

Toll样受体4及其负性调控因子 Tollip 在结肠炎大鼠肠黏膜中的表达

徐 宁^{1△}, 于振海^{2,3△*}, 王志强², 曲洪林², 孙 毅², 刘 蛟²

1. 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院消化内科, 烟台 264000
2. 滨州医学院人体解剖学教研室, 滨州 256603
3. 第二军医大学基础部人体解剖学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨 Toll 样受体 4(TLR4)、NF- κ B p65 及负性调控因子 Tollip 在三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的结肠炎大鼠肠黏膜中的表达。**方法** 40 只健康雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组和模型组。采用免疫组织化学及 RT-PCR 方法比较两组大鼠肠黏膜 TLR4、NF- κ B p65 和 Tollip 的表达。**结果** TLR4、NF- κ B p65 mRNA 在模型组肠黏膜中的表达高于正常对照组(TLR4: 0.376 ± 0.029 vs 0.215 ± 0.049 , $t=2.731$, $P=0.013$; NF- κ B p65: 0.746 ± 0.049 vs 0.206 ± 0.063 , $t=6.055$, $P=0.000$), 与大体形态损伤评分(TLR4: $r=0.754$, $P=0.000$; NF- κ B p65: $r=0.548$, $P=0.012$)及组织学损伤评分(TLR4: $r=0.866$, $P=0.000$; NF- κ B p65: $r=0.919$, $P=0.000$)呈正相关。Tollip mRNA 在模型组及正常组中表达差异无统计学意义(0.288 ± 0.050 vs 0.140 ± 0.046 , $t=1.993$, $P=0.061$); Tollip 蛋白在模型组肠黏膜固有层的表达高于正常组; Tollip 的表达与大体形态损伤评分($r=-0.497$, $P=0.026$)及组织学损伤评分($r=-0.551$, $P=0.012$)呈负相关。**结论** Toll 样受体 4 与负性调控因子 Tollip 的表达失衡参与了炎症性肠病的发病机制。

[关键词] Toll 样受体 4; NF- κ B p65; Tollip; 结肠炎; 肠黏膜

[中图分类号] R 574.62 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0032-06

Expression of Toll-like receptor 4 and its negative regulating factor Tollip in colonic mucosa of rats with experimental colitis

XU Ning^{1△}, YU Zhen-hai^{2,3△*}, WANG Zhi-qiang², QU Hong-lin², SUN Yi², LIU Jiao²

1. Department of Gastroenterology, Affiliated Yantai Yuhuangding Hospital, Qingdao University Medical School, Yantai 264000, Shandong, China
2. Department of Human Anatomy, Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong, China
3. Department of Human Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), NF- κ B p65 and the negative regulating factor Toll-interacting protein (Tollip) in colonic mucosa of rats with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced experimental colitis. **Methods** Forty healthy male SD rats were randomly divided into normal control group and model group. The expression of TLR4, NF- κ Bp65 and Tollip was detected and compared between the two groups by immunohistochemistry(IHC) and RT-PCR. **Results** RT-PCR revealed a significant higher expression of TLR4 and NF- κ B p65 mRNA in the model group compared with the normal control group (TLR4: 0.376 ± 0.029 vs 0.215 ± 0.049 , $t=2.731$, $P=0.013$; NF- κ B p65: 0.746 ± 0.049 vs 0.206 ± 0.063 , $t=6.055$, $P=0.000$). The expression of TLR4 and NF- κ B p65 was positively correlated with the general injury score (TLR4: $r=0.754$, $P=0.000$; NF- κ B p65: $r=0.548$, $P=0.012$) and the histological injury score (TLR4: $r=0.866$, $P=0.000$; NF- κ B p65: $r=0.919$, $P=0.000$). Expression of Tollip mRNA was not significantly different between the two groups as detected by RT-PCR (0.288 ± 0.050 vs 0.140 ± 0.046 , $t=1.993$, $P=0.061$). IHC revealed that Tollip protein expression was mainly assembled in the colonic mucosal lamina propria, and the expression in the model group was higher than that in the normal control group. Tollip expression was negatively correlated

[收稿日期] 2011-11-05 **[接受日期]** 2011-12-15

[基金项目] 山东省自然科学基金(ZR2009CL006). Supported by Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2009CL006).

[作者简介] 徐 宁, 硕士, 主治医师. E-mail: xuning916@sohu.com; 于振海, 博士生, 讲师.

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0535-6913213, E-mail: yzh78978@sohu.com

with the general injury score ($r = -0.497, P = 0.026$) and the histological injury score ($r = -0.551, P = 0.012$).

Conclusion The unbalanced expression of TLR4 and the negative regulating factor Tollip participates in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.

[Key words] Toll-like receptor 4; NF- κ B p65; Tollip; colitis; intestinal mucosa

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1): 32-37]

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组慢性肠道炎症性疾病的总称,包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。有证据表明该类疾病的发生可能与遗传易感机体对外环境、饮食、微生物感染因素产生难以自控的肠道免疫反应有关^[1]。人类胃肠道定居着约400余种复杂的非致病性微生物,它们在胃肠道的空间分布及种属优势不尽相同。人体的天然免疫就是在这样的压力下进化并产生对正常菌群的耐受,与之保持和平和共生;同时也保存对致病性肠道菌群迅速反应的能力^[2]。肠上皮作为黏膜免疫系统的第一道防线,持续暴露于高浓度的腔内脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)。肠道对LPS的耐受现象可能是Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)表达和其下游信号调控的结果^[3]。

TLR通过识别微生物的保守结构从而在启动宿主的天然免疫并清除入侵病原菌的过程中起着重要作用。它能特异性地识别LPS,激活细胞内各级信号转导蛋白或激酶,促使NF- κ B活化,最终导致炎症因子的表达^[4]。研究显示正常肠道TLR的表达和功能受到相对抑制,而在炎症,包括IBD的刺激下明显增高^[5]。TLR信号转导途径中的负调控因子在维持肠道的免疫耐受及避免过度炎症反应中发挥重要作用。TLR途径的负调控因子包括Tollip(Toll-interacting protein, Tollip)、PPAR- γ 、A20、IRAK-M等^[6]。Tollip与TLR4/MyD88/IRAK复合物作用,抑制LPS所致的IRAK的磷酸化激活,减少NF- κ B的转录活性,从而抑制炎症的发生,Tollip的表达下降或功能异常可能促进了某些慢性炎症性疾病的发生及发展^[7]。

目前国外研究一致认为IBD患者肠黏膜上皮及固有层炎性细胞TLR4表达升高,提示TLR信号转导通路在IBD患者中可能过度激活^[8-10],然而负性调控因子Tollip在此过程中是否发挥了作用的相关报道较少,为此本实验通过研究TLR转导通路中的关键因子及负性调控因子Tollip在结肠炎大鼠肠黏膜中的表达,以期探讨IBD的发病机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物及试剂 健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,体质量200~250 g,清洁级,购于山东绿叶制药有限公司实验动物中心,动物合格证号:SCXK(鲁)20090009;三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)购自美国Sigma公司;TLR4、NF- κ B p65多克隆抗体及SP试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,Tollip多克隆抗体购自美国Abgent公司;RNA抽提试剂盒购自上海博尚生物技术有限公司;反转录试剂盒购自美国Fermentas公司;PCR反应试剂盒购自TaKaRa公司。

1.2 结肠炎大鼠模型建立 40只健康雄性SD大鼠按照随机原则均分为2组,即正常对照组和模型组。模型组大鼠禁食24 h后,用10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉,一次性将TNBS(100 mg/kg)和50%乙醇以1:1(V:V)混合后,把1 ml混合溶液用橡胶输液管缓慢注入距肛门约8 cm的肠腔内,然后立即提起大鼠尾巴倒置8 min,防止药液倒流^[11]。对照组大鼠注入等体积的生理盐水。

造模3周后处死所有大鼠,分别于结肠上段(距盲肠1 cm)、结肠中段、结肠末端(距肛门约1 cm)处剪取结肠数段,迅速放入液氮中保存以备RT-PCR检测。其余组织用冷生理盐水冲洗肠内污染物3~4次,取大鼠肛门至回盲部结肠,沿肠系膜纵行剖开,观察大体形态改变,评分标准^[12]如下:(1)无粘连,0分;轻度粘连(结肠与其他组织剥离较易),1分;重度粘连,2分。(2)无溃疡形成及炎症,0分;局部充血,无溃疡,1分;1处溃疡,不伴充血或肠壁增厚,2分;1处溃疡伴炎症,3分;>2处溃疡伴炎症 ≤ 1 cm,4分;>2处溃疡和(或)炎症>1 cm,5分;溃疡和(或)炎症>2 cm,病变范围每增加1 cm,计分加1分(6~8分)。两项相加得总分。从每段结肠距肛门1、3、8 cm处及横结肠和升结肠取5块组织标本(2 mm \times 10 mm),另于炎症严重或溃疡处至少取1块组织,4%多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片(4 μ m),H-E染色,光镜下观察组织病理学改变,评分标准^[13]如下:(1)无溃疡,0分;小溃疡 ≤ 3 mm,1

分;大溃疡>3 mm,2分。(2)无炎症,0分;轻度炎症,1分;重度炎症,2分。(3)无肉芽肿,0分;有肉芽肿,1分。(4)病变深度:深及黏膜下层,1分;深入肌层,2分;深入浆膜层,3分。(5)无纤维化,0分;轻度纤维化,1分;重度纤维化,2分。各项相加得总分。

1.3 免疫组织化学染色 将石蜡切片经脱蜡→3% H₂O₂室温避光孵育 30 min以阻断内源性过氧化物酶→热修复抗原→封闭→加入一抗:滴加兔抗鼠多克隆抗体 TLR4(1:50)、NF-κB p65(1:100)、Tollip(1:100)→滴加生物素标记的羊抗兔 Ig 第二抗体→DAB显色→苏木素复染→脱水→封片,显微镜观察,大体区分是胞质染色和(或)胞核染色。每次实验均设立空白对照,以 0.01 mol/L PBS 代替一抗作为空白对照。

1.4 半定量 RT-PCR 检测

1.4.1 大鼠肠黏膜总 RNA 的提取 剪取肠黏膜于 1.5 ml 的 EP 管中,加入 1 ml 的 TRIzol 后振荡混匀并在冰上放置 15 min;加入 200 μl 的氯仿(预冷)剧烈振荡混匀 30 s,冰上放置 3 min 后,12 000×g,4℃离心 10 min;吸取上清液 300 μl 加入等体积(300 μl)的异丙醇(预冷)混匀,冰上放置 20 min,12 000×g,4℃离心 10 min;小心移去上清;用 75% DEPC 乙醇溶液洗 2 次,每次 1 ml,7 500×g,4℃离心 5 min;弃干净上清,空气干燥 5 min;溶解于 15 μl 的 DEPC 水中。取溶解于 DEPC 水中的总 RNA 进行凝胶电

泳并成像。

1.4.2 RT-PCR 反应 RT 反应体系:不含 RNA 的去离子水(DEPC H₂O)6 μl;Oligo(dT)₁₈引物(0.5 μg/μl)1 μl;RNA 5 μl;5×反应缓冲液 4 μl;RNA 酶抑制剂(20 μg/μl)1 μl;10 mmol/L dNTP 混合物 2 μl;M-MLV 反转录酶(200 U/μl)1 μl。总体积 20 μl,混匀,简单离心。RT 反应条件:42℃ 60 min,70℃ 5 min,4℃ 5 min,1 个循环。

PCR 反应体系:DEPC 水 35.5 μl 10×Taq 上样缓冲液(含 Mg²⁺)5 μl;dNTP(10 mmol/L)1 μl;上游引物(10 pmol/μl)1.5 μl;下游引物(10 pmol/μl)1.5 μl;cDNA 模板 5 μl;Taq 酶(2.5 U/μl)0.5 μl。TLR4 PCR 反应条件:95℃预变性 5 min 后,变性 94℃ 40 s;退火 55℃ 40 s;延伸 72℃ 25 s,共 30 个循环,最后 72℃延伸 7 min。NF-κB p65 PCR 反应条件:94℃预变性 5 min 后,变性 94℃ 30 s;退火 53℃ 30 s;延伸 72℃ 45 s,共 30 个循环,最后 72℃延伸 5 min。Tollip PCR 反应条件:95℃预变性 5 min 后,变性 94℃ 40 s;退火 56℃ 40 s;延伸 72℃ 33 s,共 30 个循环,最后 72℃延伸 7 min。反应体系采用 β-actin 作为内参照。引物序列为:正向引物 5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3';反向引物 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3'。产物长度为 496 bp。TLR4、NF-κB p65、Tollip 的引物序列及产物长度见表 1。

表 1 引物序列及扩增片段长度

Tab 1 Specific primers used for semi-quantitative RT-PCR

| Gene | Sequence (5'-3') | Size (bp) |
|-----------|--|-----------|
| TLR4 | Forward primer GGC CTC CCT GGT GTT GGA TTT TAC | 272 |
| | Reverse primer AAA GCT GAA AGC GGG GCA CTC C | |
| NF-κB p65 | Forward primer GGC AGC ACT CCT TAT CAA C | 249 |
| | Reverse primer GGT GTC GTC CCA TCG TAG | |
| Tollip | Forward primer GGA CAA CGG TCA GCG ACG CA | 345 |
| | Reverse primer CAT AGC CCA GAC GCA GGC GG | |

TLR4: Toll-like receptor 4; Tollip: Toll-interacting protein

1.4.3 电泳 反应结束后取反应产物 5 μl 行 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色,采用凝胶成像系统(美国 BioRad 公司,Gel Doc XR System)进行分析,以目的基因条带与内参照 β-actin 条带的比值作为目的基因的相对表达量,每个实验组重复 3 次计算统计量。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计

学分析。数据以 $\bar{x} \pm s_E$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;相关分析采用 Spearman 秩相关分析,双侧检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 一般情况 正常对照组大鼠活泼好动,毛色鲜亮,食欲正常,大便成形,体质量稳定增加;结肠炎模

型组大鼠建模 24 h 后出现精神萎靡、毛色晦暗、厌食、懒动等表现,解稀便或软便,大便隐血阳性,部分可见肉眼血便,体质量减轻。

正常组大鼠结肠黏膜皱襞纹理清晰,无糜烂和溃疡等表现;模型组大鼠肠管增粗,肠壁增厚,与周围组织粘连,黏膜充血水肿,伴糜烂、溃疡形成。

镜下见正常组大鼠肠黏膜上皮完整,细胞形态正常,腺体排列规则,有丰富的杯状细胞,固有层见少量淋巴细胞表达;模型组大鼠肠黏膜上皮脱落严重,黏膜及黏膜下层见大量中性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞及嗜酸粒细胞浸润并有隐窝脓肿形成,可见出血性坏死、毛细血管扩张,腺体结构紊乱,杯状细

胞少,隐窝脓肿形成,可见范围较广的溃疡,并深入固有层。

2.2 结肠黏膜 TLR4、NF- κ B p65 和 Tollip 的表达

2.2.1 TLR4 正常组肠黏膜上皮及固有层几乎不表达或微弱表达 TLR4 蛋白;模型组肠黏膜上皮及固有层单个核细胞均有 TLR4 蛋白表达,且胞质及胞膜均见黄色粗大颗粒,表达强度高于正常组,越接近肠腔,表达越强,在上皮中表达高于固有层,固有层表达也较强,见图 1A、1B。TLR4 mRNA 在模型组的表达高于正常组(0.376 ± 0.029 vs 0.215 ± 0.049 , $t = 2.731$, $P = 0.013$,图 2A)。TLR4 表达与大体形态损伤评分及组织学损伤评分呈正相关(表 2)。

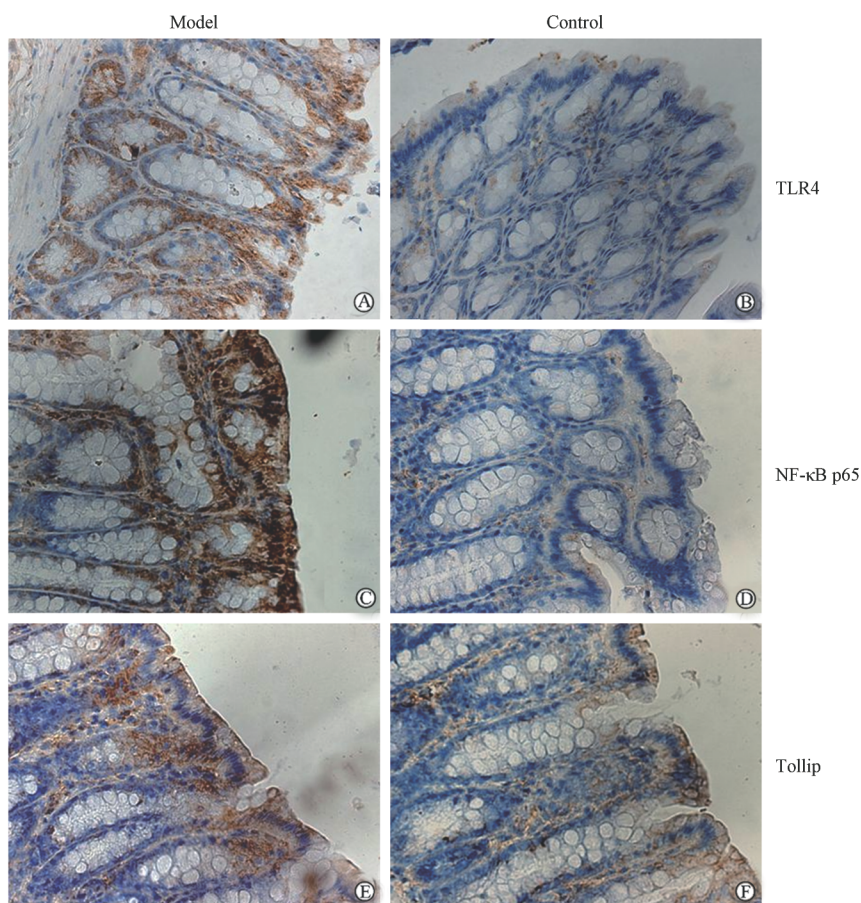


图 1 TLR4、NF- κ B p65 和 Tollip 免疫组化染色结果

Fig 1 Immunohistochemical staining with antibodies against TLR4, NF- κ B p65 and Tollip

TLR4: Toll-like receptor 4; Tollip: Toll-interacting protein. Original magnification: $\times 40$

2.2.2 NF- κ B p65 正常组肠黏膜上皮及固有层微弱表达 NF- κ B p65 蛋白;模型组肠黏膜上皮及固有层单个核细胞均有 NF- κ B p65 蛋白表达,且胞质及胞核均见黄色粗大颗粒,表达强度高于正常组,见图 1C、1D。NF- κ B p65 mRNA 在模型组的表达高于正常组(0.746 ± 0.049 vs 0.206 ± 0.063 , $t = 6.055$,

$P = 0.000$,图 2B)。NF- κ B p65 与大体形态损伤评分及组织学损伤评分呈正相关(表 2)。

2.2.3 Tollip 正常组肠黏膜上皮及固有层均表达 Tollip 蛋白,肠腔上皮表达高于固有层,见胞质有黄色细小颗粒;模型组固有层 Tollip 蛋白表达高于正常组。固有层 Tollip 蛋白呈散在阳性表达,阳性信

号多集中于靠近肠腔上皮及隐窝上皮基底部,见图1E、1F。Tollip mRNA在模型组表达与正常组差异无统计学意义(0.288 ± 0.050 vs 0.140 ± 0.046 , $t =$

1.993 , $P = 0.061$,图2C)。Tollip表达与大体形态损伤评分及组织学损伤评分呈负相关(表2)。

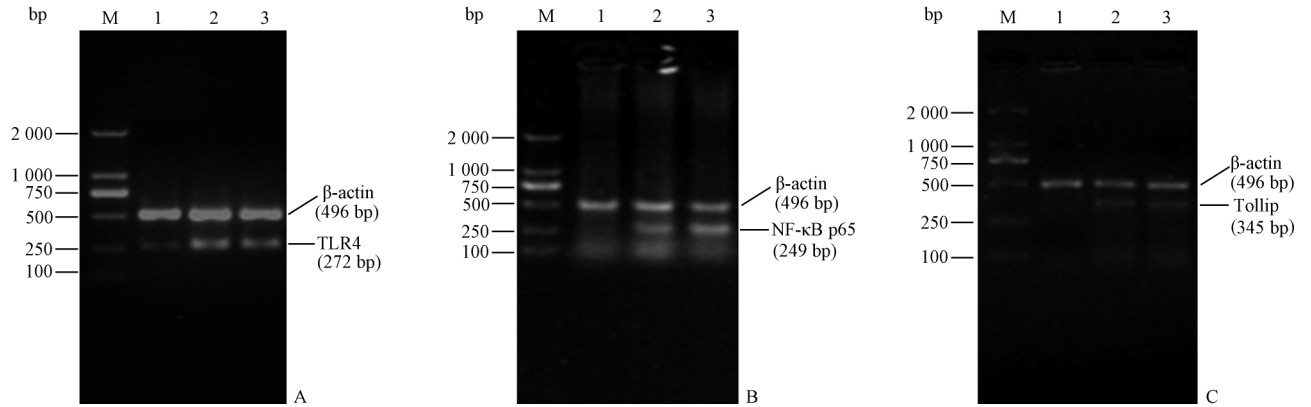


图2 RT-PCR检测TLR4、NF-κB p65和Tollip mRNA电泳结果

Fig 2 Electrophoresis of TLR4, NF-κB p65 and Tollip mRNA in the model and control groups by RT-PCT

M: Marker; 1: Control group; 2-3: Model group. TLR4: Toll-like receptor 4; Tollip: Toll-interacting protein. A: TLR4; B: NF-κB p65; C: Tollip

表2 TLR4、NF-κB p65和Tollip的表达与大体形态损伤评分、组织学损伤评分的相关性

Tab 2 Correlation of TLR4, NF-κB p65 and Tollip with general and histological injury scores

| Score | TLR4 | | NF-κB p65 | | Tollip | |
|--------------------|-------|-------|-----------|-------|--------|-------|
| | r | P | r | P | r | P |
| General score | 0.754 | 0.000 | 0.548 | 0.012 | -0.497 | 0.026 |
| Histological score | 0.866 | 0.000 | 0.919 | 0.000 | -0.551 | 0.012 |

TLR4: Toll-like receptor 4; Tollip: Toll-interacting protein

3 讨论

炎症性肠病是遗传、环境因素和免疫系统相互作用的结果。免疫反应异常是IBD发病中重要的环节,黏膜免疫系统存在促炎和抗炎之间的微妙平衡,一旦这种平衡遭受扰乱,就会促进IBD的发生。TLR4作为宿主应对细菌入侵的重要介质,联系着肠道天然与获得性免疫反应^[14]。大量LPS位于肠腔,TLR4是LPS受体复合物的主要单位,TLR4的表达及功能在维持肠道微平衡中起重要作用^[15]。本研究显示正常大鼠结肠黏膜TLR4、NF-κB p65蛋白表达微弱或不表达。有研究显示肠黏膜上皮通过下调TLR4及MD2的表达来限制LPS信号传递^[16]。健康肠道对大量LPS的良好耐受是源于肠黏膜TLR4的表达下调,最大程度地减少了肠道对LPS的识别,结肠黏膜对食物抗原和共生菌群产生有限免疫反应。TNBS诱导结肠炎大鼠结肠黏膜TLR4、NF-κB p65表达增加,而且与大体形态损伤评分及组织学损伤评分呈正相关。TLR4过度表达,表明肠腔内抗原产生及摄取增加,机体免疫耐受

被打破,炎症反应明显且持续。此外肠黏膜损伤,大量TLR4阳性的巨噬细胞募集至黏膜区,更增加了肠黏膜对LPS的敏感性^[17]。

Tollip是TLR信号转导通路中的负性调节因子,它可抑制IRAK的磷酸化与TLR4的结合从而阻止下游信号转导,抑制细胞活化及炎症反应,在炎症反应的负调控中发挥重要作用^[18]。正常生理状态下人体脑、心、肝、肺、骨骼肌、小肠及多种腺体组织组成性表达TLR4及Tollip^[19]。它的表达上调可诱导肠上皮细胞对肠道菌丛的免疫耐受,研究表明肠上皮细胞低表达TLR4而高表达Tollip^[20],它可降低IRAK磷酸化而对肠道细菌产物表现出低反应性,从而避免肠道内细菌源性的TLR配体诱导过度炎症反应^[21]。本研究显示正常肠黏膜及固有层均表达Tollip,肠腔上皮表达高于固有层,这符合肠黏膜对肠道菌丛的免疫耐受。Tollip在正常组及模型组表达差异无统计学意义,与国外研究^[22]相一致。模型组肠黏膜Tollip表达与大体形态损伤评分及组织学损伤评分呈负相关,提示炎症越重,Tollip表达越低;模型组肠黏膜上皮TLR4、NF-κB p65表达明

显升高,而 Tollip 表达未随之明显升高,提示上皮细胞内 TLR4 处于功能活跃状态^[23]。模型组固有层 Tollip 表达高于正常组,Tollip 表达多集中于肠腔上皮基底部分及隐窝上皮基底部分,这些部位同时也是炎症渗出较重的部位。单个核细胞是具有高度免疫活性的细胞,在 LPS 刺激下释放大量炎症因子。Tollip 在单个核细胞表达上调可能是机体应对结肠局部炎症避免其过度反应的一种机制,单个核细胞的过度激活可能存在其他负性调节因子的下调或功能失活。

综上所述,结肠炎大鼠结肠黏膜过度表达 TLR4、NF- κ B p65,而 Tollip 表达未随之升高,炎症越重,二者表达越低,提示 TLR 信号转导通路负性调节因子的表达异常或功能下降参与了炎症性肠病结肠黏膜免疫耐受缺失及过度炎症反应。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Hanauer S B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2006, 12(Suppl 1): S3-S9.
- [2] Cario E, Podolsky D K. Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals[J]. *Mol Immunol*, 2005, 42: 887-893.
- [3] Wang J H, Doyle M, Manning B J, Di Wu Q, Blankson S, Redmond H P. Induction of bacterial lipoprotein tolerance is associated with suppression of toll-like receptor 2 expression[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 36068-36075.
- [4] Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388: 621-625.
- [5] Cario E, Gerken G, Podolsky D K. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132: 1359-1374.
- [6] Oshima N, Ishihara S, Rumi M A, Aziz M M, Mishima Y, Kadota C, et al. A20 is an early responding negative regulator of Toll-like receptor 5 signalling in intestinal epithelial cells during inflammation[J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 159: 185-198.
- [7] Song Z, Yin J, Yao C, Sun Z, Shao M, Zhang Y, et al. Variants in the Toll-interacting protein gene are associated with susceptibility to sepsis in the Chinese Han population[J]. *Crit Care*, 2011, 15: R12.
- [8] Tanaka K. Expression of Toll-like receptors in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2008, 2: 193-196.
- [9] Fukata M, Abreu M T. TLR4 signalling in the intestine in health and disease[J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35 (Pt 6): 1473-1478.
- [10] Oostenbrug L E, Drenth J P, de Jong D J, Nolte I M, Oosterom E, van Dullemen H M, et al. Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2005, 11: 567-575.
- [11] Morris G P, Beck P L, Herridge M S, Depew W T, Szewczuk M R, Wallace J L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. *Gastroenterology*, 1989, 96: 795-803.
- [12] Butzner J D, Parmar R, Bell C J, Dalal V. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat[J]. *Gut*, 1996, 38: 568-573.
- [13] Akcan A, Muhtaroglu S, Akgun H, Akyildiz H, Kucuk C, Sozuer E, et al. Ameliorative effects of bombesin and neurotensin on trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis, oxidative damage and apoptosis in rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 28, 14: 1222-1230.
- [14] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C A Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity[J]. *Nature*, 1997, 388: 394-397.
- [15] Abreu M T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10: 131-144.
- [16] Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky D K. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex[J]. *Infect Immun*, 2003, 71: 3503-3511.
- [17] Xavier R J, Podolsky D K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Nature*, 2007, 26, 448: 427-434.
- [18] Didierlaurent A, Brissoni B, Velin D, Aebi N, Tardivel A, Käslin E, et al. Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 735-742.
- [19] Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28: 886-892.
- [20] Otte J M, Cario E, Podolsky D K. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126: 1054-1070.
- [21] Shibolet O, Podolsky D K. TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292: G1469-G1473.
- [22] Steenholdt C, Andresen L, Pedersen G, Hansen A, Brynskov J. Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2009, 44: 195-204.
- [23] Capelluto D G. Tollip: a multitasking protein in innate immunity and protein trafficking[J]. *Microbes Infect*, 2011, 8: 1-8.