

浅谈 Toll 样受体与动脉粥样硬化的关系

刘千萍 张梅(审校)

作者单位:300162 天津市,中国人民武装警察部队后勤学院

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.04.017

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种以慢性炎症反应为特点的疾病。病变区有大量免疫细胞和炎性细胞聚集,以巨噬细胞和 T 淋巴细胞为主,并有大量炎症因子产生。炎症因子刺激机体后激活固有免疫反应,造成内皮细胞功能失活,脂质聚集,被巨噬细胞吞噬后形成泡沫细胞(单核巨噬细胞源性);在发生这种变化的同时,平滑肌细胞也会因增生转入内皮下,吞噬脂质形成泡沫细胞(平滑肌源性)。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是介导固有免疫和炎症反应的主要受体,也在连接固有免疫反应与继发性免疫反应中起重要作用。已有研究^[1]表明,Toll 样受体与组织损伤及 AS 的发生发展密切相关。因此,本文就 TLRs(尤其是 TLR4)与 AS 的关系做一综述。

1 TLRs 的结构、分布、配体及功能

TLRs 最早是在 1988 年由 Hashimoto 等^[2]发现的,在果蝇胚胎发育过程中,Toll 基因决定着果蝇的背腹侧分化,其编码的蛋白质称为 Toll 蛋白,能介导抗菌感染信号转导,参与成蝇抗真菌免疫反应。1997 年,Janeway 等^[3]首次是人类细胞表面发现 TLRs。随后逐渐发现 TLRs 能识别特定类型的微生物保守分子,即病原体相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs),在进化过程中,这类微生物一直保留了其高度保守序列,该序列能被特定受体识别。

1.1 TLRs 的结构 迄今为止,已发现鼠类 TLRs 有 13 名成员,人类 TLRs 成员共有 11 名。TLRs 的所有成员都属于 I 型跨膜蛋白,可分为胞膜外区、胞浆区和跨膜区三部分。其中胞膜外区含有 19~25 个富含亮氨酸的重复序列(leucine rich repeat, LRR),为 β 折叠-环- α 螺旋,并且都含有 3 个胞外段辅助蛋白,即 MD1、MD2 和 RP105,整个 LRR 结构域形成一个马蹄形的结构,主要参与受体识别及与其他辅助受体结合形成受体复合物;胞浆区为约含 200 个氨基酸、与白介素 1 受体的信号域高度同源的尾状结构,称为 Toll/白介素 1 受体(Tol/interleukin-1 receptor, TIR)同源域,包括 3 个保守盒,为 TIR 向下游传递信号的核心元件。含有 TIR 域的不同分子能够相互结合,形成信号复合体,从而向下游传导信号。

1.2 TLRs 的分布 TLRs 的分布比较广泛,其分布的细胞多

达 20 余种,但在不同的组织或细胞上其表达量也有所不同。除 TLR3 只特异性地表达在树突状细胞(dendritic cells, DCs)上以外,其他 TLRs 多分布在单核巨噬细胞和 DCs 上,其中 TLR1 主要分布在单核细胞、中性粒细胞、B 细胞和自然杀伤细胞上;TLR2 大量表达于单核细胞、中性粒细胞以及 DCs 上;TLR4 则广泛分布于各种组织细胞,包括巨噬细胞、心肌细胞、内皮细胞、中性粒细胞、DCs 脂肪细胞及肠上皮细胞等;TLR2、TLR4 还分布于人类胚胎肾细胞(HEK293)、齿龈纤维母细胞、人表皮内皮细胞及人单核细胞型淋巴瘤细胞;正常肠黏膜细胞可组成性地表达 TLR3 和 TLR5;TLR7 广泛表达于各种免疫细胞,尤其是单核细胞;TLR5、TLR8 和 TLR9 都在单核细胞及 DCs 上表达。此外,TLR9 还表达于中性粒细胞和淋巴细胞,且免疫细胞上的 TLRs 家族成员对不同刺激发生的反应有表达量的差异。DCs 在逐渐成熟的过程中,TLR1、TLR2、TLR4 和 TLR5 的表达水平有所下降。

1.3 TLRs 的配体 TLRs 是人类抵御病原微生物及其自身变异成分的第一道防线,是先天性免疫模式识别受体,其所识别的配体具有特异性,其配体均具有一种真核细胞所不具备的特殊结构,称为 PAMPs。不同的 TLRs 识别不同的配体,TLR2 与 TLR6 或 TLR1 形成异二聚体后,识别的配体包括脂多肽、脂壁酸及酵母多糖等,而且产生的下游细胞因子能使 TLR2 的识别更加广泛。TLR3 能特异识别病毒感染过程中的双链 RNA,从而激活核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)和干扰素 β 前体。有文献^[4]表明,抗 TLR3 单克隆抗体能抑制成纤维细胞 IFN- β 的产生。另外有文献^[5]报道指出,TLR3 还具有调控鼻病毒对人支气管细胞感染的能力,这也说明了 TLR3 在抗病毒作用中的重要性。目前在 TLR5 上发现了能且只能识别细菌的主要毒力因子:鞭毛蛋白。TLR5 能诱导人的 DCs 成熟,但不能诱导鼠的 DCs 成熟。TLR7 和 TLR8 能识别单链 RNA,他们在细胞内体中发挥作用。TLR9 能识别未甲基化的 CpG 序列,具有激活 B 细胞和抗原提呈细胞的免疫特性^[6]。最近有研究^[7]报道 TLR9 也能识别甲基化的 CpG 序列,介导无菌性炎症反应。此外,不同的 TLRs 可以通过相互结合来识别不同的 PAMPs,如 TLR1 与 TLR6 可以分别协同 TLR2

对不同的 PAMPs 分子进行识别;TLR7 可能同 TLR9 组合来介导 CpG 激活免疫细胞。他们相互结合的方式也各不相同,其中 TLR4/TLR4 和 TLR9/TLR9 是以同源二聚体的形式结合;而 TLR2/TLR4、TLR2/TLR6 和 TLR7/TLR8 为异源二聚体,还有的二聚体中另外一个亚单位尚未确定,如 TLR3/TLR、TLR5/TLR。

1.4 TLRs 的功能 TLRs 与相应配体结合后激活下游信号转导途径、诱导炎症反应以及促进 APC 的活化,诱发固有免疫反应,从而抵抗微生物感染。病原体所特有的 PAMPs 被 TLRs 识别后可诱导活性氧中间产物和活性氮中间产物的产生及促炎因子的释放,并上调共刺激分子的表达。

2 TLR4 的配体及其介导的信号转导途径

外源性或内源性配体与 TLRs 和髓样分化蛋白-2 及 CD14 分子复合体结合后,通过不同的信号转导途径激活下游信号分子^[8]。此信号途径分为髓样分化蛋白 88(myeloid differentiation protein 88, MyD88) 依赖途径和非 MyD88 依赖途径^[9]。

2.1 TLR4 的配体 TLR4 不仅有外源性配体,还有内源性配体。外源性配体主要是来自革兰氏阴性菌的脂多糖和革兰氏阳性菌的脂磷壁酸以及来自呼吸道合胞病毒 F 蛋白和来自植物的紫杉醇,还包括细菌与宿主共有的热休克蛋白(heat shock protein, HSP);内源性配体有 HSP60,纤维粘连蛋白的外域 A 以及高迁移率族蛋白,体内类肝素硫酸盐和透明质酸盐降解的多糖部分以及局部的内源性酶的级联活化反应也可激活 TLRs^[10-12]。内源性配体大多数在机体应激状态或者细胞受损时产生。

2.2 MyD88 依赖信号转导途径 MyD88 的结构中除了具有一个 TIR 同源域外,还包括一个死亡域(death domain, DD),可以通过同型相互作用募集其他包含 DD 的分子。在配体的刺激下,TLRs 被激活,通过衔接蛋白使 MyD88 聚集并与 TIR 结合,激活包含 DD 的激酶,即白介素-1 受体相关激酶-4(IL-1 receptor associated kinase, IRAK-4)。IRAK-4 的活化对 TLR 信号传递起着重要作用,包括介导促炎因子的产生,也可能在维持某些细胞因子和化学趋化因子的 mRNA 的稳定性中起作用,比如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和 KC。IRAK-4 激活后促进 IRAKs 的磷酸化,使 IRAK-1 活化,与 IRAK-4 结合形成复合体。

在此信号途径中,另外一个很重要的蛋白分子是肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF-6),该分子与 IRAK-1 结合的复合物从 TIR 上分离后激活转化生长因子 β 活化激酶 1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1, TAK-1)。而 TAK-1 能激活下游因子及丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径,使 NF- κ B 转移至核内,诱导转录因子激活蛋白

1 的活化,调节各种蛋白质的转录,表达各种促炎因子,包括 IL-6、TNF- α 等。除 TLR3 以外所有的 TLRs 都可以通过 MyD88 介导下游的信号转导^[13]。

2.3 非 MyD88 依赖信号转导途径 对于非 MyD88 依赖途径,包含 TIR 域的介导 IFN- β 的调节子(TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β , TRIF)起重要作用。TRIF 的 C 端有一个丝/苏氨酸同型相互作用序列,能与受体相互作用蛋白 1(receptor-interacting protein, RIP-1)结合。RIP-1 在 TNF- α 介导的 NF- κ B 的活化中起重要作用。TRIF 通过募集 TRAF-3 来激活干扰素调节因子-3,与 NF- κ B 共同调节靶基因转录,如 I 型干扰素及干扰素介导的基因表达,发挥抗病毒及抗菌作用。

3 TLRs 与 AS 的关系

TLRs 参与 AS 的早期形成、发生发展及斑块破裂的全过程。在急性心肌梗死患者的循环血液及斑块中可以检测到 TLR2 和 TLR4 的存在,TLR4 在斑块中的含量远高于循环血液中的含量,对急性心肌梗死患者远期心血管事件也存在一定评估作用^[13]。

3.1 TLRs 参与早期 AS 发生与发展 早期 AS 以内皮损伤、单核巨噬细胞聚集黏附于内皮下、平滑肌增生为特点。巨噬细胞吞噬氧化型低密度脂蛋白形成单核细胞源性泡沫细胞,平滑肌细胞吞噬脂质形成平滑肌细胞源性泡沫细胞,这两种细胞随后逐渐形成脂纹、纤维斑块、粥样斑块。

NF- κ B 调节基因转录,在 AS 早期调节黏附分子的转录水平,使内皮细胞分泌黏附分子增多,如细胞内黏附分子-1、血管细胞黏附分子-1。黏附因子可以募集各种免疫细胞至损伤的血管壁,形成附壁血栓。DCs 在损伤区大量聚集,同时表达 TLR4,在配体的刺激下激活内皮细胞,使其表达单核细胞趋化因子-1,促进单核细胞的聚集^[12]。TLR4 还参与早期内膜泡沫细胞在动脉易损区的聚集,同时参与平滑肌细胞的环绕及增生,TLR4 信号途径可能影响损伤的发展。

3.2 TLR4 与不稳定性斑块的形成 TLR4 信号通路可能通过 Fas 途径促发血管平滑肌细胞的凋亡;单核巨噬细胞吞噬脂质后形成泡沫细胞,泡沫细胞凋亡造成斑块内出血,增加了斑块的不稳定性。此外,泡沫细胞还能介导巨噬细胞的凋亡,增加微血管的通透性,促进单核细胞的聚集黏附。在聚集的单核细胞上有 TLR4 的表达,TLR4 在血管向外重构的代偿机制及激活基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs)的过程中发挥重要作用,因血管外向重构减少了管腔流失,斑块容易脱落造成微血管血栓。MMPs 参与了细胞外基质的降解,促进斑块在较薄的纤维帽处的破裂,这些都增加了斑块的不稳定性。最新一项实验研究^[14]显示,微血管内皮细胞内 TLR4 的激活比大血管内皮细胞内 TLR4 的激活更能引起炎症反应的暴发,而且在 MMPs 的产生引起斑块破裂的

反应中起更重要的作用。

3.3 TLR 的基因多态性与 AS 9 号染色体上 TLR4 编码域 Asp299Gly 的突变导致 TLR4 信号转导途径的损伤,使机体对内毒素的反应减弱,对于无菌性炎症来说减少了炎症带来的损伤^[15]。正常 Asp299Gly TLR4 的多态性增加了急性重症感染的危险性,但是降低了颈动脉和股动脉粥样硬化和心血管事件导致的死亡的危险性^[16],这可能与低水平的促炎因子、可溶性黏附分子以及急性时相反反应物有关。与这种保护作用相反的研究^[17]结果显示,Asp299Gly 基因多态性增大男性心肌梗死的危险性,而对女性没有明显作用。两种观点的研究方法都有其弊端,所以 TLR4 基因多态性对 AS 的影响仍需进一步研究。有研究^[18]显示,TLR4 Asp299Gly 基因突变以及 TLR2 基因启动子部分片段的丢失还增加了乳腺癌的易感性。TLR4 的基因多态性与 AS 的发生在一定程度上具有相关性^[19]。

4 问题与展望

TLR4 在心血管疾病发生发展过程中的调节作用为临床治疗提供了新的可能性。可以通过抑制 TLR4 信号途径中的某一个环节来切断各种促炎因子的上游信号调节,减少炎症性损伤,从而减少心血管事件发生的可能性。或者通过研究 TLR4 在心血管事件中的表达的动态变化,选择在特定时间点给药,及时有效地干扰疾病进程,也可以起到防止损伤扩大化的作用。目前用于临床的药物有他汀类,其作为 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂及降低胆固醇的药物,有多种治疗效果。有实验^[20]表明,他汀类药物可以抑制不同类型细胞中 NF- κ B 的活化,包括单核细胞及血管平滑肌细胞,这种抑制作用是通过抑制蛋白质之间的异戊烯化从而抑制 TLRs 之间的结合,下调 TLR4 的表达实现的。坎地沙坦(血管紧张素受体阻滞剂),吡格列酮(过氧化物酶体增殖剂活化受体 γ 激动剂)也可以阻断脂多糖诱导的 TLR4 途径 mRNA 和蛋白质的表达。所有这些药物治疗 AS 的具体机制目前仍没有定论,需要进一步研究。由于 TLR4 参与人体固有免疫,而固有免疫是机体抵抗外界感染的第一道防线,若全部阻断其信号通路,机体则可能面对较高的感染危险,所以可以通过 RNA 干预,基因沉默使下游分子表达缺失,从而达到阻断疾病发生发展的目的。进一步的工作仍然需要更多的研究者来完成。

5 参考文献

- 1 Ni JQ, Ouyang Q, Lin L, et al. Role of toll-like receptor 4 on lupus lung injury and atherosclerosis in LPS-Challenge ApoE^{-/-} Mice. Clin Dev Immunol, 2013, 2013: 476856.
- 2 Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell, 1988, 52: 269-279.
- 3 Janeway CA, Chervonsky AV, Sant'Angelo D. T-cell receptors: is the repertoire inherently MHC-specific? Curr Biol, 1997, 7: R299 - R300.
- 4 Doyle SE, O'Connell R, Vaidya SA, et al. Toll-like receptor 3 mediates a more potent antiviral response than Toll-like receptor 4. J Immunol, 2003, 170: 3565-3571.
- 5 Wong JP, Christopher ME, Viswanathan S, et al. Antiviral role of toll-like receptor-3 agonists against seasonal and avian influenza viruses. Curr Pharm Des, 2009, 15: 1269-1274.
- 6 Erridge C, Burdett A, Jackson AJ, et al. Vascular cell responsiveness to Toll-like receptor ligands in carotid atheroma. Eur J Clin Invest, 2008, 38: 713-720.
- 7 Li Y, Berke IC, Modis Y. DNA binding to proteolytically activated TLR9 is sequence-independent and enhanced by DNA curvature. EMBO J, 2011, 31: 919-931.
- 8 Gioannini TL, Weiss JP. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. Immunol Res, 2007, 39: 249-260.
- 9 Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine, 2008, 42: 145-151.
- 10 Estruch M, Bancells C, Beloki L, et al. CD14 and TLR4 mediate cytokine release promoted by electronegative LDL in monocytes. Atherosclerosis, 2013, 229: 356-362.
- 11 González-Ramos M, Calleros L, López-Ongil S, et al. HSP70 increases extracellular matrix production by human vascular smooth muscle through TGF- β 1 up-regulation. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45: 232-242.
- 12 Hreggvidsdottir HS, Ostberg T, Wahamaa H, et al. The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. J Leukoc Biol, 2009, 86: 655-662.
- 13 Ishikawa Y, Satoh M, Itoh T, et al. Local expression of Toll-like receptor 4 at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction. Clin Sci (Lond), 2008, 115: 133-140.
- 14 Lu Z, Li Y, Jin J, et al. Toll-Like Receptor 4 Activation in Microvascular Endothelial Cells Triggers a Robust Inflammatory Response and Cross Talk With Mononuclear Cells via Interleukin-6. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32: 1696-1706.
- 15 Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat Genet, 2000, 25: 187-191.
- 16 Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. N Engl J Med, 2002, 347: 185-192.
- 17 Edfeldt K, Bennet AM, Eriksson P, et al. Association of hyporesponsive toll-like receptor 4 variants with

(下接第 245 页)

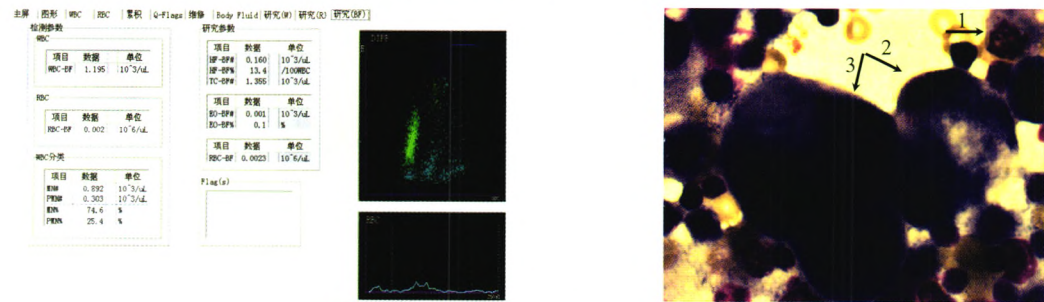


图 4 HF-BF%>20%标本的仪器及镜检结果

注:标本种类为胸水。仪器检测结果显示,WBC 值明显增高,分类 MN%值较高为 74.6%,HF-BF%值为 13.4%;镜下可见大量的间皮细胞(箭头 1 所示),组织细胞(箭头 2 所示),肿瘤细胞(箭头 3 所示)。病理诊断:腺癌。临床诊断:右肺腺癌肺门淋巴结转移。

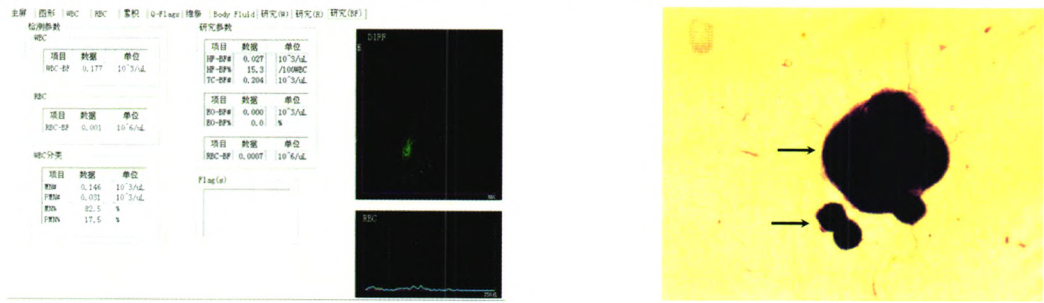


图 5 20% ≥ HF-BF%>10%标本的仪器及镜检结果

注:标本类型为胸水。仪器检测结果显示,WBC 值增高,分类 MN%值较高为 82.5%,HF-BF%值为 15.3%;镜下可见较多的肿瘤细胞(箭头所示)。病理诊断:腺癌。临床诊断:结肠癌转移。

大量的散粒,但镜下并没有找到肿瘤细胞,检测结果和镜检结果不吻合,这可能跟间皮细胞数量的多少和形态异常与浆膜腔受到的刺激强度和病因有关,尚有待于进一步研究。本文研究结果显示,10% ≥ HF-BF% > 3%、20% ≥ HF-BF% > 10%和 HF-BF% > 20%组中共有 5 例标本镜下可见大量肿瘤细胞,结果与病理和临床诊断相符,说明 HF-BF%值增高有提示肿瘤或异常血细胞的可能。在 HF-BF% ≤ 3%组中,有 1 例标本镜下可见少量肿瘤细胞,回访其病理和临床诊断后,证实是恶性积液。

体液细胞定量检测与显微镜镜下细胞形态分析结合,有助于提高对浆膜腔积液的检测能力和质量。HF-BF%值越高,提示检出肿瘤与异常细胞的可能也越高。但本文研究中也存

在 HF-BF%值很高,而镜检并未看到异常细胞的情况。因此, HF-BF%值的高低与肿瘤细胞检出的相关性还有待于进一步研究。

4 参考文献

1 张时民. 应当重视临床检验工作中的形态学检查. 实用检验医师杂志, 2012, 4: 197-201.

2 陈松立, 丁磊, 叶廷军, 等. 血液分析仪 XT-4000i 筛检浆膜腔恶性积液的应用. 诊断学理论与实践, 2012, 11: 391-393.

3 胡颖. SYSMEX XT-4000i 检测胸腹水有核细胞结果分析. 中国保健营养杂志, 2012, 6: 1689-1690.

4 王莹莹. 细胞形态学检查对鉴别良恶性胸腹水细胞的探讨. 国际检验医学杂志, 2011, 32: 784-785.

(收稿日期: 2013-08-13)

(本文编辑: 李霖)

(上接第 252 页)

risk of myocardial infarction. Eur Heart J, 2004, 25: 1447-1453.

18 Theodoropoulos GE, Saridakis V, Karantanos T, et al. Toll-like receptors gene polymorphisms may confer increased susceptibility to breast cancer development. Breast, 2012, 21: 534-538.

19 Ferronato S, Gomez-Lira M, Menegazzi M, et al. Polymorphism - 2604C>A variants in TLR4 promoter are associated with different gene

expression level in peripheral blood of atherosclerotic patients. J Hum Genet, 2013, 58: 812-814.

20 Moutzouri E, Tellis CC, Rousouli K, et al. Effect of simvastatin or its combination with ezetimibe on Toll-like receptor expression and lipopolysaccharide-induced cytokine production in monocytes of hypercholesterolemic patients. Atherosclerosis, 2012, 225: 381-387.

(收稿日期: 2013-08-13)

(本文编辑: 李霖)