

综述

炎症反应中Toll样受体对NHE蛋白家族的调节

车浩, 阮语嫣, 骆汤艳, 陈明敏*

绍兴文理学院医学院, 绍兴 312000

摘要: Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)在不同的天然免疫应答中可以识别和激活不同的病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 进而导致炎症。而钠氢交换体(Na^+/H^+ exchanger, NHE)不仅具有调节胞内pH值和细胞容积、维持腔体微环境、影响营养吸收的作用, 而且与细胞的增殖、迁移、凋亡相关。在炎症情况下, NHE的活性和膜蛋白表达都受到抑制。结肠上皮细胞TLR2激活后可通过MyD88非依赖性途径抑制NHE1活性, 其抑制作用的机制与Src的聚集和PI3Ks的磷酸化有关。长期脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)暴露可激活肠巨噬细胞TLR4, 通过MyD88依赖性途径(即TLR4/MyD88/NF- κ B通路)导致炎症发生, 并加速NHE1胞内降解, 从而抑制NHE1活性; 但短时间LPS暴露却提高NHE1活性。TLR5的激活可使NHE3活性增高。结肠炎患者和模型动物肠道巨噬细胞NHE3活性或/和表达量下降。在肾小管上皮细胞中, 基底侧LPS刺激通过激活TLR4/MyD88/MAPK/ERK信号通路抑制管腔侧NHE3的活性, 而管腔侧LPS刺激则激活TLR4/MyD88依赖性PI3K-AKT-mTOR信号通路, 引起基底侧NHE1活性抑制, 进而继发影响管腔侧NHE3功能。

关键词: Toll样受体; 钠氢交换体; 感染; 炎症性肠病

中图分类号: R363.2; R333.3; R334.1

The regulation of Na^+/H^+ exchangers by Toll-like receptors under inflammation

CHE Hao, RUAN Yu-Yan, LUO Tang-Yan, CHEN Ming-Min*

Medical School, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China

Abstract: Toll-like receptors (TLRs) can be recognized and activated by different pathogen associated molecular patterns (PAMPs), which induce innate immune response and inflammation of the body. Na^+/H^+ exchangers (NHEs) not only play roles in the regulation of cellular pH and cell volume, maintenance of the cavity microenvironment and nutrients absorption, but also are related to cell proliferation, migration and apoptosis. The activity and membrane protein expression of NHEs are inhibited under the inflammation condition. It has been shown that the activation of TLR2 in colon epithelial cells can inhibit the activity of NHE1 through MyD88 independent pathway, which involves the recruitment of Src and the phosphorylation of PI3Ks. Other studies on intestinal macrophage showed long-term LPS stimulation can induce TLR4 activation through MyD88-dependent pathway (TLR4/MyD88/NF- κ B) and induce inflammation and degeneration of intracellular NHE1, which leads to NHE1 activity inhibition. But short-term LPS exposure increases the activity and protein expression of NHE1. The activation of TLR5 increases the activity of NHE3. The activity and/or expression of NHE3 in intestinal macrophages in colitis patients and model animals were decreased. In renal tubular epithelial cells, basolateral LPS stimulation inhibits luminal NHE3 activation through TLR4/MyD88-dependent MAPK/ERK signaling pathway. And LPS stimulation on the lumen side activates TLR4/MyD88-dependent PI3K-AKT-mTOR signaling pathway, which results in the inhibition of NHE1 activity in basolateral side, and then affects the NHE3 function of the lumen side.

Key words: Toll-like receptors; Na^+/H^+ exchanger; infection; inflammatory bowel disease

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是最早被发现的模式识别受体, 迄今为止已经鉴定出 10 种人 TLRs 和 13 种小鼠 TLRs^[1,2], 每个 TLRs 都能识别来自各种病原微生物的病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 募集含有 Toll/白介素-1 受体 (Toll/IL-1 receptor, TIR) 结构域的衔接蛋白^[3], 启动下游的信号转导通路, 引起炎症细胞因子、趋化因子和抗菌肽的分泌, 激活中性粒细胞和巨噬细胞, 直接杀伤病原体^[4], 起到了人体防御功能的重要作用。

目前的研究表明 TLRs 主要分布于免疫细胞, 如单核/巨噬细胞、B 淋巴细胞、T 淋巴细胞和树突状细胞等。在肠道中, 其主要表达于固有层的巨噬细胞、树突状细胞、潘氏细胞和肠上皮细胞^[5], 且类型为 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5 和 TLR9 五种。TLRs 在肾小管上皮细胞和神经胶质细胞中也有表达, 且主要为 TLR2 和 TLR4^[1]。TLRs 的激活需要与相应的配体结合, 其配体按照来源可分为内源性配体和外源性配体, 其中内源性配体主要来自于宿主细胞, 包括透明质酸、硫酸肝素、纤维蛋白原、高迁移率族蛋白 1; 外源性配体主要来自于病原微生物, 包括脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS)、革兰氏阳性细菌的肽聚糖 (peptidoglycan, PGN)、脂磷壁酸 (lipoteichoic acid, LTA) 等^[1,2]。

TLRs 被激活后, 其胞内信号通路根据是否依赖髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 可分为 MyD88 依赖性与非依赖性。MyD88 依赖性通路: TLRs 的胞外结构域与炎症刺激因子结合, 而胞内结构域与 MyD88 的羧基端结合后, 可活化肿瘤坏死因子受体相关因子-6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor-6, TRAF-6), 并最终使人核因子- κ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- κ B, I κ B) 发生降解, 使结合在 I κ B 上的 NF- κ B 脱落进入细胞核^[6]。而 NF- κ B 是一种介导炎症的转录因子, 其功能主要涉及机体防御反应、组织损伤和应激、细胞分化和凋亡。此外, TRAF-6 也可以通过诱导丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 的磷酸化来激活 c-fos 和 c-jun 两种即刻早期基因^[7], 其表达产物 FOS 和 JUN 蛋白是两种转录因子, 可以与核内 DNA 结合从而调节细胞周期、分化和凋亡。现已知 MAPKs 有 3 个亚家族, 分别是 p38、ERK 和 JNK。MyD88 非依赖性信号通路: 已知 TLR4 可以通过 TRIF 相关接头分子 (TRIF-

related adaptor molecule, TRAM) 触发与 MyD88 无关的 TIR 结构域衔接蛋白 (Toll-receptor-associated activator of interferon, TRIF) 依赖性信号通路, TRIF 可以激活 NF- κ B 和干扰素调节因子-3 (interferon regulatory factor-3, IRF-3), 引起促炎细胞因子基因的转录和表达^[1-3]。另外, 酪氨酸激酶、蛋白激酶 K 也在其中发挥着十分重要的作用。

钠氢交换体 (Na^+/H^+ exchanger, NHE) 是一种跨膜转运糖蛋白家族, 属于阳离子/质子逆向转运蛋白超家族 (cation/proton antiporter superfamily, CPA), 根据其蛋白分子结构的不同, 可分为 NHE1~9 亚型^[8], 其中, NHE1 广泛表达于各种细胞表面, 但在肠道, 肾脏和脑组织的作用比较明显, NHE3 主要表达于胃、小肠、结肠和肾脏。NHE 不仅可以调节上皮细胞的基本功能, 包括细胞内 pH 值的控制、腹腔偏酸微环境的维持、细胞的体积和营养的吸收, 而且与细胞的增殖^[9]、迁移^[10]、凋亡^[11] 也有密切的联系, 对维持机体正常的功能运转有着重要的生物学意义。研究表明处于炎症条件下的 TLRs 与 NHE 在功能上密切相关。本文对肠上皮细胞、巨噬细胞和肾小管上皮细胞 TLRs 与 NHE 功能上的联系作一综述。

1 肠上皮细胞中 TLR2 与 NHE 的关系

结肠上皮细胞分布的 TLRs 有 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5 和 TLR9, 且主要为 TLR2 与 TLR4, 可识别源于细菌的 PAMPs, 如 LTA 等, 并接受其刺激, 诱发炎症。同样的, 分布于结肠的 NHEs 主要有 4 种, 为 NHE1、NHE2、NHE3 和 NHE8。其中, NHE1 存在于上皮细胞的基底膜上, 发挥调节细胞内 pH、电解质浓度和细胞体积的关键功能, NHE3 表达在结肠上皮的腔侧, 主要和阴离子交换体一起负责介导电中性 NaCl 吸收^[8]。

肠上皮细胞的功能异常已经被认为是各类肠道疾病发病的根本原因, TLR2 广泛分布于各类上皮细胞, 其异常激活将导致胞内各种功能蛋白 (例如 NHE1) 的活性发生变化, 导致疾病的发生。NHE1 主要分布在结肠上皮细胞基底侧, 主要作用是维持细胞体积大小和调节胞内、外的 pH, 甚至还可以影响细胞生长和分化^[12]。特别是在炎症反应的发展中, NHE1 介导的细胞内酸化起到了十分重要的作用。研究表明, 抑制 NHE1 可诱导细胞内酸化和降低 Na^+ 摄取^[13,14], 导致炎症的进一步发展, 而细胞

离子吸收功能受影响和胞内 pH 值发生变化可导致结肠重吸收水减少, 引起腹泻^[15]。腹泻也是炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的症状之一。

TLR2 是体内一种重要的 TLR, 其在上皮细胞和巨噬细胞中都有表达, 参与机体炎症的发生和调节。TLR2 的激活导致胞内 MyD88 的募集, 随后引起级联反应的激活, 诱导 NF- κ B 的转录, 引起大量炎症因子 (如 TNF- α 、IL-5、IL-6 和 IFN- γ) 分泌, 导致胞内 cAMP 的浓度升高, 激活了蛋白激酶系统, 最终导致 NHE1 活性降低 (图 1, 通路 A)。研究显示, LTA 刺激后人 T84 细胞 (CCL-248)、小鼠肺上皮 -12 细胞 (CRL-2110) 和大鼠肠上皮细胞系 -6 (CRL-1592) 中 TLR2 蛋白表达水平明显上调^[16]。

Cabral 等^[16] 使用 NF- κ B 抑制剂 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTTC) 处理人 T84 细胞后, 将其暴露于 LTA, 结果显示 TLR2 在被刺激期间对 NHE1 活性的抑制作用仍存在。这说明 LTA-TLR2 下游通路除了 NF- κ B 外, 还存在另一个与 NF- κ B 无关的信

号通路被触发进而抑制 NHE1 的活性。而 Byeon 等^[17] 研究显示, TLR2 的活化可以引起 Src 聚集和磷脂酰肌醇 3- 激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K) 磷酸化。Src 家族激酶涉及多种信号转导机制, 其功能主要与细胞的吞噬作用、炎症因子的产生和细胞迁移的诱导有关。在 TLRs 的信号通路中, Src 的激活通常是调节信号级联的早期步骤, 且在人滑膜成纤维细胞中, LTA 可以激活 TLR2, 导致 Src 磷酸化^[18], 而活化的 Src 增加了 c-jun 的核易位, 导致 IL-6 的分泌增加 (图 1- 通路 B), 而 IL-6 作为炎症因子可以抑制 NHE1 的活性。这是结肠上皮细胞上 TLRs 非 NF- κ B 依赖的调节通路的一种可能途径。

PI3Ks 已被证实是重要的 TLRs 激活组件, 在哺乳动物组织细胞中, 如人 T84 细胞、RAW-264 细胞均有表达。根据结构和功能的不同, PI3Ks 可分为 3 类, 其中 I 类 PI3Ks 可以被 TLRs 上的磷酸酪氨酸功能域 (pYxxM) 活化, 活化后的 PI3Ks 将

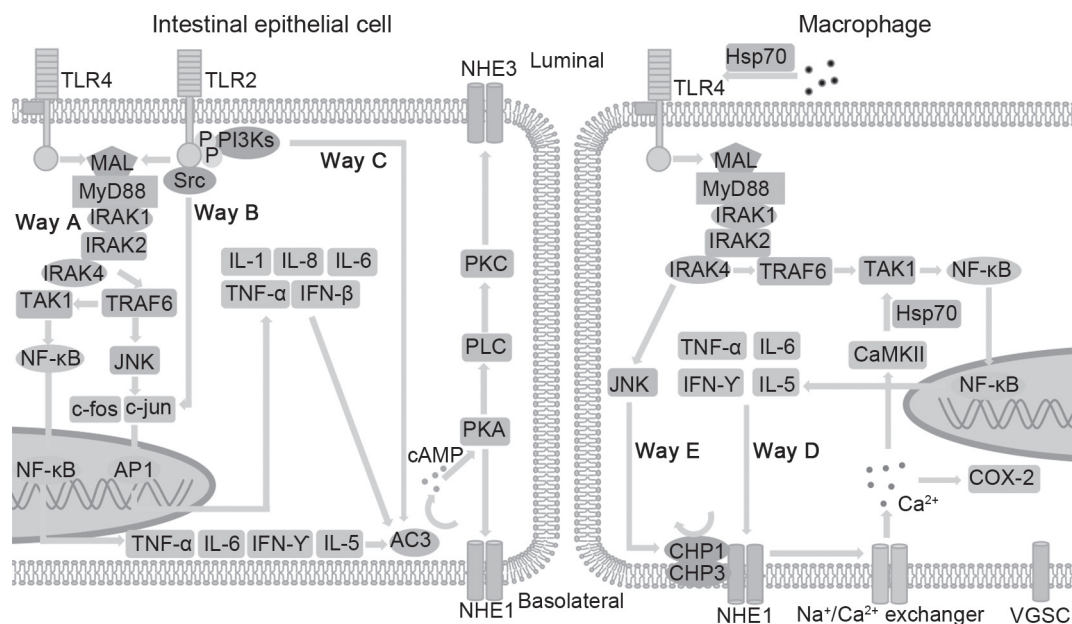


图 1. Toll样受体(TLRs)在结肠上皮细胞和巨噬细胞中对钠氢交换体(NHE)的调节

Fig. 1. The signaling pathways of the regulation of NHE by Toll-like receptors (TLRs) in colonic epithelial cells and macrophages. Way A: MyD88-dependent pathway; Way B: Src-mediated pathway; Way C: PI3Ks-mediated pathway; Way D: TLR4 altered the levels of cytosolic $[Na^+]$ and $[Ca^{2+}]$ through NHE1, thus affected the activation of CaMKII and induced inflammation; Way E: The expression of NHE is regulated by CHP1/3 through TLRs. NHE: Na^+/H^+ exchanger; MyD88: myeloid differentiation factor 88; TAK1, transforming growth factor β -activated kinase 1; IRAK, interleukin-1 receptor-associated kinase; TRAF-6, tumor necrosis factor receptor-associated factor-6; NF- κ B, nuclear factor κ B; JNK, c-jun N-terminal kinase; AP1, activator protein 1; PI3Ks: phosphatidylinositol-3 kinases; TNF- α , tumor necrosis factor α ; IFN, interferon; Hsp70, heat shock 70 kDa protein; CaMKII: Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II; MAL: MyD88 adapter-like; CHP: calcineurin homologous protein; COX-2, cyclooxygenase-2; VGSC, voltage-gated sodium channel.

磷脂酰肌醇-(4,5)-磷酸 (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate, PIP2) 转化为磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (phosphatidylinositol-3,4,5-diphosphate, PIP3), PIP3 结合并激活下游蛋白激酶, 如蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 和腺苷酸环化酶 3 (adenylate cyclase 3, AC3)(图 1- 通路 C), 从而调节细胞增殖、代谢和细胞因子产生^[16, 19]。TLR2、TLR4 和 TLR5 的胞内结构都具有能与 PI3Ks 结合的功能域, 且已有研究证明 PI3Ks 与 TLR2 之间确实存在相互作用^[20]。TLR2 介导的 NF- κ B 细胞信号通路中也需要 pYxxM 功能域的参与^[21], 这表明 PI3Ks 可聚集到 TLR2 的胞内结构域, 激活其蛋白酶系统从而抑制 NHE1 功能, 这可能也是一条与 NF- κ B 无关的潜在信号通路。

2 肠上皮细胞中TLR4与NHE1的关系

除了 TLR2/MyD88/NF- κ B 通路激活可抑制 NHE1 功能外, 在对 IBD 患者结肠上皮细胞的研究中, Siddique 等^[12] 研究还显示 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路与 NHE1 活性抑制和表达下调存在相关性。在 LPS 短期刺激条件下, TLR4 对 NHE1 的调节与 TLR2 类似, 都是通过 NF- κ B 来改变胞内 cAMP 的浓度, 进而抑制 NHE1 活性。而在长期的 LPS 刺激中, 除了与短期相关的通路外, 信号转导和转录活化因子 1 (signal transducers and activators of transcription 1, STAT1) 也参与到了调节过程中^[22], 且 TLR4 已经被认为是 IBD 的潜在治疗靶标^[12]。

首先, 在溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 患者活动期的结肠上皮组织 TLR4、NF- κ B 的表达明显高于正常组织^[12], 使用类固醇激素和免疫抑制剂硫唑嘌呤处理后, NF- κ B 的表达有显著下降, NHE1 的功能也得到了恢复^[23], 表明 UC 中 NHE1 蛋白功能的抑制与 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 表达异常有关联。

除了引起 NF- κ B 的表达增加外, TLR4 的活化还可以引起 Src 的聚集和活化。目前尚无证明 Src 可以直接与 TLR4 结合, 但已知和 TLR4 形成复合物的 CD14 可以与 Src 结合, 提示 Src 与 TLR4 之间可能存在相互作用。Cabral 等^[24] 在人 T84 细胞上使用两种酪氨酸激酶抑制剂 PP1 和 PP2 抑制 Src 磷酸化, 发现单磷酸脂质 A (monophosphoryl lipid A, MPLA) 导致的 NHE1 活性下降的现象消失, 表明 Src 的活化在 TLR4 抑制 NHE1 功能的信号通路中的重要性。另外, Cabral 等^[16] 发现同样使用 PP1 和

PP2 处理的人 T84 细胞, 其胞内蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)、磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 和蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的活性增强, 且作用效果与这三种激酶的激活剂相似。但上述 NHE1 活性下降或活性恢复并不伴随 NHE1 在细胞膜上的表达量变化。研究还显示, 利用 siRNA 来阻断 AC3 的表达可以消除 MPLA 短期处理对 NHE1 活性的抑制作用^[24]。已知 AC3 可以被 PI3Ks 磷酸化, 激活 PKA, 进而影响 NHE1 的活性^[16], 因此我们认为 PI3Ks 介导的 AC3 活化与 TLR4 调节 NHE1 活性之间存在相关性。同时, 这也提示 TLR4 可通过不同的细胞信号通路来抑制 NHE1 活性。但是对于 NHE3, 短期 MPLA 的刺激对其活性并没有影响, 长期 MPLA 刺激则可抑制活性。在 TLRs 介导的炎症反应中, NHE1 可能扮演着效应器的角色, 前者接受外来的刺激, 后者启动炎症的发生, 但是维持 NHE 活性是否可以阻断 TLR4 诱导炎症的作用, 现在还未有研究证实。

Sean 等^[25] 研究显示, 除了活性的下降, IBD 患者的结肠组织中 NHE1、NHE3 及其调节蛋白 NHERF1 表达也有明显的下降, 而 NHE2、NHE8、NHERF1 和 NHERF2 在 TNF- α 处理的 Caco-2bbe 细胞中的表达也受到了抑制^[26]。同样, UC 患者活动期结肠上皮 NHE1 活性下降, 蛋白表达也低于正常组^[23], 而使用类固醇激素和免疫抑制剂可以使 NHE1 活性和蛋白表达恢复^[12]。上述研究表明, NHE1 功能的下降不仅与活性减弱有关, 而且在慢性炎症中与表达下调也相关, 且 NHE1 表达下调与 TLR4 上调有关^[12]。

3 肠上皮细胞中TLR5与NHE1的关系

TLR5 主要接受细菌鞭毛蛋白的刺激, 继而通过细胞内信号通路来发挥多方面功能。而在肠上皮细胞中, TLR5 有助于防止微生物感染、组织损伤、放射性肠炎和结肠癌等的发生, TLR5 基因敲除的小鼠可出现肠道功能紊乱、菌群失调、自发性结肠炎等^[27]。在 UC 患者和葡聚糖硫酸钠诱导 (dextran sodium sulfate, DSS) 结肠炎小鼠模型中, 与 TLR2 和 TLR4 相反, TLR5 的表达却是下降的^[28], 进一步的实验研究显示炎症因子 (如 IFN- γ) 可以抑制 TLR5 表达^[29]。

在人 T84 细胞, 人 Caco-2 细胞、小鼠 MLE-12 细胞和大鼠 IEC-6 细胞上, 短期的鞭毛蛋白刺激可

以抑制 NHE1 活性, 而对 NHE3 没有影响, 两者的表达都没有受到影响; 在长期的鞭毛蛋白刺激下, NHE1 活性和表达变化与短期刺激下一致, 而 NHE3 的活性和表达却是增加的^[24]。关于 TLR5 对 NHE1 的功能抑制, 其作用的信号通路与肠上皮细胞中的 TLR2/4 类似, 都与胞内 AC3、PKA、PKC、PLC 的激活有关, 而对于 NHE3, 可以确定的是只有 AC3 和 PKA 参与其中。NHE3 活性和表达的增加是 TLR5 在肠道功能保护作用的重要机制。作为表达在肠上皮细胞腔侧重要的离子转运体, NHE3 对于机体 Na^+ 和 HCO_3^- 的吸收具有重要的作用, 其功能异常在脓毒血症引起的肾功能不全中已有明确定论, 而在肠道疾病方面的影响还未完全阐明。

4 巨噬细胞中TLR4与NHE1的关系

巨噬细胞是机体慢性炎症的主要效应细胞, 现在越来越多的证据显示巨噬细胞的异常激活可能参与疾病的发病过程。而在已知的人 10 种 TLRs 中, 除 TLR10 以外, 其他均表达于巨噬细胞^[2]。TLRs 接受来自细胞外的信号分子, 诱导巨噬细胞的活化、增生, 最终导致慢性炎症的发生。Campos 等^[30] 研究显示, IBD 患者外周血单核细胞 TLR2 和 TLR4 表达上调, 提示肠道慢性炎症的发病可能与单核-巨噬细胞的功能异常有关。

LPS 可通过 TLR4 活化巨噬细胞, 该作用可被阿米洛利 (一种 NHE1 抑制剂) 阻断, 且阿米洛利可减轻 LPS 诱导的炎症大鼠模型的血浆渗漏和白细胞浸润^[31]。LPS 短期刺激的巨噬细胞的 NHE1 活性是增加的^[32], 之前的研究也显示 NHE1 活性的下降可以抑制 JNK 和 NF- κ B 的活化^[31, 33], 阻止下游炎症因子的释放与激活, 而 JNK 和 NF- κ B 正是 TLR4 炎症通路的重要组成部分, 这说明巨噬细胞中 NHE1 的激活对炎症的发生是有促进作用的。NHE1 活性的增加, 引起胞内 Na^+ 浓度的上升, 激活了 NHE, 使胞内的 Ca^{2+} 浓度也逐渐上升, 最终导致花生四烯酸等炎症物质的释放和环氧合酶 (cyclooxygenase-2, COX-2) 蛋白水平的上调, 这是现在普遍公认的 NHE1 活性增加引起炎症的一种机制 (图 1-通路 D)。但 Kamachi 等^[32] 研究显示, 阿米洛利抑制 LPS 诱导的 COX-2 蛋白水平的增加并不是通过影响 COX-2 mRNA 水平来实现的, 表明巨噬细胞中 COX-2 mRNA 转录虽然主要受 MAPKs 和 NF- κ B 的活化调控, 但 NHE1 抑制剂并没有影响它们。由

此可见, 炎症早期 NHE1 活性增加可以上调 COX-2 蛋白水平, 其作用是发生在转录后, 而并不是增加转录, 其具体机制还未明确, 可能是调节蛋白质的翻译阶段, 影响了分子的稳定性。

炎症因子与 NHE1 的相互作用与炎症的发生和持续存在联系。其中, 热休克蛋白 70 (heatshock-protein 70, Hsp70) 可和 NHE1 相互作用, 通过 Ca^{2+} /钙调节素依赖性蛋白激酶 II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII)/ 转化生长因子 β 激活激酶 1 (transforming growth factor β -activated kinase 1, TAK1) 信号通路促进 LPS 诱导的 NF- κ B 核易位和的磷酸化以及 I κ B 激酶 β (inhibit κ B kinase β , IKK β) 的降解, 最终导致慢性炎症的发生^[33]。除了和 Ca^{2+} 的相互作用外, Hsp70 也与 LPS 在细胞膜上与 TLR4 的结合有关^[34]。

在神经源性巨噬细胞 (小胶质细胞) 中, LPS 介导的 NHE1 活性和表达的增加还与电压门控钠通道 (voltage-gated sodium channel, VGSC) 的活性有关。在暴露于 LPS 的 BV-2 细胞 (C57Bl/6) 中 VGSC 与 NHE1 活性明显增加, 而河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX, 一种 VGSC 抑制剂) 可以阻止这一现象的发生^[35, 36]。研究显示, 在 LPS 持续 24 h 刺激的小胶质细胞中, 胞内 Na^+ 浓度的增高在早期主要是由 VGSC 来介导的, 但一段时间后其活性下降, 而 NHE1 的活性逐渐升高, 继而代替 VGSC 介导胞内 Na^+ 浓度的升高, 最终导致小胶质细胞被活化, 产生炎症反应^[35]。可见, VGSC 的激活是 NHE1 活性增高的可能前提条件。另外, 在小鼠树突状细胞中, 雷帕霉素引起的 NADPH 氧化酶活性升高也可导致 LPS 引起的 NHE1 活性增高现象消失^[37]。

同样, NHE1 在巨噬细胞中的表达也受到 TLR4 的影响。Takakuwa 等^[38] 研究显示, LPS 长期 (24 h 以上) 刺激下, 由于胞内蛋白分解增加, NHE1 在细胞膜上的表达量下降, 且下降程度与 LPS 刺激浓度有关, 但此时 NHE3 的表达量并未有明显变化。NHE1 蛋白在胞膜上表达的下降与其降解增加有关, 而钙调神经磷酸酶同源蛋白 (calcineurin homologous protein, CHP) 在这过程中发挥了重要作用。CHP 是一种 Ca^{2+} 结合蛋白亚家族, 其参与细胞膜上 NHE1 功能的调节, 载体囊泡的运输和细胞核内的基因转录, 根据分子结构可分为 CHP1、CHP2 和 CHP3, 均表达于巨噬细胞。CHP1 可以与 NHE1 的胞内亲水区结合^[39], 当 NHE1 的胞内结构域被破坏而无法

与 CHP1 结合时, 其在胞内的稳定性明显下降^[40]。研究显示, 在 CHP1 缺陷细胞中 NHE1 对 Na⁺ 的摄取活性只有野生型细胞的 20%, 不仅 NHE1 活性下降, 其蛋白表达量也降低, 但 mRNA 表达水平没有改变^[41]。另外, CHP3 也被证实与 CHP1 一样, 可协助 NHE1 在细胞膜上锚定^[42]。

泛素-蛋白酶体作为细胞蛋白质分解代谢的重要系统, 被证实参与了 CHP1 缺陷细胞中 NHE1 功能和蛋白表达的下调^[43]。目前研究显示, CHP1 可帮助 NHE1 在细胞膜上的锚定和活性的保持, 并保护其免于泛素-蛋白酶体降解系统的破坏^[42]。Taka-kuwa 等用 LPS 长期刺激 RAW-264 细胞, 发现 NHE1 在细胞膜上的表达减少, 同时 CHP1 mRNA 和蛋白水平也明显下降, 而 JNK 抑制剂和地塞米松可以恢复 NHE1 在细胞膜上的表达^[38]。这些研究结果表明 LPS 通过 JNK 介导的地塞米松相关途径导致 CHP1 的表达减少。因此, 这可能是 TLRs 刺激 NHE1 泛素化增强的一种机制(图 1-通路 E)。不过, 当用蛋白酶体抑制剂抑制该降解途径时, NHE1 总蛋白减少的现象并没有完全被逆转^[43], 说明除了蛋白酶体降解系统的影响之外, NHE1 的减少还可能是因为受到胞内其他蛋白质降解系统的影响, 或者 NHE1 蛋白合成的下降导致其在细胞膜上的表达量降低。

综上, 在肠道的不同细胞和炎症的不同阶段, TLRs 与 NHE1/3 之间的关系是不一样的。在肠上皮这类工作细胞中, TLR2/4 的激活可以引起 NHE1 活性的下降, 而 TLR5 的激活可以使 NHE3 的活性增高, 而对于巨噬细胞这类慢性炎症细胞, TLR2/4 的激活却增强 NHE1 的活性, 诱导炎症的发生, 但长期的刺激又会引起其表达的下降。

Sullivan 等^[25] 研究显示, 在 IBD 患者和 DSS 诱导的结肠炎模型小鼠结肠活检样本中 NHE3 mRNA 和蛋白表达量都减少。除此之外, 其他结肠炎模型小鼠, 包括 IL-2 表达缺陷模型小鼠和 IL-10 表达缺陷模型小鼠 NHE3 活性或/和表达量减少^[25, 44]。另外, Yeruva 等对 UC 患者的活检样本进行检测, 发现患者非炎症区域 NHE3 活性下降, 但 mRNA 和蛋白表达量不变; 而非炎症区域 NHE3 活性及其表达量都不变^[44]。由此可见, NHE3 活性跟炎症程度有关。但不能忽视不同基因背景 NHE3 表达缺陷模型小鼠肠道炎症发展程度和炎症主要位置有所不同^[45-47], 这也从侧面解释了不同地域 IBD 患者的 NHE3 与炎

症程度关系研究结果存在的 inconsistency。另一方面, NHE3 表达缺陷模型小鼠对 DSS 诱导更敏感, 且其肠道微生物组成和肠上皮细胞紧密连接都发生改变^[48]。NHE3/IL-10 双表达缺陷模型小鼠肠上皮细胞凋亡增加且更易受肠道微生物影响^[45], 提示 NHE3 活性抑制可引起肠道以上这些变化并进一步加重炎症, 表明 NHE3 活性抑制是一种促炎因素。

相反, 还有研究通过使用 NHEs 非选择性抑制剂(阿米洛利)或其它选择性抑制剂(包括 NHE1 抑制剂 EIPA 和 MIA)处理肠道上皮细胞或巨噬细胞, 结果显示肠道炎症的发展减缓, 这是由于这些 NHEs 抑制剂还阻断了炎症发生过程中 NF- κ B 和 MAPK 活化以及 MIP-2/IL-8 的生成^[49]。还有研究显示一定浓度的锂可以引起肠道上皮细胞炎症反应, 但不能引起单核细胞和巨噬细胞的炎症反应^[50]。锂被证实在可以抑制多个系统中的 NHEs 活性^[51], 而单核细胞和巨噬细胞中仅表达 NHE1^[52], 如上所述 NHE1 抑制可缓解炎症, 这可能是锂不能引起单核细胞和巨噬细胞炎症反应的原因。但也有研究表明锂可活化 NHEs 功能^[53], 这可能与不同 NHEs 亚型有关。肠道上皮细胞表达多种 NHEs, 锂的使用导致 NHEs 活性增强, 进而活化 NF- κ B 和 MAPK, 引发炎症反应^[50]。以上研究中虽然 NHEs 亚型并不明确, 但 NHE1 可能性较高, 因其活性受抑可抑制炎症的发展, 与 NHE3 的作用相反。Li 等^[54] 研究显示, NHE1 抑制剂卡立泊来德可抑制烧伤大鼠脓毒症的发生, 表明 NHE1 对于早期炎症的发生是有促进作用的, 但为何卡立泊来德只抑制了免疫细胞的激活, 而对上皮细胞的功能没有产生影响, 仍有待进一步研究。

5 肾小管上皮细胞中 TLRs 与 NHE 蛋白的关系

肾功能不全可由许多病因引起, 最常见的是细菌感染, 脓毒症和内毒素血症亦是其中最多的两类。感染引起的全身炎症反应综合征可导致肾小管功能缺陷, 其致病机理主要与上皮细胞电解质平衡功能有关, 包括尿浓缩障碍、排钠、葡萄糖增加、低血压以及全身性代谢性酸中毒引起的多器官功能障碍。而在脓毒症引起的肾小管功能障碍过程中, 肾小管上皮细胞普遍存在 HCO₃⁻ 转运障碍的现象^[55, 56], 而 NHE3 在肾小管上皮细胞对 HCO₃⁻ 的转运中发挥着重要的作用^[57, 58]。LPS 和革兰氏阳性细菌分子(LTA, PGN)可以直接通过激活 TLRs, 进而激活下

游通路一系列的炎症反应来损害位于胞膜上的转运体,从而影响了肾小管上皮细胞的离子转运功能^[59-61]。根据细菌入侵的途径,可以分为内源性和外源性两种,前者LPS等毒素主要影响细胞基底侧,而后者直接影响的是腔侧上皮细胞。

Watts等^[59]研究显示,MAPKs/ERK抑制剂U0126和PD98059可消除经基底侧LPS诱导的HCO₃⁻吸收功能障碍;LPS刺激细胞基底侧条件下,对比MyD88^{-/-}型和对照组小鼠肾小管髓祥升支粗段的上皮细胞(MTAL细胞),结果显示对照组小鼠中HCO₃⁻的吸收明显受抑,而MyD88^{-/-}型细胞的HCO₃⁻吸收并无明显变化^[59]。可见,MyD88是基底侧LPS对HCO₃⁻吸收的抑制作用必不可少的。此外,在LPS刺激前后,MyD88^{-/-}型小鼠MTAL细胞内ERK的表达并没有变化,而对照组却有明显的增加,提示LPS通过TLR4和衔接蛋白MyD88介导激活ERK,进而降低NHE3的活性(图2-通路A),从而使细胞转运的HCO₃⁻减少,这可能是内源性感染导致肾小管功能障碍的一种机制。当然,在细菌感染引起的慢性炎症中,NHE3表达也可能下降,研

究显示在腹腔注射LPS 6~12 h后,小鼠和大鼠的肾小管上皮细胞中NHE3的表达都发生了明显下降^[62,63]。

而对于外源性感染,LPS从腔侧刺激也导致HCO₃⁻的吸收下降,但这并不受到ERK抑制剂的影响,所以HCO₃⁻转运还可能受到其他通路的调节。Abu Jawdeh等^[60]研究显示,在细胞凋亡过程中PI3Ks激活可以对NHE1产生抑制,从而导致细胞内酸化直至最后死亡。Watts等^[61]发现PI3K或其效应物AKT和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的抑制剂可以消除腔侧LPS对HCO₃⁻吸收的影响。可见,HCO₃⁻的吸收下降与PI3K下游信号通路的激活密切相关。mTOR是位于PI3Ks/AKT下游的一种重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其功能主要是活化核糖体激酶,促进细胞增殖。mTOR激活引起NHE1抑制可能是通过抑制核糖体蛋白S6激酶(mTORC1的主要下游效应物)的激活介导的^[64]。核糖体蛋白S6激酶是丝氨酸/苏氨酸激酶的AGC亚家族的成员,其家族包括常见的几种上皮转运蛋白调节剂,如蛋白激酶A、C和G等^[65]。使用LPS刺激TLR4^{-/-}型和MyD88^{-/-}型小鼠的MTAL细胞后,细胞AKT活性没有明显变化,而对照组却表现出了活性增高。由此可见,腔侧LPS是通过TLR4/MyD88依赖的PI3K-AKT-mTOR信号通路来抑制基底侧NHE1活性进而抑制腔侧NHE3,从而导致HCO₃⁻吸收障碍(图2-通路B)。

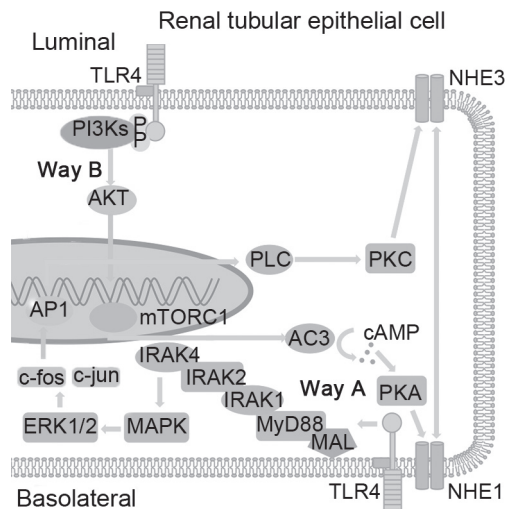


图 2. Toll样受体(TLRs)介导的肾小管上皮细胞炎症

Fig. 2. Toll-like receptors (TLRs)-mediated inflammation in renal tubular epithelial cells. Way A: Basal exposure activates TLRs-MyD88-MAPK-ERK-AC-PAK-NHE3-NHE1 pathway; Way B: Luminal exposure activates TLRs-PI3Ks-AKT-mTOR-NHE1-NHE3 pathway. TLRs: Toll-like receptors; MyD88: myeloid differentiation factor 88; MAPK: mitogen-activated protein kinase; NHE: Na⁺/H⁺ exchanger; PI3Ks: phosphatidylinositol-3 kinases; mTOR: mammalian target of rapamycin; AP1, activator protein 1; PLC, phospholipase C; IRAK, interleukin-1 receptor-associated kinase; MAL: MyD88 adapter-like.

6 总结

在肠道上皮细胞、肾小管上皮细胞和巨噬细胞中,都已发现TLR家族中的TLR2和TLR4与NHE蛋白家族中的NHE1和NHE3存在密切的关联。现阶段的研究表明,NHE可能是位于TLR调节通路下游的一个调节蛋白,其活性和表达的改变可以导致细胞功能的异常和炎症的发生,最终对组织和器官的正常生理产生一系列的影响。如在肠上皮细胞中TLRs被激活后可以通过MyD88依赖性途径诱导炎症因子的分泌来降低NHE的活性,但在巨噬细胞中TLRs的激活可以增强NHE活性进而诱导炎症的发生,而长期持续的刺激最终将导致NHE的表达下降而影响其功能。同时,在肾小管上皮细胞中也存在类似通路,且从腔侧和基底侧刺激引起的下游路径是不同的。短期TLRs的激活在导致上皮细胞的功能障碍的同时还可以引起炎症细胞

的浸润, 而长期的刺激对于工作细胞和免疫细胞中 NHE 却是抑制的, 在此过程中, 炎症因子的激活、胞内 Ca^{2+} 浓度的升高和 pH 值的下降都对炎症的发生和发展起到十分重要的作用。当然, NHE 到底能否作为药物抑制细胞炎症和治疗相关疾病的靶点, 现阶段只是在动物实验中得到验证, 具体可行性还需要临床上的评价和检验。

* * *

致谢: 本综述受国家自然科学基金 (No. 31500938)、教育部留学回国人员启动基金 (教外司留 2012 年第 940 号) 和浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目 (No. 2017R428028) 资助。

参考文献

- 1 Ospelt C, Gay S. TLRs and chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(4): 495–505.
- 2 Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 2009; 420: 1–16.
- 3 Beutler B. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev* 2009; 227(1): 248–263.
- 4 Buchholz BM, Bauer AJ. Membrane TLR signaling mechanisms in the gastrointestinal tract during sepsis. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22(3): 232–245.
- 5 Dlugosz A, Zakikhany K, Acevedo N, D'Amato M, Lindberg G. Increased expression of Toll-like receptors 4, 5 and 9 in small bowel mucosa from patients with irritable bowel syndrome. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 9624702–9624708.
- 6 Lin YC, Huang DY, Chu CL, Lin YL, Lin WW. The tyrosine kinase Syk differentially regulates Toll-like receptor signaling downstream of the adaptor molecules TRAF6 and TRAF3. *Sci Signal* 2013; 6(289): ra71.
- 7 Krzyzowska M, Swiatek W, Fijalkowska B, Niemialowski M, Schollenberger A. The role of MAP kinases in immune response. *Adv Cell Biol* 2010; 2(3): 125–138.
- 8 Alexander RT, Dimke H, Cordat E. Proximal tubular NHEs: sodium, protons and calcium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 305(3): F229–F236.
- 9 Walker J, Udem C, Yun X, Julie Lade, Jiang H, Larissa A. Role of Rho kinase and Na^+/H^+ exchange in hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and migration. *Physiol Rep* 2016; 4(6): 12702–12715.
- 10 Rigracciolo DC, Scarpelli A, Lappano R, Pisano A, Santolla MF. GPER is involved in the stimulatory effects of aldosterone in breast cancer cells and breast tumor-derived endothelial cells. *Oncotarget* 2016; 7(1): 94–111.
- 11 Zhao Y, Cui G, Zhang N, Z Liu, W Sun, Q Peng. Lipopolysaccharide induces endothelial cell apoptosis via activation of Na^+/H^+ exchanger 1 and calpain-dependent degradation of Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 427(1): 125–132.
- 12 Siddique I, Khan I. Mechanism of regulation of Na^+/H^+ exchanger in inflammatory bowel disease: Role of TLR4 signaling mechanism. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 1656–1662.
- 13 Calinescu O, Paulino C, Kühlbrandt W, Fendler K. Keeping it simple, transport mechanism and pH regulation in Na^+/H^+ exchangers. *J Biol Chem* 2014; 289(19): 13168–13176.
- 14 Jenkins EC Jr, Debnath S, Gundry S, Gundry S, Uyar U. Intracellular pH regulation by Na^+/H^+ exchanger-1 (NHE1) is required for growth factor-induced mammary branching morphogenesis. *Dev Biol* 2012; 365(1): 71–81.
- 15 Arthur K, Sebastian Z, Richard S. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 573–621.
- 16 Cabral JM, Soares-da-Silva P, Magro F. Short- and long-term regulation of intestinal Na^+/H^+ exchange activity associated with tlr2 receptor activation is independent of nuclear factor-kappa B signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 346: 453–464.
- 17 Byeon SE, Young YS, Jueun Oh, Yoo BC, Hong S, Cho JY. The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm* 2012; 512926–512943.
- 18 Tang CH, Hsu CJ, Yang WH, Fong YC. Lipoteichoic acid enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, PKCdelta and c-Src dependent pathways. *Biochem Pharmacol* 2010; 79(11): 1648–1657.
- 19 Koyasu S. The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 313–319.
- 20 Jarin C, Alice P. TLR2 induced calpain activity modulates epithelial junctions to facilitate PMN transmigration. *Cell Host Microbe* 2009; 5(1): 47–58.
- 21 Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, Godowski PJ, Ulevitch RJ, Knaus UG. Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol* 2000; 1(6): 533–540.
- 22 Magro F, Fraga S, Soares-da-Silva P. Signaling of short- and long-term regulation of intestinal epithelial type 1 Na^+/H^+ exchanger by interferon-gamma. *Br J Pharmacol* 2005; 145: 93–103.
- 23 Khan I, Siddique I, Al-Awadi FM, Mohan K. Role of Na^+/H^+ exchanger isoform-1 in human inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol* 2003; 17(1): 31–36.
- 24 Cabral JM, Grácio D, Soares-da-Silva P, Magro F. Short- and long-term regulation of intestinal Na^+/H^+ exchange by toll-like receptors TLR4 and TLR5. *Am J Physiol Gastroin-*

- test Liver Physiol 2015; 309(8): G703–G715.
- 25 Sullivan S, Alex P, Dassopoulos T, Zachos NC, Iacobuzio-Donahue C, Donowitz M, Brant SR, Cuffari C, Harris ML, Datta LW, Conklin L, Chen Y, Li X. Down-regulation of sodium transporters and NHERF proteins in IBD patients and mouse colitis models: Potential contributors to IBD-associated diarrhea. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 15(2): 261–274.
- 26 Amin MR, Orenuga T, Tyagi S, Dudeja PK, Ramaswamy K, Jaleh M. Tumor necrosis factor- α represses the expression of NHE2 through NF- κ B activation in intestinal epithelial cell model, C2BBel. *Inflamm Bowel Dis* 2015; 17(3): 720–731.
- 27 Vijay-Kumar M, Aitken JD, Sanders CJ, Frias A, Sloane VM, Xu J, Neish AS, Rojas M, Gewirtz AT. Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J Immunol* 2008; 180(12): 8280–8285.
- 28 Stanislawowski M, Wierzbicki PM, Golab A, Adrych K, Kartanowicz D, Wypych J, Godlewski J, Smoczynski M, Kmiec Z. Decreased Toll-like receptor-5 expression in the mucosa of ulcerative colitis patients. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60 Suppl 4: 71–75.
- 29 O'Mahony DS, Pham U, Iyer R, Hawn TR, Liles WC. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci* 2008; 5(1): 1–8.
- 30 Campos N, Magro F, Castro AR, Cabral J, Rodrigues P, Silva R, Appelberg R, Rodrigues S, Lopes S, Macedo G, Sarmiento A. Macrophages from IBD patients exhibit defective tumour necrosis factor- α secretion but otherwise normal or augmented pro-inflammatory responses to infection. *Immunobiology* 2011; 216(8): 961–970.
- 31 Kamachi F, Yanai M, Ban HS, Ishihara K, Hong J, Ohuchi K, Hirasawa N. Involvement of Na⁺/H⁺ exchangers in induction of cyclooxygenase-2 by vacuolar-type (H⁺)-ATPase inhibitors in RAW 264 cells. *FEBS Lett* 2007; 581 (24): 4633–4638.
- 32 Kamachi F, Ban HS, Hirasawa N, Ohuchi K. Inhibition of lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production and inflammation by the Na⁺/H⁺ exchanger inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 321(1): 345–352.
- 33 Huang C, Lu X, Wang J, Tong L, Jiang B, Zhang W. Inhibition of endogenous heat shock protein 70 attenuates inducible nitric oxide synthase induction via disruption of heat shock protein 70/Na⁺/H⁺ exchanger 1-Ca²⁺-calcium-calmodulin-dependent protein kinase II/transforming growth factor β -activated kinase 1-nuclear factor- κ B signals in BV-2 microglia. *J Neurosci Res* 2015; 93(8): 1192–1202.
- 34 Triantafilou M, Triantafilou K. Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochem Soc Trans* 2004; 32(4): 636–639.
- 35 Hossain MM, Sonsalla PK, Richardson JR. Coordinated role of voltage-gated sodium channels and the Na⁺/H⁺ exchanger in sustaining microglial activation during inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 273(2): 355–364.
- 36 Liu Y, Kintner DB, Chanana V, Algharabli J, Chen X, Gao Y, Chen J, Ferrazzano P, Olson JK, Sun D. Activation of microglia depends on Na⁺/H⁺ exchange-mediated H⁺ homeostasis. *J Neurosci* 2010; 30(45): 15210–15220.
- 37 Rotte A, Pasham V, Bhandaru M, Bobbala D, Zelenak C, Lang F. Rapamycin sensitive ROS formation and Na⁺/H⁺ exchanger activity in dendritic cells. *Cell Physiol Biochem* 2012; 29(3–4): 543–550.
- 38 Takakuwa S, Mizuno N, Takano T, Asakawa S, Sato T, Hiratsuka M, Hirasawa N. Down-regulation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 by Toll-like receptor stimulation in macrophages. *Immunobiology* 2017; 222: 176–182.
- 39 Li QH (李庆华), Pang TX, Han ZC. CHP regulated NHE1 activity affects cell growth and death. *Chin Biotechnol (中国生物工程杂志)* 2005; 25(10): 63–67 (in Chinese with English abstract).
- 40 Pang T, Su X, Wakabayashi S, Shigekawa M. Calcineurin homologous protein as an essential cofactor for Na⁺/H⁺ exchangers. *J Biol Chem* 2001; 276 (20): 17367–17372.
- 41 Matsushita M, Sano Y, Yokoyama S, Takai T, Inoue H, Mitsui K, Todo K, Ohmori H, Kanazawa H. Loss of calcineurin homologous protein-1 in chicken B lymphoma DT40 cells destabilizes Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C246–C254.
- 42 Zaun HC, Shrier A, Orłowski J. N-myristoylation and Ca²⁺ binding of calcineurin B homologous protein CHP3 are required to enhance Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 half-life and activity at the plasma membrane. *J Biol Chem* 2012; 287 (44): 36883–36895.
- 43 Simonin A, Fuster D. Nedd4-1 and β -arrestin-1 are key regulators of Na⁺/H⁺ exchanger 1 ubiquitylation, endocytosis, and function. *J Biol Chem* 2010; 285(49): 38293–303.
- 44 Yeruva S, Farkas K, Hubricht J, Rode K, Riederer B, Bachmann O, Cinar A, Rakonczay Z, Molnár T, Nagy F, Wedemeyer J, Manns M, Raddatz D, Musch MW, Chang EB, Hegyi P, Seidler U. Preserved Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 expression and localization, but decreased NHE3 function indicate regulatory sodium transport defect in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16(7): 1149–1161.
- 45 Larmonier CB, Laubitz D, Thurston RD, Bucknam AL, Hill FM, Midura-Kiela M, Ramalingam R, Kiela PR, Ghishan FK. NHE3 modulates the severity of colitis in IL-10-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300(6): G998–G1009.

- 46 Kiela PR, Laubitz D, Larmonier CB, Midura-Kiela MT, Lipko MA, Janikashvili N, Bai A, Thurston R, Ghishan FK. Changes in mucosal homeostasis predispose NHE3 knockout mice to increased susceptibility to DSS-induced epithelial injury. *Gastroenterology* 2009; 137(3): 965–975.
- 47 Laubitz D, Larmonier CB, Bai A, Midura-Kiela MT, Lipko MA, Thurston RD, Kiela PR, Ghishan FK. Colonic gene expression profile in NHE3-deficient mice: evidence for spontaneous distal colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295(1): G63–G77.
- 48 Larmonier CB, Laubitz D, Hill FM, Shehab KW, Lipinski L, Midura-Kiela MT, McFadden RM, Ramalingam R, Hassan KA, Golebiewski M, Besselsen DG, Ghishan FK, Kiela PR. Reduced colonic microbial diversity is associated with colitis in NHE3-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013; 305(10): G667–G677.
- 49 Németh ZH, Deitch EA, Szabó C, Mabley JG, Pacher P, Fekete Z, Hauser CJ, Haskó G. Na^+/H^+ exchanger blockade inhibits enterocyte inflammatory response and protects against colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283(1): G122–G132.
- 50 Németh ZH, Deitch EA, Szabó C, Fekete Z, Hauser CJ, Haskó G. Lithium induces NF-kappa B activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277(10): 7713–7719.
- 51 Aronson PS. Kinetic properties of the plasma membrane Na^+/H^+ exchanger. *Annu Rev Physiol* 1985; 47(1): 545–560.
- 52 Demaurex N, Orłowski J, Brisseau G, Woodside M, Grinstein S. The mammalian Na^+/H^+ antiporters NHE1, NHE2, and NHE3 are electroneutral and voltage independent, but can couple to an H^+ conductance. *J Gen Physiol* 1995; 106(1): 85–111.
- 53 Kobayashi Y, Pang T, Iwamoto T, Wakabayashi S, Shigekawa M. Lithium activates mammalian Na^+/H^+ exchangers: isoform specificity and inhibition by genistein. *Pflügers Arch* 2000; 439(4): 455–462.
- 54 Li WP (李文鹏), Zhao GY, Yang XK. Effects of Na^+/H^+ exchanger 1 inhibitor on intestinal injury of rats with burn sepsis and the mechanism. *Chin J Burns (中华烧伤杂志)* 2017; 33(6): 349–354 (in Chinese with English abstract).
- 55 Good DW, George T, Watts BA 3rd. Lipopolysaccharide directly alters renal tubule transport through distinct TLR4-dependent pathways in basolateral and apical membranes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297(4): F866–F874.
- 56 Good DW, George T, Watts BA 3rd. Toll-like receptor 2 mediates inhibition of HCO_3^- absorption by bacterial lipoprotein in medullary thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299(3): F536–F544.
- 57 Bobulescu IA, Moe OW. Luminal Na^+/H^+ exchange in the proximal tubule. *Pflügers Arch* 2009; 458(1): 5–21.
- 58 Wang T, Weinbaum S, Weinstein AM. Regulation of glomerulotubular balance: flow-activated proximal tubule function. *Pflügers Arch* 2017; 469 (5–6): 643–654.
- 59 Watts BA 3rd, George T, Sherwood ER, Good DW. Basolateral LPS inhibits NHE3 and HCO_3^- absorption through TLR4/MyD88-dependent ERK activation in medullary thick ascending limb. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 301(6): C1296–C1306.
- 60 Abu Jawdeh BG, Khan S, Deschênes I, Hoshi M, Goel M, Lock JT, Shinlapawittayatorn K, Babcock G, Lakhe-Reddy S, DeCaro G, Yadav SP, Mohan ML, Naga Prasad SV, Schilling WP, Ficker E, Schelling JR. Phosphoinositide binding differentially regulates NHE1 Na^+/H^+ exchanger-dependent proximal tubule cell survival. *J Biol Chem* 2011; 286(49): 42435–42445.
- 61 Watts BA 3rd, George T, Good DW. Lumen LPS inhibits HCO_3^- absorption in the medullary thick ascending limb through TLR4-PI3K-AKT-mTOR-dependent inhibition of basolateral Na^+/H^+ exchange. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 305(4): F451–F462.
- 62 Wang W, Li C, Summer SN, Falk S, Wang W, Ljubanovic D, Schrier RW. Role of AQP1 in endotoxemia-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294(6): F1473–F1480.
- 63 Baumgart K, Radermacher P, Calzia E, Hauser B. Pathophysiology of tissue acidosis in septic shock: blocked microcirculation or impaired cellular respiration. *Crit Care Med* 2008; 36(2): 640–642.
- 64 Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(5): 307–318.
- 65 Jacinto E, Lorberg A. TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem J* 2008; 410(1): 19–37.