

[文章编号] 1000 - 4718(2007)04 - 0710 - 05

# 白细胞介素 1 刺激对脑微血管内皮细胞 COX 活性、mRNA 表达和 PGE<sub>2</sub> 释放的影响\*

郭建友<sup>1,2</sup>, 霍海如<sup>1</sup>, 赵保胜<sup>1</sup>, 刘洪斌<sup>1</sup>, 李兰芳<sup>1</sup>, 郭淑英<sup>1</sup>, 姜廷良<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国中医研究院中药研究所唐氏中药研究中心, 北京 100700; <sup>2</sup>中国科学院心理研究所, 北京 100101)

**[摘要]** 目的: 探讨白细胞介素 1 (L-1) 刺激不同时间对大鼠脑微血管内皮细胞 (rCMEC) 的环氧合酶 (COX) 活性及其 mRNA 表达和 PGE<sub>2</sub> 释放的影响。方法: 建立 rCMEC 培养, 进行因子相关抗原鉴定。细胞长至融合状态后加入 L-1 (30 μg/L), 分别刺激 0.5、1、2、4、8、12、24 h, ELISA 测定细胞内 COX-1、COX-2 的活性及细胞外液 PGE<sub>2</sub> 含量, 荧光实时定量 PCR 检测 COX-1、COX-2 的 mRNA 表达量, 扩增产物进行熔解曲线图及琼脂糖电泳分析, 并与未刺激的 rCMEC 作比较。结果: 因子抗体免疫组化染色可见 90% 以上的培养细胞呈阳性, 确认为 rCMEC。L-1 刺激 4 h 时细胞培养液 PGE<sub>2</sub> 含量已明显高于未刺激组 (P < 0.05); 12 h 时 PGE<sub>2</sub> 含量达到最大值 (P < 0.01); 24 h 时 PGE<sub>2</sub> 含量有所回降, 但与未刺激组比较仍有显著差异 (P < 0.05)。L-1 刺激不同时间 rCMEC 内 COX-1 活性与未刺激组相比无统计学差异 (P > 0.05); COX-2 活性在第 8 h 时已明显高于未刺激组 (P < 0.05), 12 h 活性达峰值 (P < 0.01), 24 h 活性有所回降, 但仍具显著差异 (P < 0.05)。L-1 刺激不同时间 COX-1 mRNA 表达与未刺激组比较无明显差异 (P > 0.05); 未刺激组在本实验条件下未检测到 COX-2 mRNA 表达, L-1 刺激 1 h 时可见 COX-2 mRNA 表达, 4 h 时 COX-2 mRNA 表达至峰值, 而后开始回降, 第 12 h 时已未见表达。熔解曲线图显示无非特异性扩增; 琼脂糖电泳可见扩增基因与目的基因长度相符, 结果与荧光定量 PCR 一致。结论: L-1 作用下, rCMEC 释放的 PGE<sub>2</sub> 持续增加并于 12 h 达峰值, 这一过程主要与 COX-2 mRNA 表达激活及 COX-2 活性增加有关。

**[关键词]** 白细胞介素 1; 脑; 内皮细胞; 前列腺素 E 类; 环氧合酶 - 2

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

## Study on COX activity and its mRNA expression, and PGE<sub>2</sub> release from cerebral microvascular endothelial cells stimulated by L-1

GUO Jian-you<sup>1,2</sup>, HUO Hai-ru<sup>1</sup>, ZHAO Bao-sheng<sup>1</sup>, LU Hong-bin<sup>1</sup>, LI Lan-fang<sup>1</sup>, GUO Shu-ying<sup>1</sup>, JIANG Ting-liang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Tang Center for Herbal Medicine Research, Institute of Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing 100700, China; <sup>2</sup> Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China E-mail: hrhuo@sohu.com)

**[ABSTRACT]** **AM:** To study the cyclooxygenase (COX) activity and its mRNA expression, and PGE<sub>2</sub> release from rats cerebral microvascular endothelial cells (rCMEC) stimulated by L-1 (30 μg/L) at different times. **METHODS:** rCMEC were cultured, and identified by immunohistochemistry for von Willebrand factor (factor, a marker for all endothelial cells) in cytoplasm of the cells. After rCMEC grew to confluency, they were stimulated with L-1 for 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h, respectively. Activity of COX-1 and COX-2 in rCMEC and production of PGE<sub>2</sub> in the conditioned media were detected by ELISA. COX-1 and COX-2 mRNA expressions were measured by real-time quantity PCR. The amplification product was tested by melting curve and identified by electrophoretic gel. **RESULTS:** Positive immunostaining for factor was present diffusely in the cytoplasm in more than 90% rCMEC. Compared to the cells without L-1 stimulation, the production of PGE<sub>2</sub> increased significantly (P < 0.05) at 4 h after rCMEC were incubated with L-1 and reached the top level at 12 h (P < 0.01), then declined thereafter at 24 h (P < 0.05). There was no significant difference on COX-1 activity between L-1 group and non-L-1 group. COX-2 activity increased significantly compared with those in non-L-1 (P < 0.05) at 8 h after rCMEC were incubated with L-1 and reached the top level at 12 h (P < 0.01), then declined thereafter at 24 h (P < 0.05). There was no significant difference on

[收稿日期] 2005 - 08 - 26 [修回日期] 2005 - 11 - 01

\* [基金项目] 国家自然科学基金重大项目资助 (No. 90209006)

通讯作者 Tel: 010 - 64041008; E-mail: hrhuo@sohu.com



COX - 1 mRNA expression between L - 1 group and non - L - 1 group. COX - 2 mRNA was induced and became detectable at 1 h, and reached the top level at 4 h, then declined thereafter at 8 h and became undetectable by 12 h and 24 h after incubation with L - 1. The melting curve showed there was no nonspecific amplification and electrophoretic gel showed the lengths of amplification products accorded with the predicted lengths. **CONCLUSION:** While rCEMC are stimulated by L - 1, the excretion of PGE<sub>2</sub> increases and reaches the top level at 12 h, which is related with its induction on COX - 2 mRNA expression and COX - 2 activity.

[ **KEY WORDS** ] Interleukin - 1; Brain; Endothelial cells; Prostaglandins E; Cyclooxygenase - 2

发热是由外源性致热原作用于单核巨噬细胞等释放内生致热原(如 L - 1 等), 后者再作用于体温调节中枢引起的病理过程。以往的研究表明, 内生致热原可能是通过作用于血脑屏障(BBB)和血管终板器(OVLT)感受区, 后者可能产生和释放有关的生物活性物质进入下丘脑, 进而引起一系列的生理、病理反应过程<sup>[1-3]</sup>。前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 一直被认为是重要的中枢发热介质, 是多种致热原诱导体温升高的中枢共同通路<sup>[4]</sup>。它可能通过作用于神经元, 促进神经递质、神经调质等释放, 影响 POA/AH 区域的热敏神经元, 引起发热。环氧合酶(COX)是前列腺素类物质合成初始步骤中的关键限速酶, 其活性的增加或 mRNA 表达量的增加均能使 PGE<sub>2</sub> 合成增加。本实验以培养大鼠脑微血管内皮细胞(rCEMC)为研究对象, 以一定浓度的 L - 1 分别刺激内皮细胞 0.5、1、2、4、8、12、24 h, 观察其对细胞内 COX 活性、COX mRNA 表达以及 PGE<sub>2</sub> 释放的影响, 为在细胞水平研究 L - 1 - COX - PGE<sub>2</sub> - 发热这一信号转导通路提供实验依据。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料和试剂

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠, 体重为 (80 ± 10) g, 由中国医学科学院实验动物中心提供, 合格证为 SCXK 11 - 00 - 0006 号。

1.2 试剂 M199、胶原酶及胰酶均购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自美国 Hycorne 公司; 内皮细胞生长因子(EGF)购自德国 Roche 公司; 因子相关抗原多克隆抗体及免疫组化 SABC 染色试剂盒购自美国 ZYMED 公司; L - 1 购自英国 Peprotech 公司; PGE<sub>2</sub> ELISA 测定试剂盒购自上海太阳生物技术公司; COX 活性 ELISA 测定试剂盒购自美国 Cayman Chemical 公司; RNA 提取试剂盒、Trizol 及 RT 逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒购自美国应用生物公司; 琼脂糖购自西班牙 Biowest 公司。

### 2 方法

2.1 细胞培养 大鼠脑微血管内皮细胞的培养参考 Defazio 等<sup>[5]</sup>的方法, 并略加改动, 具体操作如下:

雄性 SD 大鼠用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 无菌条件下分离鼠脑, 去除大血管、软脑膜、小脑和大脑髓质, 收集大脑皮质。剪碎后, 玻璃匀浆器中匀浆, 匀浆液经 80 目尼龙滤网过滤, 收集滤液, 再经 200 目尼龙滤网过滤, 收集网上之血管段, 1 500 r/min 离心 8 min。弃上清, 将沉淀悬浮于 0.1% 胶原酶液中, 37℃ 放置 20 min。悬浮液 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 冲洗液清洗沉淀, 1 500 r/min 离心 5 min, 反复 3 次, 末次离心后, 去上清, 以培养液悬浮接种于明胶覆盖的培养瓶中。每 2 - 3 d 换液 1 次, 当细胞长成致密单层, 出现“铺路石”征象后用 0.25% 胰酶消化、传代, 3 - 5 d 传 1 代。

2.2 内皮细胞鉴定 显微镜下观察细胞形态, 以因子相关抗原作免疫组化鉴定。胰酶消化细胞, 以培养液调细胞浓度成  $1 \times 10^8$  cells/L, 接种于预先放入载玻片的 6 孔培养板中。37℃ 培养箱内继续孵育 18 h, 待细胞在玻片上长至汇合后, 吸出培养液, PBS 冲洗, 加入 4% 丙酮固定 15 min。以 PBS 冲洗 2 次后, 加入兔抗人因子相关抗原多抗, 4℃ 保存过夜。按试剂盒说明逐一加入一抗等试剂, 最后进行常规免疫细胞化学染色, DAB 发色。阴性对照用 PBS 液替代第一抗体。

2.3 L - 1 刺激 取培养的第 3 - 5 代大鼠脑微血管内皮细胞, 以培养液稀释细胞浓度成  $1 \times 10^8$  cells/L, 接种于 24 孔培养板内, 每孔 1 mL。37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中继续培养 24 h 后, 加入终浓度为 30 μg/L 的 L - 1 刺激。分别于 L - 1 刺激后 0.5、1、2、4、8、12、24 h (各设 12 个复孔), 收集细胞外液, 备测 PGE<sub>2</sub>。将培养板底部细胞以 PBS 冲洗后, 分别用于测定 COX 活性及 mRNA 表达 (各 6 个复孔)。同时以未加 L - 1 刺激的细胞作为空白对照 (设 12 个复孔)。

2.4 PGE<sub>2</sub> 含量测定 以 ELISA 法检测细胞外液中 PGE<sub>2</sub> 含量, 按照试剂盒的操作步骤进行, 酶标仪 (Bio - Rad 公司) 上于 490 nm 波长测定吸光度 (A) 值, 以 ng/L 表示其含量。

2.5 COX 活性测定 24 孔细胞培养板取出上清后, 以 PBS 冲洗各孔 2 次。加入预冷的含 1% 牛血清的 1 mmol/L EDTA 溶液, 以细胞刮刮取细胞。

2 000 r/min, 4 离心 10 min, 弃上清, 加入冰冷的裂解缓冲液 [1 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris - HCl (pH 7.8)], 冰浴超声 3 × 4 s 后, 10 000 r/min, 4 离心 15 min。取上清以 Lowry 法测定蛋白浓度, 以 Cayman Chemical 公司的 ELISA 检测试剂盒检测 COX - 1 及 COX - 2 的活性。以每分钟每毫克蛋白生成的 PGH<sub>2</sub> 量代表 COX - 1 及 COX - 2 的活性, 用 μmol · min<sup>-1</sup> · g<sup>-1</sup> 蛋白表示其活性单位。

**2.6 RNA 提取及 cDNA 制备** RNA 提取按 RNA Trizol 提取试剂盒操作说明书进行。提取的 RNA 质量由 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值和 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。取 1 μg RNA, 以 Oligo dT 为引物进行反转录。20 μL 体系中含有 5 ×M - MLV buffer 4 μL, dNTP 10 mmol, RNase 20 U, M - MLV 100 U, Oligo dT 20 pmol, RNA 1 μg。逆转录反应条件为: 20 5 min, 42 60 min, 70 5 min, 冰浴冷却后置 - 20 保存。

**2.7 荧光定量 PCR 反应** 根据 NCBI 数据库中的甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶 (GAPDH)、COX - 1 和 COX

- 2 基因序列, 以 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 由北京赛百盛基因技术有限公司合成 (表 1)。在 PRISM 7000 型荧光定量 PCR 仪 (美国应用生物公司) 进行实时 PCR, 20 μL PCR 反应体系中含 2 × SYBR Green PCR Master Mix 10 μL, cDNA 2 μL, 引物 2 pmol。同时以一个样本的 cDNA 稀释后作为标准品做 GAPDH 基因的定量 PCR, 稀释倍数分别为 2、10、100、1 000、10 000 倍, 使每个 PCR 反应体系中起始模板数分别为 10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10、2。以浓度的对数 (logCO) 和相应的阈值循环数 (Ct) 为相应的 X、Y 轴制作标准曲线。扩增条件为 95 5 min 变性, 94 30 s, 56 30 s, 72 1 min, 共 40 个循环。反应结束后, 根据测得的样品 Ct 值及标准曲线, 求出待测样品的相对起始浓度, 用 COX 的相对起始拷贝数除以相应的 GAPDH 的相对起始拷贝数得到 COX mRNA 表达的相对值。反应完毕后对扩增产物作熔解曲线并进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

表 1 PCR 引物序列

Tab 1 PCR primer sequence

Name	Oligo	Primer sequence	Predicted size (bp)	GenBank accession
GAPDH	Forward primer	5' - TGAACGGGAAGCTCACTGG - 3'	260	NM_017008
	Reverse primer	5' - GAGCTTCACAAA GTTGICATTGAG - 3'		
COX - 1	Forward primer	5' - GCGTGTGCTCA TCCA TCTACTC - 3'	116	S67721
	Reverse primer	5' - AGCA TCTGTGAGCA GTACCGG - 3'		
COX - 2	Forward primer	5' - TTTGTTGAGTCA TTCACCA GACA GAT - 3'	169	S67722
	Reverse primer	5' - ACGATGTGTAA GGTTCAGGGAGAA G - 3'		

3 统计学处理

数据经 F 检验后, 行方差分析或 t 检验, 结果以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

结 果

1 细胞鉴定

倒置相差显微镜下, 见细胞折光度强、呈扁平的梭状细胞, 边界清楚、胞浆丰富, 铺路石状单层镶嵌状排列。因子抗体免疫组化染色后的阳性细胞占总细胞数 95% 以上, 细胞呈短梭形或多角形, 胞浆丰富, 内含棕黄色颗粒 (图 1A)。省略第 抗体的阴性对照片只见微弱的非特异背景着色, 胞浆中未见棕黄色颗粒 (图 1B)。

2 L - 1 刺激不同时间对 rCMEC 释放 PGE<sub>2</sub> 的影响

rCMEC 经 L - 1 刺激后, 培养液中的 PGE<sub>2</sub> 含量逐渐增加。刺激后 4h 时培养液中 PGE<sub>2</sub> 含量为 (5.15 ± 1.58) ng/L, 与未刺激组比较已具统计学意义 (P < 0.05); 12 h 时 PGE<sub>2</sub> 含量为 (6.55 ± 1.08) ng/L, 至最大

值, 与未刺激组比较有非常显著的统计学差异 (P < 0.01); 24 h 时 PGE<sub>2</sub> 含量有所下降, 为 (6.04 ± 1.40) ng/L, 但与未刺激组比较仍具统计学意义 (P < 0.05) (图 2A)。

3 L - 1 刺激不同时间对 rCMEC 内 COX 活性的影响

L - 1 刺激不同时间后 rCMEC 内的 COX - 1 活性与未刺激组相比, 均无统计学意义 (P > 0.05)。

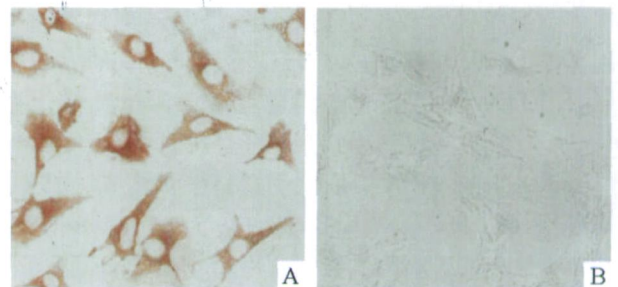


Fig 1 Characterization of rCMEC. A: rCMEC stained positively with antibody to von Willebrand factor; B: negative control (×400).

图 1 内皮细胞免疫组化

而 COX - 2活性在 L - 1 刺激后上升较为明显, 8 h时为 (350.58 ±79.79) μmol · min<sup>-1</sup> · g<sup>-1</sup>, 与未刺激组比较有显著差异 (P < 0.05); 12 h时活性为 (393.87 ±58.69) μmol · min<sup>-1</sup> · g<sup>-1</sup>, 至最大值; 24 h时活性虽有所降低, 为 (370.47 ± 66.29) μmol · min<sup>-1</sup> · g<sup>-1</sup>, 但与未刺激组仍有显著差异 (P < 0.05) (图 2B、D)。

#### 4 L - 1 刺激不同时间对 rCMEC 内 COX mRNA 表达的影响

以样本 cDNA 稀释后求得的标准曲线斜率为 - 3.951, 相关系数为 - 0.995, P < 0.05, 模板浓度对数值与 Ct 值之间呈良好的线性关系。根据标准曲线求出待测样本 COX - 1、COX - 2 mRNA 的相对拷贝数, 与相对应的 GAPDH 的相对拷贝数比较求出其 mRNA 表达水平 (图 2C、E)。L - 1 刺激不同时间后 COX - 1 mRNA 表达水平与未刺激组比较无明显差异 (P > 0.05)。COX - 2 mRNA 未刺激组 Ct 值为 40, 表明经过 40 个循环反应后仍未达到设定阈值, 提示本实验条件下未检测到 COX - 2 mRNA 表达; L - 1 刺激 1 h 时可检测到 COX - 2 mRNA 表达, 表达水平为 0.0087 ± 0.0069; 4 h 时 COX - 2 mRNA 表达至最大值, 表达水平为 0.0985 ± 0.0328; 8 h 时 COX - 2 mRNA 表达水平为 0.0195 ± 0.0064; 12 h 及 24 h 未检测到 COX - 2 mRNA 表达。

熔解曲线图显示, 扩增目的基因 COX - 1 的 T<sub>m</sub> 值 (熔解温度) 为 79.1, COX - 2 的 T<sub>m</sub> 值为 82.3, GAPDH 的 T<sub>m</sub> 值为 87.3, 均未见其它杂峰, 无非特异扩增 (图 3)。荧光定量 PCR 产物经琼脂糖电泳, 紫外灯下扫描分析结果见图 4, COX - 1、COX - 2 和 GAPDH 的扩增基因长度符合设计长度, 结果与荧光定量 PCR 一致。

### 讨 论

血管内皮细胞作为血管内膜的主要结构, 在创伤修复、血管生成等一系列生理和病理过程中起重要作用, 血管内皮细胞的研究已经成为当今生物学、医学研究的热点<sup>[6]</sup>。脑微血管内皮细胞作为血脑屏障的结构基础, 适合于发热信号转导的研究 (如 PGE<sub>2</sub> 释放等)。本实验以内源性致热因子 L - 1 刺激 rCMEC, 观察不同刺激时间对其 COX 活性及 mRNA 表达和释放 PGE<sub>2</sub> 的变化。结果提示, L - 1 刺激下, rCMEC 释放 PGE<sub>2</sub> 是一个逐渐升高、而后缓慢下降的过程, 其峰值时约在第 12 h。这可为探讨 L - 1 刺激 rCMEC 产生和释放 PGE<sub>2</sub> 的过程、相关酶和影响因子的作用提供研究设计的参考和依据, 有助于进一步对发热机制的研究和探讨。

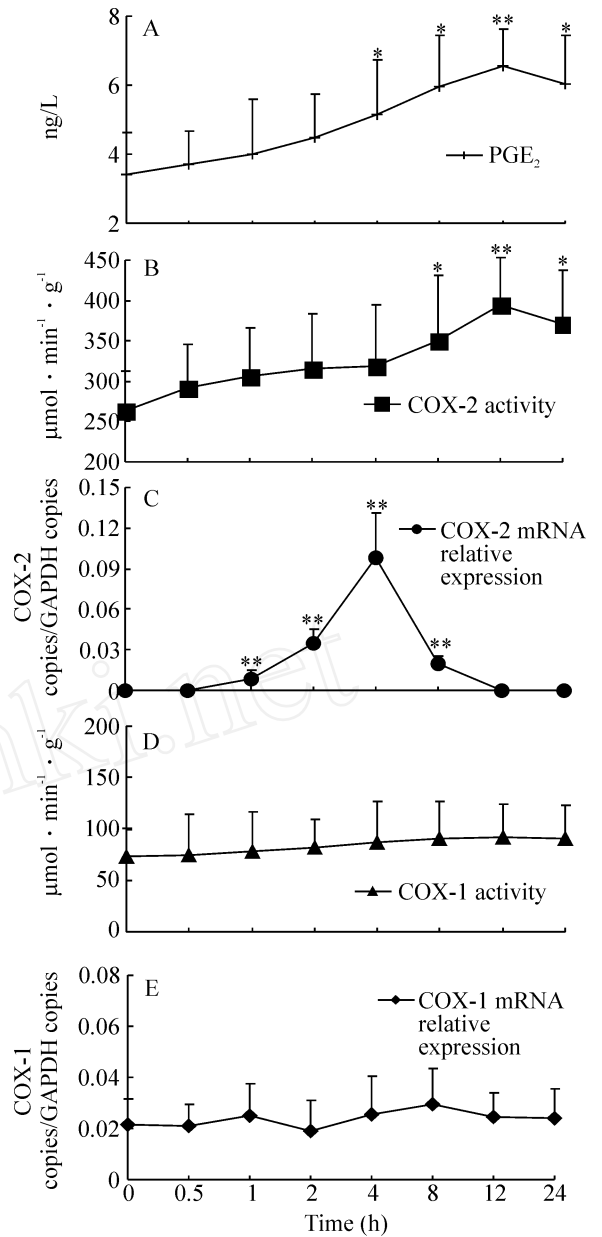


Fig 2 Time course of COX activity and mRNA expression, and PGE<sub>2</sub> production in rCMEC stimulated by L - 1 . A: PGE<sub>2</sub> production; B: COX - 2 activity; C: COX - 2 mRNA expression; D: COX - 1 activity; E: COX - 1 mRNA expression \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs non - L - 1 .

图 2 L - 1 刺激不同时间对内皮细胞内 COX 活性及其 mRNA 表达和释放 PGE<sub>2</sub> 的变化

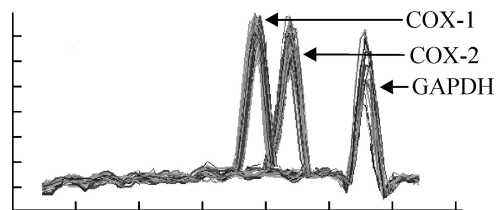


Fig 3 Melting curve of the amplification product of COX - 1, COX - 2 and GAPDH.

图 3 COX - 1、COX - 2 及 GAPDH 扩增产物熔解曲线图

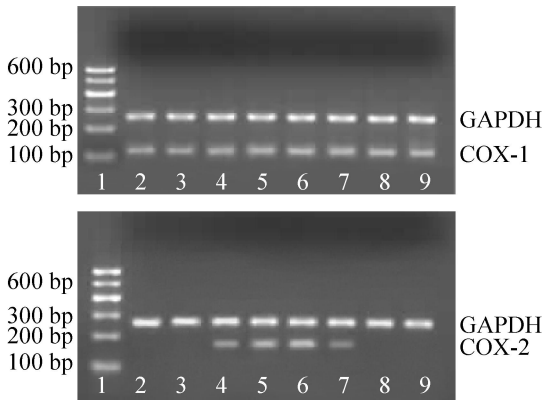


Fig 4 The amplification product of COX - 1, COX - 2 and GAPDH. Lane 1: the DNA marker; Lane 2: control; Lane 3 to 9: 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h stimulated by L - 1 .

图 4 COX - 1、COX - 2 和 GAPDH RT - PCR 扩增产物电泳结果

COX是催化花生四烯酸生成前列腺素类物质的限速酶,可被炎症因子、生长因子等诱导表达,参与肿瘤生成、炎症发生等病理过程。已经证明 COX 存在两种异构体。COX - 1 属于结构酶,在细胞中稳定表达,参与维持细胞稳定的内环境,与机体一系列生理功能如血小板激活、胃肠道的保护及肾脏功能相关。COX - 2 为诱导酶,可被多种刺激因子(如 L - 1、LPS)诱导产生,参与许多病理生理过程。本实验结果显示,在 L - 1 作用的 0.5 - 24 h 以内, iCMEC 的 COX - 1 活性无明显变化; COX - 2 活性逐渐升高、而后缓慢下降, L - 1 刺激的第 12h 是 COX - 2 活性的峰值时。

近来发展起来的采用荧光染料 SYBR Green 进行荧光定量 PCR 检测方法,其原理是该染料可嵌入到双链 DNA 中而产生荧光,随着 PCR 产物的不断扩增,该染料不断嵌入,所产生的荧光也逐渐变强, DNA 模板量与荧光强度成正比;该方法只需在 PCR 反应体系中加入该染料即可,无需合成荧光探针,与常用的 PCR 扩增、电泳、进行灰度扫描相比,更可相对定量且操作简单。它的主要不足之处在于 SYBR Green 可与所有双链 DNA 结合,不能区分特异与非特异产物,如引物二聚体<sup>[7,8]</sup>,而非特异扩增可通过熔解曲线显示。从我们所做的熔解曲线图可看出,在本实验条件下未见非特异扩增, PCR 产物电泳结果与荧光定量 PCR 一致,因此实验条件完全可行。荧光定量 PCR 结果显示 L - 1 刺激不同时间 iCMEC 内 COX - 1 mRNA 表达无明显变化;未刺激组未检测到 COX - 2 mRNA 表达, L - 1 诱导 COX - 2 mRNA 表达并于 4h 至峰值, 8 h 表达降低, 12h 及 24h 未检测到 COX - 2 mRNA 表达。实验结果表明

L - 1 可能主要作用于 COX - 2,诱导 COX - 2 mRNA 表达及 COX - 2 活性增加,但 COX - 2 mRNA 表达 4 h 至峰值, 8 h 已下降, COX - 2 活性 12h 达峰值,提示 L - 1 作用下, COX - 2 mRNA 表达激活先于其活性的增加。

本实验结果表明 30 μg/L 的 L - 1 刺激 iCMEC 后,其 COX - 2 mRNA 表达的峰值时早于其活性峰值时,这可能是由于 COX - 2 mRNA 经转录后翻译成酶合成蛋白、并经激活需经过一定的时间。COX 作为催化花生四烯酸生成前列腺素类物质的限速酶,从细胞内 COX 酶活性增高至其合成和释放出 PGE<sub>2</sub> 需要一定时间,因此其活性峰值时与释放 PGE<sub>2</sub> 的峰值时似亦应有一定的时间间隔。本次实验结果提示 iCMEC 内 COX - 2 活性的峰值时与其释放 PGE<sub>2</sub> 的峰值时一致,可能由于我们在 L - 1 刺激 12 h 至 24 h 之间未再设测定点,未精确抓住释放 PGE<sub>2</sub> 的峰值时有关,我们将在以后的实验设计方案中注意。

[参 考 文 献]

[1] 李楚杰. 发热时体温的正调节和负调节 [J]. 中国病理生理杂志, 1994, 10(5): 553 - 557.  
 [2] Blatteis CM, Li S Pyrogenic signaling via vagal afferents: what stimulates their receptors? [J]. Auton Neurosci, 2000, 85(1): 66 - 71.  
 [3] Blatteis CM, Sehic E, Li S Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts [J]. Clin Infect Dis, 2000, 31 (Suppl 5): 168 - 177.  
 [4] Ivanov A I, Romanovsky AA. Prostaglandin E<sub>2</sub> as a mediator of fever: synthesis and catabolism [J]. Front Biosci, 2004, 9(2): 1977 - 1993.  
 [5] Defazio G, Livrea P, Giorelli M, et al Interferon beta - 1a downregulates TNF alpha - induced intercellular adhesion molecule 1 expression on brain microvascular endothelial cells through a tyrosine kinase - dependent pathway [J]. Brain Res, 2000, 881(2): 227 - 230.  
 [6] Nakas - Icindic E, Zacicagic A, Hadzovic A, et al Endothelin in health and disease [J]. Bosn J Basic Med Sci, USA 2004, 4(3): 31 - 34.  
 [7] Rasmussen R. Quantification on the LightCycle Rapid cycle real time PCR, methods and applications [M]. Heidelberg: Sprinige Press, 2001. 21 - 34.  
 [8] De Medici D, Croci L, Delibato E, et al Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real - time PCR to detect Salmonella enterica serotype enteritidis in poultry [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(6): 3456 - 3461.