

TLR4 在心肌缺血再灌注损伤中作用的研究进展

张美香, 章鸣

(中南大学湘雅二医院 超声科, 长沙 410011)

摘要: 急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是全球范围内导致高致残率和高死亡率的主要疾病。对于 AMI 患者, 及时、有效的再灌注治疗对减少心肌梗死面积、挽救生命至关重要, 目前临床上采用的再灌注治疗方法主要是溶栓治疗和经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)。但是, 心肌再灌注可以导致其缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤, 包括心肌细胞死亡、梗死面积增大、左室收缩功能障碍等, 该损伤的发生机制和治疗策略仍在研究中。越来越多的实验研究表明, 固有免疫的成员之一 TLR 可能通过多条信号通路在 I/R 损伤中起关键作用。文章主要针对 TLR4 在心肌 I/R 损伤中作用的研究进展作一综述。

关键词: 缺血再灌注损伤; Toll 样受体 4; 心肌

中图分类号: R392.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)03-0237-04

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是全球范围内导致高致残率和高死亡率的主要疾病。对于 AMI 患者而言, 及时、有效的再灌注治疗对减少心肌梗死面积、挽救生命至关重要。目前临床上采用的再灌注治疗方法主要是溶栓治疗和经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI), 然而, 后者在疏通狭窄冠状动脉、恢复心脏血流灌注的同时, 还可导致心肌细胞死亡、梗死面积增大、左室收缩功能障碍等, 称为心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤。TLR 是固有免疫的重要成员, 在机体免疫系统识别病原体 and 有害因子时起重要作用, 并与炎症反应和自身免疫性疾病相关联。TLR 家族中的关键成员 TLR4, 与其他 TLR 成员相比, 在心肌细胞中的表达最高, 参与多种疾病的病理生理过程, 包括心血管疾病、过敏性疾病、代谢性疾病、自身免疫性疾病、感染性疾病等。本文将对 TLR4 在心肌 I/R 损伤中的信号转导通路作一综述, 为临床治疗心肌 I/R 损伤提供新的思路。

1 TLR 概述

TLR 最早发现于果蝇胚胎发育过程中, 在免

疫防御中扮演着不可或缺的角色。已有研究表明, TLR 是一类由 3 个结构域组成的跨膜蛋白: 胞外 C 端富含亮氨酸重复序列的配体识别结构域、中央跨膜结构域和与 IL-1 受体相似的胞内结构域^[1]。迄今为止, 已经发现的 TLR 家族成员主要有 13 个(TLR1~13), 几乎所有心脏细胞都可表达 TLR, 其中在心肌细胞中表达的有 TLR2、TLR3、TLR4 和 TLR6, 在平滑肌和内皮细胞中表达的有 TLR1~6^[2]。TLR 是模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR), 能够识别损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMP)和病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP), 包括来自革兰阴性杆菌的 LPS 等, 引发一系列信号转导, 启动免疫反应。

2 TLR4 及其信号转导通路

TLR4 几乎表达于所有的细胞, 在心肌细胞中表达最高, 可识别来自各种微生物的产物, 如热休克蛋白、高迁移率族蛋白 1(high mobility group protein 1, HMGB1)等, 不仅在固有及适应性免疫中发挥重要作用, 而且在心肌 I/R 损伤中也起着重要的调控作用^[3-7]。

TLR4 信号转导通路的激活来源于细胞质的 TIR 结构域, TLR4 信号转导通路一旦被激活, 可以通过髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)依赖途径和 IFN- β TIR 结构域衔接蛋白(TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- β ,

收稿日期: 2018-05-10

基金项目: 湖南省自然科学基金(2018JJ2583); 国家自然科学基金(81201096)

作者简介: 张美香(1993-), 女, 硕士生, 主要从事心血管超声及基础研究

通信作者: 章鸣(E-mail: zm7626@csu.edu.cn)

TRIF)依赖途径分别激活 NF- κ B、IFN 调节因子 3 (IFN regulatory factor 3, IRF3)和 IRF5, 随后刺激促炎和免疫调节细胞因子基因表达, 引起炎症细胞浸润和细胞因子释放。这一过程涉及的免疫细胞主要包括嗜中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞^[8]。

2.1 MyD88 依赖途径 MyD88 是一种含有 TIR 结构域、在 TLR 信号转导通路中起关键作用的衔接蛋白, 是固有免疫反应信号转导的关键触发器^[9], 其本质为胞质可溶性蛋白。MyD88 含有 3 个功能结构域: N 端的死亡结构域(death domain, DD)、中间结构域(intermediate domain, ID)以及 C 端类似于 IL-1 受体胞质区的 TIR 结构域, 其中 DD 是信号转导途径中的核心结构。DD 与 ID 被表达后与 IL-1 受体相关激酶结合, 发生磷酸化, 然后迅速激活 NF- κ B, 诱导细胞释放大量炎症因子, 如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等, 从而导致炎症反应的发生^[10-11]。

2.2 TRIF 依赖途径 TRIF 依赖途径又称为 MyD88 非依赖途径, 人们对它的了解要晚于 MyD88 依赖途径, 其主要存在于 TLR3 和 TLR4 信号通路中。TRIF 除了包括 TIR 结构域外, 还包括 T6BM 结构域和 RHIM 结构域, 可分别结合肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6)和受体相互作用蛋白 1 (receptor-interacting protein 1, RIP1), 进而激活 TLR 下游信号通路。TLR3 可以直接结合 TRIF, 而 TLR4 需要

以 TRIF 相关接头分子 (TRIF-related adaptor molecule, TRAM) 为桥梁来招募 TRIF^[12]。TRAM 是一种膜结合桥联接头分子^[13], 是 TRAF3 和 TRAF6 相互作用的关键分子^[14]。TRAF6 和 RIP1 可以分别独立介导 TRIF 依赖途径的 NF- κ B 激活过程, 但 TRAF6 在 TRIF 依赖途径中的作用是具有争议的, 通常认为 RIP1 在 TRIF 依赖途径中所起的作用更大。RIP1 泛素化后被泛素受体蛋白 TAB2/TAB3 识别, 并由此激活转化生长因子 β 活化激酶 1 (transforming growth factor β activated kinase 1, TAK1), 活化的 TAK1 使 NF- κ B 抑制蛋白 α 、 β 发生磷酸化, 进而激活 NF- κ B^[14], 诱导促炎因子释放, 导致炎症反应的发生。TRIF 依赖途径中, TLR4 还可以在 TANK 结合激酶 1、IKK ϵ 的调控下激活 IRF3, 导致其磷酸化, 最终促进 IFN 的表达, 启动炎症反应^[15-16]。

3 TLR4 与心肌 I/R 损伤

TLR4 可分别通过 MyD88 依赖途径和 TRIF 依赖途径介导炎症反应的发生(图 1)。如上文所述, 当 TLR4 被激活后, 启动细胞内信号转导, 通过含 TIR 结构的 MyD88、TRIF, 最终激活 NF- κ B、IRF3 和 IRF5, 诱导细胞释放大量炎症因子, 如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等, 导致炎症反应的发生, 引起心肌细胞坏死、心肌梗死面积增大、心功能降低。

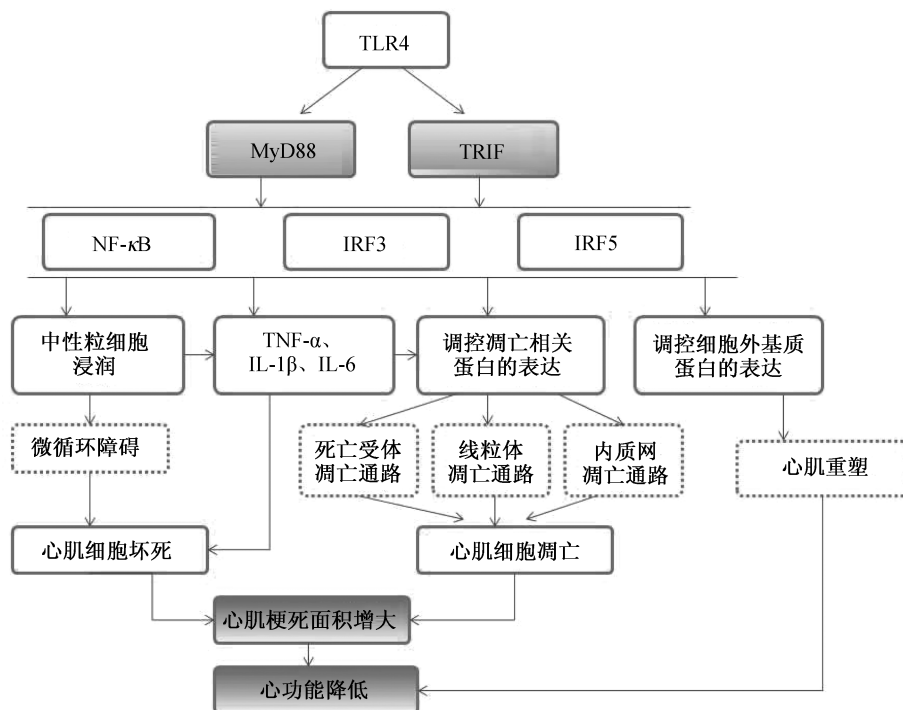


图 1 TLR4 在心肌 I/R 损伤中的信号转导机制

心肌 I/R 损伤中不仅存在细胞坏死,还存在细胞凋亡。1994 年 Gottlieb 等^[17]首次揭示了心肌 I/R 损伤中存在细胞凋亡的现象。细胞凋亡是一个精确调控的蛋白酶依赖的分子级联反应过程,旨在通过活化 Caspase 来消除受损细胞以维持体内平衡^[18]。通常认为细胞凋亡主要存在 3 种信号转导通路:死亡受体凋亡通路、线粒体凋亡通路、内质网凋亡通路,前者属于外源性途径,后两者属于内源性途径^[19]。在炎症发生过程中,死亡受体如 Fas 受到刺激后活化,招募细胞质中的 Fas 相关死亡结构域蛋白(Fas-associated protein with death domain, FADD),然后 FADD 招募 Caspase-8 酶原(pro-Caspase-8),最终形成 FasL-FADD-pro-Caspase-8 死亡诱导信号复合体。当该复合体浓度逐渐升高时,pro-Caspase-8 可自我催化成 Caspase-8,启动 Caspase 级联反应,放大凋亡信号,而且该过程并不可逆,一旦开始,就可导致心肌细胞快速死亡,从而导致心肌梗死面积增大,进一步影响心功能^[20-21]。线粒体凋亡通路主要是通过调节 Bcl-2 蛋白家族来发挥功能,当细胞受到缺氧等刺激时,线粒体通透性增加,引起线粒体膜内的 Bcl-2 蛋白家族成员促凋亡因子如细胞色素 C 等物质释放,激活线粒体凋亡通路,启动心肌细胞凋亡过程^[22]。内质网凋亡通路也主要通过调节 Bcl-2 蛋白家族的方式启动细胞凋亡,除此之外,还可以通过调节内质网上的 Ca^{2+} 浓度引起细胞凋亡。因此,内质网凋亡通路可以被认为是线粒体凋亡通路的进一步完善^[21, 23]。

当 TLR4 激活 MyD88 和 TRIF 依赖途径后,活化的心肌成纤维细胞还可调控细胞外基质蛋白的表达,引起心脏不良重塑、心力衰竭。Zhai 等^[24]通过建立小鼠心肌 I/R 损伤模型,发现 TLR4 缺乏组小鼠的心肌炎症反应较对照组减弱,胶原酶 I、IV 以及基质金属蛋白酶 2 和 9 水平降低,很大程度上抑制了远端非缺血心肌区域的细胞外基质蛋白重塑,心功能得到明显改善,但目前尚不清楚哪种炎症介质引起了细胞外基质蛋白重塑。

Tang 等^[25]研究结果显示,经银杏叶提取物 EGb 761 预处理过的小鼠可通过降低氧化应激,抑制体内炎症级联反应和 TLR4/NF- κ B 通路而减轻心肌 I/R 损伤。Yuan 等^[26]研究显示,内脏脂肪组织来源的丝氨酸蛋白酶抑制剂 Vaspin 可中断大鼠心脏中的 TLR4/NF- κ B 通路,有效减轻心肌 I/R 损伤中的炎症反应,从而对心脏起保护作用。2018

年 Yang 等^[27]通过实验阐明了 RP105 可通过抑制 TLR4/TRIF 信号通路来缓解心肌 I/R 损伤,减少心肌梗死面积。Wang 等^[28]通过建立大鼠心肌 I/R 损伤模型证明,生长激素释放肽 Ghrelin 可以抵抗 I/R 损伤后的氧化应激反应,抑制 TLR4、NOD 样受体 3(NOD-like receptor 3, NLRP3)和 Caspase-1 的表达,具有潜在的抗炎活性。刘娜等^[29]通过研究 TLR4 拮抗剂 TAK-242 对小鼠心肌 I/R 损伤的保护作用证明, TAK-242 治疗组小鼠的 TLR4 表达较 I/R 组低,心肌炎性细胞浸润减少, TNF- α 、IL-6 水平降低,而抑炎因子 IL-10、HMGB1 水平升高,对心肌具有保护作用。在 Zhang 等^[30]的实验研究中,经右美托咪啶预处理的小鼠其血清和心肌中 IL-6、TNF- α 水平及 HMGB1、TLR4、MyD88、NF- κ B 的表达均较 I/R 组低,表明右美托咪啶预处理可抑制心肌 I/R 损伤中的炎症反应;但如果和育亨宾(选择性 α 2-肾上腺素能受体拮抗剂)同时使用,这种炎症抑制作用会被削弱,提示右美托咪啶对心脏的保护作用是通过下调 α 2-肾上腺素能受体激活介导的 HMGB1-TLR4-MyD88-NF- κ B 信号通路来实现的。

4 结语

TLR4 作为 TLR 家族的重要成员,可在心肌 I/R 损伤中通过 MyD88 依赖途径和 TRIF 依赖途径分别激活 NF- κ B 和 IRF3,刺激促炎、免疫调节细胞因子基因表达,介导级联炎症反应,增加 PCI 术后患者的心肌梗死面积,制约 PCI 的疗效。目前已有大量的动物实验研究表明,抑制 TLR4 信号通路可能是减轻心肌 I/R 损伤新的治疗靶点。然而,TLR4 作为固有免疫的重要一员,抑制 TLR4 转导通路的哪个环节效果更好,抑制其信号转导通路是否有损正常的免疫防御仍然不得而知。而且不同物种、个体之间存在差异,阻断信号转导通路对机体是否利大于弊也未可知^[31],因此其在人体上的临床应用价值尚待进一步研究证实。目前并没有确切的证据表明,抑制 TLR4 信号通路对改善心肌 I/R 损伤患者的远期预后有益处,对合并有其他并发症的患者疗效如何也尚不清楚。因此,探寻一条疗效确切、安全的方法来减轻心肌 I/R 损伤应该是今后研究的重点,尤其是如何特异性抑制心肌中 TLR4 表达,从而达到精准治疗的目的,将在心肌 I/R 损伤治疗中具有重要的临床意义和广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Wang YE, Abarbanell AM, Herrmann JL, *et al.* Toll-like receptor signaling pathways and the evidence linking toll-like receptor signaling to cardiac ischemia/reperfusion injury[J]. *Shock*, 2010, 34(6): 548-557.
- [2] Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease[J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007, 4(8): 444-454.
- [3] Jeong E, Lee JY. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors[J]. *Yonsei Med J*, 2011, 52(3): 379-392.
- [4] Mu HH, Hasebe A, van Schelt A, *et al.* Novel interactions of a microbial superantigen with TLR2 and TLR4 differentially regulate IL-17 and Th17-associated cytokines[J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13(3): 374-387.
- [5] Imai Y, Kuba K, Neely GG, *et al.* Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury[J]. *Cell*, 2008, 133(2): 235-249.
- [6] Lefebvre JS, Lévesque T, Picard S, *et al.* Extra domain A of fibronectin primes leukotriene biosynthesis and stimulates neutrophil migration through activation of Toll-like receptor 4 [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(6): 1527-1533.
- [7] Sirisinha S. Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease[J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2011, 29(1): 1-14.
- [8] Vilahur G, Badimon L. Ischemia/reperfusion activates myocardial innate immune response: The key role of the toll-like receptor[J]. *Front Physiol*, 2014, 5: 496.
- [9] Nagpal K, Plantinga TS, Wong J, *et al.* A TIR domain variant of MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP results in loss of MyD88 binding and reduced TLR2/TLR4 signaling[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(38): 25742-25748.
- [10] Cheng X, Yang YL, Yang H, *et al.* Kaempferol alleviates LPS-induced neuroinflammation and BBB dysfunction in mice via inhibiting HMGB1 release and down-regulating TLR4/MyD88 pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 56: 29-35.
- [11] 李红梅,王显. TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路与动脉粥样硬化性心血管疾病的相关性研究进展[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2017, 9(9): 1132-1134.
- [12] 解鸿翔,周红. 信号分子 TRIF 的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(2): 217-220.
- [13] Gay NJ, Symmons MF, Gangloff MA. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(8): 546-558.
- [14] Ve T, Gay NJ, Mansell A, *et al.* Adaptors in toll-like receptor signaling and their potential as therapeutic targets[J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(11): 1360-1374.
- [15] Sasai M, Tatematsu M, Oshiumi H, *et al.* Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway[J]. *Mol Immunol*, 2010, 47(6): 1283-1291.
- [16] Liu Y, Yin H, Zhao M, *et al.* TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: A comprehensive review [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2014, 47(2): 136-147.
- [17] Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, *et al.* Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes[J]. *J Clin Invest*, 1994, 94(4): 1621-1628.
- [18] Smith CA, Williams GT, Kingston R, *et al.* Apoptosis[J]. *Nature*, 1989, 338(6210): 10.
- [19] Fan D, Fan TJ. Clonidine induces apoptosis of human corneal epithelial cells through death receptors-mediated, mitochondria-dependent signaling pathway[J]. *Toxicol Sci*, 2017, 156(1): 252-260.
- [20] Singh N, Hassan A, Bose K. Molecular basis of death effector domain chain assembly and its role in caspase-8 activation[J]. *FASEB J*, 2016, 30(1): 186-200.
- [21] 李帅, 张炳东. 细胞凋亡途径的研究进展[J]. *山东医药*, 2017, 57(37): 103-106.
- [22] Yang Y, Yu Y, Wang J, *et al.* Silica nanoparticles induced intrinsic apoptosis in neuroblastoma SH-SY5Y cells via CytC/Apaf-1 pathway[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017, 52: 161-169.
- [23] 李敏, 林俊. 细胞凋亡途径及其机制[J]. *国际妇产科学杂志*, 2014, 41(2): 103-107.
- [24] Zhai Y, Ao L, Cleveland JC, *et al.* Toll-like receptor 4 mediates the inflammatory responses and matrix protein remodeling in remote non-ischemic myocardium in a mouse model of myocardial ischemia and reperfusion[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121853.
- [25] Tang Y, Zhou G, Yao L, *et al.* Protective effect of Ginkgo biloba leaves extract, EGB761, on myocardium injury in ischemia reperfusion rats via regulation of TLR-4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49): 86671-86680.
- [26] Yuan L, Dai X, Fu H, *et al.* Vaspin protects rats against myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI) through the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 835: 132-139.
- [27] Yang J, Yang C, Yang J, *et al.* RP105 alleviates myocardial ischemia reperfusion injury via inhibiting TLR4/TRIF signaling pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(6): 3287-3295.
- [28] Wang Q, Lin P, Li P, *et al.* Ghrelin protects the heart against ischemia/reperfusion injury via inhibition of TLR4/NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Life Sci*, 2017, 186: 50-58.
- [29] 刘娜, 苏燕胜, 许毛, 等. Toll 样受体 4 拮抗剂 TAK-242 对 C57BL/6 小鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *国际药理学研究杂志*, 2016, 43(6): 1093-1097.
- [30] Zhang JJ, Peng K, Zhang J, *et al.* Dexmedetomidine preconditioning may attenuate myocardial ischemia/reperfusion injury by down-regulating the HMGB1-TLR4-MyD88-NF- κ B signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172006.
- [31] 任美玉, 吴欣怡. Toll 样受体的研究进展[J]. *现代免疫学*, 2006, 26(4): 340-342.