

· 论 著 ·

LPS-TLR4 复合物内化障碍与 LPS 介导巨噬细胞活化的实验研究*

王艳艳¹, 郑江^{2△}

(1. 成都军区总医院检验科, 成都 610083; 2. 第三军医大学西南医院综合实验研究中心, 重庆 400038)

摘要:目的 建立内化障碍的小鼠 RAW264.7 细胞模型, 观察脂多糖(LPS)-Toll 样受体 4(TLR4)复合物内化障碍对巨噬细胞活化作用的影响。方法 应用内化抑制剂单丹磺酰尸胺(MDC), 构建内化障碍的小鼠 RAW264.7 细胞模型; 四甲基偶氮唑盐(MTT)检测 MDC 对巨噬细胞的毒性; 应用 LPS 刺激内化障碍巨噬细胞, 流式细胞仪、激光共聚焦显微镜检测 LPS-TLR4 复合物内化抑制情况; 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)蛋白的表达; 实时 PCR 法检测 TNF- α 及 IL-6 mRNA 的表达。结果 应用化学抑制剂 MDC, 在流式细胞仪和激光共聚焦显微镜下, 均观察到 RAW264.7 细胞中 LPS-TLR4 复合物的内化被显著抑制, 成功建立了内化障碍的模型 RAW264.7 细胞; 反映该细胞活化的指标 IL-6 在蛋白水平和核酸水平均受到明显抑制($P < 0.05$), 而 TNF- α 的表达在蛋白水平和核酸水平均无显著抑制。结论 LPS-TLR4 复合物内化与 LPS 介导巨噬细胞活化密切相关, 内化障碍条件下, 由 LPS 介导的细胞活化表现为对 IL-6 的释放受到显著抑制, 而对 TNF- α 的释放则抑制不显著。

关键词: 内毒素类; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 6; 内化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.23.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)23-2291-03

Experimental study of internalization dysfunction of LPS-TLR4 complex on LPS-induced activation of macrophages*

Wang Yanyan¹, Zheng Jiang²

(1. Department of Clinical Lab, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China; 2. Medical Research Centre, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective Treatment with inhibitor of internalization to establish the cell model of internalization dysfunction and examine the effect on internalization of LPS-TLR4 complex in RAW264.7 cell model. **Methods** Utilizing chemical inhibitor, Monodansylcadaverine, to establish RAW264.7 cells model of internalization dysfunction; MTT assay MDC on macrophage toxicity; The inhibition effectiveness on LPS-TLR4 complex internalization was examined by flow cytometry and confocal laser scanning microscopy; ELISA to detect TNF- α , IL-6 protein expression; real-time PCR to detect TNF- α mRNA, IL-6 mRNA expression. **Results** MDC prevented LPS-induced internalization of LPS and TLR4 complex and thus allowed the establishment of RAW264.7 cells model of internalization dysfunction; real-time PCR and ELISA data indicated that pretreatment of cells with 100 μ mol/L MDC dramatically inhibited the expression of IL-6 ($P < 0.05$); TNF- α protein and nucleic acid levels were not significant inhibited. **Conclusion** Internalization of LPS-TLR4 complex is closely related to macrophage activation. Under the condition of internalization hindrance, LPS-induced cell activation displays significant inhibition of IL-6 release, but no such effects on TNF- α release.

Key words: endotoxins; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6; internalization

内毒素是革兰阴性菌细胞壁的主要组分之一, 其化学成分是脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)。LPS 通过诱导单核-吞噬细胞系统的活化, 大量释放肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 等多种前炎症细胞因子导致脓毒症、脓毒症休克, 甚至死亡的发生^[1-2]。Toll 样受体家族(Toll-like receptors, TLRs)是单核-吞噬细胞系统识别细菌病原分子的模式识别受体, TLR4 是单核-吞噬细胞系统识别 LPS 的模式识别受体^[3]。

有研究表明, LPS 诱导细胞活化的信号转导过程的启动环节(LPS 与 TLR4 的结合)发生在细胞膜上, LPS 不需进入胞内即可启动细胞的活化; 而进入胞内的 LPS 内化(internalization)被认为主要与其降解、代谢有关^[4]。内化泛指细胞摄取物质的现象, 存在受体介导和非受体介导 2 种途径。受体介导的细胞内化通常是将胞外信号转入胞内, 该途径可分为网格蛋白依赖(clathrin-dependent)和非依赖(clathrin-independent)途

径^[5]。LPS 内化是 TLR4 受体介导的网格蛋白依赖性途径的内化过程^[6]。最近的研究认为 LPS 内化与细胞的活化有关^[7-8]。但 LPS-TLR4 复合物的内化与细胞活化之间的关系尚不清楚, 因此本实验旨在采用化学抑制剂抑制 LPS-TLR4 内化, 建立内化障碍的小鼠 RAW264.7 细胞模型, 观察 LPS-TLR4 复合物的内化障碍是否对巨噬细胞的活化作用有影响, 为深化 LPS 活化单核/巨噬细胞的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 LPS(O55:B5)、FITC-LPS、单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverine, MDC)为美国 Sigma 公司产品, 抗 TLR4 抗体购自美国 Santa 公司, 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒为美国 eBioscience 公司产品, 主要仪器包括: 实时 PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。小鼠 RAW264.7 细胞购自美国 ATCC 公司。实时 PCR 仪、酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); 流式

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30872681)。△ 通讯作者, Tel: (023)68754435; E-mail: zhengji@mail.tmmu.com.cn。

细胞仪(Becton Dickinson 公司);激光共聚焦显微镜(LSM 510 META)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RAW264.7 细胞在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,37℃、5% CO₂ 条件下培养,每 2~3 d 传代。

1.2.2 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测 MDC 对 RAW264.7 细胞的毒性 实验分两组:阴性对照组、MDC 处理组,每组设 6 复孔,阴性对照组以培养基代替药物。RAW264.7 细胞培养在 96 孔培养板中,每孔 200 μL,1.0×10⁶/mL 细胞;培养 2 h 后 MDC 处理组分别加入终浓度为 50、100、200 μmol/L 的 MDC,培养 4 h;每孔中加入 MTT (5 mg/mL)20 μL,继续培养 4 h;弃去培养液,加入二甲亚砜 150 μL,微量震荡约 10 min,于 490 nm 处测定各孔吸光度值 OD₄₉₀。

1.2.3 流式细胞仪检测 MDC 对 RAW264.7 细胞膜表面 TLR4 表达的影响 实验分 4 组:对照组、LPS 组、MDC 组、MDC+LPS 组。MDC 100 μmol/L 预先加入 RAW264.7 细胞作用 1 h,加入 LPS 100 ng/mL 作用 1 h。弃去上清,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)漂洗 2 次,收集细胞,加入藻红蛋白(phycoerythrin,PE)标记的抗 TLR4 抗体,冰上孵育 30 min,PBS 漂洗 2 次,流式细胞仪检测膜表面 TLR4 受体变化情况。

1.2.4 激光共聚焦显微镜观察 FITC-LPS 在细胞内的定位 预先准备每孔置有 10 mm×10 mm 盖玻片的 24 孔板,用含 10%胎牛血清 DMEM 培养液培养 RAW264.7 细胞,调整细胞悬液浓度为 1×10⁵ 细胞/mL,加于 24 孔板内,每孔 1 mL,置 37℃ CO₂ 孵箱培养 4 h 后,加入 MDC,以加入等量生理盐水为对照,继续培养 1 h 后,加入 FITC-LPS 继续培养 1 h,PBS 漂洗 3 次,4%多聚甲醛固定 10 min,PBS 漂洗 3 次,加 4',6-二脒基-2-苯吲哚盐酸(4',6-diamidino-2-phenylindole 2hci,DAPI)染核 3 min,PBS 漂洗 3 次,甘油封片,激光共聚焦显微镜观察 LPS-TLR4 的定位。

1.2.5 ELISA 检测 TNF-α、IL-6 蛋白的表达 用 ELISA 试剂盒分别检测 TNF-α、IL-6 水平,操作过程按产品说明书进行,于酶标仪 450 nm 波长下测 OD₄₅₀ 值,以标准品浓度建立标准曲线,计算样品中 TNF-α 蛋白和 IL-6 蛋白的表达量。

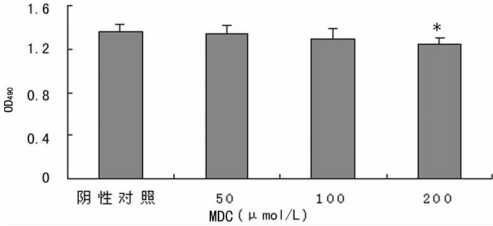
1.2.6 RT-PCR 法检测 TNF-α、IL-6 mRNA 的表达 取对数生长期 RAW264.7 细胞,用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA,并以总 RNA 为模板逆转录成 cDNA;以 cDNA 模板进行 PCR 合成,引物序列小鼠 TNF-α:上游引物 5'-CAG GTT CTG TCC CTT TCA CTC ACT-3';下游引物 5'-GTT CAG TAG ACA GAA GAG CGT GGT-3'(217 bp)。小鼠 IL-6:上游引物 5'-ACC ACG GCC TTC CCT ACT T-3';下游引物 5'-CAT TTC CAC GAT TTC CCA GA-3'(132 bp)。小鼠 β-actin:上游引物 5'-GGG AAA TCG TGC GTG ACA TCA AAG-3';下游引物 5'-CAT ACC CAA GAA GGA AGG CTG GAA-3'(191 bp)。PCR 反应条件:94℃ 预变性 3 min;94℃ 15 s,58℃ 15 s,72℃ 40 s,共 40 个循环;72℃ 延伸 5 min;再经熔解曲线分析后,通过 Bio-Rad iQ5 分析软件进行分析处理,采用相对定量法,通过 2^{-△△Ct} 法计算 TNF-α、IL-6 mRNA 与内参基因循环阈值(threshold cycle,Ct)的差值△Ct。

1.3 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据应用

SPSS13.0 统计软件进行统计分析,组内比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MDC 对 RAW264.7 细胞活性的影响 MTT 实验显示,50、100 μmol/L 的 MDC 对细胞活性的影响与对照组相比,差异无统计学意义(*P* > 0.05);而 200 μmol/L 的 MDC 对 RAW264.7 细胞存在细胞毒性,其 OD 值与对照组相比,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。因此本组将 MDC 的工作浓度定为 100 μmol/L(图 1)。



* :*P* < 0.05,与阴性对照比较。

图 1 MDC 对 RAW264.7 细胞活性的影响(*n* = 6)

2.2 MDC 对 RAW264.7 细胞膜表面 TLR4 表达的影响 流式细胞仪检测结果显示,RAW264.7 细胞在未经 LPS 刺激前,细胞膜上存在一定基础量表达的 TLR4 受体,阳性率为 85.13%,平均荧光强度为 86.49;RAW264.7 细胞在 LPS 刺激后,其膜表面的 TLR4 荧光强度降低,阳性率仅为 50.90%,平均荧光强度为 34.92,提示 LPS 与 TLR4 结合后导致细胞的内化增强;而在经内化抑制剂 MDC 预处理的 RAW264.7 细胞中本组观察到,尽管经过 LPS 刺激,但其细胞膜表面的 TLR4 受体的荧光仍较对照组强,阳性率为 99.87%,平均荧光强度为 396.28,提示 MDC 有效地抑制了 RAW264.7 细胞对 LPS-TLR4 复合物的内化作用(表 1)。

表 1 流式细胞仪检测 RAW264.7 细胞膜表面 TLR4 表达

组别	TLR4 受体阳性率(%)	平均荧光强度
对照组	85.13	86.49
LPS 组	50.90	34.92
MDC 组	89.81	85.29
MDC+LPS 组	99.87	396.28

2.3 MDC 对 FITC-LPS 与 PE-TLR4 内化的影响 激光共聚焦显微镜观察结果显示,未经 FITC-LPS 刺激的 RAW264.7 细胞无绿色荧光(图 2A);细胞膜及胞浆呈现出红色荧光,提示细胞表达一定基础量的 TLR4;RAW264.7 细胞在 FITC-LPS 刺激 1 h 后,绿色荧光与红色荧光主要集中在细胞胞浆内,少量分布在细胞膜上(图 2B),提示 LPS 与膜表面 TLR4 结合形成复合物内化入胞,膜表面 TLR4 分布减少,膜内 LPS-TLR4 复合物增加;而经内化抑制剂 MDC 预处理 1 h 的 RAW264.7 细胞与 FITC-LPS 相互作用,本组观察到绿色荧光与红色荧光主要分布在细胞膜上(图 2C),这与 MDC 作用机制相关:MDC 能抑制配体-受体复合物聚集内化进入网格蛋白包被小窝^[9],上述数据提示内化抑制剂 MDC 有效地抑制了 RAW264.7 细胞对 LPS 诱导的 TLR4 的内化。

2.4 内化障碍 RAW264.7 细胞模型 TNF-α 与 IL-6 蛋白的表达 ELISA 检测不同时点 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α 的情况,结果显示 RAW264.7 细胞在未给予 LPS 刺激时,细胞培养

上清中 TNF- α 和 IL-6 释放量很低,LPS 100 ng/mL 作用 RAW264.7 细胞 12 h,在 4~8 h TNF- α 分泌达到峰值,随后逐渐降低,而 IL-6 分泌量随时间的增加而增加;用内化抑制剂 MDC 作用 1 h 后,建立内化障碍的 RAW264.7 细胞模型,再用 LPS 100 ng/mL 作用 12 h,TNF- α 释放量较单纯 LPS 刺激组略有下降,但差异无统计学意义($P>0.05$),而 IL-6 释放量较单纯 LPS 刺激组差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 内化障碍 RAW264.7 细胞模型 TNF- α mRNA 与 IL-6 mRNA 的表达 实时 PCR 定量结果显示,RAW264.7 细胞经 LPS 刺激后,TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平显著高于对照组;MDC 预处理 RAW264.7 细胞,再以 LPS 刺激,其 TNF- α mRNA 表达水平较 LPS 组变化不显著(图 3A),而 IL-6 mRNA 表达水平较 LPS 组有显著下调($P<0.05$)(图 3B)。

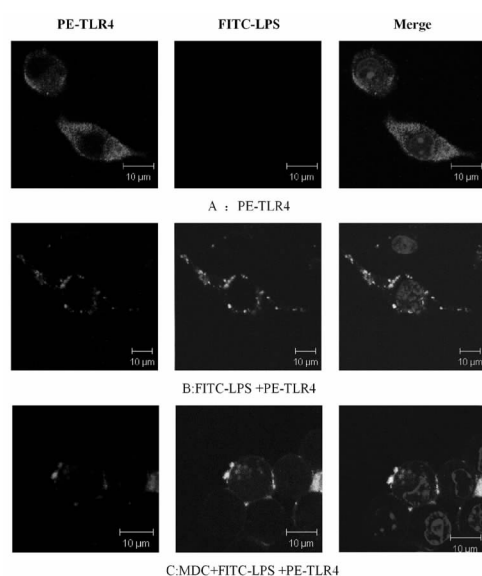
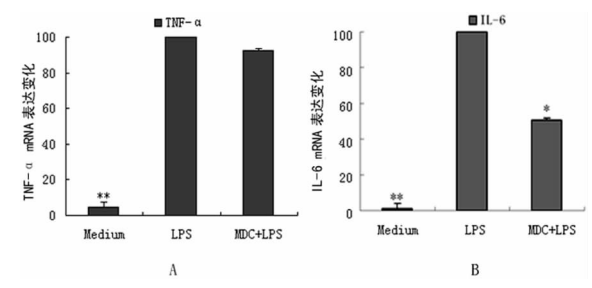


图 2 内化抑制剂对 FITC-LPS 内化的影响



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, 与 LPS 组比较。

图 3 实时 PCR 法检测 TNF- α 、IL-6 mRNA 的表达

3 讨论

脓毒症(sepsis)是感染引起的全身炎症反应综合征,是严重烧伤、创伤、感染、休克和大手术后等常见的并发症,进一步发展可导致脓毒性休克、多器官系统功能障碍综合征等,目前已成为临床危重患者的主要死亡原因之一^[1]。LPS 是脓毒症的一种重要的致病因子。LPS 进入机体后主要是通过激活单核-巨噬细胞系统,对 LPS 进行吞噬清除,同时活化的单核-巨噬细胞大量释放 TNF- α 、IL-1、IL-6 和 IL-12 等多种前炎症细胞因子和炎症介质导致对机体的损害。目前临床对脓毒症的治疗仍然缺乏特效药物^[10-11]。既往大量研究表明,LPS 诱导细胞活化的信号转导过程的启动环节(LPS 与 TLR4 的结合)

发生在细胞膜上,LPS 不需进入胞内即可启动细胞的活化,而 LPS 的内化被认为主要与其降解、代谢有关。最近的研究认为 LPS 内化与细胞的活化有关,但 LPS-TLR4 复合物的内化与细胞活化之间的关系尚不清楚。因此本实验应用内化抑制剂建立内化障碍的小鼠 RAW264.7 细胞模型,观察 LPS-TLR4 复合物内化障碍对巨噬细胞活化作用的影响。

LPS-TLR4 复合物的内化是受体介导的网格蛋白依赖性内化过程。MDC 是参与网格蛋白依赖的内化途径的网格蛋白转谷氨酰胺酶活性抑制剂,能抑制配体-受体复合物聚集内化进入网格蛋白包被小窝。本组应用这种内化抑制剂,通过流式细胞仪检测和激光共聚焦显微镜观察,结果显示,应用 MDC 成功构建了 LPS-TLR4 复合物内化障碍的小鼠 RAW264.7 细胞模型。LPS 进入机体后,活化单核-巨噬细胞系统,诱导大量炎症细胞因子释放,介导脓毒症的发生^[12]。研究表明,TNF- α 、IL-6 与 LPS 诱导的脓毒症的病程发展密切相关^[13]。因此,本组选用 TNF- α 、IL-6 作为细胞活化的主要检测指标。通过观察 IL-6 和 TNF- α 的蛋白水平及 RNA 水平的变化研究细胞的活化情况,本组发现一个有趣的现象:内化障碍的小鼠 RAW264.7 细胞,在 LPS 刺激下,其对 IL-6 的表达及分泌释放在核酸水平和蛋白水平均受到明显抑制($P<0.05$),而对 TNF- α 的表达及分泌释放在核酸水平和蛋白水平却均无显著抑制。出现此现象的生物学意义何在,尚需进一步研究探讨。

在 TLR 家族中,TLR4 的信号转导存在 2 条通路,即 MyD88 依赖与非依赖的信号转导通路^[14]。本组的实验结果显示,应用内化抑制剂后,IL-6 的释放被显著抑制,而对 TNF- α 的释放却无明显的抑制作用。有研究显示,TNF- α 的分泌主要由 MyD88 依赖的信号转导通路所介导^[15],而 IL-6 的分泌途径仍存在争议。Kagan 的研究显示,IL-6、调节激活正常 T 细胞表达的分泌因子(regulated upon activation normal T cell expressed and secreted,RANTES)的分泌主要与 MyD88 非依赖的信号转导通路有关^[16]。本组研究提示,在 LPS 通过 TLR4 介导的两条信号通路当中,可能 MyD88 非依赖的信号转导通路与受体介导的细胞内化作用密切相关。有关 TLR4 的 MyD88 依赖和非依赖的信号转导通路与受体介导的细胞内化间的研究甚少,其具体作用机制目前尚不清楚。因此深入研究 LPS-TLR4 复合物的内化与细胞活化间的关联,对阐明 LPS 活化单核/巨噬细胞的作用机制具有重要意义。

参考文献:

- [1] James A,Russell MD. Management of sepsis [J]. N Engl J Med,2006,355(16):1699-1713.
- [2] Albiger B,Dahlberg S,Henriques-Normark B,et al. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections;focus on the Toll-like receptors [J]. J Intern Med,2007,261(6):511-528.
- [3] Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors [J]. Semin Immunol,2007,19(1):3-10.
- [4] Latz E,Visintin A,Lien E,et al. The LPS receptor generates inflammatory signals from the cell surface [J]. J Endotoxin Res,2003,9(6):375-380. (下转第 2296 页)

- [6] Zhang HT, Luo H, Wu J, et al. Galangin induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the mitochondrial pathway [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(27): 3377-3384.
- [7] Zhang HT, Feng ZL, Wu J, et al. Sodium butyrate-induced death-associated protein kinase expressions promote Raji cell morphological change and apoptosis by reducing FAK protein levels [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(11): 1783-1790.
- [8] Nian H, Delage B, Pinto JT, et al. Allyl mercaptan, a garlic-derived organosulfur compound, inhibits histone deacetylase and enhances Sp3 binding on the P21WAF1 promoter [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(9): 1816-1824.
- [9] Tóth KF, Knoch TA, Wachsmuth M, et al. Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 18): 4277-4287.
- [10] Bruzzese F, Rocco M, Castelli S, et al. Synergistic antitumor effect between vorinostat and topotecan in small cell lung cancer cells is mediated by generation of reactive oxygen species and DNA damage-induced apoptosis [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(11): 3075-3087.
- [11] Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(32): 5459-5468.
- [12] Tungteakkhun SS, Filippova M, Fodor N, et al. The full-length isoform of human papillomavirus 16 E6 and its splice variant E6* bind to different sites on the procaspase 8 death effector domain [J]. *J Virol*, 2010, 84(3): 1453-1463.
- [13] Liu Y, Pop R, Sadegh C, et al. Suppression of FAS-FASL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo [J]. *Blood*, 2006, 108(1): 123-133.
- [14] 李萍, 杨志刚, 文国容, 等. 茶多酚对 ACC-M 细胞株 Fas, FasL 表达的影响 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(3): 268-269.
- [15] 郭芮伶, 吴国明, 钱桂生, 等. 多西紫杉醇诱导人肺腺癌细胞 A549 及其多药耐药细胞 A549/CDDP 凋亡的研究 [J]. *西部医学*, 2008, 20(2): 256-260.
- [16] Taghiyev AF, Guseva NV, Sturm MT, et al. Trichostatin A(TSA) sensitizes the human prostatic cancer cell line DU145 to death receptor ligands treatment [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(4): 382-390.
- [17] 李俊武, 张树梅, 任海全, 等. 白血病 NB4 细胞凋亡过程中 Fas 蛋白和基因的表达及意义 [J]. *山东医药*, 2010, 50(11): 60-61.
- [18] 刘文, 黄文芳, 卢贤瑜. 死亡受体信号传导途径研究进展 [J]. *检验医学与临床*, 2006, 3(9): 445-447.

(收稿日期: 2011-01-09 修回日期: 2011-03-22)

(上接第 2293 页)

- [5] Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(2): 121-132.
- [6] Lin WJ, Yeh WC. Implication of Toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock [J]. *Shock*, 2005, 24(3): 206-209.
- [7] Husebye H, Halaas O, Stenmark H, et al. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity [J]. *EMBO J*, 2006, 25(4): 683-692.
- [8] 李宇宁, 曹红卫, 郑江, 等. 一种高效 FITC 标记 LPS 方法的建立及应用 [J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(9): 822-824.
- [9] Green BT, Brown DR. Differential effects of clathrin and actin inhibitors on internalization of *Escherichia coli* and *Salmonella choleraesuis* in porcine jejunal Peyer's patches [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 113(1/2): 117-122.
- [10] Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002(20): 709-760.
- [11] 伏建峰, 何新建. 脓毒症的发病机制及防治药物研发新思路 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(1): 66-68.
- [12] Krawczyk-Michalak K, Glapiński A, Brzezińska-Błaszczuk E. Toll-like receptors and their role in regulation of the inflammatory response in sepsis [J]. *Anestezjol Intens Ter*, 2008, 40(4): 253-259.
- [13] 聂海, 赖西南, 黄显凯, 等. 舱内腹部闭合性爆炸伤大鼠血浆内毒素的变化及意义 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(2): 146-148, 151.
- [14] Bartor GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization [J]. *Nat Immunol*, 2009, 9(4): 535-542.
- [15] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. *Cytokine*, 2008, 42(2): 145-151.
- [16] Kagan JC, Su T, Horng T, et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta [J]. *Nat Immunol* 2008, 9(4): 361-368.

(收稿日期: 2011-01-09 修回日期: 2011-03-22)