

Toll 样受体与动脉粥样硬化易损斑块的关系

胡国晶, 路娇扬 综述, 王双 审校

(南华大学心血管疾病研究所, 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] Toll 样受体; 易损斑块; 动脉粥样硬化

[摘要] Toll 样受体作为先天免疫系统中一类病原体相关分子模式识别受体, 不仅在动脉粥样硬化发生发展过程中发挥着极为重要的作用, 在动脉粥样硬化易损斑块形成中起关键作用。本综述将从四个方面来讨论近年有关 Toll 样受体与动脉粥样硬化易损斑块关系研究进展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Relationship Between Toll-like Receptors and Atherosclerotic Vulnerable Plaque

HU Guo-Jing, LU Jiao-Yang, and WANG Shuang

(Institute of Cardiovascular Disease & Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Toll Like Receptor; Vulnerable Plaque; Atherosclerosis

[ABSTRACT] Toll like receptors (TLR), one of pathogen-associated molecular pattern recognition receptors in innate immune system, play an important role not only in the development of atherosclerosis, but also in the formation of vulnerable plaque. This review will discuss advances of the relationship between Toll-like receptors and atherosclerotic vulnerable plaque from four aspects.

动脉粥样硬化(As)导致的心脑血管疾病已成为危害人类健康的主要疾病之一, 而斑块破裂形成血栓引起动脉闭塞是导致急性临床事件的主要病理基础和发病机制。1994 年 Muller 等首次将引起多数急性心血管事件具有破损倾向的斑块称为“易损斑块(vulnerable plaque)”。随着近年来研究者们对动脉粥样硬化斑块的进一步研究, 2003 年 Naghavi 等^[1, 2]继续完善了易损斑块的概念, 将其定义为具有血栓形成倾向或可以快速进展为“肇事斑块(culprit plaque)”的动脉粥样硬化斑块。易损斑块存在以下病理学特征: 以液态胆固醇酯为主的脂质核较大, 纤维帽较薄, 斑块局部存在大量炎性细胞浸润, 纤维帽中平滑肌细胞及胶原含量较少, 斑块基底部存在大量新生微血管等。Toll 样受体(Toll like receptors, TLR)是一类 I 型跨膜蛋白, 胞外区含有 20~27 个富含亮氨酸的重复序列(leucine-rich repeats, LRR), 可识别病原体相关分子模式(patho-

gen-associated molecular patterns, PAMP)和损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMP), 是一类先天免疫和获得性免疫系统中非常关键的受体。众多研究发现^[3], TLR 在 As 发生发展过程中发挥着极其重要的作用。早在 2002 年^[4], 研究者发现 TLR 在动脉粥样硬化斑块处的表达显著增高, 最近有报道称^[5], TLR4 在急性心肌梗死患者肇事区的表达水平远高于全身水平, 且在发生急性心肌梗死 12 天后显著减少。另有研究^[6]发现, ApoE 和 TLR2 双基因敲除小鼠高脂喂养 24 周后, 体内几乎无动脉粥样硬化斑块的形成, 而 ApoE 单基因敲除小鼠体内存在多处动脉粥样硬化斑块, 说明 TLR 在 As 发生发展过程中起到了极其关键的作用。除此之外, TLR 与动脉粥样硬化易损斑块形成之间存在着不容忽视的联系, 以下将通过四个方面来概述近年有关 Toll 样受体与动脉粥样硬化易损斑块关系研究进展。

[收稿日期] 2012-02-20

[作者简介] 胡国晶, 硕士研究生, E-mail 为 hu_guo_jing@163.com。通讯作者王双, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail 为 wangyal105@hotmail.com。

1 Toll 样受体促进白细胞浸润

参与先天免疫和获得性免疫的白细胞从循环血液到内皮下间隙的募集是动脉粥样硬化发展中极为关键的一步,主要经过五个阶段,即捕获(capture)、滚动(rolling)、慢滚动(slow rolling)、稳固黏附(firm adhesion)和转移(transmigration)等阶段,被称为黏附级联反应(the adhesion cascade)。其中,捕获、滚动和慢滚动阶段是由选择素家族等介导的,而稳固黏附阶段则为黏附分子和趋化因子等所介导^[7],最后白细胞通过旁细胞途径或跨细胞途径迁移至内皮下。研究发现,动脉粥样硬化易损斑块内存在大量白细胞浸润,尤其在斑块的肩部。Yonekawa 等^[8]从 27 名急性冠状动脉综合征患者体内提取血栓块和外周血以分离出 CD14⁺ 单核细胞,用 TLR4 的配体脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与血栓源性单核细胞、外周血源性单核细胞和对照组 U937 单核细胞进行孵育培养,然后通过平均荧光强度检测 TLR4 的表达情况,结果发现在急性冠状动脉综合征患者血栓源性单核细胞中 TLR4 的荧光强度是外周血源性单核细胞中 TLR4 荧光强度的 5 倍以上,而对照组 U937 单核细胞的荧光强度只略高于外周血源性单核细胞。因此不难推测 TLR 在破裂斑块中的含量显著高于外周血,且在单核细胞的浸润过程中起着重要作用。Nakamura 等^[9]用 LPS 处理人脐静脉内皮细胞和单核细胞,观察到第 24 小时单核细胞向人脐静脉内皮细胞的黏附达到顶峰,同时检测到血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)上调,并证明该过程依赖于 TLR2 信号通路。Monaco 等^[10]的实验发现,通过对 TLR2 和 TLR4 的阻断导致趋化因子 MCP-1 含量显著降低。Cao 等^[11]对 TLR4 和 ApoE 双基因敲除小鼠高胆固醇喂养 6 个月后,发现该种小鼠主动脉窦处的巨噬细胞浸润程度较 ApoE 基因敲除小鼠降低了 65%,斑块面积减少了 55%;而 TLR 的下游基因 MyD88 与 ApoE 双基因敲除小鼠的巨噬细胞浸润程度较对照组降低了 75%,斑块面积减少了 60%。除此之外,树突状细胞及 T 细胞等免疫细胞也可通过以上方式迁移至内皮下触发免疫反应。说明 TLR 可通过上调选择素、黏附分子和趋化因子来促进白细胞在动脉粥样硬化斑块中的浸润。

2 Toll 样受体促进脂质核心的形成

动脉粥样硬化斑块由脂质核心和纤维帽组成,

脂质核心较大的斑块容易破裂。迁移至内皮下的单核细胞分化为巨噬细胞,巨噬细胞吞噬大量的脂质形成泡沫细胞,富含脂质的泡沫细胞和坏死细胞碎片等组成脂质核心。当分别用 TLR4 的特异性配体 LPS 和 TLR2 配体酵母多糖处理 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞时,发现脂肪酸结合蛋白 aP2(FABP4, 一种可促进脂肪酸摄取的蛋白)的 mRNA 表达水平分别增加 56 和 1500 倍,并且细胞内胆固醇酯的含量增加 5 倍,甘油三酯含量增加 2.2 倍^[12]。当用 LPS 和酵母多糖处理 J774 巨噬细胞时, Mal1(FABP5)和 ADRP/ADFP 的 mRNA 及蛋白水平显著增加^[13],ADRP/ADFP 被证实与脂滴的形成有关。被巨噬细胞吞噬掉的游离胆固醇有两种命运:一是通过三磷酸腺苷结合盒转运体超家族的 ABCA1 和 ABCG1 等介导的胆固醇流出,由 HDL 逆向转运至肝脏以胆汁的形式排出体外;二是在逆向转运受限的情况下多余的游离胆固醇在胆固醇酰基转移酶 A1(ACAT1)的催化作用下合成胆固醇酯,进而形成脂滴储存下来。研究发现^[14, 15],在人单核细胞和巨噬细胞上的 TLR2 或 TLR 下游肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的激活可上调 ACAT1 的表达,从而促进游离胆固醇的酯化增加胆固醇酯的蓄积。此外,TLRs 以及它的配体可能对胆固醇的流出也有所影响。实验证明介导胆固醇流出的 ABCA1 和 ABCG1 基因受转录因子 LXR 调控。Castrillo 等^[16]发现 TLR3 和 TLR4 的下游分子 IRF3 的激活可抑制 LXR 的转录活性,使 ABCA1、ABCG1 的基因表达下调,这可能是 TLR 抑制胆固醇流出和增加脂质蓄积的一个重要机制。Howell 等^[17],分别从富含 TLR4 基因的 C3H/HeN 小鼠和缺乏 TLR4 基因的 C3H/HeJ 小鼠腹腔分离巨噬细胞,将得到的巨噬细胞用 oxLDL 处理后,发现富含 TLR4 的巨噬细胞有 29% 分化为泡沫细胞,而缺乏 TLR4 的巨噬细胞仅有 5.8% 分化为泡沫细胞;他们进一步用 TLR4 阻断抗体预处理后再用 ox-LDL 处理,结果富含 TLR4 的巨噬细胞分化为泡沫细胞的比率由 29% 降低至 13%;若同时用 LPS 处理则这一比率增加到 60%。上述实验证明,TLR 通过促进游离胆固醇的酯化和脂滴的形成,抑制胆固醇逆向转运等多种方式促进了脂质核心的形成。

3 Toll 样受体促进纤维帽变薄

动脉粥样硬化纤维帽主要由平滑肌细胞和细胞外基质构成。细胞外基质主要被巨噬细胞分泌

的基质金属蛋白酶 MMP 降解。易损斑块中 MMP 含量和活性显著升高,可导致细胞外基质迅速降解,纤维帽变薄使斑块易于破裂引发临床事件。实验证明^[18],TLR2、TLR4、TLR9 激活后可诱导 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9 mRNA 的上调。Monaco 等^[10]用从 58 位患者颈动脉环切标本中获得的斑块活细胞进行培养,当用 TLR2、TLR4 阻断剂分别处理 24 h 后发现 MMP 表达水平显著降低,说明 TLR 可以诱导动脉粥样硬化斑块内 MMP 的产生。为了量化动脉粥样硬化斑块的易损性,研究者提出了易损指数的计算公式^[19],即易损指数 = 脂质成分面积(巨噬细胞 + 细胞外脂质沉积)/胶原纤维面积(平滑肌细胞 + 胶原纤维),以此来判断斑块的易破裂程度。用颈动脉套环术制作动脉粥样硬化小鼠模型 8 周后,将 TLR2、TLR4 的 RNA 干扰慢病毒载体转染至颈动脉斑块处,4 周后处死小鼠计算易损指数发现,与空载体组相比,TLR2 和 TLR4 干扰组斑块的纤维帽厚度显著增加,易损指数显著降低^[20,21]。总之,TLR 的激活可诱导细胞外基质的降解,致使纤维帽变薄,斑块变得易于破裂。然而,另有研究指出^[22]TLR 4 可通过调控 NF- κ B 活性从而促进哮喘大鼠气道平滑肌细胞的增殖,抑制细胞凋亡,但尚无有力证据证明该作用也发生在血管平滑肌细胞。

4 Toll 样受体促进血管新生

随着动脉粥样硬化斑块的增大,斑块内组织成分与外膜的滋养血管网的距离进一步扩大。当这个间距超过 100 μ m 时,由于缺血、缺氧、炎症等原因诱导血管内皮细胞在原有毛细血管处以芽生或非芽生的形式生成新的血管。这一过程被一些促血管生成因子所调节,其中包括:血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、促血管生成素(angiotensin, Ang)和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)等。Cho 等^[23]在研究类风湿性关节炎(RA)时,用 TLR2 配体细菌肽聚糖(PGN)和 TLR4 配体 LPS 处理 RA 成纤维样滑膜细胞后,发现 VEGF mRNA 水平显著增加,并且证明是通过 TLRs-MyD88-NF- κ B 经典途径。这就说明 TLR 有可能通过上调 VEGF 而促进血管新生。在一些缺血性疾病中,血管新生可改善局部的缺血损伤而被认为是有益的。但在动脉粥样硬化过程中,斑块内的新生血管由于缺少正常基质的支撑和营养不良等原因使斑块非常不稳定,容易破裂导致斑块下出

血从而影响斑块的稳定性。Moreno 等^[24]在 24 名平均年龄为 61 岁的男性患者尸检中收集到 269 块动脉粥样硬化斑块,经分析发现出血斑块中新生血管较非出血斑块多,薄帽斑块中新生血管也显著多于非薄帽斑块。因而斑块内存在大量新生血管被认为是易损斑块的一大特征。Saber 等^[25]用 TLR2 的特异性配体 Pam3CSK4(1 μ g/mL)处理人微血管内皮细胞(HMVEC)24 h 后,发现 HMVEC 可在铺有基质胶的 96 孔板上形成管状结构,即 TLR2 有调节微血管新生的作用,并检测出 Tie2 的上调,说明 TLR2 可能通过上调 Tie2 的表达而诱导微血管的新生。也有实验证明^[26]TLR3 配体 poly(I:C)也可以促进人脐静脉内皮细胞 HUVEC 形成微血管样结构。Jagavelu 等^[27]的实验更加具有说服力,他们从野生小鼠和 TLR4 缺乏小鼠体内分别提取出肝脏内皮细胞(LEC),铺在基质胶上用定量图形软件分析小管发生现象,发现野生小鼠 LEC 的小管发生较 TLR4 缺乏小鼠多;用 LPS 刺激后野生小鼠 LEC 的小管发生较对照组显著增加,而 TLR4 缺乏小鼠 LEC 的小管发生无显著改变;同时用多粘菌素 B 处理时,这种小管发生现象可被显著抑制,说明 TLR 在小鼠血管新生中起着重要的作用。他们用人肝脏内皮细胞做类似的实验时,发现小管发生可被转染的 TLR4siRNA 所抑制,说明 TLR 在人血管新生中也起到了至关重要的作用。

5 展望

综上所述,TLR 在动脉粥样硬化易损斑块发生发展过程中发挥着重要的作用,通过诱导免疫细胞的浸润和活化、促进脂质核心的形成、降低纤维帽厚度和增加血管新生等方式增加斑块的易损指数,最终导致斑块破裂、急性临床事件的发生。近年来,研究者通过基因敲除、基因沉默^[28]和阻断剂阻断等方法在分子水平、细胞水平及动物整体水平对动脉粥样硬化易损斑块发生发展过程的研究取得了巨大成就,目前已有 TLR 阻断剂类药物进入二期临床。然而,TLR 作为免疫系统中的重要受体,在人体内的作用非常复杂,除了已证实的作用以外肯定还存在其他未知的作用。例如阻断剂的应用虽然可以减慢或阻止动脉粥样硬化的发展,但可降低机体免疫力,使机体更容易患传染类疾病等。因此,对 TLR 在人体内作用机制的深入研究和靶向动脉粥样硬化斑块内 TLR 有效药物的研发是研究者们亟待解决的关键问题。

[参考文献]

- [1] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II[J]. *Circulation*, 2003, 108(15): 1 772-778.
- [2] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I[J]. *Circulation*, 2003, 108(14): 1 664-672.
- [3] 金海燕, 彭茜, 顾洪丰, 等. 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块中血小板因子 4 和 Toll 样受体 2 的表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15(6): 423-426.
- [4] Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson G K, et al. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation[J]. *Circulation*, 2002, 105(10): 1 158-161.
- [5] Kashiwagi M, Imanishi T, Ozaki Y, et al. Differential expression of Toll-like receptor 4 and human monocyte subsets in acute myocardial infarction[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(1): 249-253.
- [6] Madan M, Amar S. Toll-like receptor-2 mediates diet and/or pathogen associated atherosclerosis: proteomic findings[J]. *PLoS One*, 2008, 3(9): e3 204.
- [7] 杨欣, 任卫东, 马娜. 动脉粥样硬化兔血管内皮功能与黏附分子 VCAM-1 表达关系的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2007(3): 309-311.
- [8] Yonekawa K, Neidhart M, Altwegg LA, et al. Myeloid related proteins activate Toll-like receptor 4 in human acute coronary syndromes [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 218(2): 486-492.
- [9] Nakamura N, Yoshida M, Umeda M, et al. Extended exposure of lipopolysaccharide fraction from *Porphyromonas gingivalis* facilitates mononuclear cell adhesion to vascular endothelium via Toll-like receptor-2 dependent mechanism [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 196(1): 59-67.
- [10] Monaco C, Gregan SM, Navin TJ, et al. Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2009, 120(24): 2 462-469.
- [11] Cao F, Castrillo A, Tontonoz P, et al. Chlamydia pneumoniae--induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2[J]. *Infect Immun*, 2007, 75(2): 753-759.
- [12] Kazemi MR, McDonald CM, Shigenaga JK, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein expression and lipid accumulation are increased during activation of murine macrophages by toll-like receptor agonists[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(6): 1 220-224.
- [13] Feingold KR, Kazemi MR, Magra AL, et al. ADRP/ADFP and Mall expression are increased in macrophages treated with TLR agonists[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 209(1): 81-88.
- [14] He P, Mei C, Cheng B, et al. Chlamydia pneumoniae induces macrophage-derived foam cell formation by up-regulating acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 1[J]. *Microbes Infect*, 2009, 11(2): 157-163.
- [15] Lei L, Xiong Y, Chen J, et al. TNF-alpha stimulates the ACAT1 expression in differentiating monocytes to promote the CE-laden cell formation[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(6): 1 057-067.
- [16] 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]. *Mol Cell*, 2003, 12(4): 805-816.
- [17] Howell KW, Meng X, Fullerton DA, et al. Toll-like receptor 4 mediates oxidized LDL-induced macrophage differentiation to foam cells[J]. *J Surg Res*, 2011, 171(1): e27-e31.
- [18] Ehrentraut H, Meyer R, Schwederski M, et al. Systemically administered ligands of Toll-like receptor 2, -4, and -9 induce distinct inflammatory responses in the murine lung[J]. *Mediators Inflamm*, 2011, 2011: 746 532.
- [19] Krams R, Verheye S, van Damme L C, et al. In vivo temperature heterogeneity is associated with plaque regions of increased MMP-9 activity[J]. *Eur Heart J*, 2005, 26(20): 2 200-205.
- [20] Yang JM, Wang Y, Qi L H, et al. Combinatorial interference of toll-like receptor 2 and 4 synergistically stabilizes atherosclerotic plaque in apolipoprotein E-knockout mice. [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(3): 602-611.
- [21] Qi LH, Wang Y, Gao F, et al. Enhanced stabilization of atherosclerotic plaques in apolipoprotein E-knockout mice by combinatorial Toll-like receptor-1 and -2 gene silencing. [J]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(7): 739-750.
- [22] 韦江红, 莫碧文, 黄剑伟. TLR4/NF-κB 对哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖、凋亡的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, (25): 3 110-115.
- [23] Cho ML, Ju JH, Kim HR, et al. Toll-like receptor 2 ligand mediates the upregulation of angiogenic factor, vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 in human rheumatoid synovial fibroblasts[J]. *Immunol Lett*, 2007, 108(2): 121-128.
- [24] Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, et al. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability[J]. *Circulation*, 2004, 110(14): 2 032-038.
- [25] Saber T, Veale D J, Balogh E, et al. Toll-like receptor 2 induced angiogenesis and invasion is mediated through the Tie2 signalling pathway in rheumatoid arthritis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e2 3 540.
- [26] Paone A, Galli R, Gabellini C, et al. Toll-like receptor 3 regulates angiogenesis and apoptosis in prostate cancer cell lines through hypoxia-inducible factor 1 alpha[J]. *Neoplasia*, 2010, 12(7): 539-549.
- [27] Jagavelu K, Routray C, Shergill U, et al. Endothelial cell toll-like receptor 4 regulates fibrosis-associated angiogenesis in the liver [J]. *Hepatology*, 2010, 52(2): 590-601.
- [28] 顾洪丰, 唐朝克, 唐雅玲, 等. 小干扰 RNA 沉默 Toll 样受体 4 表达对慢性温和应激 ApoE^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞 TLR 4/NF-κB 途径基因表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(1): 6-12.