

- [13] Arida RM, Scorza FA, da Silva SG, et al. The potential role of physical exercise in the treatment of epilepsy[J]. *Epilepsy Behav*, 2010, 17(4):432-435.
- [14] 刘桂苓, 楚平华. 增强自我效能干预对癫痫患者自尊、总体幸福感及应对方式的影响[J]. *国际护理学杂志*, 2010, 29(5):652-655.
- [15] 盛卫月, 楚平华. 增强自我效能干预对癫痫患者自尊及社会功能的影响[J]. *国际护理学杂志*, 2010, 29(3):432-435.
- [16] 居丽晶, 楚平华, 范洪峰. 自我管理训练对癫痫患者心理及希望的影响[J]. *中国民康医学*, 2011, 23(14):1717-1720.
- [17] 范继美, 楚平华, 李冬梅. 自我管理训练对癫痫患者自我概念及社会功能的影响[J]. *国际护理学杂志*, 2010, 29(3):449-451.
- [18] Thompson NJ. Distance delivery of mindfulness-based cognitive therapy for depression: project UPLIFT[J]. *Epilepsy Behav*, 2010, 19(3):247-254.
- [19] Walker ER, Obolensky N, Dini S, et al. Formative and process evaluations of a cognitive-behavioral therapy and
- mindfulness intervention for people with epilepsy and depression[J]. *Epilepsy Behav*, 2010, 19(3):239-246.
- [20] 李秀辉, 楚平华, 李冬梅. 家庭干预对癫痫患者心理及适应行为的影响[J]. *国际护理学杂志*, 2009, 28(12):1675-1678.
- [21] 卢世臣. 家庭干预对癫痫患儿家庭功能缺陷的影响[J]. *国际护理学杂志*, 2009, 28(2):181-183.
- [22] 韩康玲, 楚平华. 心理剧治疗对癫痫患儿羞耻感及生活质量的影响[J]. *中国实用护理杂志*, 2010, 26(23):89-91.
- [23] 张晓艳, 楚平华, 李冬梅. 心理剧治疗对改善癫痫患者焦虑抑郁情绪及应对方式的作用[J]. *护理学杂志*, 2009, 24(9):72-74.
- [24] Pena P, Sancho J, Rufo M, et al. Driving cost factors in adult outpatients with refractory epilepsy: a daily clinical practice in clinics of neurology in Spain[J]. *Epilepsy Res*, 2009, 83(2/3):133-143.
- [25] Mittan RJ. Psychosocial treatment programs in epilepsy: a review[J]. *Epilepsy Behav*, 2009, 16(3):371-380.

(收稿日期:2011-12-15 修回日期:2012-01-14)

· 综 述 ·

## Toll 样受体 4 与动脉粥样硬化

张溢华 综述, 陈礼刚<sup>△</sup> 审校

(泸州医学院附属第一医院神经外科, 四川泸州 646000)

**关键词:** TLR4; 动脉粥样硬化; 信号通路; 配体

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.12.031

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2012)12-1223-03

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是脑血管疾病、冠脉疾病、周围动脉疾病等诸多血管性疾病的病理基础, 心脑血管疾病的发生率随着 AS 发病率的增高, 而不断增加, 人类身体健康受到严重威胁。研究表明, AS 是一种脂质介导的慢性炎症性疾病<sup>[1]</sup>, 以血管壁内脂质沉积、炎症细胞聚集为特征<sup>[2]</sup>, 免疫反应贯穿于 AS 的始终。Toll 样受体 (toll like receptors, TLR) 尤其是 Toll 样受体 4 (TLR4) 作为一类介导非特异性免疫反应的跨膜信号转导受体蛋白, 能够识别多种病原相关的分子模式 (PAMPs), 并能调控胆固醇的代谢、细胞凋亡、斑块的稳定性、炎症和免疫反应以及血管重塑等病理过程, 在动脉粥样硬化的发生发展中的作用极其重要, 是最近几年研究较多的模式识别受体, 其在免疫反应中作用突出。TLR4 能识别 PAMPs 并激活炎症细胞。TLR4 既可识别外源性配体-革兰阴性细菌细胞壁成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 同时也能识别动脉损伤过程中表达的内源性配体。诸多研究表明, TLR 与越来越多的临床疾病关系密切<sup>[3]</sup>, 在 AS 的发生、发展进程中, TLR4 的作用至关重要, 本文就 TLR4 的结构功能、信号转导通路及 AS 之间的相关性作一综述。

### 1 TLR4 的概述

TLR4 是模式识别受体中研究最多的人 TLR, 主要表达于树突状细胞和巨噬细胞等免疫细胞表面, 在免疫应答和炎症反应中起重要作用。TLR4 属于 I 型跨膜蛋白, 由 24 个亮氨酸重复序列组成的细胞外区、跨膜区和细胞内的序列保守区 3 个部分组成。TLR4 位于 9q32-33, cDNA 长度有 3 811 bp, 包含

879 个氨基酸, 多表达于 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、白细胞、单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、小肠上皮细胞、表皮微血管、脐静脉内皮细胞、人成髓牙纤维细胞、人子宫颈平滑肌细胞、呼吸道上皮细胞和心肌细胞等<sup>[4]</sup>。TLR4 作为模式识别受体, 通过胞外区的亮氨酸重复序列可使不同的 PAMPs 被识别。其既可识别外源性配体-革兰阴性细菌细胞壁成分 LPS, 同样也可识别动脉损伤过程中表达较多的内源性配体, 从而介导机体炎症反应过程。

### 2 TLR4 如何转导信号通路

**2.1 细胞外部分的信号通路转导** 在 TLR4 介导的细胞信号转导过程中, LPS 结合蛋白 (LPS-binding protein, LBP) 首先将 LPS 从细菌外膜上转移下来, 并与其脂质 A 结合, 形成 LPS-LBP 复合物, 该复合物再与可溶性 CD14 (sCD14) 结合, 形成由这三者构成的复合物。再将复合物中的 LPS 传递给膜结合 CD14 (mCD14), 并由 mCD14 将 LPS 转运并锚定于由 TLR4 和髓样分化蛋白-2 (myeloid differentiation protein, MD-2) 构成的受体复合物<sup>[5]</sup>, LPS 结合 MD-2 后, 通过 TLR4 的细胞外富含亮氨酸的重复序列介导 TLR4 的聚合, 进而触发 TLR4 的信号转导。同时, LBP 和 CD14 将 LPS 传至高密度脂蛋白颗粒, 促进其失活。

**2.2 细胞内部分的信号通路转导** 髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 是 TLR4 信号通路中重要的接头蛋白, 因此, 可以根据 TLR4 的信号转导过程是否有 MyD88 的参与将该信号通路分为 MyD88 依赖性 (早期反应)

<sup>△</sup> 通讯作者, Tel: (0830) 3165460; E-mail: chengligang\_cool@163.com。

和非依赖性(迟发反应)信号通路两种<sup>[6]</sup>。前者活化丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和核因子- $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)信号通路,后者活化 NF- $\kappa$ B和干扰素调节因子-3(IFN-regulated factor-3, IRF3)信号通路。通过上述信号途径 TLR4 诱导炎症细胞释放炎症介质来介导炎症反应;同样 TLR4 也通过激活树突状细胞促进抗原递呈,介导先天性免疫转化为获得性免疫。

**2.2.1 MyD88 依赖性信号转导通路** MyD88 由氨基端死亡结构域(death domain, DD)、羧基端 TIR 结构域和一个短的连接序列组成。在 MyD88 依赖的信号通路转导过程中, MyD88 通过 TIR 结构域与 TLR4 的 TIR 相结合、通过 DD 结构域与 IRAK(IL-1R associated kinase, IRAK)相结合,导致其自身磷酸化<sup>[7]</sup>,从而使肿瘤坏死因子相关受体因子 6(tumor necrosis factor associated receptor 6, TRAF6)能与磷酸化的 IRAK4-IRAK1 结合,形成复合物。随后, IRAK1- TRAF6 从 TLR4 上分离出来,再去激活其他的复合物,包括转化生长因子  $\beta$  活化激酶(transforming growth factor  $\beta$  activated kinase, TAK1)、TAK1 结合蛋白 1(TAB1)、TAK1 结合蛋白 2/3(TAB 2/3), 并使其磷酸化。TAK1 就能使抑制性的 NF- $\kappa$ B(inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B, I- $\kappa$ B)激酶活化,形成活化的 I- $\kappa$ B 激酶(IKK)复合物 IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ 、IKK $\gamma$ , 增加 I- $\kappa$ B 的降解,从而使细胞核内的 NF- $\kappa$ B 水平升高,导致细胞内不同促炎症反应基因的表达增加。通过上述信号转导途径, TLR4 介导转录因子的激活,诱导转录靶基因,并介导早期的非特异性免疫反应。

**2.2.2 MyD88 非依赖性信号转导通路** MyD88 非依赖性信号转导通路为 IRF3 和 NF- $\kappa$ B 的迟发激活反应。TLR4 的激活引起 TIR 的接头蛋白分子(TRIF,也叫 TICAM-1)结合了细胞内的 TIR 结构域, TRIF 再激活干扰素调节蛋白 3(IRF3), IRF3 与干扰素激活反应元件连接,使得靶基因的转录被激活。有实验证明,在 TRAF 缺乏的细胞中,不能激活 I 型干扰素,这说明这条信号转导通路可能是由 TRAF 介导的。且这一通路也能诱导干扰素诱导蛋白-10、糖皮质激素衰减反应基因-16、干扰素调节基因-1 表达和 DC 的成熟<sup>[8]</sup>。

### 3 TLR4 与 AS 的关联性

AS 是一种特别的慢性炎症性疾病,以血管壁内炎症细胞及脂质聚集为特征<sup>[9]</sup>,其进程可被分为若干不同阶段,每一个阶段都有不同的细胞分子学特征<sup>[10]</sup>,而由 TLR4 介导的免疫反应却贯穿于 AS 的始终。TLR4 胞内段结构与 IL-1 受体类似,被称之为 TLR 结构域(Toll/IL-1 receptor homologous region, TIR),负责受体活化后的信号转导。在对人及小鼠动脉粥样硬化模型的组织切片进行免疫组化结果发现<sup>[11]</sup>, TLR4 在粥样斑块组织特别是在脂质丰富、巨噬细胞浸润的部位显著表达,并与巨噬细胞共表达。另有研究表明,AS 患者的斑块中 TLR4 表达增高,且主要表达于巨噬细胞和血管内皮细胞;在载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠 AS 模型中 TLR4 基因缺陷斑块组成改变,降低斑块中巨噬细胞和脂质的成分,并明显降低促炎症因子的表达<sup>[12-13]</sup>。巨噬细胞中激活的 TLR4 能引起一系列信号级联反应,诱发炎症因子、蛋白酶表达,进一步促进动脉粥样硬化形成。

**3.1 TLR4 在 AS 中的内源性配体** 目前已经发现多种 TLR4 的内源性配体,例如:脂多糖、热休克蛋白、纤连蛋白-EDA、硫酸类肝素、透明质酸、纤维蛋白原、mmLDL、泰素、甘露糖醛酸、包膜蛋白、中性粒细胞弹性蛋白酶、肺炎衣原体 HSP60 等,且已经被证明部分受体在 AS 的形成中作用至关重要。纤连蛋白是一种分子量较大的细胞外基质糖蛋白,作为细

胞外基质的结合部位,它能调节细胞外基质的组成。在 AS 患者的动脉内膜可见纤连蛋白及其变体,包含额外的结构域 A(纤连蛋白-EDA),纤连蛋白-EDA 在非 AS 患者动脉中是不存在的<sup>[14]</sup>。Tan 等<sup>[15]</sup>证实小鼠纤连蛋白-EDA 的缺失可以通过降低致 AS 的遗传背景来减少 AS 的发生,这个过程可能是通过降低巨噬细胞对 LDL 的摄取来实现的。在 ApoE 敲出的小鼠动脉损害部位,其纤连蛋白-EDA 的 mRNA 表达水平升高;另外,血清中 EDA 的水平也同样地升高<sup>[16]</sup>。在细胞的原代培养中发现纤连蛋白-EDA 不但能激活 TLR4,而且还能诱导 TLR4 的表达<sup>[17]</sup>。这些研究均说明纤连蛋白-EDA 可能是 TLR4 致 AS 的内源性配体,参与 TLR4 的信号转导通路。

脂类对于 AS 的发生发展中起很大作用,如内皮下脂质的沉积、巨噬细胞对脂质的摄取以及泡沫细胞的形成,在脂纹的形成过程中至关重要。高胆固醇患者巨噬细胞膜表面的 LDL 受体水平降低,这提示脂质在被巨噬细胞吞噬之前已经发生氧化。Xu 等<sup>[18]</sup>研究发现在单核-巨噬细胞中,与天然的 LDL 相比氧化型 LDL(oxidized LDL, oxLDL)能使 TLR4 mRNA 的表达水平增加。然而,oxLDL 能否结合并激活 TLR4 还未被证实。相反,在树突状细胞中 TLR4 活化后炎症因子的产生却被抑制,这可能是由于 I- $\kappa$ B 进入细胞核内导致的<sup>[19]</sup>。oxLDL 的早期形式 mmLDL 能介导肌动蛋白的集合及巨噬细胞的扩散,这依赖于 TLR4 信号通路的激活。另外,Miller 等发现 mmLDL 诱导巨噬细胞产生炎症介质有一部分依赖于 TLR4。直到今天,在 AS 形成进程中,氧化型脂类通过 TLR4 信号通路发挥作用的确切作用是有争议的。

有多数热休克蛋白(heat shock protein, HSP)已经被证实 AS 的过程中起重要作用。HSP 属于分子监控蛋白类,在蛋白质-蛋白质相互作用中比较关键。HSP 在多种细胞类型中均有表达,特别是在处于应激状态的细胞中表达较高,例如炎症、高热、缺氧等。在 ApoE 基因敲出、高胆固醇饮食饲养的小鼠与 ApoE 基因未敲出、正常饮食小鼠相比,前者动脉粥样斑块中 HSP 60 和 HSP70 表达增高<sup>[17]</sup>,在稳定的 AS 斑块中 HSPmRNA 的水平有所衰减<sup>[20]</sup>。HSP 作为 TLR4 的内源性配体,能够通过 TLR4 影响 AS 中产生发生和发展。然而,到目前为止对于 HSP60 和 HSP70 是如何通过 TLR4 在 AS 中产生发病机制的研究还不清楚。

虽然许多研究均表明,TLR4 的内源性配体通过激活 TLR4 影响 AS 的发生和发展,但是其在影响 AS 发生发展和斑块的稳定性方面的分子机制不详。

**3.2 TLR4 与 AS** Michelsen 等<sup>[21]</sup>是最早提出 TLR4 与 AS 形成是有直接联系的。在这个研究中,TLR4/ApoE 都被敲出的小鼠比只有 ApoE 被敲出的小鼠 AS 的发生率小,其内膜损伤程度也比 MyD88/ApoE 都被敲出的轻。在 TLR4/ApoE 和 MyD88/ApoE 都被敲出的小鼠中,其抗 AS 的作用与胆固醇水平几乎没有关联。同时,在 TLR4/ApoE 和 MyD88/ApoE 都被敲出的小鼠 AS 斑块中的脂质和巨噬细胞也显著降低,这说明 TLR4 信号通路在动脉粥样斑块的发生发展和斑块稳定性中至关重要。

外向性的重构导致血管壁的增生是 AS 进程中的代偿性机制。在外向性重构过程中细胞产生基质金属蛋白酶,它能够削减粥样斑块的稳定性,导致其不稳定性增加容易发生损伤<sup>[22]</sup>。Hollestelle 等 TLR4 在血管外向性重构中的作用,他们建立了一个结扎对此颈动脉的小鼠动物模型,实验表明,血管的外向性重构依赖于 TLR4,在 TLR4 缺乏的小鼠模型没有出现血管的外向性重构。这些证据均表明,TLR4 在血管外向性

重构的代偿机制和基质金属蛋白酶的活化中都发挥重要的作用,使粥样斑块的不稳定性增加。

血管平滑肌细胞是动脉粥样斑块中重要的产生基质的细胞,所以它的凋亡将导致细胞外基质的产生减少。TLR4 通过 Fas 相关死亡结构域依赖的途径来促进血管平滑肌细胞的凋亡<sup>[23]</sup>。最近,Ishikawa 等<sup>[24]</sup>研究发现 TLR4 在急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)、稳定性心绞痛(stable angina,SA)等住院患者破裂的粥样斑块中有所表达。与无缺血性疾病的患者相比,AMI 和 SA 患者都存在全身性的 TLR4 mRNA 和蛋白质表达水平增高<sup>[25]</sup>。这些都说明 TLR4 在动脉粥样斑块的形成中发挥重要作用。

#### 4 小结与展望

AS 是一种脂质介导的慢性炎症性疾病,大量的证据表明 TLR4 是 AS 和非特异性免疫之间的重要介质。TLR4 广泛地表达与不同的细胞类型,与 AS 的发病机理和促 AS 的配体结合有关。TLR4 能激活 NF- $\kappa$ B 转录因子和促炎性蛋白,进一步促进炎症反应的发生和动脉粥样斑块的不稳定性增加。通过对 TLR4 结构功能、信号通路及其与 AS 的关联性研究有助于加强对 AS 的了解,更明确揭示 AS 的实质,为防治 AS 提供新靶点。

#### 参考文献:

- [1] Wijnand K,Den D,Caroline C,et al. Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization [J]. *Atherosclerosis*,2010,209(2):314-320.
- [2] Hansson GK. Inflammation,atherosclerosis,and coronary artery disease[J]. *New Engl J Med*,2005,352(16):685-695.
- [3] 嵇武. Toll 样受体与临床疾病关系的研究进展[J]. *中国误诊学杂志*,2007,16(7):3709-3711.
- [4] Zhang X,Shan P,Qureshi S,et al. TLR4 deficiency confers susceptibility to ethal oxidant lung injury[J]. *J Immunol*,2005,175(8):4834-4838.
- [5] Palsson-McDermott EM,O' Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4 [J]. *Immunology*,2004,113(2):532-162.
- [6] 杨玉荣,余锐萍,梁宏德. Toll-NF- $\kappa$ B 信号途径及其介导的功能[J]. *细胞生物学杂志*,2007,29(4):483-486.
- [7] Li T,Hu J,Thomas JA,et al. Differential induction of apoptosis by LPS and taxol in monocytic cells[J]. *Mol Immunol*,2005,42(9):1049-1055.
- [8] 张乐逸,张宇飞,嵇武. Toll 样受体 4 的研究进展和临床意义[J]. *肠外与肠内营养*,2009,16(2):123-126.
- [9] Hansson GK. Inflammation,atherosclerosis,and coronary artery disease [J]. *New Engl J Med*,2005,352(16):1685-1695.
- [10] 耿小勇,陈一文. Toll 样受体 4 在动脉粥样硬化中的作用研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*,2008,16(1):78-80.
- [11] Xu XH,Shah PK,Faure E. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL [J]. *Circulation*,2001,104(10):3103-3108.
- [12] Punturieri A,Alviani RS,Polak T,et al. Specific engagement of TLR4 or TLR3 does not lead to IFN-beta media-

ted innate signal amplification and STAT1 phosphorylation in resident murine alveolar macrophages [J]. *Immunol*,2004,173(2):1033-1042.

- [13] Bjorkbacka H,Kunjathoor VV,Moore KJ,et al. Reduced atherosclerosis in MyD88 null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways [J]. *Nat Med*,2004,10(4):416-421.
- [14] Magnusson MK,Mosher DF. Fibronectin: structure, assembly,and cardiovascular implications[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,1998,18(9):1363-1370.
- [15] Tan MH,Sun Z,Opitz SL,et al. Deletion of the alternatively spliced fibronectin E III A domain in mice reduces atherosclerosis[J]. *Blood*,2004,104(1):11-18.
- [16] Babaev VR,Porro F,Linton MF,et al. Absence of regulated splicing of fibronectin EDA exon reduces atherosclerosis in mice[J]. *Atherosclerosis*,2008,197(2):534-540.
- [17] Schoneveld AH,Hoefler I,Sluijter JP,et al. Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness [J]. *Atherosclerosis*,2008,197(1):95-104.
- [18] Xu XH,Shah PK,Faure E,et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL [J]. *Circulation*,2001,104(25):3103-3108.
- [19] Shamshiev AT,Ampenberger F,Ernst B,et al. Dyslipidemia inhibits Toll-like receptor-induced activation of CD8alpha-negative dendritic cells and protective Th1 type immunity[J]. *J Exp Med*,2007,204(2):441-452.
- [20] Kanwar RK,Kanwar JR,Wang D,et al. Temporal expression of heat shock proteins 60 and 70 at lesion-prone sites during atherogenesis in ApoE-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2001,21(12):1991-1997.
- [21] Michelsen KS,Wong MH,Shah PK,et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2004,101(29):10679-10684.
- [22] Hollestelle SC,de Vries MR,van Keulen JK,et al. Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling [J]. *Circulation*,2004,109(3):393-399.
- [23] Haase R,Kirschning CJ,Sing A,et al. A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages [J]. *J Immunol*,2003,171(8):4294-4303.
- [24] Ishikawa Y,Satoh M,Itoh T,et al. Local expression of Toll-like receptor 4 at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction [J]. *Clin Sci (Lond)*,2008,115(4):133-140.
- [25] Methe H,Kim JO,Kofler S,et al. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome[J]. *Circulation*,2005,111(20):2654-2661.