

Toll 样受体与慢性病毒性肝炎

段乃荣 张立婷 陈红

Toll 样受体(toll-like receptor, TLRs)是近年来发现的在天然免疫和获得性免疫中起重要作用的一类模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)家族,通过识别病原相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)主要指一类或一群特定的微生物病原体(及其产物)共有的某些非特异性、高度保守的分子结构,其可被非特异性免疫细胞所识别,如脂多糖(LPS)细菌内毒素、磷酸壁酸(LTA)、肽聚糖(PGN)、甘露糖、细菌 DNA 和病毒单链和双链 RNA 等。

TLRs 通过识别并结合相应的 PAMP,可启动、激活细胞内信号转导,促进细胞因子的释放,介导炎症反应发挥杀菌作用。另外,通过抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)最终诱导 T 细胞的激活和增殖,启动适应性免疫应答。免疫因素是病毒性肝炎发病机制中的主要机制。TLRs 广泛表达于肝实质细胞与非实质细胞上,通过其信号转导参与肝脏病理生理过程^[1,2]。

一、TLRs 家族成员的结构特征、表达特异性及其相应的配体

自 1999 年人类发现 Toll 蛋白以来,目前已在动物体内发现有 13 个 TLRs,称为 TLRs 家族成员。TLRs 结构属 I 型跨膜蛋白受体,由胞外区、跨膜区和胞内区组成。胞外区富含亮氨酸重复结构(leucine-rich repeator, LRRs),该结构加强蛋白之间的黏附,参与对 PAMPs 的识别。不同的 TLRs 细胞外区并不完全相同,跨膜段含有丰富的半胱氨酸,胞内区与白细胞介素受体-1(interleukin-1 receptor, IL-1R)胞内区类似,也称为 Toll/IL-1R(TIR)结构域,它在 Toll 样受体的信号转导过程中发挥重要作用,该结构域改变,就会影响 TLRs 的功能。TLRs 广泛分布于各种组织中,具有细胞分布特异性。TLR1、6、9 广泛分布于各类免疫细胞;TLR2、4、5 分布于除 T、B、NK 淋巴细胞外的免疫细胞;TLR3 只能特异分布于树突状细胞;TLR7、8 分布于外周血白细胞。TLR1、2、3、4、6 均表达于细胞表面;TLR7、8 均来源于 X 性染色体,结构高度保守;TLR3、7、8、9 存在于酸性胞内体^[3]。TLRs 识别的配体:TLR1、2、6 识别细菌胞壁酸、肽聚糖、脂多糖;TLR3 识别病毒 dsRNA 及其合成类似物 poly(I:C);TLR5 识别细菌鞭毛;TLR7、8 识别病毒单链 RNA、疱疹病毒、流感病毒和一些合成物如咪喹莫特 R837;TLR 9 识别细菌或病毒基因组中的非甲基 CPGDNA;TLR11 特异识别泌尿道病原体^[4,5]。此外,近来研究发现,TLR2、4 还可识别内源性有害物质如热休克蛋白(HSPs)、透明质酸、降解产物、饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸等,启动炎症应答,激活单核细胞或树突状细胞,刺激免疫细胞成熟,在抗感染、组织重塑以及肿瘤的免疫监视中起重要作用。

作者单位:730000 兰州市,兰州大学第一医院感染科

通讯作者:陈红, Email:Chenhong1956@126.com

二、TLRs 信号转导途径

目前认为主要存在髓样分化蛋白 88 (MyD88, 作为一种连接蛋白) 依赖性和 MyD88 非依赖性两条途径^[6]。大多数 TLRs 信号转导途径明显依赖 MyD88 发挥调节作用。在 MyD88 依赖性调控途径中, 接头蛋白 MyD88 起重要作用, MyD88 缺陷小鼠的腹腔巨噬细胞不能合成 TNF 或 IL-12 等细胞因子。MyD88 有两个结构域, 即 C-端 TIR 结构域 (toll/IL-1R homologous region, TIR) 和 N-端的死亡结构域 (death domain, DD)。当配体与 TLRs 结合, 即可导致 MyD88 集聚在 TIR 结构域。MyD88 的死亡结构域可以和 IRAK (白细胞介素相关激酶) 相互作用。IRAK 激活后, 另一种接头蛋白肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6) 被磷酸化并集聚于 IRAK 区域。TRAF6 也有两端即 C-端与 N-端, 其 N-末端对于激活下游信号分子非常重要。研究证实, TRAF6 基因敲除后, 其骨髓来源的巨噬细胞在 LPS 刺激后一氧化氮产生减少, NF- κ B 不能激活。有多种分子机制可以转导 TRAF6 的下游信号到 IKK 复合体并使其激活: 一种是经过进化保守信号中介子 (evolutionarily conserved signaling intermediate of Toll pathways, ECSIT), ECSIT 再通过 MEKK1 作用于 IKK 复合体; 另一种途径是 TRAF6 通过激活促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 (mitogen activated protein kinase kinase kinase, MAPKKK) 可以激活转化生长因子- β 激活激酶-1 (transforming growth factor β activated kinase 1, TAK-1)。TAK-1 再通过 NF- κ B 诱导激酶 (NF- κ B inducing kinase, NIK) 作用于 IKK 复合体, NIK 也可以反过来磷酸化 MEK3、MEK6 和 MKK4, 进而作用于 p38 和 JNK1, JNK1 进入核内作用于核转录因子 c-FOS, 对基因表达的转录进行调节。IKK 复合体激活后, 作用于 NF- κ B 复合物中的特异性抑制因子 I κ B, 使其磷酸化而降解。通常, 核转录因子 NF- κ B 与其抑制蛋白 I κ B 相关联, 存在于胞质中。当 I κ B 降解后, NF- κ B 游离、激活, 然后转运到细胞核内, 其活性二聚体启动细胞因子 (如 TNF- α 和 IL-1、IL-12) 和辅助协同刺激分子 CD80、CD86 基因的转录, 诱导特异性靶细胞基因的表达, 从而激活特异性免疫系统^[7,8]。MyD88 非依赖途径中, 许多信号转导机制还不太明确, 在此不再叙述。

三、Toll 样受体在慢性病毒性肝炎中的抗病毒作用机制

慢性病毒性肝炎主要指慢性乙型肝炎与慢性丙型肝炎。先天性免疫和适应性免疫的相继激活是清除病毒的关键。在 DC、NK、NKT 淋巴细胞中 Toll 样受体与之相互沟通, 在形成随后的适应性免疫应答中起关键作用^[9]。近期研究表明, 激活宿主先天性免疫应答进行抗病毒感染的途径有两条: 一是利用 TLRs 去发现通过细胞内吞作用进入到内含体的病毒, 通过几个信号蛋白致使转录因子 NF- κ B、IRF3、IRF7 的激活, 最终诱导干扰素产生, 而发挥抗病毒作用; 另一条是利用 RNA 解旋酶 (RIG-1) 是一种胞内双链 RNA (dsRNA) 的受体, 通过最近被认识的衔接蛋白 MAVS (是先天性抗病毒免疫所分泌的成分, 位于线粒体膜上) 激活 NF- κ B 和 IRFs, 诱导干扰素产生^[10]。Wu 等^[11]研究认为肝脏的先天性免疫系统通过 TLRs 促效剂激活后能控制 HBV 复制。Isogawa 等^[12]为检查不同 TLRs 对 HBV 复

制的影响,将 TLR2、3、4、5、7、9 的相应配体通过静脉注射到转基因小鼠体内,在 24 小时内,除 TLR2 之外,其余 TLRs 配体均以促进 I 型干扰素的产生而对 HBV 复制产生抑制作用。TLR4 通过上调一氧化氮合酶(iNOS)的表达诱导 HBV 特异免疫应答而发挥抗病毒作用。Sato 等^[13]用实时荧光定量 RT-PCR 方法研究了慢性 HCV 患者与健康人外周血单核细胞 TLR2 ~ 9 mRNA 表达,发现患者 TLR4、7、8 在 CD14⁺ 单核细胞中表达增加,TNF- α 、IL-6 和 IL-12 在患者血清中也增加,表明 TLRs 与细胞因子表达水平与慢性 HCV 感染相关,TLR3 识别双链 RNA,诱导 I 型干扰素的合成。当 HCV 感染人肝细胞,增加了 IFN- β 和干扰素刺激基因 56 (ISG56)启动子的激活,TLR3 的配体 poly(I:C)诱导 IFN- β 和 ISG56 表达,适度抑制 HCV 感染^[14]。Tomas 等^[15]研究 TLR1 ~ 9 受体激动剂是否能使 HCV 感染患者外周血单核细胞产生抗病毒因子,发现 TLR3、4、7、8、9 受体激动剂在外周血单核细胞具有诱导抗病毒因子产生效能,TLR3、7、9 受体激动剂成为一种抑制 HCV 复制的治疗方法。测定 TLR3、7 表达能为 HCV 感染识别提供一套新的分子技术。有研究认为,在慢性 HBV 感染患者外周血单核细胞中 TLR3、7、9 mRNA 表达低下,可能是 HBV 通过某种因子抑制受体表达。TLRs 通过诱导 IFN 和 TNF 等细胞因子的合成,调节 Th1/Th2 免疫应答平衡而发挥抗病毒作用。靶向 TLRs 的信号转导可能成为防治肝炎令人鼓舞的新途径。

四、Toll 样受体与肝损伤

病毒性肝炎造成的肝损伤不是病毒在肝细胞内复制的结果,而是由病毒引起机体免疫应答所介导。Toll 样受体识别相应的病原体,通过胞内段 Toll/IT-1R (TIR) 结构域以 MyD88 依赖和非依赖信号转导途径,分别激活 NF- κ B 和丝裂原蛋白激酶(MAPK)级联反应通路,促进 T 细胞的激活增殖,导致大量促炎性因子如 IL-1、IL-6、TNF- α 释放。前炎性细胞因子的激活,在严重肝损伤的病理生理过程中被认为起了关键作用。反过来,细胞因子可以调节肝细胞上 TLRs 表达。先天性免疫细胞,尤其是树突状细胞,通过激活与调节胸腺依赖性 T 淋巴细胞,而识别病原体和启动适应性免疫反应而起到一个中枢调节作用,库普弗细胞激活招募巨噬细胞,释放细胞因子致炎症持久、肝细胞损伤、胆汁淤积^[16]。最近研究证实,TLR4 被 LPS 诱导参与早期肝脏损伤。Hua 等^[17]用 CCl₄ 诱发大鼠慢性肝损伤和肝纤维化过程中,观察肝组织与库普弗细胞 TLR4 基因表达变化,在给予 CCl₄ 2 周后,肝组织与库普弗细胞 TLR4 mRNA 表达增加,在 4 周和 6 周达到高峰,在 8 周开始下降,而在正常的肝组织中 TLR4 mRNA 表达低下,在正常的库普弗细胞检测不到 TLR4 mRNA 表达,证实在 CCl₄ 诱导肝损伤过程中,TLR4 基因表达上调,上调程度与肝损伤程度和库普弗细胞激活有关,肠道衍生的内毒素可能上调 TLR4 的表达。晏春根等^[18]在 BALB/C 小鼠腹腔内联合注射 D-氨基半乳糖 (D-Gal) 900 mg/kg 与 LPS 10 μ g/kg,用半定量逆转录-聚合酶链反应测肝组织中 TLR2 mRNA 表达,用免疫组织化学方法观察 TLR2 蛋白的表达,结果显示正常小鼠肝组织少量表达 TLR2 mRNA,给药 1 小时表达显著增加,免疫组织化学也显示

TLR2 蛋白也有类似变化,表明 TLR2 可能通过启动下游炎症反应基因表达及下游细胞因子释放而参与 D-Gal/LPS 诱导的暴发性肝衰竭。Jiang 等^[19]在脂多糖/D 半乳糖(LPS/D-GalN)诱导的小鼠急性肝衰竭模型中发现,用 TLR3 配体 poly(I:C)预先注射的小鼠,其肝损伤程度及死亡率明显下降,从而提示 TLR3 信号活化可通过下调巨噬细胞上的 TLR4 而减弱 LPS 诱发的肝衰竭。大量的研究业已证实病原体及其产物、药物、酒精及其某些内源性物质均可通过 TLRs 介导的信号转导级联作用,导致大量炎症介质及细胞因子释放,造成肝损伤、引起肝纤维化、肝硬化、酒精性肝病、药物性肝病及自身免疫性肝病。探讨影响 TLRs 信号转导的一些手段和药物对这些疾病的治疗提供新思路。

五、问题与展望

总之,在科研者重新关注天然免疫的今天,TLRs 作为联络先天性免疫与适应性免疫的桥梁,在许多学科领域成为研究热点。研究证明 TLRs 与临床中许多疾病的发病机制有关。特别是在近两年,作了许多 TLRs 与肝病的研究。大量证据表明,TLRs 参与肝脏针对细菌及病毒免疫反应,并广泛参与肝纤维化、脂肪肝、肝脏再生等病理生理变化过程。尽管有不少 TLRs 与病毒性肝炎的研究报道,然而不同的 TLRs 在同一种肝炎中表达不相同,同一种 TLRs 在不同类型的肝炎中表达也不相同。TLRs 与众多细胞因子以及与肝炎病毒之间的作用机制如何? TLRs 为什么会出现这种表达差异? 这些问题的机制还不太明确,还有待于进一步的深入研究。相信随着分子免疫学与分子生物学的发展,这些机制会逐渐明确。深入研究病毒性肝炎的天然免疫应答之间的复杂关系不仅能揭示病毒性肝炎的细胞和分子免疫机制,而且还为防治病毒性肝炎提供新的策略。

参 考 文 献

- 1 Paik YH, Lee KS, Lee HJ, et al. Hepatic stellate cells primed with cytokines upregulate inflammation in response to peptidoglycan or lipoteichoic acid. *Lab Invest*, 2006, 86:676-686.
- 2 Vodovotz Y, Liu S, McCloskey C, et al. The hepatocyte as a microbial product-responsive cell. *J Endotoxin Res*, 2001, 7:365-373.
- 3 赵甫涛, 姬新颖, 潘蕾, 等. Toll 样受体及其在病毒性肝炎发病机制中的作用. *世界华人消化杂志*, 2005, 13:2459-2463.
- 4 Wong CK, Cheung PF, Ip WK, et al. Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37:85-96.
- 5 Terhorst D, Kalali BN, Weidinger S, et al. Monocyte-derived dendritic cells from highly atopic individuals are not impaired in their pro-inflammatory response to toll-like receptor ligands. *Clin Exp Allergy*, 2007, 37:381-390.
- 6 Finlay BB, Hancock RE. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2:497-504.
- 7 Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, et al. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*, 2003, 300:1148-1151.
- 8 刘光伟, 夏雪培, 赵勇. Toll 样受体信号传导途径的研究进展. *动物学杂志*, 2005, 40:117-121.
- 9 Kanto T, Hayashi N. Innate immunity in hepatitis C virus infection: Interplay among dendritic cells, natural killer cells and natural killer T cells. *Hepatol Res*, 2007, 37:S319-326.
- 10 Seth RB, Sun L, Chen ZJ. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res*, 2006, 16:141-147.
- 11 Wu J, Lu M, Meng Z, et al. Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice. *Hepatology*, 2007, 46:1769-1778.

- 12 Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, et al. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Virol*, 2005, 79:7269-7272.
- 13 Sato K, Ishikawa T, Okumura A, et al. Expression of Toll-like receptors in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22:1627-1632.
- 14 Kanda T, Steele R, Ray R, et al. Hepatitis C virus infection induces the beta interferon signaling pathway in immortalized human hepatocytes. *J Virol*, 2007, 81:12375-12381.
- 15 Thomas A, Laxton C, Rodman J, et al. Investigating Toll-like receptor agonists for potential to treat hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51:2969-2978.
- 16 Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis*, 2007, 27:339-350.
- 17 Hua J, Qiu DK, Li JQ, et al. Expression of Toll-like receptor 4 in rat liver during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22:862-869.
- 18 晏春根, 谢青, 周霞秋, 等. 暴发性肝衰竭中 Toll 样受体 2 表达的实验研究. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12:549-551.
- 19 Jiang W, Sun R, Wei H, et al. Toll-like receptor 3 ligand attenuates LPS-induced liver injury by down-regulation of toll-like receptor 4 expression on macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:17077-17082.

(收稿日期:2008-06-02)

(本文编辑:李卓)

段乃荣, 张立婷, 陈红. Toll 样受体与慢性病毒性肝炎[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2009, 3(4): 444-448.