

# 抑制性寡脱氧核苷酸对小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞 T-bet、STAT4 及 STAT6 表达的影响

向 璞<sup>1,2</sup>, 范学工<sup>1</sup>, 李沙陵<sup>1</sup>, 李 宁<sup>1</sup>, 章保新<sup>1</sup>

(1 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008; 2 岳阳职业技术学院, 湖南 岳阳 414000)

**[摘 要]** **目的** 探讨体外实验中, 抑制性寡脱氧核苷酸(Sup ODN)对小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞转录因子 T 细胞表达的 T 盒(T-bet)、信号转导子和转录激动子(STAT) 4 及 STAT6 表达的影响。**方法** 分离小鼠脾脏淋巴细胞, 免疫磁珠阳选法纯化 CD4<sup>+</sup>T 细胞, 流式细胞仪分析分选纯度, 在抗-CD3 $\epsilon$  抗体、抗-CD28 抗体、白细胞介素(IL)-12 作用下, 加入 Sup ODN 或对照寡脱氧核苷酸(Con ODN)培养 72 h 后, 常规提取核蛋白。Western-blot 测定核蛋白中磷酸化的 STAT (pSTAT) 4、pSTAT6 和 T-bet 蛋白表达。**结果** 与 Con ODN 组和 PBS 组比较, Sup ODN 组中 T-bet 和 pSTAT4 的表达水平明显降低( $P < 0.05$ ), 而 pSTAT6 表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。**结论** Sup ODN 可能通过下调 pSTAT4 和 T-bet 的表达, 体外抑制小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞向 Th1 细胞的功能性分化, 上调 pSTAT6 的表达, 促进 Th2 细胞的分化。

**[关 键 词]** 抑制性寡脱氧核苷酸; CD4<sup>+</sup> 阳性 T 淋巴细胞; 辅助 T 细胞; T-bet; STAT4; STAT6

**[中图分类号]** R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)05-0331-06

## Effect of suppressive oligonucleotides on mice CD4<sup>+</sup>T cell transcription factor and its significance

XIANG Ying<sup>1,2</sup>, FAN Xue-gong<sup>1</sup>, LI Sha-ling<sup>1</sup>, LI Ning<sup>1</sup>, ZHANG Bao-xin<sup>1</sup> (1 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2 Yueyang vocational Technical College, Yueyang 414000, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the effect of suppressive oligodeoxynucleotides (Sup ODN) on expression of T-bet, pSTAT4 and pSTAT6 of CD4<sup>+</sup>T spleen lymphocytes in vitro. **Methods** The spleen lymphocytes of BALB/c mice were isolated and then CD4<sup>+</sup>T cells were purified with immunomagnetic microbeads (positive selection), the purification was analysed by flow cytometry. The co-culture of CD4<sup>+</sup> cells, anti-CD3 $\epsilon$ , anti-CD28, IL-12 and Sup ODN or control oligodeoxynucleotides (Con ODN) was performed for 72 hours, the nucleoprotein was extracted with regular procedure. Expression of pSTAT4 (phosphorylated STAT4), pSTAT6, and T-bet in nucleoprotein were detected by Western-blot. **Results** Compared with Con ODN and PBS treated group, expression of T-bet and pSTAT4 in Sup ODN treated group decreased significantly ( $P < 0.05$ ), while expression of pSTAT6 in Sup ODN treated group increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Sup ODN may inhibit Th1 differentiation of mice CD4<sup>+</sup>T cell by down-regulating expression of pSTAT4 and T-bet, and promote Th2 differentiation by up-regulating expression of pSTAT6.

**[Key words]** suppressive oligodeoxynucleotides (Sup ODN); CD4<sup>+</sup>T lymphocytes; T helper cell; T-bet; STAT4; STAT6

[Chin Infect Control, 2011, 10(5): 331-336]

抑制性寡脱氧核苷酸 (suppressive oligodeoxy- nucleotide, Sup ODN) 是一类富含多聚 G 结构的具

[收稿日期] 2011-07-12

[基金项目] 国家自然科学基金 (30671845) 教育部高校博士点基金新教师资助项目 (20070533009)

湖南省卫生厅科研基金资助项目 (B2005030) 中南大学大学生创新性实验计划项目 (071053365)

[作者简介] 向璞 (1982-), 女 (汉族), 湖南省平江县人, 医师, 主要从事感染与免疫疾病的研究。

[通讯作者] 范学工 E-mail: xgfan@hotmail.com

有广泛免疫抑制活性的核苷酸序列。研究表明,富含多聚 G 的 Sup ODN 能选择性地阻止 Th1 型细胞的激活与分化,并对白细胞介素(IL)-12、干扰素(IFN)- $\gamma$  等的分泌和一氧化氮的释放有抑制作用。

近来的研究认为,对影响 Th1、Th2 分化的细胞因子微环境可以在转录水平进行调控,包括染色体重排、组织特异性转录因子及靶基因的激活。Th1 和 Th2 的分化方向受其特异的基因序列调控,不同的细胞因子、抗原种类和浓度及协同刺激分子决定了不同调控序列的激活,这一过程严格地受特异的转录因子的调节。有多种转录因子参与 Th1/Th2 的分化以及 IL-4/IFN- $\gamma$  的表达,其中信号转导子和转录激动子(signal transducers and activators of transcription, STAT) 6 特异性表达于 Th2 细胞,促进幼稚 CD4+ T 细胞向 Th2 细胞分化并正调控 Th2 细胞因子的表达。T 细胞表达的 T 盒(T box expressed in T cells, T-bet)特异表达于 Th1 细胞,促进幼稚 CD4+ T 细胞向 Th1 细胞分化并正调控 IFN- $\gamma$  的表达<sup>[1]</sup>,二者的相互制衡对 T 细胞的分化及其细胞因子的分泌至关重要。STAT4 是 Th1 细胞分化过程中的关键因子,有证据<sup>[2]</sup>表明 STAT4 转录因子可能在胶原诱导的小鼠关节炎的发生和持续过程中发挥作用,这就使 STAT4 作为自身免疫性疾病治疗的靶点成为可能。

研究报道<sup>[3-4]</sup>,Sup ODN 显著抑制 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$  分泌,同时促进 Th2 型细胞因子 IL-4 分泌,本课题组也有类似结果<sup>[5]</sup>。但其作用机制尚不清楚,其抑制作用是否与调节 Th 淋巴细胞亚群有关,对转录因子 STAT6、STAT4 和 T-bet 有何作用,此部分实验将从基因的转录水平进一步探讨。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 正常雌性 6~8 周龄 BALB/c 小鼠(SPF 级,60 只,16~20 g/只),购自中南大学湘雅医学院实验动物中心。

1.1.2 试剂 RPMI 1640 培养基及胎牛血清(FBS)购自美国 GIBCO 公司;EZ-Sep<sup>TM</sup> 小鼠淋巴细胞分离液购自深圳达科为生物技术有限公司;免疫磁珠(抗小鼠 CD4,阳性分选)及配套 MS 分离柱、荧光素标记抗体(抗小鼠 CD4-FITC)均购自德国 Miltenyi Biotec 公司;抗小鼠 CD28、抗小鼠 CD3 $\epsilon$  购自美国 eBioscience 公司;重组鼠 IL-12 购自

PEPROTECH Asia 公司。Sup ODN 序列为 TTAGGG TTAGGG TTAGGG TTAGGG,对照 ODN 序列为 TTACCC TTACCC TTACCC TTACCC,均由上海 Invitrogen 生物工程公司合成。核蛋白提取试剂盒购自美国 Merck 公司;T 细胞表达的 T-bet 购自美国 Millipore 公司;兔抗鼠磷酸化 STAT (pSTAT) 4 抗体、兔抗鼠 pSTAT6 均购自美国 abcam 公司;山羊抗兔 IgG-HRP 第二抗体购自中国北京中杉生物有限公司,进口分装;其余为分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 CD4+ T 细胞制备 颈椎脱臼法处死 BALB/c 小鼠,取脾脏置于 200 目不锈钢标准筛上研磨,PBS 冲洗的细胞悬液再经 200 目不锈钢标准筛过滤,PBS 洗涤 2 次,按小鼠淋巴细胞分离液说明方法分离淋巴细胞。将分离后的小鼠脾脏淋巴细胞用免疫磁珠法阳性分选 CD4+ T 细胞,具体步骤按试剂盒说明进行。

1.2.2 流式细胞仪分析 以分选前不加荧光素标记抗体(抗小鼠 CD4-FITC)的小鼠脾脏淋巴细胞作阴性对照,各取分选前及分选后细胞若干加入荧光素标记抗体(抗小鼠 CD4-FITC)行流式细胞分析,具体步骤按试剂盒说明进行。

1.2.3 细胞培养和 ODN 作用 调整分选的 CD4+ T 细胞浓度为  $5 \times 10^5$  /mL~ $9 \times 10^5$  /mL,以 1 mL/孔加入 24 孔平底培养板,分别加入抗-CD3 $\epsilon$  抗体(0.1 mg/L)、抗-CD28 抗体(1 mg/L)、IL-12(300 ng/L)。在上述 CD4+ T 细胞培养体系中分别加入终浓度为 5  $\mu$ mol/L 的 Sup ODN 和 Con ODN(空白对照为培养体系中加入 PBS),加样后细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 孵育 72 h,收获培养上清与细胞。

1.2.4 蛋白质抽提及蛋白免疫印迹法(Western-blot)分析 采用 Merck 公司的核蛋白提取试剂盒,按其说明进行操作。考马斯亮蓝 G-250 法检测蛋白浓度后,以裂解液调节各样品蛋白浓度均一。以 10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,5%脱脂奶粉/TBST 室温封闭 60 min;一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST (Tween-20 500  $\mu$ L,10 $\times$ TBS 50 mL,ddH<sub>2</sub>O 450 mL)漂洗 3 次,每次 10 min;二抗室温孵育 120 min,TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。ECL 作用后胶片曝光,经显影、定影处理后观察结果。结果以凝胶成像仪器成像,SensiAnsys 凝胶图像分析系统拍照分析。

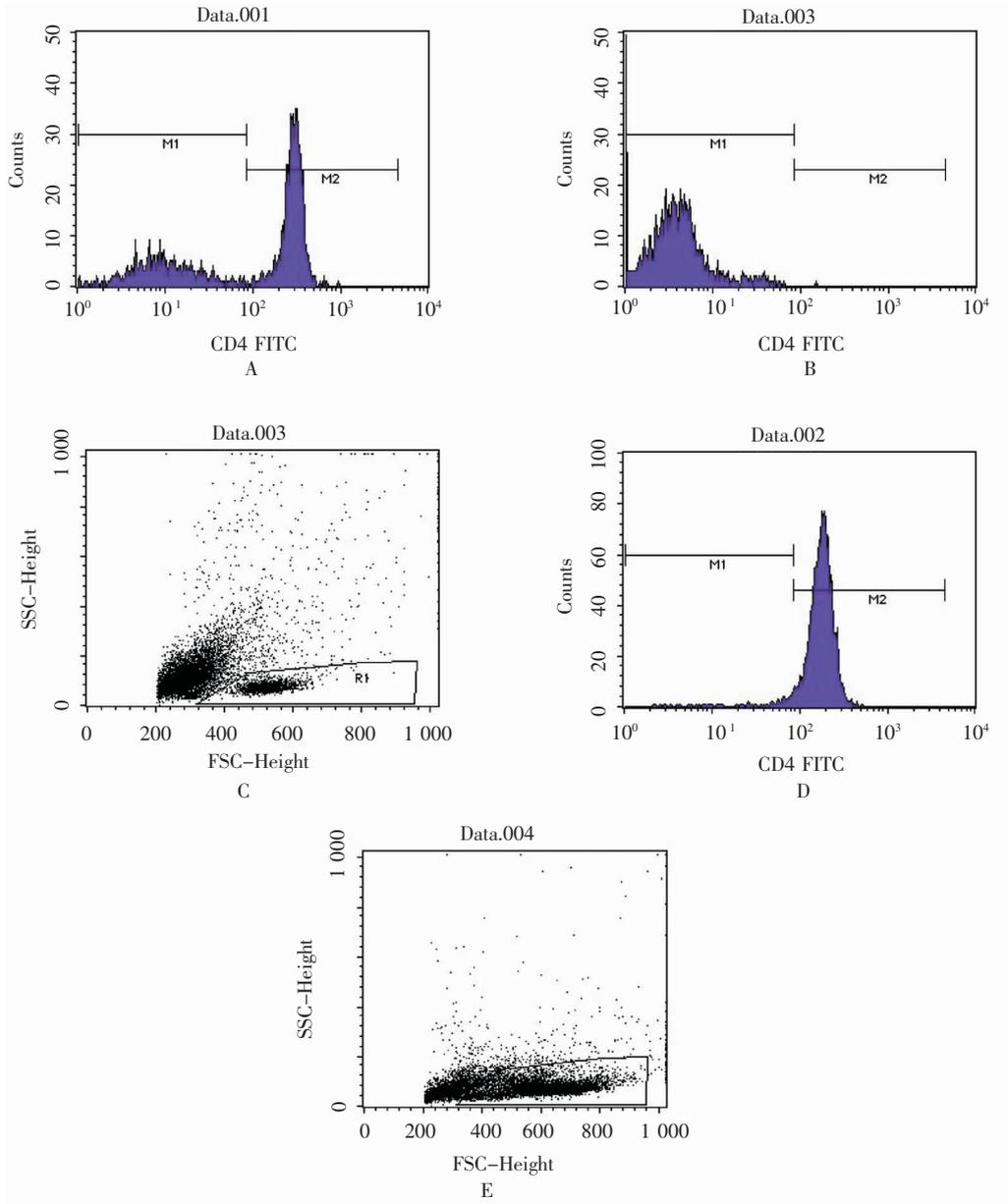
1.3 统计学处理 所有数据均应用 SPSS 13.0 软件统计。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差

分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 流式细胞仪检测 T 细胞纯度 结果显示, 以未加抗体 CD4-FITC 的分选前小鼠脾脏淋巴细胞为

阴性对照, 其 CD4 + T 细胞计数占计数细胞总数的 0.05%, 而加入抗体 CD4-FITC 的分选前小鼠脾脏淋巴细胞, 其 CD4 + T 细胞计数占计数细胞总数的 68.35%, 经磁珠分选后, CD4 + T 细胞的纯度则大幅升至分选后的 96.80%, 达到实验要求。见图 1。



A: Negative control (Pre-sorting mouse spleen lymphocytes without incubating with CD4-FITC); B: Pre-sorting CD4 + T cells incubating with CD4-FITC; C: Scatter figure of figure B; D: CD4 + T cell counts after sorting; E: Scatter figure of figure D

图 1 流式细胞仪分析免疫磁珠法阳性分选 CD4 + T 细胞

Figure 1 Flow cytometry analysis on immunomagnetic beads-based positive sorting for CD4 + T cells

2.2 各组小鼠 T 细胞中 T-bet、pSTAT4、pSTAT6 蛋白的表达 各组小鼠 T 细胞核蛋白 Western-blot 结果显示, 在蛋白质相对分子量为 58、85、94 和 36

kD 处有表达条带, 分别是 T-bet、pSTAT4、pSTAT6 和增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)。PCNA 作为内参, 它是在

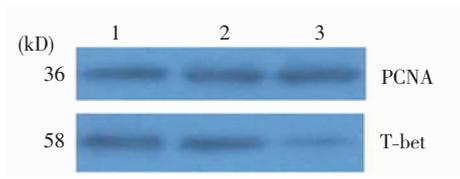
细胞周期 S 期广泛表达的一种核蛋白,仅在增殖细胞中合成与表达,是常用的核蛋白内参之一。方差分析结果表明,Sup ODN 组 T-bet 和 pSTAT4 较 Con ODN 组和 PBS 组表达降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); pSTAT6 表达增高,差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1~3 及图 2~5。

**表 1** 组间 T-bet 方差分析结果( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

**Table 1** Analysis of variance on T-bet between groups( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Groups	T-bet		
	Absorbance	F	P
Sup ODN	0.38 ± 0.11*		
Con ODN	0.54 ± 0.07	10.514	0.004
PBS	0.62 ± 0.03		

\* Compared with Con ODN group and PBS group respectively,  $P < 0.05$



1: PBS group; 2: Con ODN group; 3: Sup ODN group

**图 2** Western-blot 检测 T 细胞中 T-bet 蛋白表达

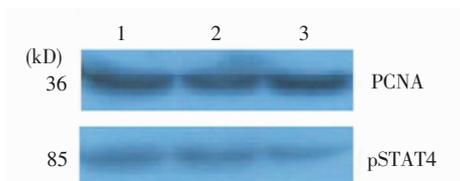
**Figure 2** The expression of T-bet in T cells detected by Western-blot

**表 2** 组间 pSTAT4 方差分析结果( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

**Table 2** Analysis of variance on pSTAT4 between groups ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Groups	pSTAT4		
	Absorbance	F	P
Sup ODN	0.29 ± 0.05*		
Con ODN	0.63 ± 0.03	10.364	0.005
PBS	0.53 ± 0.18		

\* Compared with Con ODN group and PBS group respectively,  $P < 0.05$



1: PBS group; 2: Con ODN group; 3: Sup ODN group

**图 3** Western-blot 检测 T 细胞中 pSTAT4 蛋白表达

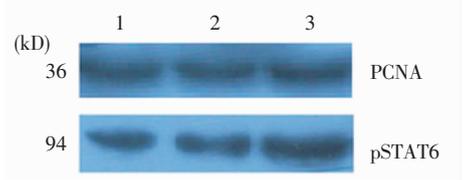
**Figure 3** The expression of pSTAT4 in T cells detected by Western-blot

**表 3** 组间 pSTAT6 方差分析结果( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

**Table 3** Analysis of variance on pSTAT6 between groups ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Groups	pSTAT6		
	Absorbance	F	P
Sup ODN	0.79 ± 0.12*		
Con ODN	0.48 ± 0.20	5.087	0.033
PBS	0.54 ± 0.07		

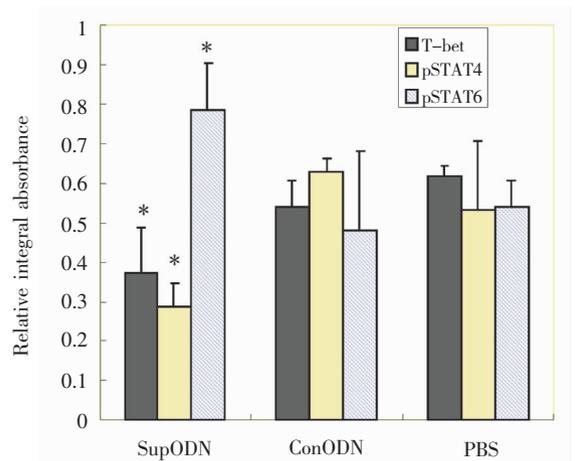
\* Compared with Con ODN group and PBS group respectively,  $P < 0.05$



1: PBS group; 2: Con ODN group; 3: Sup ODN group

**图 4** Western-blot 检测 T 细胞中 pSTAT6 蛋白表达

**Figure 4** The expression of pSTAT6 in T cells detected by Western-blot



\* Compared with Con ODN group and PBS group respectively,  $P < 0.05$

**图 5** Sup ODN、Con ODN 及 PBS 作用后 T-bet、pSTAT4 和 pSTAT6 在 T 细胞中含量的比较图

**Figure 5** The levels of T-bet, pSTAT4 and pSTAT6 in T cells treated with Sup ODN, Con ODN or PBS

### 3 讨论

CD4+ T 细胞激活以后,通过不同的分化途径获得特定的生物学功能。根据产生的细胞因子和生物学功能不同,传统上将 CD4+ T 细胞分为 Th1 和 Th2 细胞亚群。Th1 细胞产生 IFN- $\gamma$ 、IL-6 和 IL-12,介导细胞内病原微生物的清除和迟发型变态反应;Th2 细胞产生 IL-4、IL-5 和 IL-13,介导细胞外

病原微生物的清除并参与变态反应<sup>[6]</sup>。Th1 和 Th2 细胞为解释一些自身免疫性疾病提供了很好的模型。有研究<sup>[7]</sup>表明, Th1 细胞主要参与器官特异性自身免疫性疾病, 如多发性硬化和类风湿性关节炎等; 而 Th2 细胞在系统性红斑狼疮及过敏性疾病中占优势。

本课题组前期的研究发现, Sup ODN 显著抑制 IL-12 诱导的 CD4 + T 细胞向 Th1 细胞的分化, 具体表现为 IFN- $\gamma$  的分泌减少, 同时促进 Th2 型细胞因子 IL-4 的分泌, IL-4/IFN- $\gamma$  比值明显升高, 表现出 Th2 细胞因子占优势的免疫状态<sup>[5]</sup>。本实验发现, 与 Con ODN 组比较, 在 Th0 细胞分化过程中加入富含 TTAGGG 重复序列的 Sup ODN 可明显下调 T-bet 的表达。而 T-bet 对于 Th1 细胞的分化起决定作用<sup>[8]</sup>。另外, IFN- $\gamma$  的表达也直接受 T-bet 调控<sup>[9]</sup>。因此, T-bet 是反映 Th1 细胞释放细胞因子的良好标志<sup>[10-12]</sup>。IFN- $\gamma$  可诱导转录因子 T-bet 的表达, T-bet 可促进 IL-12 R $\beta$ 2 的产生, 使 CD4 + T 细胞产生更多的 IFN- $\gamma$ , 形成正反馈回路<sup>[13]</sup>。我们推测, Sup ODN 可能通过下调信号途径 T-bet, 从而抑制 Th1 细胞因子 IFN- $\gamma$  的分泌。我们的研究还发现 Sup ODN 可明显下调 pSTAT4 的表达。

我们推测, Sup ODN 可能通过下调信号途径 STAT4 的磷酸化, 从而抑制 Th1 细胞因子的分化。研究<sup>[14-16]</sup>表明, IFN- $\gamma$  除受 T-bet 调节影响外, 还受 STAT4 的影响。我们在实验中发现, 加入 Sup ODN 后, T 细胞 pSTAT4 及 T-bet 表达均下调, 这提示我们, Sup ODN 很可能是通过抑制 STAT4 的磷酸化阻断 IL-12 依赖的信号通路, 从而产生广泛的抑制 Th1 免疫反应的作用。

而 IL-12 R $\beta$ 2 的表达受 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的正负调节。如果 IL-4 出现,  $\beta$ 2 亚单位表达受阻, 剩下的  $\beta$ 1 亚单位不足以和 IL-12 结合而不能启动由 Jak2/Tyk2 和 STAT6 参与的通路转导激活信号, 而转为由 IL-4 借助相应的受体, 通过另一条由 Jak1 和 STAT6 等成分参与的通路转导激活信号, 结果引起 Th2 的分化。而我们的研究结果显示, Sup ODN 上调了 STAT6 的磷酸化, 强化了 IL-4、STAT6 信号通路, 从而促进了 Th2 细胞的分化。但此种效应除了 Sup ODN 的直接作用抑制了 Th1 型分化, 间接促进了向 Th2 的分化外, 是否还存在 Sup ODN 对 Th2 分化的直接促进作用, 有待进一步研究。

体内的 Th1 和 Th2 细胞互为抑制细胞, 两者分泌的细胞因子分别可以抑制对方的分化和功能。

Sup ODN 对 Th1 型细胞因子的抑制效应从某种程度上促进了 Th2 细胞的分化与成熟, 改变了体内 Th1/Th2 的构成比<sup>[4]</sup>。而 Th1 细胞主要参与器官特异性自身免疫性疾病, 故 Sup ODN 可用于治疗 Th1 免疫相关的疾病<sup>[14-15]</sup>。自身免疫性疾病的治疗尚缺乏理想的方法, 通常针对疾病的病理变化和组织损伤所致的后果进行治疗, 也可通过调节免疫应答的各个环节以阻断疾病过程来达到治疗的目的。但如果能从基因的转录水平进行干预, 不仅可以调节一大类细胞因子的表达, 还可利用生物信号传导的级联放大效应, 在相同的治疗强度下, 对下游细胞因子起到更有效的调节作用。Krig 等<sup>[16]</sup>进行的基因芯片研究表明, Sup ODN 抑制和干扰 STAT1 及 STAT4, 从而阻止炎症因子介导的相关信号级联反应。这些结果表明, 端粒序列的多聚态可能会在由过度旺盛的免疫反应引起的自身免疫性疾病的治疗中具有广泛的作用。

Sup ODN 的发现, 使我们有理由相信它会在自身免疫性疾病的治疗中发挥重要作用。Sup ODN 作为免疫抑制剂的优点可能包括以下 2 个方面。(1) 选择性强: 传统的免疫抑制剂往往能广泛地抑制机体的免疫功能, 这样虽能达到某些治疗目的, 但患者用药后, 感染和肿瘤的发生率也大为增加; Sup ODN 主要选择性抑制过强的 Th1 细胞免疫应答, 而对其他免疫细胞则影响不大, 因此这在一定程度上减少了感染和肿瘤的发生。(2) 安全性高: 据已有的文献报道<sup>[17-18]</sup>, 不论是 CpG-S ODN, 还是 Sup ODN, 其在动物体内均未引起明显的毒副作用。本研究为 Sup ODN 作为抑制剂临床治疗自身免疫性疾病和器官移植后排斥反应提供了理论和实验依据, 并为自身免疫性疾病的防治提供了新的思路。

#### [参 考 文 献]

- [1] Szabo S J, Kim S T, Costa G L, *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment[J]. *Cell*, 2000, 100 (6): 655 - 669.
- [2] Hildner K M, Schirmacher P, Atravea I, *et al.* Targeting of the transcription factor STAT4 by antisense phosphorothioate oligonucleotides suppresses collagen-induced arthritis[J]. *J Immunol*, 2007, 178(6): 3427 - 3436.
- [3] Shirota H, Gursel M, Klinman D M. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit Th1 differentiation by blocking IFN-gamma and IL-12-mediated signaling[J]. *J Immunol*, 2004, 173 (8): 5002 - 5007.
- [4] Klinman D M, Gursel I, Klaschik S, *et al.* Therapeutic potential

- of oligonucleotides expressing immunosuppressive TTAGGG motifs[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1058(1): 87-95.
- [5] 李沙陵, 戴霞红, 范学工, 等. 抑制性寡脱氧核苷酸对小鼠 CD4 + Th1 细胞功能性分化的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2008, 33(12): 1089-1094.
- [6] Murphy K M, Reiner S L. The lineage decisions of helper T cells[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(12): 933-944.
- [7] Ihn H, Yazawa N, Kubo M, *et al.* Circulating levels of soluble CD30 are increased in patients with localized scleroderma and correlated with serological and clinical features of the disease [J]. *J Rheumatol*, 2000, 27(3): 698-702.
- [8] Mullen A C, Hilgh F A, Hutchins A S, *et al.* Role of T-bet in commitment of Th1 cells before IL-12-dependent selection[J]. *Science*, 2001, 292(5523): 1907-1910.
- [9] Szabo S J, Kim S T, Costa G L, *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment[J]. *Cell*, 2000, 100(6): 655-669.
- [10] Kuzuhara H, Nishiyama S, Minowa N, *et al.* Protective effects of Soyasapogenol A on liver injury mediated by immune response in a concanavalin A-induced hepatitis model[J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 391(1-2): 175-181.
- [11] Wang J, Zhao Y, Xu Q. Astilbin prevents concanavalin A-induced liver injury by reducing TNF- $\alpha$  production and T lymphocytes adhesion[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56(4): 495-502.
- [12] Liu L L, Gong L K, Wang H, *et al.* Baicalin protects mouse from concanavalin A-induced liver injury through inhibition of cytokine production and hepatocyte apoptosis[J]. *Liver Int*, 2007, 27(4): 582-591.
- [13] Zhao Y, Liu J, Wang J, *et al.* Fumigaclavine C improves concanavalin A induced liver injury in mice mainly via inhibiting TNF- $\alpha$  production and lymphocyte adhesion to extracellular matrices[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56(6): 775-782.
- [14] Ohta S, Nakatnuta M, Fukushima M, *et al.* Beraprost sodium, a prostacyclin (PGI) analogue, ameliorates concanavalin A-induced liver injury in mice[J]. *Liver Int*, 2005, 25(5): 1061-1068.
- [15] Hentze H, Gantner F, Kolb S A, *et al.* Depletion of hepatic glutathione prevents death receptor-dependent apoptotic and necrotic liver injury in mice[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(6): 2045-2056.
- [16] Krig A M, Wu T, Weeratna R, *et al.* Sequence motifs in adoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs [J]. *PNAS*, 1998, 95(21): 12631-12636.
- [17] Klinman D M, Gursel I, Kliaschik S, *et al.* Therapeutic potential of oligonucleotides expressing immunosuppressive TTAGGG motifs[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1058(1): 87-95.
- [18] Shirota H, Gursel I, Gursel M, *et al.* Suppressive oligodeoxynucleotides protect mice from lethal endotoxic shock[J]. *J Immunol*, 2005, 174(8): 4579-4583.

(上接第 397 页)

## [参 考 文 献]

- [1] Laroussi M, Leipold F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure[J]. *Int J Mass Spectrom*, 2004, 233(4): 81-86.
- [2] 邢荣琦, 张博. 论等离子体消毒和灭菌[J]. *中国卫生监督与健康杂志*, 2003, 2(6): 110-112.
- [3] Laroussi M, Richardson J P, Dobbs F C. Effects of non-equilibrium atmospheric pressure plasma on the heterotrophic pathways of bacteria and on their cell morphology[J]. *Appl Phys Lett*, 2002, 81(2): 772-774.
- [4] 郭秀静, 王玉琼. 3 种常用低温灭菌方法研究现状[J]. *护理研究*, 2006, 20(6): 1425-1427.
- [5] 雷建龙. 过氧化氢低温等离子灭菌设备及其控制过程的设计[J]. *医疗卫生装备*, 2008, 29(1): 16-17.
- [6] Moisan M, Barbeau J, Moreau S, *et al.* Low-temperature sterilization using gas plasma: a review of the experiments and analysis of the inactivation mechanisms[J]. *Int J Pharmaceutics*, 2001, 226(1/2): 1-21.
- [7] 段莹. 过氧化氢等离子低温灭菌效果观察[J]. *中华医院感染学杂志*, 2006, 16(2): 184.
- [8] 李大忻. 两种低温灭菌方法在医院物品灭菌中的选择运用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2007, 17(9): 1112-1113.
- [9] 梁翠云. 过氧化氢等离子低温灭菌在消毒供应室的应用[J]. *中国医药导报*, 2007, 4(12): 117-118.
- [10] 丁晓玥, 梁毅. 国外汽化过氧化氢(VHP)低温灭菌系统的最新动态观察与探讨[J]. *机电信息*, 2010, 272(26): 45-47.
- [11] 高振邦, 刘川生, 王晓艳. 过氧化氢等离子体灭菌器对管腔类器械灭菌效果验证试验[J]. *中国消毒学杂志*, 2009, 26(3): 268-270.
- [12] 谢敏, 石丹岳. 过氧化氢等离子低温灭菌过程中所遇问题分析及改进[J]. *实用预防医学*, 2005, 12(6): 1402.
- [13] 王晓娅, 杨红兰, 徐氐, 等. 过氧化氢低温等离子灭菌程序中断环节的控制[J]. *中国消毒学杂志*, 2009, 26(1): 96-97.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 内镜清洗消毒技术操作规范[S]. 北京, 2004.
- [15] Mogul R, Bol'shakov A A, Chan S L, *et al.* Impact of low-temperature plasmas on *Deinococcus radiodurans* and biomolecules[J]. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(3): 776-783.
- [16] 陈卫平. 过氧化氢低温等离子体灭菌循环取消原因及其处理方法[J]. *中国消毒学杂志*, 2010, 27(2): 168-169.
- [17] 段莹, 何玮. 过氧化氢等离子低温灭菌效果观察[J]. *中华医院感染学杂志*, 2006, 16(2): 183.