

Toll 样受体信号通路与缺血性中风炎症反应机制的研究进展

尤晓欣 综述 裴建 审校

上海中医药大学附属龙华医院针灸科,上海市 200032

摘要: Toll 样受体既是机体天然免疫信号受体,同时也是炎症信号受体,在脑缺血发生后通过 MyD88 依赖性途径和 TRIF 依赖性途径参与炎症级联反应。阻断或者激活相应的 Toll 样受体信号传导通路,可有效抑制脑缺血急性期炎症级联反应的发生、发展,减轻炎症损伤。干预 Toll 样受体信号传导通路是脑缺血后抗炎治疗的途径之一。

关键词: 卒中; 缺血; 炎症; Toll 样受体

中风具有极高的致死率和致残率,是人类三大致死疾病之一,全球每年发生中风的患者约 1500 万人之多,其中缺血性中风占 87%^[1]。有研究显示脑缺血发生后的炎症反应可导致超过 40% 的中风患者在发病后一周内死亡或长期遗留中重度残疾^[2,3],缺血性中风急性期的炎症反应受到关注。

Toll 样受体(Toll like receptors, TLRs)作为炎症信号受体,其信号通路在脑缺血发生后引发的炎症级联反应过程中起到重要作用,与各类炎症介质表达密切相关^[4]。因此,干预炎症反应起始阶段 TLRs 信号传导通路,对有效减轻缺血性中风急性期的炎症损伤具有十分重要的意义。

1 TLRs 与缺血性中风的炎症相关性

多年研究已发现,包括白介素家族(ILs)、核因子- κ B(NF- κ B)、基质金属蛋白酶(MMPs)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素(INFs)等大量炎症细胞因子均与缺血性中风炎症有关^[5]。脑缺血发生后上述炎症介质可通过 TLRs 的信号通路在中枢神经系统中表达上调,引起内源性的炎症级联反应。

TLRs 属于模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)家族,在天然免疫系统中识别相应的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)并与之结合,介导机体免疫反应。目前人类已发现了 11 种 TLRs,其中 TLR2、TLR3、TLR4、TLR7 及 TLR9 与缺血性中风的炎症反应密切相关^[6,7]。脑缺血后小胶质细胞和星形胶质细胞

迅速被浸润入脑组织的免疫细胞活化,并大量增生,相关 TLRs 被激活后可诱导 NF- κ B、AP-1 及 IFN- β 最先活化,再逐步促进其他促炎细胞因子及黏附分子的大量表达,最终形成炎症^[8]。此外,TLR2 和 TLR4 还能增加血管渗透性,TLR2 与白细胞的迁移也有直接相关性,均可加重脑缺血后的炎症损伤^[9]。

2 TLRs 的信号传导通路

TLRs 的信号通路主要以髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)依赖性途径和 β 干扰素 TIR(Toll/IL-1 receptor, TIR)结构域衔接蛋白(TIR-domain-containing adapter inducing interferon- β , TRIF)依赖性途径为主,前者可完成除 TLR3 之外的 TLRs 的信号转导,后者可完成 TLR3 和 TLR4 的信号转导(见图 1)。目前研究表明,MyD88 依赖性信号途径包括:TLRs 与其相应配体结合并激活后发生二聚体化,其胞浆内的 TIR 结构域募集胞浆内的接头蛋白 MyD88,MyD88 氨基末端的死亡结构域(DD)与白介素 1 受体相关激酶 4(interleukin-1 receptor associated kinase 4, IRAK4)的死亡结构域相互作用,导致 IRAK1 自主磷酸化^[8]。磷酸化的 IRAK1 与肿瘤坏死因子相关因子 6(TNF receptor-associated factor 6, TRAF6)形成复合物,进而使 TRAF6 发生寡聚化而激活,TRAF6 激活后通过 TAK2 接头蛋白(TAK2-binding protein, TAB2)与生长因子 β 活化激酶(transforming growth factor- β activated kinase 1, TAK-1)相互作用,使 TAK-1 活

基金项目:上海市卫生局科研重点项目(2010003);上海市卫生局海派中医流派传承研究基地项目(ZYSNXXD-CC-HPGC-JD-004);国家中医药管理局重点学科建设项目资助

收稿日期:2013-11-19;修回日期:2014-03-18

作者简介:尤晓欣(1986-),女,住院医师,硕士研究生,主要从事脑血管病的研究。

通讯作者:裴建(1965-),男,主任医师,教授,博士研究生导师。

化^[8]。TAK-1 又分为两条途径向下传导:一是 TAK-1 激活 I κ B 激酶 (I κ B kinase, IKK), 活化的 IKK 促进 I κ B (NF- κ B 抑制蛋白) 磷酸化而降解,被解除抑制的 NF- κ B 发生核转位,启动转录;二是 TAK-1 激活丝裂原活化蛋白激酶激酶 6 (mitogen-activated protein kinase kinase, MKK6) 通路,最终导致转录因子 AP-1 和 c-Jun 活化,形成炎症^[10]。除 TLR4 外的 TLRs 可直接与 MyD88 作用,而 TLR4 则需要 Toll/白介素 1 受体结构域衔接蛋白 (Toll/interleukin-1 receptor adapter protein, TIRAP) 辅助完成 MyD88 依赖性信号转导。TRIF 依赖性途径:主要包含 TRIF (又称 TICAM-1)、TRIF 相关接头分子 (TRIF related adaptor molecule, TRAM)、IFN 调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3)、受体结合蛋白 (receptor interacting protein, RIP) 四种蛋白分子^[8]。TLR3 被激活后可直接通过 TRIF 进行信号转导,而 TLR4 则通过 TRAM 与 TRIF 共同完成该信号转导。TRIF 一是通过 TRAF3 与肿瘤坏死因子受体相关因子联合核因子- κ B 激酶 (tumor necrosis factor receptor-associated factor nuclear factor- κ B, TANK) 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1) 相互作用,进而引起 IRF3 磷酸化,磷酸化后 IRF3 形成二聚体并发生核转位,引起 IFN- β 基因及其他可诱导基因的转录;二是直接与 TRAF6 和 RIP 结合,最终激活 NF- κ B 和 AP-1。NF- κ B 和 AP-1 的活化均可导致炎症因子如 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8、NO、PAF、PGs 和黏附分子等的大量表达,促进炎症的形成^[11]。已有研究表明,TLRs 的 MyD88 依赖性信号传导通路,特别是 TRAF6 蛋白因子的信号通路对其下游的信号传导起到主要作用^[12]。

3 TLRs 信号传导通路的干预

在缺血性中风的炎症级联反应过程中,起始阶段 TLRs 通过炎症信号的传导,刺激各类炎症介质的生成,包括 NF- κ B 为首的炎症细胞因子,ICAM-1 为主的黏附分子以及一些趋化因子;随后炎症细胞因子促进选择素、整合素、细胞黏附分子等在血管内皮细胞表面大量表达;最终各类黏附分子介导炎症细胞在血管内皮上进行一系列病理活动。虽然机体自身也能激活包括 IL-10、IL-12、IL-18、TGF- β 等抗炎细胞因子,但所发挥的抑制作用只能减轻小部分炎症反应。因而,干预炎症级联反应起始阶段的信号传导是抗炎治疗的重点。

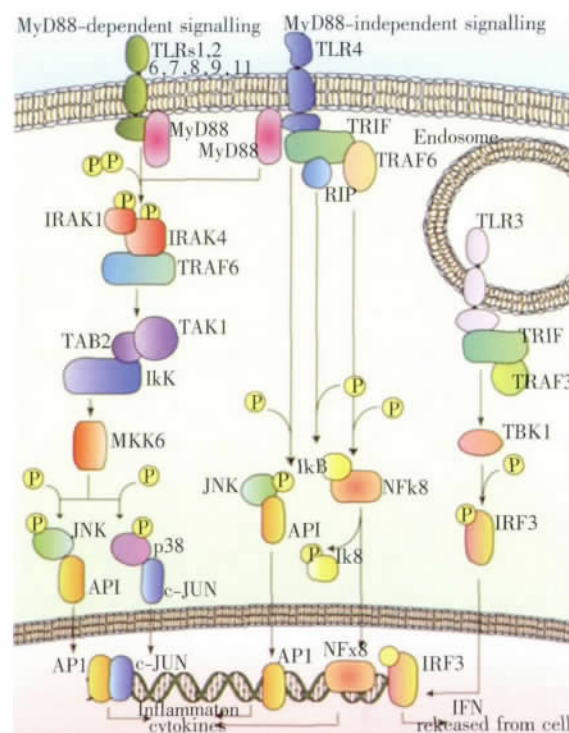


图 1 TLRs 在炎症反应中的信号传导途径。左侧为 MyD88 依赖性信号通路,右侧为非 MyD88 依赖性信号通路,右上方为 TLR3 的信号通路 (来源:^[8] Catherine E Downes, Peter J Crack. Neural injury following stroke: are Toll-like receptors the link between the immune system and the CNS? British Journal of Pharmacology, 2010, 160: 1872-1888.)

3.1 TLRs 信号通路的阻断

在缺血性中风发病后,若能即时在时间窗内对 TLRs 信号通路进行反馈抑制,将会有效阻断其下游炎症瀑布效应,遏制脑缺血炎症性损伤。TLRs 信号通路的阻断可通过针对信号传导过程中涉及到的各类转录因子、细胞因子等进行多靶点反馈阻截,减少各类炎症细胞因子表达,反馈抑制剂如 ST2 (TIR)、SIGIRR (TIR、IRAK、TRAF6)、MyD88s (MyD88、IRAK)、Tollip (IRAK)、I κ Ba (NF- κ B)、TWIST-1 (TNF、IL-1 β 、IL-6) 及 TTP (TNF、IL-2、IL-3) 等。这些抑制剂一部分可来自于内源性,脑缺血发生后机体免疫应答被激活,TLRs 的信号传导开始,体内炎症介质表达增加,可诱导体内相应的反馈抑制剂产生,从而缓解炎症反应^[13]。

近年来,对于 TLRs 与缺血性中风炎症反应的研究也在不断深入。已发现 TLRs 具有形成聚合物的特征,如 TLR2/1、TLR2/4 及 TLR2/6 二聚体,

CD36-TLR4-TLR6 异源三聚体, 均能触发炎症反应^[14,15]。有临床试验针对 TLR2、TLR4 和 TLR2/4 与中风后触发人体免疫应答反应, 引发的内源性炎症反应进行了研究, 结果显示 TLR2 和 TLR4 的表达与各类炎症介质的表达如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、VCAM1 及不良预后存在独立相关性, TLR4 与脑梗死的面积也有独立相关性; 通过阻断 TLR2/4 与其内源性配体细胞内纤连蛋白 (cellular fibronectin, cFN) 或热休克蛋白 60 (heat shock protein, HSP60) 结合, 可有效抑制脑缺血后强烈的炎症反应^[16]。另有实验研究发现, 脑缺血 1 h 的脑梗死大鼠在发病后 3~48 h 时间内脑组织中不仅有 TLR-mRNAs 表达, 还有 Mrp8 和 Mrp14 mRNA 的表达, 且缺失 Mrp-14 及 Mrp8 蛋白的脑梗死模型大鼠与对照组相比脑梗死面积小、脑水肿轻、神经胶质细胞表达减少, 提示上调 Mrp-8 和 Mrp-14 可促进神经炎症, 加重缺血损伤^[17], 因此通过抑制 Mrp-8 和 Mrp-14 蛋白表达可能成为阻断脑缺血后 TLR4 信号通路引起炎症反应的有效手段之一。

此外, 有实验研究利用基因敲除技术, 发现 MyD88^{-/-} 脑梗死模型大鼠、TRIF^{-/-} 脑梗死模型大鼠与正常脑梗死模型大鼠缺血脑组织中的神经细胞凋亡、梗死面积均无明显差异, 提示 MyD88 及 TRIF 信号通路可能不是脑梗死发生后 TLRs 唯一的信号通路, 下游通路可能还存在 TLRs 的其他配体^[18]。

3.2 TLRs 信号通路的激活

近年来, 已明确缺血性中风后机体天然免疫系统通过激活体内的天然免疫信号受体发挥保护神经的重要作用, 而作为炎症信号受体的 TLRs 同时也是机体天然免疫的信号受体。有实验研究发现, TLR2^{-/-} 脑梗死模型大鼠虽然在发病后 24~72 h 内的梗死面积小于对照组大鼠, 但 7 d 后形成的慢性缺血灶则要大于对照组大鼠, TLR2 的缺失会减少某些神经营养因子或抗凋亡因子的表达如类胰岛素一号生长因子 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 表达, 所以完全阻断 TLR2 的信号传导通路在缺血性中风急性期可以有效延缓缺血性损伤, 但会在后期恶化脑组织的梗死情况^[19], 说明 TLR2 的信号通路传导在脑缺血后的炎症反应中具有“双向作用”和“开关效应”, 发病后 3 d 内对其阻断可抑制炎症反应, 7 d 后激活可促进缺血脑组织的修复。提示在适当的时机及时触发机体内的免疫系

统, 激活 TLRs 信号通路是可以有效减少中风后的脑神经损伤。

因此, 抑制脑缺血后炎症级联反应的发生, 不仅仅在于直接阻断炎症信号通路的传导, 还可通过激活某些信号通路, 起到抗炎作用。例如, 在缺血性中风发生后注入人工合成的 TLR3 配体——聚肌胞苷酸 (polyinosinic: polycytidylic acid, Poly I:C), 可较早地激活 TRIF/IRF3 通路, 诱导 IFN- β 表达, 及时发挥抑制炎症反应的作用^[20]。脑缺血发生前注入少量 TLR4 外源性配体——脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 预先轻度激活 TLR4 信号通路, 可相应减少 NF- κ B-p65 表达, 增加内源性 NF- κ B 的抑制剂 Ship1、Tollip、p105 表达, 抑制炎症反应发生^[21-22]; 脑缺血发生后即刻注入 TLR7 外源性配体 Gardiquimod (GDQ)^[6]、TLR9 外源性配体寡脱氧核苷酸 (CpG-oligodeoxynucleotides, CpG-ODN)^[7], 可大量减少脑细胞死亡, 降低脑梗死面积及神经损害, 保护时间可持续至 14 d。由此可见, 脑缺血后使 TLRs 与相对应的人工合成配体结合后, 激活信号通路, 可提前激发内源性抑制剂及 IFN- β 的表达, 起到抑制炎症作用。此外, 通过对 TLRs 两条主要信号通路进一步研究发现, TLRs 信号传导通路中的 TRIF 依赖性途径不是激活 NF- κ B 的主要信号通路, 而是表达具有抗炎作用的 IFN- β 的主要信号通路, 因而 TRIF 依赖性途径是在脑缺血后炎症反应中主要起到保护作用的通路^[23,24]。

4 展望

临床上, 脑缺血发生后仍以溶栓、抗凝、抗血小板聚集、调脂稳斑及扩张脑血管等为主要治疗手段, 未有针对性的抗炎治疗, 因此一部分缺血性中风患者由于脑缺血后的炎性损伤而加快病情恶化, 寻求有效的抗炎治疗是日后关注的重点之一。目前, 针对 TLRs 信号传导通路的药物和新型疗法也在不断研究中, 如新型免疫疗法等^[25]。在脑缺血急性期甚至超早期, 针灸及中药治疗也可通过干预 TLRs 信号传导通路发挥抗炎作用^[26-28], 综合运用于缺血性中风的临床诊疗。

参考文献

- [1] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Heart disease and stroke statistics-2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2010, 121(7): e46-e215.
- [2] Meisel C, Meisel A. Suppressing immunosuppression after stroke. *N Engl J Med*, 2011, 365(22): 2134-2136.

- [3] Koennecke HC , Belz W , Berfelde D , et al. Factors influencing in-hospital mortality and morbidity in patients treated on a stroke unit. *Neurology* ,2011 ,77(10) : 965-972.
- [4] Eltzschig HK ,Eckle T. Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. *Nat Med* ,2011 ,7(11) : 1391-1401.
- [5] 顾悦华 尤晓欣 裴建. 基质金属蛋白酶: 一个缺血性脑卒中急性期的治疗靶点. *国际神经病学神经外科学杂志* ,2013 ,40 (3) : 266-270.
- [6] Leung PY ,Stevens SL ,Packard AE , et al. Toll-like receptor 7 preconditioning induces robust neuroprotection against stroke by a novel type I interferon-mediated mechanism. *Stroke* ,2012 ,43 (5) : 1383-1389.
- [7] Stevens SL ,Ciesielski TM ,Marsh BJ , et al. Toll-like receptor 9: A new target of ischemic preconditioning in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* ,2008 ,28(5) : 1040-1047.
- [8] Downes CE ,Crack PJ. Neural injury following stroke: are Toll-like receptors the link between the immune system and the CNS? *Br J Pharmacol* ,2010 ,160(8) : 1872-1888.
- [9] Khandoga AG ,Khandoga A ,Anders HJ , et al. Postischemic vascular permeability requires both TLR-2 and TLR-4 , but only TLR-2 mediates the transendothelial migration of leukocytes. *Shock* ,2009 ,31(6) : 592-598.
- [10] Wang YC ,Lin S ,Yang QW. Toll-like receptors in cerebral ischemic inflammatory injury. *J Neuroinflamm* ,2011 ,8: 134-144.
- [11] Okun E ,Griffioen KJ ,Lathia JD , et al. Toll-Like Receptors in Neuro-degeneration. *Brain Res Rev* ,2009 ,59(2) : 278-292.
- [12] Wu D ,Lee YC ,Liu HC , et al. Identification of TLR downstream pathways in stroke patients. *Clin Biochem* ,2013 ,46(1) : 1058-1064.
- [13] Katalin K ,Weissman D ,Welsh FA. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling-a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* ,2004 ,24(11) : 1288-1304.
- [14] Abe T ,Shimamura M ,Jackman K , et al. Key Role of CD36 in Toll-Like Receptor 2 Signaling in Cerebral Ischemia. *Stroke* ,2010 ,41(5) : 898-904.
- [15] Stewart CR ,Stuart LM ,Wilkinson K , et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* ,2010 ,11(2) : 155-161.
- [16] Brea D ,Blanco M ,Ramos-Cabrera P , et al. Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values. *J Cereb Blood Flow Metab* ,2011 ,31(6) : 1424-1431.
- [17] Ziegler G ,Prinz V ,Albrecht MW , et al. Mrp-8 and -14 mediate CNS injury in focal cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta* ,2009 ,1792(12) : 1198-1204.
- [18] Famakina BM ,Mou Y ,Ruetzler CA , et al. Disruption of downstream MyD88 or TRIF Toll-like receptor signaling does not protect against cerebral ischemia. *Brain Res* ,2011 ,1388: 148-156.
- [19] Bohacek I ,Cordeau P ,Lalancette-Hébert M , et al. Toll-like receptor 2 deficiency leads to delayed exacerbation of ischemic injury. *J Neuroinflamm* ,2012 ,8(9) : 191.
- [20] Marsh B ,Stevens SL ,Packard AE , et al. Systemic LPS protects the brain from ischemic injury by reprogramming the brain's response to stroke: a critical role for IRF3. *J Neurosci* ,2009 ,29 (31) : 9839-9849.
- [21] Kacimi R ,Giffard RG ,Yenari MA. Endotoxin-activated microglia injury brain derived endothelial cells via NF- κ B , JAK-STAT and JNK stress kinase pathways. *J Inflamm (Lond)* ,2011 ,8: 7.
- [22] Vartanian KB ,Stevens SL ,Marsh BJ , et al. LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury. *J Neuroinflamm* ,2011 ,8: 140.
- [23] Hua F ,Wang J ,Sayeed I , et al. The TRIF-dependent signaling pathway is not required for acute cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun* ,2009 ,390(3) : 678-683.
- [24] Cui G ,Ye X ,Zuo T , et al. Chloroquine pretreatment inhibits toll-like receptor 3 signaling after stroke. *Neurosci Lett* ,2013 ,26 (548) : 101-104.
- [25] Gomariz RP ,Gutierrez-Canas I ,Arranz AP , et al. Peptides targeting Toll-like receptor signaling pathways for novel immune therapeutics. *Curr Pharm Des* ,2010 ,16(9) : 1063-1080.
- [26] Lan L ,Tao J ,Chen A , et al. Electroacupuncture exerts anti-inflammatory effects in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via suppression of the TLR4/NF- κ B pathway. *Int J Mol Med* ,2013 ,31(1) : 75-80.
- [27] Spelman K ,Aldag R ,Hamman A , et al. Traditionalherbal remedies that influence cell adhesion molecule activity. *Phytother Res* ,2011 ,25(4) : 473-483.
- [28] Hu H ,Li Z ,Zhu X , et al. Gua Lou Gui Zhi decoction suppresses LPS-induced activation of the TLR4/NF- κ B pathway in BV-2 murine microglial cells. *Int J Mol Med* ,2013 ,31(6) : 1327-1332.