

Toll-like Receptor 9 在大鼠胰腺表达及与大鼠急性胰腺炎相关性的研究

曾玉剑, 罗华友, 郭姝婧, 施承民
(昆明医科大学第一附属医院胃肠外科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** (1) 建立急性胰腺炎大鼠模型, 定性检测 Toll-like Receptor 9 (TLR 9) 在大鼠胰腺的表达、分布情况; (2) 定量测定 TLR 9 在大鼠急性胰腺炎不同时间点的表达变化情况; (3) 结合 TLR 9 在大鼠胰腺的组织分布、表达情况及在雨蛙素诱导性胰腺炎 (cerulein-induced pancreatitis, CIP) 早期 24 h 的表达改变, 探讨 TLR 9 与 CIP 发生发展的相关性. **方法** (1) 采用 Wistar 大鼠, 并随机分配进入实验组或对照组; 通过皮下注射雨蛙素建立急性胰腺炎模型; (2) 采用免疫组化方法检测 TLR 9 在正常大鼠胰腺及 CIP 时大鼠胰腺的表达 TLR 9 在大鼠胰腺的组织分布情况; (3) 提取总 RNA, 采用实时荧光定量逆转录-多聚酶链反应 (Quantitative-Real-Time; QRT-PCR) 法测定 TLR 9 基因的表达. (4) 分析 TLR 9 的分布特征及可能的意义 (5) 统计分析 TLR 9 mRNA 的表达情况与 CIP 发生、发展的关系. **结果** (1) TLR 9 主要分布于胰管上皮、血管内皮和胰岛; (2) 外分泌腺泡细胞没有明显的表达; (3) QRT-PCR 结果显示 TLR 9 mRNA 在正常大鼠胰腺组织呈现低水平表达; (4) CIP 早期 TLR 9 mRNA 表达出现快速上调并在 1 h 时达到最高值; TLR 9 mRNA 表达在 CIP 前 4 h 内维持于高水平; 其后下降缓慢, 至到 CIP 的第 24 小时也未降至正常, 保持相对较高的表达水平. **结论** (1) TLR 9 在大鼠胰腺有表达, 且表达具有一定的组织特异性; (2) TLR 9 在 CIP 胰腺组织中的表达明显升高, 提示 TLR 9 在胰腺炎早期炎症反应的发生、发展中具有重要作用, 与之存在相关性.

[关键词] Toll-like Receptor 9; 胰腺炎; 大鼠; 表达; 意义

[中图分类号] R576 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 08-0020-06

The Expression of Toll-like Receptor 9 in Rat Pancreas and Its Correlation with Pancreatitis

ZENG Yu-jian, LUO Hua-you, GUO Shu-jing, SHI Cheng-min

(Dept. of Gastrointestinal Surgery, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** (1) To establish acute pancreatitis (AP) model in rats, and detect the expression of Toll-like receptor 9 (TLR9) and distribution in rat pancreas. (2) To quantitatively detect the changes of TLR9 expression at different time points in cerulein-induced pancreatitis (CIP). (3) To explore the correlation between TLR 9 and the pathogenesis and development of CIP. **Methods** (1) Wistar rats were used and randomly divided into 2 groups: experiment group and control group; Acute pancreatitis (AP) model was made by subcutaneous injections of cerulein at a total dose 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. (2) The expression/distribution of TLR9 was detected and localized in rat pancreas by immunohistochemistry (IHC). (3) The expression of TLR9 mRNA in CIP was quantitatively determined by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). (4) The characteristics and significance of TLR9 distribution were analyzed. (5) The expression of TLR9 mRNA and its correlation with the pathogenesis and development of CIP were also statistically analyzed. **Results** (1) TLR9 was mainly distributed in pancreatic ductal epithelium, vascular endothelium, and islet. (2) No TLR9 was detected in

[基金项目] 云南省教育厅科研基金资助项目 (2010Y170)

[作者简介] 曾玉剑 (1975~), 男, 四川自贡市人, 医学博士, 讲师, 主要从事胃肠外科临床与研究工作.

[通讯作者] 罗华友. E-mail: zengyujian@126.com

exocrine acinar cells. (3) Real-time RT-PCR results showed low-level TLR9 mRNA expression in pancreas of normal rats. (4) TLR9 mRNA was quickly upregulated in the early stage of CIP and reached the climax in one hour, and maintained at relative high level from 0.5 to 4 hours; but until the end of 24 hours, TLR9 expression was not still returned to the baseline. **Conclusions** (1) TLR9 is expressed in pancreas and has tissue specific expression. (2) TLR9 is highly expressed in pancreas of CIP, suggesting that TLR9 is correlated with CIP and plays an important role in the pathogenesis and/or development of CIP.

[**Key words**] Toll-like receptor 9 (TLR9); Pancreatitis; Rats; Expression; Significance

作为一个消化器官, 胰腺在机体消化功能中扮演着积极的作用. 但它不仅仅分泌胰液, 也具有抵抗自身消化的机制. 急性胰腺炎是胰腺发生的一种严重疾病, 其中急性重症胰腺炎死亡率很高; 但时至今日急性胰腺炎的发病机理仍不甚了了. 现在越来越多的证据表明先天性免疫反应和获得性免疫反应与急性胰腺炎的发生、发展关系密切.

TLR 已经被证实为先天性免疫识别至关重要的一环, 在炎症反应的起始中被视为关键性受体^[1-8]. 在 TLR 家族中, TLR9 是较晚被发现的一个, 它的配体是主要存在于细菌 DNA 的非甲基化 CpG 寡聚脱氧核苷酸 (CpG 基序)^[9,10]. 在哺乳动物, TLR9 主要表达于免疫细胞, 如 B 细胞等之上^[11]. 但至今没有关于 TLR9 在胰腺组织分布表达的研究, 且尚没人探寻它是否与胰腺炎的发生、发展有无关联.

笔者这一研究的目的是研究 TLR9 在大鼠胰腺的组织特异性分布情况, 并调查在 CIP 早期 TLR9 mRNA 的表达变化.

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

实验动物为 200 ~ 250 g 的 Wistar 大鼠, 由本校实验动物中心提供. 所有的大鼠皆饲养于标准的笼子里 [室温维持于 (23℃ ± 2)℃, 12 h 更替的白天/黑夜循环]. 它们都用标准的实验动物粮食喂养, 可自由饮水. 在试验之前, 动物适应环境 7 d; 然后维持其它条件不变, 但试验前要禁食 12 小时. 首先, 大鼠被随机分配到对照组或试验组 (试验组按采样时间分为 1, 2, 4, 6, 8, 12 和 24 h 组). 后来为了更加精确地描述 TLR9 mRNA 的变化, 又增加了 0.5, 1.5 和 3 h 组.

1.2 胰腺炎模型的建立

急性胰腺炎模型通过在皮下注射雨蛙素 (Sigma, St. Louis, MO) 来建立, 剂量为 20 μg/kg,

间隔 1 h 分 2 次给予; 但在 0.5, 1, 1.5 和 3 h 组, 总量一次性给予. 对照组则皮下注射生理盐水.

1.3 组织和血液样本的采集

用 1% 的苯巴比妥 (每公斤体重 50 mg) 麻醉后切开大鼠腹腔并切取胰管及其周围的部分胰腺组织. 取少许组织立即浸入 Trizol (Gibco, Carlsbad, CA) 用于提取 RNA; 一部分组织放入 -24℃ 的液氮中保存, 以备随后的冰冻切片及免疫组化检查; 另一部分组织则用 10% 的甲醛固定用于石蜡切片及组织学检查. 每只大鼠抽取门静脉血 2 mL, 在常温下离心后收集上层血清保存于 -80℃ 冰箱, 用于淀粉酶和脂肪酶的测定及细胞因子的检测.

1.4 组织学检查

用 10% 的甲醛固定的组织切片并脱蜡后, 进行常规的 HE 染色. 所有切片采用盲法进行阅片.

1.5 血清淀粉酶和脂肪酶的测定

淀粉酶和脂肪酶的测定在昆明医科大学第一附属医院生化中心的自动生化仪 (Olympus AU5400, Japan) 上进行.

1.6 细胞因子检测

TNF-α, interleukin 6 (IL-6) 和 IL-12 用 ELISA 试剂盒 (R&D, Minneapolis, MN) 来进行测定. 最后用全自动定量绘图酶标仪 (Bio-Rad, M550, Hercules, CA) 来判断结果.

1.7 免疫组化

冰冻切片风干后用冰丙酮处理 15 min, 然后用 pH7.4 的 PBS 液洗 10 min, 再用 3% 双氧水避光孵育 15 min. 脱水 5 min 并用 pH7.4 的 PBS 液洗 5 min × 2 次后, 用 1:20 的山羊血清封闭 30 min. 再用 1:300 的兔抗大鼠 TLR9 抗体 (rabbit anti-rat TLR9 antibody, Santa Cruz, CA) 在 37℃ 孵育 1 h, 4℃ 12 h, 然后用 pH7.4 的 PBS 液洗 5 min × 3 次. 1:200 的生物素化山羊抗兔 IgG (biotinylated goat anti-rabbit IgG; Zhongshan Biotech, Beijing, China) 孵育 40 min, pH7.4 的 PBS 液洗 10 min × 3 次. 最后再用 1:200 辣根过氧化物酶 -

卵白素复合物孵育 30 min 并 pH7.4 的 PBS 液洗 10 min × 3 次。然后用 1:50 DAB 和 0.05% 双氧水显色, 并在洗涤后用苏木素复染、脱水、封片。

1.8 实时逆转录荧光定量 PCR

大鼠胰腺总 RNA 用 Trizol 按说明提取。逆转录引物又 TAKARA (Dalian, China) 设计并合成: TLR9F, 5'-TCCCTGCATAGAGGTAAGTTC-3'; TLR9-R, 5'-TCCAGCCACTGAAGTTGTGA-3'。

TaqMan 探针: 5'-FAM-CTAGAAGTCCCCCA-ACTTCGAGTC-FAMRA-3'。取 5 μg 胰腺总 RNA 逆转录为 cDNA, 再取 5 μL cDNA 进行扩增, 扩增出的产物行 1.5% 琼脂糖电泳。用 GAPDH 作为内对照, 其引物为 GAPDHF, 5'-TGGGTGTGAACC-ACGAGA-A-3'; GAPDHR, 5'-GGCATGGACTGT-GGTCATGA-3'; Taq-Man 探针: 5'-FAMCTGCAC-CAC CAACTGCTTAGCTAMRA-3'。结果用 ΔCt 法进行处理。

1.9 统计学处理

每个实验组及对照组的淀粉酶、脂肪酶和细胞因子检测结果为每组的平均值, 表达为 (mean ± SE) 标准差; 数据采用非配对 Student t test 和方差分析 (ANOVA) 进行检验。实时逆转录荧光定量 PCR 的结果则表达为平均值 (ΔCt), 并采用 Mann-Whitney nonparametric U test 进行检验。以上检验都采用 SPSS, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清淀粉酶和脂肪酶

血清淀粉酶和脂肪酶结果随 CIP 的进展而呈现较为一致的变化; 两酶在 CIP 1 h 组就都已经明显升高 ($P = 0.000$)。淀粉酶在 6 h 组 ($P = 0.000$)、脂肪酶则在 2 h 组 ($P = 0.000$) 达到峰值。不同的是当它们同时在八小时组回落至基线水平后, 血清淀粉酶水平会在 12 h 组再次上升 ($P = 0.005$), 然后在 24 h 组再次回落至基线水平 (表 1)。

2.2 细胞因子检测结果

每个组的血清 TNF-α, IL-6 和 IL-12 用 ELISA 进行检测 (表 2)。3 种细胞因子表现为在 CIP 不同时段的上调; TNF-α 表现为缓慢的上调并在 8 h 组出现峰值, 在 24 h 重回基线水平; IL-6 峰值出现于较早的 6 h 组, 但很快就在 8 h 组回调至基线水平; IL-12 则表现为从 4 h 组到 24 h 组的一个明显上调, 并且没有明显下调的情况出现。

2.3 病理学观察

胰腺间质水肿、细胞肿胀和腺泡空泡形成等典

型的水肿性胰腺炎表现见于所有试验组, 但这些表现在 4 h 和 6 h 组最为明显。细胞空泡化和炎性细胞浸润则多见于 6、8、12 和 24 h 组。

2.4 免疫组化结果

不管对照组还是实验组, 皆可见 TLR9 阳性染色; 但其分布表现一定的组织特异性 (图 1)。TLR9 强染主要分布于实验组的胰管上皮 (图 1A、C、H) 和血管 (图 1F-H); 在对照组标本中的胰管上皮却没有明显的着色 (图 1B)。在主要承担胰腺内分泌功能的胰岛, 实验组表现为 TLR9 淡染 (图 1E); 同样对照组标本没能测得明显的 TLR9 着色 (图 1D)。此外, 无论实验组还是对照组标本的腺泡上都没有测得明显的 TLR9 着色。

2.5 Q-RT-PCR 结果

自 RNA 逆转录而来的 cDNA 经凝胶电泳证实为目的片段大小 (113 bp)。用 Taqman 探针 (一种实时荧光 PCR 技术) 对胰腺 TLR9 mRNA 表达进行定量分析; 其结果揭示: 在 CIP 的前 24 h, TLR9 在胰腺组织中呈现出明显的表达上调。但是, 不同时间点组之间其表达水平不尽相同。TLR9 mRNA 在 0.5 h 组已经上调至对照组的 7.21 (22.85) 倍 ($P = 0.001$), 并在 1 h 组达到峰值, 约为对照组的 8.98 (23.17) 倍 ($P = 0.001$)。然后, 在 1.5 h 至 4 h 组, TLR9 mRNA 仍然呈现具有统计学差异的相对高水平表达; 从 8 h 组开始, 其表达无统计学意义 ($P = 0.059$)。

3 讨论

急性胰腺炎是一种常见而严重的疾病, 但其发病机理仍未能完全阐明; 其中, 重症胰腺炎死亡率仍较高^[12-14]。作为一类新的跨膜蛋白, TLR 家族的发现给急性胰腺炎发病机理探索提供了新的途径^[15, 16]。TLR9 在其家族中较晚被发现, 通常被认为主要表达于 B 细胞、树突细胞等免疫细胞^[11, 17]。但是, 最近有报道一些 TLR 家族成员也可以表达于某些上皮细胞^[18-22]。此外, 在一些肿瘤细胞上也有 TLR9 高表达的报道^[23-25]。这些发现说明 TLR9 确实可以在一些非免疫细胞上表达, 并进一步提示在这些细胞上 TLR9 的作用可能并不是识别 CpG 基序。

所以, 笔者实验的目的是检测在胰腺组织是否有 TLR9 的表达, 如果有, 它的表达有无组织特异性, 是否参与了急性胰腺炎的早期炎症反应。

笔者用门静脉淀粉酶、脂肪酶以及胰腺组织学切片检查作为判断 CIP 的指标, 这些指标提示典型的 CIP 胰腺炎改变^[26]。

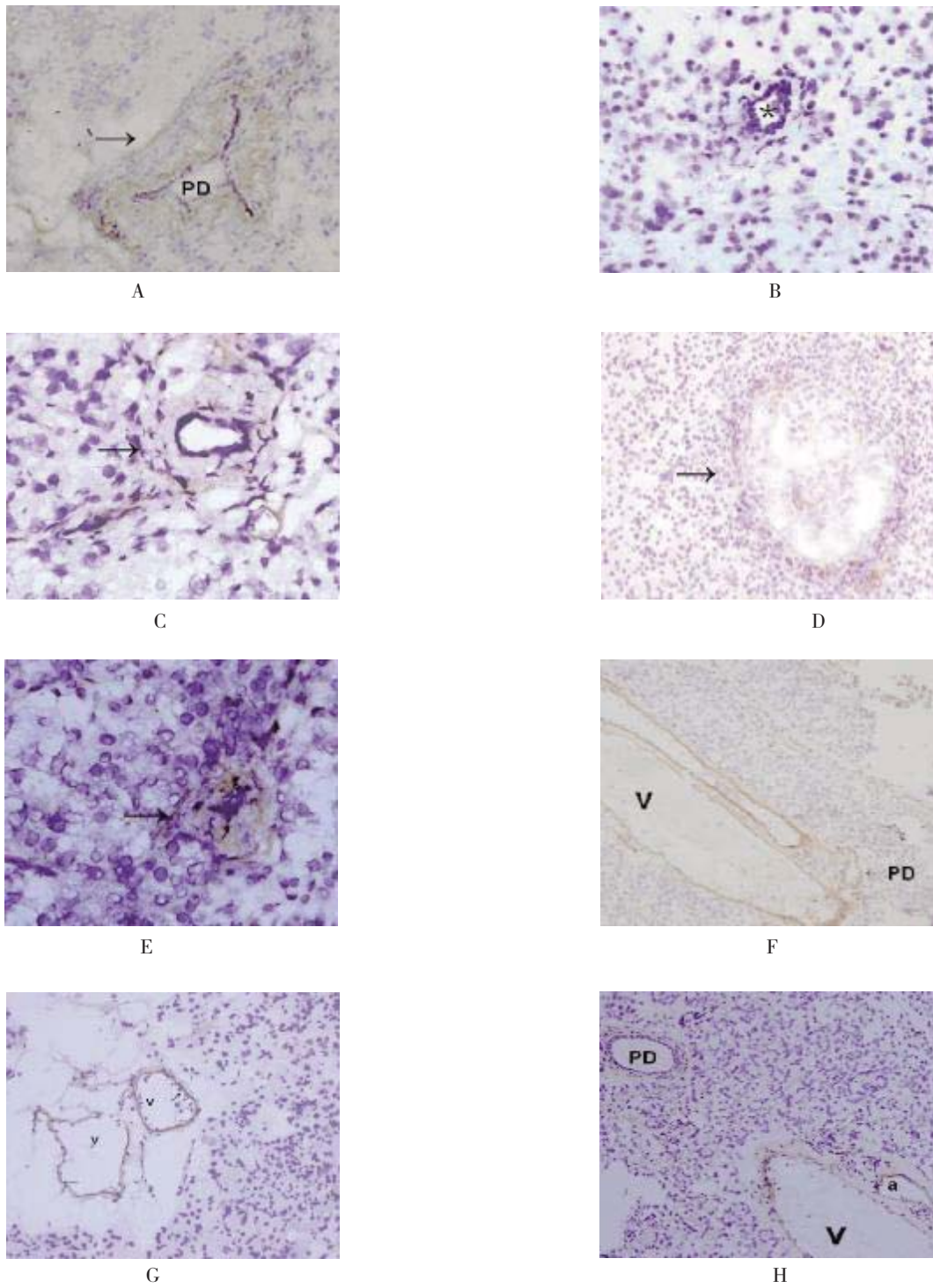


图 1 大鼠胰腺炎时胰腺组织 TLR9 免疫组织化学结果

Fig. 1 The immunohistochemistry of TLR9 in pancreas of rats with pancreatitis

A:TLR9 胰管表达; B:对照组小胰管; C:TLR9 胰管表达; D:对照组胰岛; E:TLR9 胰岛表达; F-H:TLR9 动静脉表达; PD:胰管
a:动脉 v:静脉.

表 1 血清淀粉酶和脂肪酶检测结果 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 The results of serum amylase and lipase ($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	淀粉酶 (IU/L)	<i>P</i>	脂肪酶 (IU/L)	<i>P</i>
对照组	10	1 512.73 ± 98.26	—	68.54 ± 9.29	—
1 h	10	2 998.63 ± 48.38 **	0.000	253.91 ± 12.27**	0.000
2 h	10	3 712.61 ± 136.46 **	0.000	371.95 ± 19.50**	0.000
4 h	10	4 007.50 ± 129.15 **	0.000	167.54 ± 12.90**	0.000
6 h	10	4 361.34 ± 97.59**	0.000	93.49 ± 7.09*	0.047
8 h	10	1 614.38 ± 66.79	0.403	79.34 ± 8.01	0.391
12 h	10	3 936.20 ± 111.14**	0.000	70.23 ± 8.35	0.894
24 h	10	1 707.46 ± 70.53	0.125	63.61 ± 6.30	0.665

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 血清细胞因子 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 2 Serum cytokines ($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-12 (pg/mL)
对照组	8	29.64 ± 0.76	721.23 ± 29.45	22.91 ± 2.07
1 h	8	30.24 ± 1.16	730.39 ± 24.80	26.44 ± 2.96
2 h	8	33.33 ± 1.70	755.31 ± 39.81	31.42 ± 3.35*
4 h	8	33.61 ± 1.78	894.24 ± 70.03*	34.53 ± 3.06**
6 h	8	38.67 ± 2.14**	1296.34 ± 121.60**	34.93 ± 3.07**
8 h	8	52.35 ± 2.36**	780.89 ± 64.98	38.75 ± 3.27**
12 h	8	42.01 ± 2.06**	764.99 ± 61.77	40.25 ± 4.34**
24 h	8	31.93 ± 1.46	771.56 ± 43.74	65.13 ± 6.24**

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

抗大鼠 TLR9 的特异性抗体为免疫组化检测 TLR9 在大鼠胰腺的存在和分布提供了可能. 免疫组化提示 TLR9 主要表达在胰管, 特别在胰管上皮. 笔者前期的实验也发现 TLR4 在胰管上皮也有表达; 这是否提示 TLR9 和 TLR4 存在着一致或协同的作用. 胰管粘膜屏障 (PDMB)^[27] 是一种被广泛认同的胰管自身的保护机制; 通常认为它的保护作用既包括机械性隔离因素, 也包括化学性机制. 作为先天性免疫系统的一种重要受体, TLR9 在胰管的表达揭示了一种可能: TLR9 激活和其后细胞因子释放也许参与了 PDMB 的抗炎作用调节. 据此, TLR9 也可能为一个潜在的免疫调节点. 免疫组化也揭示 TLR9 着色于胰腺的血管内皮系统. 微循环损害是急性胰腺炎的早期病理改变之一^[28,29]. 笔者前期的实验也提示: TLR4 可能参予这一损害^[30]. TLR9 的免疫组化检测结合其实时 RT-PCR 结果揭示: TLR9 可能涉及胰腺炎早期的血管微循环损害.

为了探究 TLR9 与早期胰腺炎的关联性, 实时 RT-PCR 被用于对 TLR9 mRNA 表达进行定量分析. 实时 RT-PCR 结果证实 TLR9 mRNA 在胰腺为

低水平表达, 但在 CIP 早期, 特别是前 8 h, TLR9 mRNA 表达上调明显. TLR9 mRNA 上调迅速, 在 0.5 h 组已经上升 7.21 倍 ($P = 0.001$), 并在 1 h 组达到峰值, 约为对照组的 8.98 倍 ($P = 0.001$). 在注射雨蛙素后 30 min, TLR9 已经上调至如此高的水平, 这充分说明: TLR9 对于 CIP 反应迅速, TLR9 参予了 CIP 的发展. 随后, TLR9 表达并未出现明显得下调, 而是维持在一个相对的高水平. Ling liu 等^[31] 提出: CpG 并不能特异性地诱导 TLR9 表达上调. 结合笔者的实验结果, 可以间接地推测: CIP 能够诱导 TLR9 快速而强烈的表达上调.

TLR9 的上调和血清中一些细胞因子的增加是密切相关的. 以往的研究已经证实 TLR9 的激活可以诱导促炎症细胞因子, 如 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 和 TNF- α 等的大量释放^[32-34]. 笔者对其中的 3 种, IL-10, IL-12 和 TNF- α 进行了检测; 它们在 TLR9 上调后的某一特定时段都表现为上调. 这一结果也间接支持笔者关于 TLR9 参予了 CIP 的推测.

综上所述, TLR9 在大鼠正常胰腺呈低水平地表达, 但在 CIP 早期快速上调. 这一发现将有助于

阐明胰腺炎的发生和由无菌向感染发展的机理; 但要具体地定义 TLR9 在胰腺炎中的确切作用尚需进一步的研究。

[参考文献]

- [1] MODLIN R L, BRIGHTBILL H D, GODOWSKI P J. The toll of innate immunity on microbial pathogens[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340: 1 834 - 1 835.
- [2] GORDON S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response [J]. *Cell*, 2003, 111: 927 - 930.
- [3] AKIRA S. Mammalian Toll-like receptors[J]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15: 5 - 11.
- [4] ADEREM A, ULEVITCH R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response [J]. *Nature*, 2000, 406: 782 - 787.
- [5] BARTON G M, MEDZHITOV R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors [J]. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14: 380 - 383.
- [6] VASSELON T, DETMERS P A. Toll Receptors: a Central element in innate immune response [J]. *Infect Immun*, 2002, 70: 1 033 - 1 041.
- [7] MEANS T K, GOLENBOCK D T, FENTON M J. Structure and function of Toll-like receptor proteins [J]. *Life Sci*, 2000, 68: 241 - 258.
- [8] LIEN E, INGALLS R R. Toll-like receptors[J]. *Crit Care Med*, 2002, 30: s1 - s11.
- [9] KRIEG A M, HARTMANN G, YI A K. Mechanism of action of CpG DNA[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000, 247: 1 - 21.
- [10] HEMMI H, TAKEUCHI O, KAWAI T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA [J]. *Nature*, 2000, 408: 740 - 745.
- [11] WAGNER H. The immunobiology of the TLR9 subfamily [J]. *Trends Immunol*, 2004, 25: 381 - 386.
- [12] BRUNO M J. Current insights into the pathogenesis of acute and chronic pancreatitis [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2001, (Suppl 234): 103 - 108.
- [13] SAKORAFAS G H, TSIOTOU A G. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2000, 30: 343 - 356.
- [14] BALAKRISHNAN V, PHILIP M. Cytokines as predictors of severity in acute pancreatitis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1998, 13: 1 177 - 1 179.
- [15] MORA A, MATEO M P, VIEDMA J A, et al. Activation of cellular immune response in acute pancreatitis [J]. *Gut*, 1997, 40: 794 - 797.
- [16] FROSSARD J L, PASTOR C. Experimental acute pancreatitis: New insights into the pathophysiology [J]. *Front Biosci*, 2002, 7: 275 - 287.
- [17] MELINDA A. MERRELL, JOANNA M, et al. Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity [J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(7): 437 - 447.
- [18] SCHMAUSSER B, ANDRULIS M, ENDRICH S, et al. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 136: 521 - 526.
- [19] SCHAEFER T M, DESOUZA K, FAHEY J V, et al. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells[J]. *Immunology*, 2004, 112: 428 - 436.
- [20] BOWMAN C C, RASLEY A, TRANGUCH S L, et al. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products[J]. *Glia*, 2003, 43: 281 - 291.
- [21] PLATZ J, BEISSWENGER C, DALPKE A, et al. Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells[J]. *J Immunol*, 2004, 173: 1 219 - 1 223.
- [22] MEMPEL M, VOELCKER V, KOLLISCH G, et al. Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor κ B controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent [J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 121: 1 389 - 1 396.
- [23] SCHMAUSSER B, ANDRULIS M, ENDRICH S, et al. Toll like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*[J]. *Int J Med Microbiol*, 2005, 295: 179 - 185.
- [24] DROEMANN D, ALBRECHT D, GERDES J, et al. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9[J]. *Respir Res*, 2005, 6: 1.
- [25] ZAKS-ZILBERMAN M, ZAKS T Z, VOGEL S N. Induction of proinflammatory and chemokine genes by lipopolysaccharide and paclitaxel (Taxol) in murine and human breast cancer cell lines[J]. *Cytokine*, 2001, 15: 156 - 165.
- [26] TANI S, OTSUKI M, ITOH H, et al. Histologic and biochemical alterations in experimental acute pancreatitis induced by supramaximal cerulein stimulation [J]. *Int J Pancreatol*, 1987, 2: 337 - 348.
- [27] KONOK G P, THOMPSON A G. Pancreatic ductal mucosa as a protective barrier in the pathogenesis of pancreatitis [J]. *Am J Surg*, 1969, 117: 18 - 23.
- [28] ZHOU Z G, CHEN Y D, WEI S, et al. Pancreatic microcirculatory impairment in experiment acute pancreatitis in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8: 933 - 936.
- [29] ZHOU Z G, CHEN Y D. Influencing factor of pancreatic microcirculatory impairment in acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8: 406 - 412.
- [30] YUAN L I, ZONG-GUANG ZHOU, QING-JIE XIA, et al. Toll-like receptor 4 detected in exocrine pancreas and the change of expression in cerulein-induced pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2005, 30: 375 - 381.
- [31] LING LIU, XIAOHUI ZHOU, JIANYING SHI, et al. Toll-like receptor-9 induced by physical trauma mediates release of cytokines following exposure to CpG motif in mouse skin[J]. *Immunology*, 2003, 110: 341 - 347.
- [32] KRIEG A M, YI A K, MATSON S, et al. CpG motif in bacterial DNA trigger direct B-cell activation [J]. *Nature*, 1995, 374: 546 - 549.
- [33] STACEY K J, SWEET M J, HUME D A. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA [J]. *J Immunol*, 1996, 157: 2 116 - 2 122.
- [34] SPARWASSER T, KOCH E S, VABULAS R M, et al. Bacterial DNA and immuno-stimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells [J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28: 2 045 - 2 054.

(2014-05-02 收稿)