

副干酪乳酸杆菌通过诱导负调控因子抑制单核巨噬细胞对脂多糖刺激的炎性细胞因子应答

谢 超,孙可一,季晓辉

(南京医科大学基础医学院微生物学与免疫学系,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨副干酪乳酸杆菌(*Lactobacillus paracasei*, *L. para*)预刺激抑制脂多糖(Lipopolysacchride, LPS)诱导的炎性细胞因子释放的调节机制。方法:用佛波酯诱导 THP-1 细胞分化为巨噬细胞样细胞;以 *L. para* 预刺激为实验组,小剂量 LPS(10 ng/ml)预刺激和 TLR2 激动剂 Pam3CSK4 预刺激为对照组,预刺激 24 h 后,再用 LPS 大剂量(1 μ g/ml)刺激经分化的 THP-1 细胞;检测预刺激对 TLR 信号通路负调控因子 A20、SOCS1、SOCS3、IRAK3 的表达水平,对 TLR4 和 CD14 的膜表达水平和 mRNA 水平,以及对大剂量 LPS 诱导的炎性细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 水平的影响。各目的蛋白 mRNA 水平检测采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)法,TLR4 和 CD14 的膜表达检测采用流式细胞术。结果:*L. para* 等预刺激能够降低 LPS 诱导的 IL-1 β 、TNF- α 表达水平;并能够上调细胞 TLR 信号途径负调控因子 A20、SOCS1、SOCS3、IRAK3 的 mRNA 水平,但不影响细胞膜的 TLR4 和 CD14 阳性百分率;IRAK1/4 抑制剂能够减弱预刺激诱导的负调控因子表达水平,并减弱预刺激对 LPS 诱导炎症因子释放的抑制作用。结论:副干酪乳酸杆菌预刺激能够通过上调 TLR 信号通路负调控因子 A20、SOCS1、SOCS3、IRAK3 等的表达抑制单核巨噬细胞对 LPS 刺激的炎性细胞因子的释放。

[关键词] 乳酸杆菌;脂多糖;巨噬细胞;Toll 样受体;炎症负调控因子

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)09-1184-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20140907

L. paracasei inhibits LPS-induced mononuclear phagocytes inflammatory cytokine response through negative regulators

Xie Chao, Sun Keyi, Ji Xiaohui

(Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulation mechanism of prestimulation of *Lactobacillus paracasei* (*L. para*) inhibited on LPS-induced inflammatory cytokine release. **Methods:** THP-1 cells were differentiated to macrophage-like cells by PMA stimulation. Cells were then pretreated by *L. para* (the experimental group), a lower dose LPS (10 ng/ml) and TLR2 agonist Pam3CSK4 respectively (the control group). After 24 hours pretreatment, THP-1 cells were further stimulated with a higher dose LPS (1 μ g/ml). The influence of this prestimulation on the expression of TLR signaling pathway negative regulators, membrane expression and mRNA levels in TLR4 and CD14 and IL-1 β and TNF- α levels in a higher dose LPS-induced inflammatory cytokines were respectively detected. mRNA levels were measured by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Membrane expressions of TLR4 and CD14 after pretreatment were confirmed by flow cytometry. **Results:** LPS-induced IL-1 β and TNF- α levels were significantly reduced by *L. para* pretreatment; In addition, the mRNA level of TLR signaling pathway negative regulators A20, SOCS1, SOCS3 and IRAK3 were upregulated while membrane expression of TLR4 and CD14 unaltered. Prestimulation-reduced negative regulators expression levels along with the release of LPS-reduced inflammatory cytokines were weakened by a IRAK1/4 inhibitor. **Conclusion:** *L. para* prestimulation could enhance negative regulators of TLR signaling A20, SOCS1, SOCS3 and IRAK3 expression thus inhibits inflammatory response of macrophage after LPS stimulation.

[Key words] *Lactobacillus*; lipopolysacchride; macrophage; Toll-like receptor; inflammation negative regulators

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(09): 1184-1191]

益生菌已经成为肠道菌群中最受关注的成员,然而它对机体健康的促进作用和对疾病的预防治疗作用机制仍然需要进一步研究。益生菌对机体免疫功能的调节依赖于其与机体免疫细胞或肠道上皮细胞间的相互作用,而 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR) 作为固有免疫细胞主要的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR), 在这个过程中发挥了重要作用^[1-2]。在 TLR 信号通路激活的同时,细胞内的负调控机制同样也被激活,防止过度的 TLR 活化导致炎症损伤。最近有研究表明,A20、SOCS1、IRAK3 等胞内负调控因子可能参与调控脂多糖(lipopolysacchride, LPS) 激活的 TLR 信号通路^[3-5]。我们前期的研究发现副干酪乳酸杆菌(*L. paracasei*, *L. para*) 能够通过抑制 I κ B 磷酸化及核因子(nuclear factor, NF)- κ B 核转位来调控 LPS 诱导单核巨噬细胞释放炎症因子^[6]。本研究通过观察 TLR 信号通路的负调控分子在 *L. para* 抑制 LPS 诱导单核巨噬细胞炎症因子释放中的作用,试图进一步探讨副干酪乳酸杆菌发挥抗炎作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

L. para C48 株来自本实验室^[6];人单核细胞性白血病细胞系 THP-1 (上海中国科学院细胞库);MRS 肉汤培养基(Oxiod 公司,美国);RPMI-1640 培养基及胎牛血清(Gibco-BRL 公司,美国);佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、LPS 以及 Pam3CSK4 (Sigma-Aldrich 公司, 美国);TRIzol 及 PCR mix (Roche 公司,德国);反转录试剂(Lifetech 公司,美国);抗人 TLR4、CD14 流式抗体(Miltenyi Biotec 公司,德国);IRAK1/4 抑制剂(Millipore 公司,美国)。PCR 引物由美国 Lifetech 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 副干酪乳酸杆菌的培养

保存在固体培养基中的 *L. para* 复苏后于 MRS 培养基中 37℃ 厌氧培养过夜,然后在琼脂平板上进行划线分离,再于 37℃ 厌氧培养 48 h。挑单菌落于 15 ml 无菌离心管中 37℃ 厌氧培养过夜,吸取 100 μ l 菌液并加入 10 ml MRS 在 15 ml 无菌离心管中培养过夜。离心收集细菌,以无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 3 次,沉淀用 RPMI-1640 培养基混悬,取部分菌液于 MRS 琼脂平板上进行活菌计数。余下菌液以 60℃ 水浴灭活 1 h。灭活后的细菌做活菌计数以确认灭活效果。

1.2.2 PMA 诱导 THP-1 细胞分化

离心收集对数生长期的 THP-1 细胞,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基及终浓度为 10 ng/ml 的 PMA,以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h 后弃去上清,用无菌 PBS 洗涤 3 次后换无血清 RPMI-1640 培养基培养 24 h,观察 THP-1 细胞分化情况。

1.2.3 PMA 诱导分化的 THP-1 细胞的刺激培养

诱导分化后的 THP-1 给予预刺激,预刺激分组:空白对照组,LPS 预刺激组(10 ng/ml),Pam3CSK4 预刺激组(1 μ g/ml),*L. para* 预刺激组(感染复数 MOI=100、1 000、10 000,分别为 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} CFU/ml)。观察 IRAK1/4 抑制剂作用时,以 25 μ mol/L 的抑制剂培养 2 h 后再加入预刺激剂。预刺激 24 h 后,弃去上清;用无菌 PBS 洗 3 次,洗脱预刺激剂及 IRAK1/4 抑制剂。最后,加入含终浓度为 1 μ g/ml LPS 的无血清 RPMI-1640 培养基,继续培养 3 h。培养结束后离心分离上清与细胞,冻存待测。

1.2.4 RT-PCR 检测负调控分子等及白介素 1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA 的表达

TRIzol 法分别提取预刺激 24 h 内以及 LPS 刺激 3 h 后 THP-1 细胞的总 RNA。按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录获得 cDNA,以 cDNA 为模板进行 RT-PCR,检测相关基因的 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。RT-PCR 按照 Roche FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)说明书进行。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞表面 TLR4、CD14 表达

L. para 等预刺激 24 h 后收取 THP-1 细胞,按照说明书以抗人 TLR4、抗人 CD14 抗体分别标记细胞后,用流式细胞仪检测细胞表面 TLR4、CD14 阳性表达率。

1.3 统计学方法

实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 Graphpad Prism 5.0 进行统计学分析。两组之间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 副干酪乳酸杆菌预刺激抑制 LPS 诱导的 THP1 细胞炎性细胞因子的表达

荧光定量 PCR 结果显示,LPS 刺激前 24 h *L. para*、TLR2 激动剂 Pam3CSK4 以及小剂量 LPS 的预刺激均能减弱 LPS 诱导的 THP1 炎性细胞因

表 1 PCR 引物
Table 1 PCR primers

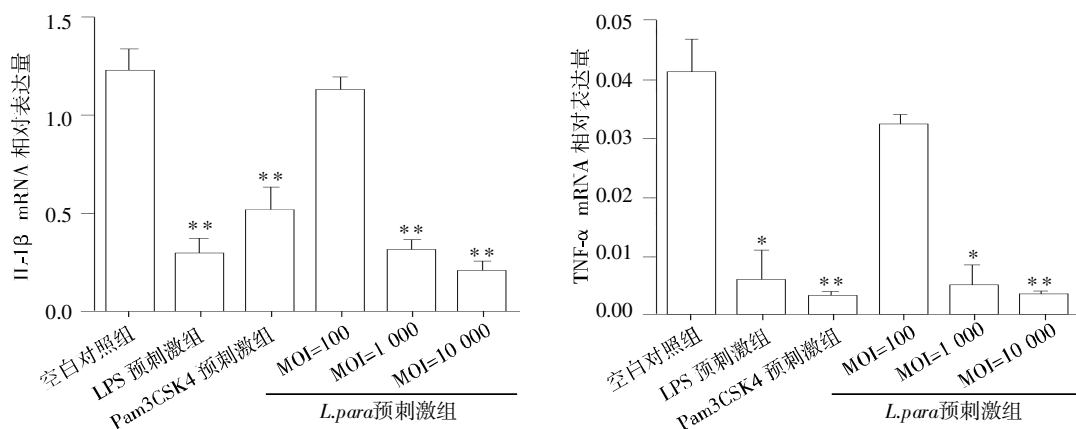
基因	上游引物(5'→3')	下游引物(3'→5')
TNF-α	CATCTATCTGGGAGGGGTCT	TCAGGGATCAAAGCTGTAGG
IL-1β	AGCTACGAATCTCCGACCAC	CGTTATCCCATGTGTCTGAAGAA
β-actin	GGACCTGACCGACTACCTCATG	CGACGTAGCAGAGCTTCTCCTT
A20	AACATTTTGCTGCTGCCTC	AGGTGCTTTGTGTGGTTCC
SOCS1	CTGGGATGCCGTGTTATTTT	TAGGAGGTGCGAGTTCAGGT
SOCS3	CCTACTGAACCCTCTCCGA	GTCCAGGAACTCCCGAATGG
TOLLIP	AGGTGACAACTGTCTCCGTC	GCCAACTTGCCTGTACCAC
IRAK3	TGCAACGCGGGCAA	TTAGTGATGTGGGAGGATCTTCA
TLR4	AGACCTGTCCCTGAACCCTAT	CGATGGACTTCTAAACCAGCCA
CD14	ACGCCAGAACCTTGTGAGC	GCATGGATCTCCACCTCTACTG

子 IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$), 而三者的抑制效果之间无差异, 同时 *L. para* 的抑制作用具有细菌浓度依赖性(图 1)。

2.2 副干酪乳酸杆菌预刺激对 THP-1 细胞 TLR4 及 CD14 mRNA 和膜表达的影响

RT-PCR 的结果(图 2A、B)显示, *L. para* 预刺激后, 随着时间延长, 细胞内 TLR4 和 CD14 的 mRNA

水平逐渐降低。TLR4 mRNA 在预刺激 12 h 后开始降低 ($P < 0.05$), 并在 24 h 后降低至约为空白对照组的 50% ($P < 0.05$); CD14 mRNA 在预刺激后 3 h 开始降低, 并持续低表达至预刺激 12 h ($P < 0.05$)。但流式结果(图 2C、D)显示, 3 种物质的预刺激均没有影响 TLR4 和 CD14 在细胞膜上的表达水平。



与空白对照组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ 。

图 1 副干酪乳酸杆菌预刺激对 LPS 诱导炎症因子的抑制作用

Figure 1 Inhibitory effects of *L. Para* prestimulation on LPS-induced inflammatory cytokines

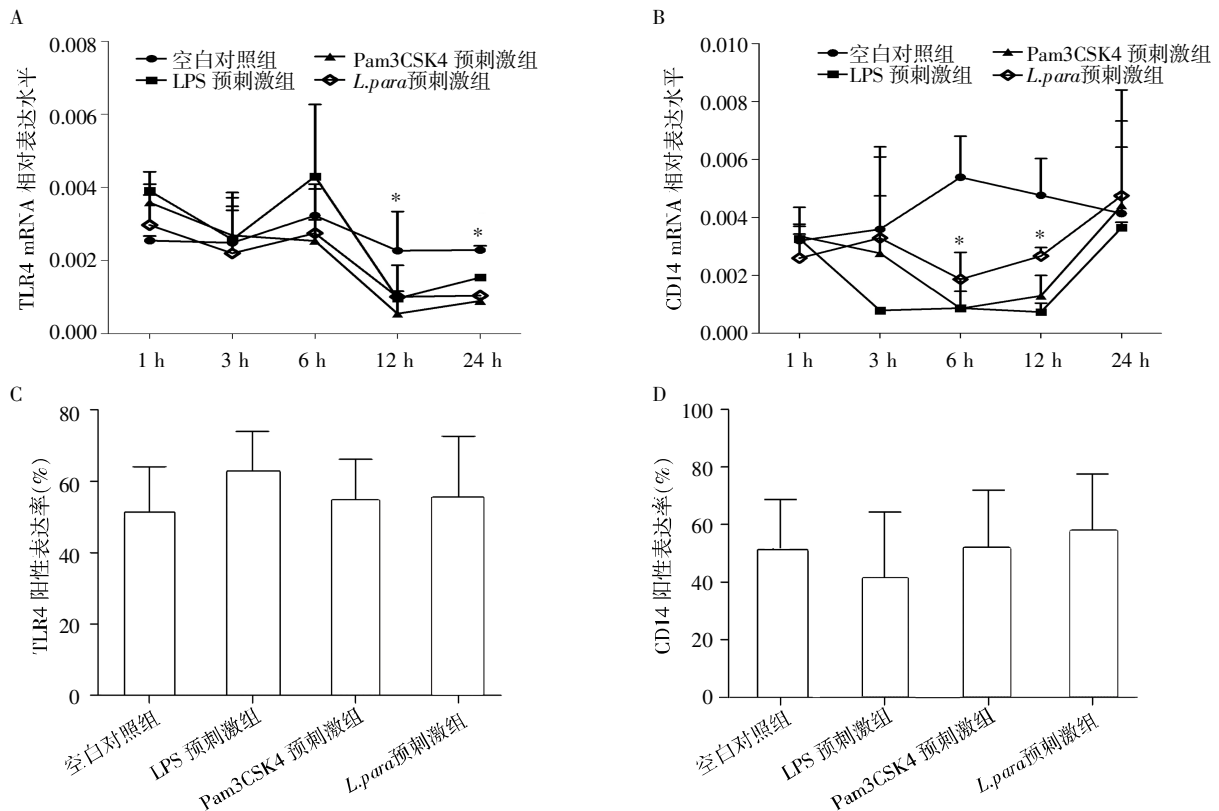
2.3 副干酪乳酸杆菌预刺激对 TLR 信号通路负调控因子 A20、SOCS1、SOCS3、TOLLIP、IRAK3 的影响

RT-PCR 结果显示, *L. para*、LPS 以及 Pam3CSK4 均能迅速上调 A20、SOCS1、SOCS3 的表达水平, 但是对另外 2 个负调控分子 TOLLIP、IRAK3 影响较弱。在 *L. para* 预刺激 3 h 后即能检测到高水平的 A20 ($P < 0.0001$), 24 h 仍高于对照 ($P < 0.05$), 3 种预刺激对 A20 的诱导能力相近。SOCS3 的变化趋势与 A20 相同, 但 *L. para* 上调 SOCS3 的能力稍弱。SOCS1 在预刺激后的改变与 A20 和 SOCS3 有所不同, 其水平升高较晚, 12 h 达到峰值 ($P < 0.05$),

Pam3CSK4 预刺激上调 SOCS1 水平高于 LPS 和 *L. para* ($P < 0.05$)。IRAK3 在预刺激后 24 h 才出现显著上调 ($P < 0.05$)。3 种预刺激对 TOLLIP 均没有明显影响(图 3)。

2.4 干扰 IRAK1/4 途径的效应

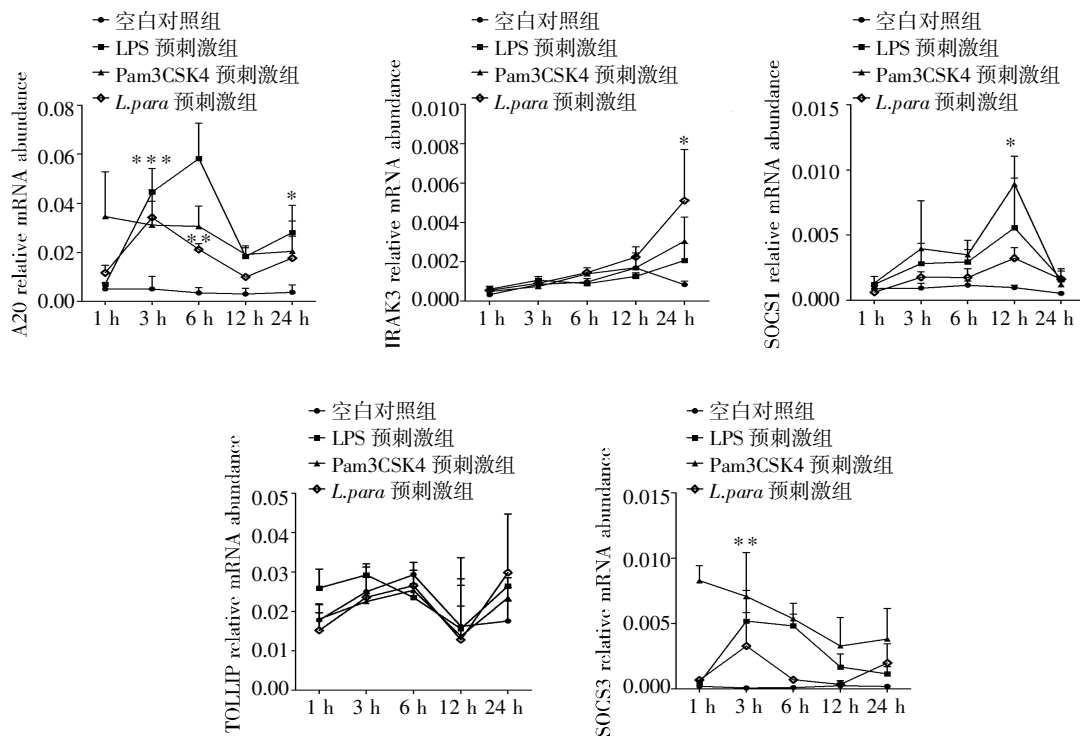
N-(2-morpholinylethyl)-2-(3-nitrobenzoylamido)-benzimidazole 是一种特异性 IRAK1/4 抑制剂。本研究发现, 在预刺激过程中使用其抑制 IRAK1/4 后, *L. para* 预刺激诱导 A20 及 SOCS3 等负调控分子的表达水平有一定程度的下降(图 4A~C); 同时预刺激对大剂量 LPS 诱导炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 的



A, B: RT-PCR 法检测结果, $n = 4$; C, D: 流式细胞术检测膜表达水平。与空白对照组比较, $*P < 0.05$, $n = 3$ 。

图 2 副干酪乳酸杆菌预刺激对 THP1 细胞 TLR4 及 CD14 的影响

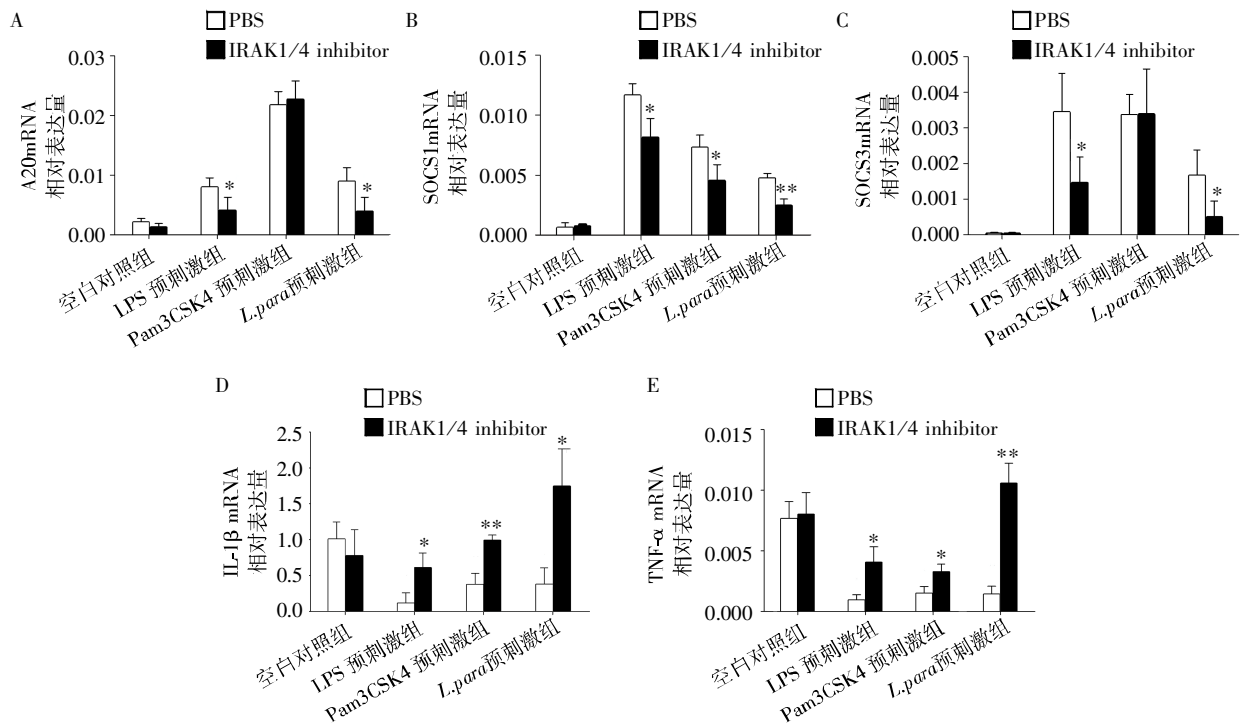
Figure 2 Effect of *L.Para* prestimulation on levels of TLR4 and CD14 in THP1 cells



与 NC 组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ ($n = 4$)。

图 3 副干酪乳酸杆菌预刺激对 THP-1 细胞内 TLR 信号通路负调控分子 mRNA 水平的影响

Figure 3 Effects of *L.Para* prestimulation on mRNA levels of TLR signal pathway regulators in THP-1 cells



与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图4 IRAK1/4 抑制剂干扰副酪乳酸杆菌预刺激对负调控因子的诱导(A~C)和炎性细胞因子分泌的抑制效应(D~E)

Figure 4 The influence of IRAK1/4 inhibitor in *L.Para* pre-stimulation-induced negative regulators(A~C) and IRAK1/4 inhibiting effects to the expression of proinflammatory cytokines (D~E)

抑制作用也有一定程度的减弱(图 4D、E)。

3 讨论

肠道益生菌在维持宿主肠道稳态中的重要作用受到越来越多的关注^[7],而益生菌与肠道免疫细胞和肠黏膜上皮细胞的相互作用仍有待探讨。本实验室的前期研究证实,某些种类的乳酸杆菌(如 *L. Para*)能够抑制单核巨噬细胞 LPS 刺激所诱导的炎症因子释放,这一作用是通过抑制 I κ B 磷酸化及 NF- κ B 核转位来实现的^[6]。然而进一步的分子调控机制尚有待深入阐明。

小剂量 LPS 预刺激能够减弱大剂量 LPS 诱导的炎症损伤这一现象被称为内毒素耐受^[8]。内毒素耐受已受到广泛重视和研究,被认为是机体对致炎信号的一种重要调控机制,以防止过强的炎症反应损伤机体。为了进一步证实乳酸杆菌具有诱导内毒素耐受的作用,我们观察了 *L.Para* 预刺激对 LPS 诱导的 THP-1 细胞炎症因子产生的影响。实验结果显示,与小剂量(10 ng/ml)LPS 预刺激相同,一定浓度的 *L.Para* 预刺激也能够降低大剂量(1 μ g/ml)LPS 诱导的炎症因子 IL-1 β 、TNF- α mRNA 水平,说明其的确能够诱导内毒素耐受。

内毒素耐受的分子机制迄今尚未完全明了。有理由推测,这一机制可能涉及细胞膜受体复合物形成受抑,以及细胞内炎症信号通路的负调控被激活。已有研究发现,内毒素耐受机制涉及 LPS 预刺激诱导炎症信号通路负调控分子的表达^[5,9-10]。我们推测,作为重要的肠道益生菌,*L.Para* 有可能通过与内毒素耐受相似的机制来抑制 LPS 诱导的炎症因子释放^[11]。为此,我们从膜受体复合物组成成分和受体信号通路负调控分子表达的角度对 *L.Para* 和 LPS 预刺激的效应进行了对照研究。

TLR 是机体固有免疫识别机制中一类重要的模式识别受体。LPS 是通过 TLR4 被免疫细胞识别的。TLR 在活化后形成 TLR 二聚体并通过其 TIR 结构域招募下游信号分子,再通过 MyD88 依赖和非 MyD88 依赖途径进一步启动下游信号;而前者是大多数 TLR 主要的信号途径。Myddosome 的形成是 MyD88 依赖途径中的关键性事件。Myddosome 是由 MyD88 和白细胞介素 1 受体相关激酶(IL-1 receptor-associated kinase, IRAKs)形成的受体激酶复合物,由 6 个 MyD88 分子、4 个 IRAK4 分子和 4 个 IRAK2 分子通过死亡结构域相互作用构成,在 MyD88 依赖的 TLR 的信号通路中具有关键性的作

用^[12]。Myddosome 复合体形成过程中,IRAK 家族成员能够通过磷酸化或者自身磷酸化而依次激活,最终引起包括 NF- κ B 在内一系列转录因子的活化。IRAK1/4 的磷酸化被认为是 Myddosome 向下游传递信号的最后阶段^[13-14]。这一信号途径的活化导致炎症基因激活、表达;同时,也导致负调控因子基因如 IRAK3、A20、细胞因子信号转导抑制因子(suppressor of cytokine signaling,SOCS)等激活、表达^[10,15],对炎性细胞因子应答起负反馈调节作用。

在内毒素耐受的机制研究中,介导单核巨噬细胞对 LPS 的识别与应答的 2 个关键性共受体 TLR4 和 CD14 的变化最先成为研究焦点。然而随后的研究发现,TLR4 在耐受细胞的膜表达水平没有明显变化,并且过表达 TLR4 和 CD14 也没有阻止内毒素耐受的发生^[16-17]。而在胞内 mRNA 水平上,不同的实验体系所得结论稍有差异,但基本上认为 TLR4 和 CD14 的 mRNA 水平在 LPS 预刺激之后并不会降低^[18-19]。鉴于这两者在 LPS 诱导的炎症信号通路上的重要性,我们考察了预刺激对 THP-1 细胞膜上和胞内 TLR4 和 CD14 的影响。发现 *L.Para*、LPS 以及 Pam3CSK4 预刺激后,TLR4 和 CD14 的 mRNA 水平均有不同程度的降低,而细胞群体中这 2 个膜蛋白分子的阳性表达率没有受到显著影响。但这一结果并不能推理出内毒素耐受机制与 TLR4 和 CD14 表达改变无关。因为,尽管 TLR4 和 CD14 mRNA 水平下调尚未引起膜蛋白分子的阳性表达率改变,却有可能已经导致蛋白表达水平的改变,可能会在一定程度上减少膜上 TLR4-CD14 信号复合体的形成从而导致细胞对 LPS 的应答减弱^[18]。由于本研究中未能对 TLR4、CD14 蛋白定量变化进行比较,相关的推测还有待今后进一步证实。

在 TLR 触发的炎症通路活化后,细胞内亦启动负调控因子的表达,在防止炎症信号失控或者过强导致损伤的负调控机制中具有重要作用。我们考察了 TLR 信号通路中的几个关键性的胞内负调控分子,结果发现 *L.Para*、LPS 及 Pam3CSK4 的预刺激均能迅速诱导 A20、SOCS1、SOCS3 的表达上调,而 IRAK3 表达水平直到 24 h 后才显著增加。TOLLIP 在预刺激 24 h 之内均没有明显改变。A20 是一种具有泛素化修饰酶活性的锌指蛋白,其在 TNF 诱导的信号通路和 TLR 信号通路中发挥着广泛的负调控作用^[20]。A20 能够抑制 TRAF6 的泛素连接酶活性,进而抑制由后者引起的 NF- κ B 信号通路活化,最终减弱炎症信号^[21]。有报道称 A20 是早期速发负调控

分子,其表达水平的上调几乎和 TNF 同时发生。这与我们观察到的 A20 变化趋势是一致的^[22]。SOCS 家族成员广泛参与固有免疫和适应性免疫的生理调节。SOCS3 能直接作用于 TRAF6 抑制其活化发挥负调控作用^[4]。我们在实验中观察到预刺激后 SOCS3 和 A20 的 mRNA 水平峰值均出现在早期,可能与其作用在信号通路的上游有关。至于 SOCS1,它能够和 TIRAP 结合并诱导后者发生泛素化降解从而抑制 MyD88 依赖的信号传递过程;同时,还能直接诱导 NF- κ B 的 p65 发生泛素化降解,从而发挥负调控作用^[23-24]。有报道称 SOCS1 在 TLR 信号通路中主要是通过 IRF3 而不是 NF- κ B 发挥作用的,而前者是 LPS 刺激后晚期时相的主要致炎信号通路^[25]。上述结论部分解释了本研究中观察到的 SOCS1 峰值较 A20 和 SOCS3 晚的意义。IRAK3 一直被认为在 TLR 信号负调控中发挥重要作用^[26],当 TLRs/IL-1R 与配体形成 MyD88 接头分子复合物后,IRAK3 就结合在 MyD88/IRAK4 上,抑制 IRAK4 对 IRAK1 的磷酸化,从而阻止 IRAK1/TRAF6 结合和 TRAF6 活化。在本研究中,预刺激后 24 h IRAK3 表达水平显著上调,提示其在信号通路中发挥作用的位置与 A20 和 SOCS3/1 明显不同,可能主要在炎症信号通路的中晚期发挥负调控作用。由于在实验中并没有观察到 TOLLIP mRNA 水平的明显改变,我们推测,*L.Para*、LPS 预刺激诱导的 A20、SOCS1、SOCS3 和 IRAK3 可能比 TOLLIP 在 LPS 炎症应答负调控中具有更为重要的作用。

我们发现,*L.Para*、LPS 以及 Pam3CSK4 诱导负调控分子表达上调的能力能被 IRAK1/4 抑制剂减弱;预刺激后 24 h,将预刺激剂和 IRAK1/4 抑制剂洗脱,再用大剂量 LPS 刺激,可诱导产生更高水平的炎性细胞因子如 IL-1 β 。本研究结果显示,预刺激诱导负调控分子可能是 IRAK1/IRAK4 依赖的,即负调控分子的产生依赖于炎症信号分子的活化,如抑制了 IRAK1/IRAK4 磷酸化(活化)就抑制了负调控分子的表达,使其后的 LPS 刺激更高水平的炎症信号分子活化和炎性细胞因子表达。这一现象提示,细胞内稳态依赖于炎症信号和负调控分子之间的相互调控。

L.para 预刺激的跨膜信号与 LPS 预刺激的跨膜信号有所不同,不是通过 TLR4、而可能是通过 TLR2 启动的。因为 *L.para* 作为革兰阳性菌并不含有 LPS,但是其菌体主要成分中的 PGN、LTA 等均能被宿主细胞的 TLR2/TLR6 异源二聚体识别。本研

究中同时应用 TLR2 的激动剂 Pam3CSK4 预刺激作为对照,也得到了与 *L.Para* 预刺激类似的结果。因此我们推测 *L.para* 预刺激可能通过 TLR2 诱导 THP-1 细胞上调 TLR 信号通路负调控因子 A20、SOCS1、SOCS3、IRAK3 等,从而抑制后续 LPS 诱发的炎症因子释放,实现诱导细胞对内毒素刺激的耐受,即通过 TLR2 和 TLR4 之间的交叉耐受来发挥其抑制炎症信号的作用^[27]。

本研究结果加深了对益生菌抑制宿主炎症反应分子机制的理解,为进一步将益生菌应用于临床提供了一定的理论基础。

[参考文献]

- [1] Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(3):171-184
- [2] Wells JM, Rossi O, Meijerink M, et al. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(Suppl 1):4607-4614
- [3] Wang J, Ouyang Y, Guner Y, et al. Ubiquitin-editing enzyme A20 promotes tolerance to lipopolysaccharide in enterocytes[J]. *J Immunol*, 2009, 183(2):1384-1392
- [4] Dimitriou ID, Clemenza L, Scotter AJ, et al. Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins[J]. *Immunol Rev*, 2008, 224(2):265-283
- [5] Xiong Y, Medvedev AE. Induction of endotoxin tolerance in vivo inhibits activation of IRAK4 and increases negative regulators IRAK-M, SHIP-1, and A20[J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 90(6):1141-1148
- [6] 徐栋花, 孙可一, 季晓辉. 乳酸杆菌对 LPS 诱导的 THP-1 细胞炎症性细胞因子释放的调节作用[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2011, 31(7):962-969
- [7] Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota-masters of host development and physiology[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(4):227-238
- [8] West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review[J]. *Crit Care Med*, 2002, 30(Suppl):S64-S73
- [9] Liew FY, Xu D, Brint EK, et al. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(6):446-458
- [10] Murray PJ, Smale ST. Restraint of inflammatory signaling by interdependent strata of negative regulatory pathways [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(10):916-924
- [11] Biswas A, Wilmanski J, Forsman H, et al. Negative regulation of Toll-like receptor signaling plays an essential role in homeostasis of the intestine[J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(1):182-194
- [12] Gay NJ, Gangloff M, O'Neill LA. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity [J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(3):104-109
- [13] Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling[J]. *Nature*, 2010, 465(7300):885-890
- [14] Fernandes-Alnemri T, Kang S, Anderson C, et al. Cutting edge: TLR signaling licenses IRAK1 for rapid activation of the NLRP3 inflammasome [J]. *J Immunol*, 2013, 191(8):3995-3999
- [15] Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling[J]. *Trends Immunol*, 2012, 33(9):449-458
- [16] Medvedev AE, Henneke P, Schromm A, et al. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4 [J]. *J Immunol*, 2001, 167(4):2257-2267
- [17] Cuschieri J, Billigren J, Maier RV. Endotoxin tolerance attenuates LPS-induced TLR4 mobilization to lipid rafts; a condition reversed by PKC activation[J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(6):1289-1297
- [18] Sato S, Nomura F, Kawai T, et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways [J]. *J Immunol*, 2000, 165(12):7096-7101
- [19] Levy E, Xanthou G, Petrakou E, et al. Distinct roles of TLR4 and CD14 in LPS-induced inflammatory responses of neonates[J]. *Pediatr Res*, 2009, 66(2):179-184
- [20] Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes[J]. *Science*, 2010, 327(5969):1135-1139
- [21] Boone DL, Turer EE, Lee EG, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(10):1052-1060
- [22] Oshima N, Ishihara S, Rumi MA, et al. A20 is an early responding negative regulator of Toll-like receptor 5 signalling in intestinal epithelial cells during inflammation [J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 159(2):185-198
- [23] Strebovsky J, Walker P, Lang R, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NF B signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus[J]. *FASEB J*, 2010, 25(3):863-874
- [24] Ramgolam VS, Markovic-Plese S. Regulation of suppressors of cytokine signaling as a therapeutic approach in autoimmune diseases, with an emphasis on multiple sclerosis[J]. *J Signal Transduct*, 2011, 2011:635721

- [25] Piao W, Song C, Chen H, et al. Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN--dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling[J]. *J Leukoc Bio*, 2009, 86(4):863-875
- [26] Hubbard LL, Moore BB. IRAK-M regulation and function in host defense and immune homeostasis[J]. *Infect Dis- ease Reports*, 2010, 2(1):e9
- [27] Saturnino SF, Prado RO, Cunha-Melo JR, et al. Endotoxin tolerance and cross-tolerance in mast cells involves TLR4, TLR2 and FcepsilonR1 interactions and SOCS expression; perspectives on immunomodulation in infectious and allergic diseases[J]. *BMC Infect Dis*, 2010, 10:240
- [收稿日期] 2014-04-08

本刊来稿题名和作者署名的注意事项

1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容,要符合编制题录、索引和检索的有关原则,并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字,必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号,尽量不出现数学式或化学式。

2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名,这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序,写法为:姓前名后,姓全部大写,名的首字母大写,其余字母小写,如 Zhou Ping, Shi Honglei;
- (4) 作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位,如“南京医科大学第一附属医院心内科”,“南京医科大学公共卫生学院流行病与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“*”,并在论文首页下补充基金的名称、编号,以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑:接雅俐)