

## Toll 样受体信号通路的负调控\*

孙冰 韩代书\*\*

(中国医学科学院基础医学研究所细胞生物学系, 北京 100005)

**摘要** 综述了 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)介导炎症反应信号通路的负调控机理. TLRs 可以被病原体激活并迅速启动炎症反应, 对先天性和获得性免疫反应起着重要调节作用. TLRs 介导的免疫反应必须受到严格的调控, 持续激活状态可长时间高表达炎症因子, 导致机体产生慢性炎症、自身免疫紊乱和其他 TLRs 相关疾病. 正常生理状态下, 机体存在着多种 TLRs 的负调控机制, 以维持免疫反应的平衡. 该领域的研究近年来取得了重要进展, 为许多免疫相关疾病的治疗提供了线索.

**关键词** Toll 样受体(TLRs), 炎症, 负调控, 信号转导  
**学科分类号** Q93

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00213

Toll 样受体(TLRs)是一个模式识别受体家族, 它们在进化上高度保守, 从线虫到哺乳动物都存在 TLRs, 目前在哺乳动物中已发现 12 个成员<sup>[1]</sup>. TLRs 主要表达于抗原递呈细胞及一些上皮细胞, 为 I 型跨膜蛋白, 胞外区具有富含亮氨酸的重复序列, 能够特异识别病原微生物进化中保守的抗原分子——病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)<sup>[2]</sup>. 为了有效地抵抗入侵的病原体, 机体需要对多种 PAMPs 产生适当的免疫应答, TLRs 可以通过识别 PAMPs 诱发抵抗病原体的免疫反应. 而且 TLRs 也参与识别有害的内源性物质. TLRs 的激活可诱导很强的免疫反应, 有利于机体抵抗病原体感染或组织损伤, 但是过度的免疫反应也会带来不利影响, 如产生内毒素休克、自身免疫性疾病等. 为了保证 TLRs 介导正确的免疫应答, 机体存在精密的负调控机制, 及时抑制 TLRs 信号, 维持机体的免疫平衡<sup>[3]</sup>.

### 1 TLRs 信号通路

TLR 家族成员(TLR3 除外)诱导的炎症反应都经过一条经典的信号通路(图 1), 该通路起始于 TLRs 的一段胞内保守序列——Toll/IL-1 受体同源区(Toll/IL-1 receptor homologous region, TIR). TIR 可激活胞内的信号介质——白介素 1 受体相关蛋白激酶(IL-1R associated kinase, IRAK) IRAK-1 和

IRAK-4、肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TNFR-associated factor 6, TRAF-6)、促分裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)和 I $\kappa$ B 激酶(I $\kappa$ B kinase, I $\kappa$ K), 进而激活核因子  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B), 诱导炎症因子的表达. TLRs 信号通路上的许多接头蛋白都具有 TIR 结构域: 髓系分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、MyD88- 接头蛋白相似物(MyD88-adaptor like, Mal)、含有 TIR 结构能诱导干扰素  $\beta$  的接头分子(TIR domain-containing adaptor inducing interferon  $\beta$ , TRIF)、TRIF 相关接头分子(TRIF-related adaptor molecule, TRAM)和 SARM (sterile  $\alpha$  and armadillo motif-containing protein)<sup>[4]</sup>. 它们参与 TLRs 所介导的信号转导, 其中 MyD88 最重要, 参与了除 TLR3 外所有 TLRs 介导的信号转导.

MyD88 首先通过 TIR 与 TLRs 相结合, 接着募集下游信号分子 IRAK-4, IRAK-4 磷酸化激活 IRAK-1, 随后活化 TRAF6. 活化的 TRAF6 具有泛素连接酶(E3)的活性, 能够结合泛素结合酶(E2), 进而泛素化降解 IKK- $\gamma$ . 这种泛素化降解可以活化

\* 国家自然科学基金资助项目(30570678).

\*\* 通讯联系人. Tel: 010-65296457, Fax: 010-65296466

E-mail: daishu@public.bta.net.cn

收稿日期: 2009-04-06, 接受日期: 2009-07-23

TGF-β 激酶(TGF-β activated kinase 1, TAK1)和 TAK1 结合蛋白(TAK1 binding protein, TAB1、TAB2、TAB3). 活化的 TAK1 会催化 IKK-β 磷酸化, 最终激活 NF-κB, 促使炎症因子的表达. 除了共同的 NF-κB 激活通路, 不同的 TLRs 还存在着其特有的信号通路, 一些 TLRs 具有募集 Mal、TRAM 和 TRIF 的作用. 不同的接头分子在信号传导中发挥的作用不同<sup>[5]</sup>, TRIF 在脂多糖(LPS)激活的 TLR4 途径和 Poly(I:C)激活的 TLR3 途径中都起到了重要的作用, 而 TRAM 仅在 TLR4 的途径中发挥作用. TLRs 的激活是一把双刃剑, 它可以

通过刺激先天性免疫应答和提高获得性免疫反应来保护机体, 但是它所引起的持续性炎症反应也会对机体产生损伤, 自身免疫、慢性炎症和感染性疾病都与它有一定关系. 例如 LPS 持续刺激 TLR4 就可以引起严重的败血症和感染性休克, 此外, 类风湿性关节炎、慢性阻塞性肺心病、结肠炎、哮喘、心肌病、狼疮和动脉粥样硬化的发生也与 TLRs 的激活有关. 因此 TLRs 的激活必须受到严格的负调控, 以保持免疫系统的稳定. 对于负调控机理的研究是近几年免疫学的热点, 以下将介绍 TLRs 负调控的研究进展(图 1).

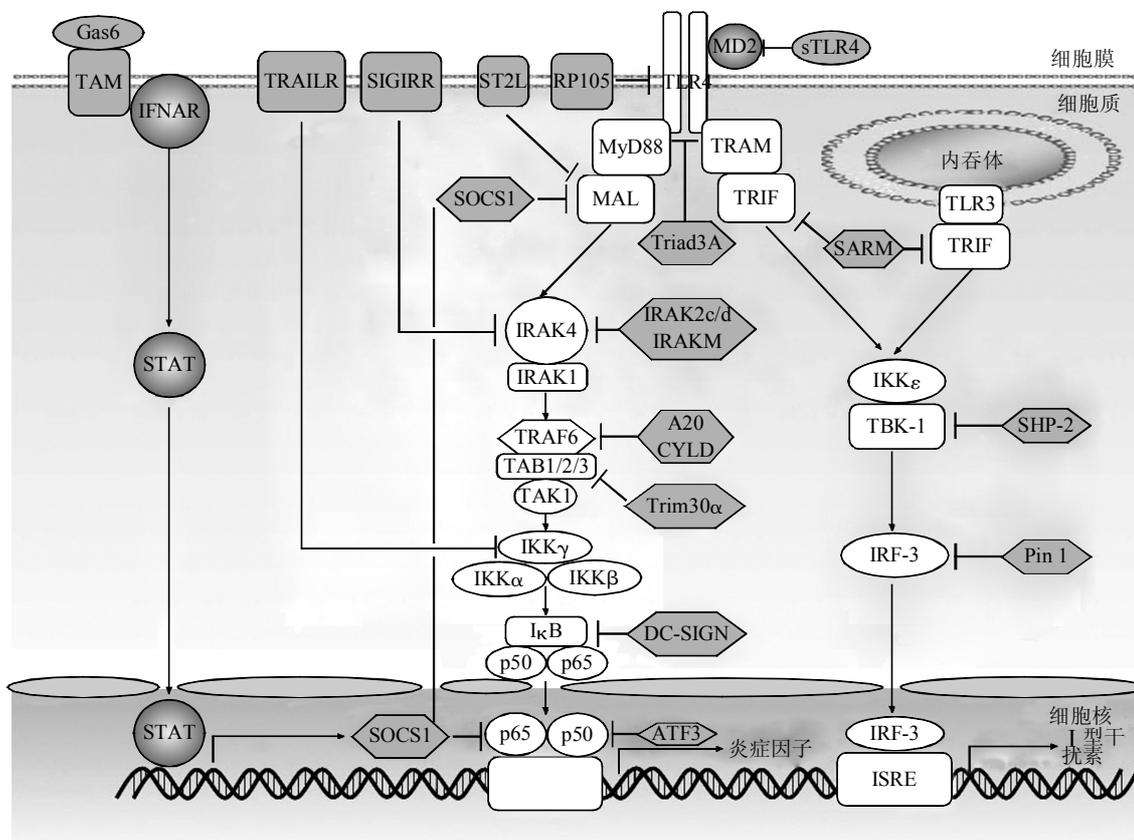


Fig. 1 Negative regulators of TLR signaling

图 1 TLR 信号通路的负调控因子

显示负调控 TLRs 信号通路的各种蛋白质分子, TLR3 信号通路为 MyD88 非依赖型, TLR4 信号通路为 MyD88 依赖型信号通路的代表. → 表示正调控, — 表示负调控. 白色为 TLRs 信号通路中的相关蛋白; 灰色为负调控相关因子. ○: 胞外负调控因子; □: 跨膜负调控因子; ◇: 胞内负调控因子; ●: 负调控通路相关因子.

## 2 胞外负调控因子

可溶性的 TLRs(sTLRs)是一种胞外负调控因子. 它在 TLRs 信号通路初始阶段发挥调控作用, 这直接减弱 TLRs 信号, 阻止急性炎症反应的发生. 人类和小鼠的 TLR4 基因可以转录出多种

mRNA产物, 其中一种转录本编码一条含 122 个氨基酸的序列. 这条序列前 86 个氨基酸与 TLR4 胞外序列相同, 其余的与磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)相似, 具有可溶性, 被命名为 sTLR4. 在小鼠体外模型中, 当 sTLR4 存在时, 脂多糖(LPS)激活 NF-κB 的过程明

显受到抑制. 这种机制目前为止还不能被完全解释, 一种假设认为, 髓系分化蛋白 2(myeloid differentiation protein 2, MD2)能够与 TLR4 胞外区相连, TLR4 在识别 LPS 过程中需要 MD2 的帮助, sTLR4 可能阻止了 TLR4 与 MD2 的结合, 从而抑制信号的起始. 与 sTLR4 类似, 在腮腺中也发现了可溶性的 TLR2 (sTLR2)<sup>[6]</sup>.

最近发现, 生长停滞特异基因 6(growth arrest-specific gene 6, Gas6)可以抑制 TLRs 介导的炎症反应, Gas6 编码的产物是一个维生素 K 依赖的 75 ku 分泌蛋白, 由谷氨酸区(Glu 区)、4 个表皮生长因子样区(EGF 区)和性激素结合球蛋白区(G 区)组成, 与抗凝剂——蛋白 S(protein S)有 46% 的氨基酸序列同源, 可以特异性地激活 TAM 受体酪氨酸激酶, 促进胞内 TLRs 负调控因子的表达, 抑制 TLRs 信号通路<sup>[7]</sup>.

### 3 跨膜负调控分子

这类分子指负调控 TLR 信号跨膜蛋白, 根据作用机理分为以下几类.

#### 3.1 促使连接复合体的解离

TLRs 传递信号需要与胞内的接头分子连接形成复合体, 促使复合体解离的物质可以抑制其功能, 肿瘤发生抑制物 2(suppressor of tumorigenicity, ST2)就属于这一类胞膜负调控分子<sup>[8]</sup>, 它能够促使 TLR 连接复合体分离. ST2 有两个亚型: ST2L 和 sST2, ST2L 属于 I 型跨膜受体, 含有一个胞内 TIR 结构域和一个胞外结构域(包含 3 个免疫球蛋白样结构). sST2 和 ST2L 的胞外区结构相似, 只是在 C 端多了 9 个氨基酸<sup>[9]</sup>. 在 IL-1、LPS、细菌脂肽或胞嘧啶磷酸鸟嘌呤(CpG)的作用下, 敲除 ST2L 和 sST2 基因的小鼠会表达更多的炎症因子. 但是当用 Poly(I : C)刺激时, 炎症因子的表达不会增多, 说明 ST2L 只是在依赖 MyD88 信号途径中发挥作用. 免疫共沉淀证实 ST2L 能同 MyD88、Mal 结合, 促使 MyD88 与 Mal 解离. 突变的 ST2L (TIR 的 box2 发生突变)不能使 Mal 和 MyD88 分离, 因此也不能抑制 NF- $\kappa$ B 的活化. 用 LPS 刺激巨噬细胞时, 加入 sST2 可以显著地抑制 TLR1 和 TLR4 的表达, 从而导致炎症因子表达降低, sST2 能抑制人单核细胞 THP-1 产生 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ <sup>[9, 10]</sup>. 这些结果表明, ST2 可以负调控 TLRs 信号.

#### 3.2 干扰功能复合体的形成

TLRs 识别配体后, 发生二聚化, 从而改变构象, 募集下游的信号分子, 启动信号转导. 防辐射 105(radioprotective 105, RP105)是 TLR4 的同源物, 具有保守的胞外亮氨酸重复序列, 但缺少 TIR 结构域. 在人胚胎肾细胞系——HEK293 中, RP105 的过表达能显著抑制 TLR4 介导的信号转导. LPS 刺激 RP105 缺陷的巨噬细胞将导致炎症因子的大量表达, Divanovic 等<sup>[11]</sup>发现, RP105 能与 TLR4/MD2 复合物直接连接, 干扰 LPS 与 TLR4/MD2 复合物的结合, 从而抑制 TLR4 信号通路的激活.

单免疫球蛋白 IL-1 相关蛋白 (single immunoglobulin IL-1 related protein, SIGIRR), 被称为 TIR-8<sup>[12]</sup>, 是 TIR 超家族成员. 它在胞外区含有单个免疫球蛋白功能域. SIGIRR 在上皮细胞和树状突细胞(DCs)中高表达, 但在巨噬细胞中不表达. 小鼠模型中 LPS 的刺激可以促使许多组织表达 SIGIRR, 提示它在炎症调节中发挥作用. 在骨髓来源的 DCs 中, 高表达的 SIGIRR 能够抑制 IL-1 和 IL-18 介导的 NF- $\kappa$ B 活化, 相反, 缺失 SIGIRR 的小鼠 NF- $\kappa$ B 活性升高, 导致自身免疫性疾病. 但 SIGIRR 基因敲除小鼠对 Poly(I : C)的刺激反应不明显, 这说明 SIGIRR 的负调控作用依赖于 MyD88. 体外实验中, IL-1 作用下 SIGIRR 与 IL-1 受体相关分子——IRAK 和 TRAF 形成复合体, 从而干扰 IRAK 和 TRAF 复合物的形成, 抑制信号转导.

#### 3.3 受体酪氨酸激酶(RTK)

TAM RTK 亚家族<sup>[13]</sup>包括 3 个成员: Tyo3、Ax1 和 Mer, 胞外可与配体结合, 胞内具有酪氨酸激酶活性结构域. 它们能够广泛抑制 TLRs 信号通路<sup>[14]</sup>. 在 LPS(TLR4 的配体)刺激时, TAM 基因敲除鼠的树突状细胞(DCs)比野生型更加敏感, 它们在受刺激后会产生更多炎症因子, 包括白介素 6 (IL-6)和肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ). 不仅如此, 用 Poly(I : C)(TLR3 的配体)和 CpG(TLR9 的配体)刺激 DCs 时也出现类似现象. 而用 Gas6(TAM 的配体)预处理正常 DCs 一段时间后, 再用 LPS、Poly(I : C)、CpG 刺激时其炎症因子的表达量将受到抑制. 作用机理已被揭示: TAM 被 Gas6 激活后, 与 I 型干扰素受体(type I interferon receptor, IFNR1)结合, 通过 IFNR1 激活转录因子 STAT1. 活化的 STAT1 能够促进细胞因子信号抑制物 1(suppressor of cytokine signaling 1, SOCS-1)和 SOCS-3 的表

达, SOCS-1 能够泛素化降解 Mal, 而 SOCS-3 则可以泛素化降解 TRAF-6, 从而抑制 TLRs 信号通路。

### 3.4 其他跨膜负调控因子

肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体受体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor, TRAILR), 不具有 TIR 结构域, 属于 TNF 超家族. 它也是一种 TLR 信号负调控因子. 在 TRAILR 敲除小鼠体内, 淋巴细胞的总数并没有增加, 但是这种小鼠在受到刺激后却能产生很强的免疫反应. 用 TLR2、TLR3 和 TLR4 的配体刺激该鼠的巨噬细胞和树突状细胞时, 能产生大量的炎症因子, 如果将 TRAILR 重新表达于该鼠的巨噬细胞, TLR4 介导的 IL-12 的表达量明显减低. 在炎症因子表达调控中, I $\kappa$ B- $\alpha$  是一个关键因子, 它的降解促使 NF- $\kappa$ B 活化入核, 诱导炎症因子的表达. TRAILR 负调控 TLR 信号的机理在于它能够维持 I $\kappa$ B- $\alpha$  的稳定, I $\kappa$ B- $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B 形成二聚体, 抑制 NF- $\kappa$ B 的活化, 不能发生核转位诱导炎症因子的产生<sup>[15]</sup>.

## 4 胞内负调控因子

胞内存在众多的负调控因子抑制 TLRs 的信号传递, 主要以泛素化降解、去泛素化、竞争性抑制等方式行使负调控功能。

### 4.1 泛素化降解

细胞通常以降解信号蛋白的方式来降低或终止信号传递, 这种也是负调控 TLRs 信号的主要方式. 一个典型实例是抑制性锌指蛋白(Triad3A), 它具有锌指蛋白活性, 能像 E3 泛素连接酶一样泛素化降解 TLRs. 在酵母双杂交实验中, 发现 Triad3A 含有与 TIR 结合的结构域. Triad3A 过量表达会促使 TLR4 和 TLR9 的降解, 降低信号转导水平, 但是它对 TLR2 或 TLR3 介导的信号转导没有影响. 相反, 沉默 Triad3A 基因能显著地增加 TLR4 和 TLR9 的表达, 但不影响 TLR2 的表达. Triad3A 也可以与其他含有 TIR 结构域的接头蛋白结合, 如 RIP-1、TRIF 和 Mal<sup>[16]</sup>. 因此, 为了精确调控 TLRs 的水平, Triad3A 选择性地与目的蛋白相结合并促使其降解。

SOCS 家族成员都含有一个保守的 Src 同源序列 SH-2, 在 C 端含有一个稀有的羧基模序, 称为 SOCS 框(SOCS box). SOCS 家族有 8 个成员, SOCS-1 与 SOCS-3 关系最为紧密, 是炎症反应的

重要负调控因子. 在巨噬细胞中, LPS 能诱导 SOCS-1 的表达, SOCS-1<sup>-/-</sup>缺陷小鼠在 LPS 刺激后便产生内毒素性休克. LPS 和 CpG 处理可以导致这些敲除小鼠产生了大量的 NO 和炎症因子, 在小鼠胚胎成纤维细胞中过表达 SOCS-1 能够抑制 LPS 激活 NF- $\kappa$ B. LPS 刺激下, SOCS-1<sup>-/-</sup>巨噬细胞内 JNK、I $\kappa$ B 和 p38 磷酸化作用增强, 说明 SOCS-1 是 TLRs 信号通路的抑制因子. Mansell 等<sup>[17]</sup>研究发现, SOCS-1 能够靶向结合 Mal 并使其泛素化降解, 从而直接调控 TLR2 和 TLR4 介导的信号通路. 在这一过程中, SOCS-1 直接抑制 Mal 依赖性的 P65 磷酸化和 NF- $\kappa$ B 的活化, 其中酪氨酸激酶的活性对于介导 Mal 和 SOCS-1 的结合至关重要<sup>[15]</sup>. 同时还发现, SOCS-1 也能够负调控 TLR3 介导的先天免疫反应<sup>[18]</sup>.

肽脯氨酰异构酶 1(prolyl isomerase 1, Pin-1)也可通过促进泛素化降解来负调控 TLR 信号, 它能够直接识别 IRF-3 的 339 位丝氨酸, 并与 IRF-3 结合促使其泛素化降解, 对 TLRs 信号产生抑制作用<sup>[19]</sup>. Pin-1 敲除的小鼠在受到 dsRNA 刺激后会产生大量的 IFN- $\beta$ , 这说明 Pin-1 负调控 TLR 所介导的抗病毒反应. 另一方面, Pin-1 还可以通过磷酸化 p65 亚单位来激活 NF- $\kappa$ B, 这需要位于 Pin-1 肽链 254 位的苏氨酸参与. SOCS-1 与 p65 结合发挥负调控作用时, 它的结合位点与 Pin-1 的结合位点十分类似. Pin-1 能够保护 p65 不被 SOCS-1 泛素化降解. 临床上 NF- $\kappa$ B 持续活化可能引起多种疾病, 包括癌症, Pin-1 和 SOCS-1 对 p65 的精密调节可能防止这些疾病的发生。

### 4.2 去泛素化方式

泛素化与磷酸化类似, 可以被双向调控. 上面讨论了泛素化降解在 TLRs 负调控中所起的作用, 除了泛素化降解目的蛋白以外, 机体也能够利用去泛素化来负调控 TLR 信号. A20 是第一个在免疫调控中被发现的去泛素化酶, 属于锌指蛋白, 能够抑制 TNF 激活的 NF- $\kappa$ B. 它具有两种截然不同的功能: 首先, 它具有去泛素化酶的活性, 能从 RIP1 上将多聚泛素链解离下来; 相反, 它还具有 E3 连接酶的活性, 能促使 RIP1 发生多泛素化降解. 如果小鼠缺少了 A20 或者 A20 的受体将导致自身免疫反应. 体外用 TLR2、TLR3 和 TLR9 配体刺激后, A20 缺陷小鼠的巨噬细胞产生炎症因子的水平显著增加. 其机制是它能够阻断 TRAF-6 与多聚泛素链的连接, 抑制 NF- $\kappa$ B 核转位<sup>[20]</sup>.

肿瘤抑制因子 CYLD(cyclindomatosis)是 NF- $\kappa$ B 的一种负调控因子. Yoshida 等<sup>[21]</sup>证实, 在细菌感染时, CYLD 可以抑制由 TLR2 介导的炎症因子的产生. 将 CYLD 的 siRNA 转染入稳定表达 TLR2 的 HEK 细胞内, 同时用 PGN、MALP-2 和 Pam3CSK-4(TLR2 的特异性配体)来刺激, 发现该细胞的 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-8 的表达量和活性都有所增加. 在 TLR2 信号通路中, CYLD 能够泛素化降解 TRAF-6 和 TRAF-7, 抑制 NF- $\kappa$ B 和 P38 的活化<sup>[21]</sup>.

### 4.3 竞争抑制

竞争性抑制广泛存在于信号转导通路中, 这种机制也可参与 TLRs 信号的负调控. SARM 是一种 MyD88 非依赖型通路接头蛋白, 能够抑制 NF- $\kappa$ B 的活化. 它含有一个 sterile  $\alpha$  模序(SAM)、一个 armadillo 模序和一个 TIR 模序. 线虫在抵抗细菌感染时所释放的抗菌肽 NLP-29 和 NLP-3143 就属于 SARM. 迄今为止, 它在人体内的功能还不十分清楚. 但是应用 RNAi 干扰 SARM 的表达时, 发现人外周血单核细胞在 Poly(I:C)和 LPS 刺激下炎症因子表达增加<sup>[22]</sup>, 说明 SARM 可以抑制 TRIF 依赖的 TLR3 和 TLR4 信号通路. SARM 的 N 端含有 LPS 的结合位点, SARM 的负调控作用也能够被 LPS 的刺激所抵消<sup>[22]</sup>, 表明在调控 TLRs 信号时, SARM 与 LPS 间存在着竞争性抑制. 目前人们对于 SARM 如何抑制 TRIF 的确切机制还不清楚. 不过已经证实, 静止期细胞 SARM 与 TRIF 作用较弱, 但在 LPS 刺激下这种相互作用加强, 从而阻止下游效应分子与 TRIF 的进一步结合<sup>[23]</sup>.

MyD88 是所有 TLRs(TLR3 除外)的接头分子, 它包含有一个 N 端死亡结构域(death domain, DD). 这个结构域可与 C 端结构域相连形成同源二聚体. 有一种短剪接突变体 MyD88(MyD88s)不能形成同源二聚体. LPS 刺激过量表达 MyD88s 的单核细胞并不能引起 NF- $\kappa$ B 过度活化, 同时也不能够导致 IRAK-4 的活化和 IRAK-1 的磷酸化. 但是对于 TNF 诱导的 NF- $\kappa$ B 的活化, MyD88s 没有抑制作用. MyD88 同源二聚体结合募集 IRAK-1, 结果导致 IRAK-1 的磷酸化, 从而激活 NF- $\kappa$ B 信号通路. 但在 MyD88s 存在下, MyD88s 与 MyD88 优先形成异二聚体, 阻碍了 MyD88 同源二聚体的形成, IRAK-4 不能连接到该信号复合物上. IRAK-1 的磷酸化正常情况下是由 IRAK-4 介导的, 由此导致 IRAK-1 不能磷酸化而激活 NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[24]</sup>.

### 4.4 其他作用方式

IRAK-2 与 IRAK-M 同属于 IRAK 家族, 它们缺乏丝 / 苏氨酸激酶活性. IRAK-2 几乎在每种细胞中都有表达, 而 IRAK-M 仅表达于单核 / 巨噬细胞. IRAK-M<sup>-/-</sup>小鼠与野生型相比, 在受到细菌感染时能产生更强的炎性反应, 对 LPS 引起的内毒素性休克耐受性较差. IRAK-M 阻碍 IRAK-1/IRAK-4 与 MyD88 的分离, 由此抑制 IRAK-1 与 TRAF-6 的结合<sup>[25]</sup>. 小鼠体内 IRAK-2 基因存在 4 个已知的剪切异构体, 分别为 IRAK-2a、IRAK-2b、IRAK-2c 和 IRAK-2d. IRAK-2a 和 IRAK-2b 过表达可增强 NF- $\kappa$ B 的活性. 在成纤维细胞中, 由于 IRAK-2c 和 IRAK-2d 缺乏 N 端 DD 结构, 因此它们的过表达则抑制 NF- $\kappa$ B 的活性. 这提示 IRAK-2 基因的选择性剪切被用于调控 TLRs 信号通路, 缺乏 DD 结构的 IRAK-2c 和 IRAK-2d 在通路中起到负调控作用.

激活转录因子 3(activating transcript factor 3, ATF-3), 属于 CREB/ATF 转录因子家族中的一员. 它可以通过抑制 p53 的转录来抵御 TNF 诱导的内皮细胞凋亡. IL-6 和 IL-12 基因含有 100 bp 的 NF- $\kappa$ B 结合位点, 该位点在 ATF-3 上也存在. 在体外用 LPS 处理的 ATF-3<sup>-/-</sup>小鼠骨髓巨噬细胞可以表达更高水平的 IL-6 和 IL-12<sup>[26]</sup>, 说明 ATF-3 能抑制 LPS 诱导的 IL-6 和 IL-12 的转录. ATF-3 与位于染色质中的组蛋白乙酰化位点结合, 引起染色质构象变化进而阻止 NF- $\kappa$ B 等转录因子与 DNA 结合. ATF-3 只对 TLR4 介导的信号途径有负调控作用. 至今还没有发现 ATF-3 对其他 TLRs 信号通路的抑制作用.

树突状细胞特异性胞间黏附分子 3 捕获非整合素(DC specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing nonintegrin, DC-SIGN)参与调节获得性免疫反应, 它出现在病原体抗原引发的免疫反应中. 像 TLRs 一样, DC-SIGN 含有 C 型凝集素, 能识别大量病原体. DC-SIGN 能与分枝杆菌壁中的 ManLAM 直接结合, 调控 TLR4 所介导的免疫反应. ManLAM 是一种 TLR4 的特异性配体, 它与 DC-SIGN 结合可抑制 LPS 诱导的树突状细胞的成熟. 两者的结合激活丝 / 苏氨酸激酶 Raf-1, 促使 NF- $\kappa$ B 亚单位 p65 的乙酰化<sup>[27]</sup>, 增加炎症因子 IL-10 的表达. 为了确定 p65 乙酰化是依赖于 Raf-1 的, 研究者将 Raf-1 抑制剂结合在 ManLAM 或 TLR 配体上. 在抑制剂存在下, IL-10mRNA 的表

达受到抑制. 这都说明 Raf-1 是在 NF- $\kappa$ B 活化之后发挥调控作用的. 通过增加抗炎因子来抑制信号是一种新的负调控方式.

含 Src 同源区 2 的蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-2, SHP-2) 是 INF- $\beta$  (TLR3 和 TLR4 诱导) 的负调控因子. SHP-2 参与负调控 JAK 和 STAT 通路. 将 SHP-2 的 siRNA 转染入小鼠腹腔巨噬细胞后, 经 LPS 和 Poly(I : C) 诱发, INF- $\beta$  的表达量对比野生型巨噬细胞明显升高<sup>[27]</sup>. 用 Poly(I : C) 和 LPS 处理 SHP-2<sup>-/-</sup> 小鼠胚胎成纤维细胞时, TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达量也会增加. SHP-2 的负调控作用依赖于 TRIF, 在 SHP-2<sup>-/-</sup> 腹腔巨噬细胞里加入 TLR2、TLR7 和 TLR9 的配体不能引起 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达量发生明显变化. Poly(I : C) 对该巨噬细胞的作用还可引起 IRF-3 活性的增加, 而 SHP-2 存在下 IRF-3 的活性将受到抑制<sup>[28]</sup>. SHP-2 能特异地结合于 TBK-1 (TRIF 相关通路的下游信号分子) 的 N 端, 阻止 TBK-1 介导的磷酸化和后续炎症因子的表达<sup>[28]</sup>. SHP-2 在 TLRs 信号通路中的作用有待进一步研究.

除泛素化方式外, 一些负调控分子还可通过其他方式来降解 TLRs 信号分子. 三模序蛋白 30 $\alpha$  (tripartite-motif protein 30 $\alpha$ , Trim30 $\alpha$ ) 能够结合并降解 TAB2 和 TAB3, 从而抑制 NF- $\kappa$ B 的激活, 但是它降解 TAB2 和 TAB3 属于非泛素化方式. 溶酶体抑制剂 (NH<sub>4</sub>Cl 和氯喹) 能够抑制 TAB2 的降解, 而且 Trim30 $\alpha$  与 TAB2 共同定位于溶酶体, 这说明 Trim30 $\alpha$  的负调控作用可能需要溶酶体的参与<sup>[29]</sup>. 因此, Trim30 $\alpha$  对 TLRs 信号的调节属于一种新的负调控方式.

## 5 结 语

病原体感染机体时, TLRs 介导的炎症反应需要受到严格调控, 这种调控是复杂的、多层次的. TLRs 与胞内接头蛋白相互作用可以激活多条信号通路, 产生炎症反应, 清除病原体, 然后启动负调控系统抑制 TLRs 通路, 使机体恢复免疫平衡. MyD88 依赖型途径已被广泛认识, 发现了多种负调控因子, 它们对于信号转导和炎症因子的适量表达十分重要. 然而, 至今还不能完全解释 MyD88 依赖途径的调控机制, 随着研究的深入会发现更多与这条通路相关的负调控因子, 进一步阐明 MyD88 依赖型途径在免疫反应中所发挥的作用.

同时对负调控因子在宿主防御中功能的深入研究, 会进一步揭示 TLRs 相关疾病的发病机理, 并有助于开发新的治疗方法.

## 参 考 文 献

- 1 Fischer M, Ehlers M. Toll-like receptors in autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, **1143**: 21~34
- 2 王海坤, 韩代书. Toll 样受体 (TLRs) 的信号转导与免疫调节. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(9): 820~827  
Wang H K, Han D S. *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(9): 820~827
- 3 Wang J, Hu Y, Deng W W, *et al.* Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway. *Microbes Infect*, 2009, **11**(3): 321~327
- 4 O'Neill L A, Bowie A G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2007, **7**(5): 353~364
- 5 Creagh E M, O'Neill L A. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol*, 2006, **27**(8): 352~357
- 6 Kuroishi T, Tanaka Y, Sakai A, *et al.* Human parotid saliva contains soluble toll-like receptor (TLR) 2 and modulates TLR2-mediated interleukin-8 production by monocytic cells. *Mol Immunol*, 2007, **44**(8): 1969~1976
- 7 Fernández-Fernández L, Bellido-Martín L, García de Frutos P. Growth arrest-specific gene 6 (GAS6). An outline of its role in haemostasis and inflammation. *Thromb Haemost*, 2008, **100**(4): 604~610
- 8 O'Neill L A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev*, 2008, **226**(1): 10~18
- 9 Sweet M J, Leung B P, Kang D, *et al.* A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 *via* inhibition of Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol*, 2001, **166**(11): 6633~6639
- 10 Takezako N, Hayakawa M, Hayakawa H, *et al.* ST2 suppresses IL-6 production *via* the inhibition of I $\kappa$ B degradation induced by the LPS signal in THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **341**(2): 425~432
- 11 Divanovic S, Trompette A, Atabani S F, *et al.* Inhibition of TLR-4/MD-2 signaling by RP105/MD-1. *J Endotoxin Res*, 2005, **11**(6): 363~368
- 12 Lech M, Kulkarni O P, Pfeiffer S, *et al.* Tir8/Sigirr prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effects of lupus autoantigens. *J Exp Med*, 2008, **205**(8): 1879~1888
- 13 Hafizi S, Dahlbäck B. Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J*, 2006, **273**(23): 5231~5244
- 14 Rothlin C V, Ghosh S, Zuniga E I, *et al.* TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*, 2007, **131**(6): 1124~1136
- 15 Diehl G E, Yue H H, Hsieh K, *et al.* TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity*, 2004, **21**(6): 877~889
- 16 Fearn C, Pan Q, Mathison J C, *et al.* Triad3A regulates

- ubiquitination and proteasomal degradation of RIP1 following disruption of Hsp90 binding. *J Biol Chem*, 2006, **281**(45): 34592~34600
- 17 Mansell A, Smith R, Doyle S L, *et al.* Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol*, 2006, **7**(2): 148~155
- 18 Pothlichet J, Chiquard M, Si-Tahar M. Cutting edge: innate immune response triggered by influenza A virus is negatively regulated by SOCS1 and SOCS3 through a RIG-I/IFNAR1-dependent pathway. *J Immunol*, 2008, **180**(4): 2034~2038
- 19 Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, *et al.* Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol*, 2006, **7**(6): 598~605
- 20 Kameda H, Watanabe M, Bohqaki M, *et al.* Inhibition of NF-kappaB signaling *via* tyrosine phosphorylation of Ymer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **378**(4): 744~749
- 21 Yoshida H, Jono H, Kai H, *et al.* The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for Toll-like receptor 2 signaling *via* negative cross-talk with TRAF6 AND TRAF7. *J Biol Chem*, 2005, **280**(49): 41111~41121
- 22 Carty M, Goodbody R, Schroder M, *et al.* The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol*, 2006, **7**(10): 1074~1081
- 23 Kenny E F, O'Neill L A. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine*, 2008, **43**(3): 342~349
- 24 Mendoza-Barberá E, Corral-Rodríguez M A, Soares-Schanoski A, *et al.* Contribution of globular death domains and unstructured linkers to MyD88. IRAK-4 heterodimer formation: an explanation for the antagonistic activity of MyD88s. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **380**(1): 183~187
- 25 Nquyen T, De Nardo D, Masendycz P, *et al.* Regulation of IRAK-1 activation by its C-terminal domain. *Cell Signal*, 2009, **21**(5): 719~726
- 26 Whitmore M M, Iparraguirre A, Kubelka L, *et al.* Negative regulation of TLR-signaling pathways by activating transcription factor-3. *J Immunol*, 2007, **179**(6): 3622~3630
- 27 den Dunnen J, Gringhuis S I, Geijtenbeek T B. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, **58**(7): 1149~1157
- 28 An H, Zhao W, Hou J, *et al.* SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. *Immunity*, 2006, **25** (6): 919~928
- 29 Shi M, Deng W, Bi E, *et al.* TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nat Immunol*, 2008, **9**(4): 369~377

## Negative Regulation of Toll-like Receptors Signaling Pathways\*

SUN Bing, HAN Dai-Shu\*\*

(Department of Cell Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China)

**Abstract** Toll-like receptors (TLRs) are key mediators of both innate and adaptive immunity by recognizing and eliciting responses to invading pathogens. The activation of TLRs must be stringently controlled in order to avoid exaggerated expression of signaling components as well as pro-inflammatory cytokines that can devastate the host, resulting in chronic inflammatory diseases, autoimmune disorders and aid in the pathogenesis of TLR-associated diseases. Therefore, it is essential that negative regulators act at multiple levels within TLR signaling cascades in order to synchronize the activation and negative regulation of signal transduction to limit potentially harmful immunological consequences. A summary of the various mechanisms employed by negative regulators of TLRs signaling to ensure the appropriate modulation of both immune and inflammatory responses was provided.

**Key words** Toll-like receptors, inflammation, negative regulation, signal transduction

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00213

\*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30570678).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-10-65296457, Fax: 86-10-65296466, E-mail: daishu@public.bta.net.cn

Received: April 6, 2009 Accepted: July 23, 2009