

Toll 样受体 4 在急性胰腺炎中的作用

何倩颖 王卫星

430060 湖北武汉, 武汉大学人民医院普通外科, 消化系统疾病湖北省重点实验室

通讯作者: 王卫星, Email: sate.llite@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.12.021

【摘要】 Toll 样受体 (TLRs) 是一类广泛存在于细胞膜的模式识别受体, 属于天然免疫系统成分, 可调节机体的炎症反应, 参与细胞的信号转导, 是特异性免疫和非特异性免疫之间的“桥梁”, 可以在内源性免疫反应中发挥重要的作用。但由 TLRs 介导的过度炎症反应可使机体免疫功能失衡, 导致多器官功能损害。最早发现的 TLR4 属于跨膜蛋白, 在几乎所有的细胞表面都有表达, 大量研究表明其与急性胰腺炎 (AP) 的发生发展密切相关。本文就 TLR4 在 AP 中发挥的作用及机制进行综述, 以阐明 TLR4 与 AP 病情进展之间的内在联系。

【关键词】 Toll 样受体 4; 胰腺炎, 急性; 机制

基金项目: 国家自然科学基金 (81370562, 81500488)

The role of Toll-like receptor 4 in acute pancreatitis He Qianying, Wang Weixing

Department of General Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Digestive System Disease, Wuhan 430060, Hubei, China

Corresponding author: Wang Weixing, Email: sate.llite@163.com

【Abstract】 Toll-like receptors (TLRs) is a kind of pattern recognition receptor which widely exists on the cell membrane. It is a natural immune system component which can regulate the inflammatory response of the body participating in the signal transduction of cells and play an important role in the endogenous immune response. But the excessive inflammatory reaction initiated by TLRs can make the immune function of the body unbalanced and damage the function of many organs. The earliest discovered TLR4 is a transmembrane protein, almost express in all kinds of cell. Lots of study show it is closely related to the occurrence and development of acute pancreatitis (AP). The role and mechanism of TLR4 in AP will be reviewed in this article.

【Key words】 Toll-like receptor 4; Acute pancreatitis; Mechanism

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81370562, 81500488)

急性胰腺炎 (AP) 是一种极其凶险、复杂的急腹症, 可对肺、肾等多种胰腺外器官产生损伤, 具有致死率高的特点, 目前尚无有效的治疗手段^[1]。而 AP 的发展与炎症反应过度有关, 病情严重者可导致全身炎症反应综合征 (SIRS)、多器官功能障碍综合征 (MODS), 甚至死亡。Toll 样受体 (TLRs) 是一类广泛存在于人和哺乳动物体内高度保守的 I 型模式识别受体^[2], 至今在人和鼠体内发现了 13 种亚型。在特异性配体的刺激下, TLRs 对机体起到非特异性免疫、抗病毒感染及修复组织损伤的作用^[3]。其中 TLR4 是于哺乳动物体内最早被发现的果蝇 Toll 样受体同源物, 在生理状况下, TLR4 作为机体非特异性免疫的防线, 可有效清除外源性病原微生物, 维护机体免疫系统的稳态^[4]。为了维持体内炎症反应平衡, 避免机体受到炎症损害, 一些特定的调控分子共同参与 TLR4 信号通路的负调控, 负责 TLR4 信号通路的降解。其中, 一些调控分子能与 TLR4 信号通路中的分子相互作用, 使下游通路分子的信号减弱, 譬如相对分子质量为 12 000 的 DNAX 活化蛋白 12 (DAP12)、骨髓细胞 2 触发受体 (TREM2) 等^[5]; 另一些则促进 TLR4 或通路中信号分子的泛素化降解, 如泛素化修饰酶 (A20) 和具有 E3 泛素连接酶活性的含 RING 结构域的环指蛋白 (Triad3A)^[6-7]。如果机体受到过度刺激, 由 TLR4 开启的炎症反应可能会失去控制,

从而导致 AP 等多种炎性疾病。由于 TLR4 在 AP 发生发展中所起的关键作用, 有望作为疾病治疗的靶点。现就 TLR4 的结构特征, 在 AP 中扮演的角色及其作用机制进行综述。

1 TLR4 的结构及特征

TLR4 属于 I 型跨膜受体, 由胞外区、跨膜区和胞质区组成。胞外区的受体结构为一段 16~28 个富含亮氨酸的重复序列, 在相应蛋白的辅助下, 负责与特异性配体结合, 然后将信号转导至胞内^[8-9]。其胞外区识别的配体结构分为两种, 即由细菌、病毒和真菌等产生的病原体相关分子模式 (PAMP) 以及由损伤或者死亡裂解的细胞产生的损伤相关分子模式 (DAMP)^[10-11]。其中, PAMP 为外源性配体, 主要组成为革兰阴性菌产生的脂多糖 (LPS); DAMP 为内源性配体, 主要组成为高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)、DNA、组蛋白和热休克蛋白 70 (HSP70) 等^[12-13]。

TLR4 属于白细胞介素-1 (IL-1) 受体超家族, 其胞质区结构为 Toll/IL-1 受体同源区 (TIR)^[14]。在受到 LPS 刺激后, 此处接收由胞外区传导而来的信号, 招募同样具有 TIR 结构的衔接蛋白, 与之结合促进 TLR4 复合物的二聚化, 从而启动下游信号通路的转导, 最终激活核转录因子- κ B (NF- κ B) 通路或者丝裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 通路, 产生细胞因子、趋化因子以及干扰素等炎性介质。

2 TLR4的生物合成及迁移

由于TLR4在内源性免疫反应以及炎症疾病中发挥的重要作用,其在体内的生成表达以及定位均受到精密的调控,不仅通过信号通路的正负反馈来调节体内的浓度,也通过控制它的合成及转移来保证机体的内稳态^[15]。

在机体受到刺激后,TLR4开始大量转录,生成mRNA及蛋白从而介导机体的炎症反应。其中,mRNA在内质网中进行正确的翻译、折叠、糖基化修饰等步骤必须通过gp96和PRAT4A两个伴侣蛋白的协助。髓样分化蛋白-2(MD-2)对于TLR4在内质网上正确的糖基化修饰也起到了关键的作用,并且在转移至细胞膜后加强了TLR4对LPS的敏感性。之后,TLR4被含7个转运结构域的emp24跨膜蛋白(TMED7)识别,并将其转移至表面带有外套蛋白复合物II(COP II)的囊泡里,进而传递到高尔基复合体中进行后续加工成熟。TMED7和TLR4的稳定结合与卷曲螺旋结构域及高尔基动态结构域(GOLD)有关,稳定结合后可将TLR4从内质网通过高尔基体顺行转移至细胞表面。成熟的TLR4由Rab10依赖性的囊泡转移至细胞表面^[16]。有研究表明,在细胞受到LPS刺激后,Rab10在高尔基体与TLR4结合,可加强TLR4转移到细胞表面的频率^[15,17]。

3 TLR4在AP中的作用

Sharif等^[18]证明,在使用不同方法诱导AP发生后,与野生型小鼠对比,TLR4基因敲除小鼠血清淀粉酶水平、胰腺水肿程度、髓过氧化物酶(MPO)水平、胰腺腺泡的损伤和坏死均得到改善,说明TLR4与AP的发生发展有一定关系。研究证明,在LPS诱导的重症急性胰腺炎(SAP)中,TLR4/NF- κ B通路过度活化,免疫细胞及胰腺腺泡细胞释放过多的细胞因子^[19]。Cao等^[20]证明,乌司他丁可以降低由LPS诱导产生的TLR4蛋白以及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 β 和IL-6等炎症因子水平,改善肺损伤严重程度。Luan等^[21]证明,在AP模型中下调HMGB1水平可以抑制NF- κ B的活化,下调其下游信号分子IL-1 β 、TNF- α 的水平,同时减轻AP导致的肺损伤严重程度。Chen等^[22]证明,在急性坏死性胰腺炎模型中,肠黏膜组织中TLR4的mRNA和蛋白表达均升高;而使用抗HMGB1中和抗体后可以显著降低TLR4及IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等的表达水平,改善肠黏膜损伤。说明HMGB1可能通过TLR4介导的信号通路启动了炎症反应,因而对胰腺外器官产生损伤;下调HMGB1水平则可抑制信号通路的活化,减少炎症因子的产生,对胰腺及胰腺外器官起到保护的作用^[23]。

4 TLR4在AP中的作用机制

TLR4对于AP的发生发展有重要作用,通过识别LPS和HMGB1等配体,可以使AP从局部炎症反应发展为SIRS,甚至是MODS。研究表明,敲除TLR4基因或者使用小分子干扰RNA沉默TLR4后,小鼠体内炎症反应明显减弱^[24-25]。一方面,当AP发生时细胞内胰蛋白酶的异常活化可以导致局部的胰腺损伤及细胞坏死,而且坏死细胞内的蛋白分子进入细胞外液,作为内源性配体被TLR4识别后可启动免疫

反应,发生无菌性的炎症反应;另一方面,由于AP引起的肠黏膜屏障损伤可使肠道条件致病菌移位,进入血液循环,其产生的LPS作为外源性配体被TLR4识别,启动NF- κ B通路,上调细胞因子及趋化因子等炎症介质的表达。Cao等^[26]证明,在诱导脓毒症后,TLR4基因敲除小鼠较野生型小鼠体内TNF- α 、IL-2、IL-10和IL-4等炎症介质的表达水平显著下降,动物存活率明显提高。

无论何种配体,与TLR4结合之后,接收到的信号经过跨膜区的传导,到达胞质区的TIR结构处,在此处主要招募4种衔接蛋白,分别为髓样分化因子88(MyD88)、TIR相关蛋白(Mal)、 β -干扰素诱导的含TIR结构域接头蛋白(TRIF)和TRIF相关接头分子(TRAM)。当外源性配体LPS进入机体后,首先与脂多糖结合蛋白(LBP)形成复合物,通过CD14锚定TLR4与MD-2结合形成的TLR4/MD-2复合物^[27],之后LPS/LBP复合物与MD-2的疏水腔结合,促进TLR4复合物的二聚化,招募以上衔接蛋白^[9,28],然后启动MyD88依赖性或非MyD88依赖性两种信号转导途径^[29]。

4.1 MyD88依赖性途径:信号转导至TLR4胞内段后,MyD88和Mal通过TIR与之结合,招募具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性的IL-1受体相关激酶(IRAK)家族成员形成复合物。在复合物形成后,募集到的下游信号分子IRAK4磷酸化激活IRAK1,经过修饰后的IRAK1从MyD88上被释放到胞质内,与具有E3泛素连接酶活性、RING结构域的肿瘤坏死因子受体相关因子(TRAF6)连接。TRAF6与泛素E2结合酶复合物(UBC13、UEV1A)共同促进K63连接的TRAF6和转化生长因子-活化激酶1(TAK1)蛋白激酶复合物的多聚泛素化。TAK1是促分裂素活化蛋白激酶激酶(MAPKKK)家族的一员,它与转化生长因子- β 活化激酶结合蛋白1~3(TAB1、TAB2、TAB3)等调控亚基形成复合物,随后该复合物与TRAF6结合。然后TAK1活化两条不同的信号通路,即NF- κ B抑制激酶(IKK)复合物-NF- κ B通路以及IKK复合物-MAPK通路。TAK1通过泛素链与IKK复合物结合,IKK复合物由IKK α 、IKK β 和NF- κ B必须调节蛋白(NEMO)组成。静息状态下,NF- κ B抑制蛋白(I κ B α)与NF- κ B结合使其处于非活性状态,而IKK复合物可以磷酸化I κ B α ,使其泛素化而降解,从而使NF- κ B被分离,从细胞质转移到细胞核中,启动细胞因子、趋化因子等基因的转录。活化的TAK1还可以激活MAPK信号通路,从而介导炎症反应^[30]。

Li等^[31]发现,使用TLR4拮抗剂TAK-242作用后,小鼠体内TLR4、I κ B α 、NF- κ B p65、磷酸化的p38MAPK以及TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平均降低,表明此拮抗剂通过降低TLR4的表达,抑制了MyD88依赖性途径的活化,下调了NF- κ B以及MAPK通路的炎症介质的表达,减轻了炎症反应损伤。Wang等^[32]研究也发现,使用大豆异黄酮直接抑制MyD88通路活化,小鼠体内TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等炎症介质表达减少,炎症反应明显减轻。

4.2 非MyD88依赖性途径:在受到LPS刺激后,TLR4与TRIF、TRAM形成的复合物在Rab11a、ARF6和p120-连环

蛋白的协助下被内吞至核内体,然后通过 TRAF6 和 TRAF3 激活下游信号通路^[33-34]。TRAF6 与 RIP-1 结合形成复合物,协同活化 TAK1,导致 NF- κ B 通路的活化,从而诱导炎症介质的表达。与 TRAF6 不同,TRAF3 激活 IKK 相关激酶 TBK1 和 IKKi,这些分子磷酸化干扰素调节因子 3(IRF3)。然后磷酸化的 IRF3 从细胞质转移到细胞核,诱导 I 型干扰素(IFN-1)、趋化因子 10(IP10)等因子的表达^[35]。

5 小结与展望

综上所述,TLR4 作为加重 AP 病情的关键受体,其作用机制是通过接收配体信号的刺激,启动两种途径上调炎症介质的表达。如果刺激过度或调控机制发生障碍,导致炎症反应失衡,则会对胰腺及胰腺外器官产生损伤。但是目前关于 TLR4 的研究还停留在基础研究层面,如果有望在此基础上开发出相应的靶向药物,则可拮抗 TLR4 的功能,从而使疾病不再进展,改善疾病的预后。

参考文献

- [1] Malc'h J, Balázs A, Pallagi P, et al. Alcohol disrupts levels and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to promote development of pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148 (2): 427-439. e16. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.11.002.
- [2] He X, Jia H, Jing Z, et al. Recognition of pathogen-associated nucleic acids by endosomal nucleic acid-sensing toll-like receptors [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013, 45 (4): 241-258. DOI: 10.1093/abbs/gms122.
- [3] Stocks CJ, Schembri MA, Sweet MJ, et al. For when bacterial infections persist: Toll-like receptor-inducible direct antimicrobial pathways in macrophages [J]. *J Leukoc Biol*, 2018, 103 (1): 35-51. DOI: 10.1002/JLB.4R10917-358R.
- [4] Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and type I interferons [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (21): 15319-15323. DOI: 10.1074/jbc.R700009200.
- [5] Peng Q, Long CL, Malhotra S, et al. A physical interaction between the adaptor proteins DOK3 and DAP12 is required to inhibit lipopolysaccharide signaling in macrophages [J]. *Sci Signal*, 2013, 6 (289): ra72. DOI: 10.1126/scisignal.2003801.
- [6] Boone DL, Turer EE, Lee EG, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5 (10): 1052-1060. DOI: 10.1038/ni1110.
- [7] Chuang TH, Ulevitch RJ, Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5 (5): 495-502. DOI: 10.1038/ni1066.
- [8] Gao D, Li W. Structures and recognition modes of toll-like receptors [J]. *Proteins*, 2017, 85 (1): 3-9. DOI: 10.1002/prot.25179.
- [9] Muzio M, Fonte E, Caligaris-Cappio F. Toll-like receptors in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2012, 4 (1): e2012055. DOI: 10.4084/MJHID.2012.055.
- [10] Li G, Wu X, Yang L, et al. TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway mediates HMGB1-induced pancreatic injury in mice with severe acute pancreatitis [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 37 (1): 99-107. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2410.
- [11] 张玖强, 李莹. Toll 样受体 4 的临床应用研究进展 [J]. *中国急救医学*, 2012, 32 (9): 849-851. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2012.09.022.
- [12] Zhang JQ, Li Y. Research progress on clinical application of Toll-like receptors 4 [J]. *Chin J Crit Care Med*, 2012, 32 (9): 849-851. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2012.09.022.
- [12] 王静, 王焯. 高迁移率族蛋白-1 与 Toll 样受体与重症急性胰腺炎的关系 [J]. *重庆医学*, 2013, 42 (33): 4089-4091. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.33.046.
- [12] Wang J, Wang X. Relationship between HMGB1 and TLRs and severe acute pancreatitis [J]. *Chongqing Med*, 2013, 42 (33): 4089-4091. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.33.046.
- [13] Kang R, Lotze MT, Zeh HJ, et al. Cell death and DAMPs in acute pancreatitis [J]. *Mol Med*, 2014, 20: 466-477. DOI: 10.2119/molmed.2014.00117.
- [14] Brodsky I, Medzhitov R. Two modes of ligand recognition by TLRs [J]. *Cell*, 2007, 130 (6): 979-981. DOI: 10.1016/j.cell.2007.09.009.
- [15] Liaunardy-Jopeace A, Bryant CE, Gay NJ. The COP II adaptor protein TMED7 is required to initiate and mediate the delivery of

- TLR4 to the plasma membrane [J]. *Sci Signal*, 2014, 7 (336): ra70. DOI: 10.1126/scisignal.2005275.
- [16] Sano H, Peck GR, Blachon S, et al. A potential link between insulin signaling and GLUT4 translocation: association of Rab10-GTP with the exocyst subunit Exoc6/6b [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 465 (3): 601-605. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.08.069.
- [17] Wang D, Lou J, Ouyang C, et al. Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107 (31): 13806-13811. DOI: 10.1073/pnas.1009428107.
- [18] Sharif R, Dawra R, Wasiluk K, et al. Impact of toll-like receptor 4 on the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury in mice [J]. *Gut*, 2009, 58 (6): 813-819. DOI: 10.1136/gut.2008.170423.
- [19] Cen Y, Liu C, Li X, et al. Artesunate ameliorates severe acute pancreatitis (SAP) in rats by inhibiting expression of pro-inflammatory cytokines and Toll-like receptor 4 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 38: 252-260. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.06.007.
- [20] Cao C, Yin C, Shou S, et al. Ulinastatin protects against LPS-induced acute lung injury by attenuating TLR4/NF- κ B pathway activation and reducing inflammatory mediators [J]. *Shock*, 2018, 50 (5): 595-605. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001104.
- [21] Luan ZG, Zhang XJ, Yin XH, et al. Downregulation of HMGB1 protects against the development of acute lung injury after severe acute pancreatitis [J]. *Immunobiology*, 2013, 218 (10): 1261-1270. DOI: 10.1016/j.imbio.2013.04.013.
- [22] Chen X, Zhao HX, Bai C, et al. Blockade of high-mobility group box 1 attenuates intestinal mucosal barrier dysfunction in experimental acute pancreatitis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 6799. DOI: 10.1038/s41598-017-07094-y.
- [23] Pan LF, Yu L, Wang LM, et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) regulates acute pancreatitis via inhibiting HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10 (2): 402-410.
- [24] Ma J, Chadban SJ, Zhao CY, et al. TLR4 activation promotes podocyte injury and interstitial fibrosis in diabetic nephropathy [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (5): e97985. DOI: 10.1371/journal.pone.0097985.
- [25] Lin M, Yiu WH, Wu HJ, et al. Toll-like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23 (1): 86-102. DOI: 10.1681/ASN.2010111210.
- [26] Cao C, Chai Y, Shou S, et al. Toll-like receptor 4 deficiency increases resistance in sepsis-induced immune dysfunction [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 54: 169-176. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.11.006.
- [27] Komatsu H, Shimose A, Shimizu T, et al. Trypsin inhibits lipopolysaccharide signaling in macrophages via toll-like receptor 4 accessory molecules [J]. *Life Sci*, 2012, 91 (3-4): 143-150. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.06.030.
- [28] Okamoto N, Mizote K, Honda H, et al. Funiculosin variants and phosphorylated derivatives promote innate immune responses via the Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor-2 complex [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292 (37): 15378-15394. DOI: 10.1074/jbc.M117.791780.
- [29] 庄宁彤, 赵冬久, 史丽云. Toll 样受体 4 (TLR4) 的内吞通路及其调控机制研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32 (11): 1574-1578.
- [29] Zhuang NT, Zhao DJ, Shi LY. Advances in endocytic pathway and regulation mechanism of Toll-like receptor 4 (TLR4) [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2016, 32 (11): 1574-1578.
- [30] Satoh T, Akira S. Toll-like receptor signaling and its inducible proteins [J]. *Microbiol Spectr*, 2016, 4 (6): DOI: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0040-2016.
- [31] Li J, Bao L, Zha D, et al. Oridonin protects against the inflammatory response in diabetic nephropathy by inhibiting the TLR4/p38-MAPK and TLR4/NF- κ B signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 9-19. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.11.040.
- [32] Wang B, Wu C. Dietary soy isoflavones alleviate dextran sulfate sodium-induced inflammation and oxidative stress in mice [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14 (1): 276-282. DOI: 10.3892/etm.2017.4469.
- [33] Zhou X, Liu Z, Cheng X, et al. Socs1 and Socs3 degrades Traf6 via polyubiquitination in LPS-induced acute necrotizing pancreatitis [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e2012. DOI: 10.1038/cddis.2015.342.
- [34] Rajaiyah R, Perkins DJ, Ireland DD, et al. CD14 dependence of TLR4 endocytosis and TRIF signaling displays ligand specificity and is dissociable in endotoxin tolerance [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112 (27): 8391-8396. DOI: 10.1073/pnas.1424980112.
- [35] Gao W, Xiong Y, Li Q, et al. Inhibition of Toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: a journey from molecular to nano therapeutics [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 508. DOI: 10.3389/fphys.2017.00508.