

TLR4 在急性肺损伤中的作用

唐婧¹ 综述,莫中成²,王德明¹ 审核

(1. 南华大学附属第二医院麻醉科,湖南 衡阳 421001;2. 南华大学医学院组胚教研室)

摘要: 急性肺损伤(ALI)在临床上以顽固性低氧血症、弥漫性肺浸润和肺微血管通透性增高引起的肺水肿为主要表现,是肺部失控的炎症反应。TLR4 是识别脂多糖(LPS)的受体,介导炎症反应,可以使中性粒细胞聚集,介导肺组织的损伤。TLR4 表达水平决定了内毒素造成急性肺损伤的程度,以 TLR4 为靶点,对其转录信号的特异性抑制干扰介入治疗有望对肺损伤的预后有益。

关键词: TLR4 信号转导; 炎症; 肺损伤

中图分类号: R563 **文献标识码:** A

Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)是识别脂多糖(LPS)的受体,可以早期识别侵入体内的 G-细菌启动炎症反应,并活化通用转录因子 NF- κ B、AP-1 等,最终引起以 TNF- α 、IL-1 等为中心的促炎因子激活,放大炎症效应,导致多种炎症因子的瀑链式释放,形成二次打击,而产生生物学损伤效应。因此,探索从“源头”控制炎症介质的产生和释放,并对其涉及的细胞信号分子进行相关的研究,可望为阐明 TLR4 在急性肺损伤(Acute Lung Injury, ALI)发生发展中的作用及机制提供新的思路。

1 Toll 样受体 4 的结构、功能及其分布

1.1 Toll 样受体 4 的结构

已被识别的哺乳动物 Toll 样受体(TLR)家族成员至少有 13 个,而人类拥有 10 种 Toll 样受体(T1-T10),它们针对不同的病原体成分诱导精细的抗感染固有免疫^[1]。TLR4 是最为特殊的 TLRs 家族成员,其基因位于染色体 9q32~33, cDNA 长度有 3811bp, 879 个氨基酸。TLR4 蛋白属于 I 型跨膜蛋白,由细胞外区、跨膜区和细胞内区三个部分组成。胞外区能特异性识别 PAMPs;胞内区与 IL-1 受体胞内区的保守序列有高度同源性,故被称为 Toll/IL-1

受体结构域(TIR)。因此,TLR4 也属于 IL-1 受体超家族成员。TIR 区域是 TLR4 与其配体结合后激活下游相关信号转导分子相互作用的关键部位,介导下游信号的转导^[2-3]。

1.2 TLR4 的配体

双链 RNA、脂多糖和鞭毛蛋白属于 TLR4 的外源性配体,它们与 TLR4 结合后产生信号瀑布式传递,并导致前炎症介质的释放和其后的免疫反应。此外,Matzinger^[4]的“危险模式”理论提出,体内还可出现内源性危险信号,这些危险信号主要来自损伤变性、坏死或者凋亡的细胞,如细胞损伤时产生的热休克蛋白、抗菌素、透明质酸、硫酸乙酰肝素、神经介质、细胞因子、纤维蛋白原,以及死亡细胞释放的蛋白如 HMGB1(高迁移率族蛋白-1)等等^[5]。另外,肺泡表面蛋白(surfactant protein, SP)也可激活 TLR4 信号通路。

HMGB1 和 TLR4 之间的相互作用增强了 NETs(Neutrophil extracellular traps)的形成, HMGB1 可以表明中性粒细胞相关性炎症疾病的严重程度。Toll 样受体参与的后期炎症反应中 HMGB1 起到致病性作用。抗 HMGB1 抗体的治疗可保护小鼠免受 LPS 诱导的致死危险,即使该治疗被延误数小时后可起保护作用,因为抗 HMGB1 抗体也可在早期促炎细胞因子反应出现后起作用。然而,有研究已表明, HMGB1 自身没有促炎活性,并且只能通过巨噬细胞上的 TLR4 或结合到促炎介质(如 IL-1 β , LPS 或 DNA)的时候,才能诱导细胞因子的产生^[6-7]。

1.3 TLR4 的分布和生物学功能

TLR4 在免疫相关的细胞,如单核巨噬细胞、中

收稿日期:2013-6-5

基金项目:湖南省自然科学基金资助(11JJ3120)。

作者简介:唐婧,硕士在读,研究方向:ALI 发病机制及防治, E-mail: tangjingfaiting@163.com. 通讯作者王德明,教授,硕士生导师, E-mail: web@nh2h.com.

性粒细胞、树突状细胞、B 淋巴细胞中表达丰富。在肺分布广泛,在呼吸道上皮细胞,血管内皮细胞也有表达。作为参与固有免疫的重要受体,TLR4 不仅能识别细菌还能识别病毒的病原菌相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 而且是唯一能利用 4 种转接分子 (TIRAP/MyD88, TRAM/TRIF) 传递信号级联反应、促进炎症因子和干扰素分泌的受体,在启动固有免疫和获得性免疫中发挥重要作用。

TLR4 经配体刺激后,通过四种转接分子 TIRAP/MyD88, TRAM/TRIF 连接下游信号,最终活化转录调节因子,如 NF- κ B、AP-1 和一系列的干扰素调节因子 (interferon regulatory factors, IRFs), 诱导感染细胞分泌炎症因子和 I 型 IFN (interferon), 启动固有免疫和获得性免疫应答。而活化的 TLR4 选择性募集不同的转接分子,导致 TLR4 有不同的信号通路及应答。TLR4 下游信号通路主要有两条: MyD88 依赖性信号转导通路 (TIRAP/MyD88), 主要介导炎症反应; MyD88 非依赖性信号转导通路 (TRAM/TRIF), 诱导 I 型 IFN 应答^[8]。

2 TLR4 在急性肺损伤中的作用

由于外来致病菌的入侵, PAMPs 和 TLR4 结合以后,通过信号通路的转导,激活 NF- κ B 和 IFN, 释放大量的前炎症介质如 TNF- α 、IL- β 、IL-1、IL-6、IL-8 和 MIP-1 等因子,诱导大量的炎症细胞生成和浸润,影响着疾病的发生发展和预后。

近年来,肺泡巨噬细胞 (Alveolar Macrophages, AMs) 在 ALI 发病中的作用倍受重视。有试验表明, ALI 发病 6-24 h 期间,肺泡巨噬细胞数量迅速增加, TLR4 表达增加,且持续时间长,因而其在 ALI 发病中的作用引起了广泛的关注。AMs 不但能释放一系列损伤性促炎因子,更重要的,它是肺脏局部趋化因子的主要策源地,可募集大量 PMNs 在肺内积聚,进而造成肺损伤^[9]。另一方面,肝 X 受体的活化后,为巨噬细胞通过 TLR4 信号转导通路的诱导增强抗菌反应做准备,提高机体对 LPS 反应信号通路的敏感性,从而增加 MCP-1 和 TNF α 分泌,减轻肺部的炎症损伤^[10]。也有研究证实,半乳糖苷酶-9 可通过 TLR4 下调,抑制巨噬细胞释放炎症细胞因子,防止 ALI 的进一步恶化^[11]。

TLR4 在清除 RSV (呼吸道合胞病毒) 感染中起

着重要的作用, RSV 外壳蛋白可与 NF- κ B 结合,并诱导人类和鼠单核细胞和巨噬细胞基因的表达^[12]。同时, TLR4 缺陷小鼠肺部的 CD 14 细胞损伤, NK 细胞功能障碍, IL-1 表达受损,造成病毒清除障碍^[13]。

在吸烟诱导肺损伤和 COPD 患者中 TLR4 表达上调已被证实。失血诱导的肺损伤,中性粒细胞的集聚和蛋白渗漏与 NF- κ B 激活无关,而依赖于 TLR4 的功能^[14]。TLR4 缺陷小鼠在博莱霉素诱导的非感染性肺损伤体内实验中,中性粒细胞显著减少,但是肺组织切片却显示间质增厚,间质炎症细胞大量积聚,支气管肺泡灌洗液里也有更多的蛋白积聚。TLR4 缺陷小鼠上皮细胞不能诱导中性粒趋化因子的产生,造成了肺间质积聚和对病原体的敏感性增强^[15-16]。研究发现,肺损伤时细胞外基质主要成分透明质酸可激活肺泡上皮细胞 TLR4 信号通路,通过 MyD88 途径减少上皮细胞的凋亡,起到保护肺损伤,促进肺修复的作用^[17]。在胸部外伤导致肺挫裂伤的动物,肺部炎症依赖于 TLR4 的激活。通过 MyD88 途径使化学趋化因子 CXCL 产生增加,从而导致中性粒细胞在肺部聚集^[18]。

但在失血性休克 + 内毒素的“二次打击”肺损伤模型中,休克/复苏过程同时扮演了阻碍 LPS 诱导的 TLR4 mRNA 不稳定和增强 LPS 刺激的 TLR4 基因转录的作用。需要特别指出的是,休克最终阻止了 LPS 诱导的 TLR4 mRNA 量的减少。该实验说明,非感染性肺损伤可能会通过调节 TLR4 的敏感性从而改变对感染性刺激因子的反应性^[19]。

最近的研究显示:在 TLR4 缺陷小鼠的急性肺损伤中运用,观察到小鼠肺组织顺应性和气道阻力变化不大,ALI 转归更快。这些变化与降低血管通透性和氧化应激有关系。ALI 诱导的血管通透性与 CysLT-CysLT1 受体信号有关,且 ALI 转归与可以调节氧化应激的 SOCS3 的表达密切相关^[20]。

3 TLR4 在急性肺损伤治疗中的前景与展望

急性肺损伤 (ALI) 从富含蛋白质的肺水肿,顽固的低氧血症,恶化成进行性呼吸衰竭,最严重的阶段为 ARDS (急性呼吸窘迫综合征)。大量的流行病学调查显示 ALI 的发病率和病死率很高。当炎症因子过度表达,抗炎症因子提供的控制并不足以抵抗

前炎症因子的效应时,就发生 ALI。以前研究的热点,诸如 NF- κ B、TNF- α 、IL- β 、IL-1、NO 及氧自由基等被认为是调控炎症反应强弱的核心。但这些因子本身不是受体,不能直接感知各种刺激,属于下游事件。而 TLR4 是识别 LPS 的受体,作为固有免疫反应的“哨兵”蛋白,可以使中性粒细胞聚集,介导肺组织的损伤。

SPA4 肽区有助于 SP-A-TLR4 相互作用,并抑制 LPS 诱导的 NF- κ B 和 TNF- α 的活性。Ramani V 等^[21]观察到 SPA4 肽抑制 TNF- α 表达,影响 NF- κ Bp65 的核定位和细胞融合,从而减轻小鼠模型的内毒素性休克样症状。这表明 SPA4 肽通过结合 TLR4 发挥抗炎活性,对 ALI 有治疗意义。同样,PI3K- γ 的抑制可以降低树突状细胞的渗透和 TLR4 在肺中的表达,从而减轻 ALI。由于其潜在的促炎症作用和广泛的分布,决定了它在肺部炎症性疾病中的重要作用。

最近的研究表明,TLR4 基因表达增加,会导致 TNF 和趋化因子配体产物增多、微血管和肺泡上皮损伤,且伴有蛋白向气道渗漏和肺部微小结构的破坏。转染 Ad-siTLR4,可有效地下调体内或者体外 TLR4 的表达,也减轻了 LPS 诱导的肺损伤^[22]。此外,刺囊酸可以通过抑制 LPS 与有或无 MyD88 siRNA 转染的肺巨噬细胞上的 TLR4 的结合,从而表达抗炎作用^[23]。

TAK-242、E5564 作为 TLR4 的抑制剂,能有效抑制肺内中性粒细胞聚集和激活,减少肺通透性增加和炎症介质的产生,降低 LPS 刺激诱导的 NF- κ B 的 DNA 结合活性^[24]。

综上所述,无论感染因素还是非感染因素导致的急性肺损伤,均通过 TLR4 信号通路的调节发挥炎症效应,降低 TLR4 表达水平或抑制 TLR4 的下游信号可以有效减轻炎症反应,从而抑制急性肺损伤的发生发展。因此以 TLR4 为靶点,对其转录信号的特异性抑制干扰介入治疗有望改善肺损伤的预后。

参考文献:

[1] Yokota S, Okabayashi T, Yokosawa N, et al. Measles virus P protein suppresses Toll-like receptor signal through up-regulation of ubiquitin-modifying enzyme A 20[J]. *Faseb J*, 2008, 22(1): 74-83.

[2] Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pat-

tern-recognition receptors and their cross talk [J]. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76: 447-480.

[3] Abe T, Kaname Y, Hamamoto I, et al. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines [J]. *J Virol*, 2007, 81(17): 8953-8966.

[4] Matzinger P. The gangster model: a renewed sense of self [J]. *Science*, 2002, 296(5566): 30.

[5] Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through Toll-like receptor 4 [J]. *J Immunol*, 2001, 167(5): 2887-2894.

[6] Tadie JM, Bae HB, Jiang S, et al. HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4 [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 304(5): 342-349.

[7] Lorne E, Dupont H, Abraham E. Toll-like receptors 2 and 4: initiators of non-septic inflammation in critical care medicine [J]. *Intensive Care Med*, 2010, 36(11): 1826-1835.

[8] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(7): 499-511.

[9] Chopra M, Reuben JS, Sharma AC. Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2009, 234(4): 361-371.

[10] Fontaine C, Rigamonti E, Nohara A, et al. Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages [J]. *Circ Res*, 2007, 101(1): 40-49.

[11] Kojima K, Arikawa T, Saita N, et al. Galectin-9 attenuates acute lung injury by expanding CD14- plasmacytoid dendritic cell-like macrophages [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 184(3): 328-339.

[12] Haeberle HA, Takizawa R, Casola A, et al. Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor- κ B in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways [J]. *J Infect Dis*, 2002, 186(9): 1199-1206.

[13] Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, et al. Involvement of Toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus [J]. *J Virol*, 2001, 75(22): 10730-10737.

[14] Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, et al. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients [J]. *Respir Res*, 2005, 6(1): 68.

[15] Zhang XC, Shan PY, Qureshi S, et al. Cutting edge: TLR4 deficiency confers susceptibility to lethal oxidant

- lung injury[J]. J Immunol, 2005, 175(8):4834-4838.
- [16] Jiang DH, Liang JR, Fan J, et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan [J]. NatMed, 2005, 11(11):1173-1179.
- [17] Noble PW, Jiang D. Matrix regulation of lung injury, inflammation, and repair; the role of innate immunity[J]. Proc Am Thorac Soc, 2006, 3(5):401-404.
- [18] J. Jason Hoth, Jonathan D. Wells, Noel A. Brownlee, et al. Toll-like receptor 4-dependent responses to lung injury in a murine model of pulmonary contusion[J]. Shock, 2009, 31(4):376-379.
- [19] Fan J, Kapus A, Marsden PA, et al. Regulation of Toll like receptor-4 expression in the lung following hemorrhagic shock and lipopolysaccharide [J]. J Immunol, 2002, 168(10):5252-5259.
- [20] Hilberath JN, Carlo T, Pfeffer MA, et al. Resolution of Toll-like receptor 4-mediated acute lung injury is linked to eicosanoids and suppressor of cytokine signaling 3 [J]. FASEB J, 2011, 25(6):1827-1835.
- [21] Ramani V, Madhusoodhanan R, Kosanke S, et al. A TLR4-interacting SPA4 peptide inhibits LPS-induced lung inflammation[J]. Innate Immunity, 2013, [Epub ahead of print].
- [22] Wu F, Liu Y, Lv X, et al. Small interference RNA targeting TLR4 gene effectively attenuates pulmonary inflammation in a rat model[J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012:406-435.
- [23] Joh EH, Gu W, Kim DH. Echinocystic acid ameliorates lung inflammation in mice and alveolar macrophages by inhibiting the binding of LPS to TLR4 in NF- κ B and MAPK pathways[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 84(3):331-340.
- [24] Seki H, Tasaka S, Fukunaga K, et al. Effect of Toll-like receptor 4 inhibitor on LPS-induced lung injury[J]. Inflamm Res, 2010, 59(10):837-845.

(此文编辑:秦旭平)

精品阅读

C/EBP β 控制耐力运动诱发的心脏生理性生长和抗病理性重构

Pontus Boström, Nina Mann, Jun Wu, Pablo A Quintero, Eva R Plovie, Daniela Panáková, Rana K Gupta, Chunyang Xiao, Calum A MacRae, Anthony Rosenzweig, and Bruce M Spiegelman

心肌能通过使其细胞增大来适应外界压力的增加,这一应激反应适应于生理性刺激或病理性刺激对心脏造成的高负荷压力。例如,在负荷运动,高血压等刺激下,心肌都会出现明显的肥大和增殖现象。病理性心肌肥大可导致心力衰竭或心律失常,但生理性肥厚却不能引起这些疾病,所以弄清楚这两种类型的心肌肥大分子机制具有重要的临床意义。以往对病理性心肌肥大相关的转录因子报道较多,但对于调控心肌生理性肥大的分子机制则了解甚少。C/EBP β (CCAAT/enhancer-binding protein β)是转录因子 bHLH 基因家族成员之一,其主要功能是调控细胞增殖、分化基因的转录。本研究发现;小鼠在坡道上进行游泳运动训练诱导产生了生理性心肌肥大,伴随着 C/EBP β 基因的表达下调,和 CITED4(是一种转录辅助激活因子)上调。反过来,利用 siRNA 沉默 C/EBP β 基因能使体外培养的心肌细胞发生增殖,证实了生理性心肌肥大现象可以由 C/EBP β 基因下调,并由 CITED4 介导或部分介导。这提示,C/EBP β 基因表达下调诱导的细胞增殖效应可能是由负调控 CITED4 传达的。另外,本研究还在以下方面有所发现:斑马鱼胚胎中 C/EBP β 下调能有效地引发心肌细胞增殖,同样的结果也出现在 C/EBP β 基因杂合小鼠中;遗传性 C/EBP β 水平低下的小鼠在心脏表型上与常运动的小鼠有很多相同之处;C/EBP β 水平低下的小鼠在心脏衰竭或负载过重时能有效地抵抗心脏功能紊乱。这些资料表明 C/EBP β 作为一个信号中心可抑制由生理性刺激引起的成年哺乳类动物心脏心肌细胞的生长和增殖。

(骆镜妃 阅读,秦旭平 审阅)(Cell 2010;Cell 143:1072-1083)