

Toll 样受体在脂多糖耐受性机制作用中的研究进展

吕镗烽(综述) 宋勇(审校)

【关键词】 Toll 样受体; 脂多糖; 耐受性

脂多糖(LPS)耐受性是指机体或细胞经低剂量 LPS 刺激后,对 LPS 的再次刺激呈低反应或无反应状态,它与 LPS 信号转导变化密切相关。LPS 细胞外信号转导是通过脂多糖结合蛋白(LBP)呈递给 CD₁₄ 来实现的^[1],但对 LPS 跨膜转导机制一直不明确。近年来 Toll 样受体(TLRs)的发现为此提供了新的线索。TLRs 表达量和功能下调及 TLR4 信号通路中各个环节的功能缺陷,都将导致 LPS 耐受性的产生,是 LPS 耐受性产生的重要原因之一。现就 LPS 耐受性与 TLRs(主要是 TLR4)研究进展简要综述如下。

1 LPS 耐受性与 TLRs 的关系及进展

TLRs 是广泛存在于细胞表面的一类跨膜蛋白,与 LPS 耐受性相关的主要为 TLR4 和 TLR2。TLR2 仅为 LPS 低亲和性受体之一,TLR4 是介导 LPS 信号转导的主要受体。TLR2 识别配体范围较广,而 TLR4 仅识别革兰阴性菌和胞壁成分 LPS。LPS 通过 TLR4 激活细胞必须要有分泌蛋白髓样分化因子-2(MD-2)存在。MD-2 主要与 TLR4 细胞外区结合,形成 TLR4-MD-2 复合物以识别 LPS,增强经 TLR4 介导的 LPS 信号转导过程。而通过 TLR2 激活细胞的许多配体并不要求 MD-2 绝对存在,但如果有 MD-2 存在,则能增强这些配体对细胞的活化反应。LPS 耐受也能通过暴露于脂肽和脂胞壁酸由 TLR2 介导的信号而诱导。由于 TLR4 是 LPS 的主要受体,所以 TLR4 结构和功能的改变以及 TLR4 信号转导通路中各个环节的功能缺陷等,都有可能使宿主对 LPS 产生耐受性。

1.1 TLR4 结构和表达的改变与 LPS

基金项目:江苏省自然科学基金面上项目(BK2004096)

作者单位:210002 南京,南京军区南京总医院呼吸科

作者简介:吕镗烽(1973-),男(汉族),江西省九江市人,医学硕士,主治医师。

耐受性:研究表明,小鼠 TLR4 基因编码区点突变或缺失,都可使小鼠对 LPS 的再次刺激表现出低反应性,提示 TLR4 结构改变是形成 LPS 耐受性的重要原因^[2]。人 TLR4 结构变化同样导致 LPS 耐受性的产生,TLR4 表达下调也会导致 LPS 耐受性的产生。用不同剂量 LPS 重复刺激小鼠腹腔巨噬细胞发现,TLR4 在巨噬细胞表面的表达持续性下降,与炎症细胞因子产量下降呈正相关^[3,4]。用 LPS 预处理原代培养的人肠微血管内皮细胞(HIMEC)24~48 h 后再用 LPS 刺激,虽未改变 HIMEC 上的 TLR4 表达,但能明显减少白细胞黏附,导致 LPS 耐受性产生^[5]。另有报道,白细胞介素-1(IL-1)能够诱导小鼠对 LPS 产生低反应性,其作用机制也是使 TLR4 表达下调^[6]。用人热休克蛋白 60(HSP60)预处理单核细胞后再次用 HSP 60 刺激时,单核细胞呈现低反应性,对 LPS 刺激也无反应,称为交叉耐受。增加抗 IL-10 中和抗体不能改变 HSP60 或 LPS 诱导的单核细胞耐受性,导致 TLR4 表达明显下降,其机制与 LPS 耐受性相似^[7]。研究证实^[8]:在体外人单核细胞 TLR4 mRNA 接受 LPS 再次刺激时,表达反而上升,TLR2 mRNA、MD-2 mRNA、CD14、细胞表面 TLR2 表达未发生明显改变;同时提示 LPS 反应性不能简单地归因于先前的感染和细胞表面 LPS 结合复合物蛋白发生明显的变化,还可能涉及 TLRs 信号转导的改变。

1.2 TLR4 信号转导通路及 LPS 耐受性:TLR4 介导的 LPS 信号转导通路改变在 LPS 耐受性产生中起关键作用。LPS、LBP、CD14 形成复合物致使 TLR4 发生活化,在 MD-2 辅助下与接头蛋白 MyD88 的 TLR4 受体域相结合,通过 MyD88 死亡结构域再与 IL-1 受体相关激酶(IRAK)相结合,导致 IRAK 自身的磷酸化,致使丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)活化,使抑制性 κ B(I κ B)磷酸化而降解,最后导致核转录因子- κ B

(NF- κ B)活化,引起炎症细胞因子的释放。TLR4 信号转导通路中各个环节(MD-2、MyD88、IRAK、I κ B、NF- κ B、MAPK、炎症细胞因子)的功能缺陷,都将会导致 LPS 耐受性的产生。在 LPS 耐受过程中,LBP、CD14、MD-2、TLR2 未发生变化或未上调,而 TLR4 受到短暂的抑制或无改变,邻近受体后信号蛋白也发生改变,包括 IRAK 降解的增加、TLR4-MyD88 和 IRAK-MyD88 结合的减少。LPS 耐受性也与 Gi 蛋白含量和活性下降、MAPK 活性下降、NF- κ B 诱导的基因转录水平降低相关。然而,不是所有的信号蛋白和信号转导通路都受到抑制。IRAK-M 和磷酸酰肌醇-3 激酶(PI3K)信号可能起到诱导炎症的功能,诱导增加 I κ B 亚型的表达。NF- κ B 亚基 p50 同型二聚体表达和过氧化物酶体增殖子活化受体- γ (PPAR- γ)也与耐受性密切相关^[9]。

1.2.1 MD-2 与 LPS 耐受性:分泌蛋白 MD-2 与 TLR4 在转导 LPS 信号时有协同作用。虽然单独的 MD-2 基因表达水平不受 LPS 刺激的影响,但 TLR4/MD2 复合物的表达明显下降与 LPS 耐受性产生密切相关。最近研究表明,靶细胞内 TLR4/MD-2 复合物下游调节子的表达和功能变化在介导 LPS 耐受性中可能发挥更重要的作用^[10]。有报道证实,中国仓鼠卵巢细胞对 LPS 的耐受不能仅仅归因于 TLRs/MD-2 表达的下降,也提示 TLR4/MD-2 复合物下游信号功能和表达的抑制可能与 LPS 耐受性产生密切相关^[11]。在人肾胚胎细胞 HEK293T 细胞中也发现了类似结果。

1.2.2 MyD88 与 LPS 耐受性:Kawai 等^[12]发现,MyD88 基因敲除小鼠的巨噬细胞对 LPS 缺乏反应性。用 LPS 预处理人单核细胞后显示,TLR2 表达增加,TLR4 表达却未受影响,推测 TLR4-MyD88 复合物形成下降及随后产生的 IRAK-1 活性损害可能是 LPS 耐受性的基础^[13]。LPS 信号转导涉及 MyD88

依赖和 MyD88 非依赖两个途径,而 MyD88 非依赖级联反应介导的 γ -干扰素 (IFN- γ) 可诱导细胞因子的表达^[14]。IFN- γ 和粒细胞-单核细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 通过促进 IRAK 表达并与 MyD88 结合,阻止内毒素耐受性的产生。LPS 耐受性是不依赖于 IRAK 活性的,提示再次 LPS 刺激后,这些细胞因子通过 IRAK 降解和促进其与 MyD88 的分离以阻止 LPS 耐受性的产生^[15]。

1.2.3 IRAK 与 LPS 耐受性: IRAK 水平与作用的下调也是产生 LPS 耐受性的原因之一。IRAK 是 IL-1 转导的信号,参与 TLRs 介导的对细菌性 LPS 的先天性免疫反应。IRAK 家族由 IRAK、IRAK-4 两个活性激酶和 IRAK-2、IRAK-M 两个非活性激酶所组成。其中,IRAK-M 阻止 IRAK、IRAK-4 从 MyD88、IRAK-肿瘤坏死因子相关因子-6 (TRAF6) 复合物中分离,对 TLRs 信号进行负调控^[16]。虽然 IRAK 在 LPS 刺激后快速失活/降解,提供负反馈导致对 LPS 产生耐受性,但 IRAK 降解机制仍不清楚。研究显示,IRAK 降解呈双峰状,涉及双重受体和明显不同的途径^[17]。第一峰是 IRAK 在受到刺激后 30 min 内快速降解,通过 CD14/TLR4 通路转导信号,又通过 PI3K 进行调节;第二峰在受到刺激后 2 h,通过独立于 PI3K 的补体受体 (CR3) 系统来调节。因此,有多重独立机制涉及到 IRAK 降解。宿主细胞在接受 LPS 刺激后,内源性 IRAK 快速被激活,也引起 IRAK 与 MyD88 结合,出现 LPS 耐受时内源性 IRAK 数量显著减少,IRAK 与 MyD88 的联系因此也中断。酪氨酸激酶抑制剂 AG126 能减轻 LPS 诱导的细胞因子基因表达,也能降低 IRAK 水平及其活性。有报道用 LPS 和脂多糖 (LTA) 延长孵育可以导致肠上皮细胞 (IEC) 低反应状态,IEC 表面的 TLRs 表达和 IRAK 活性下降,而 Toll 抑制性蛋白 (Tollip) mRNA 和蛋白表达在低反应性细胞中表达增加,表面 TLRs 下调和抑制性 Tollip 上调伴随 IRAK 磷酸化降低可能是产生这种低反应性的原因^[3]。这些都提示 IRAK 是 LPS 信号转导所必需的,通过下调 IRAK 能产生内毒素耐受性。

1.2.4 p38 MAPK、I κ B 和 NF- κ B 与 LPS 耐受性: Medvedev 等^[18]观察到,在对 LPS 产生耐受性的小鼠巨噬细胞中,

p38 激酶磷酸化、I κ B- α 与 I κ B- β 降解、NF- κ B 的活化均受到抑制。有报道证实,感染弓形虫属的小鼠接受 LPS 刺激后,TLR4 上调、p38 MAPK 持续活化;接着再用 LPS 刺激却未能阻止 I κ B- α 降解,明显不同于 LPS 导致的耐受,其机制有待进一步研究^[19]。Ropert 等^[20]报道用克鲁斯锥鞭毛体 (TLR2 激动剂) 和 LPS (TLR4 激动剂) 黏液样糖蛋白 (tGPI-mucin) 对巨噬细胞进行预处理,导致再次刺激时的低反应状态,但加入磷酸酶活性抑制剂冈田敏 (okadaic 酸) 则可以逆转这种低反应性。用特异性 p38 MAPK-2 抑制剂 (SB203580) 或 NF- κ B 易位抑制剂 (SN50) 预处理也可以阻止 LPS 耐受性的产生。这些研究提示在 LPS 低反应性中,p38 MAPK 和 NF- κ B 依赖的磷酸酶起着非常重要的作用。

总之,LPS 耐受性的产生与 TLR4 表达、结构的变化和信号转导通路的改变密切相关。特别是通过调节 TLR4 信号转导通路诱导 LPS 耐受性的产生,对于防治脓毒症具有十分重要的意义。

1.2.5 细胞因子与 LPS 耐受性: 有报道,先天 LPS 耐受的 C57BL/ScCr 小鼠具有严重的 IFN- γ 功能缺陷^[21]。现研究已证实,IL-12 在 IFN- γ 诱导中起着非常重要的作用,提示 IL-12 功能的缺陷在 LPS 耐受性产生中同样具有重要的地位^[22]。小鼠巨噬细胞 TLR4 表达部分是 LPS 耐受的基础。最近致炎因子 IFN- γ 对人单核细胞表面 TLR4 表达的影响颇受关注。IFN- γ 上调 TLR4 表达,对抗 LPS 诱导的 TLR4 下调。LPS 耐受性是通过 LPS 和抗炎细胞因子 [IL-10、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)] 诱导的。人单核细胞膜 TLR4 暴露于 LPS 后表达下降,并持续 12 h,随后恢复至正常水平^[23]。LPS 和 IL-1 间存在交叉耐受,但未出现于 LPS 与 TNF- α 之间,推测可能是由于 LPS 与 IL-1 信号表达或共同信号相互介导功能的损害引起 LPS 耐受性的产生^[18]。致炎细胞因子诱导依赖 TLRs 的细菌蛋白黏附素产生,提示 CD14-TLR4 系统与致炎细菌的蛋白黏附素相互作用,涉及细胞因子产生和耐受性的诱导^[24]。

2 展望

LPS 是革兰阴性菌细胞壁上主要的致病成分,能导致宿主细胞因子失控性

表达,发生严重的感染和多脏器损伤。由于 LPS 在自然界广泛存在,机体不可避免地接触并受到其攻击。对 LPS 产生耐受性是机体自身一种重要的保护机制,同时也抑制了炎症细胞因子的表达,不利于机体抵御微生物的入侵,所以研究 LPS 耐受性具有重要的理论和实际意义。例如由于单核细胞再次暴露于 LPS 容易导致耐受性产生,从脓毒症及脓毒性休克存活患者中提取的单核细胞也对 LPS 具有耐受的特征,能够明显减轻“二次打击”带来的损伤,对于提高脓毒性休克患者生存率和改善预后具有积极意义^[25]。研究证实,TLRs 与 LPS 耐受性密切相关,从 TLRs 信号通路和基因转录调控水平认识 LPS 耐受性的分子调节机制,可为从分子水平干预 LPS 诱导的炎症和损伤效应提供新的靶点和治疗措施,对于防治创伤、感染和多器官功能衰竭具有重要的意义。

参考文献:

- 1 万辛,王培训,周联,等.脂多糖刺激前后小鼠肺脾组织中 Toll 样受体基因表达情况[J].中国危重病急救医学,2004,16:73-76.
- 2 Qureshi S T, Lariviere L, Leveque G, et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4) [J]. J Exp Med, 1999, 189:615-625.
- 3 Medvedve A E, Henneke P, Schromm A, et al. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptor 2 or 4 [J]. J Immunol, 2001, 167:2257-2267.
- 4 Li L W, Cousart S, Hu J, et al. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells [J]. J Biol Chem, 2000, 275:23340-23345.
- 5 Ogawa H, Rafiee P, Heidemann J, et al. Mechanisms of endotoxin tolerance in human intestinal microvascular endothelial cells [J]. J Immunol, 2003, 170:5956-5964.
- 6 Alves-Rosa F, Vulcano M, Beigier-Bompadre M, et al. Interleukin-1 beta induces in vivo tolerance to lipopolysaccharide in mice [J]. Clin Exp Immunol, 2002, 128:221-228.
- 7 Kilmartin B, Reen D J. HSP60 induces self-tolerance to repeated HSP60 stimulation and cross-tolerance to other pro-inflammatory stimuli [J]. Eur J

- Immunol, 2004, 34: 2041 - 2051.
- 8 Calvano J E, Agnese D M, Um J Y, et al. Modulation of the lipopolysaccharide receptor complex (CD14, TLR4, MD - 2) and Toll - like receptor 2 in systemic inflammatory response syndrome - positive patients with and without infection: relationship to tolerance [J]. Shock, 2003, 20: 415 - 419.
 - 9 Fan H, Cook J A. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance [J]. J Endotoxin Res, 2004, 10: 71 - 84.
 - 10 Medvedev A E, Vogel S N. Overexpression of CD14, TLR4, and MD - 2 in HEK 293T cells does not prevent induction of in vitro endotoxin tolerance [J]. J Endotoxin Res, 2003, 9: 60 - 64.
 - 11 Otte J M, Cario E, Podolsky D K. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll - like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells [J]. Gastroenterology, 2004, 126: 1054 - 1070.
 - 12 Kawai T, Adachi O, Ogawa T, et al. Unresponsiveness of MyD88 - deficient mice to endotoxin [J]. Immunity, 1999, 11: 115 - 122.
 - 13 Medvedev A E, Lentschat A, Wahl L M, et al. Dysregulation of LPS - induced Toll - like receptor 4 - MyD88 complex formation and IL - 1 receptor - associated kinase 1 activation in endotoxin - tolerant cells [J]. J Immunol, 2002, 169: 5209 - 5216.
 - 14 Sato S, Takeuchi O, Fujita T, et al. A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88 - dependent and independent pathways [J]. Int Immunol, 2002, 14: 783 - 791.
 - 15 Adib - Conquy M, Cavillon J M. Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony - stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin - 1 receptor - associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 27927 - 27934.
 - 16 Kobayashi K, Hernandez L D, Galan J E, et al. IRAK - M is a negative regulator of Toll - like receptor signaling [J]. Cell, 2002, 110: 191 - 202.
 - 17 Noubir S, Hmama Z, Reiner N E. Dual receptors and distinct pathways mediate interleukin - 1 receptor - associated kinase degradation in response to lipopolysaccharide: involvement of CD14/TLR4, CR3, and phosphatidylinositol 3 - kinase [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 25189 - 25195.
 - 18 Medvedev A E, Kopydlowski K M, Vogel S N. Inhibition of lipopolysaccharide - induced signal transduction in endotoxin - tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll - like receptor 2 and 4 gene expression [J]. J Immunol, 2000, 164: 5564 - 5574.
 - 19 Kim L, Butcher B A, Denkers E Y. Toxoplasma gondii interferes with lipopolysaccharide - induced mitogen - activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance [J]. J Immunol, 2004, 172: 3003 - 3010.
 - 20 Ropert C, Closel M, Chaves A C, et al. Inhibition of a p38/stress - activated protein kinase - 2 - dependent phosphatase restores function of IL - 1 receptor - associate kinase - 1 and reverses Toll - like receptor 2 - and 4 - dependent tolerance of macrophages [J]. J Immunol, 2003, 171: 1456 - 1465.
 - 21 Merlin T, Sing A, Nielsen P J. Inherited IL - 12 unresponsiveness contributes to the high LPS resistance of the LPS (d) C57BL/10ScCr mouse [J]. J Immunol, 2001, 166: 566 - 573.
 - 22 Poltorak A, Merlin T, Nielsen P J, et al. A point mutation in the IL - 12R beta 2 gene underlies the IL - 12 unresponsiveness of LPS - defective C57BL/10ScCr mice [J]. J Immunol, 2001, 167: 2106 - 2111.
 - 23 Moreno C, Merino J, Vazquez B, et al. Anti - inflammatory cytokines induce lipopolysaccharide tolerance in human monocytes without modifying Toll - like receptor 4 membrane expression [J]. Scand J Immunol, 2004, 59: 553 - 558.
 - 24 Hajishengallis G, Martin M, Sojar H T, et al. Dependence of bacterial protein adhesins on Toll - like receptors for proinflammatory cytokine induction [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9: 403 - 411.
 - 25 Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, et al. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex [J]. Pharmacol Ther, 2003, 100: 171 - 194.

(收稿日期: 2004 - 11 - 26)

修回日期: 2005 - 03 - 21)

(本文编辑: 郭方)

• 启事 •

高海拔地区急性危重病与多器官功能障碍综合征(MODS)诊断标准 早期防治专题研讨会征文通知

由中华高原医学会主办,《中国危重病急救医学》杂志社、《高原医学》杂志社协办,甘肃省医学会兰州军区兰州总医院承办的中国首届“高海拔地区急性危重病与 MODS 诊断标准早期防治”专题研讨会订于 2005 年 9 月 12 日在甘肃兰州召开。届时将邀请国内知名危重病急救医学、高原医学、创伤外科和呼吸病学专家莅会讲学。现将参会事项及征文内容通知如下。

1 会议时间: 2005 年 9 月 12 日报到, 9 月 13 - 14 日开会, 9 月 15 日撤离。

2 征文内容: ①严重创伤/多发伤伤情评分、现场救护、后续处理; ②急性呼吸窘迫综合征与 MODS; ③高海拔地区急性与慢性危重病; ④高海拔地区严重创伤、烧伤、早期复苏与延迟复苏; ⑤高海拔地区围手术期防护特点; ⑥心肺复苏技术与呼吸机支持技术; ⑦与联合会议内容相关的其他论文。

3 征文要求: 论文摘要 300~800 字, 有全文者需附软盘(word97/2000 格式), 凡参加会议的代表, 均颁发论文证书, 优秀论文颁发优秀论文证书并授予国家 I 类继续医学教育学分。征稿截止日期: 2005 年 7 月 30 日。

4 收费标准: 会务费(含资料费)600 元, 食宿费自理。

5 来稿请寄: 兰州市小西湖兰州军区兰州总医院胸外科张德海、刘惠萍收, 邮编: 730050, 联系电话: 0931 - 8975748。大会联络处负责人: 刘毅、李乃斌。Email: lanzhouhy@126.com。

(中华高原医学会)