文章编号:1000-5404(2010)09-0869-05

论著

氯喹对脂多糖/内毒素诱导的RAW264.7细胞TLR4-MyD88非依赖信号转导途径的抑制作用

王艳艳,刘 鑫,曹红卫,王 宁,鲁永玲,郑 江 (400038 重庆,第三军医大学西南医院综合实验研究中心)

[摘要] **目的** 探讨氯喹对脂多糖/内毒素(lipopolysaccharide/endotoxin,LPS)诱导TLR4-MyD88非依赖途径的抑制作用。**方法** MTT法检测不同浓度氯喹(5、10、20、40、60 μg/ml)对RAW264.7细胞活性的影响,ELISA检测培养体系中TNF-α、IL-6在2、6、12、18、24 h的释放情况,RT-PCR检测TNF-α、IL-6、TLR4、TRAM mRNA的表达,EMSA检测NF-κB的活性,Western blot检测IκBα磷酸化水平和IRF3的降解情况。**结果** 氯喹浓度小于40 μg/ml时对RAW264.7细胞活性无影响($P>0.05$);应用氯喹预处理后LPS诱导的RAW264.7细胞TNF-α、IL-6在蛋白水平和核酸水平均受到明显抑制($P<0.05$),TLR4和TRAM在核酸水平均受到显著抑制($P<0.01$);EMSA结果显示NF-κB的活化受到抑制,而Western blot检测显示IκBα磷酸化及IRF3的降解也受到抑制。**结论** 氯喹对LPS诱导的RAW264.7细胞TLR4-MyD88非依赖信号转导途径具有抑制作用。

[关键词] 氯喹;内毒素;核因子κB;干扰素调节因子3
[中图法分类号] R392.32; R631.202; R978.61 [文献标志码] A

Inhibition of chloroquine on TLR4-MyD88-independent signaling pathway in lipopolysaccharide/endotoxin-induced RAW264.7 cells

Wang Yanyan, Liu Xin, Cao Hongwei, Wang Ning, Lu Yongling, Zheng Jiang (Medical Research Centre, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the inhibitory effect of chloroquine on TLR4-MyD88-independent signaling pathway lipopolysaccharide/endotoxin (LPS)-induced RAW264.7 cells. **Methods** Effect of various chloroquine (5、10、20、40、60 μg/ml) concentrations on viability of RAW264.7 cells was detected by MTT test. TNF-α and IL-6 levels in culture supernatant were measured at 2, 6, 12, 18, 24 h by ELISA, and RT-PCR for the detection of expressions of TNF-α, IL-6, TLR4 mRNA and TRAM mRNA. EMSA was used to detect NF-κB activity. IκBα phosphorylation and IRF3 degradation were assayed by Western blotting. **Results** Chloroquine had no effect on the viability of RAW264.7 cells at a concentration of less than 40 μg/ml ($P>0.05$). The expression of TNF-α, IL-6, TLR4 and TRAM in LES-induced RAW264.7 cells at protein and mRNA level was significantly inhibited ($P<0.05$, $P<0.01$). EMSA showed that LPS inhibited the activity of NF-κB and Western blotting showed that LPS could suppress the phosporylation of IκBα and the degradation of IRF3. **Conclusion** Chloroquine inhibits TLR4-MyD88-independent signaling pathway in LPS-induced RAW264.7 cells.

[**Key words**] chloroquine; lipopolysaccharide; NF-κB; interferon regulation factor 3

Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China(30872681). Corresponding author: Zheng Jiang, Tel: 86-23-68754435, E-mail: zhengj@mail.tmmu.com.cn

脂多糖/内毒素(lipopolysaccharide/endotoxin,LPS)是革兰阴性菌细胞外膜的主要成分,LPS通过诱导单核-吞噬细胞系统的活化,大量释放TNF-α、IL-6等多种前炎症细胞因子,诱导脓毒症(sepsis)的发生。但目前国际上针对LPS介导的脓毒症尚无有效的防治措施,因此寻找有效的拮抗LPS措施、研究其作用机制具有重要的意义[1]。

Toll样受体家族(Toll-like receptors, TLRs)中的

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30872681)
[通信作者] 郑 江,电话:(023)68754435,E-mail:zhengj@mail.tmmu.com.cn

TLR4是单核-吞噬细胞系统识别细菌LPS的模式识别受体[2,3]。LPS介导的TLR4信号转导存在2条通路：MyD88依赖的信号转导通路和MyD88非依赖的信号转导通路[4-6]。最新研究显示MyD88依赖的信号转导通路的启动环节发生在细胞膜，而MyD88非依赖的信号转导通路的启动可能发生在早期内体内，TRAM不介导MyD88依赖的信号转导通路，而是通过其双侧分选信号将TLR4从质膜运送至早期内体，介导MyD88非依赖的信号转导通路[7]。

我们课题组和其他实验室的研究发现抗疟药物氯喹可通过影响细胞早期内体的成熟而抑制CpG DNA、LPS诱导的单核细胞活化[8-12]。有研究显示氯喹可通过抑制TLR4-MyD88依赖信号转导途径中NF-κB、AP-1的活化从而发挥抑制细胞因子如TNF-α的释放[13,14]，但有关氯喹是否抑制LPS诱导的TLR4-MyD88非依赖信号转导途径尚少见报道。因此，本研究通过研究氯喹对LPS诱导的TLR4-MyD88非依赖途径细胞因子IL-6的释放及其信号转导途径中重要分子的影响，探讨氯喹抑制LPS引起的炎症反应的作用机制，为寻找新的有效的脓毒症治疗措施奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

LPS(O55:B5)、氯喹为美国Sigma公司产品；IκBα抗体：美国Abcam公司产品；IRF3：美国Santa公司产品；EMSA试剂盒为美国Pierce公司产品；细胞蛋白抽提试剂盒为广州碧云天生物技术公司产品；RT-PCR引物：上海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；Model 550酶联分析仪、半干转印仪、Gel Doc 2000凝胶分析仪：美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将小鼠巨噬细胞株RAW264.7用96孔培养板加入含10%胎牛血清的DMEM培养液，置37 ℃，5% CO_2培养箱中。按实验设计将培养细胞分成3组(每组6复孔)：①空白组：用PBS处理作为空白对照组；②LPS处理组：100 ng/ml LPS处理；③氯喹+LPS组：20 μg/ml氯喹预处理1 h，再加100 ng/ml LPS共同处理。各组细胞在不同处理因素作用24 h后，收集上清和细胞。

1.2.2 氯喹工作浓度的选择 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测氯喹对RAW264.7细胞的毒性，选择氯喹的工作浓度。实验分2组：阴性对照组、氯喹处理组，每组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，1.0×10^6/ml细胞；培养2 h后氯喹处理组分别加入终浓度为5、10、20、40、60 μg/ml的氯喹，培养24 h；每孔中加入MTT(5 mg/ml) 20 μl，继续培养4 h；弃去培养液，加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μl，微量震荡约10 min，酶标仪490 nm处测定各孔光密度值D(490)。

1.2.3 ELISA检测TNF-α、IL-6蛋白的表达 使用20 μg/ml氯喹预处理接种在96孔板内的RAW264.7细胞1 h，经100 ng/ml LPS连续刺激，在不同时相点收集细胞培养上清，以100 ng/ml LPS单独处理为对照组。按照ELISA试剂盒说明操作，酶标仪450 nm波长下测D(450)值，以标准品浓度建立标准曲线，计算样品中TNF-α和IL-6蛋白的表达量。

1.2.4 RT-PCR检测TNF-α、IL-6、TLR4、TRAM mRNA的表达 取对数生长期细胞，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，引物序列合成见表1。PCR反应条件：94 ℃预变性3 min；94 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，共26个循环；72 ℃延伸5 min，产物4 ℃保存。PCR产物1%琼脂糖凝胶电泳。用Quantity One ChemiDoc XRS图像采集系统及分析软件对电泳条带进行分析处理，TNF-α、IL-6、TLR4、TRAM mRNA表达量用其条带校正容积与GAPDH校正容积之比表示。

表1 PCR引物序列

引物名称	序列	产物大小(bp)
TNF-α	上游引物 5′-CAGGTTCTGTCCCTTTCACTCACT-3′	217
	下游引物 5′-GTTCAGTAGACAGAAGAGCGTGGT-3′	
IL-6	上游引物 5′-ACCACGGCCTTCCCTACTT-3′	132
	下游引物 5′-CATTTCCACGATTTCCCAGA-3′	
TLR4	上游引物 5′-AAGGCATGGCATGGCTTACAC-3′	132
	下游引物 5′-GGCCAATTTTGTCTCCACAGC-3′	
TRAM	上游引物 5′-AGCCAGAAAGCAATAAGC-3′	188
	下游引物 5′-CAAACCCAAAGAACCAAG-3′	
GAPDH	上游引物 5′-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3′	660
	下游引物 5′-GTCTGGGATGGAAATTGTGA-3′	

1.2.5 EMSA检测NF-κB的活性变化 实验分3组：对照组、LPS组、氯喹+LPS组。氯喹20 μg/ml预先加入RAW264.7细胞作用1 h，加入LPS 100 ng/ml作用12 h，弃去上清，预冷PBS洗涤2次，提取细胞核蛋白。蛋白定量后取20 μg蛋白质至含20 fmol的生物素探针标记的NF-κB(5′-AGTTGAGGG-GACTTTCCCAGGC-3′)中，室温放置20 min，6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，蛋白-DNA-生物素复合物通过紫外交联仪交联至尼龙膜上，复合物经抗生物素蛋白链菌素-辣根过氧化物酶结合物孵育15 min，洗涤液4次洗涤，最后经化学发光底物和显色液显色，在凝胶成像仪中观察并分析结果。

1.2.6 Western印迹法检测IκBα、IRF3蛋白的表达 实验分3组：对照组、LPS组、氯喹+LPS组，氯喹20 μg/ml预先加入RAW264.7细胞作用1 h，加入LPS 100 ng/ml作用12 h，弃去上清，PBS洗涤2次，加入预冷的细胞裂解液500 μl，冰浴中匀浆粉碎，16 000×g 4 ℃离心30 min，取上清液。蛋白定量后取20 μg蛋白质行10% SDS-PAGE，转PVDF膜后，用脱脂奶粉室温封闭60 min，加入一抗4 ℃过夜，TBST充分漂洗5次，10 min/次，二抗37 ℃孵育1 h，TBST充分漂洗3次，10 min/次。加入ECL显色液，置于凝胶成像仪中观察并分析结果，CCD自动获取图像，同时小鼠β-actin作为内参照。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，所有数据应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析，组内比较采用 t 检验。

2 结果

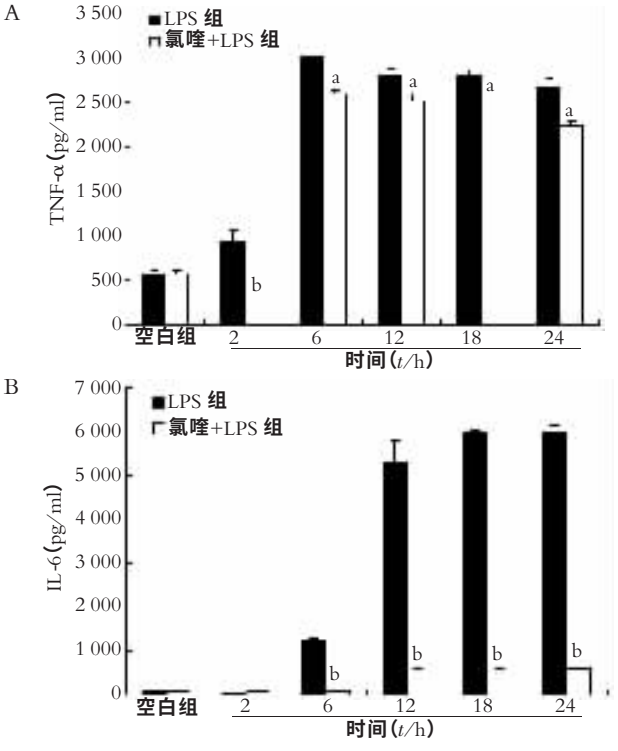
2.1 氯喹工作浓度的选择

正常细胞 MTT 检测其 D(490)为(1.90±0.16)，5、10、20、40、60 μg/ml 氯喹 D(490)分别为(1.96±0.07)、(1.91±0.05)、(1.83±0.11)、(1.64±0.14)、(0.89±0.37)。与正常对照组比较，当氯喹浓度小于 40 μg/ml 时，RAW264.7 细胞活力无明显变化($P>0.05$)。因此，我们将氯喹的工作浓度定为 20 μg/ml。

2.2 氯喹对 LPS 诱导的 TNF-α、IL-6 释放的抑制作用

RAW264.7 细胞在未给予 LPS 刺激时，细胞培养上清中 TNF-α 释放量很低，LPS 100 ng/ml 持续作用 RAW264.7 细胞 24 h，在 6 h TNF-α 分泌达到峰值，随后逐渐降低。应用氯喹预处理 1 h 后再用 LPS 刺激，TNF-α 释放量较单纯 LPS 刺激组显著降低($P<0.05$，图 1A)。

RAW264.7 细胞在未给予 LPS 刺激时，细胞培养上清中 IL-6 释放量很低，LPS 100 ng/ml 作用 24 h，IL-6 分泌量随时间的增加而增加；用氯喹预处理 1 h 后再经 LPS 100 ng/ml 作用 24 h，IL-6 释放量较单纯 LPS 刺激组显著降低($P<0.01$，图 1B)。结果显示氯喹可明显降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌细胞因子的作用，尤其以降低 IL-6 释放能力为显著。

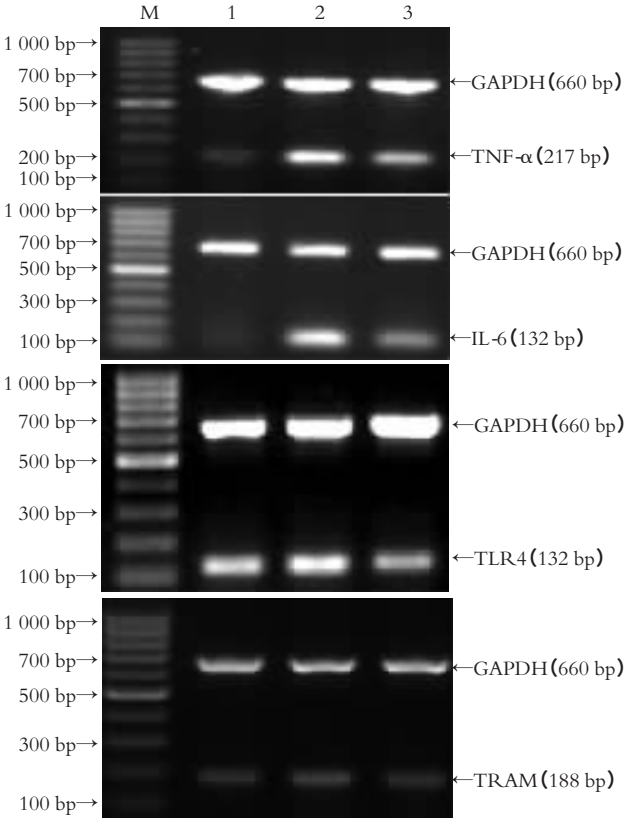


A：氯喹对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α 的影响；B：氯喹对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞分泌 IL-6 的影响；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 LPS 组比较

图 1 氯喹对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 分泌 TNF-α、IL-6 的抑制作用

2.3 氯喹对 LPS 诱导的 TNF-α 与 IL-6 mRNA 表达的抑制作用

RT-PCR 结果显示，RAW264.7 细胞在未给予 LPS 刺激时，TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达水平很低，而 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后，TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达水平明显高于对照组；氯喹预处理 RAW264.7 细胞，再以 LPS 刺激，其 TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达水平较 LPS 组明显下调($P<0.05$，图 2，表 2)，氯喹能显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 TNF-α、IL-6 在核酸水平的表达。



M：DNA 标准(DL 1000)；1：阴性对照组；2：LPS 组；3：氯喹+LPS 组

图 2 RT-PCR 检测氯喹对 RAW264.7 细胞 TNF-α、IL-6、TLR4、TRAM mRNA 表达的影响

表 2 氯喹对 RAW264.7 细胞 TNF-α、IL-6、TLR4、TRAM mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α	IL-6	TLR4	TRAM
阴性对照组	0.18±0.02[b]	0.18±0.05[b]	0.69±0.08[a]	0.36±0.02[b]
LPS 组	0.98±0.08	1.08±0.04	0.79±0.03	0.48±0.07
氯喹+LPS 组	0.70±0.04[a]	0.60±0.16[a]	0.49±0.02[b]	0.36±0.05[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 LPS 组比较

2.4 氯喹对 LPS 诱导的 TLR4 mRNA 表达的抑制作用

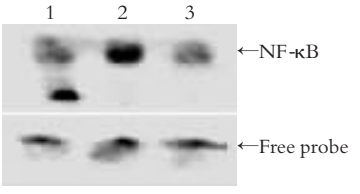
RT-PCR 结果显示，RAW264.7 细胞在未给予 LPS 刺激时，TLR4 mRNA 有一定的基础表达量，而 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后，TLR4 mRNA 表达水平高于对照组；氯喹预处理 RAW264.7 细胞，再以 LPS 刺激，其 TLR4 mRNA 表达水平较 LPS 组有明显下调($P<0.01$，图 2，表 2)，说明氯喹能显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 TLR4 在核酸水平的表达。

2.5 氯喹对LPS诱导的TRAM mRNA表达的抑制作用

RT-PCR结果显示,RAW264.7细胞在未给予LPS刺激时,TRAM mRNA表达水平很低,而LPS刺激RAW264.7细胞后,TRAM mRNA表达水平明显高于对照组;氯喹预处理RAW264.7细胞,再以LPS刺激,其TRAM mRNA表达水平较LPS组明显下调($P<0.01$,图2,表2)。提示氯喹对LPS诱导的TRAM mRNA的表达有抑制作用。

2.6 氯喹抑制NF-κB的活化

EMSA结果显示,经LPS刺激12 h后,细胞核NF-κB较对照组明显升高;氯喹预处理后,再经LPS刺激12 h,NF-κB的活性较LPS组明显下降(图3)。提示氯喹抑制RAW264.7的活性可能与抑制NF-κB活化有关。

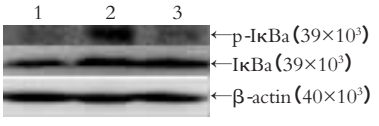


1:阴性对照组;2:LPS组;3:氯喹+LPS组

图3 EMSA检测氯喹对LPS诱导的RAW264.7细胞NF-κB活性的影响

2.7 Western blot检测氯喹对LPS诱导的IκBα磷酸化水平的影响

通过EMSA实验我们发现氯喹能抑制NF-κB活化,因此我们检测其上游IκBα分子的磷酸化水平。结果显示LPS组p-IκBα较阴性对照组明显升高,而氯喹+LPS组无明显差异(图4)。提示氯喹能抑制IκBα的磷酸化水平,从而抑制NF-κB的活化及相关基因的转录。

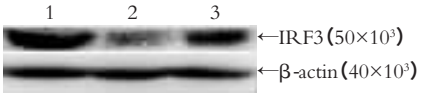


1:阴性对照组;2:LPS组3:氯喹+LPS组

图4 Western blot检测氯喹对LPS诱导的RAW264.7细胞IκBa磷酸化的抑制作用

2.8 Western blot检测氯喹对LPS诱导的IRF3的影响

实验结果显示LPS组较对照组明显下降,提示经LPS刺激后,IRF3有部分降解。氯喹+LPS组较对照组略有下降,而与LPS组比较则IRF3降解减少(图5)。提示氯喹能抑制IRF3的降解,从而影响后续细胞因子的释放。



1:阴性对照组;2:LPS组;3:氯喹+LPS组

图5 Western blot检测氯喹对LPS刺激RAW264.7细胞IRF3降解的抑制作用

3 讨论

脓毒症是由感染因素引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)。近年来大量研究证实,许多病原体如细菌、真菌的菌体成分均能介导脓毒症的发生,其中由G^-菌、G^+菌介导的脓毒症占95%以上[15]。存在于G^-细菌外膜的脂多糖/内毒素作为重要的病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),其诱导脓毒症发生的能力最强,在脓毒症的病理生理过程中发挥非常重要的作用[16]。因此,对LPS的研究成为脓毒症研究领域的焦点。TLR4是单核-吞噬细胞系统识别细菌LPS的模式识别受体。LPS介导的TLR4信号转导存在2条通路:MyD88依赖/非依赖的信号转导通路。有研究显示氯喹可通过抑制TLR4-MyD88依赖信号转导途径抑制TNF-α的释放[14],但对氯喹是否抑制LPS诱导的TLR4-MyD88非依赖信号转导途径尚少见报道。我们的研究发现应用氯喹后,TNF-α和IL-6的蛋白水平及RNA水平都被显著抑制($P<0.05$),且对IL-6的抑制效果更为显著($P<0.01$)。因此我们研究提出氯喹不仅对LPS诱导的TLR4-MyD88依赖途径具有抑制作用,而且对TLR4-MyD88非依赖途径也有抑制作用。为排除氯喹抑制LPS诱导的RAW264.7细胞的活化可能与其非特异性的细胞毒性有关,我们通过MTT实验,在所有实验中应用的氯喹浓度(20 μg/ml)均远低于其最低细胞毒性浓度(40 μg/ml)。

TLR4是单核-吞噬细胞系统识别细菌LPS的模式识别受体。LPS通过活化TLR4介导的2条信号通路调节细胞因子的释放。文献[7]报道TLR4-MyD88非依赖途径的启动需要LPS-TLR4复合物通过网格蛋白依赖的途径内化入胞,进而启动后续信号分子的活化。本研究首先观察了早期内体成熟抑制剂氯喹对LPS诱导的TLR4 mRNA的抑制作用,结果显示氯喹能够显著抑制LPS诱导的RAW264.7细胞TLR4 mRNA的表达($P<0.05$)。

TRAM是MyD88非依赖的信号转导通路中TRIF相关的接头分子,是激活TRIF,活化IRF3、NF-κB等信号通路必不可少的重要衔接分子[17]。研究显示TRAM特异性介导了TLR4-MyD88非依赖的信号转导途径,而对TLRs中的其他受体无作用[18]。我们的研究显示氯喹能抑制LPS诱导的RAW264.7细胞TRAM mRNA的表达($P<0.05$),提示氯喹抑制细胞因子的释放与TLR4介导的MyD88非依赖的信号转导通路密切相关,而且与下调TRAM mRNA的表达有关。

在MyD88非依赖的信号转导通路中,IRF3是一个重要的诱导抗病毒基因转录的转录因子,可以诱导

一系列干扰素刺激因子的转录[19]。我们的研究发现氯喹对IRF3也具有抑制作用。

NF-κB是一类重要的核转录因子,它可调控细胞的增殖、凋亡、恶性转化及浸润和转移[20]。在正常细胞中,NF-κB主要分布于细胞质中,与其抑制物IκBα相结合,使其滞留在细胞质内呈非活性状态。当细胞受到刺激时(如炎性因子、细胞因子等),胞外信号经过膜受体转导至细胞质,可以激活特异的蛋白激酶(包括IKK-1、IKK-2、NIK 3种激酶),从而使IκBα磷酸化,磷酸化的IκBα泛素化后,随即被蛋白酶体降解,从而使NF-κB被释放,发生核转位,进入细胞核,启动相关基因的转录。我们通过Western blot检测IκBα的磷酸化水平,发现氯喹能抑制IκBα的磷酸化水平。随即我们检测IκBα的磷酸化被抑制后,NF-κB的活性变化情况,EMSA结果显示应用氯喹预处理12 h后,NF-κB的活性较LPS组明显下降,NF-κB的活化受到抑制。因此,研究提示氯喹可通过抑制MyD88非依赖的信号转导通路中的IKK信号通路的活化,从而抑制细胞因子如IL-6的释放。

综上所述,本研究提示氯喹可能通过抑制TLR4介导的MyD88非依赖的信号转导通路中NF-κB活化和IRF3的降解,而抑制细胞因子的释放,从而达到抑制炎症反应的作用。本研究为氯喹抑制LPS引起的炎症反应提供了实验依据,为寻找有效的拮抗内毒素措施奠定了实验基础。

参考文献:

[1] 郑江, 周红, 鲁永玲, 等. 氯喹对内毒素血症小鼠的保护作用以及对细胞因子的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(5): 391-393.

[2] Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors[J]. Semin Immunol, 2007, 19(1): 3-10.

[3] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, *et al*. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product[J]. J Immunol, 1999, 162(7): 3749-3752.

[4] Martin G S, Mannino D M, Eaton S, *et al*. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000[J]. N Engl J Med, 2003, 348(16): 1546-1554.

[5] Kagan J C, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling[J]. Cell, 2006, 125(5): 943-955.

[6] Lu Y C, Yeh W C, Ohashi P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway[J]. Cytokine, 2008, 42(2): 145-151.

[7] Kagan J C, 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.

[8] Brown W J, Constantinescu E, Farquhar M G. Redistribution of mannose-6-phosphate receptors induced by tunicamycin and chloroquine[J]. J Cell Biol, 1984, 99(1 Pt 1): 320-326.

[9] Lee K S, Scanga C A, Bachelder E M, *et al*. TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to Streptococcus pneumoniae[J]. Cell Immunol, 2007, 245(2): 103-110.

[10] Wang J, Zhou H, Zheng J, *et al*. The antimalarial artemisinin synergizes with antibiotics to protect against lethal live Escherichia coli challenge by decreasing proinflammatory cytokine release[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(7): 2420-2427.

[11] Li B, Zhang R, Li J, *et al*. Antimalarial artesunate protects sepsis model mice against heat-killed Escherichia coli challenge by decreasing TLR4, TLR9 mRNA expressions and transcription factor NF-kappa B activation[J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(3): 379-389.

[12] Fu J, Cao H, Wang N, *et al*. An anti-sepsis monomer, 2′, 5, 6′, 7-tetrahydroxyflavanonol (THF), identified from Scutellaria baicalensis Georgi neutralizes lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo*[J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(12): 1652-1657.

[13] Weber S M, Chen J M, Levitz S M. Inhibition of mitogen-activated protein kinase signaling by chloroquine[J]. J Immunol, 2002, 168(10): 5303-5309.

[14] Zhou H, Zheng J, Wang L, *et al*. Chloroquine protects mice from challenge with CpG ODN and LPS by decreasing proinflammatory cytokine release[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(2): 223-234.

[15] Russell J A. Management of sepsis[J]. N Engl J Med, 2006, 355(16): 1699-1713.

[16] Krieg A M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects[J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20: 709-760.

[17] Palsson-McDermott E M, Doyle S L, McGettrick A F, *et al*. TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway[J]. Nat Immunol, 2009, 10(6): 579-586.

[18] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, *et al*. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway[J]. Nat immunol, 2003, 4(11): 1144-1150.

[19] Sung B, Pandey M K, Aggarwal B B. Fisetin, an inhibitor of cyclin-dependent kinase 6, down-regulates nuclear factor-kappaB-regulated cell proliferation, antiapoptotic and metastatic gene products through the suppression of TAK-1 and receptor-interacting protein-regulated IkappaBalpha kinase activation[J]. Mol Pharmacol, 2007, 71(6): 1703-1714.

[20] Suh H S, Zhao M L, Choi N, *et al*. TLR3 and TLR4 are innate antiviral immune receptors in human microglia: role of IRF3 in modulating antiviral and inflammatory response in the CNS[J]. Virology, 2009, 392(2): 246-259.

(收稿:2009-12-16;修回:2010-01-07)

(编辑 王 红)