurobiology,2017:1-3. doi:10.1007/S12035-017-0456-Z.

[责任编辑:黄 敏]