

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002346

TET2 上调 IRAK-M 表达促进巨噬细胞内毒素耐受

李方方, 张春冬

(重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究 TET2 蛋白(ten-eleven translocation 2)对巨噬细胞白介素-1 受体相关激酶-M(interleukin-1 receptor-associated kinase-M, IRAK-M)表达的影响,探讨细菌内毒素(endotoxin/lipopolysaccharide, LPS)刺激诱导 TET2 表达的上游信号通路。**方法:**用 LPS 刺激小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 诱导内毒素耐受, qPCR 和 Western blot 检测 LPS 刺激不同时间点和内毒素耐受时 IRAK-M 和 TET2 表达;用 siRNA 干扰 TET2 表达, qPCR 和 Western blot 检测对 IRAK-M 表达的影响;用促分裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路抑制剂预处理细胞,再用 LPS 刺激, qPCR 和 Western blot 检测对 TET2 表达的影响。**结果:**TET2 蛋白和 IRAK-M 在 LPS 刺激 RAW264.7 细胞诱导内毒素耐受后仍持续表达,且表达模式都和细胞因子表达模式相反;干扰 TET2 表达抑制 IRAK-M mRNA ($P=0.000$)和蛋白水平表达;抑制 MAPK 信号通路抑制 TET2 表达。**结论:**巨噬细胞炎症反应过程中 MAPK 信号通路上调 TET2 表达, TET2 通过促进 IRAK-M 表达促进内毒素耐受。

【关键词】TET2 蛋白;巨噬细胞;白介素-1 受体相关激酶-M;促分裂原活化的蛋白激酶通路

【中图分类号】R392.11

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-09-02

Ten-eleven translocation 2 up-regulating interleukin-1 receptor-related kinase-M expression to promote endotoxin tolerance in macrophage

Li Fangfang, Zhang Chundong

(Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of ten-eleven translocation 2 protein (TET2) on expression of interleukin-1 receptor-related kinase-M (IRAK-M) in macrophage, and to investigate the upstream signaling pathway for TET2 expression induced by bacterial endotoxin/lipopolysaccharide (LPS). **Methods:** LPS was used to stimulate macrophage cell line RAW264.7 in mice to induce endotoxin tolerance; qPCR and Western blot were used to detect the expression of IRAK-M and TET2 at different time points of LPS stimulation and endotoxin tolerance. After interference of siRNA to TET2 expression, qPCR and Western blot were used to detect the effect on IRAK-M expression. Cells were pretreated with mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway inhibitors, and stimulated with LPS; qPCR and Western blot were used to detect the effect on TET2 expression. **Results:** TET2 and IRAK-M protein continued to express after endotoxin tolerance in RAW264.7 cells, and its expression pattern was opposite to cytokines expression pattern. Expression of IRAK-M mRNA ($P=0.000$) and protein level was inhibited by interfering TET2 expression. Inhibition of MAPK signaling pathway was able to inhibit TET2 expression. **Conclusion:** MAPK signaling pathway up-regulates TET2 expression during macrophage inflammatory response, and TET2 promotes endotoxin tolerance by promoting IRAK-M expression.

【Key words】ten-eleven translocation 2 protein; macrophage; interleukin-1 receptor-related kinase-M; mitogen-activated protein kinase pathway

内毒素是革兰阴性菌细胞壁的主要成分,可引起机体炎症反应,是临床上脓毒症最主要和公认的触发因子之一^[1-2]。内毒素耐受指细胞或机体接受小

剂量 LPS 刺激后,对后续大剂量 LPS 刺激无反应或反应降低的现象,表现为炎症因子释放减少,机体炎症损伤减轻等^[3-4]。内毒素耐受是涉及细胞内多条信号转导通路并与多种生物分子相关的复杂网络化过程,对其机制的认识仍有许多不明之处,探索内毒素耐受的分子机制,寻求机体内源性的抗炎机制将为脓毒症等一些致死性感染性疾病的治疗提

作者介绍:李方方, Email: lifangfang715@126.com,

研究方向:巨噬细胞炎症。

通信作者:张春冬, Email: zcd308@163.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20191112.1127.012.html>

(2019-11-13)

供新的思路和理论依据。

TET2 属于 TET 蛋白家族,该家族包含 3 个成员: TET1、TET2 和 TET3,均属于 α -酮戊二酸和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶,可以将 5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, 5mC) 水解成 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC),最后除去甲基^[5-8]。TET2 在炎症和自身免疫疾病的发展中起重要作用,如动脉粥样硬化、类风湿关节炎、过敏性皮炎等^[9-11]。TET2 蛋白在巨噬细胞炎症反应中具有调控作用,研究发现 TET2 可以结合一种抑制性表观调控分子组蛋白去乙酰化酶-2 (histone deacetylase-2, HDAC2),选择性地结合白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 基因启动子而抑制其转录^[12]。而内毒素耐受的表现即为炎症因子的释放减少,这就提示 TET2 可能在巨噬细胞内毒素耐受过程中起作用。本研究在巨噬细胞内毒素耐受模型中检测了 TET2 对 LPS/Toll 样受体-4 (Toll like receptor-4, TLR4) 通路的抑制性分子 IRAK-M 表达的影响并探索了其上游信号通路。

1 材料和方法

1.1 材料

LPS O55:B5 购自 Sigma 公司;小鼠 RAW264.7 细胞购自 ATCC 公司;DMEM 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 SERA 公司;TET2 siRNA 和阴性对照 siRNA 由上海吉码公司合成;转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;qPCR 引物由上海生工生物公司合成;总 RNA 提取试剂盒 (DP419) 购自天根生化科技有限公司,反转录试剂盒 (FSQ-101) 和荧光定量 PCR 试剂盒 (QPK-212) 购自 Toyobo 公司;蛋白提取试剂盒 T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (78510) 购自 Thermo 公司;小鼠 TET2 单克隆抗体 (MABE462) 购自 Millipore 公司;兔抗 IRAK-M 多克隆抗体 (SAB3500193) 购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (A0208)、山羊抗小鼠 IgG (A0216) 购自碧云天生物公司;抑制剂 SB203580、SP600125、U0126 均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 培养于含 10% 热灭活 FBS 的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养;巨噬细胞炎症模型采用 100 ng/mL LPS 刺激后于不同时间点取样,内毒素耐受细胞模型诱导方法为先用 1 ng/mL LPS 预刺激 24 h,再用 100 ng/mL LPS 刺激 3 h。

1.2.2 siRNA 设计与转染 TET2 siRNA 序列参考文献^[13],正义链序列为:5'-GCUCUGAACAGUAUUCAGCTT-3',反义链序列为:5'-GCUUUGAAUACUGUUCAGAGCTT-3'。阴性对照 NC siRNA 的正义链序列为:5'-GUUCAGAU-

GUGCGGCGAGUTT-3',反义链序列为:5'-ACUCGCCGC-ACAUCUGAACTT-3'。收集对数生长期的 RAW264.7 细胞,以 1×10^6 个细胞/孔的密度接种至 6 孔板,转染参照 Lipofectamine 2000 说明书进行。转染后 48 h 进行检测或进行其他处理。

1.2.3 RNA 提取和 qPCR 检测 RAW264.7 种于 6 孔板中,100 ng/mL LPS 刺激后分别于 0、3、6、12、24 h 以及 1 ng/mL 预刺激 24 h 再用 100 ng/mL 再刺激 3 h,用 Trizol 裂解细胞,RNA 提取、反转录参照试剂盒说明书进行,荧光定量 PCR 引物序列如下:TET2 上游引物:5'-CTCCCATCAGCCATACAGAACC-3',下游引物:5'-CTGACTGTGCGTTTATCCCT-3';IRAK-M 上游引物:5'-GTTCTACTCTGTTCCGTCACC-3',下游引物:5'-GTCCCGTTGCTCATATAGGGATA-3';TNF- α 上游引物:5'-CTGAACTTCGGGTGATCGG-3',下游引物:5'-GGCTTGTCACCTCGAATTTTGAGA-3';IL-6 上游引物:5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3',下游引物:5'-AGTGCTATAGACAGTCTGTTGG-3';GAPDH 上游引物:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3',下游引物:5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'。SYBR green qPCR 试剂用法参照试剂说明书,反应体系为 10 μL 。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析 qPCR 结果。

1.2.4 Western blot 检测 细胞用蛋白提取裂解液在冰上裂解 30 min,用 BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳和转膜按常规操作步骤进行。转膜后用 5% 的 BSA 室温封闭 2 h,一抗 (稀释比例均为 1:1 000) 4 °C 摇床孵育过夜,二抗 (稀释比例均为 1:2 000) 室温孵育 1 h。用 Super Singal West Dura 发光试剂盒显色。

1.3 统计学处理

实验数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示,使用 Graphpad Prism 6.0 软件进行统计分析,两组间比较采用两独立样本 t 检验,双侧检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 巨噬细胞内毒素耐受后 IRAK-M 蛋白持续高表达

按以下分组进行 LPS 刺激:medium 组,LPS 100 ng/mL 3 h、6 h、12 h、24 h 组,LPS 1 ng/mL 预刺激 24 h+100 ng/mL 再次刺激 3 h 组。分别于 LPS 刺激后相应时间点提取 RNA,反转录为 cDNA,qPCR 检测 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达。结果如图 1 所示,用 LPS 100 ng/mL 单次刺激后细胞因子 mRNA 表达迅速上升,之后便逐渐降低,LPS 1 ng/mL 预刺激再用 100 ng/mL 再次刺激组 (TNF- α : 2.850 ± 0.183 ; IL-6: $1.603.0 \pm 102.3$),与 LPS 100 ng/mL 3 h 组 (TNF- α : 25.170 ± 1.947 , $t=11.420$, $P=0.000$; IL-6: $2.203.00 \pm 86.44$, $t=4.487$, $P=0.011$), 6 h 组 (TNF- α : 12.730 ± 0.461 , $t=19.930$, $P=0.000$; IL-6: $6.775.0 \pm 292.2$, $t=16.71$, $P=0.000$), 12 h 组 (TNF- α : 4.878 ± 0.496 , $t=3.838$, $P=0.019$; IL-6: $5.743.0 \pm 312.2$, $t=12.600$, $P=0.000$), 24 h 组 (TNF- α : 4.353 ± 0.226 , $t=5.176$, $P=0.014$; IL-6: $4.084.0 \pm 164.2$, $t=12.83$, $P=0.000$) 相比细胞因子 mRNA 表达水平明显

降低(图 1A、B),说明 1 ng/mL LPS 预刺激使细胞产生了耐受现象,耐受细胞模型成功建立。

提取以上 LPS 刺激和耐受细胞的 mRNA 和总蛋白,检测 IRAK-M 表达,结果显示,IRAK-M 蛋白在 LPS 刺激 3 h 迅速升高,随后持续保持在较高水平,且在耐受细胞中也持续高表达(图 1C、D),说明在巨噬细胞 LPS 耐受后 IRAK-M 基因属不耐受基因。

2.2 巨噬细胞内毒素耐受后 TET2 蛋白与细胞因子表达模式相反

在以上 LPS 刺激和耐受细胞中检测 TET2 表达,结果和细胞因子 mRNA 表达模式相反,TET2 蛋白在 LPS 刺激 3~

6 h 迅速升高,随后保持在较高水平,且在耐受细胞中 TET2 持续高表达(图 2A),提示 TET2 在 LPS 耐受过程中可能起了调控作用。

体外合成针对 TET2 的 siRNA,转染至 RAW264.7 细胞,48 h 后用 100 ng/mL LPS 刺激 6 h,用 qPCR 及 Western blot 检测干扰效率。qPCR 结果显示与对照 siNC+LPS 组(4.513 ± 0.100)相比,siTET2+LPS 组 TET2 mRNA 表达(2.273 ± 0.207 , $t=9.739$, $P=0.000$)明显降低(图 2B)。Western blot 检测结果显示,siTET2+LPS 组 TET2 蛋白水平明显低于对照 siNC+LPS 组(图 2C),表明所用 siRNA 能有效抑制 LPS 刺激引起的 TET2 表达上调。

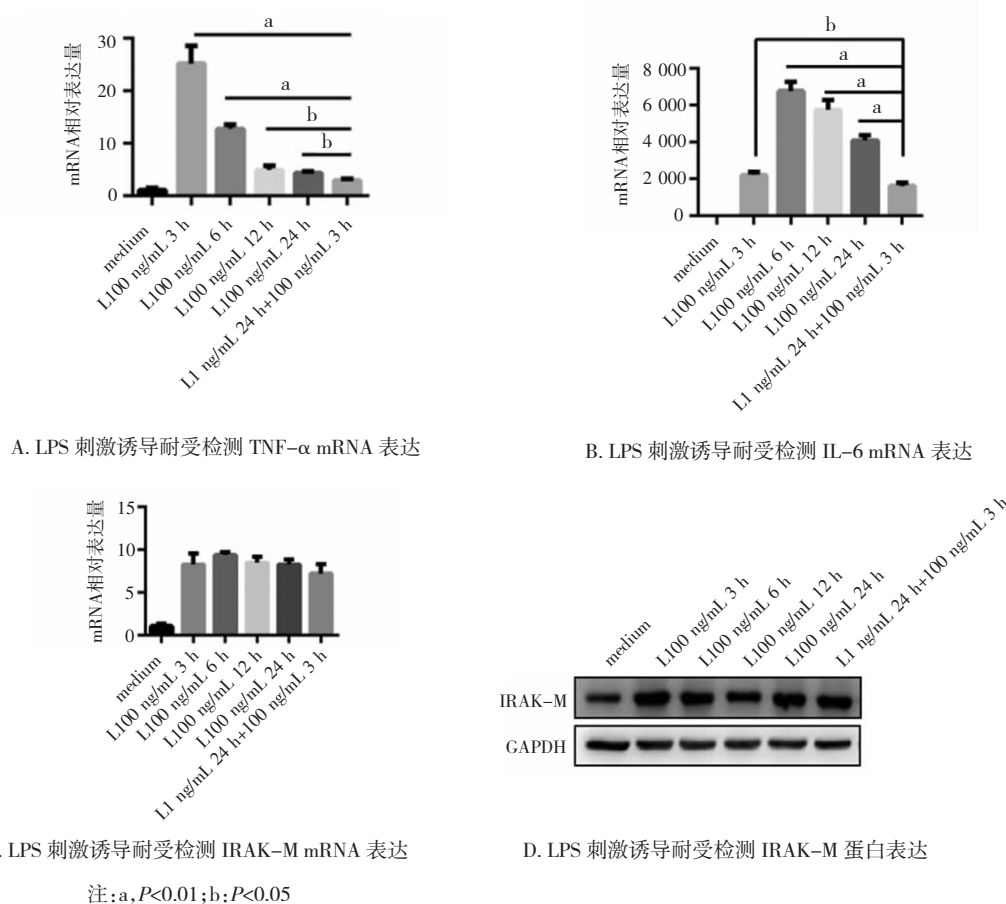


图 1 LPS 刺激 RAW264.7 细胞诱导内毒素耐受并检测 IRAK-M 表达

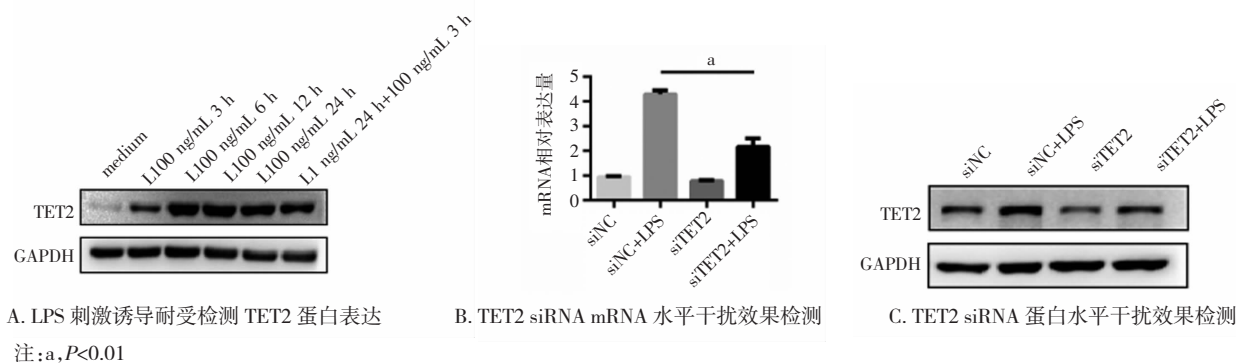
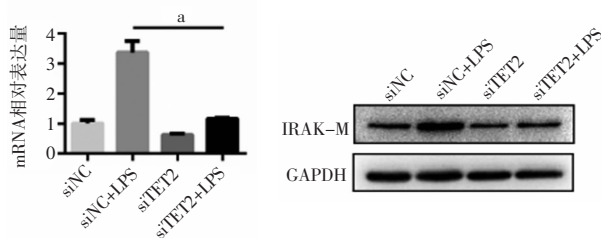


图 2 LPS 刺激后不同时间点及耐受细胞中检测 TET2 表达

2.3 干扰 TET2 抑制 IRAK-M 表达

用上述干扰 TET2 细胞 cDNA 模板和蛋白样品检测 IRAK-M 的表达,qPCR 结果显示与对照 siNC+LPS 组(3.363 ± 0.219)相比,siTET2+LPS 组 IRAK-M mRNA 表达(1.157 ± 0.022 , $t=10.010$, $P=0.000$)明显降低(图 3A)。Western blot 检测结果显示,siTET2+LPS 组 IRAK-M 蛋白水平明显低于对照 siNC+LPS 组(图 3B)。表明干扰 TET2 抑制 LPS 刺激后的 IRAK-M mRNA 和蛋白水平。



注:a, $P<0.01$

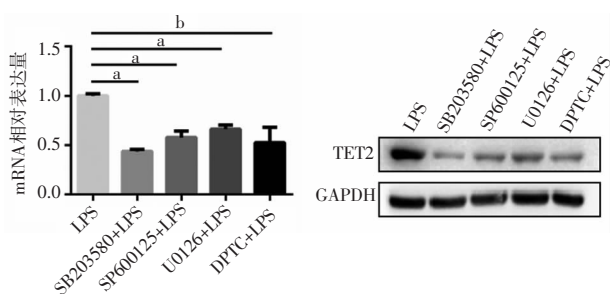
A. 干扰 TET2 后检测 IRAK-M mRNA 水平表达

B. 干扰 TET2 后检测 IRAK-M 蛋白水平表达

图 3 干扰 TET2 表达检测对 IRAK-M 表达的影响

2.4 抑制 MAPK 信号通路抑制 TET2 表达

分别用 P38、JNK、ERK、NF- κ B 抑制剂 SB203580、SP600125、U0126、DPTC 5 μ mol/L 预处理 RAW264.7 细胞 2 h,再用 LPS 刺激 3 h,检测 TET2 mRNA 和蛋白表达。qPCR 结果显示与对照 LPS 组(1.000 ± 0.012)相比,SB203580+LPS 组(0.436 ± 0.011 , $t=33.750$, $P=0.000$)、SP600125+LPS 组(0.577 ± 0.037 , $t=10.9$, $P=0.000$)、U0126+LPS 组(0.663 ± 0.023 , $t=12.920$, $P=0.000$)、DPTC+LPS 组(0.524 ± 0.111 , $t=5.668$, $P=0.011$)TET2 mRNA 表达明显降低(图 4A)。Western blot 结果显示,抑制剂组 TET2 蛋白水平都明显低于对照刺激组(图 4B),表明 MAPK 通路抑制剂处理抑制 LPS 刺激引起的 TET2 表达上调。



注:a, $P<0.01$,b: $P<0.05$

A. MAPK 通路抑制剂处理后检测 TET2 mRNA 表达

B. MAPK 通路抑制剂处理后检测 TET2 蛋白表达

图 4 MAPK 通路抑制剂对 TET2 mRNA 和蛋白表达的影响检测

3 讨论

LPS 激活 TLR4 信号通路诱导大量炎症相关基因表达,这些基因根据功能的不同可分为两类。一

类编码促炎介质,其在耐受细胞中失活以防止过度炎症;另一类编码抗微生物效应,如与吞噬功能、损伤愈合等相关的基因保持可诱导状态,以提供持续的免疫感染保护作用^[14-15]。IRAK-M 作为 LPS/TLR4 信号通路的负性调节因子,其可以抑制 IRAK-1 和 IRAK-4 与髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88,MyD88)的解离,从而抑制信号向下游传导^[16-17]。本研究发现 IRAK-M 在内毒素耐受细胞中属不耐受基因,干扰 TET2 抑制 IRAK-M 的表达,说明 TET2 对 IRAK-M 的表达起促进作用,TET2 可通过促进 IRAK-M 表达抑制促炎信号,促进内毒素耐受。

TET2 蛋白在炎症和免疫过程中起重要作用,但其调控机制相当复杂,且其对炎症的作用是正向还是负向仍存在争议。有研究认为 TET2 蛋白促进炎症,人外周血单核细胞中 TET2 促进炎症小体相关基因的脱甲基化,从而促进单核细胞的活化^[18]。人骨髓细胞中干扰 TET2 表达抑制粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor,GM-CSF)、IL-6、IL-8 的表达^[19]。TET2 通过腺苷脱氨酶-1(adenosine deaminase acting on RNA enzyme 1,ADAR1)使细胞因子信号抑制因子-3(suppressor of cytokine signaling 3,SOCS3)mRNA 不稳定而抑制 SOCS3 表达,释放其对 JAK-STAT 信号通路的抑制,促进机体针对病原微生物的入侵及时作出免疫反应^[20]。也有研究认为 TET2 蛋白抑制炎症。干扰 TET2 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 TNF- α 、IL-6、IL-12 表达有促进作用^[21]。此外,TET2 与抑制性表观调控分子组蛋白去乙酰化酶 HDAC2 结合,选择性地直接结合 IL-6 基因启动子而抑制其转录^[12]。综合文献和本研究结果认为 TET2 随炎症进程其作用可能是动态变化的,炎症风暴早期 TET2 起促进炎症的作用,而炎症风暴过后进入耐受阶段 TET2 持续表达又对炎症有抑制作用,以促进炎症的消退。

耐受基因和不耐受基因都是由 LPS/TLR4 通路诱导表达,两者为什么会有不同的表达模式? 研究发现两者除了受信号通路调控外,还受基因特异性表达如染色质重组、组蛋白修饰等表观调控方式调控^[14]。暂时的内毒素耐受对细胞具有保护作用,但长期的耐受又会减弱宿主的防御机制,导致更大的损伤。研究发现内毒素耐受是可恢复的,当 LPS 被内

化并最终降解后细胞可以从耐受状态恢复为可诱导状态^[22-24],因此细胞需要表观调控方式动态调控基因的表达。综合分析本研究认为 IRAK-M 可能通过甲基化和去甲基化调控方式使细胞可以在耐受状态和可诱导状态之间转变。

综上所述,本研究在 LPS 耐受细胞模型中,发现 TET2 蛋白水平与细胞因子表达趋势相反,干扰 TET2 抑制 IRAK-M 表达,并探讨了其调控的上游信号通路。该研究提示 TET2 蛋白通过上调 IRAK-M 促进内毒素耐受,为深入研究脓毒症的发病机制提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway[J]. Cytokine, 2008, 42(2): 145-151.
- [2] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity; update on Toll-like receptors[J]. Nat Immunol, 2010, 11(5): 373-384.
- [3] Morris M, Li L. Molecular mechanisms and pathological consequences of endotoxin tolerance and priming[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2012, 60(1): 13-18.
- [4] Seeley JJ, Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS [J]. J Leukoc Biol, 2017, 101(1): 107-119.
- [5] He YF, Li BZ, Li Z, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA[J]. Science, 2011, 333(6047): 1303-1307.
- [6] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1[J]. Science, 2009, 324(5929): 930-935.
- [7] Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine[J]. Science, 2011, 333(6047): 1300-1303.
- [8] Yin X, Xu Y. Structure and function of TET enzymes[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 945: 275-302.
- [9] Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice[J]. Science, 2017, 355(6327): 842-847.
- [10] de Andres M C, Perez-Pampin E, Calaza M, et al. Assessment of global DNA methylation in peripheral blood cell subpopulations of early rheumatoid arthritis before and after methotrexate[J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17: 233.
- [11] Liang Y, Chang C, Lu Q. The genetics and epigenetics of atopic dermatitis-filaggrin and other polymorphisms[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2016, 51(3): 315-328.
- [12] Zhang Q, Zhao K, Shen Q, et al. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6[J]. Nature, 2015, 525(7569): 389-393.
- [13] Ito S, D' Alessio AC, Taranova OV, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification [J]. Nature, 2010, 466(7310): 1129-1133.
- [14] Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications[J]. Nature, 2007, 447(7147): 972-978.
- [15] Pena OM, Pistolic J, Raj D, et al. Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization(M2) in human mononuclear cells[J]. J Immunol, 2011, 186(12): 7243-7254.
- [16] Al-Shaghhdali K, Durante B, Hayward C, et al. Macrophage subsets exhibit distinct E.coli-LPS tolerable cytokines associated with the negative regulators, IRAK-M and Tollip[J]. PLoS One, 2019, 14(5): e0214681.
- [17] Lyroni K, Patsalos A, Daskalaki MG, et al. Epigenetic and transcriptional regulation of IRAK-M expression in macrophages[J]. J Immunol, 2017, 198(3): 1297-1307.
- [18] Vento-Tormo R, Alvarez-Erribo D, Garcia-Gomez A, et al. DNA demethylation of inflammasome-associated genes is enhanced in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes[J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 139(1): 202-211.e6.
- [19] Wang X, Feng Z, Li Q, et al. DNA methylcytosine dioxygenase ten-eleven translocation 2 enhances lipopolysaccharide-induced cytokine expression in human dental pulp cells by regulating MyD88 hydroxymethylation[J]. Cell Tissue Res, 2018, 373(2): 477-485.
- [20] Shen Q, Zhang Q, Shi Y, et al. Tet2 promotes pathogen infection-induced myelopoiesis through mRNA oxidation[J]. Nature, 2018, 554(7690): 123-127.
- [21] Li B, Huo Y, Lin Z, et al. DNA hydroxymethylase 10-11 translocation 2(TET2) inhibits mouse macrophage activation and polarization [J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2017, 33(9): 1165-1170.
- [22] Thompson PA, Gauthier KC, Varley AW, et al. ABCA1 promotes the efflux of bacterial LPS from macrophages and accelerates recovery from LPS-induced tolerance[J]. J Lipid Res, 2010, 51(9): 2672-2685.
- [23] Wysocka M, Montaner LJ, Karp CL. Flt3 ligand treatment reverses endotoxin tolerance-related immunoparalysis[J]. J Immunol, 2005, 174(11): 7398-7402.
- [24] Lu M, Varley AW, Ohta S, et al. Host inactivation of bacterial lipopolysaccharide prevents prolonged tolerance following gram-negative bacterial infection[J]. Cell Host Microbe, 2008, 4(3): 293-302.

(责任编辑:唐秋姗)