

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.002

TNF α 和 IL-1 β 靶点抗炎药物筛选细胞模型的构建 *王星华¹ 谭 琰¹ 丁海敏² 张 琦¹ 华 茜^{1Δ}

(1 北京中医药大学基础医学院 北京 100029; 2 北京中医药大学中药学院 北京 100029)

摘要 目的: 构建两个高表达人 TNF α 和 IL-1 β 细胞系, 建立抗炎药物筛选细胞模型。**方法:** 运用 PCR 的方法从载体 pCMVSPORT-TNF α 和 pCMVSPORT-IL1 β 上扩增目的基因, 以亚克隆方法将目的基因分别插入真核表达载体 pcDNA3.1 和 pFLAG-CMV 中, 用单酶切、PCR 扩增和基因测序的方法鉴定重组效果, 然后将重组成功的质粒转入 HEK293 细胞系内, 挑选能够稳定表达并遗传的单克隆细胞株, 用蛋白免疫印迹(Western blot)法分析其表达效果。**结果:** 三种鉴定方法均显示重组质粒构建成功。Western blot 结果显示, 细胞株 T3、T4 均能较高表达炎症因子 TNF- α ; 细胞株 I2、I3、I5 均能较高表达炎症因子 IL-1 β 。**结论:** 成功构建了 TNF α 和 IL-1 β 靶标的药物筛选细胞模型, 为筛选具有抗炎作用的中药提供了一个新平台。

关键词: 肿瘤坏死因子 α ; 白介素 1 β ; 抗炎; 药物筛选; 稳定转染

中图分类号: Q785; R965.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)06-1005-05

Establishment of Drug Screening Model Targeting TNF α and IL-1 β in Cells*WANG Xing-hua¹, TAN Yan¹, DING Hai-min², ZHANG Qi¹, HUA Qian^{1Δ}

(1 School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China;

2 School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China)

ABSTRACT Objective: Establish a novel cell-based model for drug screening targeting human TNF α and IL-1 β . **Methods:** Clone the target genes of TNF- α and IL-1 β from vectors pCMVSPORT-TNF α and pCMVSPORT-IL1 β . The target genes were connected to pFLAG-CMV and pcDNA3.1 respectively. Single endonuclease digestion, PCR reactions and gene sequencing were used to verify whether the recombinant plasmids were constructed successfully and then they were stable transfected into HEK293 cell line. Detect the expression level of TNF α and IL-1 β in monoclonal with the method of Western blot. **Results:** Recombinant plasmid was successfully constructed. Results of Western blot showed that cell line T3 and T4 can be highly express inflammatory cytokines TNF- α ; cell line I2, I3 and I5 can be highly express inflammatory cytokines IL-1 β . **Conclusion:** The HEK293 cell-based drug screening model targeting inflammatory cytokine TNF α or IL-1 β has been established here and is available for the screening of anti-inflammatory drugs.

Key words: TNF α ; IL-1 β ; Anti-inflammatory; Drug screening; Stable transfection

Chinese Library Classification (CLC): Q785; R965.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)06-1005-05

前言

炎症是指机体对感染、外来物质或其它原因(如抗原抗体复合物)所致损伤的一种反应, 炎症的复杂进程既能为机体抵抗外界感染或损伤, 也会为宿主带来不同程度的伤害作用。另一方面, 炎症反应也可能带来一系列的疾病, 最常见的包括类风湿性关节炎, 肠道炎症, 牛皮癣和多发性硬化症等。近年研究发现, 炎症在很多流行病症中也扮演了重要角色, 如阿尔兹海默病, 心血管疾病及癌症等^[1]。有报道表示有些癌症如肝癌也是肝感染并长期发炎的结果^[2]。肺癌的发病原因有很大一部分是从空气中吸入大量的病原体, 污染物, 抗氧化物等导致肺部发生慢性炎症最终导致癌变^[3]。正常成人脑中的小神经胶质细胞一般处于静止状态, 而在患有神经退行性疾病的病人脑内, 则

处于活化状态, 并释放出各种炎症分子, 对神经元细胞造成损伤^[4]。

在脑病中, 脑损伤、中风、癫痫症、阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)和帕金森病均有明显的炎症反应^[5], 其中肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor alpha, TNF α) 和白介素 1 β (Interleukin-1 beta, IL-1 β) 是两个最为突出的表达因子。TNF α 是主要的炎症因子, 它能调节组织的炎症反应, 并与多种脑病的发病机制有着密切联系。在 AD 患者脑内, TNF- α 的过度表达能诱发神经元毒性级联反应, 促进病理过程中神经元的损伤与神经细胞的凋亡。缺血性中风患者急性期血清中 TNF- α 水平也明显高于正常组, 且含量与梗塞灶大小密切相关, 其过度表达可加速神经细胞死亡^[6,7]。IL-1 β 主要以分泌形式存在, 具有神经毒性, 其在 AD 患者脑内过度表达, 大量研究

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81072901); 教育部博士点基金项目(20120013110013);

在读研究生资助项目(2014-JYBZZ-XS-029); 在读研究生资助项目(2014-JYBZZ-XS-013)

作者简介: 王星华(1990-), 女, 硕士, 主要研究方向: 中药小分子特异核酸配基的筛选, 电话: 18811506135, E-mail: wangxinghuacla@163.com

Δ 通讯作者: 华茜, E-mail: hqianz@aliyun.com

(收稿日期: 2014-07-18 接受日期: 2014-08-14)

报道显示,IL-1 β 在急性和慢性两种神经退行性疾病中均产生作用^[8,9]。

在中医理论中“毒”和现代理论中的“炎症”一致。中药清热解毒、祛风除湿、扶正固本等作用与现代医学的抗炎、免疫等作用相似,从中药中寻找抗炎免疫活性成分也已成为当前抗炎免疫研究的热点^[10]。目前很多中药有效成分已经被报道可以用于炎症治疗,如皂苷类,黄酮类,生物碱类,香豆素类,萜类和挥发油类,酚酸类等^[11]。中药抗炎机理表现为多途径,一般从对下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPAA)的影响、干扰花生四烯酸代谢及抗组胺效应、免疫抑制等几个方面进行,此外还有从抑制白细胞活化、抗血小板等方面的阐释^[12]。许多抗炎中药直接或间接干预TNF α 与IL-1 β 的表达量或活性从而达到抗炎的作用。独一味注射剂通过增加巨噬细胞的数量,减少IL-1 β 的分泌,最终达到抑制炎症发生的作用^[13]。野菊花是一种常用的抗炎中药,体外实验研究证实,野菊花能明显抑制巨噬细胞产生TNF α 与IL-1 β ,这可能是野菊花抗炎作用的机制之一^[14]。

本实验目的是在体外构建能高效表达炎症因子人TNF α 和IL-1 β 的细胞系,用来筛选具有抗炎作用的药物,从而为脑部炎症治疗及因炎症引发的脑病治疗带来新的希望。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

DH 5 α 感受态细胞(Solarbio公司),质粒提取试剂盒(Promega公司),胶回收试剂盒(Promega公司);工具酶BamHI、HindIII、KpnI、XbaI,连接酶T4 DNA Ligase,聚合酶PrimeSTAR HS DNA Polymerase(大连宝生物工程有限公司);载体pCMVSPORT α 、pCMVSPORT-IL1 β 、pcDNA3.1、pFLAG-CMV(美国PremierBiosoft公司);脂质体Lipo-fectamineTM2000(北京威格格拉斯有限公司);引物合成(上海生工生物工程技术服务有限公司);DMEM培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(美国Gibco公司);胰酶(美国AMRESCO公司);转染试剂(北京威格格拉斯有限公司);G418筛选培养基(北京Solarbio公司);RIPA裂解液(碧云天生物技术有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司)。

电热恒温箱(DHP-9052型,湖北省黄石市医疗器械厂,中国);离心机(Heraeus Labofuge 400R,Scientific Heraeus,美国);PCR仪(Arktik,Thermo Scientific,美国);凝胶成像仪(Champegel 2000,北京赛智创业科技有限公司,中国);水浴锅(XMTB,北京市长风仪器仪表公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 TNF α 基因和IL-1 β 基因克隆 以克隆载体pCMVSPORT-TNF α 、pCMVSPORT-IL1 β 为模板,上下游引物两端分别加限制性内切酶的酶切位点。用带酶切位点的克隆引物进行PCR扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳后,使用DNA胶回收试剂盒回收。扩增得到的TNF α 片段长度为701 bp,IL1 β 片段长度为809 bp。

1.2.2 TNF α 基因和IL-1 β 基因真核表达载体的构建 用工具酶HindIII、BamHI和KpnI、XbaI分别双酶切上述已纯化的PCR产物和真核表达载体pcDNA3.1、pFLAG-CMV,双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳分离。胶回收双酶切的目的条带。将四

对连接物在连接酶T4 DNA Ligase 16 $^{\circ}$ C下(16-20 h)连接过夜。

1.2.3 重组体的鉴定 将连接产物转化到DH5 α 感受态细胞中,接种于LB固体培养基内,使用氨苄青霉素进行抗性筛选,37 $^{\circ}$ C恒温培养,12小时后挑选单克隆;将单克隆重新接种于LB液体培养基(含相应浓度的氨苄青霉素),37 $^{\circ}$ C恒温水浴摇床震荡12-16 h(OD600=2-3)培养;提取质粒,分别进行单酶切鉴定、PCR鉴定和测序鉴定。单酶切实验中,pcDNA3.1-TNF α 与pFLAG-CMV-TNF α 两个重组质粒用HindIII酶进行单酶切,pcDNA3.1-IL1 β 与pFLAG-CMV-IL1 β 两个重组质粒用KpnI酶进行单酶切。重组质粒测序工作由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

1.2.4 HEK293细胞系的培养 HEK293由本实验室保存,将冻存的HEK293细胞株从液氮罐取出,细胞经常规复苏及传代,培养基为90%DMEM完全培养基加入10%胎牛血清,细胞置于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱中培养,隔天换液,待细胞长至60%~70%单层后,用0.25%胰蛋白酶消化,传代培养,24小时后细胞进入对数生长期时开始实验。

1.2.5 重组质粒的转染与单克隆稳转细胞系的筛选 当HEK293细胞培养至汇合度为80%时,利用脂质体Lipo-fectamineTM2000转染pFLAG-CMV-TNF α 和pFLAG-CMV-IL1 β 。转染4 h后换成90%DMEM完全培养基加10%胎牛血清,继续培养至48 h,用胰蛋白酶消化细胞并接种于35 mm平皿中,接种密度为6000~12000/孔,并将培养基换成G418筛选培养基,浓度为1 mg/mL。筛选培养期间,用显微镜连续观察细胞生长情况,一个月后,消化细胞接种于24孔板中。用枪头挑出单克隆细胞,并继续用G418维持,浓度为0.5 mg/mL。

1.2.6 Western blot检测稳转细胞株内TNF α 和hIL-1 β 蛋白表达水平 收取对数生长期的各单克隆细胞系,用RIPA裂解液裂解,BCA法测蛋白浓度,取90 μ g蛋白(以转染空载体的细胞作为对照)上样进行SDS-PAGE电泳分离。半干法转至硝酸纤维素膜,分别用抗TNF α 和hIL-1 β 抗体检测TNF α 和hIL-1 β 两种蛋白的表达量,以 β -actin作为内参,用Quantity One 4.62计算出各个稳转细胞系的标准化相对表达量。

2 结果

2.1 目的基因TNF α 、IL-1 β 的获得

以克隆载体pCMVSPORT-TNF α 、pCMVSPORT-IL1 β 为模板,分别利用四对引物进行PCR扩增。产物经琼脂糖凝胶电泳分离,结果如图1所示。TNF α 两个扩增产物均在700 bp附近出现明亮条带(图1A),IL-1 β 的两个扩增产物均在800 bp附近出现明亮条带(图1B)。该结果表明,四对引物均成功扩增出目的条带,带有不同酶切位点的目的基因TNF α 和IL-1 β 成功获得。

2.2 TNF α 基因和IL-1 β 基因真核表达载体的构建及鉴定

将上述获得的TNF α 和IL-1 β 基因的PCR产物用HindIII、BamHI和KpnI、XbaI分别双酶切,胶回收获取双酶切片段,分别连接于真核表达载体pcDNA3.1的HindIII、BamHI位点及pFLAG-CMV的KpnI、XbaI位点。重组质粒单酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离后,均大于空载体单酶切产物(图2A、B),该结果表明目的基因已成功插入重组质粒中。对四个重组体分别

进行目的基因 PCR 扩增,均得到了阳性结果(图 2C、D),再一次验证四个重组体中已成功连上特定的目的基因。

重组体经北京三博远志生物技术有限责任公司基因测序鉴定,该结果与 Genbank 基因序列一致(TNF α 序列号 NM_000594、IL1 β 序列号 NM_000576)。质粒图谱如图 3 所示。

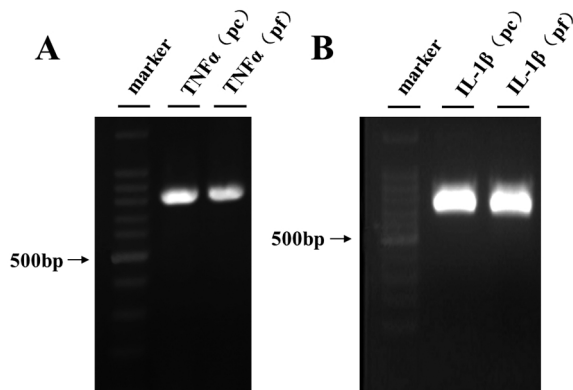


图 1 TNF α (A)和 IL-1 β (B)基因扩增结果

Fig.1 PCR amplification of TNF α (A) and IL-1 β (B)

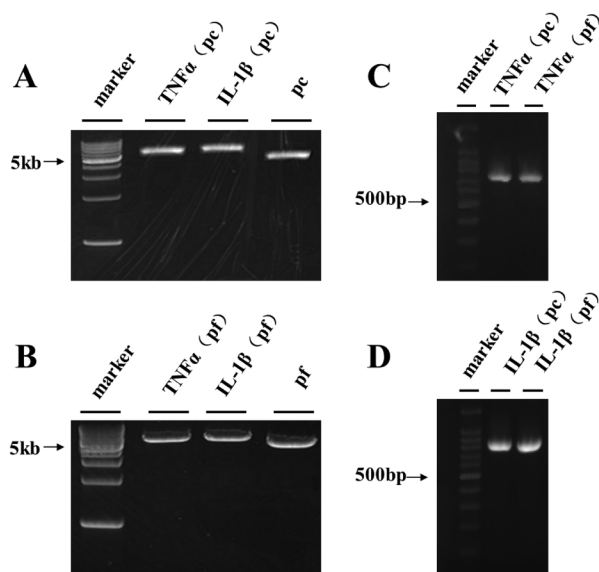


图 2 重组质粒鉴定 (A)重组体单酶切电泳图。(B) 重组体单酶切电泳图。(C) TNF α 两个重组体 PCR 电泳图。(D) IL-1 β 两个重组体 PCR 电泳图

Fig.2 Identification of recombinant plasmid (A) mono-restriction of recombinant plasmid . (B) mono-restriction of recombinant plasmid . (C) PCR amplification of recombinant plasmids. (D) PCR amplification of recombinant plasmids

2.3 单克隆稳转细胞系的筛选

转染 2 天后,少量细胞开始出现死亡,但细胞整体形态保持良好。加 G418 筛选后第 2 天,细胞形态明显改变,细胞回缩,边缘不平整。加 G418 后第 6 天,细胞出现大量死亡,表明瞬时转染的细胞,外源基因逐渐被代谢,抗性能力降低或完全丧失,继而出现大量死亡;而稳定转染的细胞,外源基因已整合入细胞染色体中并表达了相应蛋白,细胞具有抗 G418 的能

力,因此存活。加 G418 后第 10 天,出现单克隆细胞。加 G418 后的第 21 天,单克隆细胞集落开始长成细胞岛。细胞岛经过 1-2 周的稳定生长,长满整个平皿时,即可传代、冻存。其中,pFLAG-CMV 筛选出 3 株细胞系,标号 pf1、pf2、pf3;pFLAG-CMV-TNF α 筛选出 6 株细胞系,标号 T1、T2、T3、T4、T5、T6;pFLAG-CMV-IL1 β 筛选出 5 株细胞系,标号 I1、I2、I3、I4、I5。

2.4 稳转 TNF α 和 IL-1 β 的 HEK293 细胞系的鉴定

使用 Western blot 方法对 pFLAG-CMV-TNF α 转染的 6 株细胞系进行 TNF α 蛋白表达量检测结果如图 5A 所示,T3、T4 两个单克隆细胞株 TNF α 蛋白的相对表达量远高于转入空载体的细胞株。pFLAG-CMV-IL1 β 转染的 5 株细胞系进行 IL-1 β 蛋白表达量检测结果如图 5B 显示,I2、I3、I5 三个单克隆细胞株 IL-1 β 蛋白的相对表达量远高于转入空载体的细胞株。因此,可以认为 T3、T4 两个细胞株稳定转染了 pFLAG-CMV-TNF α 并能够高效表达 TNF α 蛋白,I2、I3、I5 三个细胞株稳定转染了 pFLAG-CMV-IL1 β 并能够高效表达 IL-1 β 蛋白。

3 讨论

目前高通量药物筛选是最流行的药物研发手段^[15],而用于新药高通量筛选 (High throughput screening, HTS) 的技术如蛋白质芯片技术、高内涵筛选技术、极化荧光筛选技术、模式生物等都各有其局限性。细胞模型通过模拟并构建各种信号通路,通过测试细胞对药物的反应来预测药物对人体的作用,具有简便易行、稳定可靠、筛选通量高等特点,已成功应用于药物筛选研究中^[16,17]。

现在已经有多种炎症模型用于抗炎药物筛选,具体可分为两大类:一类为针对具体疾病的炎症模型,如粘膜炎症模型,肠炎模型等^[18,19];另一类为针对具体药物靶点的炎症模型,如以 COX 家族为靶点的炎症模型或针对 CD4⁺ 的炎症模型,但这些多为动物模型^[20,21]。动物模型在药物研究中不可或缺,但同时也具有周期长、花费高等缺点,在用作早期药物的高通量筛选中不如细胞模型的快速高效。TNF- α 和 IL-1 β 作为炎症治疗的靶点,尤其是脑部炎症,具有重要地位^[5,9]。笔者通过建立稳定转染的细胞株,为以 TNF α 和 IL-1 β 为靶点的抗炎药物的筛选提供了可能性。稳定转染 pFLAG-CMV-TNF α 和 pFLAG-CMV-IL1 β 的单克隆细胞株,性质均一,且能高表达 TNF α 蛋白和 IL-1 β 蛋白,可以有效模拟炎症状态。通过监测这两种蛋白的表达量,可以简单高效筛选出具有抗炎作用的中药。另外这两种炎症因子与脑病尤其是神经退行性疾病关系密切,使用这两种高表达炎症因子的细胞株,有利于脑部炎症机制及治疗的研究。

4 结论

本实验通过 PCR 基因克隆的方法从载体 pCMVSPORT-TNF α 和 pCMVSPORT-IL1 β 成功获得目的基因片段,然后将目的基因连入真核表达载体 pcDNA3.1 和 pFLAG-CMV,通过脂质体转染的方法将重组体成功导入受体细胞 HEK293,并利用单克隆的方法得到稳定转染这两种目的基因的细胞株,最后通过对目的蛋白表达进行检测,结果表明试验成功构建了能分别高表达人 TNF α 和 IL-1 β 蛋白的细胞株,为抗炎药物大规模筛选提

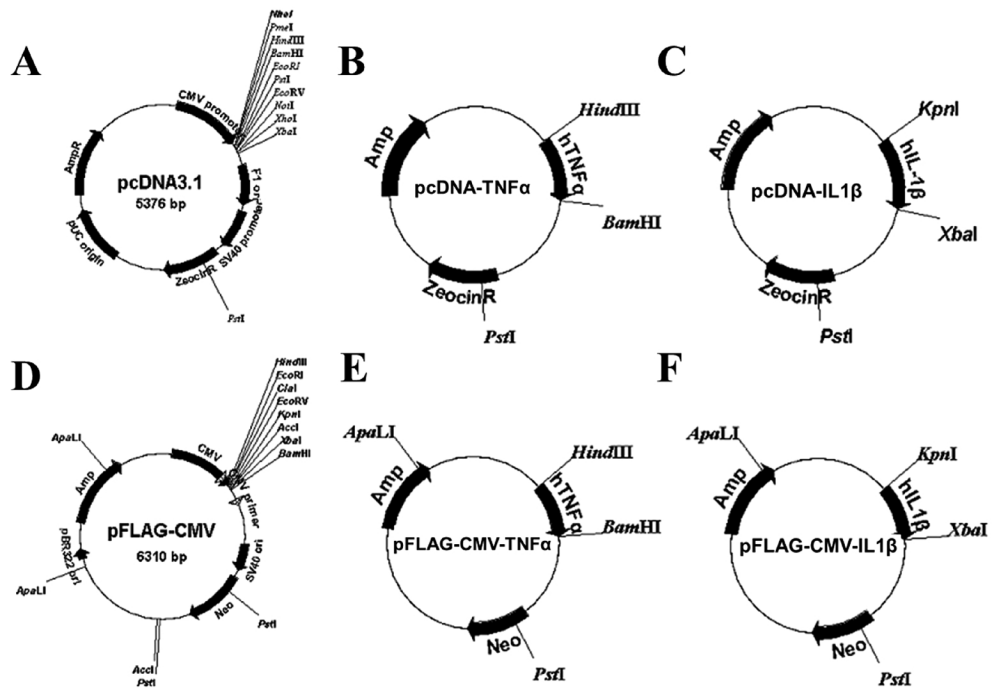


图3 重组体质粒图谱 (A) pcDNA3.1 质粒图谱 (B) pcDNA3.1-TNF α 质粒图谱 (C) pcDNA3.1-IL1 β 质粒图谱 (D) pFLAG-CMV 质粒图谱 (E) pFLAG-CMV-TNF α 质粒图谱 (F) pFLAG-CMV-IL1 β 质粒图谱

Fig.3 Plasmid profile (A) pcDNA3.1 (B) pcDNA3.1-TNF α (C) pcDNA3.1-IL1 β (D) pFLAG-CMV (E) pFLAG-CMV-TNF α (F) pFLAG-CMV-IL1 β

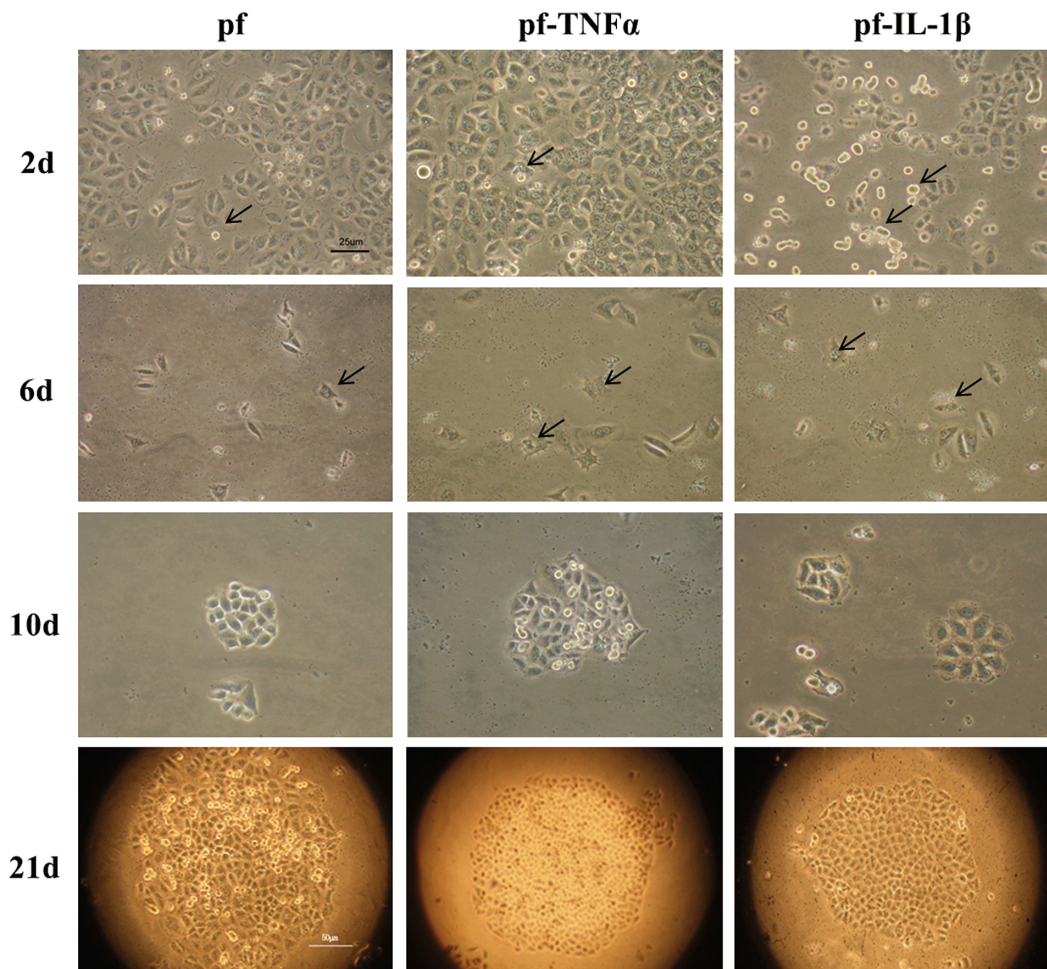


图4 HEK293 细胞系单克隆筛选过程形态变化图 (第2天,第6天,第10天 bar=25 μ m,第21天 bar=50 μ m)

Fig.4 The morphological developments and changes of HEK293 in the process of monoclonal screening. (Bar=25 μ m(day2,6,10);bar=50 μ m(day21))

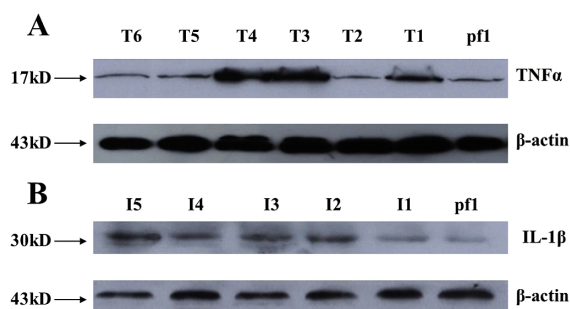


图5 Western blot 检测单克隆细胞系内炎症因子 $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 的蛋白表达量 (A) 单克隆细胞株 $\text{TNF}\alpha$ 蛋白表达量, T1~T6 是转染 pFLAG-CMV- $\text{TNF}\alpha$ 的 6 个 HEK293 单克隆细胞株, pf 是转染空载体 pFLAG-CMV 的细胞株; (B) 单克隆细胞株 $\text{IL-1}\beta$ 蛋白表达量, I1~I5 是转染 pFLAG-CMV- $\text{IL-1}\beta$ 的 5 个 HEK293 单克隆细胞株, pf 是转染空载体 pFLAG-CMV 的细胞株

Fig.5 Detect the $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ expression level in monoclonal (A) The protein level of $\text{TNF}\alpha$ in monoclonal, T1~6 refers to the six monoclonal strains transfected with pFLAG-CMV- $\text{TNF}\alpha$, pf refers to the monoclonal strain transfected with pFLAG-CMV; (B) The protein level of $\text{IL-1}\beta$ in monoclonal, T1~6 refers to the six monoclonal strains transfected with pFLAG-CMV-h $\text{IL-1}\beta$, pf refers to the monoclonal strain transfected with pFLAG-CMV

供了一个新的平台。

参考文献(References)

- [1] 邢梦龙. 炎症与医药开发[J]. 上海医药情报研究, 2004, 4: 44-47
Xing Meng-long. Inflammation and medicine development [J]. Shanghai Food and Drug Information Research, 2004, 4: 44-47
- [2] C Berasain, J Castillo, M J Perugorria, et al. Inflammation and liver cancer: new molecular links[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1155: 206-221
- [3] N Azad, Y Rojanasakul, V Vallyathan. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species[J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2008, 1190(1): 1-15
- [4] B Liu and, J S Hong. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 304(1): 1-7
- [5] M C Papadopoulos, D C Davies, R F Moss, et al. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review[J]. Crit Care Med, 2000, 28 (8): 3019-3024
- [6] 何娅, 马琳. 急性脑梗塞患者血清肿瘤坏死因子含量的动态变化及意义[J]. 中医实用内科杂志, 2003, 23(5): 290
He Ya, Ma Lin. Dynamic change of TNF level in the serum of acute cerebral infarction patients and its meaning [J]. Journal of Chinese practical Department of Internal Medicine, 2003, 23(5): 290
- [7] 陈芳梅, 尹琦. 急性脑梗死患者白细胞介素-6、肿瘤坏死因子及细胞粘附分子的动态研究 [J]. 国外医学 (临床生物化学与检验学分册), 2005, 26(10): 690
Chen Fang-mei, Yin Qi. Changes in serum IL-6, $\text{TNF-}\alpha$ and adhesion molecules in patients with acute cerebral infarction [J]. Sect Clin Biochem & Lab Med Foreign Med Sci, 2005, 26(10): 690
- [8] S M Allan, N J Rothwell. Cytokines and acute neurodegeneration[J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(10): 734-744
- [9] S M Lucas, N J Rothwell, R M Gibson. The role of inflammation in CNS injury and disease[J]. Brit J Pharmacol, 2006, 147: S232-S240
- [10] 杨冬梅, 李海涛. 中药抗炎免疫药理研究进展 [J]. 中国中医急症, 2006, 11(15): 1278-1280
Yang Dong-mei, Li Hai-tao. Research progress of the pharmacology of anti-inflammatory and immune effects of Chinese Medicine [J]. JETCM, 2006, 11(15): 1278-1280
- [11] 崔晓, 周莹君, 王淑静, 等. 中药有效成分抗炎作用研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 4(9): 95-96
Cui Xiao, Zhou Ying-jun, Wang Shu-jing, et al. Research on the anti-inflammatory action of active ingredients of Chinese herbal medicine [J]. Chinese medicine modern distance education of China, 2011, 4(9): 95-96
- [12] 张法仁, 曾忠良. 中药抗炎机理研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(11): 49-52
Zhang Fa-ren, Zeng Zhong-liang. Anti-inflammatory Mechanism of Traditional Chinese Medicine [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2009, 43(11): 49-52
- [13] P. Zhang, H. Ji, Y Q Li, et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of Lamiophlomis rotata injection [J]. Chin J Nat Med Jan, 2009, 7(1): 61-64
- [14] M S Cheon, T Yoon, Y Lee do, et al. Chrysanthemum indicum Linne extract inhibits the inflammatory response by suppressing NF-kappaB and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 122(3): 473-477
- [15] 赵霞霞, 郜瑞, 李发荣. 基于细胞模型的高通量药物筛选[J]. 药物生物技术, 2008, 15(3): 227-230
Zhao Xia-xia, Gao Rui, Li Fa-rong. High through-put drug screening based on the cell model[J]. Pharm Biotechnol, 2008, 15(3): 227-230
- [16] Y Yang, W Jiang, L Wang, et al. Characterization of the isoflavone pratensein as a novel transcriptional up-regulator of scavenger receptor class B type I in HepG2 cells [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32 (7): 1289-1294
- [17] J Fang and, R B Silverman. A cellular model for screening neuronal nitric oxide synthase inhibitors[J]. Anal Biochem, 2009, 390(1): 74-78
- [18] C O Elson, R B Sartor, G S Tennyson, et al. Experimental-Models of Inflammatory Bowel-Disease[J]. Gastroenterology, 1995, 109(4): 1344-1367
- [19] R S Blumberg, L J Saubermann, W Strober. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease[J]. Current Opinion in Immunology, 1999, 11(6): 648-656
- [20] K Subbaramaiah, P Michaluart, W J Chung, et al. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells [J]. Cancer Prevention: Novel Nutrient and Pharmaceutical Developments, 1999, 889: 214-223
- [21] S Okamoto, M Watanabe, M Yamazaki, et al. A synthetic mimetic of CD4 is able to suppress disease in a rodent model of immune colitis [J]. European Journal of Immunology, 1999, 29(1): 355-366