

# Toll 样受体 4 在动脉粥样硬化中的作用研究进展

耿小勇, 陈一文 综述, 秦明照 审校

(首都医科大学附属北京同仁医院干部医疗科, 北京市 100730)

[关键词] 内科学; Toll 样受体; 动脉粥样硬化; 心血管疾病; 免疫反应

[摘要] Toll 样受体尤其是 Toll 样受体 4 作为介导天然免疫反应的一类跨膜受体蛋白在动脉粥样硬化进程中的作用日益引起关注, 本文就其结构、配体及其在动脉粥样硬化各阶段作用及动脉粥样硬化免疫学治疗现状作一概述。

[中图分类号] R392

[文献标识码] A

动脉粥样硬化以血管壁内脂质、炎症细胞聚集为特征<sup>[1]</sup>。越来越多的证据表明动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种炎症性疾病, 而近年来研究显示免疫反应贯穿了动脉粥样硬化的整个过程。Toll 样受体(toll like receptors, TLR)尤其是 Toll 样受体(toll like receptor, TLR)4 作为一类介导天然免疫反应的跨膜信号转导受体家族在动脉粥样硬化进程中的作用亦日益引起关注。

## 1 免疫反应与动脉粥样硬化

先天免疫反应迅速而非特异, 巨噬细胞和树突细胞是其重要组成部分, 相应配体与其结合后, 细胞被活化而诱导炎症反应(如: 分泌炎症细胞因子、趋化因子, 上调清道夫受体表达, 吞噬氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)等参与 As 形成和发展。此外, 活化巨噬细胞可进一步影响一些基因的表达如过氧化体增殖物激活型受体(peroxisome Proliferator-activated receptors, PPAR)、CD36、ATP 结合盒 A1(ATP-binding cassette A1, ABCA1), 后者能影响巨噬细胞的炎症反应及致 As 作用。其他先天免疫的可溶性分子, 如补体及 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)也涉及 As 的形成。获得性免疫反应具有特异性, 启动缓慢作用持久, 具有高度特异性和亲合力的抗原分子可特异识别 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)和 B 细胞受体(B cell receptor, BCR)。树突细胞和巨噬细胞亦可活化 T 细胞。而 T 细胞是早期或晚期的斑块重要组成部分。在早期斑块上广泛存在着 Th1 细胞分泌的白细胞介素 2、干扰素  $\gamma$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ), TNF $\alpha$  可增强 INF $\gamma$  的分泌, INF $\gamma$  是主要的炎症前因子和致 As 前因子, 可抑制平滑肌细胞增殖、胶原降解、活化巨噬细胞, 促进斑块破裂。INF $\gamma$  调节致 As 前因子白细胞介素 18 的分泌, 也抑制 Th2 细胞分泌白细胞介素 4

和白细胞介素 10。Th 2 拮抗 Th 1 细胞的致 As 作用, 如白细胞介素 10 抑制白细胞介素 12 和 INF $\gamma$  的分泌。Th2 细胞有保护作用, 和 Th 1 细胞共同影响斑块的进程及稳定性。巨噬细胞、平滑肌细胞、Th 3 细胞可分泌具有抗炎作用的转化生长因子  $\beta$ , 后者可刺激胶原合成, 稳定斑块, 而抑制转化生长因子  $\beta$ , 可促进斑块不稳定。

总之, 免疫反应在 As 形成和发展过程中发挥了重要作用。相关研究为拓展临床治疗提供了新的思路。

## 2 Toll 样受体 4 的结构和配体及信号传导途径

### 2.1 Toll 样受体 4 的结构和配体

Toll 样受体属于 iv 型跨膜蛋白, 其胞外区结构由富含亮氨酸的重复序列组成, 参与配体的识别, 其胞内区结构与白细胞介素 1 受体 1(interleukin 1 receptor 1, IL-1R1)的胞内区相似, 称为 TIR 区(TLR/IL-1R1 homologous region), 负责活化信号的转导。不同的 TLRs 在与相应的配体结合后, 通过一系列蛋白质级联反应激活核因子  $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)等, 诱导很多快速反应基因的活化, 产生效应分子如: 一氧化氮合成酶、抗菌肽、炎症细胞因子等参与机体炎症反应。TLR 的主要配体为病原体相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP), 如脂多糖、磷壁酸、肽聚糖、甘露糖和葡聚糖等。这些分子结构可被非特异性免疫细胞所识别。TLR4 主要识别脂多糖及一些具有保守类脂 A 结构的衍生物, 还可识别活结核杆菌的某些成分。此外, Ohashi 等报道了第一个内源性 TLR4 配体—内源性热休克蛋白 60(heat shock protein 60, HSP60)。后来另一些内源性 TLR4 配体, 如表面活性剂 A、透明质酸低聚糖、硫酸肝素片段、纤维蛋白原、 $\beta$ -防御素 2、纤连蛋白的额外域等也相继被报道<sup>[2]</sup>。

### 2.2 Toll 样受体 4 信号传导途径

TLR 激活后信号途径可大体分为 MyD88 依赖途径和非 MyD88 依赖途径<sup>[3]</sup>。MyD88 是除 TLR3 外所有 TLRs 的衔接蛋白。MyD88 依赖途径主要引起核因子  $\kappa$ B 易位进入细胞核内而诱导免疫基因如金属蛋白酶、单核细胞趋化蛋白、细胞粘附分子、白细胞介素等的转录。而非 MyD88 依赖途径(或称干扰素依赖途径)主要激活干扰素调节因子 3(interferon

[收稿日期] 2007-10-09 [修回日期] 2008-01-12

[作者简介] 耿小勇, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为急性冠脉综合征, 联系电话为 010-58268320, 13241777681, E-mail 为 lbsjzgy@163.com。陈一文, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为老年病, E-mail 为 cyiw@sina.com。通讯作者秦明照, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病与冠心病, E-mail 为 qinmingzhao@gmail.com。

regulated factor 3, IRF-3)而引起 1 型干扰素(type 1 interferons, IFNs)的转录,后者引起一系列干扰素依赖基因的转录而使机体呈现抗病毒状态。以上信号途径产物可通过多途径改变细胞功能状态、平衡细胞活性与炎症。

### 3 Toll 样受体 4 在动脉粥样硬化中的作用

动脉粥样硬化进程可被分为多个不同阶段,每一个阶段有其细胞分子学特征。越来越多的证据表明 TLR 参与了动脉粥样硬化的起始、进展以及斑块的破裂各个环节,可通过多途径影响动脉粥样硬化进程。

#### 3.1 Toll 样受体 4 在血管内皮的表达及其在早期动脉粥样硬化病变形成过程中的作用

在动脉粥样硬化的起始阶段免疫系统聚集单核细胞和 T 淋巴细胞至血管壁,内皮下巨噬细胞和少数平滑肌细胞呈灶性积聚,细胞内外脂质沉积。这一过程需要内皮细胞表达粘附分子的参与,而后者通常继发于内皮细胞的损伤或炎症因子的刺激导致的功能紊乱。已经发现在人和鼠动脉粥样硬化病变的内皮细胞和巨噬细胞中均有 TLR1、TLR2、TLR4 表达。Edfeldt 等发现与正常血管相比,动脉粥样硬化病变中的内皮细胞 TLR4 表达明显增加。体外培养的人血管内皮细胞在基础条件下低水平表达 TLR4,但经促炎因子刺激 TLR4 呈高水平表达。此外,氧化应激亦可引起内皮功能紊乱和粘附蛋白表达,越来越多的证据显示氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)和氧化二棕榈酰卵磷脂(Oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine, ox-PAPC)在 TLR4 表达及其信号途径起着重要作用。研究显示 TLR4 能识别内皮细胞中的 ox-PAPC 而引起趋化因子白细胞介素 8 的分泌。提示氧化应激可通过 TLR4 促进动脉粥样硬化形成<sup>[4]</sup>。这些蛋白可以激活巨噬细胞中 TLR4 使得巨噬细胞吞饮氧化脂质而转化为泡沫细胞而促进动脉粥样硬化形成。粘附分子的表达同时受转录因子核因子  $\kappa$ B 的调控,脂多糖可以通过内皮细胞中的 TLR4 激活核因子  $\kappa$ B 上调细胞内粘附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞粘附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)和单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1),参与单核细胞聚集、启动进一步炎症反应。此外,在早期动脉粥样硬化病变中血管平滑肌细胞迁移至内膜转变为泡沫细胞,已有研究证明在此过程中血管中层平滑肌细胞中 TLR4 表达上调<sup>[5]</sup>。以上所述均支持 TLR4 在早期动脉粥样硬化中的作用。

#### 3.2 TLR4 在动脉粥样硬化病变进展过程中的作用

在动脉粥样硬化进展过程中炎症反应持续,纤维组织(主要是胶原)形成引起动脉内膜结构改变导致动脉粥样硬化进展、粥样斑块形成。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。在炎症或损伤部位,微生物可以通过 TLR4 诱导人血管平滑肌细胞浸润。Vint 等<sup>[6]</sup>发现血管外膜成纤维细胞中 TLR4 激活可促进新内膜生成,此效应在 TLR4 缺陷的基因敲除小鼠模型中明显降低,提示 TLR4 参与动脉

粥样硬化进程中新内膜形成。在动脉粥样硬化小鼠模型中应用 TLR4 配体后动脉粥样硬化面积增大,提示 TLR4 激活可促进斑块进展。Boekholdt 等<sup>[7]</sup>针对 TLR 中的 TLR4 基因多态性研究提示人类 TLR4 基因的多态性可能反映了心血管疾病的易感性,其中 TLR4 第 299 位点的点突变,从精氨酸到甘氨酸的氨基酸替代(D299G)与颈部动脉粥样硬化和急性冠状动脉病变发生率降低密切相关。具有此类多态性的人群分泌较低的循环促炎症反应细胞因子如白细胞介素 6、纤维蛋白原和可溶性 VCAM-1,上述分子在与动脉粥样硬化的进展、斑块破裂及其后的血管阻塞相关炎症反应中起重要的促进作用。Bulut 等在动脉粥样硬化病变中发现肺炎衣原体产生的 HSP60,而在应激状态下上皮细胞表达的人 HSP60 与病原体的 HSP60 有免疫交叉反应,人 HSP60 也可作为 PAMP 与免疫细胞表面的 TLR4 和(或)TLR2 结合,激活 NF- $\kappa$ B 依赖的促炎症基因而激发炎症反应,促进 As 的发生、发展<sup>[8,9]</sup>。在 D299G 多态性的人群中,由于 TLR4 发生点突变,影响了对 HSP60 的泛特异性识别及后续的信号转导通路从而阻碍了 As 的进程。

#### 2.3 Toll 样受体 4 在斑块破裂中的作用

临床心血管事件的发生与局部斑块的不稳定化密切相关,而后者依然是炎症反应进展的结果。在此阶段炎性细胞聚集并产生基质降解酶等进一步改变斑块结构使其脆性增加而易于破裂。在载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠 As 模型中 TLR4 基因缺陷可以改变斑块组成,包括降低斑块中脂质和巨噬细胞成分,并显著降低促炎因子的表达<sup>[10,11]</sup>。这些变化使得斑块稳定而不易破裂。提示 TLR4 信号途径在促使斑块不稳定化过程中发挥着重要作用。已证实脂多糖通过 TLR4 介导基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、蛋白水解酶表达<sup>[12]</sup>,两者可降解细胞外基质引发斑块不稳定<sup>[13,14]</sup>。此外,研究表明细胞凋亡亦可促进斑块不稳定发展。斑块的破裂多发生在其肩部,平滑肌细胞的凋亡可使斑块肩部无法起到支撑作用,同时平滑肌细胞及基质的减少导致纤维帽形成障碍,两者均可促进斑块不稳定。已有报道 TLR4 信号途径可诱导凋亡分子表达<sup>[15]</sup>,促进平滑肌细胞凋亡而引发斑块不稳定。

### 4 Toll 样受体 4 对肝脏 X 受体的作用

除以上途径外,Toll 样受体可以通过与肝脏 X 受体(liver X receptor, LXR)的相互作用这一非炎症、非免疫反应途径促进动脉粥样硬化的形成。LXR 是一种转录调节因子,存在于肝细胞和巨噬细胞,可以通过由 ATP-结合盒 A1(ATP-binding cassette A1, ABCA1)等介导的胆固醇可逆性转运从泡沫细胞中清除胆固醇<sup>[16]</sup>。用氧化胆固醇或人工合成的激活剂刺激 LXR,可使这些细胞内产生的 ABCA1 增加,激活胆固醇输出蛋白,减少细胞内胆固醇,防止动脉粥样硬化的发生。TLRs 可介导 LXR 的抑制从而促进脂质的沉积和动脉粥样硬化进展。用 TLR3 的强激活剂 poly I:C 和 TLR4 的激活剂脂多糖 A 可选择性抑制巨噬细胞合成 ABCA1,使巨噬细胞内胆固醇水平上升,导致动脉粥样硬化。Castrillo 等的研究显示,这种

LXR-TLR 相互作用抑制 ABCA1 的生成是非 MyD88 和核因子  $\kappa$ B 依赖的,但依赖于干扰素调节因子 3(Interferon regulated factor 3, IRF3)<sup>[17]</sup>。后者是一种可经 TLR3 和 TLR4 信号途径激活的转录调节因子。已证实病毒或细菌抗原可通过 IRF3 对抗 LXR 转录活性而抑制胆固醇的清除。

## 5 动脉粥样硬化的免疫学治疗现状

动脉粥样硬化的免疫调节治疗策略有:应用抗原刺激机体产生保护性免疫应答;④通过诱导免疫耐受或用外源性抗体封闭抗原,抑制加重的自身免疫反应。目前国内外已有一些研究涉及 As 的免疫治疗。如用  $\alpha$ -LDL 免疫兔和小鼠,可使动脉粥样斑块面积减少 40%~70%<sup>[18, 19]</sup>,产生的抗体主要是 IgG,且抗体水平与粥样斑块被抑制程度之间呈正相关,表明接种  $\alpha$ -LDL 引起的免疫应答对动脉粥样硬化有保护作用。用载脂蛋白 B-100 抗原肽对小鼠进行免疫接种,不仅减轻动脉粥样硬化病变达 70%,而且能降低粥样斑块中的巨噬细胞含量和增加胶原含量<sup>[20]</sup>;粘膜接种 HSP60 抗原可抑制促炎症的 Th1 细胞,能减轻自身免疫性疾病动物模型中特定器官的炎症反应;Maron 等发现经胃肠或鼻腔途径对 LDL 受体缺陷小鼠接种 HSP65 抗原可抑制小鼠粥样斑块内炎症反应。

动脉粥样硬化的进展受获得性免疫反应调控<sup>[10, 21, 22]</sup>。而天然免疫反应和 TLR 在指导和控制获得性免疫反应方面起重要作用<sup>[23, 24]</sup>。已证实激活的 TLR 和 T 辅助细胞可控制 B 细胞反应<sup>[25]</sup>,TLR 的激活还可控制 CD4 阳性 T 细胞。作为联系天然免疫反应和获得性免疫反应的桥梁,TLR 信号途径的研究可增加对动脉粥样硬化过程中获得性免疫反应的了解并为对动脉粥样硬化的免疫学治疗提供帮助。

### [参考文献]

- [1] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease [J]. *New Engl J Med*, 2005, **352** (16): 1 685-695.
- [2] Sabroe I, Read RC, Whyte MK, et al. Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain [J]. *J Immunol*, 2003, **171** (4): 1 630-635.
- [3] McGettrick AF, O'Neill LA. The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction [J]. *Mol Immunol*, 2004, **41** (6-7): 577-582.
- [4] Walton KA, Hsieh X, Gharavi N, et al. Receptors involved in the oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine-mediated synthesis of interleukin-8. A role for Toll-like receptor 4 and a glycosylphosphatidylinositol anchored protein [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (32): 29 661-666.
- [5] Stoll LL, Denning GM, Li WG, et al. Regulation of endotoxin-induced proinflammatory activation in human coronary artery cells: expression of functional membrane-bound CD14 by human coronary artery smooth muscle cells [J]. *J Immunol*, 2004, **173** (2): 1 336-343.
- [6] 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): 393-398.
- [7] Boekholdt SM, Agema WR, Peters RJ, et al. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events [J]. *Circulation*, 2003, **107** (19): 2 416-421.
- [8] Xu Q. Infections, heat shock proteins, and atherosclerosis [J]. *Current Opin Cardiol*, 2003, **18** (4): 245-252.
- [9] Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, et al. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (33): 31 332-339.
- [10] Punturieri A, Alviani RS, Polak T, et al. Specific engagement of TLR4 or TLR3 does not lead to IFN-beta-mediated innate signal amplification and STAT1 phosphorylation in resident murine alveolar macrophages [J]. *J Immunol*, 2004, **173** (2): 1 033-042.
- [11] 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.
- [12] Grenier D, Grignon L. Response of human macrophage-like cells to stimulation by *Fusobacterium nucleatum* ssp. *nucleatum* lipopolysaccharide [J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2006, **21** (3): 190-196.
- [13] 周志斌, 郭毅, 王思鸿, 等. 基质金属蛋白酶 9 及转化生长因子  $\beta$ 1 在人动脉粥样硬化斑块的表达及其与斑块稳定性的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (3): 217-220.
- [14] 梁萍, 孙雷, 唐建武, 等. 细胞间粘附分子 1、血管细胞粘附分子 1 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  在人动脉粥样硬化病灶中的表达及意义[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (4): 427-429.
- [15] Fukui M, Imamura R, Umemura M, et al. Pathogen-associated molecular patterns sensitize macrophages to Fas ligand-induced apoptosis and IL-1 beta release [J]. *J Immunol*, 2003, **171** (4): 1 868-874.
- [16] Naik SU, Wang X, Da Silva JS, et al. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo [J]. *Circulation*, 2006, **113** (1): 90-97.
- [17] Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, et al. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism [J]. *Molecular Cell*, 2003, **12** (4): 805-816.
- [18] Nilsson J, Hansson GK, Shah PK. Immunomodulation of atherosclerosis: implications for vaccine development [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (1): 18-28.
- [19] Shah PK, Chyu KY, Fredrikson GN, et al. Immunomodulation of atherosclerosis with a vaccine [J]. *Nat Clin Prac*, 2005, **2** (12): 639-646.
- [20] Fredrikson GN, Soderberg I, Lindholm M, et al. Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (5): 879-884.
- [21] Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2002, **91** (4): 281-291.
- [22] Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (12): 1 876-890.
- [23] Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity [J]. *Microbes and Infection*, 2004, **6** (15): 1 382-387.
- [24] Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses [J]. *Nat Immunol*, 2004, **5** (10): 987-995.
- [25] Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors [J]. *Nature*, 2005, **438** (7 066): 364-368.

(此文编辑 李玲玲)