

Toll 样受体在成骨细胞和破骨细胞中的表达及作用

王凌综述 李大金审校

【摘要】 Toll 样受体 (TLRs) 在早期固有免疫中对入侵病原微生物的识别发挥重要作用,并在固有免疫和适应性免疫中起着枢纽作用。近来研究发现,TLRs 在成骨细胞 (OB) 及破骨细胞 (OC) 分化、成熟及其功能中具有重要的调控作用。OC 骨吸收与 OB 骨形成构成了持续不断的骨重建过程。阐明 TLRs 在 OB 和 OC 发生和功能中的作用,可加深对骨代谢相关疾病发生机制的认识并为开发针对性药物提供新的方法。

【关键词】 Toll 样受体;信号转导;成骨细胞;破骨细胞;骨代谢

Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 在早期固有免疫中对入侵病原微生物的识别发挥重要作用,并在高等脊椎动物的固有免疫和适应性免疫中起着枢纽作用^[1,2]。近来研究发现,TLRs 对成骨细胞 (OB) 及破骨细胞 (OC) 也具有重要的调控作用。OC 骨吸收与 OB 骨形成构成了持续不断的骨重建过程。阐明 TLRs 调控 OB、OC 的分化、成熟及其功能的机制将为治疗骨代谢相关疾病提供重要信息。本文将对 TLRs 在 OB 及 OC 中的表达及作用进行简要综述。

1 TLRs 概述

1.1 TLRs 及其相应配体 进化保守的 TLRs 与果蝇 Toll 蛋白家族在结构上有高度同源性,可识别病原微生物上高度保守的结构基序——病原相关分子模式 (PAMP)。PAMP 包括各种细菌胞壁成分及鞭毛蛋白、细菌 DNA 和病毒双链 RNA。目前已发现人类有 10 个 TLRs,小鼠有 9 个 TLRs,其中 7 个已找到相应配基。每种 TLRs 都可识别多种微生物来源分子结构:TLR2 可识别多种 PAMPs,包括脂多糖 (LPS)、肽聚糖和胞壁酸等;TLR3 识别双链病毒 RNA;TLR4 研究最广泛,主要识别 LPS;TLR5 识别鞭毛蛋白;TLR6 与 TLR2 形成复合物共同识别革兰氏阴性菌成分、酵母多糖、肽聚糖、支原体脂蛋白等,使 TLR2 识别具特异性;TLR7 识别双链 RNA;TLR9 识别细菌非甲基化 CpG DNA;最近发现 TLR7 和 TLR8 能识别一些人工合成的抗病毒小分子。其余 TLRs 的配体尚不清楚。

1.2 TLRs 的结构 TLRs 均为 型跨膜受体,胞外区含 19~25 个富含亮氨酸的重复序列 (LRRs),其间有非 LRR 序列分隔。其基本框架结构是马蹄形螺旋管,凹面上含丰富的 片层和许多可与配体结合的表位。这些表位和 片层提供的结合面比抗体和 T 细胞受体的抗原结合面大 10 倍^[3],有利于促进相互黏附,识别特异性配体,激活胞内信号转导。胞内区由与 Toll 及白细胞介素 (IL)-1 同源的 TIR 结构域 (Toll/IL-1 receptor homologous region, TIR) 和羧基端长短不同的短肽组成。前者是 TLRs 向下游转导信号的核心元件。

1.3 TLRs 的信号转导 TLRs 信号转导由作为转接蛋白的髓样细胞分化蛋白 MyD88 介导。另一个转接蛋白叫 Toll/IL-1 受体衔接蛋白 (TIRAP),也称 Mal,参与 TLR2 和 TLR4 的信号转导。最近有文献报道,第 3 种转接蛋白 TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN γ) 或 TICAM-1 (Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor molecule-1),对 TLR3 活化干扰素调节因子-3 (IRF-3) 起重要作用^[4]。在人类还存在另外两个转接蛋白,即 TRAM (Trif-related adaptor molecule) 和 SARM (sterile alpha and HEAT/Armadillo motifs),但其具体作用尚未明了^[5]。不同 TLRs 募集的转接蛋白不同,从而导致 TLRs 信号差异。TLRs 信号转导包括 MyD88 依赖性和非依赖性两个途径。MyD88 依赖性途径主要介导核因子 B (NF- κ B) 活化;而非依赖途径主要介导干扰素 (IFN)、干扰素调节基因-1 (IRG-1)、主要组织相容性复合物 (MHC)、协同刺激分子 CD80 和 CD86 等的表达。

2 TLRs 对 OB 的调控作用

OB 的主要功能是合成骨基质,调节骨吸收细胞 OC 活性,此外还有启动并维持免疫应答的作用。细

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30472259);上海市科技攻关资助项目 (004019061)

作者单位:200011 上海,复旦大学上海医学院附属妇产科医院暨妇产科研究所

菌作用下,OB 除产生各种炎性细胞因子和趋化因子外,还以 MHC 复合体形式呈递抗原,并表达协同刺激分子 CD40 活化 T 细胞。目前认为,OB 表达 TLR2、TLR4、TLR5 和 TLR9,通过 TLRs 识别细菌相应配体并对其产生应答。

2.1 TLR2 和 TLR4 对 OB 的调控作用 小鼠 OB 内存在 TLR2 和 TLR4 的 mRNA,因此认为鼠 OB 和 OB 系细胞组成性表达 TLR2 和 TLR4^[6]。Kikuchi 等^[6]发现 LPS 可通过 TLR 诱导小鼠 OB 表达 NF- κ B 受体活化因子配基(RANKL)。用类脂 A 诱导 TLR4 基因突变的 C3H/HeJ 小鼠原代 OB,RANKL mRNA 合成没有增加,提示 TLR4 在该过程中起关键作用。

其具体过程如下:LPS 结合血清中脂多糖结合蛋白(LBP),LBP 将其传递给膜型 CD14(mCD14),形成三聚体复合物。复合物中 LPS 解聚,与 TLR4 作用,使 TLR4 二聚化,从而激活 MyD88,后者使 IL-1 相关蛋白激酶(IRAK)自身磷酸化。IRAK 与 MyD88 分离后,活化胞浆内的肿瘤坏死因子(TNF)受体活化因子 6(TRAF6)。活化后的 TRAF6 与转化生长因子活化激酶 1(TAK1)及 TAK1 的结合蛋白 TAB1/2 形成复合物,降解 NF- κ B 抑制蛋白(I κ B),NF- κ B 活化后进入核内,导致那些与炎症有关的基因转录;同时,TIRAP/MAL 与 TLR4 的 TIR 结构域相互作用,MAL 自身二聚化或与 MyD88 形成异二聚体,结合 IRAK2,将信号传递给 TRAF6 和 TAK1,活化的 TAK1 激活 MKK(MAP kinase kinase),MKK 磷酸化丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)家族(包括 c-Jun 氨基端激酶、p38 和细胞外信号调节激酶)最终激活转录因子激活蛋白-1(AP-1),后者可刺激 OB 增殖、转化。

在上述信号转导过程中,TRAF6 是调节适应性免疫、固有免疫和骨代谢的关键信号分子。TRAF6 在调节免疫和骨质疏松症等多种疾病中呈现重要作用。

Gasper 等^[7]认为 TLR4 还可介导细菌诱导 OB 分泌 INF 诱导蛋白 10(IP-10,CXCL10)。抗 TLR4 抗体可阻滞 LPS 诱导的 IP-10 产生,进一步证实 OB 功能性表达 TLR4。尽管细菌可诱导 OB 表达 TLR2 mRNA,但 TLR2 特异性配体肽聚糖未能使 OB 活化,也不能促进其分泌 IP-10,因此 TLR2 在 OB 中的作用尚待进一步探讨^[8]。人 OB 细胞系 SaOS-2 细胞表达 TLR4 mRNA、MD-2、CD14 和 MyD88,而不表达 TLR2 mRNA。来源于大肠杆菌的类脂 A 可诱导 SaOS-2 细胞内 NF- κ B 活化及 RANKL 表达增加,且类脂 A 处理后的 SaOS-2 细胞可介导外周血单个核细胞(PBMC)向 OC 分化。抗 TLR4 单抗可阻滞上述效应。以上结果显示,OB 中 TLR 信号可调控 OC 生成

及功能。近来发现,Toll 相互作用蛋白(Tollip)是 TLR 信号通路中一个重要的信号蛋白,对 TLR 信号降调节,从而限制 OB 产生促炎性介质。

2.2 TLR5 对 OB 的调控作用 TLR5 介导信号可促发鼠 OB 产生炎性介质。Madrazo 等^[9]发现,静止 OB 组成性表达低水平的 TLR5 mRNA;具鞭毛细菌刺激后,可大大增加 OB 内 TLR5 mRNA 的表达。鞭毛蛋白作用于 OB 中的 TLR5,激活转录因子并产生促炎性细胞因子,提示 TLR5 在 OB 识别病原体的过程中起重要作用。

2.3 TLR9 对 OB 的调控作用 Zou 等^[10]发现,OB 表达有 CpG DNA 受体 TLR9;CpG DNA 可促进 OB 表达 TNF- α 和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)。在骨髓细胞与 OB 共培养时,在 TNF- α 协同作用下,CpG DNA 可诱导 OB 表达 RANKL,从而调节 OC 发生。CpG DNA 对 OB 的作用是特异的。

TLRs 在识别配体并介导信号转导过程中,一般不需配体的内吞或摄入。但 TLR9 不同,它定位在胞内,亲水性 CpG DNA 须经内吞摄入 OB。内吞时细胞局部质膜下陷形成小窝,后者离开质膜形成小泡。含 CpG DNA 小泡与细胞小体结合,CpG DNA 在此与受体 TLR9 结合。细胞小体膜上有 H⁺ 泵,能降低细胞小体 pH 值,有利于 CpG DNA 与 TLR9 识别并结合。

除激活 NF- κ B 外,CpG DNA 还可激活不同的 MAPK 通路(细胞外信号调节激酶、c-Jun 氨基端激酶和 P38MAPK)。骨髓全系培养时,LPS 诱导 OB 表达 RANKL,促进 OB 分泌 IL-1、前列腺素 E₂ 和 TNF- α ,从而介导骨吸收。LPS 还可直接作用于 OC 上的 TLR4 或通过 OB 上的 TLR4 间接调控 OC 生成。而 CpG DNA 作用于 OB 上的 TLR9,可发挥间接促 OC 生成的作用。

3 TLRs 对 OC 的调控作用

骨吸收细胞 OC 来源于造血干细胞,在骨重建中亦起重要作用。已知鼠骨髓中的 OC 前体细胞表达所有已知的鼠 TLRs (TLR1 ~ TLR9)。不同的 TLR 配体如肽聚糖、dsRNA、LPS、未甲基化的 CpG DNA 基序(分别为 TLR2、3、4 和 9 的配体)可活化 OC 前体细胞中的 NF- κ B 并上调 TNF- α 产生。TLR 家族与 NF- κ B 受体活化因子(RANK)一起共享一些下游信号。RANKL 不存在时,LPS 可通过 TLR4 替代 RANKL 的作用,促进 OC 生成。但 TLR 家族的其他配体如 TLR2 的配体肽聚糖或 TLR9 的配体——未甲基化的 CpG DNA 均无此替代效应^[11]。体内实验也证实,TLR4 的配体 LPS 可诱导 OC 分化并促进其产生

IL-1、IL-6 和 TNF α 等细胞因子^[12]。OC 前体细胞用 TLR9 的配体 CpG DNA 预处理后, RANKL 诱导的 OC 生成受抑制;若用 RANKL 预处理,则 CpG DNA 又是有力的促 OC 生成因子。因此认为 CpG DNA 可双向调节 OC 生成^[13]。但也有学者提出 TLR 转导的信号对 OC 前体细胞分化为成熟 OC 起抑制作用^[14]。

TLRs 对 OC 的调控研究主要集中在对 OC 生成的调控上。Itoh 等^[15]报道成熟 OC 表达 LPS 受体 TLR4 的 mRNA 及其共受体 CD14, LPS 可通过 TLR4 诱导 OC 中的 IB 快速降解,活化 NF- κ B,促进 OC 存活。OC 前体细胞分化为成熟 OC 后,TLRs 的表达发生怎样的变化以及其对 OC 细胞生物学功能的影响尚在研究中。

综上所述,骨代谢是一个复杂的过程,受全身和局部多种因素的影响和调节。在骨代谢中,OB 和 OC 起着关键的作用。目前研究认为,TLRs 可调控 OB 和 OC 分化成熟及其功能,从而参与调控骨代谢。但 OB 和 OC 的 TLRs 表达缺乏系统的研究报道,有关 TLRs 在骨代谢及骨免疫等方面的研究尚处于起步阶段,仍有许多结论来自动物实验和离体研究,在人体内的具体机制仍有待进一步探讨。例如:成熟 OB 和 OC 上是否表达所有已知 TLRs,这些 TLRs 表达的调控机制如何、激素如雌激素等能否调控其表达、各种 TLRs 通过何种信号通路调控骨代谢过程。有关 TLRs 在骨代谢中的研究成果无疑会有医药方面的重要应用价值,上述问题的阐明将有助于完善免疫—骨代谢调节网络。另外,该领域的深入研究可为骨代谢性疾病的防治提供新的理论依据。

参 考 文 献

1 Abreu MT, Arditi M. Innate immunity and toll-like receptors: clinical

- implications of basic science research. *J Pediatr*, 2004, 144: 421-429.
- 2 Basu S, Fenton MJ. Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286: L887-L892.
- 3 Bell J K, Mullen GE, Leifer CA, et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol*, 2003, 24: 528-533.
- 4 Yamamoto M, Takeda K, Akira S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol*, 2004, 40: 861-868.
- 5 O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol*, 2003, 24: 286-290.
- 6 Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, et al. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol*, 2001, 166: 3574-3579.
- 7 Asai Y, Hirokawa Y, Niwa K, et al. Osteoclast differentiation by human osteoblastic cell line SaOS-2 primed with bacterial lipid A. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, 38: 71-79.
- 8 Casper NA, Petty CC, Schrum LW, et al. Bacterium-induced CXCL10 secretion by osteoblasts can be mediated in part through toll-like receptor 4. *Infect Immun*, 2002, 70: 4075-4082.
- 9 Madraza DR, Tranguch SL, Marriott I. Signaling via Toll-like receptor 5 can initiate inflammatory mediator production by murine osteoblasts. *Infect Immun*, 2003, 71: 5418-5421.
- 10 Zou W, Amcheslavsky A, Bar-Shavit Z. CpG oligodeoxynucleotides modulate the osteoclastogenic activity of osteoblasts via Toll-like receptor 9. *J Biol Chem*, 2003, 278: 16732-16740.
- 11 Hayashi S, Tsuneto M, Yamada T, et al. Lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis in Src homology 2-domain phosphatase-1-deficient viable motheaten mice. *Endocrinology*, 2004, 145: 2721-2729.
- 12 Bi Y, Seibold JM, Kaar SG, et al. Adherent endotoxin on orthopedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 2082-2091.
- 13 Hayashi S, Yamada T, Tsuneto M, et al. Distinct osteoclast precursors in the bone marrow and extramedullary organs characterized by responsiveness to Toll-like receptor ligands and TNF α . *J Immunol*, 2003, 171: 5130-5139.
- 14 Takami M, Kim N, Rho J, et al. Stimulation by toll-like receptors inhibits osteoclast differentiation. *J Immunol*, 2002, 169: 1516-1523.
- 15 Itoh K, Udagawa N, Kobayashi K, et al. Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. *J Immunol*, 2003, 170: 3688-3695.

(收稿日期: 2004-12-03)

消息

“内分泌信息网”全面改版并已于近期试运行

由我《国外医学内分泌学分册》杂志编辑部创建的“内分泌信息网”自开通以来受到国内外广大界内人士的好评,本编辑部全体人员特向大家表示感谢。为了更好的服务于广大内分泌学工作者,我编辑部已对“内分泌信息网”进行全面改版,增加了“国内内分泌信息”部分,将对国内内分泌研究所、学术会议、界内消息、相关杂志、网站、医药公司及其产品等予以全面、及时的报道。另外,本网站还增加了“留言板”版块,给广大内分泌学工作者提供一个经验交流、信息沟通、学术探讨的互动平台,我刊的广大作者、读者也可以通过该版块了解编辑部信息、稿件处理情况等。欢迎访问我们的网站“<http://www.endocrine.com.cn>”。

本刊编辑部