

TLR4 在哺乳动物对脂多糖反应中的作用*

龚小卫 姜 勇**

(第一军医大学病理生理教研室和全军休克微循环重点实验室, 广州 510515)

摘要 Toll 信号转导通路在果蝇的发育和天然免疫反应中起重要作用. 最近在小鼠进行的定点克隆研究表明 *Lps* 位座编码一种 Toll 样受体 TLR4, 该受体作为 LPS 受体复合物的跨膜成分而转导脂多糖 (LPS) 信号, 而其相关蛋白 TLR2 则在其他病原体微生物介导的细胞反应中起作用. TLR4 的发现使我们对 LPS 信号转导通路的认识前进了一大步.

关键词 Toll 样受体 4, 脂多糖, 信号转导

学科分类号 Q288

目前, 革兰氏阴性 (G^-) 细菌内毒素 (endotoxin), 即脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 导致的感染和中毒性休克仍是引起临床病人死亡的重要原因. LPS 的识别和信号转导是宿主对 G^- 菌发生防御反应的关键. Ulevitch 实验室在 1986 年发现并克隆了 LPS 结合蛋白 (LPS binding protein, LBP), 1990 年又发现了 CD14 是 LPS 的受体, 在此基础上提出 LPS 介导细胞反应的过程: LBP 与 LPS 结合并将其转运到髓样细胞的膜上, 与膜 CD14 (mCD14) 结合形成复合物, 通过跨膜信号分子将信号转导到细胞内. 这些发现对于人们认识 LPS 介导的细胞反应起到重要的里程碑作用. 但由于 CD14 与多种传递信号的跨膜信号受体不同, 没有跨膜区和胞浆内段, 因此不能直接和细胞内进行信息交流. 人们推测, LPS 受体属于“多构件受体”, 包含至少两种以上的蛋白质; CD14 是主要的配基结合构件, 而其他蛋白质则作为跨膜受体 (transmembrane receptor, Rt) 而介导 LPS 与 CD14 结合后的跨膜信号转导^[1]. 那么, 这种 (些) “其他蛋白” 究竟是什么呢? Beutler 等的出色工作回答了这个问题一直悬而未决的难题, 使我们对 LPS 的信号转导通路的认识有了长足的进步. 本综述将对 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 的发现和鉴定及其在 LPS 信号转导通路中的作用做详细讨论.

1 果蝇 Toll 信号转导通路概述

Toll 是与果蝇胚胎发育早期背腹侧轴形成有关的信号通路中一种必不可少的成分. 在果蝇胚胎的发育过程中, *Spätzle* 基因编码的 *Spätzle* 蛋白以一

种无活性的前体形式分泌, 这种前体能被丝氨酸蛋白酶水解而激活. *Spätzle* 被激活后转而激活 Toll, 激活的 Toll 随后作用于其下游底物 Tube 和 Pelle. 具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的 Pelle 使 Cactus 降解, 原来与 Cactus 形成复合体的 Dorsal 将移位入核并激活一系列特异的靶基因转录, 从而对胚胎的发育进行调节.

后来发现, 除了在胚胎发育过程中起作用外, Toll 信号通路还是一种介导果蝇对微生物感染产生天然免疫反应的重要信号转导通路^[2]. 微生物细胞壁的某些成分是天然免疫反应的强烈激活因子, 这些被称为病原体相关分子模型 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 的分子, 包括革兰氏阴性菌的 LPS, 革兰氏阳性菌的肽聚糖 (peptidoglycan) 和脂胞壁酸 (lipoteichoic acid, LTA) 及真菌的甘露聚糖 (mannans) 等, 都能激活 Toll 信号转导通路. 在微生物感染时, PAMPs 将诱导一组编码抗微生物多肽的基因转录. 酵母感染能强烈诱导抗真菌多肽的产生, 但对抗细菌多肽的诱导作用则相当微弱. 相反, 细菌感染时, Toll 家族的另一个成员 18-wheeler 在诱导抗细菌多肽基因 *attacin* 的转录中起重要作用. 这说明不同的 PAMPs 能激活不同的 Toll 家族成员并导致特定的靶基因转录. 所有的抗微生物多肽基因上游区都含有 κB 元件, 提示 Rel/NF- κB (nuclear factor κB) 蛋白可能是昆虫免疫反应的激活因子.

* 国家杰出青年科学基金 (39925014)、国家自然科学基金重点项目 (39830400) 和军队杰出人才基金 (98J003) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 020-85148231, E-mail: yjiang@public.guangzhou.gd.cn

收稿日期: 2000-06-05, 接受日期: 2000-07-07

在哺乳动物细胞中,也存在与果蝇 Toll 通路类似的信号通路. Medzhitov 等^[3]首次鉴定和克隆了人类的一种 Toll 同源物,并证实它能诱导 NF- κ B 激活,并启动受 NF- κ B 调控的炎症因子如 IL-1、IL-6 和 IL-8 等的基因转录,同时还能激活共刺激分子 B7.1 的表达. 目前,在已知的果蝇基因组序列中发现了 7 种与 Toll 相关的基因;随着人类基因组计划 (human genome project, HGP) 的进展,在人类发现了 6 种 Toll 家族蛋白,分别被命名为 TLR1~6. Toll 家族的所有成员都是单跨膜蛋白,胞外区都包含 18~31 个富含亮氨酸的重复序列 (leucine-rich repeats, LRR);其胞质区大约为 200 个氨基酸大小,与 IL-1 受体的胞质区相似,因而被称为 Toll/IL-1 受体同源区 (Toll/IL-1 receptor homologous region, TIR). 人 TLR4 与果蝇 Toll 的 TIR 有 32% 同源,而与 IL-1 受体的 TIR 仅 20% 同源. Toll 家族成员的胞外区之间也具有较大的差异性 (例如 TLR2 和 TLR4 的胞外区仅 24% 同源),这可能是各种不同配体激活不同受体的结构基础^[2]. 小鼠和人同源基因的胞外区之间的差异也相当显著;例如,人和小鼠的 TLR4 胞外区仅 53% 相同,而胞质区则有 83% 相同,这可能是不同生物对同一病原体侵袭的反应性不同的基本机制之一.

2 哺乳动物中 TLR4 的发现

30 年前,人们曾普遍认为 LPS 可能通过嵌入细胞膜或与许多不同的受体结合而产生生理学效应. 后来,当认识到小鼠的 LPS 感受器是一种被称为 *Lps* 的单基因编码的产物后,这种假说就被推翻了. *Lps* 基因突变的小鼠对 LPS 完全耐受,而对其他微生物产物及 LPS 诱导产生的细胞因子都能产生正常的反应,同时其免疫发育和免疫反应没有受到影响. 从理论上讲,应当存在单一的通路来转导 LPS 的跨膜信号,因为如果存在其他通路的话, *Lps* 突变体的纯合子将不会完全失去对 LPS 的反应^[4]. 据此,一些实验室进行了寻找 *Lps* 基因的工作.

早在 1978 年,人们就发现 *Lps* 位于小鼠的第 4 条染色体,并将其定位于 *Mup-1* 和 *Ps* 两个远隔位点之间. 从 1994 年开始,美国的三个实验室 (分别由 Malo, Schwartz 和 Beutler 领导) 通过严格定位的方法各自独立地对 *Lps* 进行鉴定和克隆. 1996 年,Politorak 等^[5]将该基因限定在他们命名为

“B”和“83.3”的两个新标志之间 (约 2.6 Mb 大小) 的位置. 随后,他们进一步将其发现的区域进行了完全测序,并通过一种计算机辅助的生物信息学方法进行了分析,最后在该区域内发现了一个编码 TLR4 的单基因. 在 TLR4 作为 *Lps* 唯一的候选者而得到鉴定后,Politorak 等^[6]通过对 TLR4 基因的突变,产生了两个小鼠株 C3H/HeJ 和 C57BL/10ScCr. 在 C3H/HeJ 小鼠中,TLR4 的胞质区的一个保守的脯氨酸 (P) 突变为组氨酸 (H) (表示为 P712H);而 C57BL/10ScCr 小鼠则是 TLR4 的一个无义突变体,不能产生 TLR4 mRNA. 这两个小鼠株都不能对 LPS 的刺激产生反应,说明 *TLR4* 基因的突变使细胞丧失了对 LPS 的反应能力.

然而, Yang 等^[7]利用编码 TLR 家族各成员的 cDNA 与一个 CD14 表达质粒及一个能检测 NF- κ B 核移位的报告基因共转染 293 细胞,得到的结果却是 TLR2 是使 293 细胞对 LPS 产生反应的信号转导受体,而未能发现 TLR4 在 LPS 的信号转导中起作用.

尽管这些研究者的论文在发表后数月内被广泛引用并引起了很大反响,但最终起决定作用的遗传学研究向这些结论提出了强有力的挑战. 首先,在 *TLR2* 基因缺陷的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中,一个移码突变使 TLR2 的肽链合成提前中止,产生一种没有胞质区的分泌蛋白,但这些细胞仍能对 LPS 产生一定的反应^[8]. 其次,更令人确信的是,小鼠 *TLR2* 基因敲除对 LPS 的信号转导完全没有影响,其等位基因敲除的纯合子对 LPS 的反应与正常对照具有相同的活性^[9]. 但是与此相反, *TLR4* 的基因敲除突变体则表现出一种典型的 *Lps* 突变的表型^[10]. 因此, LPS 的信号转导并不需要 TLR2 的参与. Yang 等未发现 TLR4 在 LPS 信号转导通路中起作用,这可能是由于使用的细胞系不同的缘故. 另外, Shimazu 等^[11]的研究表明,用一种与 TLR4 具有亲和力的分泌蛋白 MD-2 与 TLR4 共转染 293 细胞时,能使 TLR4 对 LPS 产生反应. 因此, LPS 的信号转导需要 MD-2 (可能还有其他蛋白质) 与 TLR4 的共同作用,这似乎也可以解释上述转染实验的结果.

目前,多数学者都倾向于 TLR4 在 LPS 的信号转导通路中起作用,而 TLR2 则是其他微生物病原体的信号转导因子. 例如, Lien 等^[12]报道, TLR2 能作为一种模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 来识别不同的病原体产物,包括某

些螺旋体属、支原体属及分枝杆菌属的微生物。TLR2 还能介导肽聚糖和脂胞壁酸诱导的细胞激活^[13]。除了这些实验证据外, 家族各个成员的胞外区之间差异较大, 其作用可能是识别不同的配体, 这也支持上述观点。另外, 在病原体微生物作用下, TLR2 可能还能介导其他生物学效应。例如, 在细菌脂蛋白刺激时, TLR2 能介导 THP-1 单核细胞凋亡^[14]。

3 TLR4 在 LPS 信号转导通路中的作用

TLR4 作为 LPS 的信号转导因子, 怎样感受/传导 LPS 信号是一个非常重要的问题。前期研究表明, CD14 是单核/巨噬细胞表面上重要的 LPS 结合蛋白。细胞表面的 CD14-LPS 复合体可能直接与 TLR4 结合, 然后依次转导 LPS 信号。LPS 与 TLR4 的作用可采用两种不同的模式^[1], 一种模式认为 TLR4 本身并不直接和 LPS 结合, 而是在 LPS 与 CD14 结合后使其构型发生变化, 再与 TLR4 作用; 另外一种模式则是 CD14 使 LPS 能够直接和跨膜蛋白结合, 预示着在不存在 CD14 的情况下 TLR4 仍可直接和 LPS 结合, 但其亲和力较低, 表明 CD14 能增强细胞对 LPS 的识别和反应, 但对信号转导并不是绝对必需的。这就合理地解释了 CD14 非依赖性信号传递。

但也有通过遗传学互补作用的研究证实 TLR4 和 LPS 之间存在物理作用的报道^[4]。在 C3H/HeJ 小鼠的巨噬细胞中表达人或鼠 TLR4 时, 人 TLR4 能区分脂质 A (LPS 的毒性成分) 和四酰基脂质 A (所有的二级酰基支链都被除去) 的不同, 而小鼠 TLR4 则对两种分子都起反应, 说明人 TLR4 与配体之间有密切接触。而且, 由于不同种属 (人和小鼠) TLR4 分子之间结构上的差异能导致对特定配体 (四酰基脂质 A) 产生不同的反应, 因此 TLR4 外侧结构域的某些氨基酸差异可能是对特定 LPS 分子产生不同反应的原因。

4 TLR4 的下游信号通路

4.1 TLR4 激活 NF- κ B 的信号过程

在果蝇和哺乳动物细胞中, Toll 受体的信号由受体复合物、I κ B 激酶 (I κ B kinase, IKK) 复合物和能降解 I κ B (inhibitor of NF- κ B) 的复合物依次介导。

在 LPS 刺激时, 受体将形成一个复合物。该复合物包括一种适配体蛋白 (哺乳动物为 MyD88,

果蝇为 Tube), 和丝氨酸-苏氨酸天然免疫激酶 (serine-threonine innate immunity kinase, SIHK) 家族的一种激酶 [哺乳动物为 IL-1 受体相关激酶 (IL-1 receptor-associated kinase, IRAK), 果蝇为 Pelle]。MyD88 的氨基端具有一个与肿瘤坏死因子受体 (tumor necrosis factor receptor, TNF-R) 超家族成员的胞质区相关的死亡结构域 (death domain, DD), 羧基端则有一个 TIR 结构域。其 TIR 结构域存在于胞质中, 并与激活的 IL-1 受体的胞质区形成蛋白质复合体来参与 TLR4 的信号转导。MyD88 基因敲除的小鼠对 LPS 不起反应^[15], 这与 TLR4 突变体的表型非常相似, 说明它们在同样的生化过程中起作用。IRAK 是一类在 IL-1 的信号转导中起作用的激酶, 能与 IL-1 结合并被其激活, 其功能的缺失将阻断 IL-1 信号转导通路。但 IRAK 在 LPS 信号转导通路中的作用尚不明确。

在哺乳动物细胞中, 目前认为 TNF 受体相关因子 6 (TNF-receptor-associated factor 6, TRAF6) 在受体复合物与第二种蛋白质复合物——能磷酸化 I κ B 的 I κ B 激酶 (IKK) 复合物或信号小体 (signosome) 之间起连接作用。Traf 6 突变体小鼠的细胞在 LPS 的作用下, 不能激活 NF- κ B, 证实 TRAF6 在 LPS 信号转导通路中起作用。另外, 通过对小鼠的两个 IKK 亚单位——IKK α 和 IKK β 进行定向突变产生的表型表明, 细胞因子依赖的 NF- κ B 的激活需要 IKK β 的参与。从这些突变表型获得的结果证实这两种蛋白质具有不同的功能。缺乏 IKK α 的小鼠由于皮肤和骨骼缺陷而在胚胎形成末期死亡^[16]; 而且这些纯合子突变体动物的成纤维细胞能对 IL-1 和 TNF- α 起正常反应而激活 NF- κ B。与此相反, 缺乏 IKK β 的小鼠死于中孕期, 其表型与一种缺乏 p65 亚单位的 NF- κ B 的小鼠非常相似。在受到 IL-1 和 TNF- α 的作用时, IKK β 无义突变体的成纤维细胞不能激活 NF- κ B, 说明 IKK β 在该通路中起不可或缺的作用。

第三种蛋白质复合物能降解磷酸化的 I κ B。目前对于哺乳动物中这种蛋白质复合物的作用还不清楚。

4.2 TLR4 对 MAPK 的调控

丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是细胞内一类重要的信号分子。除了激活 NF- κ B 以外, LPS 的刺激还可激活不同的 MAPK 通路 (图 1)。Weinstein 等发现 LPS 刺激巨噬细胞导致细胞内的多个蛋白质磷酸

化, 其中两个磷酸化蛋白质被确认为是 MAPK 超家族的成员: ERK1 和 ERK2. 除了 ERK 外, p38 MAPK 也能在 LPS 作用时发生酪氨酸磷酸化. 我们发现, LPS 刺激 RAW 细胞时, p38 会迅速发生核移位, 通过对转录因子磷酸化诱导 TNF- α 基因转录表达^[17]. 其他 MAPK 与 p38 类似, 被磷酸化激活后可转移到不同的细胞部位, 作用到细胞内相应的目标, 从而发挥不同的调节功能. 然而, 目前仍不清楚 LPS 通过 TLR4 将信号转导至细胞内并导致各条 MAPK 通路的激活的确切机制. 由于 CD14 缺乏胞浆内段, TLR4 作为介导 LPS 信号的一个重要受体分子, 其对 MAPK 的分子调控机制已引起广泛的重视, 这方面的研究不久将可能取得重要突破.

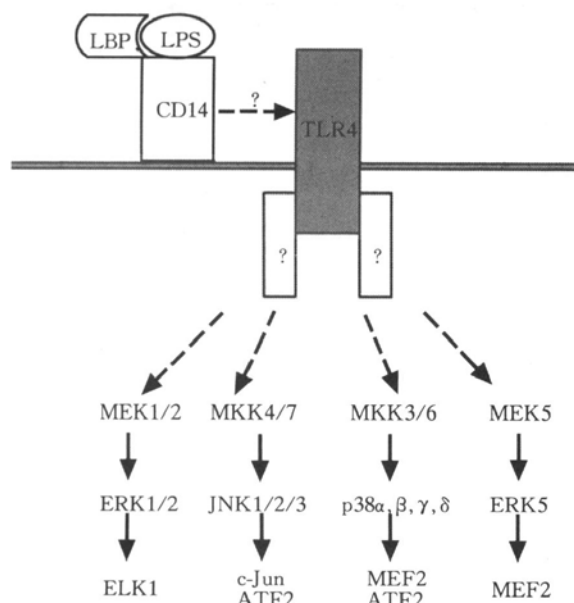


Fig. 1 Activation of MAPK signal transduction pathways through TLR4 by LPS

图1 LPS通过 TLR4 介导 MAPK 信号转导通路激活

5 展 望

天然免疫系统的血清蛋白和细胞都参与对病原体微生物的识别. 革兰氏阴性细菌的 LPS 是一类重要的病原体微生物成分. 目前的研究已经阐明, LBP 与 LPS 结合并将其转运到 CD14 上, 通过 TLR4 将信号转导到细胞内. 然而, 尽管 TLR4 的发现使我们对天然免疫系统对 LPS 的响应的认识达到了一个新的水平, 但是仍有许多问题有待解决. 例如, 对于可能存在的其他 Toll 样受体的鉴定和功能研究; 各种 Toll 样受体如何识别不同的

PAMPs 并对其产生特异性的反应; TLR4 的细胞内作用目标; LPS 通过 TLR4 激活 MAPK 通路的确切机制; LPS 信号转导通路与其他信号通路之间的相互作用等等. 随着对 TLR4 研究的深入, 必将对感染、中毒性休克和全身炎症反应综合征的理论研究取得新的突破, 并对这些疾病的临床防治起到指导作用.

参 考 文 献

- 姜 勇. 内毒素激活内皮细胞的信号机制的研究进展. 中华医学杂志, 1999, **79** (1): 76~78
Jiang Y. Natl Med J China, 1999, **79** (1): 76~78
- Modlin R L, Brightbill H D, Godowski P J. The toll of innate immunity on microbial pathogens. N Engl J Med, 1999, **340** (23): 1834~1835
- Medzhitov R, Preston H P, Janeway C A Jr. A human homologue of the *Drosophila* toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature, 1997, **388** (6640): 394~397
- Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. Curr Opin Immunol, 2000, **12** (1): 20~26
- Poltorak A, Smirnova I, He X, et al. Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. Blood Cells Mol Dis, 1998, **24** (3): 340~355
- Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. Science, 1998, **282** (5396): 2085~2088
- Yang R B, Mark M R, Gray A, et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. Nature, 1998, **395** (6699): 284~288
- Heine H, Kirschning C J, Lien E, et al. Cutting edge: cells that carry a null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. J Immunol, 1999, **162** (12): 6971~6975
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. Immunity, 1999, **11** (4): 443~451
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. J Immunol, 1999, **162** (7): 3749~3752
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J Exp Med, 1999, **189** (11): 1777~1782
- Lien E, Sellati T J, Yoshimura A, et al. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. J Biol Chem, 1999, **274** (47): 33419~33425
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, et al. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. J Biol Chem, 1999, **274** (25): 17406~17409
- Aliprantis A O, Yang R B, Mark M R, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor 2. Science, 1999, **285** (5428): 736~739
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, et al. Unresponsiveness of

- MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 1999, **11** (1): 115~ 122
- 16 Hu Y, Baud V, Delhase M, *et al.* Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase. *Science*, 1999, **284** (5412): 316~ 320
- 17 姜 勇, 刘爱华, 黄巧冰, 等. p38 MAPK 参与 LPS 诱导 RAW 细胞 TNF- α 基因表达的调控. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31** (1): 9~ 15
- Jiang Y, Liu A H, Huang Q B, *et al.* *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1999, **31** (1): 9~ 15

The Role of TLR4 in Response to LPS in Mammals*

GONG Xiao-Wei, JIANG Yong**

(*Department of Pathophysiology and Key Laboratory for Shock and Microcirculation of PLA, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China*)

Abstract Toll signal transduction pathway plays a critical role in development as well as in innate immune responses in *Drosophila*. Positional cloning work proceeded in mice recently has revealed that *Lps* encodes the Toll-like receptor 4 (TLR4) of mammals, which functions as the transmembrane component of LPS receptor complex. In contrast, TLR2, a receptor closely related to TLR4, makes no contribution to LPS induced signaling. The discovery of TLR4 has greatly promoted understanding on the LPS signal transduction pathway.

Key words Toll-like receptor 4, lipopolysaccharide, signal transduction

* This work was supported by grants from National Science Fund for Distinguished Young Scholars (39925014), Grant of National Natural Science Foundation of China (39830400), and Grant for Outstanding Young Investigator of PLA (98J003).

** Corresponding author. Tel: 86-20-85148231, E-mail: yjiang@public.guangzhou.gd.cn

Received: June 5, 2000 Accepted: July 7, 2000