

高氧所致氧化应激状态下肺泡上皮细胞 Toll 样受体的表达及其功能研究

黄栋 方芳 许峰

【摘要】 目的 观察高氧暴露后肺泡上皮细胞内活性氧(ROS)水平与 Toll 样受体(TLRs)基因、蛋白表达变化及其与信号通路功能之间的关系,探讨高氧所致肺损伤炎症反应的可能机制。方法 将体外培养的人肺腺癌 A549 细胞株分为空气对照组、高氧组、N-乙酰半胱氨酸(NAC)预处理组,高氧组细胞在 $>90\%O_2$ 的高氧环境中暴露 2、6、12、24 及 48 h, NAC 预处理组细胞予以 ROS 清除剂 NAC 预处理后高氧暴露 6 h。于相应时间点用流式细胞术检测细胞内 ROS 含量以及 TLR2/4 蛋白在细胞中的分布和表达,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 TLR2/4 mRNA 表达,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞上清液中白细胞介素(IL-6、IL-8)的含量。结果 A549 细胞有 TLR2/4 表达,并且以细胞质内表达为主。与空气对照组比较,高氧组暴露 2 h 细胞内 ROS 含量(荧光强度)即明显增高(11.820 ± 3.123 比 7.223 ± 1.170 , $P < 0.01$),随高氧暴露时间延长呈进行性增高,于 48 h 达高峰(113.837 ± 5.247 , $P < 0.01$);高氧暴露 2 h TLR2/4 mRNA 表达至高峰(TLR2 mRNA: 1.820 ± 0.056 比 1.263 ± 0.023 ; TLR4 mRNA: 2.080 ± 0.220 比 1.317 ± 0.107 , 均 $P < 0.01$),随高氧暴露时间延长,TLR2/4 mRNA 表达虽仍有增多,但无显著变化;高氧暴露后 TLR2/4 蛋白表达显著增高,6 h 表达至高峰(TLR2 蛋白: 8.370 ± 1.548 比 3.930 ± 0.277 ; TLR4 蛋白: 25.803 ± 5.783 比 8.867 ± 2.230 , 均 $P < 0.01$),以细胞质内表达为主;随高氧暴露时间延长,细胞上清液中 IL-6(ng/L)、IL-8(ng/L)水平呈进行性增高,于 48 h 达高峰(IL-6: 2213.41 ± 69.99 比 9.76 ± 1.47 ; IL-8: 11520.38 ± 429.93 比 159.56 ± 20.80 , 均 $P < 0.01$)。在 NAC 预处理情况下,高氧刺激后,细胞内 ROS 水平明显降低(14.050 ± 1.257 比 31.180 ± 2.336 , $P < 0.01$),细胞 TLR2/4 mRNA 和蛋白表达显著降低(TLR2 mRNA: 1.270 ± 0.061 比 1.683 ± 0.025 ; TLR4 mRNA: 1.507 ± 0.058 比 1.650 ± 0.139 ; TLR2 蛋白: 3.458 ± 0.258 比 8.370 ± 1.548 ; TLR4 蛋白: 11.611 ± 3.403 比 25.803 ± 5.783 , 均 $P < 0.05$),细胞上清液中 IL-6、IL-8 水平显著下降(IL-6: 8.42 ± 0.70 比 73.51 ± 16.70 ; IL-8: 134.94 ± 5.19 比 772.82 ± 96.05 , 均 $P < 0.05$),与空气对照组比较差异均无统计学意义。结论 A549 细胞在高氧暴露后,细胞内 ROS 能够激活人肺泡上皮细胞 TLR2/4 的表达,导致前炎症细胞因子 IL-6 和 IL-8 的大量释放。

【关键词】 活性氧; 肺泡上皮细胞; Toll 样受体 2/4; 白细胞介素-6/8

Hyperoxia-induced up-regulation of Toll-like receptors expression in alveolar epithelial cells HUANG Dong*, FANG Fang, XU Feng.* Department of Pediatrics, Guizhou Province People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China

Corresponding author: XU Feng, Department of Pediatrics Intensive Care Unit, Chongqing Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China, Email: xufeng9899@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To examine the correlation between the hyperoxia-induced reactive oxygen species (ROS) production and Toll-like receptors (TLRs) expression in cultured alveolar epithelial cells in order to understand the role of TLRs signaling in inflammatory response during acute lung injury. **Methods** Three groups of cultured human lung adenocarcinoma cell line A549 were exposed to: ① air, ② hyperoxia ($95\%O_2 + 5\%CO_2$) and ③ N-acetylcysteine (NAC) pretreatment + hyperoxia. The level of intracellular ROS, TLR2/4 mRNA, TLR2/4 protein and cytokin interleukin-6/8 (IL-6/8) concentrations in the culture supernatant were measured by flow cytometry, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in cells harvested at different time points into the treatment. **Results** A549 cells were found to have a baseline (mainly intracellular) TLR2/4 expression. Continued exposure to hyperoxia caused ① a progressive increase in intracellular ROS, which became significantly higher than the air treated cells after 2 hours of exposure (11.820 ± 3.123 vs. 7.223 ± 1.170 , $P < 0.01$), and reached a peak after 48 hours of exposure (113.837 ± 5.247 , $P < 0.01$); ② an increase in intracellular TLR2/4 mRNA which peaked after 2 hours of exposure (TLR2 mRNA: 1.820 ± 0.056 vs. 1.263 ± 0.023 ; TLR4 mRNA: 2.080 ± 0.220 vs. 1.317 ± 0.107 , both $P < 0.01$); ③ significant increase in TLR2/4 protein expression (mainly intracellular), both peaked after exposure for 6 hours (TLR2 protein: 8.370 ± 1.548 vs. 3.930 ± 0.277 ; TLR4 protein: 25.803 ± 5.783 vs. 8.867 ± 2.230 , both $P < 0.01$); ④ a progressive increase in culture supernatant IL-6 (ng/L), IL-8 (ng/L) concentration, both peaked at 48 hours (IL-6: 2213.41 ± 69.99 vs. 9.76 ± 1.47 ; IL-8: 11520.38 ± 429.93 vs. 159.56 ± 20.80 , both $P < 0.01$). NAC pre-treatment significantly suppressed the hyperoxia induced intracellular ROS (14.050 ± 1.257

vs. 31.180 ± 2.336 , $P < 0.01$) production, the hyperoxia induced expression of TLR2/4 (TLR2 mRNA: 1.270 ± 0.061 vs. 1.683 ± 0.025 ; TLR4 mRNA: 1.587 ± 0.058 vs. 1.650 ± 0.139 ; TLR2 protein: 3.458 ± 0.258 vs. 8.371 ± 1.548 ; TLR4 protein: 11.611 ± 3.403 vs. 25.803 ± 5.783 , all $P < 0.05$), and the hyperoxia induced increase in IL-6 and IL-8 in supernatant level (IL-6: 8.42 ± 0.70 vs. 73.51 ± 16.70 ; IL-8: 134.94 ± 5.19 vs. 772.82 ± 96.05 , both $P < 0.05$), as seen in the hyperoxia treated groups. **Conclusion** Hyperoxia induced intracellular ROS production can up-regulate TLR2/4 expression in A549 cells, leading to the release pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 from these cells.

【Key words】 Reactive oxygen species; Alveolar epithelial cell; Toll-like receptor 2/4; interleukin-6/8

肺泡上皮细胞作为与外界病原直接接触者,可能是黏膜炎症的重要参与者和发起者^[1]。Toll 样受体(TLRs)作为病原识别受体之一,通过识别病原微生物启动机体先天性免疫和继发性免疫,因而在肺部起着重要的防御作用。本课题组前期动物实验已经证实,TLR2 和 TLR4(TLR2/4)在高氧所致急性肺损伤(ALI)中变化明显,与肺组织的氧化应激性损伤密切相关^[2]。本研究中通过体外观察高氧 ALI 炎症反应中肺泡上皮细胞 TLRs 的表达,进一步探讨肺泡上皮细胞 TLRs 在高氧所致肺部炎症机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器:胎牛血清(天津 TBD 生物技术发展中心),DMEM 培养基粉剂(美国 Gibco 公司),总 RNA 提取试剂盒(杭州博日科技公司),反转录试剂盒(日本 TOYOBO 公司),荧光定量检测试剂盒(天根生物有限公司),荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪以及分析软件(美国应用生物系统公司),TLR4-异硫氰酸荧光素(FITC)流式抗体(英国 AbD-serotec 公司),同型抗体免疫球蛋白 G2a(IgG2a)及人白细胞介素-8(IL-8)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 Genzyme 公司产品,由深圳晶美生物工程有限公司分装)。

1.2 细胞培养:人肺腺癌 A549 细胞株(重庆医科大学附属儿童医院儿研所急救实验室保存)培养于含 10%胎牛血清 DMEM 培养液中,以 2.0×10^5 /ml 在 6 孔板内培养 24 h 后换无血清培养液培养 16 h。

1.3 实验分组及处理:将细胞分为空气对照组,高氧 2、6、12、24 和 48 h 组及 N-乙酰半胱氨酸(NAC)预处理组共 7 组。空气对照组直接将换好培养液的细胞(6 孔板)置于孵箱中继续培养。高氧组先将 6 孔板置于独立培养的小室中,放入测氧仪,通入

1 L/min 95%O₂+5%CO₂ 的混合气体 30 min,密闭氧仓,置于孵箱中培养,于不同时间点取出,对于培养时间超过 12 h 者,每 12 h 重复充入氧气,并使氧仓中的氧浓度不低于 85%。NAC 预处理组先将 NAC 加入细胞培养液中,终浓度为 10 mmol/L,然后将 6 孔板置于氧仓内,处理同高氧组,置于孵箱中培养 6 h。高氧暴露 6 h 和 NAC 终浓度 10 mmol/L 的标准根据预实验的结果选择。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)分子探针法检测细胞内活性氧(ROS):各组细胞处理完毕后,以 DMEM 培养基清洗细胞 3 次,6 孔板每孔加入 1 ml DMEM 培养基稀释的 DCFH-DA(终浓度为 10 μmol/L),在 37 °C 培养箱中孵育 25 min 后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,0.25%胰酶消化,消化后加入 1 ml 培养液终止消化,离心收集各组细胞。流式细胞仪在激发波长 488 nm、发射波长 525 nm 处检测细胞平均荧光强度,以反映细胞内 ROS 水平。

1.4.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 A549 细胞 TLRs mRNA 表达:各组细胞处理后提取细胞总 RNA。测定 RNA 纯度及浓度,按反转录试剂盒操作说明书经反转录合成 cDNA。TLR1~10 基因和三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因的引物序列参考文献^[3-4]标准(引物由美国 Invitrogen 公司中国分公司合成)。PCR 扩增条件:95 °C 预变性 4 min,95 °C 变性 45 s,63 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,39 个循环;PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,将凝胶放入凝胶成像系统观察并拍照。

1.4.3 RT-PCR 检测 A549 细胞 TLR 2/4 mRNA 表达:细胞提取总 RNA 和反转录步骤同 1.4.2。取 cDNA 产物 2 ml 进行实时 PCR。标准曲线以不同梯度拷贝数的 PCR 产物绘制,检测结果以每微升 cDNA 中 TLR 2/4 mRNA 与 GAPDH mRNA 的拷贝数比值表示。

1.4.4 流式细胞术检测 A549 细胞 TLR2/4 蛋白

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.11.002

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670931)

作者单位:550002 贵阳,贵州省人民医院儿科(黄栋),重庆医科大学附属儿童医院重症监护病房(方芳、许峰)

通信作者:许峰,Email:xufeng9899@yahoo.com.cn

表达:各组细胞处理完毕后取 100 μ l 细胞悬液,对照管加鼠抗人 IgG2 α 抗体 5 μ l,检测管加 TLR2/4 抗体 20 μ l,4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min,用流式细胞仪检测分析上皮细胞膜上 TLR2/4 的蛋白表达。上皮细胞破膜处理:细胞悬液加 3%多聚甲醛液冰上固定 10 min,离心后再加 0.2%吐温 20 液孵育 15 min,离心。取 100 μ l 细胞悬液加荧光标记抗体,用流式细胞仪检测分析细胞内 TLR2/4 的蛋白变化。

1.4.5 ELISA 检测细胞上清液中 IL-8 和 IL-6 水平:各组细胞处理完毕后,收集上清液,离心除去细胞沉渣,-80 $^{\circ}$ C 冻存以备 ELISA 检测。

1.5 统计学处理:采用 SPSS 17.0 统计软件进行结果分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A549 细胞 TLR 1~10 mRNA 表达(图 1):首先通过 RT-PCR 方法检测未暴露于高氧下的 A549 细胞是否有 TLRs 表达,经与人单核细胞 TLR1~10 mRNA RT-PCR 结果比较,提示 A549 细胞可表达 TLR 1~10 mRNA。

2.2 高氧暴露及 NAC 干预对 A549 细胞内 ROS 水平的影响(表 1):与空气对照组比较,各高氧组 A549 细胞内 ROS 水平均明显升高,并随高氧暴露时间延长而进行性增加(均 $P<0.01$)。在高氧培养 6 h 细胞中加入 NAC 后,细胞内 ROS 水平较高氧 6 h 组显著降低($P<0.01$),而与空气对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 高氧暴露及 NAC 干预对 A549 细胞 TLR2/4 mRNA 表达的影响(表 1):高氧暴露后即可引起 A549 细胞 TLR2/4 mRNA 表达显著增高,高氧 2 h 表达达高峰(均 $P<0.01$),随高氧暴露时间延长,TLR2/4 mRNA 表达虽仍有增多,但无明显变化。在高氧培养 6 h 细胞中加入 NAC 后,A549 细胞内 TLR2/4 mRNA 表达均较高氧 6 h 组显著下降(均 $P<0.05$),而与空气对照组比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

2.4 高氧暴露及 NAC 干预对 A549 细胞 TLR2/4 蛋白分布及表达的影响(图 2~3;表 1):正常 A549 细胞 TLR2/4 蛋白表达细胞质内明显高于细胞膜。高氧暴露 6 h 即可引起 A549 细胞 TLR2/4 蛋白表达显著增高,且达高峰(均 $P<0.01$),以细胞质内表达为主,随高氧暴露时间延长,TLR2/4 蛋白表达虽仍有增多,但无显著变化。NAC 预处理组细胞 TLR2/4 蛋白表达与空气对照组比较差异无统计学意义,而与高氧 6 h 组比较 TLR2/4 蛋白表达显著下降(均 $P<0.05$)。

2.5 细胞培养上清液中 IL-6 及 IL-8 含量的变化(表 1):高氧暴露后各组细胞培养上清液中 IL-6 和 IL-8 含量随暴露时间延长显著高于空气对照组;二者的变化趋势基本相同,均在高氧 6 h 后即迅速升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且 IL-8 增高较 IL-6 更为明显。NAC 预处理组 IL-6 及 IL-8 与空气对照组

RT-PCR,逆转录-聚合酶链反应,TLR 1~10,Toll 样受体 1~10,1,DNA ladder,2~11,TLR 1~10,12,三磷酸甘油醛脱氢酶
图 1 RT-PCR 检测人单核细胞(A)和肺腺癌 A549 细胞株(B) TLR 1~10 mRNA 表达电泳图

表 1 高氧暴露及 NAC 干预对 A549 细胞内 ROS、TLR2/4 mRNA 和蛋白表达以及细胞上清液中 IL-6/8 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	细胞内 ROS 荧光强度	TLR2 mRNA	TLR4 mRNA	TLR2 蛋白	TLR4 蛋白	IL-6(ng/L)	IL-8(ng/L)
空气对照组	6	7.223 \pm 1.170	1.263 \pm 0.023	1.317 \pm 0.107	3.930 \pm 0.277	8.867 \pm 2.230	9.76 \pm 1.47	159.56 \pm 20.80
高氧 2 h 组	6	11.820 \pm 3.123 ^a	1.820 \pm 0.056 ^a	2.080 \pm 0.220 ^a	5.321 \pm 0.424	11.853 \pm 1.717	9.97 \pm 1.54	110.90 \pm 18.84
高氧 6 h 组	6	31.180 \pm 2.336 ^a	1.683 \pm 0.025 ^a	1.650 \pm 0.139 ^a	8.370 \pm 1.548 ^a	25.803 \pm 5.783 ^a	73.51 \pm 16.70 ^b	772.83 \pm 96.05 ^b
高氧 12 h 组	6	63.623 \pm 4.230 ^a	1.737 \pm 0.032 ^a	1.867 \pm 0.093 ^a	5.572 \pm 0.738 ^b	19.888 \pm 4.772 ^a	760.60 \pm 41.99 ^a	3 100.83 \pm 186.00 ^a
高氧 24 h 组	6	77.628 \pm 4.448 ^a	1.717 \pm 0.025 ^a	1.873 \pm 0.049 ^a	5.855 \pm 0.738 ^b	15.689 \pm 1.335 ^b	1 273.58 \pm 140.35 ^a	5 539.65 \pm 373.82 ^a
高氧 48 h 组	6	113.837 \pm 5.247 ^a	1.550 \pm 0.046 ^a	1.710 \pm 0.087 ^a	5.638 \pm 0.444 ^b	15.912 \pm 2.094 ^b	2 213.41 \pm 69.99 ^a	11 520.38 \pm 429.93 ^a
NAC 预处理组	6	14.050 \pm 1.257 ^d	1.270 \pm 0.061 ^c	1.507 \pm 0.058 ^c	3.458 \pm 0.258 ^c	11.611 \pm 3.403 ^c	8.42 \pm 0.70 ^c	134.94 \pm 5.19 ^c
方差齐性检验 P 值		0.135	0.274	0.341	0.115	0.105	0.115	0.105
ANOVA 检验 F 值		860.176	92.090	13.415	17.526	14.094	17.526	14.094
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:NAC,N-乙酰半胱氨酸,A549,人肺腺癌 A549 细胞株,ROS,活性氧,TLR2/4,Toll 样受体 2/4,IL-6/8,白细胞介素-6/8,与空气对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与高氧 6 h 组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$

注, A549, 人肺腺癌 A549 细胞株, TLR2/4, Toll 样受体 2/4

图 2 A549 细胞于高氧暴露 6 h 时细胞质内
和细胞膜 TLR2/4 蛋白表达

注, A549, 人肺腺癌 A549 细胞株, TLR2/4, Toll 样受体 2/4

图 3 A549 细胞 TLR2/4 蛋白表达和分布

比较差异无统计学意义, 而与高氧 6 h 组比较差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

高氧肺损伤的病因被认为是吸入高浓度氧使肺组织细胞产生过量的 ROS, 超过了机体细胞抗氧化能力而造成的氧化应激性损伤^[5-7]。研究显示上皮细胞可产生各种炎症介质和化学性趋化因子, 募集炎性细胞在局部聚集, 而在肺部炎症反应中发挥着重要作用^[1,8]。这种 ROS 诱发的无菌性炎症是否与病原微生物一样, 可通过激活 TLR/核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路, 增强炎症介质的基因转录, 参与炎症发生发展^[9-11], 以及 ROS 是否可通过激活肺泡上皮细胞 TLRs 来参与炎症反应目前尚不清楚。

实验研究已证实, ROS 作为内源性宿主分子产生的反应物, 可被 TLRs 识别, 如 Qureshi 等^[12]和 Zhang 等^[13]通过基因敲除小鼠和特殊转基因肺泡

细胞株及原代肺泡上皮细胞实验证实, 在高氧肺损伤时, ROS 可激活肺泡上皮细胞 TLR4, 通过上调血红素氧化酶-1 和 Bcl-2 的表达来抵御肺泡上皮细胞的凋亡。还有研究显示, ROS 激活中性粒细胞 TLR4 介导的炎症信号通路, 激活上调心肌细胞 TLR2 的表达和功能^[14]。本研究中通过与人单核细胞 TLR1~10 mRNA 比较, 证实人肺腺癌 A549 细胞株可在未受外界刺激的状态下自发地表达 TLR1~10 mRNA, 这与 Homma 等^[15]的研究结果相同。本研究中还观察到, 在高氧暴露下肺泡上皮细胞 TLR2/4 的 mRNA 和蛋白表达随着细胞内 ROS 含量增高而增强, TLR2/4 mRNA 表达在高氧 2 h 达高峰, 而 TLR2/4 蛋白表达高峰出现在高氧 6 h, 此后持续升高, 这是因为蛋白表达在基因转录之后, 并且在高氧 6 h 内 A549 细胞 TLR2/4 的表达与细胞内 ROS 呈浓度依赖性; 同时通过观察打孔细胞和未打孔细胞 TLR2/4 蛋白的分布, 发现 TLR2/4 蛋白主要位于细胞质内, 细胞膜表达较少。目前关于 TLR2/4 蛋白在肺泡上皮的分布报道还不一致, Nelson 等^[16]和 Gon 等^[17]认为其主要分布于细胞膜。我们认为之所以存在这种现象, 可能是与采取的实验技术和方法不同, 如是否采用细胞打孔技术等。Guillot 等^[18]采用细胞打孔技术和流式细胞术、激光共聚焦以及免疫共沉淀方法进一步证实 TLR2/4 蛋白主要位于细胞质内, 这与我们观察到的结果是一致的。并且在高氧暴露下, 细胞膜 TLR2/4 蛋白增加不明显, 而以细胞质内增加为主。这个发现可能提示, 在 TLRs 介导的气道黏膜上皮细胞先天免疫系统对于正常的气道菌群和外界环境的变化可产生免疫沉默, 而不会导致不必要的气道炎症发生。为了进一步研究 ROS 是否参与了高氧诱导的 TLR2/4 表达, 本研究中使用 ROS 清除剂 NAC 预处理 A549 细胞, 在显著降低细胞高氧暴露后 ROS 浓度的同时, 细胞 TLR2/4 mRNA、蛋白表达也显著降低, 说明 ROS 可诱导 TLR2/4 表达的增加。

虽然 A549 细胞内 TLR2/4 mRNA 和蛋白的表达可随细胞内 ROS 浓度的增加而增高, 但其功能是否被激活仍不得而知。本研究中通过 ELISA 法测定 TLRs 信号通路下游产物 IL-8 和 IL-6 的水平来了解是否被激活, 结果观察到随着高氧暴露时间的延长, A549 细胞培养上清液中 IL-6 和 IL-8 水平也显著增高, 尤以 IL-8 更为明显, 这与本课题组前期动物实验结果^[2]及国外相关研究的动物实验结果^[16,18-22]相一致。其原因可能是由于随着高氧暴露

时间的延长,细胞内 ROS 产生增加,导致促炎因子 IL-8 分泌增加,机体产生炎症反应加剧,同时机体生成 IL-6 来抑制炎症,清除细胞内的 ROS,减轻机体的损伤;使用 ROS 清除剂 NAC 后,A549 细胞培养上清液中 IL-6 和 IL-8 水平随着 TLR2/4 的表达降低也显著降低。

综上,本研究结果表明,ROS 能够激活人肺泡上皮细胞,导致 IL-6 和 IL-8 的大量释放。

参考文献

- [1] Gripar SC, Richardson WM, Sodhi CP, et al. No longer an innocent bystander, epithelial toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation. *Mol Med*, 2008, 14: 645-659.
- [2] 黄栋,方芳,许峰.高氧致大鼠急性肺损伤 Toll 样受体 2 和 4 的变化及意义. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 644-647.
- [3] Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, et al. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31: 358-364.
- [4] Chen Z, Cheng Y, Xu Y, et al. Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. *Clin Immunol*, 2008, 128: 400-408.
- [5] Altemeier WA, Sinclair SE. Hyperoxia in the intensive care unit, why more is not always better. *Curr Opin Crit Care*, 2007, 13: 73-78.
- [6] Alejandre-Alcázar MA, Kwapiszewska G, Reiss I, et al. Hyperoxia modulates TGF-beta/BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292: L537-549.
- [7] Lee PJ, Choi AM. Pathways of cell signaling in hyperoxia. *Free Radic Biol Med*, 2003, 35: 341-350.
- [8] Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*, 2004, 23: 327-333.
- [9] 姚咏明, 鄢小建, 姚风华, 等. 严重腹腔感染大鼠组织 Toll 样受体 2/4 基因表达及其调节机制. *中国危重病急救医学*, 2003, 15: 646-650.
- [10] 路小光, 战丽彬, 刘伟光, 等. 大剂量附子汤对重症急性胰腺炎肺损伤大鼠肺组织 Toll 样受体 4/核转录因子- κ B 的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2009, 16: 14-17.
- [11] 李忠旺, 邱信霖, 孙琦, 等. 血必净注射液对创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织 Toll 样受体 4 及核转录因子- κ B 表达的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17: 24-27.
- [12] Qureshi ST, Zhang X, Aberg E, et al. Inducible activation of TLR4 confers resistance to hyperoxia-induced pulmonary apoptosis. *J Immunol*, 2006, 176: 4950-4958.
- [13] Zhang X, Shan P, Qureshi S, et al. Cutting edge, TLR4 deficiency confers susceptibility to lethal oxidant lung injury. *J Immunol*, 2005, 175: 4834-4838.
- [14] Asehounne K, Strassheim D, Mitra S, et al. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF- κ B. *J Immunol*, 2004, 172: 2522-2529.
- [15] Homma T, Kato A, Hashimoto N, et al. Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31: 463-469.
- [16] Nelson DE, Thekwaba AE, Elliott M, et al. Oscillations in NF- κ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science*, 2004, 306: 704-708.
- [17] Gon Y, Asai Y, Hashimoto S, et al. A20 inhibits toll-like receptor 2- and 4-mediated interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31: 330-336.
- [18] Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, et al. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem*, 2004, 279: 2712-2718.
- [19] Ward NS, Waxman AB, Homer RJ, et al. Interleukin-6-induced protection in hyperoxic acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 22: 535-542.
- [20] Mikawa K, Nishina K, Maekawa N, et al. Attenuation of hyperoxic lung injury in rabbits with superoxide dismutase: effects on inflammatory mediators. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1995, 39: 317-322.
- [21] Wagenaar GT, ter Horst SA, van Gastelen MA, et al. Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36: 782-801.
- [22] D'Angio CT, Lo Monaco MB, Chaudhry SA, et al. Discordant pulmonary proinflammatory cytokine expression during acute hyperoxia in the newborn rabbit. *Exp Lung Res*, 1999, 25: 443-465. (收稿日期, 2011-08-03) (本文编辑, 李银平)

• 科研新闻速递 •

一份对多器官功能障碍与多器官功能衰竭评分系统的流行病学调查报告

有研究对过去 20 年间评估及记录危重病患者病情的多种评分系统进行了讨论并形成一套合理的研究方法,下面简介如下:多器官功能障碍综合征(MODS)是重症监护病房(ICU)内患者死亡的首要原因,是指多个器官出现功能异常,其范围包括:从轻微的功能改变到严重的不可逆的器官衰竭,过去也称为多器官衰竭综合征、全身多器官衰竭或多器官衰竭。感染曾被认为是导致多器官功能障碍发生的主要因素,然而,其他诸如严重创伤、烧伤以及肺感染性炎症反应等因素也会促使多器官功能障碍或者类似状况突发。2001 年,由北美和欧洲的数个危重病学术界相关人员对脓毒症及相关概念进行了重新界定,即机体生理失衡状态(如精神情况改变、肠梗阻)被附加到全身炎症反应综合征的判断标准中,除此之外,降钙素原、C-反应蛋白、肌酐以及细胞因子水平等生化检查结果被列入脓毒症的诊断依据中。对于 ICU 患者来说,MODS 的常见发病器官有肺、心、肾、肝、血液以及中枢神经系统。研究人员提倡用器官功能衰竭评分来描述 ICU 患者器官功能障碍严重程度,其目的在于从发病而非死亡与否的方面对 ICU 患者建立起严格的分层与对照,连续评估能够记录与跟踪患者病情的发展,也有助于预测病情的变化。

姚甲瑞,编译自《Semin Respir Crit Care Med》,2011,32:543-551;胡森,审校