

Toll 样受体及其信号转导*

王梁华 司宇红¹⁾ 焦炳华**

(第二军医大学基础医学部卫生毒理学教研室, 上海 200433)

摘要 Toll 样受体 (TLR) 介导着绝大部分哺乳动物、昆虫及植物的宿主防御. TLR4 与配体结合涉及膜抗原 CD14 和分泌蛋白 MD-2 的调节并一起形成受体复合物, 然后与接头分子 MyD88 结合, 使 IRAK 磷酸化, 再使 TRAF6 寡聚化, 随后激活控制着各种效应基因表达的转录因子 NF- κ B.

关键词 病原识别, Toll 样受体 (TLR), 信号转导

学科分类号 R392

天然免疫的识别系统是由能够识别病原相关的分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 介导的, 这些受体信号转导所激活的通路控制着各种免疫应答所要表达的基因. 这些受体根据功能可分为三类: 信号受体、内吞受体及分泌蛋白. 内吞受体与分泌蛋白的作用已经研究得比较清楚, 发现了一系列具有内吞或调理作用的分子, 如抗体、补体参与的病原体或病原分子的内吞等. 但病原识别的直接信号受体直到最近随着发现 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 在果蝇和哺乳动物的宿主防御中的重要作用后才逐渐被确立, 因为 TLRs 所激活的细胞内信号正是控制着各种效应基因表达的转录因子 NF- κ B^[1].

1 TLRs 分子特征

TLRs 是最早于果蝇中发现的一类细胞膜蛋白, 目前报道人 TLRs 有六种, 分别被称为 TLR1~6, 它们的一些分子特征见表 1. TLRs 为一类 I

型跨膜蛋白, 其细胞外区域存在由 18~31 个氨基酸组成的富含亮氨酸的重复单位 (leucine-rich repeat, LRR). 它们的细胞外区域较长, 在 550~980 氨基酸之间, 而且同源性较差, 如 TLR2 与 TLR4 细胞外区域的同源性只有 24%, 提示 TLRs 各分子所结合的配体具有不同的结构、性质; 但各分子种属间的差异较小, 如人与鼠的 TLR4 的细胞外区域有 53% 的同源性, 而细胞内部分的同源性更高达 83%, 提示它们是一组非常保守的分子, 执行着相似的功能. TLRs 细胞内区域的其中约 200 个氨基酸与白介素 1 受体 1 (Interleukin-1R1, IL-1R1) 及其他数种植物疾病抵抗蛋白具有高度的同源性, 称 TIR (Toll/IL-1R1 homologous region). 图 1 显示了此保守区域的结构, 其中列出的 23 个氨基酸的位置是固定的, 所形成的三个区域分别为这些分子的标志区域和信号介导区域. 具有 TIR 结构的分子现在发现共有 31 种, 包括 IL-1R1、IL-1RAcP、IL-18R、某些细胞质蛋白和植物抗病毒蛋白以及其他一些不知其功能的相关蛋白.

Table 1 Structure characteristics of TLR families molecules

表 1 TLR 家族分子的结构特征

TLRs	cDNA/bp	LRR 数目	胞内区 特征结构	染色体 定位	表达
TLR1	2366	18	TIR	4q32	各类免疫细胞(广泛)
TLR2	2600	19	TIR	4q35	除 T.B.NK 外的免疫细胞(局限)
TLR3	3029	24	TIR	4p14	DC(特异)
TLR4	3811	22	TIR	1q33.3	除 T.B.NK 外的免疫细胞(局限)
TLR5	1275(部分)	4(部分)	TIR	9q32~33	除 T.B.NK 外的免疫细胞(局限)
TLR6	2388	20	TIR	4p12~15	广泛表达

* 国家自然科学基金资助项目 (39970041). ** 通讯联系人. Tel: 021-65493936, E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

¹⁾ 中国药科大学生物制药学院, 南京 210009. 收稿日期: 2000-06-12, 接受日期: 2000-08-23



Fig. 1 Structure of TIR

图1 TIR的结构

2 TLRs 所识别的病原分子

哺乳类 TLRs 的作用是从研究 TLR2 和 TLR4 两个分子介导内毒素功能开始的^[2~4]. 表 2 列出了与 TLR2、4 结合的分子. 对内毒素耐受的 C3H/HeJ 和 C57BL/10/ScCr 小鼠系的基因进行分析后, 发现就是由于 TLR4 分子第 712 位的脯氨酸被组氨酸所取代 (密码子 CCT 突变为 CAT), 而导致了对内毒素的耐受^[5]. 从而进一步证明了 TLRs 在 PAMPs 对机体作用中的重要地位.

Table 2 PRRs and PAMPs^[6,7]
表 2 TLRs 与各类分子结合的能力^[6,7]

TLRs	BLP	LPS	肽聚糖	结合其他成分
TLR2	+	+	+	酵母多糖, 脂磷壁酸
TLR4		+		紫杉醇(鼠 TLR4), HSP60

3 TLRs 与病原分子及内源性配体的结合

对 TLRs 细胞外区域识别病原分子的过程还不是很清楚. 单独的 TLRs 分子与各成分结合时亲和力皆不高. 一些血清因子, 如可溶性 CD14、LBP、某些磷脂类分子等可能调节了它们的结合. 细胞膜上的某些分子也参与形成 TLRs 与病原分子的复合物.

3.1 CD14

CD14^[8]是相对分子质量为 5.5×10^4 的糖蛋白, 以糖脂磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 的形式联接在细胞膜上, 其主要表达在单核/巨噬细胞膜表面. CD14 可从细胞膜上脱落下来, 形成可溶性 CD14. CD14 有 10 个 LRR, 缺失突变其中的 7 个, 并不影响 LPS 与 CD14 的结合. CD14 基因缺陷的小鼠对 LPS 有较高抗性, 但高浓度的 LPS 仍可激活此类小鼠的免疫细胞.

细胞与脂多糖 (LPS) 的作用首先是通过与细胞膜上的 CD14 特异性结合进行的. 此过程需血浆因子——内毒素结合蛋白 (LPS binding protein, LBP) 的参与. LBP 是血浆脂转运蛋白, 它的功能是使聚集的 LPS 形成单体, 然后把 LPS 单体转运至细胞膜上的 CD14 分子^[9].

CD14 可以促进 TLR4-MD2 的信号转导. 研究表明, TLR2、TLR4 与单独 LPS 的亲和力是相当低的, 约 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ mol/L. 在体内 LPS 形成 LPS-LBP-CD14 复合物后与 TLR4 结合的亲和力明显升高, 分析原因可能是 CD14 的磷脂部分起到了这一作用.

事实上 CD14 在体内行使着另一重要作用——介导凋亡细胞的清除. CD14 介导了巨噬细胞吞噬凋亡细胞, 但并不发生炎症. CD14 首先识别凋亡细胞表面的凋亡细胞相关的分子模式 (apoptosis-cell associated molecular pattern, ACAMP), 然后传递释放抑制炎症的因子信号. 提示: CD14 识别 ACAMP 后并不是象识别 LPS 后把信号传递给 TLRs 而是把信号传递给了另一类分子, 但具体的机制还不清楚.

我们对一些 GPI 结合的膜蛋白进行汇总后发现, 以 GPI 结合的分子可能在体内承担着清除配体复合物的作用. 因为信号分子不会自动消失, 细胞一方面需对此作出反应, 另一方面需清除这些信号, 避免对此作出持续的应答. 对 CD14 的研究充分提示: CD14 在运送 LPS 至高尔基体降解的过程中承担着重要作用.

3.2 MD-2

转染 TLR2 的细胞系可使该细胞对 LPS 产生应答, 激活 NF- κ B; 而转染 TLR4 的细胞系并不能对 LPS 产生应答; C3H/HeJ 和 C57BL/10ScCr 小鼠中的 TLR4 基因发生变异, 两者对 LPS 低应答, 这说明 TLR4 对 LPS 产生应答需额外的分子.

寻找这一分子是从 RP105 着手的. RP105 是从表达的淋巴细胞中发现的, 其胞外区 LRR 和 TLR 胞外区同源. RP105 有一个伴随表达的相关分子 MD-1, 它们的 LRR 区相互作用, 构成 RP105 胞外部分的完全区域. 用 MD-1 氨基酸序列进行计算机检索, 从 EST 库中搜索到一个最长开放阅读框架为 160 个氨基酸的分子, 命名为 MD-2^[10], 其 N 端 16 个残基组成疏水区为其分泌信号. MD-2 广泛表达于各种组织中.

MD-2 伴随着 TLR4 的表达, 并分泌至细胞表面, 通过物理作用与 TLR4 锚定在细胞膜上. 表达 MD-2 能增强依赖于 TLR4 的 NF- κ B 的活性 2~3 倍. 推测其机理可能是 MD-2 在细胞表面形成了一个同源二聚体或更大的复合物, 促进 TLR4 与配体结合. TLR4-MD-2 可以识别 *E. coli* 0111: B4、

055: B5 .S. Minnesota Re595 来源的 LPS 或类脂 A, 而 TLR2 只能识别后者的 LPS. 这提示由于 MD-2 或 MD-2 样的分子可使 TLRs 对病原菌的应答有更宽的范围.

4 TLRs 的信号转导途径

由于 TLRs 胞内区域与 IL-1R 的胞内区域同源性较高, 并有特征性的 TIR 区域 (图 1), 所以它们的信号传递链基本相同, 但对不同的信号的刺激还是有所区别. 现在已经明确参与此信号途径的分子有: MyD88、IRAK、TRAF6 等.

4.1 MyD88

MyD88^[11,12] 是相对分子质量为 3.5×10^4 的蛋白质, 结构上有三个功能区域, N 端的死亡区域 (death domain, DD), 中间区域及 C 端的 TIR. DD 是与启动细胞凋亡信号途径中的接头分子相互结合进行信号转导的特征结构, 但现在还没有发现其可介导细胞凋亡. 对 MyD88 进行缺失突变的研究表明, 只有 DD 和中间区共同被表达才能激活 NF- κ B; 其他的组合皆不能激活 NF- κ B. 在 IL-1R 信号转导中, MyD88 可与 IL-1R1、IL-1R 相关蛋白 (IL-1R associated protein, IL-1RAcP) 和 IRAK 三者形成的复合物. 这种结合作用是信号依赖性的, 即只有当配体 (例如 IL-1) 和 IL-1R 结合时才能使 MyD88 和复合物相结合.

从 MyD88 基因剔除的小鼠身上也证实, MyD88 处于 TLR/IL-1R 信号转导的中心位置, 因为对小鼠 IL-1、IL-18 的刺激都被废止了. 但对 LPS 的刺激以延迟的方式产生, 最终还是能激活 NF- κ B 和 MAK 激酶. 提示 LPS 的信号转导还有独立与 TLR/MyD88 的途径, 这与 TLR4 突变的 C3H/HeJ 和 C57BL/10ScCr 小鼠也能对 LPS 产生微弱的反应结果相一致.

MyD88 有一个调节蛋白, 命名为 Toll 相关蛋白 (Toll-interacting protein, Tollip), 其在静息状态时与接头分子——髓性分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 下游的激酶——IL-1R 相关的激酶 (IL-1R-associated kinase, IRAK) 结合; 而一旦受体与配体结合, 招募接头分子, 再招募 IRAK 时, Tollip 就脱落下来, IRAK 就能自动磷酸化, 完成信号转导^[13].

4.2 IRAK

IRAK^[1] 是丝氨酸/苏氨酸先天免疫激酶 (serine/threonine innate immunity kinase, SIK) 中

的一种, 它们存在于植物、脊椎动物、无脊椎动物中, 参与信号转导, 导致免疫应答效应的发生.

当 MyD88 的 C 端 TIR 区和 IL-1R/Toll 的胞质区相互作用时, MyD88 通过 N 端死亡区域招募下游分子的死亡区域与其结合, IRAK 利用自身的 N 端死亡区域和 MyD88 作用. IRAK 与 IL-1R 或 TLRs 与 MyD88 形成的受体复合物结合后, IRAK 自动磷酸化. 但 MyD88 只招募去磷酸化的 IRAK 与受体结合; IRAK 的磷酸化导致了受体复合物激活.

IRAK 缺陷小鼠来源的细胞失去了对 IL-1、IL-18 的反应性也证实 IRAK 在整个信号转导中的重要位置. IRAK 的缺失形式 (酶缺失或 C 端缺失的形式) 能通过上游成分抑制 NF- κ B 的活性, 即 MyD88 也能招募这些 IRAK 形成受体复合物.

4.3 肿瘤坏死因子相关因子 6

与 IRAK 结合的接头分子是肿瘤坏死因子相关因子 6 (TNFR-associated factor 6, TRAF6)^[14], IRAK 一旦磷酸化, 就会从 MyD88 中释放出来, 而不是象 MyD88 那样形成受体复合物. 而且只有磷酸化的 IRAK 才能促进 TRAF6 聚合.

TRAF 家族现在发现有 6 个成员, TRAF1~5 是 TNF 受体信号转导途径上介导细胞保护通路的一类重要分子. TRAF 家族的 C 端区域约含 170 个氨基酸的保守区域, 具有高度同源性, 此同源性区域能使 TRAFs 寡聚化, 只有寡聚化的 TRAFs 才能起到信号转导的作用; 它们的 N 端是信号转导所必需的, 除 TRAF1 以外都含有一环状和锌指结构, 即螺旋-螺旋区域, 但目前还没有发现与其结合分子. TRAF6 的 C 端与其他分子的同源性约为 36%. 与其他的 TRAFs 成员不同, TRAF1~5 都受受体作用蛋白 (receptor-interacting protein, RIP) 招募, 而 TRAF6 既参与 IL-1R、TLRs 的信号转导, 还参与 CD40 的信号转导, 但所介导的结果似乎相似, 皆激活 NF- κ B. 同时, TRAF6 除了在 CD40 的信号转导是参与受体复合物的形成外, 是 TRAFs 家族中唯一不与受体形成复合物的接头分子. TRAF6 不能磷酸化, 在结构上也无与 IRAK 相互结合的区域, 提示 IRAK 可能磷酸化了其他分子, 与 TRAF6 的 N 端结合从而促进其寡聚化. 区域缺失的 TRAF6 不能完全阻断 TLR4 介导的 c-Jun 途径的激活; 而 TRAF6 基因剔除的小鼠能明显削弱对 IL-1 或 IL-18 的反应, 但对 IL-1 与 LPS 的反应并没有完全消失. 提示, 可能有新的分子介导着

IRAK 的信号转导, 即 IRAK 磷酸化其他分子后再激活下游的信号链, 而 TRAF6 只是其中重要的一条途径.

因为许多可诱导的免疫应答基因受控于 NF- κ B 和 AP-1 转录因子, 故可以利用研究控制 AP-1 的受体的结果, 分析 TLR 和 MyD88 对 AP-1 诱导活性. MyD88 可激活 AP-1 控制的报告基因, IRAK 和 TRAF6 的突变体抑制这些报告基因的活性. 转染表达 CD4-TLR4 的 293 细胞诱导 AP-1 的活性, 突变的 IRAK 和 TRAF6 则对此起抑制作用. TRAF6 突变体过表达抑制 AP-1 的活性. 但是 IL-1 却不能诱导 AP-1 的活性, MyD88 和 TRAF6 都存在于 IL-1R 介导的 NF- κ B 活性中, 且两者都可激活 AP-1. 这说明, 在 TRAF6 水平上, 存在 NF- κ B 和 AP-1 通路的分叉点.

4.4 TRAF6 以后的信号转导

NF- κ B 复合物本身激活的过程已经比较清楚^[15]. 在 TLR/IL-1R 信号转导链上, TRAF6 激活和 NF- κ B 诱导激酶 (NF- κ B-inducing kinase, NIK). 激活的 NIK 激活 NF- κ B 抑制物的激酶 (inhibitor of NF- κ B kinases, IKKs), IKKs 使得 NF- κ B 复合物中的抑制成分 I κ B 磷酸化而脱颗粒, 释放 NF- κ B 迁移至核内, 在核内诱导特异基因的表达. NIK、丝裂原激活的蛋白激酶的激酶/细胞外信号调节激酶的激酶 [MAPK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) /ERK (extracellular-signal-regulated kinase) kinase kinase 1, MEKK1], 转化生长因子 β 激活的激酶 (TGF β activated kinase 1, TAK1), 蛋白激酶 C ζ (protein kinase C ζ , PKC ζ) 和 MEKK2、3 等均可以激活 IKKs, 这些分子中直接可与 TRAF6 作用的有 NIK, TRAF6 还可以通过 Toll 途径上进化的保守信号中介分子 (evolutionarily conserved signaling intermediated in Toll pathways, ECSIT) 间接激活 MEKK1, 再进一步激活 IKK.

4.5 IL-1R/TLR 信号转导途径小结

简单说来, TLR 通路是由几个蛋白质复合物介导的, 第一个复合物包括活性 TLRs (如与配体结合的 TLR4-MD2 等)、接头分子 MyD88、IRAK. 被激活的 TLR 复合物由 TRAF6 介导、随后激活 IKKs 复合物, IKKs 使得 I κ B 的 N 端的丝氨酸磷酸化. 磷酸化的 I κ B-NF- κ B 复合物与泛素化的连接酶相连, I κ B 泛素化后被蛋白水解酶降解, NF- κ B 得以释放, 移至核内. 以 TLR4 为例整

个信号转导过程如图 2 所示.

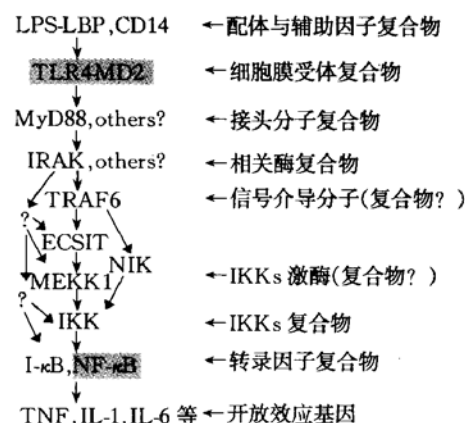


Fig. 2 Model of the signaling transduced pathways in TLR/IL-1R

图 2 TLR/IL-1R 信号转导途径的模型

除以上所述之外, TLRs 还有其他的信号转导通路, 如 TLR4 可激活 Jun N 端激酶 (Jun amino-terminal kinase, JNK) 和 p38/ MAPK 通路^[14]. 如 p38/ MAPK 的果蝇同源物的过表达抑制了抗微生物肽基因的表达, 这表明在被感染的晚期, MAPK 通路的激活减轻了免疫应答效应, 以免免疫过剩.

TLRs 在人体和果蝇属中构成了天然免疫系统的重要组成部分, 分析哺乳动物 TLRs 的信号转导途径与果蝇的差别仅为接头分子的不同——哺乳动物的接头分子为 MyD88, 而果蝇属为结合管蛋白, 其他环节如 TLRs 所识别的病原分子、信号转导通路中接头分子下游的分子、激活后所调控的基因及所完成的免疫应答皆相似或相同.

参 考 文 献

- 1 Bowie A, O'Neill L A. The interleukin 1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol*, 2000, **67** (4): 508~ 514
- 2 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
- 3 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
- 4 Faure E, Equils O, Sieling P A, *et al.* Bacterial lipopolysaccharide activates NF- κ B through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem*, 2000, **275** (15): 11058~ 11063
- 5 Poltorak A H, Xialong H, Sminova I, *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4

- gene. *Science*, 1998, **282** (5396): 2085~ 2088
- 6 Brightbill H D, Libraty D H, Krutzik S R, *et al.* Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, 1999, **285** (5428): 732~ 736
 - 7 Flo T H, Halaas O, Lien E, *et al.* Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *J Immunol*, 2000, **164** (4): 2064~ 2069
 - 8 Akashi S, Ogata H, Kirikae F, *et al.* Regulatory Roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via Toll-like receptor 4 MD-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **268** (1): 172~ 177
 - 9 焦炳华, 王梁华, 周丙荣, 等. 细菌内毒素的结构与功能. 见: 曾庆贵等编. 中华内科理论与实践, 5. 成都: 四川科学技术出版社, 1998. 567~ 573
Jiao B H, Wang L H, Zhou B R, *et al.* The Structure and function of endotoxin. In: Zeng Q G eds. Theory and Practice of Chin Internal Med, 5. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 1998. 567~ 573
 - 10 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
 - 11 Kawai T, Adachi O, Ogawa T, *et al.* Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 1999, **11** (1): 115~ 122
 - 12 Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, *et al.* Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol*, 2000, **12** (1): 113~ 117
 - 13 Burns k, Clatworthy J, Martin L, *et al.* Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol*, 2000, **2** (6): 346~ 351
 - 14 Muzio M, Natoli G, Saccani S, *et al.* The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor κ B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med*, 1998, **187** (12): 2097~ 2101
 - 15 Hatada E N, Krappmann D, Scheidereit C. NF- κ B and the innate immune response. *Curr Opin Immunol*, 2000, **12** (1): 52~ 58

The Toll-like Receptors and Its Signalling Transduction Pathways^{*}

WANG Liang-Hua, SI Yu-Hong¹⁾, JIAO Bing-Hua^{**}

(Department of Health Toxicology, Faculty of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

¹⁾ College of Bio-Pharmaceuticals, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract The most ancient host defense system found in mammals, insects and plants are mediated by Toll-like receptors (TLRs) and its associated signaling pathways of NK- κ B. Signaling pathways of downstream of TLR2 or TLR4 complex which includes ligands (LPS or another), CD14 or/and MD-2 and receptor itself recruit MyD88 to activate the autophosphorylation of IRAK. The oligomerization of TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) is necessary to initiate the activation of NF- κ B-inducing kinase (NIK) which finally leads to the activation of NF- κ B via the Toll/IL-1-receptor homologous region (TIR) domain.

Key words pathogen recognition, TLRs, IL-1RI, signaling transduction

^{*} This work was supported by a grant from National Natural Science Foundation of China (39970041).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-21-65493936, E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

Received: June 12, 2000 Accepted: August 23, 2000