

[文章编号] 1007-3949(2010)18-09-0713-05

• 实验研究 •

变形链球菌对 EAhy926细胞 Toll样受体 2和 4及白细胞介素 6和 8表达的影响

曹宁, 王一松, 郑群, 平国玲, 张力平

(首都医科大学基础医学院病原生物学系, 北京市 100069)

[关键词] 变形链球菌; EAhy926细胞; Toll样受体 2 Toll样受体 4 白细胞介素 6 白细胞介素 8

[摘要] 目的 观察变形链球菌对 EAhy926细胞 Toll样受体 2和 4的表达及炎性细胞因子白细胞介素 6和 8分泌的影响, 初步探讨 Toll样受体表达与细胞因子产生之间的关系。方法 变形链球菌作用于 EAhy926细胞, RT-PCR 法检测 EAhy926细胞 Toll样受体 2和 4及白细胞介素 6和 8的 mRNA 表达; 流式细胞术检测 EAhy926细胞表面 Toll样受体 2和 4的表达; 细胞生物活性法和 ELISA 分别检测 EAhy926细胞白细胞介素 6和 8的分泌; 抗体阻断实验观察 Toll样受体 2和 4的表达与白细胞介素 6和 8产生间的关系。结果 将变形链球菌作用于 EAhy926细胞 6 h, Toll样受体 2和 4的 mRNA 表达与加入的细菌量呈一定的剂量依赖关系, 以细菌与细胞作用比例为 100: 1 时, Toll样受体 2和 4的 mRNA 表达量最高 ($P < 0.05$)。变形链球菌能诱导 EAhy926细胞 (100: 1) Toll样受体 2和 4的 mRNA 和蛋白水平表达增强, 在 6 h 达到高峰, 12 h 后又逐渐下降 ($P < 0.01$); 白细胞介素 6和 8的表达量也增加, 在 12 h 达最大表达量 ($P < 0.05$)。经 Toll样受体 2和 Toll样受体 4抗体阻断后, 变形链球菌诱导 EAhy926细胞白细胞介素 6和 8的 mRNA 表达明显减少 ($P < 0.01$)。结论 变形链球菌可上调 EAhy926细胞 Toll样受体 2和 4的表达, 促进炎性细胞因子白细胞介素 6和 8的产生; 白细胞介素 6和 8的产生与 Toll样受体 2和 4的表达上调密切相关。

[中图分类号] R37

[文献标识码] A

Effects of Streptococcus Mutans on the Expression of Toll Like Receptor 2 and 4 Interleukin-6 and -8 in EAhy926 Cells

CAO Ning WANG YiSong ZHENG Qun PNG Guo-Ling and ZHANG LiPing

(Department of Microbiology, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[KEY WORDS] Streptococcus Mutans EAhy926 Cell Toll Like Receptor 2 Toll Like Receptor 4 Interleukin-6 Interleukin-8

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of streptococcus mutans on the expression of toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, interleukin-6 (IL-6) and IL-8 in EAhy926 cells (the human endothelial hybridoma of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and the human epithelial cell line A549, characterized by endothelial phenotype and biology). **Methods** EAhy926 cells were treated with Streptococcus mutans. The mRNA expression of TLR2, TLR4, IL-6 and IL-8 in EAhy926 cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). TLR2 and TLR4 were analyzed by flow cytometry. The production of IL-6 and IL-8 in the cultured supernatants was measured by biochemical method and ELISA respectively. TLR2 and TLR4 blocking assay was used to investigate the relationship between IL-6, IL-8 and TLR2, TLR4 mRNA expression. **Results** The expression of mRNA and protein for TLR2 and TLR4 in EAhy926 cells increased after stimulated by Streptococcus mutans, peaked the maximal level at 6 h ($P < 0.05$), and then decreased. The expression of IL-6 and IL-8 mRNA was significantly induced when exposed to Streptococcus mutans, reaching the maximal level at 12 h, respectively ($P < 0.05$). Meanwhile, Streptococcus mutans induced the production of IL-6 and IL-8 with peaking at 12 h ($P < 0.01$). The mRNA expression of IL-6 and IL-8 in EAhy926 cells was significantly blocked by anti-human TLR2 and anti-TLR4. **Conclusion** Streptococcus mutans upregulated the expression of TLR2 and TLR4 and induced the production of inflammatory cytokines IL-6 and IL-8. The expression of TLR2 and TLR4 of EAhy926 cells may elicit a TLR2 and TLR4 mediated innate immune response and contribute to production of inflammatory cytokines IL-6 and IL-8.

越来越多的流行病学调查、临床和实验证据表明, 感染是动脉粥样硬化性疾病的危险因素。其中,

口腔细菌在动脉粥样硬化灶局部检出几率较高^[1,2], 但迄今为止二者的关系尚不明了。本课题

[收稿日期] 2010-06-28 [修回日期] 2010-09-05

[基金项目] 北京市教育委员会科技发展计划项目 (KM 200810025012); 北京市属市管高等学校人才强教计划资助项目

[作者简介] 曹宁, 硕士研究生, 研究方向为细菌与宿主细胞的相互作用, E-mail为 cning_0813@yahoo.com.cn。王一松, 博士, 讲师, 研究方向为细菌与宿主细胞的相互作用, E-mail为 yswang@cmu.edu.cn。通讯作者张力平, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为细菌与宿主细胞的相互作用, E-mail为 lpzhang@cmu.edu.cn。

组既往研究表明,链球菌蛋白能够上调 RAW 264 7 巨噬细胞 Toll样受体 2(Toll like receptor TLR2)、TLR4、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素 6(interleukin-6 IL-6)的表达,链球菌细胞壁能够上调 EAhy926 细胞 TLR2、TLR4、IL-6 和 IL-8 的表达^[3]。提示变形链球菌可能会诱导血管内皮细胞细胞因子和黏附分子的表达上调、增强内皮细胞的黏附性,从而参与血管内皮细胞的炎性改变,但尚未见直接的实验证据。因此本研究拟在体外观察变形链球菌感染血管内皮细胞后,TLR2 和 TLR4 以及炎性细胞因子的表达及其它们间的关联性,初步探讨 TLR 在变形链球菌感染血管内皮细胞过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料

DM SO 和 2-巯基乙醇购自 MERCK 公司,Trizol 试剂为 BBI 公司产品, rhIL-6 购自 Pepro Tech 公司, DMEM 培养基、RPM I1640 培养基和 0.25% 胰酶购自 Hyclone 公司, FBS 为杭州四季青公司产品, MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自上海生物工程技术有限公司, GoTaq DNA 多聚酶和 dNTP Mix 为 Promega 公司产品, PE 标记的抗人 TLR2 和 TLR4 抗体以及 PE 标记的鼠 IgG2a 同型对照购自 eBioscience 公司, 抗人 TLR2 和 TLR4 抗体及 IgG 同型对照购自 R&D 公司, 人 IL-8 ELISA 试剂盒为武汉博士德公司产品。

1.2 变形链球菌作用于 EAhy926 细胞

EAhy926 细胞(融合细胞株,是人脐静脉内皮细胞和人肺腺癌细胞 A549 杂交而成的细胞株,具有血管内皮细胞的特性^[4])由首都医科大学附属北京安贞医院药理研究室金鸣研究员惠赠,用含 20% FBS 的 DMEM 培养基,于 37℃、5% CO₂ 条件下进行培养。将对数生长期 EAhy926 细胞接种于 6 孔细胞培养板中(每孔含 2×10^5 个细胞), 37℃、5% CO₂ 孵育 12 h。按细菌与 EAhy926 细胞作用比例分别为 0.50: 1、100: 1 和 200: 1,在细胞培养中加入细菌,于 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 6 h。根据上述实验结果选取变形链球菌与 EAhy926 细胞作用比例为 100: 1 组,分别在 37℃、5% CO₂ 条件下培养不同时间段。各设 3 个复孔,同时设空白对照,收集细胞培养上清用于检测细胞因子,细胞用于分析 TLR2 和 TLR4 的表达及 IL-6 和 IL-8 mRNA 水平的检测。

1.3 RT-PCR 分析 EAhy926 细胞 Toll样受体 2 和 4 及白细胞介素 6 和 8 的 mRNA 表达水平

采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,测定总 RNA 浓度及纯度。用 MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA 后进行 PCR。PCR 引物为: GAPDH 上游 5'-CCA CCC AGA AGA CTG TGG AT-3', 下游 5'-AGG TCC ACC ACT GAC ACG TT-3', 扩增片长 218 bp。TLR2 上游 5'-TGT CTT CAT AAG CGG GAC TTC ATT -3', 下游 5'-CTC CAG GTA GGT CTT GGT GTT CAT T-3', 扩增片长 336 bp。TLR4 上游 5'-AGA GCC GCT GGT GTA TCT TTG A-3', 下游 5'-TTG GTT CCT TGA CTG AGT TGG TT-3', 扩增片长 534 bp。IL-6 上游 5'-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC-3', 下游 5'-GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G-3', 扩增片长 358 bp。IL-8 上游 5'-TCT GCA GCT CTG TGT GAA GG-3', 下游 5'-ACT TCT CCA CAA CCC TCT GC-3', 扩增片长 229 bp。PCR 反应条件为 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 58℃ 45 s, 72℃ 1 min, 循环 35 次; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,用 Bio-Rad 公司图像分析仪成像并进行半定量分析。

1.4 流式细胞术检测 EAhy926 细胞 Toll样受体 2 和 4 的表达

收集 1×10^6 个 EAhy926 细胞, 4℃、1 000 r/min 离心 5 min 弃上清;用预冷的含 2% BSA 的 PBS 洗 2 遍(1 000 r/min, 5 min, 4℃);细胞沉淀用 80 μ L 含 2% BSA 的 PBS 重悬后,分别加入 20 μ L PE 标记的抗人 TLR2 抗体、TLR4 抗体和鼠 IgG2a 同型对照, 4℃避光孵育 45 min,用预冷的含 2% BSA 的 PBS 洗 3 遍(1 000 r/min, 5 min, 4℃);使细胞悬浮于 250 μ L PBS 缓冲液中,加入 250 μ L 4% 多聚甲醛固定液后将样本避光保存于 4℃。流式细胞仪检测 TLR2 和 TLR4 的表达。

1.5 EAhy926 细胞培养上清中白细胞介素 6 和白细胞介素 8 含量的检测

按吴强等^[5]方法用 7TD1 细胞(IL-6 依赖生长的小鼠杂交瘤细胞,本室保存)测定待检样品的 IL-6 活性,并用不同稀释度的 rhIL-6 做标准曲线。按 IL-8 ELISA 试剂盒说明用 ELISA 方法检测细胞培养上清中 IL-8 的含量。

1.6 抗体阻断实验检测 Toll样受体 2 和 4 对 EAhy926 细胞白细胞介素 6 和 8 表达的影响

将 EAhy926 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 12 h,各孔加入 TLR2 抗体或 TLR4 抗体或同型对照抗体(终浓度均为 10

mg/L) 1 h后, 实验组按细菌与细胞比例为 100: 1 加入变形链球菌分别作用 6 h 和 12 h 同时设置未加细菌的对照组。细菌与细胞作用后, 用 PBS 洗 1 遍, Trizol 裂解细胞提取细胞总 RNA, RT-PCR 法检测 TLR 抗体阻断后细胞 IL-6 和 IL-8 mRNA 的表达水平。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 11.5 软件包进行统计学处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异性比较采用 ANOVA 单因素方差分析及 *t* 检验。

2 结果

2.1 变形链球菌对 EAhy926 细胞 Toll 样受体 2 和 4 表达的影响

细菌与细胞比例分别为 50: 1、100: 1 和 200: 1 时, 将变形链球菌作用于 EAhy926 细胞 6 h, TLR2 和 TLR4 的 mRNA 表达与加入的细菌量呈一

定的剂量依赖关系, 在细菌与细胞作用比例为 100: 1 时, TLR2 和 TLR4 的 mRNA 表达量达最高值 ($P < 0.05$, 表 1 和图 1A)。细菌与细胞比例为 100: 1 的变形链球菌能诱导 EAhy926 细胞 TLR2 和 TLR4 的 mRNA 和蛋白表达增加, 作用 6 h 后表达水平达到高峰 ($P < 0.01$, 表 2 和图 1), 12 h 后表达逐渐下降, 但表达量仍明显高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 1 不同剂量变形链球菌对 EAhy926 细胞 TLR2 和 TLR4 mRNA 表达的影响

细菌与细胞比例	TLR2	TLR4
0(对照组)	1 ± 0	1 ± 0
50: 1	1.239 ± 0.061	1.267 ± 0.112 ^a
100: 1	1.684 ± 0.084 ^b	1.310 ± 0.072 ^a
200: 1	1.401 ± 0.143 ^a	1.269 ± 0.073 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

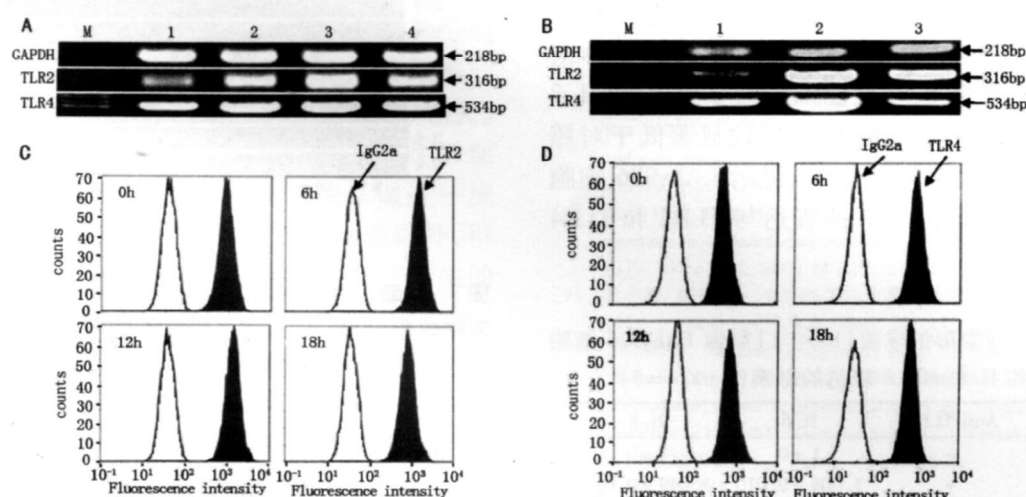


图 1 变形链球菌对 EAhy926 细胞 Toll 样受体 2 和 Toll 样受体 4 表达的影响 A 为不同剂量变形链球菌作用 6 h 对 EAhy926 细胞 TLR2 和 TLR4 mRNA 表达的影响, M 为 Marker 1 为对照组, 2、3、4 分别为链球菌与细胞比例为 50: 1、100: 1 和 200: 1 组; B 为变形链球菌作用于 EAhy926 细胞 (100: 1) 不同时间段 TLR2 和 TLR4 mRNA 表达的变化, M 为 Marker 1 为对照组, 2、3 分别为链球菌作用细胞 6 h 和 12 h; C 为变形链球菌作用于 EAhy926 细胞 (100: 1) 不同时间段 TLR2 蛋白表达的变化; D 为变形链球菌作用于 EAhy926 细胞 (100: 1) 不同时间段 TLR4 蛋白表达的变化。

表 2 变形链球菌作用 EAhy926 细胞 (100: 1) 不同时间段 TLR2 和 TLR4 mRNA 和蛋白表达水平的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

作用时间	TLR2		TLR4	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
0 h(对照组)	1 ± 0	72.167 ± 12.829	1 ± 0	56.700 ± 1.650
6 h	2.319 ± 0.182 ^b	124.967 ± 17.130 ^b	1.511 ± 0.100 ^a	95.150 ± 2.750 ^b
12 h	1.733 ± 0.255 ^a	110.900 ± 17.586 ^b	1.059 ± 0.163	82.000 ± 1.230 ^b
18 h	—	71.300 ± 9.519	—	64.580 ± 0.790

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

2.2 变形链球菌对 EAhy926细胞白细胞介素 6和 8表达的影响

变形链球菌 (100: 1) 作用于 EAhy926细胞后, 随着作用时间的延长, IL-6和 IL-8的 mRNA 表达水平逐渐增高, 在 6 h表达量开始增加, 在作用 12 h后达到最高峰 ($P < 0.05$ 图 2和表 3)。细胞培养上清中 IL-6和 IL-8的含量随着作用时间的延长而逐渐增加, 作用 12 h后, 细胞 IL-6和 IL-8的分泌量达到最高峰 ($P < 0.01$ 表 3), 24 h后表达水平下降。

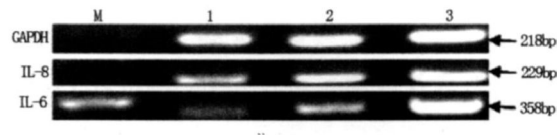


图 2 变形链球菌 (100: 1) 对 EAhy926细胞白细胞介素 6和 8 mRNA 表达的影响 M 为 Marker 1 为对照组, 2, 3 分别为链球菌作用 6 h和 12 h。

表 3 变形链球菌 (100: 1) 对 EAhy926细胞白细胞介素 6和 8表达的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$)

作用时间	IL-6 mRNA	IL-6 ($\mu\text{g/L}$)	IL-8 mRNA	IL-8 ($\mu\text{g/L}$)
0 h(对照组)	1 \pm 0	132.1 \pm 8.0	1 \pm 0	108.3 \pm 5.5
6 h	1.720 \pm 0.023 ^b	188.1 \pm 10.3	1.198 \pm 0.083	139.4 \pm 7.0
12 h	1.952 \pm 0.122 ^b	392.1 \pm 13.9 ^b	1.834 \pm 0.206 ^a	310.0 \pm 15.6 ^b
24 h	-	223.6 \pm 21.3 ^b	-	203.0 \pm 10.4 ^b

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

2.3 Toll样受体 2和 4对变形链球菌刺激 EAhy926细胞白细胞介素 6和 8 mRNA 表达的影响

经 TLR2抗体或 TLR4抗体阻断后, 变形链球菌作用 EAhy926细胞 6 h, 炎性细胞因子 IL-6和 IL-8的 mRNA 表达量开始下降, 12 h后均显著低于对照组 ($P < 0.05$ 图 3, 表 4和表 5), 提示 EAhy926细胞炎性细胞因子 IL-6和 IL-8的表达与 TLR2和 TLR4的介导密切相关。

表 4 Anti-TLR2对变形链球菌 (100: 1) 刺激 EAhy926细胞不同时间 IL-6和 IL-8 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$)

作用时间	Anti-TLR2	IL-6	IL-8
0 h	-	1 \pm 0	1 \pm 0
	+	1.008 \pm 0.010	1.049 \pm 0.039
6 h	-	1.279 \pm 0.128	1.552 \pm 0.021
	+	1.129 \pm 0.086	1.315 \pm 0.038
12 h	-	2.036 \pm 0.124	1.968 \pm 0.163
	+	1.464 \pm 0.052 ^a	1.543 \pm 0.997 ^a

a为 $P < 0.05$ 与作用相同时间段未加 TLR2抗体组相比。

表 5 Anti-TLR4对变形链球菌 (100: 1) 刺激 EAhy926细胞不同时间 IL-6和 IL-8 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$)

作用时间	Anti-TLR4	IL-6	IL-8
0 h	-	1 \pm 0	1 \pm 0
	+	0.991 \pm 0.049	0.987 \pm 0.012
6 h	-	1.529 \pm 0.261	1.501 \pm 0.166
	+	1.325 \pm 0.155	1.309 \pm 0.135
12 h	-	2.379 \pm 0.259	2.116 \pm 0.302
	+	1.674 \pm 0.118 ^b	1.576 \pm 0.214 ^a

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与作用相同时间段未加 TLR4抗体组相比。

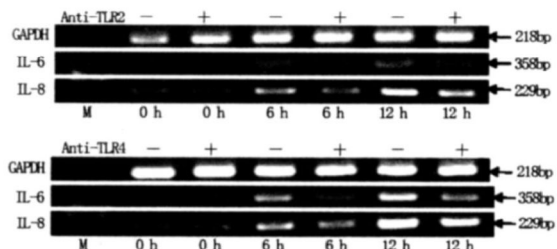


图 3 阻断 Toll样受体 2(上图)或 Toll样受体 4(下图)对变形链球菌 (100: 1) 刺激 EAhy926细胞不同时间白细胞介素 6和 8 mRNA 表达的影响

3 讨论

血管内皮细胞损伤和功能紊乱是动脉粥样硬化的初始环节和关键步骤, 微生物来源的 TLR 激活剂可上调内皮细胞和巨噬细胞 TLR 的表达, 导致炎症反应。Nakano等^[1]学者发现, 在动脉粥样硬化斑块中变形链球菌的检出率为 74%, 用长距离 PCR 技术分析表明, 心血管组织中的变形链球菌菌体成分可能来源于口腔, 但其是否或者如何参与动脉粥样硬化的发生和发展尚不明了。为此, 本课题选择 C 型变形链球菌为口腔链球菌代表, 用 EAhy926细胞作为人血管内皮细胞体外模型进行实验研究。结果表明变形链球菌作用于 EAhy926细胞后, 能刺激 TLR2和 TLR4表达上调, 并诱导产生 IL-6和 IL-8。TLR2和 TLR4抗体可部分阻断细胞 IL-6和 IL-8的产生。

在动脉硬化的形成和发展过程中, IL-6不仅能

加速平滑肌细胞的增殖和迁移,而且在脂肪条纹的形成中起重要作用^[6-7]。IL-8在急性冠状动脉综合征患者的动脉硬化斑块中表达增加^[17]。IL-8可趋化T细胞和单核细胞,降低粥样硬化斑块的稳定性。本研究发现,变形链球菌作用于EAhy926细胞后,可上调IL-6和IL-8 mRNA表达,促进IL-6和IL-8的产生和释放,这种变化具有明显的时间依赖性。提示变形链球菌可能通过诱导血管内皮细胞产生IL-6和IL-8等细胞因子参与动脉粥样硬化的发生和发展进程^[8]。

目前认为,TLR是哺乳动物识别病原微生物的关键受体,病原体成分与细胞表面的TLR结合是机体启动免疫反应并产生细胞因子的首要步骤,在动脉粥样硬化的炎症反应中有着举足轻重的作用^[9]。本研究结果显示,变形链球菌能够明显上调EAhy926细胞TLR2和TLR4的表达。当这种作用被TLR2和TLR4抗体阻断后,IL-6和IL-8的产生受到明显抑制,提示变形链球菌可能通过TLR途径诱导炎性细胞因子的表达。然而实验中仅显示了部分阻断作用,说明在变形链球菌作用于EAhy926细胞产生的炎症反应与TLR2和TLR4信号通路部分相关。本课题组还将采用RNA干扰技术,对细菌作用后细胞TLR与炎性细胞因子产生之间的关系做进一步验证。另外,除TLR2和TLR4信号转导通路外,可能还有其他信号通路参与该细菌对细胞因子产生的分子机制。Hemm i等^[10]报道TLR9能识别CpG DNA,而TLR6可与TLR2共同参与肽聚糖的识别,从而激活下游信号通路,产生细胞因子。IL-8还能通过入侵到胞内的细菌与核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)结合激活信号通路产生^[11]。变形链球菌对血管内皮细胞诱导炎性细胞因子是否有上述途径参与,需要

直接的实验证据。因此,有必要对链球菌诱导EAhy926细胞炎性细胞因子的产生机制进行更深入和广泛的研究。

综上所述,变形链球菌可通过上调EAhy926细胞TLR2和TLR4的表达,刺激细胞产生和释放IL-6和IL-8从而引起血管内皮细胞的炎性改变。这可能是变形链球菌参与动脉粥样硬化性血管疾病发生和发展过程机制之一。

[参考文献]

- [1] Nakano K, Inaba H, Nomura R, et al. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens [J]. *J Clinical Microbiol* 2006 **44** (9): 3 313-317.
- [2] Ott SJ, Elmokhtari NE, Musfeldt M, et al. Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease [J]. *Circulation* 2006 **113** (7): 929-937.
- [3] 李琴,王一松,郑群,等. 变形链球菌细胞壁对EAhy926细胞TLR4、IL-6和IL-8表达的影响[J]. *微生物学报*, 2010 **50** (2): 204-210.
- [4] Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell-line expressing human factor-viii-related antigen established by hybridization [J]. *Proceed Nat Acad Sci Unit Stat Am Biol Sci* 1983 **80** (12): 3 734-737.
- [5] 吴强,庞学雯,钱晓萍,等. 胸腺细胞对胸腺上皮细胞分泌IL-6的促进作用[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1996 **16** (6): 418-421.
- [6] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease - reply [J]. *New Engl J Med* 2005 **353** (4): 429-430.
- [7] Rus H G, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall [J]. *Atherosclerosis* 1996 **127** (2): 263-271.
- [8] Gima HRS, Orsib NM, Vanniasinkama SH. An overview of cytokine interactions in atherosclerosis and implications for peripheral arterial disease [J]. *Vasc Med* 2007 **12** (2): 299-309.
- [9] 耿小勇,陈一文. Toll样受体4在动脉粥样硬化中的作用研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16** (1): 78-80.
- [10] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA [J]. *Nature* 2000 **408** (6813): 740-745.
- [11] Takeuchi O, Kawai T, Muhlbadt P F, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6 [J]. *Internat Immunol* 2001 **13** (7): 933-940.

(此文编辑 许雪梅)