

甲氨蝶呤对脂多糖诱导的大鼠脊髓神经胶质细胞 pIκBα-NF-κBp65-炎症因子通路的影响

刘勇锋^{1a}, 李咪咪^{1a*}, 刘芳^{1b}, 邹奇锋²(1.福建医科大学附属第一医院, a.药学部, b.高压氧科, 福州 350005; 2.莆田市第一医院药剂科, 福建 莆田 351100)

摘要: 目的 观察甲氨蝶呤对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的大鼠脊髓神经胶质细胞 pIκBα-NF-κBp65-炎症因子通路的影响。方法 脊髓组织块法培养神经胶质细胞。将分离的神经胶质细胞接种于多孔板培养 48 h 后, 分为空白对照组、LPS 组、LPS+pIκBα 抑制剂组、LPS+甲氨蝶呤组。随后应用免疫印迹法测定各组分的 pIκBα 与胞核及胞浆 NF-κBp65 水平变化, 酶免疫法(ELISA)测定炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量。结果 神经胶质细胞经 LPS 诱导后, pIκBα、胞核 NF-κBp65 和细胞上清液炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平均显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。甲氨蝶呤可明显抑制经 LPS 诱导的神经胶质细胞 pIκBα 水平, 显著降低胞核 NF-κBp65 水平和细胞上清液炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的含量($P<0.05$)。结论 甲氨蝶呤对 LPS 诱导的脊髓神经胶质细胞 pIκBα-NF-κBp65-炎症因子通路有显著的抑制作用。

关键词: 甲氨蝶呤; 脂多糖; 神经胶质细胞; pIκBα; NF-κBp65; 炎症因子

中图分类号: R322.81; R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)02-0186-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.02.008

Effect of Methotrexate on the Pathway of LPS-induced pIκBα-NF-κBp65-Inflammatory Cytokine in the Rat Spinal Cord Glial Cells

LIU Yongfeng^{1a}, LI Mimi^{1a*}, LIU Fang^{1b}, ZOU Qifeng²(1.The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, a. The Department of Pharmacy, b.The Department of Hyperbaric Oxygen, Fuzhou 350005, China; 2.The Department of Pharmacy, The First Hospital of Putian City, Putian 351100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of methotrexate on the pathway of lipopolysaccharide(LPS)-induced pIκBα-NF-κBp65-inflammatory cytokine in glial cells of the rat spinal cord. **METHODS** The glial cells were obtained from the spinal cord tissue nubbles, then were inoculated into multi-well plate and cultured for 48 h. Cells were divided into 4 groups: control group, LPS group, LPS+pIκBα inhibitor group and LPS+methotrexate group. The expression of pIκBα, NF-κBp65 in each groups were detected by Western blot, and the concentrations of inflammatory factors(including TNF-α, IL-1β, IL-6) were measured by ELISA. **RESULTS** The LPS group showed significantly higher expressions of pIκBα, NF-κBp65 protein in the nucleus and the concentrations of inflammatory factors(including TNF-α, IL-1β, IL-6) compared to the normal control group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with LPS group, the expressions of pIκBα, NF-κBp65 protein and concentration of TNF-α, IL-1β, IL-6 were significantly decreased in LPS plus methotrexate group and pIκBα inhibitor group($P<0.05$). **CONCLUSION** Methotrexate can markedly inhibit the pathway of LPS-induced pIκBα-NF-κBp65-inflammatory cytokines in glial cells.

KEY WORDS: methotrexate; lipopolysaccharide; glial cells; pIκBα; NF-κBp65; inflammatory cytokine

急性脊髓损伤是高致残率疾病, 近年来的研究表明急性脊髓损伤促发的局部炎症反应是导致继发性损伤的重要机制^[1]。甲氨蝶呤作为治疗类风湿性关节炎的一线处方药, 广泛应用于其他炎症性疾病的治疗, 国内外学者研究表明, 低剂量甲氨蝶呤可以抑制急性脊髓损伤大鼠神经细胞凋亡, 为临床急性脊髓损伤治疗提供新思路^[2-3]。本课题组前期研究发现, 在急性脊髓损伤大鼠中应用甲氨蝶呤, 可以显著降低炎症因子含量, 明显减轻

急性脊髓损伤后大鼠损伤脊髓组织炎症反应, 其神经保护作用与此密切相关。本实验通过体外细胞培养实验探讨甲氨蝶呤调控急性炎症反应的靶点, 进一步明确甲氨蝶呤对急性脊髓损伤后炎症反应通路作用的分子机制, 为甲氨蝶呤用于临床急性脊髓损伤治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 Sprague-Dawley 大鼠, ♂, 体质量

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2016J01526)

作者简介: 刘勇锋, 男, 主管药师 Tel: 13763819990
(0591)87981630 E-mail: limimi1979@139.com

E-mail: lyfxbl@163.com

*通信作者: 李咪咪, 女, 主管药师 Tel:

145 g, 由福建医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂

注射用甲氨喋呤(广东岭南制药有限公司, 批号: 271021-2, 规格: 每支 5 mg); 大鼠白介素 IL-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF- α) ELISA 检测试剂盒(美国 R & D, 批号: A6071377、A6071384、A6071379), 兔抗鼠 Vimentin 单克隆抗体、兔抗鼠 β -actin 单克隆抗体(美国 Santa Cruz); 辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG(二抗, 北京中杉公司); FITC 标记的羊抗兔二抗(美国 Santa Cruz); 脂多糖(LPS, 美国 Sigma); Western-blotting 蛋白印迹化学发光试剂(美国 Santa Cruz); PVDF 膜(millipore 公司); 抗 pIkB α 、NF- κ Bp65(英国 Signal cell); pIkB α 抑制剂 R0106(美国 Sigma); 抗 β -actin(美国 Santa Cruz); M199 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(美国 Life); RIPA Buffer 蛋白裂解液(美国 Sigma); Bicinchoninic acid(BCA)蛋白定量试剂盒(天根生化科技有限公司, 批号: PA115); SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术研究所); 其他常用试剂均为分析纯。

1.3 仪器

TGL-16B 型号台式高速离心机(北京六一仪器厂); 4 $^{\circ}$ C 低温冰箱(海尔公司); -70 $^{\circ}$ C 超低温冰箱(Thermo 公司); PYX-YDH 电热恒温鼓风干燥箱(北京六一仪器厂); DK-8D 型电热恒温水槽(上海华连医疗器械公司); DYY-III-6B 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂); Mini-PROTEAN Tetra MP4 型蛋白垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司); DYCP-40C 型半干式碳板转印仪槽(北京六一仪器厂); 680 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad)。

1.4 细胞培养

取 SD 大鼠(体质量 145 g), 脱臼处死, 于 75% 酒精浸泡 5 min, 取腰段脊髓组织, 将组织剪成约 1 mm² 小块。用 200 目不锈钢筛网过滤, 加入 10%FCS M199 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 2~3 d 即可见到扁平星状的脊髓胶质细胞生长。更换新的培养基, 待细胞铺满瓶底 2/3 时用 0.25%胰酶消化传代, 选择生长良好的 3~6 代细胞进行实验。

1.5 细胞鉴定

将培养细胞接种于 24 孔板, 细胞生长至 50% 汇合时弃 0.2% FCS 培养基 24 h, 每孔加 2 mL 10% 福尔马林, 室温 30 min 后弃福尔马林, 加预冷 PBS

漂洗 3 次(每次 5 min), 0.1%Trion-100 孵育 10 min; PBS 漂洗 3 次(每次 5 min), 加一抗(抗 Vimentin 抗体 1 : 50)4 $^{\circ}$ C 过夜 PBS 漂洗 3 次(每次 5 min), 加 FITC 标记的二抗(1 : 500), 25 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; PBS 漂洗 3 次(每次 5 min), 荧光显微镜(波长 480 nm) 下观察阳性表达, 阳性细胞表达 >90% 用于实验。

1.6 MTT 法测定脊髓胶质细胞存活率

取对数生长期的脊髓胶质细胞以适宜的浓度接种于 96 孔板中, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养细胞至生长密度为 80%~90% 时, 弃去培养液, 然后加入含甲氨喋呤浓度为 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 的细胞培养液, 作用 45 min 后于 10⁻⁷ mol·L⁻¹ 管中加入浓度为 100 ng·mL⁻¹ 的 LPS 进行刺激, 同时设立对照组。继续培养 60 min 后, 每孔加入 10 μ L MTT 溶液, 培养 4 h 后, 弃去上清液, 每孔加入 100 μ L DMSO, 振荡 10 min, 充分溶解结晶物, 用酶标仪于 492 nm 波长下测定吸光值, 计算相对细胞存活率。

1.7 分组及给药

将对数生长期的脊髓神经胶质细胞分别按每孔 6 \times 10⁶ 个培养接种 6 孔板, 并随机分为空白对照组、LPS 组、LPS+pIkB α 抑制剂组、LPS+甲氨喋呤组。按设定待细胞生长至 60%~70% 汇合时, 更换 0.2% FCS 培养基培养 24 h 后, 加入 LPS (100 ng·mL⁻¹) 继续培养, 分别在 0, 15, 30, 60, 120 min 行细胞蛋白攫取检测 pIkB α 与胞核及胞浆 NF- κ Bp65 水平变化; 另待细胞生长至 60%~70% 汇合时, 更换 0.2% FCS 培养基培养 24 h 后, 加入甲氨喋呤(10⁻⁷ mol·L⁻¹), pIkB α 抑制剂 R0106 (10⁻⁶ mol·L⁻¹) 45 min 后, 加入 LPS(100 ng·mL⁻¹) 继续培养 60 min, 备用。

1.8 细胞总蛋白抽提

待抽提蛋白细胞弃培养基, 加入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中取出的 TBS 2 mL 漂洗 1 次; 弃 TBS, 将 6 孔培养板于干净滤纸上轻拍 2~3 次后置于冰板上; 每孔迅速加入预冷解缓冲液 200 μ L, 用细胞刷来回刮动; 5~10 min 后将裂解液移至 1.5 mL 的 EP 管, 15 s 超声破碎制备蛋白悬液, 放置冰浴中继续裂解 30 min; 于 4 $^{\circ}$ C 12 000 \times g 离心 10 min, 取上清; 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行样本的蛋白浓度测定; SDS 上样缓冲液与蛋白按 1 : 4 的比例混合, 沸水煮 10 min, 冰上冷却, 分装, 置入 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.9 细胞核蛋白与胞浆蛋白的提取

接种细胞于 6 cm 培养皿中, 每个培养皿细胞数为 3.0×10^5 , 待细胞生长至 60%~70% 汇合时更换 0.2% FCS 培养基 3 mL 孵育 24 h; 加入不同干预剂, 干预完成后, 弃培养基, 每个培养皿加预冷 PBS 3 mL, 漂洗 3 次; 加 0.5 mL 0.25% 胰酶 2~3 min 后, 加入 5 mL M199 培养基, 冲洗 2~3 次。将细胞悬浮液移至 10 mL 离心管中, 4°C $300 \times g$ 离心 5 min, 弃上清液; 加 200 μL A 液(低渗液)重悬细胞, 4°C 保存 10 min; 4°C 下 $12\,000 \times g$ 离心 10 min, 将上清移至另一 EP 管中; 加 50 μL $1 \times$ SDS 裂解液(200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 10% 甘油, 2% SDS, $1 \times$ PMSF, $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Aprotin, $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Leptin)重悬沉淀, 超声仪震荡 5 min, $12\,000 \times g$ 离心 5 min, 取上清, 即为细胞核蛋白; 另一 EP 管中加入等体积 $2 \times$ SDS 裂解液(400 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 20% 甘油, 4% SDS, $2 \times$ PMSF, $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Aprotin, $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Leptin), 超声仪震荡 5 min, $12\,000 \times g$ 离心 5 min, 取上清, 即为细胞胞浆蛋白。测定浓度后, 与 $4 \times$ SDS 样品缓冲液混匀, 沸水煮 5 min 变性, 冰上冷却, 分装, 置 -70°C 冰箱保存。

1.10 Western blot 蛋白测定

免疫印迹法(Western blot)检测 pIkBa、NF- κ Bp65 水平。取出提取的胞核和胞浆样品, 行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 半干式转膜 1 h, 将 PVDF 膜置于含 3% 脱脂奶粉的 TBST 中, 室温 30 min, 加 pIkBa、NF- κ Bp65 抗体(1:500)、 β -actin (1:1000) 4°C 孵育过夜, 用 TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加辣根过氧化物酶标记的二抗(山羊抗兔 IgG 1:5000) 37°C 摇 1 h, 用 TBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加 ECL、暗室曝光、显影、定影、扫描, White/Ultraviolet Transilluminator 凝胶成像分析系统分析。蛋白表达水平以目标蛋白与内参 β -actin 光密度比值表示。

1.11 ELISA 法测定

ELISA 测定肿瘤坏死因子(TNF- α)、IL-1 β 、IL-6 含量。用 PBS 将细胞清洗, 然后用裂解液裂解, 使用蛋白定量试剂盒作蛋白定量, 依照酶联免疫吸附测定法, 按照抗原包被、加入样品、加入酶标抗体、加入底物显色、最后终止反应等步骤, 在 450 nm 处测定 OD 值, 建立标准曲线, 计算出 IL-6、IL-10、TNF- α 的释放量。

1.12 数据处理及统计分析

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 统计学软件进行统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 2 组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测甲氨喋呤单独作用及其与 LPS 联合作用对脊髓神经胶质细胞存活率的影响

与空白对照组相比, 10^{-9} , 10^{-8} , $10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲氨喋呤单独作用及其与 LPS($100 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)联合作用时对脊髓神经胶质细胞存活率的影响无统计学差异, 当甲氨喋呤剂量增大到 $10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 甲氨喋呤明显影响脊髓神经胶质细胞的活性($P < 0.01$)。结果见图 1。

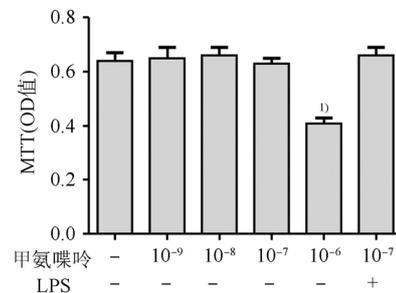


图 1 甲氨喋呤对脊髓神经胶质细胞存活率的影响与空白对照组相比, $^1P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effect of methotrexate on neuroglial cell viability Compared with blank group, $^1P < 0.01$.

2.2 LPS 对脊髓神经胶质细胞 pIkBa、NF- κ Bp65 水平的影响

LPS($100 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)能够呈时间依赖性诱导脊髓神经胶质细胞 pIkBa 及胞核 NF- κ Bp65 水平, 与空白对照组相比, pIkBa 在 30 min 时即能见到明显增加, 在 60 min 时达到峰点($P < 0.01$); 胞核 NF- κ Bp65 随时间推移水平显著增高, 60 min 时达到峰点($P < 0.01$); 胞浆 NF- κ Bp65 水平显著降低($P < 0.01$)。结果见图 2。

2.3 甲氨喋呤对 LPS 诱导脊髓神经胶质细胞 pIkBa 与胞核及胞浆 NF- κ Bp65 水平的影响

与空白对照组比较, LPS 处理脊髓神经胶质细胞 60 min 后, 细胞 pIkBa、胞核 NF- κ Bp65 水平显著增加, 胞浆 NF- κ Bp65 水平显著降低($P < 0.01$); 与 LPS 组比较, LPS+甲氨喋呤组脊髓神经胶质细胞核 NF- κ Bp65 水平显著降低($P < 0.05$), 而胞浆 NF- κ Bp65 水平显著升高($P < 0.05$), 与 pIkBa 抑制

剂组无统计学差异, 结果见图 3。

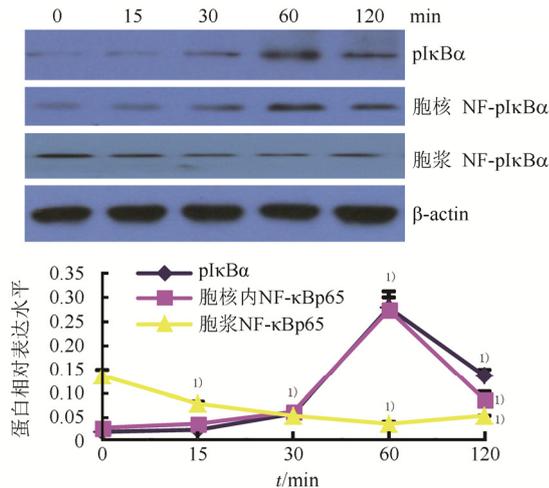


图 2 LPS 诱导脊髓神经胶质细胞 pIκBα 及 NF-κBp65 变化影响($n=6, \bar{x} \pm s$)
与空白对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effect of LPS on expressions of pIκBα, NF-κBp65 in neuroglial cell of spinal cord($n=6, \bar{x} \pm s$)
Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$ 。

2.4 甲氨喋呤对 LPS 诱导脊髓神经胶质细胞 TNFα、IL-1B 及 IL-6 水平的影响

与空白对照组比较, LPS 组脊髓神经胶质细胞上清液 TNF-α、IL-1β、IL-6 均显著增加($P<0.01$); 与 LPS 组比较, LPS+甲氨喋呤组脊髓神经胶质细胞上清液 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平均显著降低($P<0.05$); LPS+甲氨喋呤组与 LPS+pIκBα 抑制剂组比较差异具有统计学意义($P<0.05$), 结果见表 1。

表 1 甲氨喋呤对 LPS 诱导大鼠脊髓神经胶质细胞 TNFα、IL-1B 及 IL-6 水平影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of low-dose methotrexate on levels of TNF-α, IL-1β, IL-6 in neuroglial cell of spinal cord($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
空白对照组	9.81±1.23	10.25±1.18	12.01±1.72
LPS 组	85.28±15.05 ¹⁾	65.08±9.22 ¹⁾	60.35±10.48 ¹⁾
LPS+甲氨喋呤组	50.16±8.08 ¹⁾²⁾	32.73±5.06 ¹⁾²⁾	27.55±3.25 ¹⁾²⁾
LPS+pIκBα 抑制剂组	20.55±3.35 ¹⁾²⁾³⁾	21.17±3.25 ¹⁾²⁾³⁾	20.08±3.04 ¹⁾²⁾³⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 LPS 组比较, ²⁾ $P<0.05$; 与 LPS+甲氨喋呤组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with LPS group, ²⁾ $P<0.05$; compared with LPS+methotrexate group, ³⁾ $P<0.05$ 。

3 讨论

脊髓神经胶质细胞是脊髓损伤后重要免疫细胞, 邹云等学者在研究中发现^[4], 大鼠脊髓损伤组织神经胶质细胞分泌大量炎症因子。有学者认为^[5-6], 炎症细胞识别 LPS 并将炎症信号传入脊髓神经胶质细胞, 引起 NF-κB 激活, 进而释放多种炎症介质。NF-κBp65 与抑制蛋白 IκBα 结合成无活性的

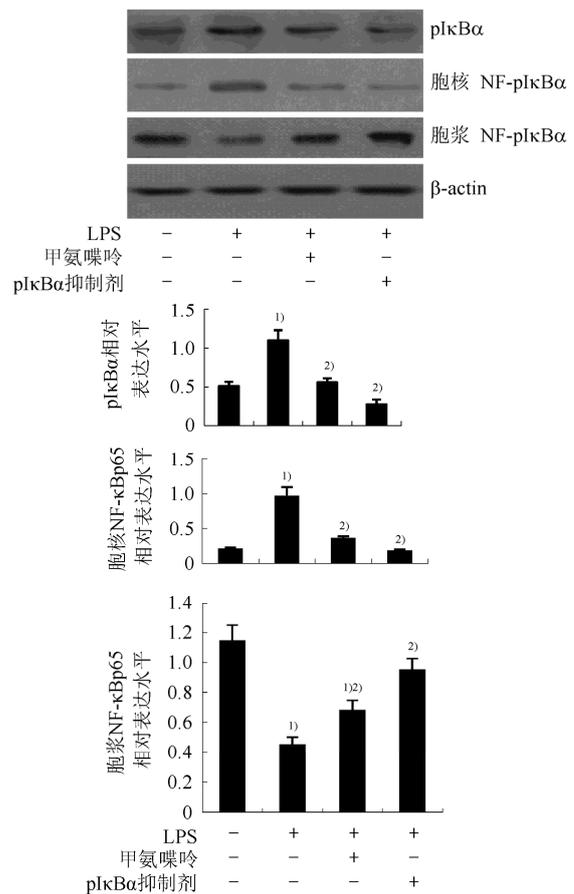


图 3 甲氨喋呤对 LPS 诱导脊髓神经胶质细胞 pIκBα 与胞核及胞浆 NF-κBp65 水平的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)
与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 LPS 组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of low-dose methotrexate on expressions of pIκBα, NF-κBp65 in neuroglial cell of spinal cord($n=6, \bar{x} \pm s$)
Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with LPS group, ²⁾ $P<0.05$ 。

复合物存在于胞质中, 当受到外源性激活剂(如 LPS)的刺激后, IκBα 快速和大量的磷酸化为 pIκBα, 复合物被水解, 核定位信号暴露, 导致胞浆内 NF-κBp65 快速移至胞核内发挥基因表达的调控作用, 增强 TNF-α、IL-1β、IL-6 等炎症因子的转录及其蛋白生成, pIκBα-NFκ-Bp65-炎症因子通路放大了炎症信号, 导致继发瀑布式的级联损

害^[7]。本研究利用 LPS 诱导体外培养的大鼠脊髓神经胶质细胞来构建动物脊髓损伤后炎症反应的模型,其结果提示 pI κ B α 显著升高, NF- κ Bp65 胞浆含量减少、入核增多,炎症因子含量增加。扈玉华^[8]学者也证实了在脊髓神经损伤中 NF- κ Bp65 的活化依赖 pI κ B α ,表明 pI κ B α 是调控炎症反应的重要靶点。

有研究表明,低剂量甲氨蝶呤可以调节循环中炎症细胞因子水平以及脂质过氧化表达产生影响^[9-10];近年来研究发现它的抗炎作用甚至可以与糖皮质激素类药物相媲美^[11]。本研究使用甲氨蝶呤预处理经 LPS 诱导的大鼠脊髓神经胶质细胞,实验结果显示,甲氨蝶呤可明显降低 pI κ B α 、胞核 NF- κ Bp65 蛋白表达水平及炎症因子含量,这表明甲氨蝶呤可直接抑制 LPS 诱导的细胞 pI κ B α ,阻止胞浆 NF- κ Bp65 入核参与下游基因的调控,减少下游炎症因子的表达,提示甲氨蝶呤通过 pI κ B α -NF- κ Bp65-炎症因子通路进行调控急性炎症反应。与使用 pI κ B α 抑制剂预处理组相比较,两者具有统计学差异,表明甲氨蝶呤对 pI κ B α -NF- κ Bp65-炎症因子通路的抑制还受到其他因子的调控。

综上所述,甲氨蝶呤具有抑制炎症因子的过度表达,从而减轻损伤神经元的生化反应、基因表达等级联反应的发生,这种机制对 LPS 诱导的体外培养大鼠脊髓神经胶质细胞起到保护作用。本研究结果增加了甲氨蝶呤对抗炎作用、减轻兴奋毒性作用的认识,拓宽了人们对甲氨蝶呤用于脊髓神经损伤保护作用机制的理解。

REFERENCES

- [1] 黄卫,李新志,卢国强,等.急性脊髓损伤的治疗现状和研究进展[J].中外医疗,2015,11(3):197-198.
- [2] BAKAR B, KÖSE E A, KUPANA AYVA S, et al. Effects of low-dose methotrexate in spinal cord injury in rats [J]. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, 2013, 19(4): 285-293.
- [3] KERTMEN H, GÜRER B, YILMAZ E R. The protective effect of low-dose methotrexate on ischemia-reperfusion injury of the rabbit spinal cord [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 714(1-3): 148-156.
- [4] ZOU Y, YU Z J, LIN J T. The significance of proliferation of glial cells induced by experimental Hemi-sectioned spinal cord injury [J]. J Guiyang Med Coll(贵阳医学院学报), 2015, 40(9): 905-909.
- [5] ROSSOL M, HEINE H, MEUSCH U, et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages [J]. Crit Rev Immunol, 2011, 31(5): 379-446.
- [6] KALYANARAMAN M, HEIDEMANN S M, SARNAIK A P. Macrophage inflammatory protein-2 predicts acute lung injury in endotoxemia [J]. J Investig Med, 1998, 46(6): 275-278.
- [7] CHEN Y Z, XU W H. Therapeutic significance of pre-inflammatory cytokines intervention in animal model with spinal cord injuries [J]. Med Recapit(医学综述), 2007, 13(17): 1301-1303.
- [8] HU Y H, SHI X F, LU S K. Expression of NF- κ B in spinal cord after acute spinal cord injury in rats [J]. J Hebei Med Univ(河北医科大学学报), 2003, 24(1): 1-3.
- [9] 刘晓凯,胡万英,黄健雄.小剂量甲氨蝶呤对急性冠脉综合症炎症反应影响的研究[J].浙江临床医学,2008,10(7):954-955.
- [10] ZHANG S, GU B, WANG S Y. Effects of methotrexate on acute phase of spinal cord contusion-induced lipid peroxidation in rats [J]. Acta Neuropharmacol(神经药理学报), 2014, 4(1): 11-16
- [11] KEITH M P, EDISON J D, GILLILAND W R. Progress toward personalized treatment of rheumatoid arthritis [J]. Clin Pharmacol Ther, 2012, 92(4): 440-442.

收稿日期: 2016-06-02