

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.05.009

MOTS-c 通过 TLR4 对肠源性脓毒症的作用及其机制 *

房 彬¹ 曹晓瑞¹ 闫 昭¹ 杜天舒¹ 田小溪^{2Δ}

(1 空军军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032; 2 空军军医大学唐都医院急诊科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:脓毒症是机体对感染产生的全身性炎症反应综合征,由于具体机制尚不明确,临床治疗效果不佳,死亡率一直居高不下。本实验通过研究线粒体来源多肽 MOTS-c 通过影响 Toll 样受体 4 在肠源性脓毒症小鼠模型中的作用及其相关机制,寻找新的临床治疗靶标,为感染性疾病的研究开拓新的思路。**方法:**在盲肠结扎穿孔(CLP)所致肠源性脓毒症小鼠给予 MOTS-c 处理后检测小肠组织中检测炎症相关因子 TNF- α , IL-6, IL-1 β 水平,检测 TLR4 表达水平,并且在野生型和 TLR4 过表达小鼠中构建 CLP 模型并给予 MOTS-c 处理,将其与对照组进行比较,以明确 TLR4 在 MOTS-c 对脓毒症影响中的作用。**结果:**在 MOTS-c 组 CLP 小鼠模型中,小鼠体内促炎因子 TNF- α , IL-6, IL-1 β 水平与对照组相比显著降低($P < 0.05$),此外,TLR4 与对照组相比表达下降,进一步在 TLR4 过表达小鼠 CLP 模型中对小鼠给予 MOTS-c 处理发现,MOTS-c 对小鼠 CLP 的抗炎作用被抑制,小鼠体内促炎因子 TNF- α , IL-6, IL-1 β 水平与野生型小鼠比较均显著上升,差异具有统计学意义,说明过表达 TLR4 逆转了 MOTS-c 的抗炎作用,提示 MOTS-c 可以在肠源性脓毒症中发挥抗炎作用,并且此过程可能依赖于 TLR4。**结论:**MOTS-c 可以在脓毒症中抑制小肠上皮细胞中 TLR4 过度激活,最终抑制炎症,因此可能对脓毒症有治疗效果,有望用于临床治疗。

关键词:TLR4; MOTS-c; 脓毒症; 炎症

中图分类号:R-33; R631.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)05-843-05

The Effects of MOTS-c on Gut-origin Sepsis Via TLR4 and Its Mechanism*

FANG Bin¹, CAO Xiao-rui¹, YAN Zhao¹, DU Tian-shu¹, TIAN Xiao-xi^{2Δ}

(1 Department of Orthopedic, Xijing hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Emergency, Tangdu hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: Sepsis is a systemic inflammatory response syndrome caused by infection. Because the mechanism is still unclear, the clinical treatment effect is not good, and the mortality rate is always high. In this study, the effects of MOTS-c, a mitochondria-derived polypeptide, on toll-like receptor 4 (toll-like receptor 4) in the mouse model of enterogenic sepsis and its related mechanisms were studied to search for new clinical therapeutic targets and to open up new ideas for the research of infectious diseases. **Methods:** In the enterogenous sepsis in mice caused by cecum ligation perforation (CLP) MOTS-c was given after inspection in the small intestine tissue inflammation. TNF- α , IL-6, IL-1 β levels, TLR4 expression level were detected, both in the wild type mice and TLR4 overexpression mice CLP model. The mice were given MOTS-c treatment, then the MOTS-c treated group was compared with the control group as for the pro-inflammatory cytokine level, in order to make clear the role of TLR4 in MOTS-c's effects on sepsis. **Results:** In the MOTS-c treated CLP group, pro-inflammatory factors TNF- α , IL-6, IL-1 β level were significantly decreased compared with the control group ($P < 0.05$). In addition, TLR4 expression was decreased compared with control group. Furthermore, MOTS-c treatment was given to the TLR4 overexpression CLP mice model and MOTS-c's anti-inflammatory effects on CLP mouse model were suppressed. The pro-inflammatory factors TNF- α , IL-6, IL-1 β levels were significantly increased compared with wild type mice which suggested that TLR4 overexpression reverses the anti-inflammatory effects of MOTS-c, showing that MOTS-c play an anti-inflammatory role in enterogenic sepsis, and this process may be dependent on TLR4. **Conclusion:** MOTS-c can inhibit the excessive activation of TLR4 in intestinal epithelial cells in sepsis, and ultimately inhibit inflammation, so it may have therapeutic effects on sepsis, and is expected to be used in clinical treatment in the future.

Key words: TLR4; MOTS-c; Sepsis; Inflammation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R631.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)05-843-05

前言

脓毒症(sepsis)是机体对感染产生的全身性炎症反应综合征,常发生于外伤、烧伤或免疫力低下时病原体严重感染^[1]。肠

* 基金项目:陕西省重点研发计划项目(S2017-ZDYF-YBXM-SF-0353)

作者简介:房彬(1989-),女,本科,主要研究方向:骨关节炎及危重病诊治, E-mail: 363645115@qq.com

Δ 通讯作者:田小溪,硕士,副主任医师,主要研究方向:急诊危重病的救治,尤其是消化内科疾病的诊治, E-mail: xiaoxi2007.love@163.com

(收稿日期:2019-09-01 接受日期:2019-09-25)

道屏障功能受损导致的肠源性脓毒症引发脓毒性休克及多器官功能障碍综合征^[2]。由于脓毒症具体机制尚不明确,临床治疗效果不佳,死亡率一直居高不下^[3]。近年来研究显示,脓毒症发病进程中包括淋巴细胞、中性粒细胞、树突状细胞、胃肠上皮细胞在内的多种细胞发生凋亡^[4-6]。研究表明,胃肠上皮细胞凋亡增加使肠黏膜上皮屏障功能减弱,导致肠源性细菌毒素进一步入血,形成恶性循环,在肠源性脓毒症的发生和发展中起着重要的作用。持续炎症激活状态会诱发细胞内活性氧簇(ROS)爆发并产生氧化应激^[7-8],导致心脏、肾脏等重要器官发生细胞凋亡,并产生功能障碍,由此促进脓毒症中多器官衰竭的发病进程^[9]。但目前尚未完全阐明肠源性脓毒症中肠上皮细胞内炎症的产生、发展以及作用机制。因此,进一步探索脓毒症及其并发症的发病机制,有利于寻找新的临床治疗靶标,并且为感染性疾病的研究开拓新的思路。

MOTS-c 是线粒体 DNA 编码的线粒体多肽,2015 年由 Lee 等首次报道^[10]。它在各种组织中均有表达。体内研究表明,MOTS-c 具有多种功能,如通过调节糖代谢,预防老年性或高脂饮食诱导的胰岛素抵抗,以及调节通过糖代谢诱导的肥胖^[11,12]。此外也发现 MOTS-c 可以通过抑制破骨细胞的分化来减轻骨丢失^[13]。然而,MOTS-c 在脓毒症中的作用及其相应的分子机制尚不清楚。

Toll 样受体 4(Toll-Like Receptor 4, TLR4)是 TLRs 家族的重要成员,可以识别脂多糖、热休克蛋白等^[14]。实验研究表明:TLR4 表达量的多少与炎症因子释放量直接相关,且通过调控其信号转导通路调节炎症免疫反应,进而影响脓毒症的发展^[15]。有报道称 TLR4 在脓毒症中发挥重要作用,例如 Venancio 等人的研究表明,CETP 通过降低 TLR4 的表达来减轻 LPS 诱导的脓毒症的炎症反应^[16]。因此,调节 TLR4 是治疗脓毒症炎症的潜在策略。在本研究中,我们主要探究 MOTS-c 对小鼠肠源性脓毒症的影响,并且通过 TLR4 过表达小鼠探索其可能机制。

1 材料和方法

1.1 MOTS-c 多肽合成

多肽由 China Peptide 公司采用高效液相色谱法合成,其纯度为 98%。MOTS-c 的氨基酸序列如下:Met-Arg-Trp-Gln-Glu-Met-Gly-Tyr-Ile-Phe-Tyr-Pro-Arg-Lys-Leu-Arg,将多肽溶解在 ddH₂O 中,在 -20℃ 冷冻。

1.2 利用 CLP 方法建立脓毒症小鼠模型

准备普通 C57 小鼠和 TLR4 基因过表达小鼠(分别购自空军军医大学实验动物中心和南京大学模式动物研究所,体重 20~25 g),参照报道过的文献,利用盲肠结扎穿刺方法(Cecal ligation and puncture, CLP)制成脓毒症动物模型^[17]。实验分为 4 组,1)假手术对照组:普通 C57 小鼠开腹后即关闭;2)CLP 组:普通 C57 小鼠接受 CLP 手术,术后 4 h 腹腔注射 100 μ L 生理盐水;3)MOTS-c 治疗组:普通 C57 小鼠接受 CLP 手术,术后 4 h 腹腔注射 MOTS-c 溶液(20 mg/kg);4)TLR4 基因过表达组:TLR4 基因过表达小鼠接受 CLP 手术,术后 4 h 腹腔注射 MOTS-c 溶液(20 mg/kg)。在建模后 12 h 完整分离各组小鼠的盲肠组织,并用于实验,具体建模方式如下。

小鼠术前 8 h 禁食,自由饮水。将小鼠置于七氟烷麻醉小室,给予 25%七氟烷吸入麻醉,腹部正中区域备皮消毒。取腹部正中切口寻及并不露盲肠及其周围临近肠管。距盲肠末端约整个盲肠长度 1/3~1/2 处使用丝线结扎盲肠,之后使用 20G 号针对结扎部分盲肠进行穿刺,将所有肠管回纳入腹腔,逐层缝合手术伤口,放回鼠笼,自由苏醒,苏醒后小鼠自由饲食及饮水。术后 4 h 根据分组分别通过腹腔注射生理盐水 0.5 mL 或 MOTS-c 溶液。

1.3 HE 染色

石蜡切片脱蜡,依次将切片放入二甲苯、无水乙醇、95%酒精、90%酒精、80%酒精、70%酒精,用蒸馏水洗。用苏木素染细胞核 3-8 min,自来水洗,1%的盐酸酒精分化数秒,随后用水冲洗,0.6%氨水返蓝,流水冲洗。伊红染细胞质切片入伊红染液中染色 1-3 min。脱水封片,将切片依次放入 95%酒精,无水乙醇,二甲苯中脱水透明,将切片从二甲苯拿出来稍晾干,中性树脂封片。显微镜镜检,图像采集分析。

1.4 实时定量 RT-PCR 和酶联免疫吸附试验(ELISA)

取肠道组织 50~100 mg,研磨后参照 RNA 提取纯化试剂盒说明书提取各肠道组织的总 RNA,使用琼脂糖凝胶电泳和微型核酸蛋白定量仪确定 RNA 的完整性;应用 Primer 6.0 软件设计引物,由生工公司合成。引物序列如下:TNF- α :F,5'-CAGGCGGTGCCTATGTCTC-3',R,5'-CGATCACCCGAAGTT CAGTAG-3';IL-1 β :F,5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3',R,5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3';IL-6:F,5'-CTGCA AGAGACTTCCATCCAG-3',R,5'-AGTGGTATAGACAGGT CTGTTGG-3';TLR4:F,5'-CCGCTCTGGCATCATCTTCA-3',R,5'-CCCACTCGAGGTAGGTGTCTG-3'; β -actin:F,5'-GGAG ATYACTGCCCTGGCTCCTA-3',R,5'-GACTCATCGTACTCC TGC ITGCTG-3'。使用 M-MuLV 反转录酶(Takara,日本)将 RNA 反转录后,使用 Real-time PCR 在 BioRad CFX96 实时 PCR 检测系统(BioRad, USA)上使用 SYBR Green PCR Mastermix 进行检测。按试剂盒配置 25 μ L 反应体系,扩增条件为 95℃预变性 30 s,1 个循环,95℃变性 5 s,63℃退火 20 s,72℃延伸 45 s,共 40 个循环;得到标准曲线并求出斜率和扩增效率;以 β -actin 为内参照,采用计算基因相对表达公式算出各组 mRNA 的相对表达量。

酶联免疫吸附试验使用 R&D 公司的 ELISA 检测试剂盒(TNF- α , IL-1 β , IL-6),根据厂商使用说明书进行检测,用稀释液稀释后,加样。经过孵育,洗板,加底物,半个小时避光反应后,终止液完成反应,通过吸光度分析目标蛋白浓度。

1.5 Western Blot

采用 RIPA (Beyotime, Beijing, China)从小肠组织中提取蛋白。50 μ g 蛋白质 10% sds - page 分离和转移到 PVDF 膜(美国微孔),在室温下 1 h 与 TBS 5%的脱脂牛奶封闭。洗净后膜用一抗孵育过夜。以下抗体用来检测相关蛋白的表达:TLR4 (CST,美国), β -actin(CST,美国)。使用适当的兔二抗(Thermo Scientific,美国)检测免疫标记蛋白,然后用 ECL (Millipore, 美国)进行发光并检测分析。

1.6 统计学处理

计量数据均使用均数 $\pm$ 标准差的形式($\bar{x}\pm s$)表示,使用

SPSS11.0 软件对各个组进行 ANOVA 检验。设定 $P < 0.05$ 认为差异具有显著性,推断结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 MOTS-c 可以显著降低肠源性脓毒症小鼠肠道炎症因子释放

我们利用盲肠结扎穿孔构建肠源性脓毒症小鼠模型,12h 后,小鼠均未死亡,两组小鼠精神状态均较建模前差,通过 HE 染色检测小鼠建模情况,结果显示,假手术组光镜下肠黏膜结构基本正常,绒毛结构完整且无炎症浸润;模型组光镜下可见绒毛坏死以及黏膜间隙扩大,炎症浸润严重。实时定量 PCR 检

测提示模型组小肠内 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子表达显著上调,证实建模成功。

为了研究 MOTS-c 在肠源性脓毒症中的作用,我们收集了 MOTS-c 处理组小肠组织,同样进行了 HE 染色检测,发现在 MOTS-c 处理组,小鼠肠道组织炎症渗出较对照组减少,肠道绒毛结构较 CLP 组完整,渗出减少。提取 RNA 和蛋白进行检测,实时定量 PCR 和 ELISA 结果提示,与对照组小鼠相比, MOTS-c 组小鼠的小肠组织内 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达明显降低,提示 MOTS-c 在肠源性脓毒症中可能起到抗炎作用。

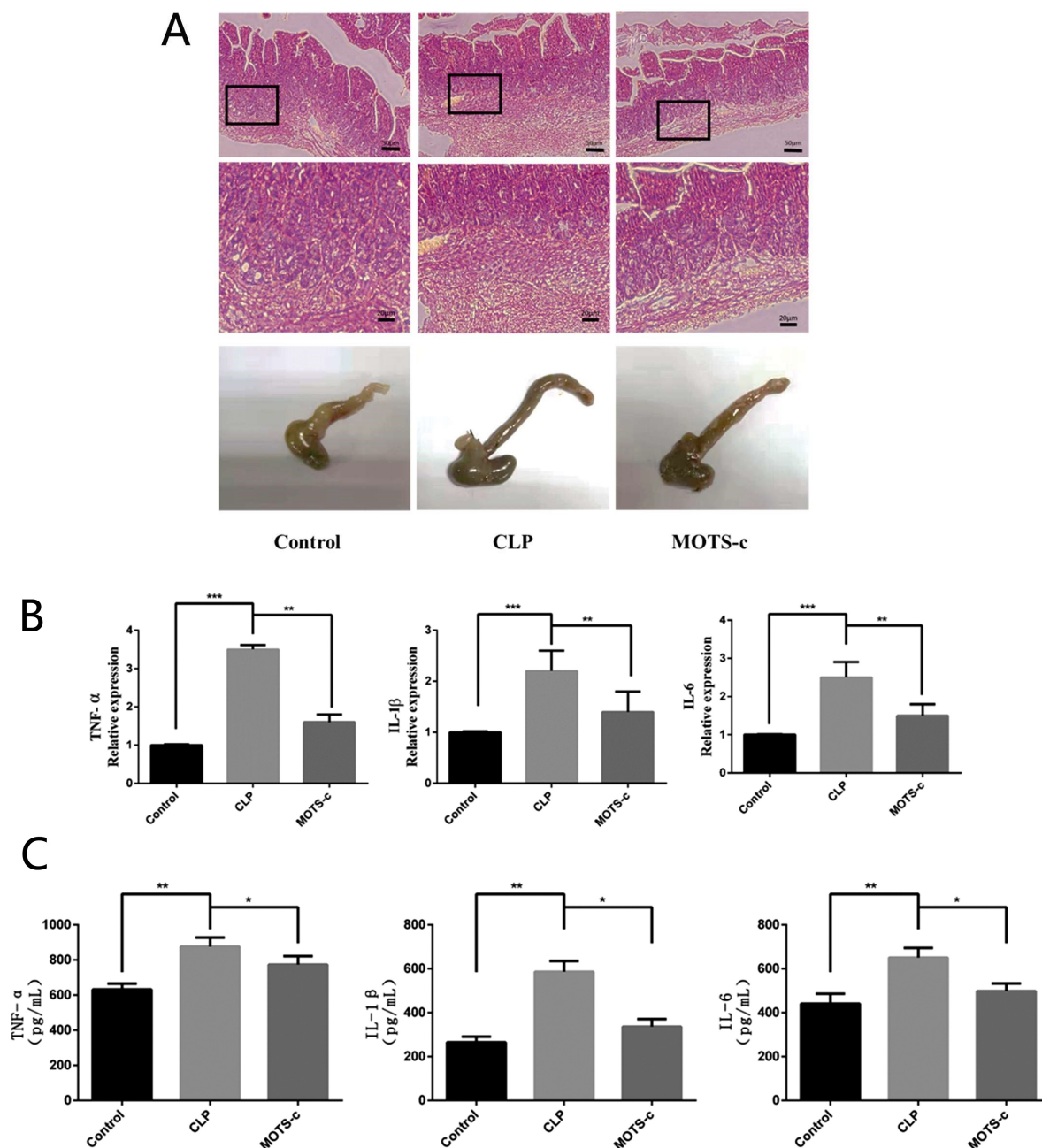


图 1 MOTS-c 对肠源性脓毒症小鼠模型的影响

(A: HE 染色结果比较; B: RT-PCR 结果比较; C: ELISA 结果比较 *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$)

Fig.1 The effects of MOTS-c on Enterogenic sepsis mouse model

(A: Comparison of HE staining; B: Comparison of RT-PCR results; C: Comparison of ELISA results

*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$)

2.2 MOTS-c 对肠源性脓毒症的抗炎作用依赖于 TLR4 的激活

有文献表明 TLR4 在脓毒症的发病中起到重要作用^[16],为了进一步了解 MOTS-c 抗炎作用的机制,我们检测了 TLR4 在肠源性脓毒症中的表达变化,Western blot 结果提示在 CLP 组 TLR4 表达显著提升,而在 MOTS-c 处理组,小鼠肠道内 TLR4 表达显著下降。

我们使用了 TLR4 过表达小鼠与野生型(WT)小鼠进行造模实验并都给予 MOTS-c 腹腔注射,并检测两组小鼠肠粘膜炎症浸润情况和组织及血清炎症因子表达水平。对小鼠进行盲肠

结扎穿孔后 24 h 将小鼠处死,取小鼠盲肠,并研磨后提取 RNA 和蛋白,对 TLR4 和炎症因子表达水平进行检测。实时定量 PCR 和 ELISA 结果提示,TLR4 过表达组小鼠的炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达水平明显高于野生型小鼠,TLR4 过表达逆转了 MOTS-c 对脓毒症的抗炎作用。Western blot 证实 TLR4 表达显著高于野生型小鼠,表明过表达 TLR4 可以逆转 MOTS-c 的抗炎作用,MOTS-c 的抗炎作用可能是通过抑制 TLR4 的表达实现的。

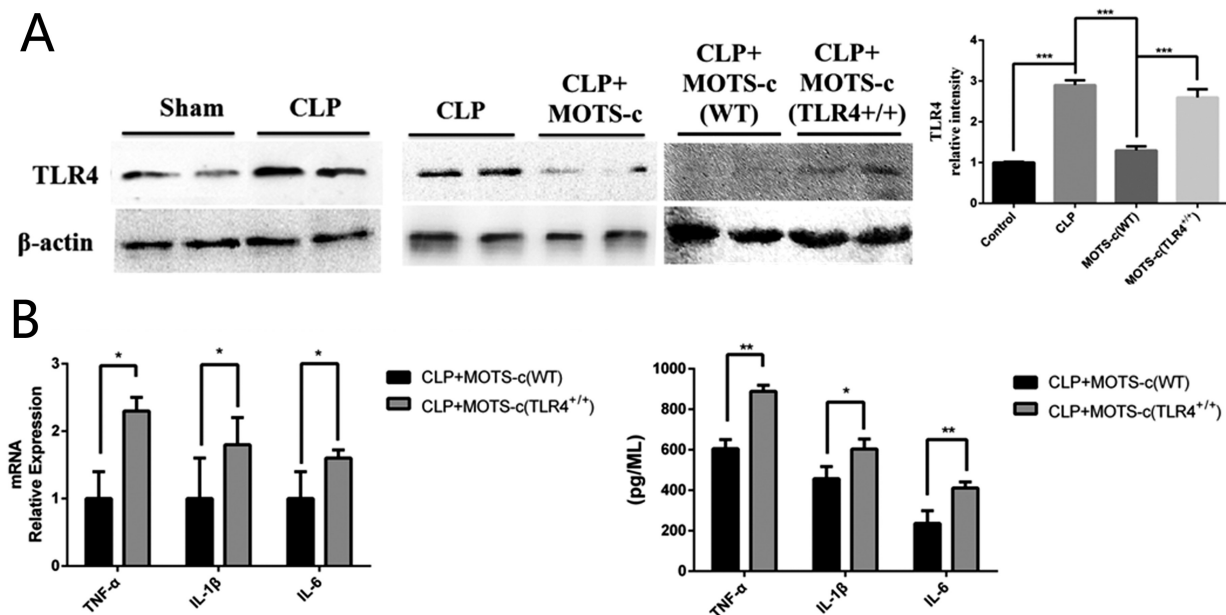


图 2 MOTS-c 对肠源性脓毒症的抗炎作用依赖于 TLR4 的激活

(A:不同组间 TLR4 表达 Western Blot 结果比较;B:RT-PCR 和 ELISA 结果比较 *** $P<0.001$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$; NS, $P>0.05$)

Fig. 2 The anti-inflammatory effect of MOTS-c on enterogenic sepsis depends on the activation of TLR4

(A: Comparison of Western blot; B: Comparison of RT-PCR and ELISA *** $P<0.001$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$; NS, $P>0.05$)

3 讨论

脓毒症是感染引起的全身炎症反应,进一步发展可导致严重脓毒症、脓毒性休克及多器官功能障碍综合征,全球每年有超过 1800 万严重脓毒症病例,涉及各个年龄段人群,且病死率高达 30%~70%。然而,目前尚缺乏合理有效的靶向性治疗药物。因此阐明脓毒症的发生发展机制、探索脓毒症的治疗新策略,是目前危重病医学领域亟需解决的问题^[1,3,18]。近年来研究表明,病原体的严重感染过度激活机体免疫细胞,使其释放大量的促炎细胞因子和化学因子,如 TNF- α 、IL-1 β 和前列腺素 E₂,是脓毒症重要的病理生理过程^[19,20]。这些炎症因子是导致宿主细胞凋亡异常的重要因素,细胞凋亡异常又促进脓毒症的发展。脓毒症发病过程中有多种细胞发生凋亡,包括淋巴细胞、中性粒细胞、树突状细胞、胃肠上皮细胞等,继而导致脓毒性休克甚至多器官衰竭。Sipola 等通过一项回顾性临床研究发现,肠切除术后并发脓毒症的患者病理检查可见肠上皮细胞出现明显损伤,部分细胞凋亡^[21]。胃肠上皮细胞凋亡增加使黏膜上皮屏障功能减弱,成为脓毒症病程进展的重要环节,也是多器官功能障碍综合征“肠-肝-肺”一系列病变的开始,促进严重脓毒症的恶性循环^[22]。因此,抑制肠道的炎症并进一步减少对

肠黏膜的损伤是遏制肠源性脓毒症恶化的关键。

线粒体衍生肽是一类新型的循环信号小分子,在细胞和机体水平具有独特的生物活性。这一类别的第一个成员 Humanin 已被证明具有多种代谢作用,如减轻体重增加和增加胰岛素释放^[23]。另外一些新成员的发现,如 MOTS-c 和 SHLP1-6,进一步增加了这个家族的成员数量。最近的一项研究表明,MOTS-c 的目标是骨骼肌,并提高葡萄糖的消耗。我们之前的研究表明,MOTS-c 治疗抑制破骨细胞分化,显著减轻卵巢切除引起的骨丢失^[13]。此外,Zhai 等人的工作也证明了 MOTS-c 具有抗炎作用,其特点是降低促炎细胞因子水平,显著提高 MRSA 感染小鼠的存活率^[24]。这说明线粒体来源的肽 MOTS-c 在体内具有多种保护作用。在本研究中,我们发现 MOTS-c 可以显著抑制肠道炎症性渗出,并且降低促炎因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等的分泌,抑制炎症,从而保护肠黏膜。

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 是参与非特异性免疫 (天然免疫) 的一类重要蛋白质分子,当微生物突破机体的物理屏障,如皮肤、粘膜等时,TLR 可以识别它们并激活机体产生免疫细胞应答。TLR4 是 TLRs 家族的重要成员,可以识别脂多糖、热休克蛋白等^[25,26]。TLR4 广泛存在于机体各组织细胞中,内皮细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞和心肌细胞中均有

表达^[14,27]。近年来人们逐步认识到脓毒症出现众多细胞凋亡的现象可能与 TLR4 及其下游的信号通路有关^[28,29]。Neal 等人发现肠上皮细胞表面的 TLR4 会减弱肠道屏障功能,促使细菌通过进入血液循环,加快脓毒症病程进展^[30]。我们针对 TLR4 进行的实验利用盲肠结扎穿孔(CLP)所致肠源性脓毒症小鼠模型,使用 Western blot 技术检测发现 CLP 小鼠小肠组织内 TLR4 存在高表达,而在 MOTs-c 处理之后,TLR4 的表达显著下降,伴随着促炎因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等的分泌减少,在 TLR4 过表达的小鼠组,MOTS-c 对肠源性脓毒症的抗炎作用被抑制,与野生型小鼠相比,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等的分泌显著增加,提示 TLR4 可能与肠源性脓毒症的发病机制以及 MOTs-c 的抗炎作用密切相关。

总而言之,我们通过研究发现:MOTS-c 可以显著降低肠源性脓毒症小鼠肠道炎症因子释放;MOTS-c 对于肠源性脓毒症的抗炎作用与其对 TLR4 表达的抑制作用密切相关。由于 MOTs-c 是一种来源于线粒体的小分子多肽,具有分子小、毒性小、生物学活性强等特点,因此有望作为一种潜在的临床治疗脓毒症的药物,为临床研发相应的治疗提供坚实的理论依据和参考资料。

参考文献(References)

- [1] Bone R C, Balk R A, Cerra F B, et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis [J]. Critical Care Medicine, 1992, 101(6): 1644-1655
- [2] Macfie J, O'Boyle C, Mitchell C J, et al. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity [J]. Gut, 1999, 45(2): 223
- [3] Glick T, Opal S M. Advances in Sepsis Therapy [J]. Drugs, 2004, 64 (8): 837-859
- [4] Bellingan G. Inflammatory cell activation in sepsis [J]. British Medical Bulletin, 1999, 55(1): 12
- [5] Hotchkiss R S, Tinsley K W, Swanson P E, et al. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(25): 14541-14546
- [6] Kasten K, Seitz A, Unsinger J, et al. IL-7 Promotes T Cell Viability, Enhances Immunity, and Improves Survival in Sepsis [J]. Journal of Surgical Research, 2010, 158(2): 209-210
- [7] Zou Z, Liu B, Zeng L, et al. Cx43 Inhibition Attenuates Sepsis-Induced Intestinal Injury via Downregulating ROS Transfer and the Activation of the JNK1/Sirt1/FoxO3a Signaling Pathway [J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019: 7854389
- [8] Li S, Wu H, Han D, et al. A Novel Mechanism of Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Protection against Sepsis: Restricting Inflammasome Activation in Macrophages by Increasing Mitophagy and Decreasing Mitochondrial ROS [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 3537609
- [9] Kuchler L, Morbitzer V, Heeg A, et al. Attenuated NOX2 expression impairs ROS production during the hypoinflammatory phase of sepsis [J]. Critical Care, 2012, 16(S3): P51
- [10] Lee, Changhan, Zeng, et al. The Mitochondrial-Derived Peptide MOTs-c Promotes Metabolic Homeostasis and Reduces Obesity and Insulin Resistance [J]. Cell Metabolism, 2015, 21(3): 443-454
- [11] Lee C, Kim K H, Cohen P. MOTs-c: A novel mitochondrial-derived peptide regulating muscle and fat metabolism [J]. Free Radic Biol Med, 2016, 100: 182-187
- [12] Lu H, Wei M, Zhai Y, et al. MOTs-c peptide regulates adipose homeostasis to prevent ovariectomy-induced metabolic dysfunction [J]. Journal of Molecular Medicine, 2019, 97(4): 473-485
- [13] Ming W, Lu G, Xin S, et al. Mitochondria related peptide MOTs-c suppresses ovariectomy-induced bone loss via AMPK activation [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2016, 476(4): 412-419
- [14] K H, O T, T K, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4) -deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product [J]. Journal of Immunology, 1999, 162(7): 3749-3752
- [15] Barber R, Aragaki C, Riverachavez F, et al. TLR4 and TNF- α polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury [J]. Journal of Medical Genetics, 2004, 41(11): 808
- [16] Venancio T M, Machado R M, Castoldi A, et al. CETP Lowers TLR4 Expression Which Attenuates the Inflammatory Response Induced by LPS and Polymicrobial Sepsis [J]. Mediators of Inflammation, 2016, 2016(4): 1-12
- [17] Shogo Kasuda M. Von Willebrand Factor-Dependent Inflammatory Responses in Mouse Septic Model By Cecal Ligation and Puncture [J]. Blood, 2014, 124: 2773
- [18] Otto G P, Sossdorf M, Claus R A, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate [J]. Critical Care, 2011, 15(4): R183
- [19] Boermeester M A, van Leeuwen P A, Coyle S M, et al. Interleukin-1 blockade attenuates mediator release and dysregulation of the hemostatic mechanism during human sepsis [J]. Archives of Surgery, 1995, 130(7): 739-748
- [20] Luan Y Y, Yin C F, Qin Q H, et al. Effect of Regulatory T Cells on Promoting Apoptosis of T Lymphocyte and Its Regulatory Mechanism in Sepsis [J]. Journal of Interferon & Cytokine Research the Official Journal of the International Society for Interferon & Cytokine Research, 2015, 35(12): 969-980
- [21] Sipola S, Ala-Kokko T I, Laurila J J, et al. Colon epithelial injury in critically ill colectomized patients: aberration of tight junction proteins and Toll-like receptors [J]. Minerva Anestesiologica, 2017
- [22] Werdan K, Schmidt H, Ebel H, et al. Impaired regulation of cardiac function in sepsis, SIRS, and MODS [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2009, 87(4): 266-274
- [23] Lee C, Yen K, Cohen P. Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides? [J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2013, 24(5): 222-228
- [24] Zhai D, Ye Z, Jiang Y, et al. MOTs-c peptide increases survival and decreases bacterial load in mice infected with MRSA [J]. Molecular Immunology, 2017, 92: 151-160
- [25] Bakopoulos A, Kapelouzou A, Tsilimigras D I, et al. Expression of Toll-like receptors (TLRs) in the lungs of an experimental sepsis mouse model [J]. PLoS One, 2017, 12(11): e188050 (下转第 905 页)

- 的作用与机制[J]. 广东医学, 2010, 31(18): 2367-2369
- [10] 庞晓明, 司继刚. 氨溴索超说明书剂量临床应用现状[J]. 儿科药理学杂志, 2018, 24(4): 63-65
- [11] 陈炎, 陈亚蓓, 陶荣芳. 《CSCO 原发性肺癌诊疗指南 2016》非小细胞肺癌治疗内容介绍[J]. 中国实用内科杂志, 2017, 37(S1): 35-37
- [12] 徐广文, 熊燃, 吴汉然, 等. 单孔和三孔胸腔镜手术对肺癌患者术后近期生活质量影响的比较研究 [J]. 中华外科杂志, 2018, 56(6): 452-457
- [13] Mu JW, Gao SG, Xue Q, et al. A propensity matched comparison of effects between video assisted thorascopic single-port, two-port and three-port pulmonary resection on lung cancer[J]. J Thorac Dis, 2016, 8(7): 1469-1476
- [14] 李彩伟, 徐美青, 徐广文, 等. 单孔与三孔胸腔镜肺部手术后急性慢性疼痛的对比研究[J]. 中国肺癌杂志, 2018, 21(4): 279-284
- [15] 程宇, 尹晓清, 程良昊, 等. 单孔电视胸腔镜肺叶切除术治疗早期肺癌的效果及对血清 EGFR、VEGF 水平及免疫功能的影响[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(4): 725-728, 782
- [16] Ji C, Xiang Y, Pagliarulo V, et al. A multi-center retrospective study of single-port versus multi-port video-assisted thorascopic lobectomy and anatomic segmentectomy [J]. J Thorac Dis, 2017, 9(10): 3711-3718
- [17] Liu Z, Yang R, Shao F. Comparison of Postoperative Pain and Recovery between Single-Port and Two-Port Thorascopic Lobectomy for Lung Cancer[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2019, 67(2): 142-146
- [18] Gonzalez-Rivas D, Kuo YC, Wu CY, et al. Predictive factors of postoperative complications in single-port video-assisted thorascopic anatomical resection: Two center experience [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(40): e12664
- [19] Li X, Wang X, Zhang H, et al. Unilateral single-port thorascopic surgery for bilateral pneumothorax or pulmonary bullae [J]. J Cardiothorac Surg, 2019, 14(1): 71
- [20] Han KN, Kim HK, Choi YH. Midterm outcomes of single port thorascopic surgery for major pulmonary resection [J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0186857
- [21] 肖宏涛, 田社民, 魏莹, 等. 乌司他丁联合大剂量氨溴索对重度烧伤患者肺功能及氧化应激的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(15): 110-114
- [22] Wang Y, Lu J, Li T, et al. Investigation of a potential drug-drug interaction between salbutamol and ambroxol and bioequivalence of a new fixed-dose combination containing these two drugs in healthy Chinese subjects[J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2018, 56(5): 247-254
- [23] 王少强. 短期大剂量盐酸氨溴索对老年肺癌围术期肺损伤的保护作用[D]. 中南大学, 2012
- [24] Takeda K, Miyahara N, Matsubara S, et al. Immunomodulatory Effects of Ambroxol on Airway Hyperresponsiveness and Inflammation[J]. Immune Netw, 2016, 16(3): 165-175
- [25] Yoshida S, Yokohira M, Yamakawa K, et al. Effects of the expectorant drug ambroxol hydrochloride on chemically induced lung inflammatory and neoplastic lesions in rodents [J]. J Toxicol Pathol, 2018, 31(4): 255-265
- [26] Magalhaes J, Gegg ME, Migdalska-Richards A, et al. Effects of ambroxol on the autophagy-lysosome pathway and mitochondria in primary cortical neurons[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1385
- [27] Wang W, Yu J, He Y, et al. Ambroxol inhibits mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* and contributes to the bactericidal activity of ciprofloxacin against mucoid *P. aeruginosa* biofilms [J]. APMIS, 2016, 124(7): 611-618
- [28] Deretic V, Timmins GS. Enhancement of lung levels of antibiotics by ambroxol and bromhexine [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2019, 15(3): 213-218
- [29] 李卓隽, 王晓强, 苑振飞. 不同剂量氨溴索对肺癌术后患者肺功能、心肌酶谱及炎症因子的影响 [J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(4): 256-261
- [30] 户安喜. 胸腔镜下肺叶切除术联合氨溴索治疗肺癌对其血清中 IL-6 水平及外周血淋巴细胞免疫活性的影响[J]. 中国合理用药探索, 2017, 14(11): 44-46

(上接第 847 页)

- [26] Dolasia K, Bisht M K, Pradhan G, et al. TLRs/NLRs: Shaping the landscape of host immunity[J]. Int Rev Immunol, 2018, 37(1): 3-19
- [27] Arbour N C, Lorenz E, Schutte B C, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans [J]. Nature Genetics, 2000, 25(2): 187-191
- [28] Panneerselvam P, Ding J L. Beyond TLR Signaling-The Role of SARM in Antiviral Immune Defense, Apoptosis & Development [J]. Int Rev Immunol, 2015, 34(5): 432-444
- [29] Cruz-Zarate D, Cabrera-Rivera G L, Ruiz-Sanchez B P, et al. Innate Lymphoid Cells Have Decreased HLA-DR Expression but Retain Their Responsiveness to TLR Ligands during Sepsis [J]. J Immunol, 2018, 201(11): 3401-3410
- [30] Neal M D, Leaphart C, Levy R, et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier [J]. Journal of Immunology, 2006, 176(5): 3070-3079