

DOI: 10.13376/j.cblls/2014143

文章编号: 1004-0374(2014)10-0998-06

· 发现的历程 ·



编者按:当机体受到病原微生物感染时, Toll 样受体 (TLR) 在固有免疫反应中发挥关键调控作用。然而, 过度的 TLR 信号引起的炎症反应将导致组织损伤, 甚至内毒素休克等疾病的发生。为了更好地理解 TLR4 信号稳态机制, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 王红艳实验室研究发现, 在细菌感染的巨噬细胞中, 血管内皮生长因子受体 3 (VEGFR-3) 和其配体 VEGF-C 的表达量明显上升。VEGF-C 结合并活化 VEGFR-3 受体后, 显著降低巨噬细胞中促炎因子 IL-6 和 TNF α 等的分泌。这主要是由于 VEGFR-3 通过活化 PI3K-Akt1 通路和上调 SOCS1 的表达, 抑制了巨噬细胞中

TLR4-NF- κ B 信号通路。在严重细菌感染时, VEGFR-3 胞外配体结合区域缺失或胞内激酶活性区突变的基因工程小鼠死亡率显著升高。王红艳实验室及其合作者的研究揭示了 VEGFR-3 在巨噬细胞中反馈调控 TLR4-NF- κ B 通路, 为治疗淋巴水肿伴随的感染提供了新策略。

VEGFR-3反馈性抑制巨噬细胞TLR4诱发的炎症反应

张彦波

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

固有免疫 (innate immunity) 是机体免疫系统的重要组成部分。在机体受到病原微生物入侵时, 发挥着监测和诱导机体免疫应答反应的关键作用。Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 作为一种重要的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR), 主要表达于巨噬细胞 (macrophage) 和树突状细胞 (dendritic cell, DC) 等固有免疫细胞表面^[1]。这些固有免疫细胞通过识别病原菌相关分子模式 (PAMPs) 并活化转录因子, 分泌多种炎性细胞因子和趋化因子, 启动固有免疫应答反应, 构成机体免疫反应的第一道防线^[2]。TLR4 是最早发现的 TLR 家族成员之一, 在识别革兰氏阴性菌来源的脂多糖成份 LPS 后, 引起巨噬细胞内两条通路的活化: (1) MyD88 依赖性早期 NF- κ B 信号通路的活化, 该信号通路引起下游炎症性因子如 IL-6、IL-1 β 、TNF α 等的表达; (2) 通过 MyD88 非依赖性途径, TLR4 活化下游干扰素调控因子 (IRF3) 并且导致晚期 NF- κ B 的活化。两种方式均引起干扰素 IFN- β 的分泌和 IFN 诱导基因的表达, 晚期 NF- κ B 活化信号同样引起炎症性细胞因子的产生^[3]。

TLR4-NF- κ B 信号通路活化能够通过刺激固有免疫应答和促进获得性免疫反应, 对机体发挥着至关重要的作用。但是, 过度活化或持续性炎症反应也会引起严重的机体损伤和相关炎症性疾病, 包括感染性疾病、自身性免疫疾病和慢性炎症, 如细菌感染引起 TLR4 过度活化导致败血症 (sepsis) 的产生^[4]。败血症是指致病菌侵入血液循环, 生长繁殖, 产生毒素而发生的急性全身性感染, 常伴有炎症因子风暴, 引起严重组织损伤。败血症是一种死亡率高的疾病, 在医院手术感染患者中具有较高发病率^[5-6]。

因而, TLR4-NF- κ B 信号通路的活化必须受到严格且精密的负性调控, 从而维持机体免疫系统发挥稳定的保护作用^[7]。鉴于 TLRs 信号负性调控的重要性, 对于负性调控 TLRs 机理的研究已成为近些年免疫学领域的研究热点。尽管已有研究结果已经发现了能够抑制 TLR 信号通路的众多细胞内调节因子^[4,7], 但很少定位在细胞膜的信号蛋白能够

收稿日期: 2014-09-10

*通信作者: E-mail: zhangyanbo@sibcb.ac.cn

下调 TLR 信号, 并且保护宿主避免内毒素性休克的发生。同时, 尽管研究结果暗示多种细胞因子可能用来作为败血症的生物标记物^[8], 但其调控败血症休克的分子机制还知之甚少。

生物标记物 (biomarker) 能够对患者进行早期快速诊断和分类, 对于败血症治疗过程中的病情监测具有重要作用, 并且能够用来评估治疗方案的效果^[8]。至今临床上仍缺乏针对败血症疗效高、副作用小的治疗方法。TLR4 的阻断抗体能有效地抑制革兰氏阴性细菌感染诱导炎症因子的分泌和败血症的发生^[9]。TLR4 受体拮抗剂 E5564 (Eritoran) 可作为治疗细菌感染所引起的严重的败血症的候选药物^[10], 但近期发现其临床二期试验中不能有效降低死亡率^[11], 因而新的败血症治疗药物和治疗靶点亟待发现。

很多 TLR 阴性调控分子在炎症刺激下能够被诱导性表达, 然后反馈性地抑制 TLR 信号通路, 减弱炎症反应, 或引发内毒素耐受。那么, 巨噬细胞内是否存在受 TLR4 活化而被诱导产生的细胞因子受体和相应的细胞因子, 负反馈性地抑制 TLR4 过度活化, 从而发挥保护作用呢?

为了找到这个问题的答案, 本课题组检测了在巨噬细胞受到 TLR4 刺激物 (包括 LPS、沙门氏菌和大肠杆菌等) 活化时, 胞内多种细胞因子、趋化因子、生长因子和相关受体的表达情况, 以期发现新型 TLR4 炎症反应过程中抑制性细胞因子-受体组合。细胞因子在外周循环中能够方便地作为败血症生物标记物, 探索该组合调控 TLR4 的分子机制有助于发现新的败血症治疗方法和手段。与已有研究结果一致^[8], 本课题组通过实时荧光定量 PCR 方法检测到在巨噬细胞 TLR4 活化过程中, 多种促炎因子和趋化因子表达量上升, 包括 IL-6、IL-1 β 、CCL2 和 CXCL10 等。然而, 这些因子相关的受体, 包括 IL-6R、IL-1R、CCR2 和 CXCR3 的表达量, 变化很小或者有一定程度的减少。有意思的是, 血管内皮生长因子 C (VEGF-C) 和其受体血管内皮生长因子受体 3 (VEGFR-3) 的表达显著上升。

前期的研究表明, 在生理 (如胚胎发育、伤口愈合和肌肉生长等) 和病理条件下 (如缺血性心脏病、肿瘤和多种炎症性疾病等), 血管内皮生长因子及其受体在血管生成和淋巴管生成中发挥着关键作用, 并调节血管通透性和内皮细胞的生存^[12]。跨膜蛋白 VEGFRs 家族包括 VEGFR-1、VEGFR-2 和 VEGFR-3。VEGFRs 具有保守的胞外免疫球蛋白类

似结构域、单次跨膜结构域和胞内激酶结构域, 具有酪氨酸激酶活性并可发生自身磷酸化。本课题组的研究结果显示, VEGFR-3 在 LPS 或 *E. coli* 刺激后的小鼠原代巨噬细胞中的表达显著上升。在 LPS 刺激的人类 THP-1 细胞中, VEGFR-3 的表达也显著提高。除受体之外, 还发现 LPS 刺激和 *E. coli* 感染迅速诱导小鼠腹腔渗出巨噬细胞 (PEM)、骨髓来源巨噬细胞 (BMM) 和 PMA 诱导的人类 THP-1 巨噬细胞分泌 VEGF-C。VEGF-C 在 LPS 休克的小鼠血清中的含量相对于对照小鼠要高 10 倍。本研究同时发现, 在沙门氏菌 SL1344 菌株感染的小鼠血清中, VEGF-C 的含量也大幅度上升。更为重要的是, 本课题组发现在败血症患者血清中, VEGF-C 的含量也有类似小鼠败血症休克模型中的显著上升现象, 提示 VEGF-C 有可能被用作败血症诊断的一种标志物。

那么, VEGFR-3 和 VEGF-C 是否是受到 TLR4 活化信号而被诱导产生的呢。NF- κ B 是 TLR4 活化后下游主要的转录因子, 本课题组利用 NF- κ B 抑制剂有效地抑制了 VEGFR-3 在 LPS 活化的巨噬细胞中的表达。通过染色质共沉淀技术, 进一步证实了 NF- κ B 亚基 p65 能够结合在 VEGFR-3 基因启动子区域。然后, 利用 siRNA 方法将巨噬细胞中 p65 表达量敲减, 发现 VEGFR-3 和 VEGF-C 的表达量下降。另外, 当 MyD88 缺失后, VEGFR-3 和 VEGF-C 在巨噬细胞中的表达量也受到了抑制。因此, 本课题组的结果证实 TLR4-NF- κ B 信号通路促进了 VEGFR-3 和 VEGF-C 在巨噬细胞中的表达。

接下来的研究重点是, VEGFR-3 及其配体是否能抑制巨噬细胞中 TLR4 活化和炎症因子的分泌呢。

经过对巨噬细胞进行单独 LPS 或 LPS 加上外源性 VEGF-C 刺激, 本课题组发现, 外源性 VEGF-C 的加入抑制了 LPS 诱导的炎症因子的产生, 包括 IL-6、IL-1 β 和 TNF α 。为了进一步确定 VEGFR-3 在 TLR4 调控的炎症反应过程中的阴性调控作用, 本课题组利用 siRNA 将小鼠原代巨噬细胞中 VEGFR-3 的表达量敲减。VEGFR-3 表达敲减后, 促炎因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF α 的表达量显著上升。相应的, 在 PMA 诱导的人类巨噬细胞系 THP-1 中, 过表达 VEGFR-3 的确抑制了促炎因子的产生。

接下来, 本课题组使用了在巨噬细胞中特异性表达缺失 VEGFR-3 胞外配体结合区域 (*Vegfr3*^{ALBD}) 和胞内激酶活性突变 (*Vegfr3*^{TKmut}) 的两种小鼠的原

代巨噬细胞和细菌感染的活体小鼠模型, 验证 VEGFR-3 对炎症因子分泌的抑制作用。

作为细胞表面具有酪氨酸激酶活性的受体, VEGFR-3 具有本底低水平的自我磷酸化, 而 VEGF-C 的结合能够进一步增强其酪氨酸磷酸化程度^[13-14]。缺失胞外配体结合区域的 VEGFR-3 不能与 VEGF-C 相互作用^[15]。这种小鼠使得本课题组能够研究配体 VEGF-C 的结合对于 VEGFR-3 信号调控巨噬细胞抑炎反应是否重要。

本课题组发现 TLR4 活化的 *Vegfr3*^{ALBD/ALBD} 巨噬细胞确实表达更高水平的 IL-6、IL-1 β 和 TNF α 。接下来, 在体内验证 *Vegfr3*^{ALBD/ALBD} 小鼠是否对 LPS 诱导的败血症休克更为敏感。在 LPS 和伤沙门氏菌 SL1344 分别诱导的小鼠败血症休克模型中, 同野生型或杂合型小鼠相比, *Vegfr3*^{ALBD/ALBD} 突变小鼠显示更高的死亡率; 并且在 *Vegfr3*^{ALBD/ALBD} 小鼠发生内毒素休克过程中, 伴随更为严重的肺组织损伤和更多的免疫细胞浸润到肺组织。

此外, 本课题组比较了野生型小鼠和激酶活性缺失的 TKmut 小鼠在应对细菌感染时的反应。由于纯合 *Vegfr3*^{TKmut/TKmut} 基因型的小鼠在胚胎期致死, 本课题组利用杂合 *Vegfr3*^{WT/TKmut} 小鼠 (也称 Chy 小鼠) 对比野生型小鼠巨噬细胞的功能。体外和体内实验均证明 VEGFR-3 胞内激酶活性丧失后, 巨噬细胞产生更多的促炎因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF α , 并且 *Vegfr3*^{WT/TKmut} 小鼠在细菌诱发的败血症休克模型中, 在更早期出现更高的死亡率, 并且伴有更严重的肺部组织损伤。

值得一提的是, 由于 VEGFR-3 激酶活性突变, *Vegfr3*^{WT/TKmut} 小鼠具有淋巴水肿 (lymphoedema) 症状, 这种症状与人类淋巴水肿相似。在人类中存在 VEGFR-3 遗传突变, 引起 VEGFR-3 激酶活性下降, 导致人类淋巴水肿疾病的发生^[16]。有趣的是, 这类淋巴水肿患者常伴随感染症状^[17]。由以上研究结果推测, 淋巴水肿症状的产生, 除了由于突变导致淋巴管内皮细胞功能缺陷之外, 还可能由于 *Vegfr3*^{TKmut} 突变通过影响巨噬细胞功能而导致了感染症状的发生。

接下来, VEGFR-3 发挥功能的分子机制是什么。由于是 TLR4 激发转录因子 NF- κ B 活性, 引起 IL-6、IL-1 β 、TNF α 等炎症因子的产生^[18], 那么, VEGFR-3 是否通过影响 NF- κ B 的活化而降低这些炎症因子或趋化因子的表达。已有研究结果显示, IKKs 能够磷酸化 I κ B, 导致 I κ B 与 NF- κ B 转录活

性亚基的解离, 从而使 NF- κ B 亚基 (如 p65) 进入细胞核内, 启动下游基因的转录^[19]。本课题组发现外源性 VEGF-C 处理降低了 LPS 刺激的小鼠巨噬细胞中 p-IKK α 、p-IKK β 和 p-I κ B α 的含量。在 LPS 刺激下, 与对照组野生型小鼠来源的巨噬细胞相比, VEGFR-3 敲减后的巨噬细胞中 p-IKK α 、p-IKK β 和 p-I κ B α 的含量相对增加。更为重要的是, siRNA 敲减小鼠原代巨噬细胞中 VEGFR-3 的表达, 的确促进 NF- κ B 的亚单位 p65 转移进入 TLR4 活化的巨噬细胞的核内。与上述结果一致的是, 本课题组在 *Vegfr3*^{ALBD/ALBD} 小鼠和 *Vegfr3*^{WT/TKmut} 小鼠来源的原代巨噬细胞中也检测到了 NF- κ B 信号通路的过度活化。

那么, VEGFR-3 是否通过与其他关键信号分子相互作用而影响 TLR4-NF- κ B 信号通路呢。VEGFR-3 不能与 TLR4 直接相互作用, 也不与内源性 TLR4 下游重要信号分子如 MyD88、TRAF6、TRIF、TAK1、TIRAP 和 TBK1 等结合。

由于 *Vegfr3*^{TKmut} 突变导致 VEGFR-3 胞内酪氨酸几乎不发生磷酸化, 并且突变后不能有效抑制 TLR4 信号活性, 本课题组猜测 VEGFR-3 很可能通过其胞内区域结合含有 SH2 结构域的阴性调节分子而影响 TLR4 通路, 并且这种结合可能依赖于其酪氨酸磷酸化位点。据报道, PI3K 分子能够负性调控 TLR4-NF- κ B 信号通路^[20-22]。PI3K 的亚单位 p85 含有 SH2 结构域, 并且在 LPS 刺激后能定位于细胞膜部位, 这种蛋白分子分布区域的变化有利于其与细胞膜表面受体分子磷酸化酪氨酸位点的结合。本课题组发现, 发生自磷酸化后的 VEGFR-3 能够结合 PI3K 调节性亚基 p85 α 蛋白。更为重要的是, VEGFR-3 能够促进 p85 α 发生磷酸化。将 p85 α 上的 SH2 结构域切除之后 (p85 α Δ SH2), p85 α Δ SH2 与 VEGFR-3 不能相互结合。

IA 型 PI3K 由调节性亚基 p85 α 与活性亚基 p110 δ 异二聚体组成。磷酸化酪氨酸肽段结合 p85 α 亚基的 SH2 结构域, 能够使其释放对 p110 δ 亚基活性的抑制作用, 从而引起 PI3K 激酶的活化^[23]。与此一致, 本课题组发现在 LPS 刺激的 *Vegfr3*^{WT/TKmut} 小鼠巨噬细胞中 PI3K (p85/p55) 和 Akt (Ser473) 的磷酸化水平显著下降。与对照组相比, 在 LPS 刺激下的巨噬细胞中, siRNA 敲减 VEGFR-3 降低了 p-Akt (Ser473) 的水平。另外, 外源性 VEGF-C 处理增强了 LPS 诱导的 Akt (Ser473) 磷酸化水平, 但是在 VEGFR-3 敲减的巨噬细胞中, 外源性 VEGF-C 不能诱导 Akt (Ser473) 的磷酸化。

Akt1 是 PI3K 下游的主要信号分子, 因此本课题组更深入地研究了 Akt1 是否是 VEGFR-3 抑制炎症反应的主要下游效应分子。经 TLR4 活化后, Akt 特异性抑制剂 (Triciribine) 处理的巨噬细胞或缺失 Akt1 的小鼠巨噬细胞产生更多的 IL-6 和 IL-1 β 等炎症因子。通过逆转录病毒包装体系, 将持续活化的 Akt1 (Myr-Akt1) 表达质粒转入野生型、杂合型和 *Vegfr3*^{ALBD/ Δ LBD} 小鼠原代巨噬细胞中, 发现 Myr-Akt1 回复了 *Vegfr3*^{ALBD/ Δ LBD} 细胞中 NF- κ B 亚基 p65 过度入核的现象。

前人的研究结果证明, Akt1 和 PI3K 催化活性亚基 p110 δ 能够影响 TLR4 的内吞和 TLR4 mRNA 的表达而抑制 NF- κ B 活化 [20, 24]。尽管 TLR4 在野生型和 *Vegfr3*^{ALBD/ Δ LBD} 小鼠原代巨噬细胞中的含量相同, 但通过流式细胞术分析或激光共聚焦显微镜观察, 本课题组发现 LPS 诱导的 *Vegfr3*^{ALBD/ Δ LBD} 细胞明显下调 TLR4 分子内吞的程度。这意味着在 LPS 等刺激时, VEGFR-3 缺陷的巨噬细胞表面持续分布更多的 TLR4 分子, 从而引起下游更强的 NF- κ B 活化水平。

SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) 被证实是巨噬细胞 TLR4 炎症反应过程中的重要负性调控分子 [25-27], 而 Akt1 活性缺失导致 SOCS1 的表达下降 [24]。由于 VEGFR-3 活性影响 PI3K-Akt1 的活化, 在 *Vegfr3*^{ALBD/ Δ LBD} 小鼠巨噬细胞中, SOCS1 的表达量相对野生型显著减少。尽管经外源性 VEGF-C 处理的巨噬细胞能一定程度抑制 IL-6 的产生, 但这种效应在 siRNA 敲减 SOCS1 后消失。相应地, 外源性 VEGF-C 处理的巨噬细胞降低了 p-IKK α 和 p-IKK β

水平, 而 siRNA 敲减 SOCS1 能够阻断这种效应。此外, 经外源性 VEGF-C 处理后, 野生型巨噬细胞降低了 IL-6 的表达; 而 *Vegfr3*^{ALBD/ Δ LBD} 巨噬细胞在接受外源性 VEGF-C 刺激后的反应明显减弱, 不能降低 IL-6 的表达。

总结上述结果, 本课题组认为巨噬细胞表面受体 VEGFR-3 能够通过其胞内磷酸化酪氨酸肽段, 结合并磷酸化 PI3K 亚基 p85 α , 然后活化 PI3K-Akt1 通路, 促进 SOCS1 的表达, 最终抑制 TLR4-NF- κ B 信号的活化。

在该研究中, 本课题组发现 VEGF-C 在败血症休克小鼠模型或患者血清中显著升高, 该结果表明 VEGF-C 或可作为人或动物败血症诊断的一种生物标记物。同时, 实验证实细胞表面受体分子 VEGFR-3 能够抑制巨噬细胞中 TLR4-NF- κ B 信号反应。不同于其他一些胞内负性调控分子, VEGFR-3 是一种巨噬细胞跨膜蛋白, 并且该受体分子具有酪氨酸激酶活性。VEGFR-3 的这种特性已经被应用于临床治疗, 例如利用 VEGFR-3 阻断性抗体或特异性抑制剂来治疗肿瘤 [28-29]。本研究结果揭示, 在巨噬细胞中, TLR4-MyD88-NF- κ B 信号能够促进 VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达, VEGF-C-VEGFR-3 信号形成负反馈性通路而一定程度地抑制 TLR4 活化的炎症反应 (图 1)。此外, 利用 VEGF-C 的治疗方法已经成功地应用于小鼠淋巴水肿模型 [30], 是否能通过 VEGF-C 激活 VEGFR-3 信号, 避免宿主发生严重炎症感染或败血症将是一项拟开展的重要课题。

同时, 研究过程中所用 *Chy* 或 *Vegfr3*^{TKmut} 小鼠具有与人类淋巴水肿患者相似的症状 [16]。而且,

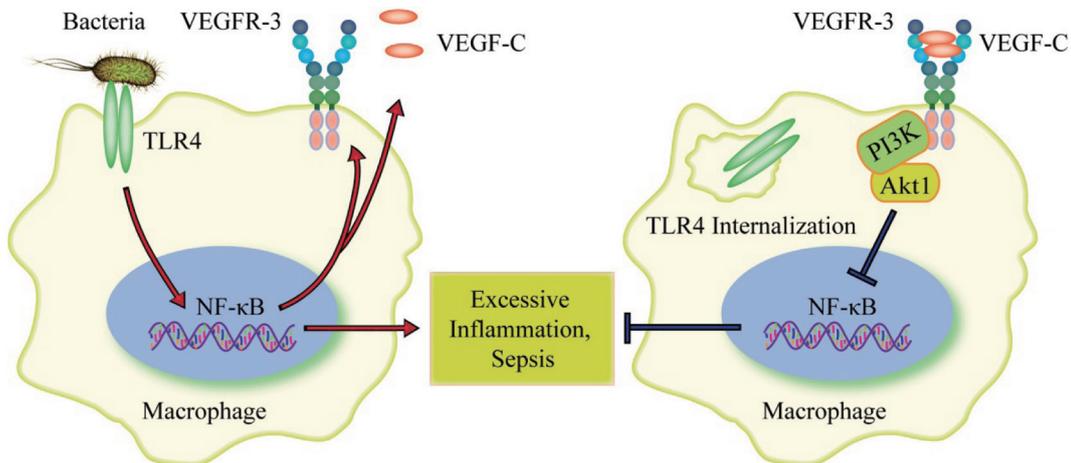


图1 VEGFR-3和VEGF-C反馈性抑制TLR4介导的炎症反应

Chy 小鼠对内毒素休克诱导更为敏感。这提示易发严重感染或败血症患者的可能伴有 *Vegfr3* 无义突变、*Vegfr3* 突变或片段缺失。

总之,本课题组的研究发现,巨噬细胞中 TLR 活化引起 VEGFR-3 和 VEGF-C 表达量显著上升,VEGFR-3 作为一种“自我反馈”的调节机制,下调 TLR4-NF- κ B 信号,防止巨噬细胞在细菌性感染时发生过度炎症反应(图 1)。本项研究不仅发现了 VEGFR-3-VEGF-C 能够作为严重感染的治疗靶点或疾病诊断标记物,还拓展了对利用 VEGFR-3-VEGF-C 治疗淋巴水肿的认识。但在临床利用 VEGFR-3 治疗败血症的路途还很漫长,最大的问题是解决如何特异性地激活 VEGFR-3 而不产生副作用,如外源性 VEGF-C 因子的注射会增加血管通透性等严重副作用。目前有一种特异性 VEGFR-3 改造型配体——VEGF-C156S,能够增强 VEGFR-3 激酶活性而对血管通透性影响较小,也许有望尝试其体内治疗效果。

后记

该课题从开始探索到作为封面文章在 *Immunity* 杂志发表用了三年半的时间,过程还是很辛苦的。但最难忘的是发现过程中的惊喜和乐趣。沉浸在科研带来的兴奋中时甚至觉得如果不吃饭将能拥有更多工作时间,也因此养成了每天五六个小时睡眠的习惯。炎症反应需要平衡,生活也需要调节。尽管我绝大多数时间都投入到了实验室中,但为了身体健康,也为了更好地保持科研兴趣,我养成了晨跑的习惯。早晨五点多钟起床,跑步 10 公里回到家,吃过早餐,八点半来到实验室,精神地开始一天 14 个多小时的实验工作。跑步带来的快乐也很好地平衡了我这几年单调的实验室生活。有意思的是,在文章正式接受前,我参加了上海国际马拉松,全程竟然跑出了 3 小时 11 分的成绩,可见习惯和坚持的力量。科研如同马拉松,路途是辛苦的,但如果真的热爱,一路也是很快乐的;坚持到了终点,更能体会到莫名的兴奋和满足感。马拉松有 42.195 公里的里程,踏上这段路程需要勇气;对生命科学奥秘的探索没有尽头,选择科研更需要毅力。跑马拉松要挥洒汗水,做科研甚至还需倾注心血。

致谢:衷心感谢我的导师王红艳研究员,感谢路瑶、马丽等合作者以及实验室全体成员的支持和帮助。感谢参与课题合作的上海生科院魏滨老师、苏州大学何玉龙老师、上海生科院李党生老师、中国疾控

中心段招军老师和安徽医科大学陈洁霞医生对本工作给予的悉心指导和大力支持。感谢上海生科院孙兵老师、同济大学戈宝学老师、南京大学杨中州老师、第二军医大学曹雪涛院士、上海生科院王纲老师和美国里海大学张晓辉老师等在课题进展过程中提供实验材料的帮助。

[参 考 文 献]

- [1] Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 2002, 111(7): 927-30
- [2] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2001, 1(2): 135-45
- [3] Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(3): 168-179
- [4] Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol*, 2012, 33(9): 449-58
- [5] Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 2013, 369(21): 2063
- [6] Harrison C. Sepsis: calming the cytokine storm. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(5): 360-1
- [7] Liew FY, Xu D, Brint EK, et al. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(6): 446-58
- [8] Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care*, 2010, 14(1): R15
- [9] Roger T, Froidevaux C, Le Roy D, et al. Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(7): 2348-52
- [10] Tidswell M, Tillis W, Larosa SP, et al. Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*, 2010, 38(1): 72-83
- [11] Opal SM, Laterre PF, Francois B, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA*, 2013, 309(11): 1154-62
- [12] Lohela M, Bry M, Tammela T, et al. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(2): 154-65
- [13] Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*, 1996, 122(12): 3829-37
- [14] Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, et al. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(5): 359-71
- [15] Zhang L, Zhou F, Han W, et al. VEGFR-3 ligand-binding and kinase activity are required for lymphangiogenesis but not for angiogenesis. *Cell Res*, 2010, 20(12): 1319-31
- [16] Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, et al. Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat Genet*, 2000, 25(2): 153-9

- [17] Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene*, 2000, 19(49): 5598-605
- [18] West AP, Koblansky AA, Ghosh S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22: 409-37
- [19] Sun SC, Ley SC. New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol*, 2008, 29(10): 469-78
- [20] Aksoy E, Taboubi S, Torres D, et al. The p110delta isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat Immunol*, 2012, 13(11): 1045-54
- [21] Guha M, Mackman N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem*, 2002, 277(35): 32124-32
- [22] Keck S, Freudenberg M, Huber M. Activation of murine macrophages via TLR2 and TLR4 is negatively regulated by a Lyn/PI3K module and promoted by SHIP1. *Journal of Immunology*, 2010, 184(10): 5809-18
- [23] Burke JE, Vadas O, Berndt A, et al. Dynamics of the phosphoinositide 3-kinase p110 δ interaction with p85 α and membranes reveals aspects of regulation distinct from p110 α . *Structure*, 2011, 19(8): 1127-37
- [24] Androulidaki A, Iliopoulos D, Arranz A, et al. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity*, 2009, 31(2): 220-31
- [25] Kinjyo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, et al. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity*, 2002, 17(5): 583-91
- [26] Mansell A, Smith R, Doyle SL, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol*, 2006, 7(2): 148-55
- [27] Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity*, 2002, 17(5): 677-87
- [28] Kirkin V, Thiele W, Baumann P, et al. Maz51, an indolinone that inhibits endothelial cell and tumor cell growth *in vitro*, suppresses tumor growth *in vitro*. *Int J Cancer*, 2004, 112(6): 986-93
- [29] Laakkonen P, Waltari M, Holopainen T, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res*, 2007, 67(2): 593-9
- [30] Tammela T, Saaristo A, Holopainen T, et al. Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat Med*, 2007, 13(12): 1458-66