

## 凝血酶敏感蛋白-1对脓毒症肝损伤影响的实验研究

缪玉兰<sup>1)</sup>, 夏照帆<sup>2)</sup>, 王广庆<sup>2)</sup>, 付晋凤<sup>1)</sup>

(1) 昆明医学院第二附属医院烧伤科, 云南昆明 650101; 2) 第二军医大学长海医院烧伤科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的** 利用 RNA 干扰 (RNAi) 方法探讨凝血酶敏感蛋白-1 (TSP-1) 对脓毒症肝损伤的影响及机制. **方法** 选用雄性 Balb/c 小鼠随机分为 4 组 (n = 10): 假手术组 (sham)、CLP 对照组、阴性片段对照组、有效片段组. 利用流体尾静脉注射法予以 TSP-1 特异性的 siRNA 片段进行 RNAi, 下调肝脏 TSP-1 表达, 采用盲肠结扎穿刺 (CLP) 制作脓毒症模型, 检测血清转氨酶、血清 TNF- $\alpha$  含量, 观察肝细胞凋亡, 检测肝脏 JNK 蛋白表达变化. **结果** 与假手术组相比, CLP 组和阴性对照组转氨酶 ALT 和 AST 含量、TNF- $\alpha$  含量、凋亡细胞比例明显升高 ( $P < 0.05$ ), 磷酸化 JNK 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), 予以有效片段进行 RNAi 后, ALT 和 AST 含量、TNF- $\alpha$  含量、凋亡细胞比例明显降低 ( $P < 0.05$ ), 磷酸化 JNK 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ ). **结论** TSP-1 参与介导脓毒症肝损伤, 导致血清转氨酶及血清 TNF- $\alpha$  含量升高、肝细胞凋亡增加, 其机制与 JNK 通路的抑制有关.

**[关键词]** 凝血酶敏感蛋白-1; 脓毒症; 肝损伤; RNA 干扰; 细胞凋亡; JNK

**[中图分类号]** R575 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 04 - 0025 - 05

## Experimental Study on Impact of Thrombospondin-1 on Septic Liver Injury

MIAO Yu-lan<sup>1)</sup>, XIA Zhao-fan<sup>2)</sup>, WANG Guang-qing<sup>2)</sup>, FU Jin-feng<sup>1)</sup>

(1) Dept. of Burn, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101;  
2) Dept. of Burn, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the impact and mechanism of the thrombospondin-1 in septic liver injury by application of RNA interference. **Methods** Male Balb/c mice were randomly divided to four groups (n = 10 per group): sham, CLP control, siRNA negative fragment control, and siRNA effective fragment group. Through hydrodynamic tail vein injection, the fragments of siRNA specific for TSP-1 were delivered to make RNA interference and reduce TSP-1 protein expression. The model for sepsis was developed by cecal ligation and puncture (CLP). Serum aminotransferase and serum TNF- $\alpha$  contents were detected. Apoptosis of liver cell was observed. The change of liver c-Jun N-terminal kinase (JNK) was detected. **Results** In comparison with sham group, serum ALT, AST and TNF- $\alpha$  contents, apoptosis of liver cell were significantly increased as well as the expression of liver phospho-JNK was decreased in CLP and siRNA negative fragment groups. After RNAi all detections were inverse. **Conclusions** TSP-1 may induce septic liver injury. This results in increased serum aminotransferase, serum TNF- $\alpha$  contents and increased apoptosis of liver cell. The suppression of phospho-JNK is involved in the mechanism.

**[Key words]** Thrombospondin-1; Sepsis; Liver injury; RNA interference; Apoptosis; c-Jun N-terminal kinase

**[基金项目]** 云南省卫生科技计划基金资助项目 (2009NS086)

**[作者简介]** 缪玉兰 (1975~), 女, 云南弥勒县人, 医学博士, 主治医师, 主要从事烧伤脓毒症基础研究及烧伤临床工作.

**[通讯作者]** 夏照帆. E-mail: xiazhaoan@163.com

脓毒症及多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 是外科危重病救治难题, 并发的多器官损伤中肝脏常常受累, 肝脏具有代谢、免疫、解毒等功能, 在细胞能量代谢损害时肝脏损害发生最早、程度最重, 急性肝损伤可发生在脓毒症任何阶段, 肝功能不全为脓毒症发展为 MODS 的标志之一<sup>[1]</sup>. RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是由小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 启动同源靶 mRNA 降解, 引起序列特异性转录后基因沉默, 阻断目的基因活性, 不能翻译合成相应蛋白质<sup>[2]</sup>. RNAi 作为新型基因封闭技术, 用于关闭特异基因表达, 逐渐成为研究靶基因、靶蛋白的有力手段. 本课题前期研究发现脓毒症时肝脏凝血酶敏感蛋白-1 (thrombospondin-1, TSP-1) 发生规律性变化, 同时肝脏炎症加重、肝功能受损, TSP-1 可能参与脓毒症肝损伤的发生发展. 本实验拟应用 RNAi 下调肝脏 TSP-1 表达, 探讨后者在脓毒症肝损伤中的作用及机制.

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型

参照文献<sup>[3,4]</sup>利用流体尾静脉 (hydrodynamic tail vein, HTV) 注射法输入 siRNA 片段: 体重 18~22 g 的健康成年雄性 Balb/c 小鼠 (第二军医大学实验动物中心) 禁食 16 h, 将 40  $\mu$ g 的 siRNA (Qiagen 公司), 即阴性对照片段、有效片段, 分别溶于 PBS 1.5 mL, 经小鼠尾静脉 5~7 s 内推入, 假手术组和 CLP 对照组同法注射 PBS 1.5 mL. 之后参照文献<sup>[5]</sup>利用盲肠结扎穿刺 (cecal ligation and puncture, CLP) 制作脓毒症模型: 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔麻醉, 开腹并牵出盲肠, 于盲肠和升结肠交汇处结扎盲肠, 18 号针头贯穿盲肠 1 次, 挤压使盲肠内容物流出, 回纳盲肠并关腹, 背

部皮下注射生理盐水 1 mL 补液, 完成制模, 假手术组予开腹, 牵出盲肠不行结扎穿刺, 之后回纳并关腹.

### 1.2 分组及取材

随机分为 4 组 ( $n = 10$ ): 假手术组 (sham)、CLP 对照组、阴性对照组、有效片段组. 制模后 6 h 各组 5 只同前麻醉, 开胸经右心房抽静脉血约 0.7 mL, 开腹剪断腹腔血管放血致死, 取肝左叶于液氮冷冻下研磨成粉分装置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱待用. 血标本于室温自然凝血, 予以 2 500 r/min, 离心 5 min, 取上层血清置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱备检. 各组另 5 只制模后 12 h 同前麻醉, 剪开右心耳放血致死, 小号头皮针穿刺左心室, 予生理盐水灌注至右心耳流出液清亮, 肝脏变为浅黄甚至苍白色, 换用甲醛灌注 10 min, 灌毕取肝右叶用于检测凋亡.

### 1.3 肝功能检测

利用自动生化仪测定血清转氨酶 ALT 和 AST 含量.

### 1.4 血清 TNF- $\alpha$ 检测

采用 ELISA 法检测血清 TNF- $\alpha$  含量.

### 1.5 肝组织原位细胞凋亡检测

采用 TUNEL 法原位检测肝细胞凋亡.

### 1.6 肝组织 JNK 蛋白检测

采用 Western blot 检测. 肝粉末用全细胞裂解法提取总蛋白, BCA 法定量, 各组取 50  $\mu$ g 样品蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 按 5% 浓缩胶、10% 分离胶制胶, 上样电泳 (50 V, 约 30 min, 待蛋白浓缩成线, 换为 100 V, 约 100 min), 取分离胶进行全湿法电转移 (100 V, 电转 80 min), 转入硝酸纤维素膜 (Pall corporation 公司). 剪下目的条带放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温下封闭 2 h, 洗膜, 加入相应一抗  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 洗膜后与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (Pierce 公司) 和 ECL 显色液 (Pierce 公司) 反应, 显影、成像、扫描, 见表 1.

表 1 第一抗体反应条件

Tab. 1 The reaction condition of primary antibody

第一抗体名称	来源	特异性	稀释比例	厂家
phospho-JNK antibody	兔	多克隆抗体	1:1 000	Cell Signaling Technology 公司
JNK antibody	兔	多克隆抗体	1:1 000	Cell Signaling Technology 公司
$\beta$ -actin-HRP antibody	小鼠	单克隆抗体	1:25 000	Sigma 公司

### 1.7 统计学分析

结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示. 进行方差齐性检验, 采用单因素方差分析比较组间差异,

$P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

## 2.1 血清转氨酶及血清 TNF- $\alpha$ 测定结果

与假手术组相比, CLP 组和阴性对照组 ALT 含量、AST 含量、TNF- $\alpha$  含量均明显升高 ( $P <$

0.05), 予以有效片段进行 RNAi 后, 与 CLP 组和阴性对照组相比, 3 者均明显降低 ( $P <$  0.05), 见表 2。

表 2 RNAi 下调 TSP-1 对脓毒症时肝功能、血清 TNF- $\alpha$ 、肝细胞凋亡、JNK 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 The effect of TSP-1 downregulation by RNAi on the liver function, serum TNF- $\alpha$ , liver apoptosis and JNK protein expression in septic liver injury( $\bar{x} \pm s$ )

组别	血清ALT(U/L)	血清AST(U/L)	血清TNF- $\alpha$ (pg/mL)	凋亡细胞比例	JNK/ $\beta$ -actin	phospho-JNK/JNK
sham 组	30 $\pm$ 2.24	72 $\pm$ 2.12	121.1 $\pm$ 3.51	0.082 $\pm$ 0.002	1.006 $\pm$ 0.084	1.756 $\pm$ 0.085
CLP 组	140 $\pm$ 4.53 $^{\Delta}$	302 $\pm$ 3.54 $^{\Delta}$	514.5 $\pm$ 6.83 $^{\Delta}$	0.345 $\pm$ 0.014 $^{\Delta}$	1.024 $\pm$ 0.090 $^{\Delta}$	0.302 $\pm$ 0.045 $^{\Delta}$
阴性对照组	80 $\pm$ 2.55 $^{\Delta}$	392 $\pm$ 4.53 $^{\Delta}$	415.9 $\pm$ 5.81 $^{\Delta}$	0.314 $\pm$ 0.013 $^{\Delta}$	0.974 $\pm$ 0.074 $^{\Delta}$	0.198 $\pm$ 0.038 $^{\Delta}$
有效片段组	30 $\pm$ 1.41 $^*$	78 $\pm$ 2.55 $^*$	112.7 $\pm$ 3.54 $^*$	0.051 $\pm$ 0.003 $^*$	1.034 $\pm$ 0.060	1.748 $\pm$ 0.113 $^*$

与 CLP 组和阴性对照组比较,  $^*P <$  0.05; 与 sham 组比较,  $^{\Delta}P <$  0.05. 每组  $n = 10$ .

## 2.2 TUNEL 法检测肝细胞凋亡

普通光镜下凋亡细胞核呈蓝黑色, 单个分散在肝小叶中, 核固缩显现一个或多个染色体团块(图中箭头所示). 假手术组(见图 1)及有效片段组(见图 2)见少量散在凋亡细胞, 而 CLP 组(见图 3)及阴性对照组(见图 4)见大量凋亡细胞。

TUNEL 切片每高倍视野下盲法计数 100 个细胞, 计算其中凋亡细胞所占比例, 计数 5 个高倍视野, 求得该比例的平均值<sup>[6]</sup>. 与假手术组相比, CLP 组和阴性对照组凋亡细胞比例显著增高 ( $P <$  0.05), 予以有效片段进行 RNAi 后, 与 CLP 组和阴性对照组相比, 凋亡细胞比例明显降低 ( $P <$  0.05), 见表 2。

## 2.3 肝脏 JNK 蛋白表达

Western blot 检测各组 phospho-JNK、非磷酸化 JNK、内参照  $\beta$ -actin 表达条带(见图 5), 以蛋白条带的平均光密度值表示其含量. 以相应  $\beta$ -actin 为基准比较非磷酸化 JNK 蛋白相对表达, 发现各组间差异无统计学意义 ( $P >$  0.05); 再以非磷酸化 JNK 为基准比较 phospho-JNK 蛋白表达, 与假手术组相比, CLP 组和阴性对照组 phospho-JNK 表达明显降低 ( $P <$  0.05), 予以有效片段进行 RNAi 后, 与 CLP 组和阴性对照组相比, phospho-JNK 蛋白表达明显升高 ( $P <$  0.05), 见表 2。

## 3 讨论

### 3.1 HTV 注射法诱导动物肝脏 RNAi 的可行性

上世纪 90 年代晚期利用秀丽隐杆线虫研究显示 RNAi 是一种进化保守的基因沉默机制<sup>[7]</sup>, 从植物、蠕虫、酵母到人类均可发生. 其分子机制是: 长双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 被特

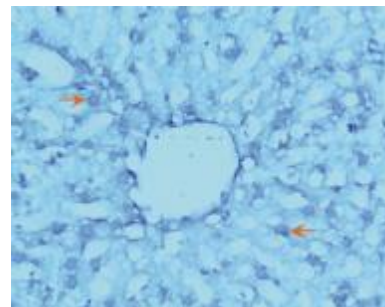


图 1 假手术组散在少量凋亡细胞 ( $\times 200$ )

Fig. 1 Few disperse apoptotic cells in sham group ( $\times 200$ )

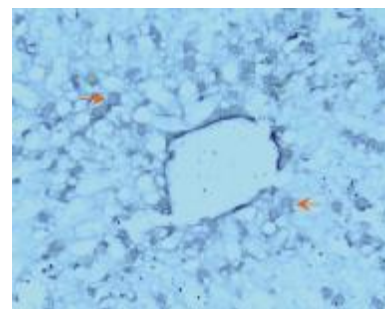


图 2 有效片段组少量凋亡细胞 ( $\times 200$ )

Fig. 2 Few disperse apoptotic cells in siRNA effective fragment group ( $\times 200$ )

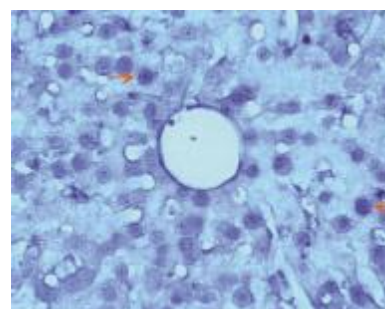


图 3 CLP 组大量凋亡细胞 ( $\times 200$ )

Fig. 3 Many apoptotic cells in CLP group ( $\times 200$ )

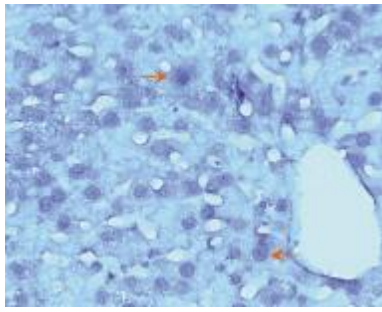


图 4 阴性对照组大量凋亡细胞 ( $\times 200$ )

Fig. 4 Many apoptotic cells in siRNA negative fragment control group ( $\times 200$ )

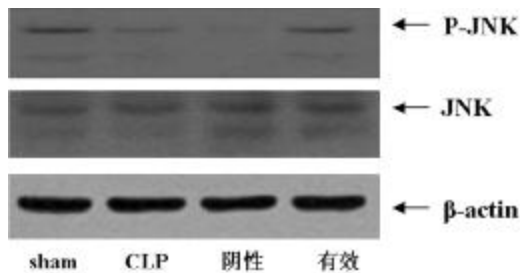


图 5 对照及 RNAi 组 phospho-JNK/JNK 蛋白印迹检测结果

Fig. 5 The Western blot results of phospho-JNK/ JNK in control and RNAi groups

异性内切酶 Dicer 识别并降解成 siRNA, Dicer 酶促进 siRNA 结合到核酶复合物形成 RNA 诱导沉默复合物, 依赖 ATP 释能可将 siRNA 解旋成单链而激活, siRNA 反义链通过碱基互补配对识别具有同源序列的靶 mRNA, 靶 mRNA 与 siRNA 正义链换位, 在距离 siRNA 3' 端 12 个碱基处特异性切割、降解同源靶 mRNA<sup>[8]</sup>, 引起序列特异性转录后基因沉默. 在较低等真核生物中利用 RNAi 研究特定基因功能的成功吸引研究者将其拓展用于哺乳动物, 过去 10 余 a 里 RNAi 广泛用于解释疾病中单个基因的功能, 也用于下调动物靶基因表达从而快捷、简便地产生转基因动物, 要强调的是基因表达是被敲减而非敲除. RNAi 既往成功用于研究肝脏诸多损伤和疾病, 比如炎症、病毒感染、癌症、缺血再灌注 (I/R) 损伤等, 据此可望用于探讨脓毒症肝损伤.

RNAi 在哺乳动物使用的主要瓶颈是如何将 siRNA 有效输送到靶细胞、组织、器官. 使用“高压的”或“流体的”注射技术输入裸的、未修饰的 siRNA 片段可引起哺乳动物靶基因表达下调, 该技术需将 siRNA 溶解于相对较大容量 (约为体重的 10%) 的生理缓冲液, 之后快速 (5~7 s 内) 向血管内注入<sup>[3,4]</sup>. 在啮齿动物中流体快速注射 siRNA

是最好的导入方法, 最主要的受体是肝脏, 40% 的肝细胞可以成功获得转基因输入并表达<sup>[9]</sup>, HTV 注射简单易行又高效, 成为进行肝脏 RNAi 的优先选择. Lewis<sup>[4]</sup>通过滴定法发现诱导肝脏 RNAi 的 siRNA 用量呈剂量依赖, 据此本实验选择 40  $\mu\text{g}$  的 siRNA 成功下调肝脏 TSP-1 表达. 遗憾的是这种大容量、高剂量 siRNA 直接注射法并不适用于临床.

### 3.2 TNF- $\alpha$ 作为重要的炎症介质参与诱导脓毒症发生

在感染中细菌致病成分诱导单核/巨噬细胞、淋巴细胞及中性粒细胞过度生成 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、ILs 和 NO 等炎症介质, 是引发脓毒症的关键因素. 尽管抗炎药物、新颖抗生素及重症支持技术长足发展, 但严重脓毒症和 MODS 的病死率仍高达 50% 以上<sup>[10]</sup>. TNF- $\alpha$  是比较明确的与多器官障碍乃至衰竭有关的细胞因子, 在脓毒症肝损伤中起重要作用, 活性明显增高<sup>[11]</sup>. 用 TNF- $\alpha$  特异性 siRNA 腹腔注射脓毒症小鼠, 能提高致命性脂多糖攻击后的小鼠存活率 6 倍<sup>[12]</sup>. 本实验通过 RNAi 下调脓毒症肝脏 TSP-1 表达, 同时检测到血清转氨酶及 TNF- $\alpha$  含量下降, 从一个侧面也说明 TSP-1 在脓毒症肝损伤中起促炎作用, 与 TNF- $\alpha$  协同造成肝损伤.

### 3.3 TSP-1 作为一种新奇的介质参与介导脓毒症肝细胞凋亡

上世纪 70 年代 Baenziger 从凝血酶刺激后的血小板中分离得到 TSP-1, 它是血小板  $\alpha$  颗粒的主要成分, 占血小板总蛋白量的 3%, 受到刺激后分泌至血液, 占血小板蛋白分泌量的 25%<sup>[13]</sup>, 不过 TSP-1 并非血小板特有, 作为第一个被发现的内源性多肽类血管新生抑制剂, 其抗血管新生功能明确, 在抗肿瘤治疗中有很好的前景. 正常条件下基础 TSP-1 的表达可忽略不计, 增高的 TSP-1 表达涉及多系统、多疾病、多病理状态<sup>[13]</sup>, 如中枢神经系统损伤、肾 I/R 损伤、心梗、高血压、类风湿性关节炎、癌症等, 近年其在创伤、炎症中的作用逐渐引起关注.

阻断细胞凋亡是脓毒症合理治疗策略的重要部分, TSP-1 可通过多途径介导细胞凋亡发生, 可将 TSP-1 设计作为联合治疗措施<sup>[14]</sup>. TSP-1 直接的凋亡活性在血管内皮重塑中尤为重要, 可以限制正常组织血管密度以及缩减肿瘤生长. TSP-1 在肾脏 I/R 损伤中表达增高, 且在体外诱导近端小管细胞凋亡, 都提示 TSP-1 不仅是损伤的标志而且还是损伤的介质, 在 TSP-1 敲除小鼠中显示出对 I/R 损伤中肾小管损害和肾功能衰竭的保护作用, 表明

TSP-1在肾I/R损伤中的高表达是有害的,其作用机制与诱导细胞凋亡有关<sup>[15]</sup>,值得深入研究.本实验予以RNAi下调肝脏TSP-1表达,发现肝细胞凋亡明显减少,提示脓毒症肝损伤中TSP-1参与介导肝细胞凋亡,导致肝脏炎症加重、肝功能障碍.

### 3.4 JNK通路是TSP-1介导脓毒症肝细胞凋亡的重要途径之一

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)是一组分布于胞浆中具有丝/苏氨酸双重磷酸化能力的蛋白激酶,可磷酸化其他细胞质蛋白,并从胞浆移位到胞核而调节转录因子的活性,是介导细胞外信号引起细胞核反应的重要信号转导系统,普遍存在于多种生物细胞内,该家族有4个主要成员,即ERK、JNK、p38、BMK1<sup>[16]</sup>.高度保守的MAPK是信号从细胞表面传导到胞核内部的重要传递者,被认为是细胞信息传递的交汇点和共同通路,参与介导细胞生长、发育、分裂、死亡等多种生理过程,在炎症、免疫调控、应激反应、肿瘤发生、I/R损伤等领域发挥重要作用.不同的MAPK分子结构相似,却中介不同的生物反应.

JNK通路参与许多病理过程,具有依赖不同信号而产生不同的信号翻译的能力<sup>[17]</sup>.JNK通路在细胞凋亡过程中起重要而复杂的作用,多数研究认为JNK通路是化疗药物、神经酰胺、紫外线照射及Fas蛋白等诱导细胞凋亡所必须的通路,但也有研究认为JNK活化并非凋亡的唯一机制,不仅如此,甚至一些研究认为JNK活化会对凋亡起到一定程度的保护作用,同一通路表现出相反效应<sup>[18]</sup>.本实验予以RNAi下调肝脏TSP-1表达,发现肝细胞凋亡明显减少,肝脏中磷酸化JNK通路活化,提示JNK通路的活化减少细胞凋亡、保护肝损伤.

总之在脓毒症、MODS的防治中,除了积极治疗原发病、加强内脏支持外,减少大量释放的炎症介质也很必要,通过RNAi减少TSP-1的表达从而拮抗炎症为防治脓毒症肝损伤提供了新思路.

### [参考文献]

[1] WANG P, CHAUDRY I H. Mechanism of hepatocellular dysfunction during hyperdynamic sepsis[J]. *Am J Physiol*, 1996, 270(6):927-933.

[2] PARRISH S, MELLO C, FIRE A, et al. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirements for the two trigger strands in RNA interference [J]. *Molec Cell*, 2000, 6: 1 077-1 087.

[3] MCCAFFREY A P, MEUSE L, PHAM T T, et al. RNA in-

terference in adult mice [J]. *Nature*, 2002, 418 (6 893): 38-39.

- [4] LEWIS D L, HAGSTROM J E, LOOMIS A G, et al. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice [J]. *Nat Genet*, 2002, 32(1): 107-108.
- [5] CHAUDRY I H, WICHTERMAN K A, BAUE A E. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels [J]. *Surgery*, 1979, 85(2): 205-211.
- [6] 姜泊. 细胞凋亡基础与临床[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999: 293.
- [7] REINHART B J, SLACK F J, BASSON M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403 (6 772): 901-906.
- [8] BERNSTEIN E, CAUDY A A, HAMMOND S M, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. *Nature*, 2001, 409(6 818): 363-366.
- [9] LEWIS D L, WOLFF J A. Delivery of siRNA and siRNA expression constructs to adult mammals by hydrodynamic intravascular injection [J]. *Methods Enzymol*, 2005, 392: 336-350.
- [10] RIEDEMANN N C, GUO R F, WARD P A. Novel strategies for the treatment of sepsis [J]. *Nat Med*, 2003, 9(5): 517-524.
- [11] KATAGIRI H, ITO Y, ITO S, et al. TNF- $\alpha$  induces thromboxane receptor signaling-dependent microcirculatory dysfunction in mouse liver [J]. *Shock*, 2008, 30 (4): 463-467.
- [12] SORENSEN D R, LEIRDAL M, SIOUD M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice [J]. *J Mol Biol*, 2003, 327(4): 761-766.
- [13] ESEMUEDE N, LEE T, PIERRE-PAUL D, et al. The role of thrombospondin-1 in human disease [J]. *J Surg Res*, 2004, 122(1): 135-142.
- [14] MIROCHNIK Y, KWIAATEK A, VOLPERT O V. Thrombospondin and apoptosis: molecular mechanisms and use for design of complementation treatments [J]. *Curr Drug Targets*, 2008, 9(10): 851-862.
- [15] THAKAR C V, ZAHEDI K, REVELO M P, et al. Identification of thrombospondin 1 (TSP-1) as a novel mediator of cell injury in kidney ischemia [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115 (12): 3 451-3 459.
- [16] JOHNSON G L, LAPADAT R. Mitogen-activated protein kinases pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases [J]. *Science*, 2002, 298(5 600): 1 911-1 912.
- [17] DAVIS R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [J]. *Cell*, 2000, 103(2): 239-252.
- [18] LIN A, DIBLING B. The true face of JNK activation in apoptosis [J]. *Aging Cell*, 2002, 1(2): 112-116.

(2012-02-20 收稿)