

# 肝移植缺血再灌注后Kupffer细胞CD14的表达机制

彭 勇, 龚建平, 刘长安, 李生伟, 刘海忠, 李寿柏

彭勇, 龚建平, 刘长安, 李生伟, 刘海忠, 李寿柏, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 重庆市 400010  
彭勇, 男, 1969-07-25 生, 四川省眉山县人, 汉族, 博士, 副教授, 主要从事肝移植相关研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30300337; 30200278; 30170919  
项目负责人: 彭勇, 400010, 重庆市渝中区临江路 76 号, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科。 pengyong725@sina.com  
电话: 023-63784264 传真: 023-63829191  
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-02-24

## CD14 expression in Kupffer cells of ischemia-reperfusion injury after rat liver transplantation

Yong Peng, Jian-Ping Gong, Chang-An Liu, Sheng-Wei Li, Hai-Zhong Liu, Shou-Bai Li

Yong Peng, Jian-Ping Gong, Chang-An Liu, Sheng-Wei Li, Hai-Zhong Liu, Shou-Bai Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30300337; 30200278; 30170919  
Correspondence to: Dr. Yong Peng, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, 74 Linjiang Road, Chongqing 400010, China. pengyong725@sina.com  
Received: 2004-01-15 Accepted: 2004-02-24

## Abstract

**AIM:** To study the expression of lipopolysaccharide receptor CD14 mRNA and protein in Kupffer cells and its role in ischemia-reperfusion injury (IRI) in rat liver graft.

**METHODS:** The Kupffer cells were isolated and divided into control, ischemia-reperfusion (IR), and anti CD14 antibody groups. The CD14 mRNA, CD14 protein, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) activity, and TNF- $\alpha$  and IL-1 level in the culture supernatant were measured.

**RESULTS:** The CD14 mRNA, and protein in IR group were significantly higher than those in control group (mRNA  $1.28 \pm 0.12$  vs  $0.42 \pm 0.02$ , protein  $23.7 \pm 2.36$  vs  $6.3 \pm 1.27$ ,  $P < 0.01$ ). The NF- $\kappa$ B activity, TNF- $\alpha$  and IL-1 level in IR group were significantly higher than those in control group (NF- $\kappa$ B  $2.79 \pm 0.48$  vs  $0.27 \pm 0.01$ , TNF- $\alpha$   $205.9 \pm 12.04$  ng/L vs  $57.4 \pm 4.35$  ng/L, IL-1  $176.8 \pm 8.94$  ng/L vs  $37.6 \pm 3.47$  ng/L,  $P < 0.01$ ), and they greatly decreased after anti-CD14 antibody treatment compared with IR group (NF- $\kappa$ B  $1.34 \pm 0.24$  vs  $2.79 \pm 0.48$ , TNF- $\alpha$   $129.6 \pm 6.48$  ng/L vs  $205.9 \pm 12.04$  ng/L, IL-1  $103.4 \pm 5.74$  ng/L vs  $176.8 \pm 8.94$  ng/L,  $P < 0.05$ ), but still significantly higher than those in control group (NF- $\kappa$ B  $1.34 \pm 0.24$  vs  $0.27 \pm 0.01$ , TNF- $\alpha$   $129.6 \pm 6.48$  ng/L vs  $57.4 \pm 4.35$  ng/L, IL-1  $103.4 \pm 5.74$  ng/L vs  $37.6 \pm 3.47$  ng/L,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** LPS following IR can up-regulate the ex-

pression of CD14 mRNA and protein in Kupffer cells, and subsequently activate NF- $\kappa$ B to produce cytokines. But other signal transduction pathways might also participate in the NF- $\kappa$ B activation and IRI.

Peng Y, Gong JP, Liu CA, Li SW, Liu HZ, Li SB. CD14 expression in Kupffer cells of ischemia-reperfusion injury after rat liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(6):1333-1336

## 摘要

**目的:** 研究大鼠肝移植缺血再灌注后Kupffer细胞脂多糖受体CD14表达即其参与缺血再灌注损伤的机制。

**方法:** 分离培养大鼠 Kupffer 细胞, 分为正常对照组, 肝移植缺血再灌注组, 抗 CD14 抗体组, 检测 Kupffer 细胞 CD14mRNA、膜蛋白表达, 核转录因子  $\kappa$ B 活性、以及培养上清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 的分泌量。

**结果:** 再灌注后 Kupffer 细胞 CD14mRNA 和膜蛋白表达明显高于对照组(mRNA  $1.28 \pm 0.12$  vs  $0.42 \pm 0.02$ ; 膜蛋白  $23.7 \pm 2.36$  vs  $6.3 \pm 1.27$ ,  $P < 0.01$ ); 再灌注后核转录因子  $\kappa$ B 活性、培养上清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 表达量明显高于对照组 (NF- $\kappa$ B  $2.79 \pm 0.48$  vs  $0.27 \pm 0.01$ ; TNF- $\alpha$   $205.9 \pm 12.04$  ng/L vs  $57.4 \pm 4.35$  ng/L; IL-1  $176.8 \pm 8.94$  ng/L vs  $37.6 \pm 3.47$  ng/L,  $P < 0.01$ ); 用抗 CD14 抗体后 NF- $\kappa$ B 活性、TNF- $\alpha$ 、IL-1 表达量与再灌注相比明显下降(NF- $\kappa$ B  $1.34 \pm 0.24$  vs  $2.79 \pm 0.48$ ; TNF- $\alpha$   $129.6 \pm 6.48$  ng/L vs  $205.9 \pm 12.04$  ng/L; IL-1  $103.4 \pm 5.74$  ng/L vs  $176.8 \pm 8.94$  ng/L;  $P < 0.05$ ), 但仍然高于对照组(NF- $\kappa$ B  $1.34 \pm 0.24$  vs  $0.27 \pm 0.01$ ; TNF- $\alpha$   $129.6 \pm 6.48$  ng/L vs  $57.4 \pm 4.35$  ng/L; IL-1  $103.4 \pm 5.74$  ng/L vs  $37.6 \pm 3.47$  ng/L,  $P < 0.01$ )。

**结论:** 缺血再灌注时LPS能够上调Kupffer细胞CD14表达, 激活 NF- $\kappa$ B, 启动细胞因子的转录和分泌, 但尚存在除 CD14 以外的其他信号途径参与了 NF- $\kappa$ B 的激活和缺血再灌注损伤。

彭勇, 龚建平, 刘长安, 李生伟, 刘海忠, 李寿柏. 肝移植缺血再灌注后 Kupffer 细胞 CD14 的表达机制. *世界华人消化杂志* 2004;12(6):1333-1336  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1333.asp>

## 0 引言

脂多糖(LPS)受体CD14是存在于单核-巨噬细胞表面的一种膜蛋白, 主要功能是识别 LPS-LBP(脂多糖结合蛋白)复合物<sup>[1-3]</sup>. LPS-LBP 与 CD14 结合后, 促使单核-

巨噬细胞活化并释放多种前炎症因子, 在内毒素血症、酒精性肝病、肝硬化等疾病中扮演重要角色<sup>[4-8]</sup>. Kupffer 细胞作为肝脏内一种独特的单核 - 巨噬细胞是否也表达 CD14, CD14 是否参与肝移植缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI), 引起 IRI 的细胞因子是否由 CD14 信号传导通路产生, 这些问题到目前为止均未得到解决. 我们通过分离培养肝移植缺血再灌注(IR)后的 Kupffer 细胞, 观察 CD14mRNA 和蛋白的表达, CD14 胞内信号传导途径中 NF- $\kappa$ B 活性以及细胞因子的产生情况, 探讨其引起 IRI 的确切机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 实验分三组(每组 30 例), 对照组, 取正常大鼠 Kupffer 细胞为实验对象; 再灌注(IR)组, 取再灌注后 1 h Kupffer 细胞为研究对象; 抗 CD14 抗体组, 取再灌注后 1 h Kupffer 细胞, 并在培养液中加入 CD14 抗体 0.2 mL 共同培养 12 h. 健康  $\delta$  Wistar 大鼠, 质量 210-250 g (重庆医科大学实验动物中心提供). 参照 Peng et al<sup>[9]</sup> 的改进 Kamada 袖套法, 建立大鼠原位肝移植动物模型. 供体手术: 游离肝周韧带和血管, 切取供肝, 在水浴中完成门静脉、肝下下腔静脉袖套准备, 胆管内支架插管. 受体手术: 切除原肝, 原位植入供肝, 先完成肝上下腔静脉连续缝合, 门静脉袖套吻合, 结束无肝期, 以此时作为再灌注开始. 完成肝下下腔静脉袖套吻合和胆道重建. 再灌注后 1 h, 参照 Gong et al 介绍的胶原酶肝脏原位灌注法分离 Kupffer 细胞<sup>[3]</sup>. 经门静脉插管, 50 g/L IV 型胶原酶(Sigma)体外循环灌注消化肝脏, 不连续 Percoll (Pharmacia)密度梯度离心分离 Kupffer 细胞, 用含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液, 37  $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养 6 h 后, 洗去未贴壁细胞, 重悬贴壁细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  待用. 测其纯度大于 90%, 活力大于 95%.

## 1.2 方法

**1.2.1 Kupffer 细胞 CD14 mRNA 检测** 采用 Trizol 试剂盒(life Technologies)提取 Kupffer 细胞总 RNA, 取 0.5 mL RNA 产物, 用 RT-PCR 试剂盒(Roche)将其逆转录为互补 DNA(cDNA), -70  $^{\circ}$ C 保存待用. 以  $\beta$ -actin 作为内参对照进行 PCR 反应(表 1), CD14 以及  $\beta$ -actin 引物由上海生工合成. PCR 循环条件: 94  $^{\circ}$ C 1 min, 58  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延长 7 min. 用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物, EB 染色, 凝胶成像系统和图像分析系统观察并半定量计算 PCR 产物的相对表达量, 结果以 CD14/ $\beta$ -actin 的灰度比值表示.

**1.2.2 Kupffer 细胞 CD14 蛋白的检测** 采用 Western blot 检测 Kupffer 细胞 CD14 蛋白的表达. Kupffer 细胞蛋白提取物 50  $\mu$ g 用 100 g/L SDS-PAGE 进行电泳分离, 电泳后的蛋白质转移至硝酸纤维素膜 4  $^{\circ}$ C 过夜, 20 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h, 与抗 CD14 多克隆抗体(一抗, Santa Cruz)反应 2 h, PBST 洗涤 3 次去除封闭液和一抗, 与辣根过

氧化酶标记的二抗(生物晶美公司)反应 2 h, PBST 洗涤 3 次去除二抗. 最后加入增强化学发光剂自显影, 凝胶成像系统进行密度扫描, 图像分析软件分析蛋白区带, CD14 蛋白表达量用蛋白区带积分吸光度表示.

表 1 RT-PCR 检测 CD14 引物设计

	引物序列	长度(bp)
CD14	5' CTCAACCTAGAGCCGTTTCT 3'	267
	5' CAGGATTGTCAGACAGGTCT 3'	
$\beta$ -actin	5' ATCATGTTTGAGACCTTCAACA 3'	300
	5' CATCTCTTGCTCGAAGTCCA 3'	

**1.2.3 Kupffer 细胞 NF- $\kappa$ B 活性检测** 应用凝胶迁移变动分析(EMSA)检测 Kupffer 细胞 NF- $\kappa$ B 活性. 提取 KC 细胞核蛋白, NF- $\kappa$ B 寡核苷酸探针序列为 5' GCC TCC AAT GTT CGC GAA CTT TCG 3' (Santa Cruz 产品), <sup>32</sup>P 标记, 进行凝胶阻滞分析, 放射自显影, 测定每条电泳滞后的吸光度值, 所得结果表示 NF- $\kappa$ B 的相对活性.

**1.2.4 细胞培养上清液 TNF- $\alpha$  和 IL-1 检测** 采用 ELISA 检测试剂盒(Sigma)测定上清液 TNF- $\alpha$  和 IL-1 (操作步骤参见说明书).

统计学处理 实验数据以均数  $\pm$  标准差(mean $\pm$ SD)表示, 用 SPSS9.0 进行统计分析, 以  $P < 0.05$  为差别有显著性.

## 2 结果

**2.1 Kupffer 细胞 CD14 mRNA 表达** 对照组有微量 CD14 mRNA 表达, 再灌注后 CD14 mRNA 表达明显升高 (CD14/ $\beta$ -actin  $1.28 \pm 0.12$  vs  $0.42 \pm 0.02$ ,  $P < 0.01$ ).

**2.2 Kupffer 细胞 CD14 蛋白表达** 再灌注后 Kupffer 细胞 CD14 蛋白明显表达, 而对照组仅有微量的 CD14 蛋白表达 ( $23.7 \pm 2.36$  vs  $6.3 \pm 1.27$ ,  $P < 0.01$ , 图 1).

**2.3 Kupffer 细胞 NF- $\kappa$ B 活性改变** 再灌注后 NF- $\kappa$ B 活性明显高于对照组 ( $2.79 \pm 0.48$  vs  $0.27 \pm 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), 应用抗 CD14 抗体后, NF- $\kappa$ B 活性与 IR 相比显著降低 ( $1.34 \pm 0.24$  vs  $2.79 \pm 0.48$ ,  $P < 0.05$ ), 但仍然高于对照组 ( $1.34 \pm 0.24$  vs  $0.27 \pm 0.01$ ,  $P < 0.01$ , 图 2).

**2.4 TNF- $\alpha$  和 IL-1 表达量** IR 组和抗 CD14 治疗组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 均明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 但抗 CD14 治疗组又明显低于 IR 组 ( $P < 0.05$ , 图 3).

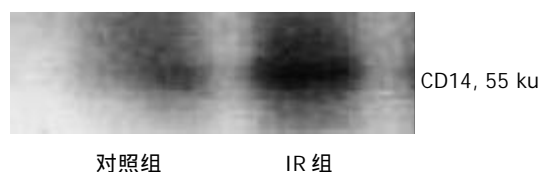


图 1 CD14 蛋白 Western blot 检测结果.

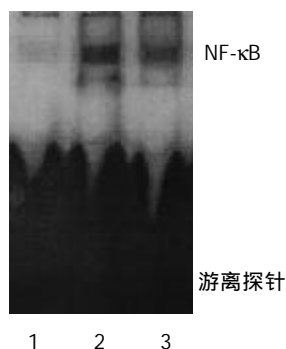


图2 NF- $\kappa$ B EMSA放射自显影图像. 1: 对照组; 2: IR组; 3: 抗CD14组.

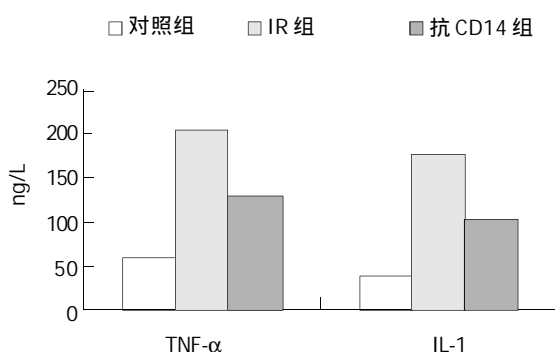


图3 Kupffer 细胞培养上清中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 分泌量.

### 3 讨论

CD14在介导内毒素引起的单核巨噬细胞活化过程中起启动作用<sup>[2, 10-12]</sup>, Kupffer 细胞是肝移植缺血再灌注损伤的主要参与者<sup>[13-16]</sup>, 因此研究 Kupffer 细胞上 CD14 的表达以及其后的胞内信号传导途径, 对于阐明肠道内毒素激活 Kupffer 细胞引起缺血再灌注损伤的机制意义重大<sup>[17-20]</sup>. 我们发现, 正常处于静息状态下的 Kupffer 细胞有少量的 CD14 表达, 这可能对于维持正常 Kupffer 细胞功能, 使之处于应激状态是必需的<sup>[15, 21-23]</sup>. 但再灌注后, 大量内毒素由门静脉入肝, 立即引起 CD14 mRNA 以及蛋白的表达大量增多, 启动 Kupffer 细胞的激活<sup>[24-27]</sup>.

缺血再灌注损伤的最终形式表现为大量有害细胞因子(如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等)对移植物的攻击和损伤<sup>[28-31]</sup>. Kupffer 细胞 CD14 表达增加是否与细胞因子分泌增多存在因果关系? 我们通过研究 CD14 以后的胞内信号传导途径, 特别是处于 CD14 与细胞因子之间的 NF- $\kappa$ B 的活性变化, 阐明了他们之间的联系. 再灌注后 NF- $\kappa$ B 活性明显高于对照, TNF- $\alpha$  等细胞因子的产生也较对照明显升高. 上述一系列连续的变化过程表明, LPS-CD14-NF- $\kappa$ B-细胞因子是存在于再灌注损伤中的一条重要信号传导途径, CD14 对其下游的 NF- $\kappa$ B 活化及细胞因子的产生存在必然关系. 但我们同时也发现, CD14 并非激活 NF- $\kappa$ B 惟一上游信号, 通过用抗 CD14 抗体阻断 CD14 功能后, 发现 NF- $\kappa$ B 活性以及细胞因子的产生有所降低, 但仍然高于正常, 证明除 CD14 途径外, 尚有其他信号途径可以激活 NF- $\kappa$ B.

总之, 我们的研究表明 Kupffer 有 CD14 基因以及膜蛋白的表达, 缺血再灌注后, CD14 表达增强, 内毒素通过与 CD14 的结合, 启动 Kupffer 细胞激活的信号传导, 信号通过多级酶联反应由胞外传到胞内, 激活 NF- $\kappa$ B, 启动 TNF- $\alpha$  等细胞因子的转录和分泌, 最终造成对移植物的攻击和损害. 但尚需进一步研究 CD14 至 NF- $\kappa$ B 之间的准确信号传导过程, 以及除 CD14 以外的其他激活 NF- $\kappa$ B 的信号途径, 才能完整阐明参与缺血再灌注损伤的整个信号传导通路.

致谢: 本研究是在重庆市肝胆外科重点实验室完成, 在此感谢!

### 4 参考文献

- Heumann D, Lauener R, Ryffel B. The dual role of LBP and CD14 in response to Gram-negative bacteria or Gram-negative compounds. *J Endotoxin Res* 2003;9:381-384
- Latz E, Visintin A, Lien E, Fitzgerald KA, Espevik T, Golenbock DT. The LPS receptor generates inflammatory signals from the cell surface. *J Endotoxin Res* 2003;9:375-380
- Lin M, Rikihisa Y. Ehrlichia chaffeensis downregulates surface Toll-like receptors 2/4, CD14 and transcription factors PU.1 and inhibits lipopolysaccharide activation of NF-kappa B, ERK 1/2 and p38 MAPK in host monocytes. *Cell Microbiol* 2004;6:175-186
- Gong JP, Wu CX, Liu CA, Li SW, Shi YJ, Yang K, Li Y, Li XH. Intestinal damage mediated by Kupffer cells in rats with endotoxemia. *World J Gastroenterol* 2002;8:923-927
- Olszyna DP, Verbon A, Pribble JP, Turner T, Axtelle T, van Deventer SJ, van der Poll T. Effect of IC14, an anti-CD14 antibody, on plasma and cell-associated chemokines during human endotoxemia. *Eur Cytokine Netw* 2003;14:158-162
- Takeda Y, Arai S, Mori A, Imamura M. High expression of the CD14 gene and interleukin-1beta gene in the liver and lungs of cirrhotic rats after partial hepatectomy. *J Surg Res* 2003;115:9-17
- Nagy LE. Recent insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:882-890
- Dai LL, Gong JP, Zuo GQ, Wu CX, Shi YJ, Li XH, Peng Y, Deng W, Li SW, Liu CA. Synthesis of endotoxin receptor CD14 protein in Kupffer cells and its role in alcohol-induced liver disease. *World J Gastroenterol* 2003;9:622-626
- Peng Y, Gong JP, Yan LN, Li SB, Li XH. Improved two-cuff technique for orthotopic liver transplantation in rat. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3:33-37
- Vives-Pi M, Somoza N, Fernandez-Alvarez J, Vargas F, Caro P, Alba A, Gomis R, Labeta MO, Pujol-Borrell R. Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin Exp Immunol* 2003;133:208-218
- Opal SM, Palardy JE, Parejo N, Jasman RL. Effect of anti-CD14 monoclonal antibody on clearance of Escherichia coli bacteremia and endotoxemia. *Crit Care Med* 2003;31:929-932
- Jiang JX, Chen YH, Xie GQ, Ji SH, Liu DW, Qiu J, Zhu PF, Wang ZG. Intrapulmonary expression of scavenger receptor and CD14 and their relation to local inflammatory responses to endotoxemia in mice. *World J Surg* 2003;27:1-9
- Vajdova K, Heinrich S, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning and intermittent clamping improve murine hepatic microcirculation and Kupffer cell function after ischemic injury. *Liver Transpl* 2004;10:520-528
- Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann Surg* 2004;239:220-231

- 15 Cavalieri B, Perrelli MG, Aragno M, Ramadori P, Poli G, Cutrin JC. Ischaemic preconditioning modulates the activity of Kupffer cells during in vivo reperfusion injury of rat liver. *Cell Biochem Funct* 2003;21:299-305
- 16 Giakoustidis DE, Iliadis S, Tsantilas D, Papageorgiou G, Kontos N, Kostopoulou E, Botsoglou NA, Gerasimidis T, Dimitriadou A. Blockade of Kupffer cells by gadolinium chloride reduces lipid peroxidation and protects liver from ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1587-1592
- 17 Tsoulfas G, Takahashi Y, Ganster RW, Yagnik G, Guo Z, Fung JJ, Murase N, Geller DA. Activation of the lipopolysaccharide signaling pathway in hepatic transplantation preservation injury. *Transplantation* 2002;74:7-13
- 18 Manigold T, Bocker U, Hanck C, Gundt J, Traber P, Antoni C, Rossol S. Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:275-282
- 19 Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003;37:1043-1055
- 20 Su GL, Goyert SM, Fan MH, Aminlari A, Gong KQ, Klein RD, Myc A, Alarcon WH, Steintraesser L, Remick DG, Wang SC. Activation of human and mouse Kupffer cells by lipopolysaccharide is mediated by CD14. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G640-645
- 21 Wheeler MD, Thurman RG. Up-regulation of CD14 in liver caused by acute ethanol involves oxidant-dependent AP-1 pathway. *J Biol Chem* 2003;278:8435-8441
- 22 Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G256-265
- 23 Enomoto N, Takei Y, Hirose M, Ikejima K, Miwa H, Kitamura T, Sato N. Thalidomide prevents alcoholic liver injury in rats through suppression of Kupffer cell sensitization and TNF-alpha production. *Gastroenterology* 2002;123:291-300
- 24 van Oosten M, van Amersfoort ES, van Berkel TJ, Kuiper J. Scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide and lipoteichoic acid to liver endothelial and Kupffer cells. *J Endotoxin Res* 2001;7:381-384
- 25 Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:379-414
- 26 Zipfel A, Schenk M, Metzendorf B, Bode C, Viebahn R. Release of TNF-alpha from lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Kupffer cells in serum- and nutrient-free medium. *Inflammation* 2001;25:287-92
- 27 Enomoto N, Schemmer P, Ikejima K, Takei Y, Sato N, Brenner DA, Thurman RG. Long-term alcohol exposure changes sensitivity of rat Kupffer cells to lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:1360-1367
- 28 Kozar RA, Schultz SG, Bick RJ, Poindexter BJ, DeSoignie R, Moore FA. Enteral glutamine but not alanine maintains small bowel barrier function after ischemia/reperfusion injury in rats. *Shock* 2004;21:433-437
- 29 Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock* 2004;21:401-409
- 30 Que X, Debonera F, Xie J, Furth EE, Aldeguer X, Gelman AE, Olthoff KM. Pattern of ischemia reperfusion injury in a mouse orthotopic liver transplant model. *J Surg Res* 2004;116:262-268
- 31 Takeuchi D, Yoshidome H, Kato A, Ito H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Morita Y, Miyazaki M. Interleukin 18 causes hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing anti-inflammatory cytokine expression in mice. *Hepatology* 2004;39:699-710

## World Journal of Gastroenterology 排版印刷

《World Journal of Gastroenterology, WJG》全文模板设计从书眉、栏目、题名、作者、作者单位、基金资助、通讯作者、E-mail、电话、传真、收稿日期、接受日期、摘要、文献著录格式、一级标题字体、二级标题字体、图、表、参考文献, 均制订了统一的字体及格式要求, 每篇文章结束后不再续接其他文章, 适用于摘要数据库、ASP、XML、PDF 格式的要求. WJG 使用的排版软件为国际流行的 PageMaker 软件, 可自动生成 ASP、XML、PDF, 为 WJG 进入电子版格式起到了重要的作用. WJG 出片为进口片, 黑白和彩色印刷用海德堡彩色印刷, 采用三面刀剪切. 北京科信印刷厂承担 WJG 印刷业务, 一条龙服务, 包括出片、打样、装订前书样, 全部送杂志社审核, 达到标准后才能印刷和装订. WJG 出版后, 赠送给国内外专家, 他们认为 WJG 封面、内文印刷和装订可与国际著名期刊相媲美.