

低分子量透明质酸片段通过 toll 样受体 4 信号途径 激活枯否细胞

张进祥^{①†}, 王慧^{②†}, 肖青^③, 梁慧芳^④, 李卓娅^④, 蒋春舫^①, 吴河水^⑤, 郑启昌^⑤

① 华中科技大学附属协和医院急诊外科, 武汉 430030

② 华中科技大学同济医学院医学遗传学系, 武汉 430022

③ 华中科技大学附属协和医院眼科, 武汉 430030

④ 华中科技大学同济医学院免疫学系, 武汉 430022

⑤ 华中科技大学附属协和医院普通外科, 武汉 430030

† 同等贡献

E-mail: camelzjx@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-12-04; 接受日期: 2008-07-25

国家自然科学基金(批准号: 30500487 和 30700792)资助项目

摘要 高分子量透明质酸(high-molecular-weight hyaluronic acid, HMW-HA)是重要的肝脏基质, 分子量高达 2×10^6 Da 以上, 可被活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)等降解成低分子量透明质酸片段(hyaluronic acid fragments, HA fragments), 后者能被 toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 识别并激活免疫细胞诱发炎症反应. 基于枯否细胞表达 TLR4, 推测 HA fragments 通过激活枯否细胞 TLR4 信号系统而启动肝脏缺血再灌注损伤. 从 TLR4 基因突变型(C3H/HeJ, TLR4^{Mut/Mut})及野生型(C3H/HeN, TLR4^{+/+})小鼠分离肝脏枯否细胞常规培养, 用酶降解及色谱柱分离方法制备 HA fragments, 观察 HMW-HA 及 HA fragments 激活枯否细胞的差异, 检测培养上清肿瘤坏死因子- α 或白介素-1 β 水平变化; 枯否细胞 p38MAPK 信号通路的活化; 用特异性 p38MAPK 阻断剂——SB-203580, 阻断 p38MAPK 活化后, 观察培养上清中肿瘤坏死因子- α 或白介素-1 β 水平变化. 结果显示 HA fragments 可以促进 TLR4^{+/+} 枯否细胞分泌促炎因子, 不能诱导 TLR4^{Mut/Mut} 枯否细胞分泌促炎因子. 而 HMW-HA 既不能促进 TLR4^{+/+} 枯否细胞也不能促进 TLR4^{Mut/Mut} 枯否细胞分泌促炎因子. 采用多黏菌素中和脂多糖后, HA fragments 促进 TLR4^{+/+} 枯否细胞分泌促炎因子的能力不变, 这一过程伴随 p38MAPK 信号通路的活化. 当运用 p38MAPK 信号通路的特异性阻断剂 SB-203580, 抑制 p38MAPK 活性时, HA fragments 促进 TLR4^{+/+} 枯否细胞分泌促炎因子的能力显著下降. 因此与基质组成成分 HMW-HA 不同, HA fragments 可以通过 TLR4 激活枯否细胞, 促进其分泌促炎因子诱发炎症反应, 这一过程依赖于 p38MAPK 的激活.

关键词

枯否细胞
透明质酸片段
toll 样受体 4
p38MAPK
脂多糖
缺血再灌注损伤
肝脏

肝脏缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, IRI)常见于肝脏移植或肝脏切除手术, 是决定患者预

后的重要病理过程之一^[1]. 研究表明^[2], 常驻于肝窦隙枯否细胞(Kupffer cells, KC)的活化在其中扮演极

其重要的角色。近来发现 toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4), 一种 IL-1 受体家族成员, 介导肝脏缺血再灌注过程中枯否细胞的激活^[3,4]。TLR4 是模式识别受体, 识别革兰氏阴性细菌壁成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)。不局限于此, 诸多内源性分子(也称危险信号相关分子模式), 如热休克蛋白 (heat shock protein, HSP)、高迁移率族蛋白 1 (high mobility group protein box 1, HMGB1) 等, 也可以与 TLR4 结合, 并激活 TLR 关联的炎症级联反应^[5-7]。前期研究证明, TLR4 启动肝脏缺血再灌注损伤过程中炎症链式反应, 且与 LPS 无关^[8]。那么这种 TLR4 活化的内源性配体是什么呢? 尽管 HSP, HMGB1 等可活化 TLR4, 但研究表明 HSP 在肝脏缺血再灌注早期发挥保护肝脏的作用, 而 HMGB1 则是一种晚期炎症因子^[9], 因此迫切需要寻找肝脏缺血再灌注过程中的早期激活 TLR4 的内源性配体。

近来的探索表明, 高分子量透明质酸 (high-molecular-weight hyaluronic acid, HMW-HA) 与低分子量透明质酸片段 (hyaluronic acid fragments, HA fragments) 的生理学功能差别非常大^[10]。HA fragments 是由从双糖至二十四糖分子组成的混合物, 可激活 TLR4 诱发诸如肺泡巨噬细胞等免疫细胞的炎症反应^[11]。在无菌状态下甚至在恶性肿瘤细胞表面, HA fragments 亦可激活 TLR4 诱发免疫反应, 促进伤口愈合或肿瘤免疫^[12, 13]。HMW-HA 是由葡糖醛酸和 N-乙酰葡萄糖胺线性聚合而成的高分子化合物, 分子量高达 $1 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ Da, 具备抗炎活性^[14]。在生理状态下, HMW-HA 完全被肝窦内皮细胞摄取代谢, 且 HMW-HA 代谢能力可反应肝窦内皮细胞的功能状态^[15]。在肝脏缺血再灌注过程中, 由于缺血缺氧导致肝窦内皮细胞功能受损时, 血液 HMW-HA 水平会显著升高^[16]。肝脏恢复灌注时, HMW-HA 将被产生的氧自由基裂解成小分子片段^[10]。因此, 推测在肝脏缺血再灌注过程中 HA fragments 可以作为内源性危险信号分子激活枯否细胞 TLR4, 从而在极早期启动肝脏的炎症链式失控反应, 导致肝脏缺血再灌注损伤^[17]。

这些研究促使我们进一步探索 HA fragments 在枯否细胞活化中的作用, 以及这种活化与 TLR4 受体

信号通路的关系。本研究证明在体外 HA fragments 可以通过 TLR4 激活枯否细胞, p38MAPK 信号通路与这种激活相关。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

TLR4 基因突变的 C3H/HeJ 小鼠购于上海斯莱克实验动物中心, TLR4 野生型 C3H/HeN 小鼠购于北京维他利华实验动物公司。小鼠约 6~8 周龄, 均饲养于华中科技大学同济医学院实验动物中心。所有动物实验均经过同济医学院实验动物伦理委员会批准。链霉菌蛋白酶 E (pronase E)、胶原酶、脂多糖 (来源于 0111: B4 大肠杆菌)、多黏菌素 B、Percoll 溶液、牛睾丸透明质酸酶等均购于美国 Sigma 公司。1640 细胞培养液、新生小牛血清、HEPES 购于深圳生命生物技术公司。人脐带纯化高分子量透明质酸 (分子量高达 200000 Da) 购于美国 MP 生物学材料公司, 其蛋白质含量小于 2%, 硫酸软骨素含量小于 3%。肿瘤坏死因子- α 及白介素-1 β 检测 ELISA 试剂盒购于 R&D 公司。抗 p38MAPK 抗体、抗 CD44 抗体、抗 TLR4 抗体 (HTA125) 以及 p38 阻滞剂 SB-203580 等购于 Santa Cruz 公司。

1.2 枯否细胞分离、培养及活化

枯否细胞分离按照 Munthe-Kaas 等人^[18]的方法进行。无菌切开腹腔, 暴露肝门行门静脉插管。用含 10 mmol/L HEPES 无 Ca^{2+} 、无 Mg^{2+} 的 Hank's 平衡液 (HBSS) 灌洗肝脏 15 min, 然后用含 0.2% 链霉菌蛋白酶的 HBSS 溶液继续灌洗 5 min, 取下肝脏, 离体用含 0.05% 胶原酶的 HBSS 灌流消化 30 min, 再用解剖刀剪碎肝脏, 100 目钢网过滤, 然后运用密度梯度离心法分离非实质细胞, 用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养 60 min, 收获贴壁的枯否细胞。每只小鼠肝脏可收获约 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个枯否细胞。胎盘蓝染色表明存活率约 80%, 用溶酶体染色鉴定。然后在 95% CO_2 和 5% O_2 条件下分别用脂多糖、HMW-HA、HA fragments 等, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下刺激枯否细胞 6 h, 检测培养上清中炎症因子的水平。用 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SB-203580 与枯否细胞共同孵育 7 h, 以阻断 p38 信号途径。

1.3 透明质酸片段的制备

采用两种不同分子量的透明质酸: (1) 商业购买的 HMW-HA; (2) 制备的 HA fragments: 将 HMW-HA 溶于 1 mol/mL 的乙酸钠溶液, 用牛睾丸透明质酸酶消化 12 h, 然后用 Bio-Gel P-10 (Bio-Rad, USA) 过柱分离. 12 h 后收获 60 min 内的低分子量片段^[19]. 用添加糖醛酸的方法确定透明质酸片段的浓度并调整浓度为 1 mg/mL, 用 30% 聚丙烯酰胺胶电泳证实分离的片段均小于 24 个双糖.

1.4 用 ELISA 方法检测培养上清 TNF- α 和 IL-1 β 的浓度

在指定的时间点分别采集对照组、LPS、HMW-HA 以及 HA fragments 刺激等各组培养枯否细胞的上清液. ELISA 检测方法完全按照试剂商提供的说明书进行. 终反应产物在 450 nm 处检读并用 Bio-LinxTM 软件分析.

1.5 Western blot 检测 p38MAPK 信号通路

抽提缺血叶肝组织(100 mg)膜蛋白[1×PBS, 1% NP40, 0.5% 去氧胆酸钠, 0.1% SDS, 临用前加入 10 mg/mL PMSF, 抑酶肽(30 μ L/mL), 1 mol/L 原钒酸钠(10 μ L/mL). 定量后, 样品煮沸, 点样于 8.5% SDS-聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶溶液封闭后, 与一抗(p38MAPK

单克隆抗体, 1 : 400)及二抗反应后用辣根过氧化物酶系统显色, 扫描后用凝胶分析系统定量, 计算 OD 值, 磷酸化 p38 与总 p38 之比为 p38 活化水平.

1.6 统计分析

所有数据以 \pm SD 表示. 两组间差异用 *t* 检验, 组间差异采用单向 ANOVA 检验. *P* < 0.05 表示差异有显著性.

2 结果

2.1 HA fragments 激活枯否细胞

枯否细胞的活化以分泌促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 为特征, 因此通过检测培养上清中促炎因子水平即可判断枯否细胞是否被激活. 原代培养的枯否细胞对 HMW-HA 及 HA fragments 刺激的反应完全不同. 即使是浓度仅为 10 μ g/mL 的 HA fragments 亦可以促进枯否细胞分泌 TNF- α 和 IL-1 β , 而 HMW-HA 即使是在浓度高达 100 μ g/mL 的情况下也不能激活枯否细胞(图 1). 而且, HA fragments 活化枯否细胞的能力呈现浓度依赖性(图 1).

2.2 HA fragments 激活枯否细胞依赖于 TLR4

进一步探讨参与 HA fragments 诱导的枯否细胞活化的受体. 抗 TLR4 单克隆抗体 HTA125 可以阻止配体与 TLR4 结合, 从而特异性阻断 TLR4 诱导的炎症级联反应. 用 10 μ g/mL HTA125 单克隆抗体

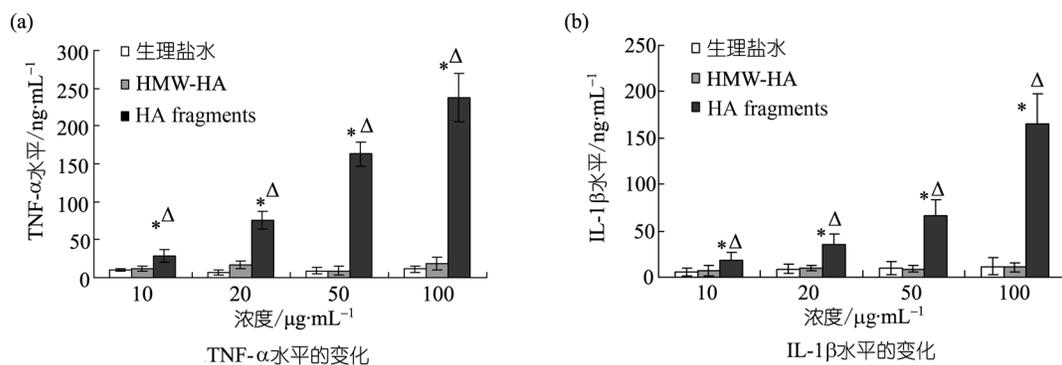


图 1 分别使用 HMW-HA, HA fragments 及生理盐水对照刺激枯否细胞 6 h 后, 培养上清中促炎因子水平 (TNF- α 和 L-1 β) 变化

*, *P* < 0.01, 与 HMW-HA 组或生理盐水对照组比较, *t*-test 检验; Δ , *P* < 0.01, 不同的 HA fragments 剂量组之间比较, 单向 ANOVA 检验

与枯否细胞孵育 30 min, 然后在用 LPS 刺激枯否细胞, 发现枯否细胞此时对 LPS 刺激无反应, 同时对 HA fragments 刺激的反应也消失($P < 0.01$, 图 2). 这充分说明 TLR4 介导 HA fragments 诱发的枯否细胞活化. 为进一步对此进行证明, 分别用 HA fragments 刺激 TLR4 突变(TLR4^{Mut/Mut})及野生型(TLR4^{+/+})两种不同基因型的枯否细胞, 发现 TLR4^{Mut/Mut}枯否细胞对不同浓度的 HA fragments 刺激均无反应(图 3). TLR4 是 LPS 受体, 当 LPS 浓度低至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的微小剂量时亦可通过激活 TLR4 而活化单核巨噬细胞系, 因此, 不能排除上述结果是否存在 LPS 污染的可能. 于是在 HA fragments 刺激液中加入多黏菌素 B 以中和可能存在的 LPS, 并设置多黏菌素对照. 提示多黏菌素单独对枯否细胞活化无影响, 且对 HA fragments 活化枯否细胞的能力亦没有影响($P > 0.05$), 但是它可以完全阻断 LPS 通过 TLR4 活化枯否细胞($P < 0.01$, 图 2).

研究认为, CD44 是 HMW-HA 受体, 通过识别 HMW-HA 介导细胞间连接, 还可以促进 HMW-HA 摄入代谢, 而且枯否细胞表面高表达 CD44 受体. 那么 HA fragments 是否能通过激活 CD44 而促进枯否细胞分泌炎症因子呢? 因此, 用 CD44 封闭抗体封闭枯否细胞表面 CD44 后, 再用 HA fragments 刺激枯否细胞, 发现封闭 CD44 不影响 HA fragments 活化枯否细胞的能力($P > 0.05$, 图 2). 说明 CD44 与 HA fragments 诱导的枯否细胞活化无关.

2.3 HA fragments 激活枯否细胞需要 p38MAPK 信号通路参与

采用 Western blot 方法检测 HA fragments 激活枯否细胞是否有 p38MAPK 信号通路介入. 从图 4 可以看出, HA fragments 可以明显增强 p38 活性, 而 HMW-HA 则不能增强 p38 活性($P > 0.05$); 当用 p38 阻断剂 SB-203580, 阻断 p38 活性时, HA fragments 诱导的 p38 活性下降($P < 0.05$). 而且当运用 SB-203580 阻断 p38 活性过后, 用 HA fragments 刺激枯否细胞后, TNF- α 及 IL-1 β 的分泌水平明显下降($P < 0.01$, 图 5), 而对 HMW-HA 刺激组无影响, 充分说明 HA fragments 激活枯否细胞需要 p38MAPK 信号通路参与.

3 讨论

肝脏缺血再灌注损伤是肝脏移植、肝叶切除等肝脏手术中常见的病理现象, 枯否细胞活化在这个过程中扮演重要角色^[20]. 已有研究^[3, 21]证明, 表达于枯否细胞的 TLR4 在启动肝脏缺血再灌注损伤这一炎症链式反应中起着重要作用, 且与外源性病原成分无关^[3, 21]. 本研究旨在探索枯否细胞表面 TLR4 活化的内源性配体. 结果表明, 由 HMW-HA 降解产生的 HA fragments 具备激活枯否细胞促进其释放促炎因子的能力, 这种能力呈现 HA fragments 浓度依赖性, HMW-HA 则不具备这种能力. 虽然 CD44 是 HMW-HA 受体, 进一步研究提示 HA fragments 的这种活化枯否细胞的能力依赖于 TLR4, 而与 CD44 无

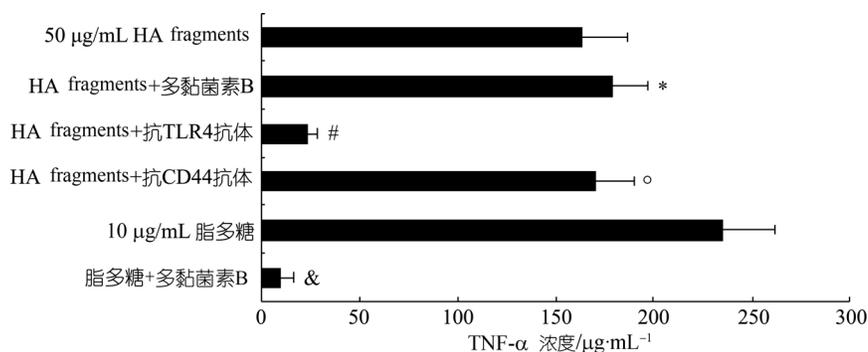


图 2 HA fragments 通过激活 TLR4 活化枯否细胞

*, $P > 0.05$, 与 HA fragments 刺激组比较; #, $P < 0.01$, 与 HA fragments 刺激组比较; o, $P > 0.05$, 与 HA fragments 刺激组比较; &, $P < 0.01$, 与 LPS 刺激组比较. 通过加入多黏菌素 B 以排除 LPS 污染

关, 最后用 p38MAPK 阻断剂证明这种活化需要 p38MAPK 信号通路参与.

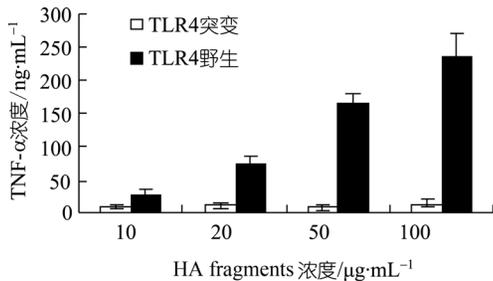


图 3 TLR4 突变及 TLR4 野生型枯否细胞对低分子量透明质酸片段刺激反应

*, $P < 0.01$, 与 TLR4^{Mut/Mut} 枯否细胞比较

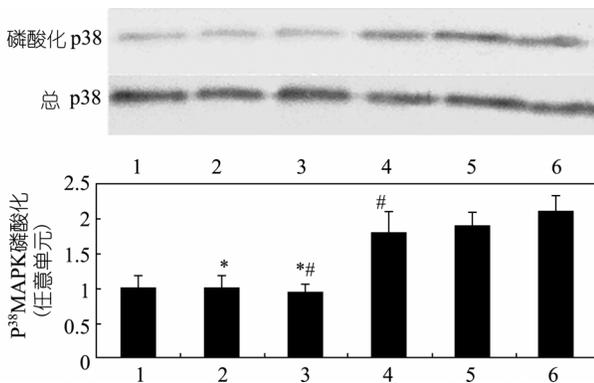


图 4 不同刺激因素对枯否细胞 p38MAPK 磷酸化的影响

(1) 生理盐水对照组; (2) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HMW-HA 刺激 3 h; (3) 枯否细胞与 SB-203580 预孵育 7 h 后 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HA fragment 刺激 3 h; (4) 10 ng/mL LHA fragments 刺激 3 h; (5) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HA fragments 刺激 3 h; (6) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 刺激 3 h, 后用 Western blot 检测 p38 表达强度(磷酸化 p38 MAPK 与总 p38 MAPK 之比). *示 $P > 0.05$; #示 $P < 0.05$ 、相同标记组间比较

肝脏缺血再灌注损伤包括两个显著的阶段^[22]. 缺氧阶段以肝脏组织细胞能量和氧供的显著缺乏为特点, 伴肝窦内皮细胞功能受损, 因此肝窦内皮细胞代谢降解透明质酸的能力下降, 导致血液中 HMW-HA 水平升高^[16,23]. 随后的再灌注过程以血液和氧供的迅速恢复并伴发剧烈的炎症链式反应为特点. 大量的研究表明^[2-4]这种炎症链式反应与 TLR4 介导的枯否细胞活化有关. 但是再灌注极早期激活枯否细胞 TLR4 的配体尚不明确. 究竟是什么内源性配体在激活枯否细胞表面 TLR4 诱发炎症链式反应中发挥主导作用? 在再灌注早期体内是否存在一种能活化枯否细胞表面 TLR4 的内源性物质呢? 早在 1998 年 Rockey 等人^[24]发现 HA fragments 可以激活枯否细胞诱导型一氧化氮合酶的转录, 但是涉及的受体一直未深入研究. 因此推测, 在灌注早期当 HMW-HA 被瞬间产生的 ROS 降解为 HA fragments 时, 即给枯否细胞表面 TLR4 活化提供了大量的内源性配体, 该配体通过活化枯否细胞表面 TLR4 诱发剧烈炎症链式反应, 损伤肝细胞, 形成缺血再灌注损伤.

近来的研究^[10,25]认为, 细胞外基质有动态合成、分解的代谢特点, 而不仅仅表现为惰性的组织细胞支撑结构, 尤其是在缺血再灌注这种病理状态下, 主要表现为细胞外基质成分不断的从高分子复合物降解为低分子片段, 而这种不同于其高分子前体的低分子片段则具备与之不同的生物学特性. HMW-HA 是由 D-葡萄糖醛酸和 D-葡萄糖胺线性聚合而成的多糖分子, 是细胞基质的主要成分之一. 在局部炎症状态下, HMW-HA 可以被活性氧分子降解成 HA fragments^[26], HA fragments 可以激活树突细胞、肺泡巨噬细胞等免

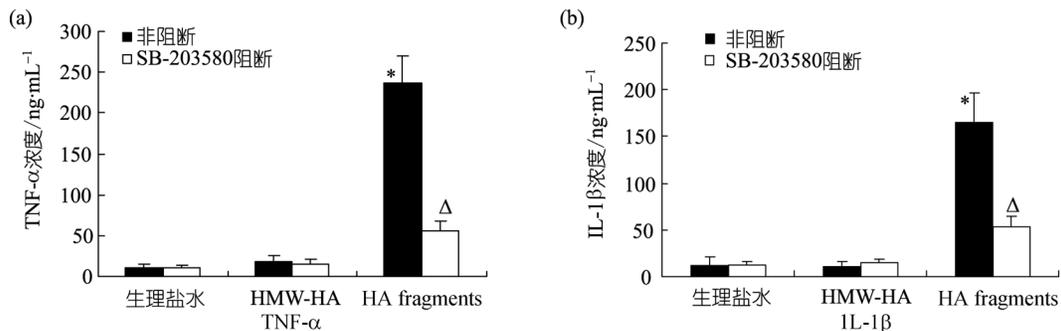


图 5 运用特异性 p38MAPK 阻断剂 SB-203580 阻断 p38 活性后, 不同刺激物对枯否细胞分泌促炎因子的影响

*, $P < 0.01$, 与 Δ 相比较

疫细胞诱发炎症反应^[11,19], 且这种激活通过TLR4 介导^[27]. 即使肺组织损伤修复的炎症反应也可能与HA fragments激活TLR4 有关^[11,12]. 最新的研究^[13]认为, HA fragments还可激活肿瘤细胞表面TLR4, 增强肿瘤细胞的侵袭性.

基于上述研究, 探讨肝脏中的主要免疫细胞——枯否细胞是否能被HA fragments激活, 而且这种激活是否由TLR4 介导. 分别用HMW-HA与HA fragments刺激枯否细胞, 并用多黏菌素B排除LPS污染, 证明HA fragments可以活化枯否细胞, HMW-HA则不具备这种功能. 再运用抗体阻断TLR4 功能并用TLR4 受体基因突变品系小鼠来源的枯否细胞进行研究, 发现HA fragments的这种激活枯否细胞的功能由枯否细胞表面TLR4 介导, 并与CD44 无关. 众所周知, TLR4 识别革兰氏阴性菌细胞壁成分——LPS, 极低浓度LPS可激活TLR4, 且TLR4 存在多种内源性或外源性配体^[28,29]. 因此在研究中用多黏菌素B排除了LPS的影响. CD44 是HMW-HA受体^[19], 介本胞间黏附, 促进透明质酸通过淋巴系统代谢. 本实验证实HA fragments激活枯否细胞不通过CD44 介导. 当TLR4 参与HA fragments活化枯否细胞这一免疫功能时, 什么下游分子会介入呢^[30,31]? 本研究选用p38MAPK为研究对象. 结果提示HA fragments活化

枯否细胞需要p38MAPK介导, 而另有研究^[24,32]表明核因子κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB)亦可能介入这一过程. 在下一步的研究中, 将会对介入的诸如ERK, JNK, AP-1 等信号分子进行进一步研究以完善本实验结果.

越来越多的关于HMW-HA生成及分解代谢的研究表明, 在肝脏缺血再灌注过程中可能存在上述推测的理论. 每天机体产生 10~100 mg HMW-HA进入血液, 但是血液中HMW-HA水平达不到其 1%, 如此快的HMW-HA代谢率可能意味着某种监视机体细胞组织损伤状态的机制的存在^[10]. HMW-HA几乎完全由肝窦内皮细胞摄取代谢, 而且不具备激活免疫细胞的功能^[14]. 当肝窦内皮细胞功能在缺血缺氧状态下受到损伤时, 血液中HMW-HA水平升高, 并被随后再灌注早期的活性氧分子降解成HA fragments, 于是在机体损伤状态下, 具备激活免疫细胞功能的HA fragments将被大量释放, 并活化肝脏内免疫细胞, 诱发炎症级联反应形成肝脏缺血再灌注损伤. 本研究证实了上述设想中关键的一步, 即HA fragments具备激活TLR4 而活化枯否细胞的能力. 在随后的研究中, 我们将继续通过进一步的实验来完善本假设, 并由此揭开肝脏缺血再灌注损伤的发生机制, 为临床上本病理过程的防治提供重要的理论基础.

参考文献

- 1 Kupiec-Weglinski J W, Busuttil R W. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc*, 2005, 37: 1653—1656 [\[DOI\]](#)
- 2 Fondevila C, Busuttil R W, Kupiec-Weglinski J W. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look. *Exp Mol Pathol*, 2003, 74: 86—93 [\[DOI\]](#)
- 3 Tsung A, Hoffman R A, Izuishi K, et al. Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells. *J Immunol*, 2005, 175: 7661—7668
- 4 Zhai Y, Shen X D, O'Connell R, et al. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol*, 2004, 173: 7115—7119
- 5 Yu M, Wang H, Ding A, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*, 2006, 26: 174—179 [\[DOI\]](#)
- 6 Vabulas R M, Ahmad-Nejad P, Ghose S, et al. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem*, 2002, 277: 15107—15112 [\[DOI\]](#)
- 7 Kol A, Lichtman A H, Finberg R W, et al. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol*, 2000, 164: 13—17
- 8 Sun D, Chen D, Du B, et al. Heat shock response inhibits NF-kappa B activation and cytokine production in murine Kupffer cells. *J Surg Res*, 2005, 129: 114—121 [\[DOI\]](#)
- 9 Kim J Y, Park J S, Strassheim D, et al. HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288: L958—965 [\[DOI\]](#)

- 10 Powell J D, Horton M R. Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. *Immunol Res*, 2005, 31: 207—218[DOI]
- 11 McKee C M, Penno M B, Cowman M, et al. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages: the role of HA size and CD44. *J Clin Invest*, 1996, 98: 2403—2413[DOI]
- 12 Taylor K R, Yamasaki k, Radek K A, et al. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J Biol Chem*, 2007, 282: 18265—18275[DOI]
- 13 Voelcker V, Gebhardt C, Averbek M, et al. Hyaluronan fragments induce cytokine and metalloprotease upregulation in human melanoma cells in part by signalling via TLR4. *Exp Dermatol*, 2008, 17: 100—107[DOI]
- 14 Cantor J O, Nadkarni P P. Hyaluronan: the jekyll and hyde molecule. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2006, 5: 257—260[DOI]
- 15 Laurent T C, Fraser J R. Hyaluronan. *FASEB J*, 1992, 6: 2397—2404
- 16 Reinders M E, van Wagenveld B A, van Gulik T M, et al. Hyaluronic acid uptake in the assessment of sinusoidal endothelial cell damage after cold storage and normothermic reperfusion of rat livers. *Transpl Int*, 1996, 9: 446—453
- 17 Jeyabalan G, Tsung A, Billiar T R. Linking proximal and downstream signalling events in hepatic ischaemia/reperfusion injury. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34: 957—959[DOI]
- 18 Munthe-Kaas A C, Berg T, Seglen P O, et al. Mass isolation and culture of rat Kupffer cells. *J Exp Med*, 1975, 141: 1—10[DOI]
- 19 Termeer C C, Hennies J, Voith U, et al. Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J Immunol*, 2000, 165: 1863—1870
- 20 Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 284: G15—26
- 21 Wang H, Li Z Y, Wu H S, et al. Endogenous danger signals trigger hepatic ischemia/reperfusion injury through toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway. *Chin Med J*, 2007, 120: 509—514
- 22 Teoh N C, Farrell G C. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18: 891—902[DOI]
- 23 Nanashima A, Yamaguchi H, Tanaka K, et al. Preoperative serum hyaluronic acid level as a good predictor of posthepatectomy complications. *Surg Today*, 2004, 34: 913—919[DOI]
- 24 Rockey D C, Chung J J, McKee C M, et al. Stimulation of inducible nitric oxide synthase in rat liver by hyaluronan fragments. *Hepatology*, 1998, 27: 86—92[DOI]
- 25 Mummert M E. Immunologic roles of hyaluronan. *Immunol Res*, 2005, 31: 189—206[DOI]
- 26 Agren U M, Tammi R H, Tammi M I. Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture. *Free Radic Biol Med*, 1997, 23: 996—1001[DOI]
- 27 Termeer C, Benedix F, Sleeman J, et al. Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 2002, 195: 99—111[DOI]
- 28 Beg A A. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol*, 2002, 23: 509—512[DOI]
- 29 Tsan M F, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol*, 2004, 76: 514—519
- 30 Maung A A, Fujimi S, Miller M L, et al. Enhanced TLR4 reactivity following injury is mediated by increased p38 activation. *J Leukoc Biol*, 2005, 78: 565—573[DOI]
- 31 Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors: their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol*, 2001, 1: 625—635[DOI]
- 32 Wolf D, Schumann J, Koerber K, et al. Low-molecular-weight hyaluronic acid induces nuclear factor-kappa B-dependent resistance against tumor necrosis factor alpha-mediated liver injury in mice. *Hepatology*, 2001, 34: 535—547[DOI]