文章编号:1000-5404(2010)12-1271-04

论著

TLR4 及 MD2 反义基因对内毒素诱导的肺泡Ⅱ型细胞活化的影响

李永旺[1],麻 莉[2],张德明[3],钱桂生[3] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院:麻醉科[1],呼吸科[3];100088 北京,第二炮兵总医院妇产科[2])

[摘要] **目的** 观察 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)及 myeloid differentiation protein 2(MD2)反义基因对内毒素(lipopolysaccharide,LPS)诱导的肺泡Ⅱ型细胞 NF-κB 活化的影响。**方法** 培养的肺泡Ⅱ型细胞分为:正常细胞(对照)组、LPS 组、LPS + 转染空载体组、LPS + 转染 TLR4 反义基因组、LPS + 转染 MD2 反义基因组、LPS + 转染 TLR4-MD2 反义基因组($n = 8$)。Northern blot 检测转染细胞的 TLR4 及 MD2 mRNA 表达,Western blot 检测转染细胞 TLR4 及 MD2 蛋白表达,电泳迁移率改变法检测 NF-κB 的活性,ELISA 测定细胞培养上清中 TNF-α 和 IL-6 含量。**结果** 与对照组比较,LPS 刺激后的细胞 TLR4 及 MD2 mRNA 和蛋白表达、NF-κB 活性、TNF-α 和 IL-6 的生成均显著增加($P < 0.01$);而转染反义基因组细胞与其他 LPS 刺激组比较,TLR4 及 MD2 mRNA 和蛋白的表达、NF-κB 活性及 TNF-α 和 IL-6 的含量均明显降低($P < 0.01$)。**结论** TLR4 及 MD2 反义基因能有效抑制 LPS 诱导的肺泡Ⅱ型细胞的活化。

[关键词] 内毒素类;肺泡;上皮细胞;细胞, 培养的;受体,细胞表面;信号转导;Toll 样受体 4;MD2
[中图法分类号] R322.35;R392-33;R392.2 **[文献标志码]** A

TLR4 and MD2 antisense genes suppress activation of alveolar type Ⅱ epithelial cells induced by lipopolysaccharide

Li Yongwang[1], Ma Li[2], Zhang Deming[3], Qian Guisheng[3] ([1]Department of Anesthesiology, [3]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Gynecology and Obstetrics, General Hospital of Second Artillery Army, Beijing, 100088, China)

[Abstract] **Objective** To observe effects of the antisense genes of Toll-like receptor 4 (TLR4) and myeloid differentiation protein-2 (MD2) on the activation of NF-κB in alveolar type Ⅱ epithelial cells (AT Ⅱ cells) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Cultured AT Ⅱ cells were randomized to normal cells (control) group, LPS group, LPS + empty vector group, LPS + TLR4 antisense gene group, LPS + MD2 antisense gene group, LPS + TLR4-MD2 antisense gene group. The expressions of TLR4 and MD2 mRNA and protein in AT Ⅱ cells were detected by Northern blotting and Western blotting respectively. The activity of NF-κB in AT Ⅱ cells was measured with electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The TNF-α and IL-6 concentrations in the supernatant of cultured AT Ⅱ cells were tested with ELISA. **Results** Compared with control groups, the expressions of TLR4 and MD2 mRNA and protein, the NF-κB activity, the levels of TNF-α and IL-6 were increased remarkably in LPS group and LPS + empty vector group ($P < 0.01$). After stimulating with the antisense genes, the expressions of TLR4 and MD2 mRNA and protein, the NF-κB activity, the levels of TNF-α and IL-6 were decreased remarkably than in LPS and LPS + empty vector group ($P < 0.01$). **Conclusion** The antisense gene of TLR4 and MD2 can inhibit activation of AT Ⅱ cells induced by LPS.

[Key words] lipopolysaccharides; pulmonary alveoli; epithelial cells; cells, cultured; receptors, cell surface; signal transduction; Toll-like receptor 4; myeloid differentiation protein-2

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (39730210). Corresponding author: Li Yongwang, Tel: 86-23-68774980, E-mail: malyw@163.com

我们的前期研究[1]证实,在内毒素(lipopolysaccharide,LPS)所致肺急性炎症反应过程中,肺泡Ⅱ型上皮细胞(alveolar type Ⅱ epithelial cells, AT Ⅱ cells)被

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(39730210)
[通信作者] 李永旺,电话:(023)68774980,E-mail:malyw@163.com

激活并且表达有 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)及 myeloid differentiation protein 2(MD2)受体,显示 TLR4 及 MD2 可能参与了 LPS 介导的肺泡Ⅱ型上皮细胞活化,为进一步研究 TLR4 及 MD2 在 LPS 激活肺泡Ⅱ型上皮细胞的过程中的作用,我们用构建的 TLR4 及 MD2 反义表达载体转染了肺泡Ⅱ型上皮细胞,并观察了其对 LPS 激活肺泡Ⅱ型上皮细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

LPS(*E. coli* serotype 055: B5)购自 Sigma 公司、[γ-32p]ATP 购自北京福瑞公司,TNF-α 和 IL-6 ELISA 检测试剂盒购自晶美生物,RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物,RNA 提取试剂(Tripue)购自罗氏公司,凝胶电泳迁移分析系统(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)检测试剂盒购自 Promega 公司。DOTAP 转染试剂购自美国 Roche 公司,抗人 TLR4 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,Northern blot、Western blot 试剂盒购自武汉博士德公司,其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肺泡Ⅱ型上皮细胞培养参照文献[2]方法进行。

1.2.2 载体构建 TLR4 及 MD2 反义基因的构建参照文献[3]进行。

1.2.3 基因转染 细胞培养 24 h 后,用脂质体包裹的质粒转染细胞,分为正常细胞(对照)组、LPS 组、LPS + 转染空载体组、LPS + 转染 TLR4 反义基因组,LPS + 转染 MD2 反义基因组,LPS + 同时转染 TLR4 及 MD2 反义基因组。具体转染过程按试剂盒说明书进行:取 30 μl DOTAP 与 5 μg 质粒混合成 DNA-脂质体混合物,15 ~ 25 ℃放置 10 ~ 15 min,加无血清 DMEM 培养基 1 ml,混匀,覆加到Ⅱ型上皮细胞表面,培养箱内培养 10 h 后,弃去转染液,再加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 24 h 后,转为无血清 DMEM 培养,同时加入 LPS 1 μg/ml(正常对照组细胞不加),继续培养 2 h 后,提取细胞核蛋白,总 RNA 和蛋白。

1.2.4 Northern blot 检测转染细胞的 TLR4 及 MD2 mRNA 表达 TLR4 及 MD2 cDNA 探针的制备:根据 Genbank 中 TLR4 (ACCESSION NM_138554)及 MD2(ACCESSION NM_015364)的基因序列用引物设计软件 Primer Premier 5 设计引物,TLR4:P1: 5′-AGCCCTGGGAGCCTTTTCTGG-3′, P2: 5′-CAAATTGCACAGGCCCTCTAG-3′,扩增产物长度 499 bp,56 ℃。MD2:P1: 5′-ACCTACTGTGAATAAAATGCAATACC-3′, P2: 5′-TTTGAATTAGGTTGGTGTAGGATGA-3′ 扩增产物长度 337 bp,56 ℃。探针的标记和 Northern blot 均按试剂盒说明进行。

1.2.5 Western blot 鉴定转染细胞 TLR4 蛋白表达 总蛋白的提取:倒掉培养液,并用 PBS 冲洗培养瓶,每 100 毫米培养瓶加 RIPA 0.6 ml,于 4 ℃轻轻摇动 15 min, 用细胞刮器刮下黏附的细胞,用 0.3 ml RIPA 冲洗培养瓶,将细胞裂解液合并在一起,加 10 μl PMSF,冰上孵育 30 ~ 60 min,10 000 × *g*、4 ℃离心 10 min,上清 -70 ℃保存。Western blot 具体操作方法按试剂盒说明书进行。结果经扫描仪扫入计算机中,然后用 Image Tool 系统进行分析,以积分灰度值表示蛋白的相对表达。

1.2.6 NF-κB 活性检测 EMSA 检测 NF-κB 的活性,具体检测方法按文献[4]进行,结果经扫描仪扫入计算机中,然后用 Image Tool 系统进行分析,以积分灰度值表示 NF-κB 的活性变化。

1.2.7 ELISA 测定细胞培养上清中 TNF-α 和 IL-6 含量 具体检测方法按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件,组间比较采用多个均数之间两两比较的单因素方差分析,方差齐者采用 LSD-*t* 检验,方差不齐者采用 Dunnett *t* 检验。

2 结果

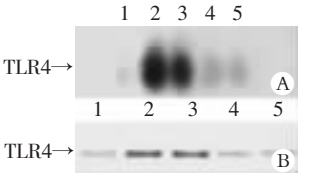
2.1 LPS 刺激对转染细胞的 TLR4 蛋白表达的影响

经 LPS 刺激后,未转染细胞及转染空载体的细胞与对照组比较,TLR4 mRNA 和蛋白的表达明显增强($P < 0.01$);转染 TLR4 及同时转染 TLR4 及 MD2 反义基因的细胞与未转染组比较,TLR4 mRNA 和蛋白的表达明显减弱($P < 0.01$);而转染空载体的细胞与未转染组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1,图 1。

表 1 TLR4 反义基因对各组细胞 TLR4 mRNA 和蛋白表达的影响($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	mRNA 表达	蛋白表达
对照组	10.16 ± 1.63	24.44 ± 6.90
LPS 组	108.81 ± 28.21[a]	88.75 ± 30.87[a]
LPS + 转染空载体组	98.75 ± 21.91[a]	88.04 ± 33.26[a]
LPS + 转染 TLR4 反义基因组	26.46 ± 4.51[ab]	35.10 ± 5.90[ab]
LPS + 同时转染 TLR4 及 MD2 反义基因组	23.61 ± 3.46[ab]	36.48 ± 3.12[ab]

a:$P < 0.01$,与对照组比较;b:$P < 0.01$,与 LPS 组和 LPS + 转染空载体组比较



1:对照组; 2:LPS 组;3:LPS + 转染空载体组;4:LPS + 转染 TLR4 反义基因组;5:LPS + 同时转染 TLR4 及 MD2 反义基因组

A:Northern blot 检测 TLR4 mRNA 表达;B:Western blot 检测 TLR4 蛋白表达

图 1 TLR4 反义基因对各组细胞 TLR4 mRNA 和蛋白表达的影响

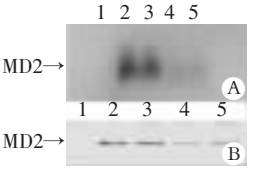
2.2 LPS 刺激对转染细胞 MD2 mRNA 和蛋白表达的影响

经 LPS 刺激后,未转染细胞及转染空载体的细胞与对照组比较,MD2 mRNA 和蛋白的表达明显增强;转染 MD2、转染 TLR4 及 MD2 反义基因的细胞与未转染组比较,MD2 mRNA 和蛋白的表达明显减弱($P < 0.01$);而转染空载体的细胞与未转染组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2,图 2。

表 2　MD2 反义基因对各组细胞 MD2 mRNA 和蛋白表达的影响($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	mRNA 表达	蛋白表达
对照组	0	0
LPS 组	81.54 ± 11.40	40.61 ± 10.95
LPS + 转染空载体组	85.81 ± 6.26	44.47 ± 14.28
LPS + 转染 MD2 反义基因组	37.46 ± 4.16[a]	23.68 ± 3.87[a]
LPS + 同时转染 TLR4 及 MD2 反义基因组	36.08 ± 2.15[a]	27.66 ± 6.08[a]

a:$P<0.01$,与 LPS 组和 LPS + 转染空载体组比较



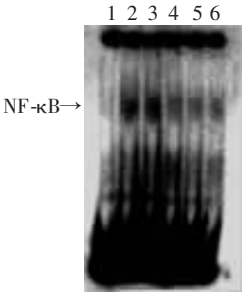
1:对照组;2:LPS 组;3:LPS + 转染空载体组;4:LPS + 转染 MD2 反义基因组;5:LPS + 同时转染 TLR4 及 MD2 反义基因组

A:Northern blot 检测 MD2 mRNA 表达;B:Western blot 检测 MD2 蛋白表达

图 2　MD2 反义基因对各组细胞 MD2 mRNA 和蛋白表达的影响

2.3　LPS 刺激对转染细胞 NF-κB 活性的影响

经 LPS 刺激后,各组细胞与对照组(52.14 ± 6.67)比较,NF-κB 活性明显增强($P<0.01$)。转染 TLR4(123.43 ± 4.80)、MD2(106.49 ± 11.53)及共同转染 TLR4 和 MD2(108.40 ± 10.69)反义基因的细胞与未转染组(146.92 ± 6.43)比较,NF-κB 活性明显减弱($P<0.01$),而转染空载体(145.92 ± 5.84)的细胞与未转染组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);同时转染 TLR4 及 MD2、单独转染 MD2 反义基因的细胞与单独转染 TLR4 反义基因的细胞比较,NF-κB 活性有显著下降($P<0.05$)。同时转染 TLR4 及 MD2 反义基因的细胞与单独转染 MD2 反义基因的细胞组比较,NF-κB 活性无显著变化($P>0.05$,图 3)。



1:对照组;2:LPS 组;3:LPS + 转染空载体组;4:LPS + 转染 TLR4 反义基因组;5:LPS + 转染 MD2 反义基因组;6:LPS + 同时转染 TLR4 及 MD2 反义基因组

图 3　EMSA 检测各组细胞 NF-κB 活性

2.4　LPS 刺激对转染细胞 TNF-α 和 IL-6 生成的影响

经 LPS 刺激后,各组细胞与对照组比较,细胞培养上清中 TNF-α 和 IL-6 的含量均显著增加($P<0.01$);转染 TLR4、MD2 及同时转染 TLR4 及 MD2 反义基因的细胞与未转染组比较,细胞培养上清中 TNF-α 和 IL-6 的含量明显减少($P<0.01$);而转染空载体的细胞与未转染组比较,无明显差异;同时转染 TLR4 及 MD2、单独转染 MD2 反义基因的细胞与单独转染 TLR4 反义基因的细胞比较,细胞培养上清中 TNF-α 和 IL-6 的含量有显著下降($P<0.01$)。同时转染 TLR4 及 MD2 反义基因的细胞与单独转染 MD2 反义基因的细胞组比较,TNF-α 和 IL-6 的含量无显著变化(表 3)。

表 3　TLR4 及 MD2 反义基因对各组细胞 TNF-α 和 IL-6 生成的影响(pg/ml, $n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α	IL-6
对照组	24.88 ± 4.79	6.08 ± 3.04
LPS 组	180.17 ± 19.84[a]	89.50 ± 17.84[a]
LPS + 转染空载体组	174.83 ± 12.42[a]	86.17 ± 14.91[a]
LPS + 转染 TLR4 反义基因组	102.04 ± 8.36[ab]	60.84 ± 9.01[ab]
LPS + 转染 MD2 反义基因组	88.52 ± 6.93[ac]	47.82 ± 6.61[ac]
LPS + 同时转染 TLR4 及 MD2 反义基因组	89.67 ± 8.94[ac]	49.37 ± 11.37[ac]

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 LPS 组比较;c:$P<0.01$,与 LPS + 转染 TLR4 反义基因组比较

3　讨论

本实验通过转染 TLR4 及 MD2 反义基因来观察其对 LPS 炎症信号的影响,结果发现,我们所构建的反义表达载体转染细胞后能有效地抑制靶基因 mRNA 和蛋白的表达。对靶 mRNA 的抑制可能是反义表达载体在细胞内产生反义 RNA,与靶 mRNA 形成双链体。这样既可阻止 mRNA 从核的转运和与核糖体结合的过程,又可根据反义与正义 RNA 在细胞中的位置而引起 RNase 对反义 RNA-mRNA 双链体的降解;而对靶蛋白的抑制可能由于抑制了 mRNA 从而导致蛋白表达减少。而从实验结果来看,mRNA 的抑制作用较蛋白更为明显,分析原因可能是:Northern blot 特异性较好而敏感性较差,而且 RNA 在提取、电泳及转膜等过程中容易发生降解,以至于微量的 mRNA 检测不出;蛋白相对比较稳定,不容易降解,且 Western blot 的敏感性和特异性均较好;TLR4 蛋白固定表达在细胞膜上(即正常情况下就有表达),反义基因无法抑制这一部分蛋白,只能抑制经 LPS 刺激后增强表达的那一部分蛋白。这也是反义基因的优点所在,因为 TLR4 所介导的 LPS 炎症反应是机体自我保护反应的一部分,如果完全把它阻断也有可能对机体造成不利影响。我们通过 Northern blot 和 Western blot 均未在正常细胞中检测到 MD2 的表达,但在以前实验[1]中通过 RT-PCR 却检测到正常细胞中有 MD2 mRNA 的表达,这可能由于正常细胞 MD2 的表达极少,Northern blot 和 Western blot 无法检测出,而 RT-PCR 相对比较敏感的缘故,也可能是由于 RT-PCR 的非特异性结果造成的。

本实验中还观察了 LPS 炎症信号通路中的下游信号分子 NF-κB 的活性变化及细胞因子的产生情况。结果发现,转染组细胞受 LPS 刺激后与未转染组相比,NF-κB 的活性明显降低,细胞因子的生成也明显减少。这与反义基因抑制靶基因的表达相一致,由于

TLR4及MD2表达的降低,致使传至NF-κB的炎症信号减弱,最终导致炎性细胞因子的生成减少。抑制MD2基因同抑制TLR4基因一样能抑制NF-κB的活性,说明MD2在LPS激活肺泡上皮细胞的过程中同样起着重要作用;而且单纯抑制MD2基因与单纯抑制TLR4基因相比,NF-κB活性被抑制的程度明显增强,对细胞因子生成的抑制作用也明显增强;这可能由于抑制了MD2之后,不仅抑制了LPS诱导的TLR4-MD2信号通路,还有可能抑制了LPS诱导的MD2辅助下的TLR2-MD2信号通路。这说明TLR4-MD2信号通路可能不是LPS激活Ⅱ型细胞的唯一通路。同时抑制TLR4和MD2基因却没有得到两者叠加的效应,原因有待探讨。而且NF-κB活性和细胞因子生成的抑制作用也并没有想象中的那么理想,进一步说明TLR4-MD2信号通路可能不是LPS激活Ⅱ型细胞的唯一通路。目前的研究主要考虑的是上皮细胞通过胞外的受体被激活,而细菌也可以发生内在化(internalization)或穿透上皮细胞(penetration),这样LPS就有可能直接呈递给胞内的受体而激活细胞。目前已知,LPS诱导的肠上皮细胞NF-κB和c-Jun-terminal kinase(JNK)的活化就是通过侵入肠上皮细胞内的弗氏痢疾杆菌引起的,而胞外的细菌无法激活肠上皮细胞[5];似乎是一种细胞质植物疾病抗性样蛋白(cytosolic plant disease resistance-like protein)CARD/Nod1介导了这一过程[6]。这说明上皮细胞除了细胞膜受体能够传递信号外,胞内也可能有传递信号的模式识别受体。肺泡Ⅱ型上皮细胞的活化能否直接通过胞内受体途径来介导尚待研究。

综上所述,在LPS激活Ⅱ型细胞的过程中,TLR4及MD2介导了LPS的炎症信号传导通路,当然也不排除其他通路的存在。在全身炎症反应综合征中,肺之所以是最容易受损伤的靶器官,其原因除了肺血管丰富、肺内扣押的中性白细胞,肺泡巨噬细胞在炎症期间大量活化,释放大量炎性介质[7-11]。除此之外,Ⅱ型细胞的活化也起着不可忽视的作用[12,13]。其适度的活化对机体是有利的,然而过度活化就可能造成Ⅱ型上皮细胞的损伤破坏。由于Ⅱ型细胞不仅合成表面活性物质,而且位于Ⅱ型细胞基侧膜的Na^+-K^+-ATP酶和位于Ⅱ型细胞顶质膜的氨氯吡咪敏感性钠通道还参与肺泡腔内游离水的主动转运,维持肺泡腔处于相对"干燥"状态,利于气体交换[14-17]。Ⅱ型细胞过度活化造成的损伤将会造成表面活性物质合成的减少和钠、水主动转运功能的丧失,造成肺功能严重损害,最终可能导致急性呼吸窘迫综合征。TLR4及MD2反义基因对LPS激活Ⅱ型细胞效应的抑制作用可为急性肺损伤的防治提供有益的探索。

参考文献:

[1] 李永旺, 张德明, 钱桂生, 等. TLR4在内毒素激活肺泡Ⅱ型上皮细胞过程中的表达及可能作用机制[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(10): 863-866.

[2] 李永旺, 杨天德, 刘桥义. 异氟醚对原代培养的肺泡Ⅱ型上皮细胞合成表面活性物质的影响[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(5): 516-518.

[3] 李永旺, 李淑萍, 钱桂生, 等. 人TLR4及MD2基因反义真核表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(7): 601-603.

[4] 李永旺, 张德明, 钱桂生, 等. MD2在内毒素激活肺泡Ⅱ型上皮细胞中的表达及作用[J]. 重庆医学, 2007, 36(16): 1582-1584, 1586.

[5] Philpott D J, Yamaoka S, Israel A, *et al*. Invasive Shigella flexneri activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells[J]. J Immunol, 2000, 165(2): 903-914.

[6] Girardin S E, Tournebize R, Mavris M, *et al*. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri[J]. EMBO Rep, 2001, 2(8): 736-742.

[7] Hu G, Malik A B, Minshall R D. Toll-like receptor 4 mediates neutrophil sequestration and lung injury induced by endotoxin and hyperinflation[J]. Crit Care Med, 2010, 38(1): 194-201.

[8] He Z, Zhu Y, Jiang H. Inhibiting tolL-like receptor 4 signaling ameliorates pulmonary fibrosis during acute lung injury induced by lipopolysaccharide: an experimental study[J]. Respir Res, 2009, 10: 126.

[9] Togbe D, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, *et al*. TolL-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury[J]. Int J Exp Pathol, 2007, 88(6): 387-391.

[10] Baumgarten G, Knuefermann P, Wrigge H, *et al*. Role of Toll-like receptor 4 for the pathogenesis of acute lung injury in Gram-negative sepsis[J]. Eur J Anaesthesiol, 2006, 23 (12): 1041-1048.

[11] Togbe D, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, *et al*. TLR4 gene dosage contributes to endotoxin-induced acute respiratory inflammation[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(3): 451-457.

[12] Thorley A J, Ford P A, Giembycz M A, *et al*. Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages[J]. J Immunol, 2007, 178(1): 463-473.

[13] Matalon S, Lazrak A, Jain L, *et al*. Invited review: biophysical properties of sodium channels in lung alveolar epithelial cells[J]. J Appl Physiol, 2002, 93(5): 1852-1859.

[14] Helenius I T, Dada L A, Sznajder J I. Role of ubiquitination in Na, K-ATPase regulation during lung injury[J]. Proc Am Thorac Soc, 2010, 7(1): 65-70.

[15] Possmayer F, Hall S B, Haller T, *et al*. Recent advances in alveolar biology[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2010, 170(3): 1-10.

[16] Adir Y, Welch L C, Dumasius V, *et al*. Overexpression of the Na-K-ATPase alpha2-subunit improves lung liquid clearance during ventilation-induced lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294(6): L1233-L1237.

[17] Walker M G, Tessolini J M, McCaig L, *et al*. Elevated endogenous surfactant reduces inflammation in an acute lung injury model[J]. Exp Lung Res, 2009, 35(7): 591-604.

(**收稿**:2009-12-20;**修回**:2010-03-31)

(编辑 栾 嘉)