文章编号:1000-5404(2014)17-1817-05

论著

rhEPO对大鼠肾缺血再灌注损伤TLR4/NF-κB通路的影响

李清初,陈 超,尹友生,韦家智,李康慧,覃 源 (541001 广西 桂林,桂林医学院附属医院肾内科)

[摘要] **目的** 探讨不同时段相同剂量重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin,rhEPO)对大鼠肾缺血再灌注损伤TLR4/NF-κB信号通路的影响。**方法** 将70只雄性SD大鼠按随机数字表法分假手术组,缺血再灌注组(IR),注射rhEPO在缺血前6 h组(P6)、缺血前2 h组(P2)、缺血前0 h组(P0)、缺血后2 h组(A2)、缺血后6 h组(A6),每组10只。测定血尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)水平,HE染色观察肾组织病理学形态,免疫组织化学法检测肾组织TLR4、NF-κB p50蛋白表达与分布,RT-PCR法检测肾组织TLR4、NF-κB mRNA表达。**结果** IR组的血清BUN、Cr,肾小管Paller评分,TLR4、NF-κB p50蛋白表达及肾组织TLR4、NF-κB mRNA表达较假手术组均升高($P<0.01$);P6、P2、P0、A2、A6组的Paller评分、BUN和Cr的血清浓度、TLR4及NF-κB的蛋白质和mRNA表达较IR组减少($P<0.01$),每组的5项监测指标趋势一致;rhEPO干预组中P6、P2组的5项监测指标均较P0、A2、A6组减少($P<0.01$),P6和P2间及P0、A2和A6组间的各项指标比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** rhEPO干预能缓解肾缺血再灌注损伤所致的急性肾损伤,可能是通过抑制TLR4/NF-κB通路起作用,rhEPO在肾缺血前注射比肾缺血后注射对肾脏保护作用更明显。

[关键词] 肾脏;缺血再灌注损伤;重组人促红细胞生成素;Toll样受体4;NF-κB
[中图法分类号] R364.12; R692.02; R977.6 [文献标志码] A

Recombinant human erythropoietin attenuates renal ischemia reperfusion injury in rats through inhibiting TLR4/NF-κB signal transduction pathway

Li Qingchu, Chen Chao, Yin Yousheng, Wei Jiazhi, Li Kanghui, Qin Yuang (Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 541001, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of recombinant human erythropoietin (rhEPO) injected at the same dose but different time points on toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B (TLR4/NF-κB) signal transduction pathway in rats after renal ischemia reperfusion injury. **Methods** Totally 70 male SD rats were randomly divided into 7 groups ($n=10$), sham operation group (S group), ischemia reperfusion group (IR group), the group receiving rhEPO in 6 h before ischemia (P6 group, 2 000 U/kg rhEPO *via* tail vein), the group receiving rhEPO in 2 h before ischemia (P2 group), the group receiving rhEPO in 0 h before ischemia (P0 group), the group receiving rhEPO in 2 h after ischemia (A2 group), and the group receiving rhEPO in 6 h after ischemia (A6 group). The IR injured model was established by resecting the right kidney and blocking left renal artery for 45 min. In 24 h after blocking, all animals were killed and their blood samples and left kidneys were collected. The renal pathological changes were observed by HE staining. Serum levels of BUN and Cr were determined. The expression and distribution of TLR4 and NF-κB p50 in renal tissue were determined by immunohistochemistry assay. Reverse transcriptional-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect the mRNA levels of TLR4 and NF-κB. **Results** Serum levels of BUN (40.63 ± 4.45) and Cr (166.25 ± 7.80), the paller scores of renal tubule pathologic damage (251.83 ± 12.65), the protein expression of TLR4 and NF-κB p50 (211.758 ± 17.720 and 212.492 ± 17.989), and mRNA expression of TLR4 and NF-κB (2.191 ± 0.046 and 0.771 ± 0.069) were significantly higher in IR group than S group ($P<0.01$). While, these indexes were obviously lower in the P6, P2, P0, A2 and A6 groups than the IR group ($P<0.01$). Moreover, the changing trend of the 5 test items was accordant in each group. Among the

[基金项目] 广西壮族自治区卫生厅课题(Z2008293)
[通信作者] 尹友生,E-mail:yinyousheng@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140618.1742.004.html(2014-06-18)

administrated groups by rhEPO, the 5 test items were markedly lower in P6 and P2 groups than in P0, A2 and A6 groups ($P<0.01$), and, there was no significant difference in the 5 items between P6 and P2 groups, and among P0, A2 and A6 groups ($P>0.05$). **Conclusion** rhEPO alleviates acute kidney injury caused by kidney ischemia-reperfusion injury, which might be through inhibiting TLR4/NF-κB signal transduction pathway. rhEPO exerts more significant protective effect when given before ischemia than after ischemia.

[**Key words**] kidney; ischemia reperfusion injury; recombinant human erythropoietin; toll-like receptor 4; nuclear factor-kappa B

Supported by the Project of Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region (Z2008293). Corresponding author: Yin Yousheng, E-mail: yinyousheng@163.com

促红细胞生成素简称促红素(erythropoietin, EPO),是一种主要由肾间质细胞分泌的细胞因子,在骨髓造血微环境下促进红细胞的生成。1985年科学家应用基因重组技术,在实验室获得重组人促红素(recombinant human erythropoietin, rhEPO),目前主要用于治疗肾性贫血,但近年研究发现促红素有肾保护作用。动物实验研究表明,促红素对肾缺血再灌注损伤所致急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)有改善肾功能和肾保护作用[1],但具体作用机制目前尚未完全阐明。

急性肾损伤一直是临床上棘手的问题,患者病死率很高。糖尿病、血管疾病及慢性肾脏病(CKD)等易出现肾脏缺血,致使患者发生AKI。临床上肾脏缺血再灌注损伤已成为AKI发生的一个主要原因,目前尚缺乏有效的干预措施。Toll样受体(Toll-like receptors, TLR)是参与非特异性免疫的一类重要蛋白质分子,也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁。研究表明,在AKI发生过程中,即将死亡的肾脏细胞可释放多种分子来刺激免疫细胞释放众多促炎因子,炎症因子作用于Toll样受体2、4(TLR-2、TLR-4),诱导MyD88、NF-κB和MAPK信号通路的激活[2]。

本实验在制作肾缺血再灌注损伤大鼠模型前后不同时间点用rhEPO干预,检测各种相关实验指标,探讨rhEPO对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用是否通过TLR4/NF-κB信号通路实现,以期阐明rhEPO对肾缺血再灌注损伤所致急性肾损伤的肾保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

SPF级健康雄性2月龄SD大鼠70只,体质量(200±20)g,购于广西医科大学实验动物中心。rhEPO购于上海凯茂生物医药有限公司,兔抗人TLR4多克隆抗体购于武汉博士德生物技术有限公司,兔抗人NF-κB p50多克隆抗体(美国Santa Cruz公司生产)购于北京中杉金桥生物技术有限公司,无RNA酶处理的焦碳酸二乙酯(DEPC)、TRIzol试剂(美国Invitrogen公司)购于武汉凌飞生物公司。逆转录扩增试剂盒(美国Fermentas生产)购于天地扬生物公司。所有引物由天地扬生物公司设计。

1.2 方法

1.2.1 模型制作 肾缺血再灌注损伤模型制作:3%水合氯醛(100 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,沿下腹部正中线逐层切开4~5 cm的切口,暴露右侧肾脏游离右侧肾蒂,结扎右侧肾蒂后切除右肾,分离左侧肾蒂并用玻璃分针分离出左肾动脉,用无创动脉夹夹闭左侧肾动脉完全阻断血流,45 min后松开动脉夹,恢复肾灌注,肾脏由缺血后的黑紫色逐渐变为鲜红色,标志肾缺血再灌注损伤模型制作成功。

1.2.2 动物分组 选用SPF级雄性SD大鼠70只,适应性饲养1周后按随机数字表法分7组,每组10只。即假手术组、缺血再灌注组(IR)、注射rhEPO在缺血前6 h组(P6)、缺血前2 h组(P2)、缺血前0 h组(P0)、缺血后2 h组(A2)、缺血后6 h组(A6)。假手术组:方法同IR组,打开腹腔后,分离双侧肾蒂,但不结扎,45 min后关闭腹腔。P6、P2、P0组:按照IR组的方法,大鼠在切除右肾之后,由尾静脉注射rhEPO 2 000 U/kg,分别于6、2、0 h后夹闭左侧肾动脉;A2组:大鼠肾缺血再灌注损伤模型制作成功后75 min(即在夹闭左侧肾动脉后2 h)由尾静脉注射rhEPO 2 000 U/kg; A6组:按照IR组的方法,在夹闭左侧肾动脉后6 h由尾静脉注射rhEPO 2 000 U/kg。

1.2.3 血清尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)的检测 各组大鼠在切除右肾,夹闭左侧肾动脉后24 h开腹取静脉血,全自动生化分析仪检测BUN、Cr水平,评估其肾功能。

1.2.4 肾组织病理改变 术后24 h开腹切除左肾,剥离肾周组织及包膜后沿肾中线剖开,一半置于液氮速冻后放于-70 ℃冰箱保存备用,另一半置于中性福尔马林液固定后石腊包埋,常规切片行HE染色,光镜下观察肾小球、肾小管、肾间质变化及炎性细胞浸润情况。采用Paller法评估肾小管损伤,每只大鼠肾组织切片随机选择10个无重叠视野(×400),每个视野下随机选择10处肾小管,共按100个肾小管计分,分数越高表示肾小管损伤程度越严重。肾小管Paller法评分标准:肾小管明显扩张、细胞扁平,1分;肾小管内管型形成,2分;肾小管管腔内有脱落坏死细胞,但无管型和细胞碎片,1分;上皮细胞颗粒样变性,1分;上皮细胞空泡样变性,1分;皮细胞细胞核固缩,1分。

1.2.5 肾组织TLR4、NF-κB p50蛋白的表达 取石蜡块常规切片3 μm,常规免疫组化二步法检测肾组织TLR4、NF-κB p50蛋白的表达。每张切片在10×40倍光镜下随机选取不相互重叠的10个清晰的视野,对每个高倍镜视野分别进行阳性

细胞(TLR4 蛋白在细胞质表达、NF-κB p50 蛋白在细胞核和细胞质都表达)计数并计算阳性细胞数的平均值以反映阳性表达的强度。

1.2.6 肾组织 TLR4、NF-κBp mRNA 的检测 称取液氮保存的肾组织 80 mg,组织匀浆后用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA,以适量的无核酸酶将 RNA 溶解后,用 DNA/RNA 测量仪测得 RNA 浓度。采用半定量 RT-PCR 法扩增 TLR4 mRNA、NF-κB mRNA。扩增后产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析仪(Gene Genius)在紫外光下采集图像。采用 Gepro 4.0 软件进行分析。以大鼠 β-actin 为内参,以目的基因与同一标本的 β-actin 的 RT-PCR 产物条带的光密度比值表示其相对含量。RT-PCR 反应条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,TLR4 mRNA 60 ℃、NF-κB mRNA 55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,72 ℃ 5 min,热循环 36 次。引物序列见表 1。

表 1 引物序列和产物长度

引物名称	引物序列	产物长度(bp)
TLR4	上游 5′-CCTGAGACCAGGAAGCTTGA-3′	192
	下游 5′-TCCAGCCACTGAAGTTGTGA-3′	
NF-κB	上游 5′-AACGAGCCTAGAGATTGTGC-3′	240
	下游 5′-CGTAACCGCGTAGTCGAAGA-3′	
β-actin	上游 5′-CCATGGATGACGATATCGCT-3′	236
	下游 5′-GCCGTGTTCAATGGGGTACT-3′	

1.3 统计学分析

应用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布数据采用单因素方差分析-SNK 检验。

2 结果

2.1 肾缺血再灌注后肾功能变化

肾缺血再灌注后,IR 组的 BUN 和 Cr 表达水平较假手术组明显升高($P<0.01$),P6、P2、P0、A2、A6 组的 BUN 和 Cr 表达水平较 IR 组明显降低($P<0.01$),P6 组与 P2 组比较无明显降低($P>0.05$),P6、P2 组与 P0、A2、A6 组比较明显降低($P<0.01$),P0、A2、A6 组间比较无明显差异($P>0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠肾功能 BUN 和 Cr 的变化(mmol/L,$n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	BUN	Cr
假手术组	7.63 ± 0.22	31.55 ± 2.64
IR 组	40.63 ± 4.45[a]	166.25 ± 7.80[a]
P6 组	24.77 ± 3.31[b]	79.01 ± 4.83[b]
P2 组	21.90 ± 4.83[b]	85.25 ± 3.30[b]
P0 组	32.55 ± 1.97[bc]	117.75 ± 3.77[bc]
A2 组	31.77 ± 1.38[bc]	121.34 ± 6.32[bc]
A6 组	31.77 ± 1.55[bc]	121.75 ± 2.51[bc]

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与 IR 组比较;c:$P<0.01$,与 P6、P2 组比较

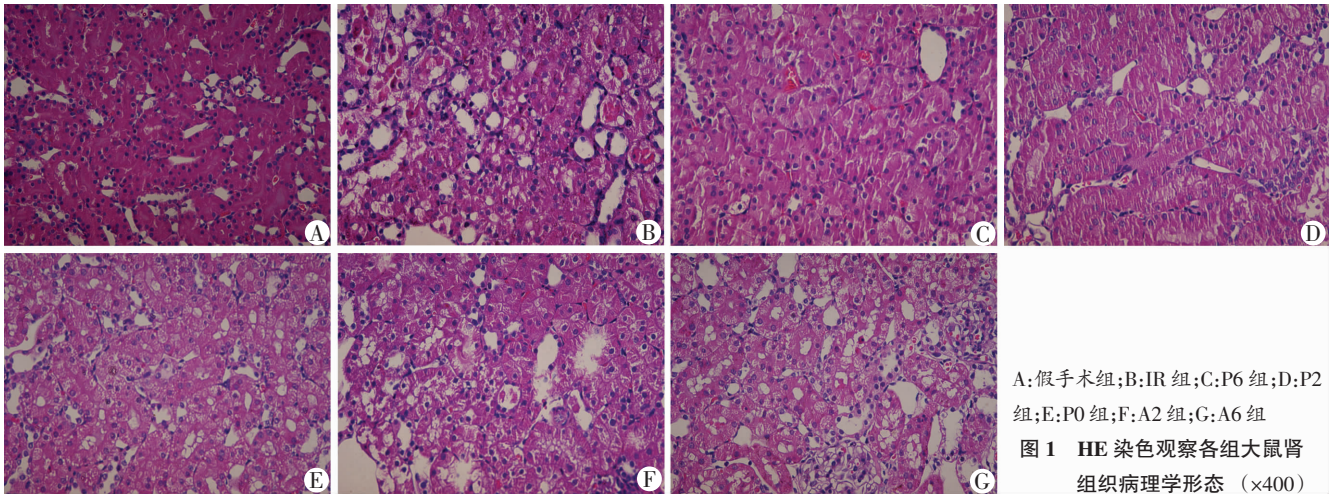
2.2 肾组织病理改变及肾小管 Paller 评分

光镜下(图 1)假手术组肾组织形态结构无明显改变;IR 组可见肾小管上皮细胞有不同程度的肿胀、坏死和脱落,有炎症细胞浸润,管腔扩张和管型出现;P6、P2 组肾小管上皮细胞肿胀、坏死和脱落程度比 IR 组轻,有炎症细胞浸润,没有管型出现;P0、A2、A6 组肾小管上皮细胞肿胀,坏死和脱落,程度比 IR 组轻,比 P6、P2 组重,有炎症细胞浸润,管腔扩张,有少量管型出现。各组肾小球结构无明显变化。肾小管 Paller 评分假手术组相对较低,IR 组表达较假手术组升高,差异有统计学意义($P<0.01$),而 P6、P2、P0、A2、A6 组表达水平较 IR 组明显降低($P<0.01$),P6 组与 P2 组比较无明显降低($P>0.05$),P6、P2 组与 P0、A2、A6 组比较明显降低($P<0.01$),P0、A2、A6 组间比较无明显差异($P>0.05$,表 3)。

表 3 缺血再灌注后各组大鼠肾小管 Paller 评分(分,$n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	肾小管评分
假手术组	18.50 ± 2.73
IR 组	251.83 ± 12.65[a]
P6 组	106.50 ± 9.13[b]
P2 组	108.00 ± 9.89[b]
P0 组	154.83 ± 8.42[bc]
A2 组	155.66 ± 9.45[bc]
A6 组	164.83 ± 8.93[bc]

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与 IR 组比较;c:$P<0.01$,与 P6、P2 组比较



A:假手术组;B:IR 组;C:P6 组;D:P2 组;E:P0 组;F:A2 组;G:A6 组

图 1 HE 染色观察各组大鼠肾组织病理学形态 (×400)

2.3 肾组织中 TLR4 和 NF-κB p50 蛋白表达

TLR4 蛋白在假手术组表达很低，分布于血管内皮细胞，阳性细胞呈棕褐色。IR 组表达增强，以血管内皮细胞为主，肾小管上皮细胞也可见表达（图 2），与假手术组比较差异有显著性（$P<0.01$）。P6、P2、P0、A2、A6 组 TLR4 蛋白的表达均较 IR 组明显降低（$P<0.01$）。P6 组与 P2 组比较无明显降低（$P>0.05$）；P6、P2 组与 P0、A2、A6 组比较明显降低（$P<0.01$）；P0、A2、A6 组间比较无明显差异（$P>0.05$）。各组肾小球上皮细胞未见表达。假手术组肾组织中 NF-κB p50 蛋白可见极少量表达，以肾小管上皮细胞为主。IR 组肾小管上皮细胞和血管内皮细胞强表达（图 3），与假手术组比较表达升高，差异有显著性（$P<0.01$）。P6、P2、P0、A2、A6 组均可见 NF-κB p50 蛋白表达，主要分布于肾小管细胞，各组的表达趋势与 TLR4 蛋白一致，其表达水平均较 IR 组明显降低（$P<0.01$）；各组肾小球上皮细胞均未见 NF-κB p50 蛋白表达。各组 TLR4 蛋白和 NF-κB p50 蛋白的表达强度详见表 4。

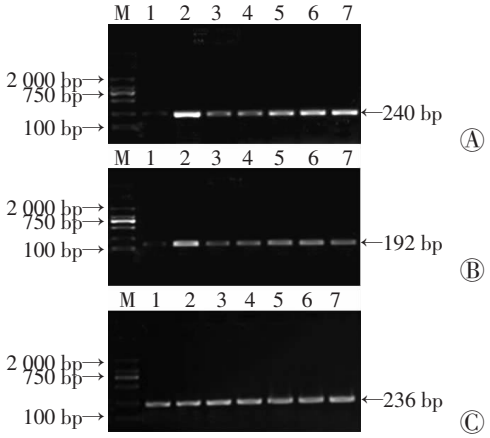
表 4 各组大鼠肾组织 TLR4、NF-κB p50 蛋白表达（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	TLR4	NF-κB p50
假手术组	1.274 ± 0.035	1.286 ± 0.046
IR 组	211.758 ± 17.720[a]	212.492 ± 17.989[a]
P6 组	114.484 ± 8.780[b]	113.884 ± 7.957[b]
P2 组	115.486 ± 13.887[b]	112.578 ± 10.879[b]
P0 组	175.82 ± 10.146[bc]	174.198 ± 8.095[bc]
A2 组	180.95 ± 8.306[b]	179.974 ± 7.250[bc]
A6 组	176.21 ± 5.254[b]	175.504 ± 4.743[bc]

a：$P<0.01$，与假手术组比较；b：$P<0.01$，与 IR 组比较；c：$P<0.01$，与 P6、P2 组比较

2.4 肾组织中 TLR4 和 NF-κB mRNA 表达

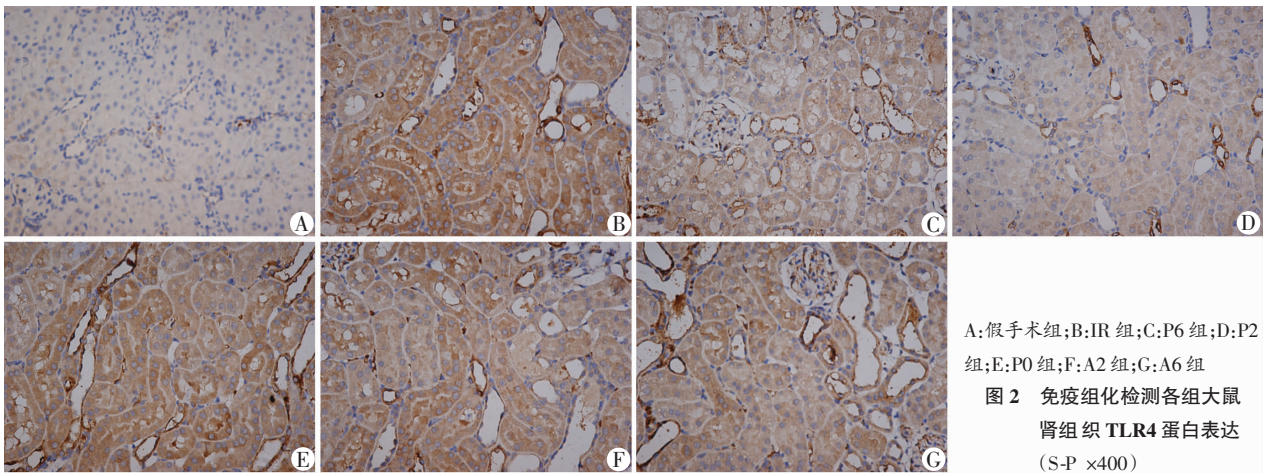
肾组织中 TLR4 mRNA 和 NF-κB mRNA 的表达在假手术组水平相对较低，IR 组与假手术组比较表达升高，差异有显著性（$P<0.01$），而 P6、P2、P0、A2、A6 组表达水平较 IR 组明显降低（$P<0.01$），P6 组与 P2 组比较无明显降低（$P>0.05$），P6 组、P2 组与 P0、A2、A6 组比较明显降低（$P<0.01$），P0、A2、A6 组间比较无明显差异（$P>0.05$）。见图 4 和表 5。



M：标准；1：假手术组；2：IR 组；3：P6 组；4：P2 组；5：P0 组；6：A2 组；7：A6 组

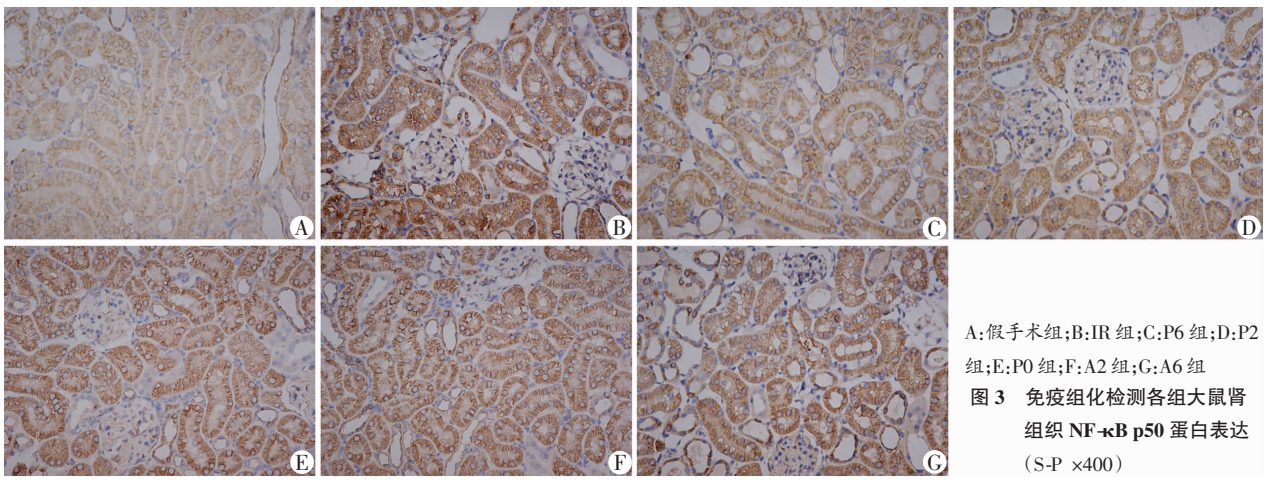
A：NF-κB；B：TLR4；C：β-actin

图 4 各组大鼠肾组织 TLR4、NF-κB mRNA 的表达



A：假手术组；B：IR 组；C：P6 组；D：P2 组；E：P0 组；F：A2 组；G：A6 组

图 2 免疫组化检测各组大鼠肾组织 TLR4 蛋白表达（S-P ×400）



A：假手术组；B：IR 组；C：P6 组；D：P2 组；E：P0 组；F：A2 组；G：A6 组

图 3 免疫组化检测各组大鼠肾组织 NF-κB p50 蛋白表达（S-P ×400）

表 5 各组大鼠肾组织 TLR4、NF-κB mRNA 表达($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	TLR4	NF-κB
假手术组	0.186 ± 0.010	0.043 ± 0.004
IR 组	2.191 ± 0.046[a]	0.771 ± 0.069[a]
P6 组	0.744 ± 0.033[b]	0.281 ± 0.010[b]
P2 组	0.765 ± 0.021[b]	0.291 ± 0.007[b]
P0 组	1.167 ± 0.055[bc]	0.534 ± 0.031[bc]
A2 组	1.216 ± 0.040[bc]	0.560 ± 0.031[bc]
A6 组	1.120 ± 0.121[bc]	0.571 ± 0.022[bc]

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与 IR 组比较;c:$P<0.01$,与 P6、P2 组比较

3 讨论

急性肾损伤是临床常见的综合征,大多为肾缺血所致。肾缺血再灌注损伤也是外科手术常见的并发症。肾缺血再灌注损伤触发免疫反应并导致局部和系统炎症反应。研究表明促红素对 AKI 有改善肾功能和肾保护作用。Coldewey 等[3]发现 EPO 能缓解脓毒症 AKI。Moeini 等[4]也证实 EPO 对肾缺血再灌注损伤所致 AKI 有保护作用。本实验中,rhEPO 干预组 BUN 和 Cr 水平明显较模型组低,肾组织中肾小管损伤也较 IR 组减轻,证实促红素能缓解肾缺血再灌注损伤所致的急性肾损伤。

有研究发现肾缺血再灌注损伤大鼠肾小管细胞 TLR2 和 TLR4 表达明显增加[5-6],提示肾缺血再灌注损伤促发了肾脏天然免疫系统活化。TLRs 是一类介导天然免疫的跨膜信号传递受体家族,在细胞活化信号转导中起重要作用,是联系天然免疫与获得性免疫的桥梁。其主要信号通路之一是通过衔接蛋白 MyD88[7]与白介素-1 受体相关激酶(IRAK)的死亡结构域结合引起 IRAK 的自磷酸化,进而激活肿瘤坏死因子受体相关因子-15(TRAF-6)[8],导致 NF-κB 的激活和转位,促使下游炎症因子的合成及转录表达[9]。本实验中,rhEPO 干预组较 IR 组肾小管损伤较轻,BUN 和 Cr 水平下降,肾组织中的 TLR4 mRNA 和 NF-κB mRNA 及 TLR4 和 NF-κB p50 蛋白的表达减弱,提示 rhEPO 对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用,可能与阻断 TLR4/NF-κB 信号通路使下游的炎症反应不能激活有关。研究证实,各器官组织中均含有促红细胞生成素受体(EPOR),能够与 EPO 特异性结合,EPO 与 EPOR 结合后导致构象改变[10],使 Janus 家族中酪氨酸蛋白激酶 2(JAK2)分子与受体在近端呈持续结合,并通过转磷酸化使 JAK2 激活,磷酸化的酪氨酸滞留于细胞质中,成为细胞内信号蛋白的结合部位,阻止肾小管上皮细胞 TLR4/MyD88 的激活,进而抑制 NF-κB 等细胞因子的释放,减轻炎症反应[11]。

本实验结果显示,在不同时段注射 rhEPO 对大鼠肾缺血再灌注损伤的干预效果是有差异的。在夹闭肾动脉造成肾缺血之前 6 h 和 2 h 注射 rhEPO 比夹闭肾动脉后 0、2、6 h 干预效果要明显,说明在肾缺血前注射 rhEPO 比肾缺血后更具有肾保护作用。推测可能是肾缺血前注射 rhEPO 能够预先在肾小管上皮细胞表面与 EPOR 结合,在肾损伤前启动保护机制。

参考文献:

[1] Moore E, Bellomo R. Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury [J]. Ann Intensive Care, 2011, 1(1): 3.

[2] Allam R, Scherbaum C R, Darisipudi M N, *et al*. Histones from dying renal cells aggravate kidney injury *via* TLR2 and TLR4[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(8): 1375 - 1388.

[3] Coldewey S M, Khan A I, Kapoor A, *et al*. Erythropoietin attenuates acute kidney dysfunction in murine experimental sepsis by activation of the β-common receptor[J]. Kidney Int, 2013, 84(3): 482 - 490.

[4] Moeini M, Nematbakhsh M, Fazilati M, *et al*. Protective role of recombinant human erythropoietin in kidney and lung injury following renal bilateral ischemia-reperfusion in rat model[J]. Int J Prev Med, 2013, 4(6): 648 - 655.

[5] Kim B S, Lim SW, Li C, *et al*. Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys[J]. Transplantation, 2005, 79(10): 1370 - 1377.

[6] Chen J, John R, Richardson J A, *et al*. Toll-like receptor 4 regulates early endothelial activation during ischemic acute kidney injury[J]. Kidney Int, 2011, 79(3): 288 - 299.

[7] Kleinridders A, Schenten D, Konner A C, *et al*. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity[J]. Cell Metab, 2009, 10(4): 249 - 259.

[8] Sasai M, Tatematsu M, Oshiumi H, *et al*. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM- 1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll- like receptor 3/4 pathway[J]. Mol Immunol, 2010, 47(6): 1283 - 1291.

[9] Ko H M, Koppula S, Kim B W, *et al*. Inflexin attenuates proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in LPS-treated microglia[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 633(1/3): 98 - 106.

[10] Ehrenreich H, Kastner A, Weissenbom K, *et al*. Circulating damage marker profiles support a neuroprotective effect of erythropoietin in ischemic stroke patients[J]. Mol Med, 2011, 17(11/12): 1306 - 1310.

[11] Kang S Y, Kang J H, Choi J C, *et al*. Expression of erythropoietin in the spinal cord of lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Clin Neurol, 2009, 5(1): 39 - 45.

(**收稿**:2014-02-08;**修回**:2014-03-04)

(编辑 龙 亮)