

文章编号: 1004-0374(2013)09-0932-05

Toll样受体4及其调控神经病理性痛的可能机制

阮丽钦, 洪炎国*

(福建师范大学生命科学院, 生物学和神经科学省级重点实验室, 福州 350108)

摘要: Toll样受体4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是一类介导固有免疫的跨膜信号转导受体, 近来有研究发现 TLR4 不仅是参与机体免疫应答的重要蛋白, 而且能识别伤害性刺激, 诱导一系列神经活性物质和促炎因子的释放, 激活胶质细胞, 最终导致炎症和神经病理性痛的产生和维持。主要通过对 TLR4 的生物学结构、TLR4 功能发挥依赖的相关分子以及 TLR4 介导神经病理性痛的可能通路进行综述, 阐述 TLR4 在神经病理性痛的发生和发展中的作用。

关键词: Toll样受体4; 神经病理性痛; 胶质细胞

中图分类号: Q422; R338 **文献标志码:** A

Toll-like receptor 4 and the possible mechanism underlying TLR4 mediated neuropathic pain

RUAN Li-Qin, HONG Yan-Guo*

(Key Laboratory of Developmental Biology and Neuroscience in Fujian Province,
College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: Toll-like receptor 4 (TLR4) is a type of transmembrane signal transduction receptors, which mediate innate immune responses. Recently, studies have found that TLR4 is not only an important protein involved in the body immune response, but also able to induce the release of neuroactive substances and pro-inflammatory cytokines by activating glial cells following noxious stimuli, which eventually contributes to inflammation and neuropathic pain. This article briefly describes the TLR4 structure and its biological function, as well as TLR4 function-related molecules. Furthermore, the role of TLR4 in neuropathic pain and the mechanism underlying TLR4 mediation of neuropathic pain are discussed.

Key words: Toll-like receptor 4; neuropathic pain; glia

Toll样受体 (Toll-like receptors, TLR) 家族是一类通过识别病原体上特异性分子介导天然免疫的跨膜信号传递受体^[1-2]。Toll蛋白最初是在果蝇体内发现的。1997年, Medzhitov等首次在哺乳动物体内发现了Toll样受体, 即Toll样受体4 (TLR4)。目前在哺乳动物体内至少发现了13个TLR家族成员 (TLR1~13)。早期, 人们对TLR4的研究多是关注其免疫方面的作用, 近年来有研究发现, 细胞损伤后释放的内源性“危险信号”分子如高迁移率组蛋白1 (high mobility group box-1, HMGB1) 能激活TLR4, 诱发一系列炎症因子的表达, 导致炎症和神经病理性痛的发生和持续^[1,3], TLR4有望成为疼痛治疗的

新的靶点。本文将就TLR4在神经病理性痛中的作用进行最新研究进行阐述。

1 TLR4的生物学结构

TLR4作为首个被发现的哺乳动物体内的Toll样蛋白, 是TLR家族最重要的蛋白之一, 1998年, Poltorak等^[4]最先公布其生物学结构和作用。TLR4属于I型跨膜受体蛋白, 包括胞外区、跨膜区和胞

收稿日期: 2013-08-01; 修回日期: 2013-09-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171072)

*通信作者: E-mail: yhong@fjnu.edu.cn

内区3个功能部分。和TLRs家族的其他成员一样, TLR4是由富含亮氨酸的重复序列(leucine rich repeats, LRRs)和白细胞介素-1受体(Toll-interleukin 1 receptor, TIR)结构域组成。LRRs位于胞外区, 约为18~31个亮氨酸, 调控识别病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)^[5], TIR位于胞内区, 由Toll同源结构域(Toll homology domain, TH domain)和C端组成, 约含160个氨基酸, 对胞内的信号转导有重要作用。TIR包含三个重要结构域(Box1、Box2、Box3), 其中Box1是TIR结构域特征序列; Box2可能与下游元件或与另一TLR二聚化形成回路, 大多数Box2序列含保守的脯氨酸, 一旦突变成组氨酸, 会使蛋白质无法成为信号分子; Box3的功能还不清楚。TIR的结构表现出保守性, 即TLR蛋白家族内不同成员的氨基酸序列高度相似。这种相对保守有利于满足维持信号转导活性的需要。而TLR4胞外区结构高度变异, 能与不同的配体分子结合^[6]。

2 TLR4生物学功能及作用依赖相关分子

TLR4在介导免疫应答中有相当重要的作用。TLR4是脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的受体, 是胶质细胞应答LPS的关键因子^[7-8]。LPS刺激TLR4后产生一系列级联反应, 激活细胞核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)、促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)等, 诱导炎症因子的释放。除介导LPS的信号转导外, TLR4还可以识别其他一些革兰氏阴性菌类的病原分子, 如热休克蛋白60(heat shock proteins 60, HSP60)等^[9]。TLR4对另外一些内源性分子如纤维蛋白原、葡萄糖醛酸也有很高的亲和性。

TLR4与配体结合时, 受体二聚化, 构象发生改变, 相应的配体通过TIR结构域与TLR4结合, 包括髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、MyD88衔接样蛋白(MyD88 adaptor-like, MAL)、TIR结构域接头蛋白(TIR-domain-containing adaptor protein, TIRAP)、Toll受体相关的干扰素活化剂(Toll-receptor-associated activator of interferon, TRIF)、TRIF相关衔接分子(TRIF-related adaptor molecule, TRAM)等^[10]。此外, 为了确保TLR识别配体产生信号, 还需要某些衔接蛋白和共受体参与, 比如TLR4重要的衔接蛋白髓样分化因子2(myeloid differentiation factor 2, MD-2)。TLR4-MD-2复合物以及共受体CD14在LPS-TLR4介导的信号通路中

发挥重要作用^[11-13]。不同的细胞类型, 不同的TLR4复合物结合不同的共受体, 诱导出不同的炎症因子信号肽, 促使疼痛信号传递^[14]。

3 TLR4参与神经病理性痛的可能机制

3.1 TLR4参与调控神经病理性疼痛的效应细胞及分子

近年研究发现, TLR蛋白引起的中枢免疫信号通路参与形成许多中枢神经系统病变, 包括疼痛的形成。Raghavendra等^[15]发现足底注射CFA引起的炎症模型中, TLR4转录表达上调, 这种上调发生迅速且持续时间长。在注射CFA后4h至术后第14d, 中枢神经系统很多部位, 如腰段脊髓、脑干和前脑等处的TLR4转录表达都增加。Tanga等^[16]发现损伤大鼠L5神经后, 脊髓小胶质细胞中TLR4的表达会大量上调。鞘内注射TLR4抑制性寡核苷酸, 可以降低脊髓胶质细胞标记物和促炎因子的表达, 抑制神经损伤引起的痛觉超敏, 表明TLR4的表达与神经损伤诱发的痛觉过敏有关。在TLR4基因敲除和基因突变小鼠中, L5神经切断不再能引起热痛敏和触诱发痛。该研究首次证实了小胶质细胞TLR4在神经病理性痛形成中的作用。

神经系统中的TLR4分布极其广泛。在外周, 初级感觉神经元如背根神经节和三叉神经节神经元大量表达TLR4^[5,10]; 在中枢胶质细胞尤其是小胶质细胞是表达TLR4的主要场所^[17], 也有研究报导称TLR4同样表达于中枢神经系统中的其他细胞如星型胶质、神经元和血管内皮细胞^[18]。TLR4参与神经病理性痛的调控依赖细胞和一系列因子的作用。脊髓内的TLR4引起痛觉过敏可能是通过在免疫活性细胞如胶质细胞产生的^[10]。Liu等^[5]认为组织损伤和神经损伤后, TLR4不仅激活小胶质细胞也激活星型胶质细胞, 诱导脊髓水平释放炎症因子, 从而调控病理性痛的发生和维持。研究发现TLR4信号通路能引发神经系统促炎细胞因子(IL-1 β 、TNF- α 等)的放大、协同及级联效应, 在中枢神经系统小胶质细胞的激活过程中发挥重要的作用, 主要是通过小胶质调控神经病理性痛^[9]。研究表明机体损伤时, TLR4识别LPS或内源性伤害刺激, 转换成中枢免疫信号, 通过一系列信号传递, 引起中枢神经元和其他免疫细胞尤其是胶质细胞的应答。被激活的胶质细胞会引起p38MAPK、JNK等信号通路的激活, 促使NF- κ B进入细胞核, 诱导mRNA的转录及表达, 进而促进胶质细胞分泌释放神经活

性物质及一系列促炎因子，这些释放的物质又能进一步激活附近的神经元和胶质细胞，调制神经免疫，诱发神经病理性痛^[10]。

3.2 与神经病理性痛相关的TLR4信号通路

TLR4 调控神经病理性痛的信号传递通路根据与 TLR4 结合的受体是否依赖于 MyD88 蛋白，分为 MyD88 依赖通路和 MyD88 非依赖通路即 TRIF 依赖信号通路两种。这几年不少的人在研究 TLR4 作用的上下游因子，试图找出与神经病理性痛相关的重要调控因子，完善其信号通路。Kawai 和 Akira^[20-21] 整理出的信号通路图显示 (如图 1 所示)，TLR4 通过 TIR-TIR 结构域分别连接 TIRAP/Mal 及 TRAM，分别激活 MyD88 依赖信号通路和 TRIF 依赖信号通路。在 MyD88 依赖信号通路中，MyD88 与配体白细胞介素 -1 受体相关激酶 4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4, IRAK4) 和肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6) 相结合，TRAF6

则激活转化生长因子 β 激活性激酶 TAK1 (transforming growth factor-β-activated protein kinase 1)/TAB1/TAB2/TAB3 复合物使其泛素化，泛素化了的 TAK1 复合物激活 IKK，催化激活 NF-κB 抑制剂 IκB(inhibitor of NF-κB)，IκB 被胞内蛋白酶降解后，NF-κB 激活并转运到核内，调控炎症因子和 I 型干扰素的编码；TAK1 同时激活 MAPK 信号通路，使其磷酸化并活化激动蛋白 -1 (activating protein-1, AP-1)，NF-κB 和 AP-1 的激活最终引起炎症因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 释放；TLR4 也可通过 TRAM 激活 TRIF，激活 TBK1 (TANK-binding kinase)/IKKi 复合物，TBK1/IKKi 复合物介导干扰素调节因子 IRF3 (interferon regulatory factor 3) 磷酸化，活化的 IRF3 二聚化，转运进入细胞核与 DNA 结合。TRIF 还能通过激活 TRAF6 和受体相互作用蛋白 RIP1 (receptor interacting protein 1) 介导 NF-κB 活化。活化的 IRF3、NF-κB 和 AP-1 是诱导 I 型干扰素，尤其是 IFNβ 的基本要求。另研究发现，TAK1 复合

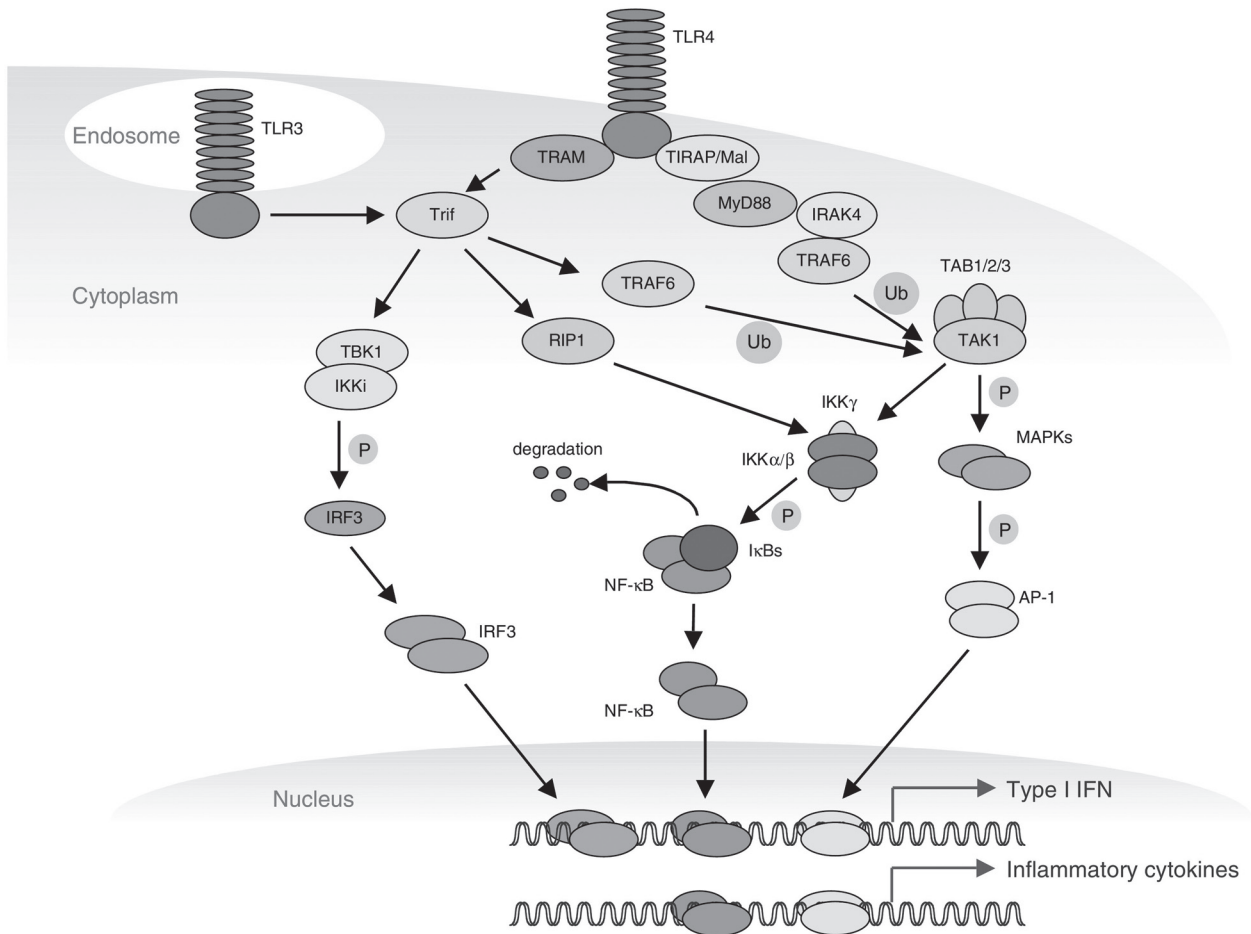


图1 TLR4信号转导通路示意图^[21]

物可能通过磷酸化丝裂原活化蛋白激酶激酶 3/6 (mitogen-activated protein kinase kinase 3/6, MKK3/6) 激活 p38/MAPK ; 或通过磷酸化 MKK4 激活氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) ; 或同时激活 IKK 复合物, 作用于 TPL2, 通过磷酸化 MKK1/2 激活细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK), 这三者可活化 AP-1 的亚单位 c-Fos 和 Jun, 与核内的其他因子发生反应^[22]。

TLR4 选择下游信号衔接子和通路的标准还不清楚, MyD88 依赖的通路和 TRIF 依赖的通路发挥作用的条件和时间仍是研究的重要课题。为了发挥最大的炎症应答, TLR4 被认为能同时起始这两条信号通路^[20]。TLR4 通过这两条信号通路参与神经病理性痛的发生和发展, 抑制 TLR4 的表达或阻断其下游信号通路中的节点可抑制疼痛的发生^[23-24]。有研究发现 TLR4 介导的疼痛在不同性别的动物中产生的效果不同, Sorge 等^[25]发现 LPS 促进 TLR4 的表达产生的痛觉过敏仅发生在雄性小鼠上, 因此还需要更充分的研究来确定 TLR4 在神经病理性痛中的作用。

4 小结

近十年来的研究证实 TLR4 在神经病理性痛的发生和发展中有重要作用。不少研究者通过阻断或抑制 TLR4 信号通路上各个节点, 观察其对神经病理性痛的影响, 以期能找到新的药物作用靶点。如 Bettoni 等^[23]腹腔注射 TLR4 抑制剂 FP-1, 可有效降低小鼠体内神经损伤引起的疼痛; 国内的 Liu 等^[24]研究发现 TLR4 诱导胶质细胞合成促炎因子可能与 p38/MAPK 信号通路有关, 鞘内注射 p38/MAPK 的抑制剂或其他促炎因子的拮抗剂, 能明显减缓 TLR4 依赖的神经病理性痛。由此可见, 靶向抑制 TLR4 及其下游的信号通路的药物可以缓解神经病理性痛。因此, 对 TLR4 的分子机理及其下游的信号通路的阐明, 有助于进一步揭露神经病理性痛发生和发展过程, 为治疗疼痛提供新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Zheng WW, Zheng XX, Liu S, et al. TNF α and IL-1 β are mediated by both TLR4 and Nod1 pathways in the cultured HAPI cells stimulated by LPS. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(4): 762-7
- [2] 阳红艳, 胡兴国, 曾因明. 脊髓 Toll样受体 4 与神经病理性疼痛. *实用疼痛学杂志*, 2012, 8 (1): 55-60
- [3] Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, et al. HMGB1: Endogenous danger signaling. *Mol Med*, 2008, 14(7-8): 476-84
- [4] Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10 ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 1998, 282(5396): 2085-8
- [5] Liu T, Gao YJ, Ji RR. Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch. *Neurosci Bull*, 2012, 28(2): 131-44
- [6] Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, et al. Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med*, 2007, 39(4): 421-38
- [7] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*, 1999, 162 (7): 3749-52
- [8] Qin L, Li G, Qian X, et al. Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *Glia*, 2005, 52(1): 78-84
- [9] Ohashi K, Burkart V, Flohe S, et al. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol*, 2000, 164(2): 558-61
- [10] Nicotra L, Loram LC, Watkins LR, et al. Toll-like receptors in chronic pain. *Exp Neurol*, 2012, 234(2): 316-29
- [11] Cao L, Tanga FY, Deleo JA. The contributing role of CD14 in toll-like receptor 4 dependent neuropathic pain. *Neuroscience*, 2009, 158(2): 896-903
- [12] Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*, 2002, 3(7): 667-72
- [13] Wang X, Grace PM, Pham MN, et al. Rifampin inhibits Toll-like receptor 4 signaling by targeting myeloid differentiation protein 2 and attenuates neuropathic pain. *FASEB J*, 2013, 27(7): 2713-22
- [14] Acosta C, Davies A. Bacterial lipopolysaccharide regulates nociceptin expression in sensory neurons. *Neurosci Res*, 2008, 86(5): 1077-86
- [15] Raghavendra V, Tanga FY, Deleo JA. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur J Neurosci*, 2004, 20(2): 467-73
- [16] Tanga FY, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(16): 5856-61
- [17] Lehnardt S, Massillon L, Follett P, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8514-9
- [18] Jou I, Lee JH, Park SY, et al. Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia. *Am J Pathol*, 2006, 168(5): 1619-30
- [19] Buchanan MM, Hutchinson M, Watkins LR, et al. Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *J Neurochem*, 2010, 114(1): 13-27
- [20] Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*,

- 2007(1), 19: 24-32
- [21] Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*, 2006,13(5): 816-25
- [22] Carty M, Bowie AG. Evaluating the role of Toll-like receptors in diseases of the central nervous system. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(7): 825-37
- [23] Bettoni I, Comelli F, Rossini C, et al. Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice. *Glia*, 2008, 56(12): 1312-9
- [24] Liu S, Yang J, Wang L, et al. Tibia tumor- induced cancer pain involves spinal p38 mitogen-activated protein kinase activation via TLR4-dependent mechanisms. *Brain Res*, 2010, 1346: 213-23
- [25] Sorge RE, Lacroix-Fralish ML, Tuttle AH, et al. Spinal cord toll-like receptor4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice. *J Neurosci*, 2011, 31(43): 15450-4