

综述

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2022.04.002

Toll样受体9在呼吸系统疾病中的作用机制研究进展

燕江雪 曹囡囡 丁霞 倪倩

【摘要】 Toll样受体9 (TLR9) 是TLR家族中的一员, 在机体天然免疫和适应性免疫活化中发挥关键作用。TLR9与哮喘、肺癌、肺炎等多种常见呼吸系统疾病有密切关联, 影响疾病的转归与预后。该文结合近年相关研究, 综述TLR9在呼吸系统疾病中的作用及其相关机制。

【关键词】 Toll样受体9; 哮喘; 肺癌; 肺炎

Research progress on the mechanism of Toll-like receptor 9 in respiratory diseases Yan Jiangxue, Cao Nannan, Ding Xia, Ni Qian. Department of Pediatric Respiration, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China

Corresponding author, Ni Qian, E-mail: natelieniqian@yeah.net

【Abstract】 Toll-like receptor 9 (TLR9) is a member of the TLR family, which plays a key role in the activation of innate and adaptive immunity. TLR9 is closely associated with various common respiratory diseases, such as asthma, lung cancer and pneumonia, and affects clinical outcome and prognosis. In this article, the roles and related mechanisms of TLR9 in respiratory diseases were reviewed based on relevant studies in recent years.

【Key words】 Toll-like receptor 9; Asthma; Lung cancer; Pneumonia

Toll样受体 (TLR) 是一类模式识别受体, 与配体结合后, 启动胞内免疫信号蛋白的级联反应、激活免疫应答信号通路, 在激活宿主天然免疫和适应性免疫反应、增强免疫防御的过程中发挥关键作用。人类TLR共包含10个功能性受体 (TLR1~TLR10), TLR9可在识别配体未甲基化的CpG二核苷酸后, 启动下游免疫信号通路, 激活免疫反应, 从而在呼吸系统疾病中发挥重要作用^[1,4]。本文就TLR9在呼吸系统常见疾病中的作用及其机制进行综述。

一、TLR9

1. TLR9在细胞内的运输途径及信号通路

TLR9位于静息细胞的内质网, 需要内体穿梭以启动信号转导。不协调的93同系物B1 (UNC93B1) 是内质网驻留蛋白, 可调控TLR9包装为外壳蛋白复合物II (COP II) 囊泡, 从而使TLR9转运至高尔基体。静息状态下, TLR9与UNC93B1共同定位于内质网, TLR9通过COP II囊泡, 沿分泌途径到达高尔基体、质膜; 而TLR9

可与质膜上的激活蛋白2 (AP-2) 以网格蛋白依赖的方式内吞进入内体溶酶体系统, 在内体酸化后, 组织蛋白酶和肽链内切酶水解TLR9。同时, TLR9的配体CpG也以网格蛋白依赖的方式内吞后进入内体溶酶体系统。当TLR9及其配体进入内体溶酶体系统后, 启动信号转导^[5]。

TLR9信号转导通路募集的参与分子取决于细胞类型。在巨噬细胞、浆细胞样树突状细胞 (pDC) 和经典DC中, 活化的TLR9通过募集髓样分化因子88 (MyD88), 激活IL-1受体相关激酶4 (IRAK4)、IRAK1和IRAK2等信号分子, 继而激活核因子- κ B (NF- κ B) 的信号通路, 合成促炎细胞因子, 如TNF- α 、IL-6和IL-12等^[1,5]。但在pDC上, TLR9主要启动I型IFN (IFN-I) 合成途径, MyD88通过引导IFN调节因子7 (IRF7) 向细胞核易位, 进而促进细胞合成IFN-I^[2,3,5]。

2. TLR9的配体

未甲基化的CpG二核苷酸是TLR9的配体, 存在于天然的细菌、病毒及线粒体的DNA中。未甲基化的CpG二核苷酸激活TLR9及下游信号,

基金项目: 甘肃省自然科学基金 (20JR10RA746); 兰州大学第二医院“萃英科技创新”计划项目 (CY-2020-MS13); 兰州市科技发展指导性计划项目 (2020-ZD-98)

作者单位: 730030 兰州, 兰州大学第二医院小儿呼吸科

通信作者, 倪倩, E-mail: natelieniqian@yeah.net

可诱导强烈的1型辅助性T淋巴细胞(Th1)为主的免疫反应。Th1产生细胞因子如IFN- γ 、IL-12等,继续活化自然杀伤(NK)细胞、增强CD8⁺T淋巴细胞的免疫应答。同时,这一级联免疫反应可抑制Th2介导的免疫反应,减少细胞因子如IL-4、IL-5等的生成^[67]。CpG寡脱氧核苷酸(CpG ODN)是人工合成的含有非甲基化CpG的ODN,有学者发现CpG ODN可通过TLR9/MyD88信号通路促进IL-10等产生,从而抑制过敏性气道炎症反应。因此,TLR9的配体可作为变应性哮喘中病理性Th2免疫应答反应的调节剂^[6]。另外,CpG ODN联合免疫靶点阻断疗法已用于肿瘤免疫治疗的研究^[8]。

二、TLR9与呼吸系统疾病

研究表明,TLR9与多种呼吸系统疾病,如哮喘、肺癌和肺炎等疾病发生发展有密切关联,并影响疾病的转归与预后^[2,6,89]。

1. TLR9与哮喘

哮喘是慢性气道免疫炎症性疾病,其病理机制主要为:Th2生成的细胞因子(如IL-4、IL-5、IL-9和IL-13)增多,Th1生成的细胞因子(IL-2)减少,B淋巴细胞产生的IgE增多,募集肥大细胞、嗜酸性粒细胞等,促进哮喘的气道炎症^[101]。

TLR9/IL-2轴通过抑制IL-17A的过度生成而加重哮喘。IL-2是Th17生成IL-17A的负调控因子。在屋尘螨诱导的过敏性哮喘动物模型中,TLR9缺失小鼠与野生型(WT)小鼠相比,嗜酸性粒细胞数量减少,气道高反应性降低;同时Th2细胞因子IL-4、IL-5和IL-13的产生受到抑制,Th1生成的IL-2减少,导致Th17生成的IL-17A增多,而过量的IL-17A可抑制过敏性气道炎症反应,提示TLR9/IL-2轴通过抑制IL-17A的过量产生,从而促进气道高反应性和气道炎症。另外,NaR9是TLR9抑制抗体,可以抑制屋尘螨诱导的气道高反应性和Th2型炎症反应;使用NaR9阻断TLR9,IL-17A的生成增多,这与TLR9缺失小鼠表现类似,结合以上研究结果,证明在屋尘螨诱导的过敏性哮喘中,NaR9通过抑制TLR9/IL-2轴,促进IL-17A的过量生成,从而抑制过敏性哮喘的炎症反应^[12]。

c-Jun氨基末端激酶(JNK)/TLR9信号通路通过抑制褪黑素生物合成,介导过敏性气道炎症。SP600125是JNK的特异性抑制剂,可减轻卵清蛋白(OVA)诱导的WT小鼠过敏性气道炎症。有

学者发现,由OVA诱导构建的过敏性气道疾病动物模型中,TLR9和磷酸化JNK的表达水平明显升高。TLR9缺失可有效抑制气道炎症,使肺部炎症细胞的募集和黏液分泌明显减少,血清中特异性的IgE表达水平降低,支气管肺泡灌洗液内的炎症因子,如IL-4、IL-13及IFN- γ 表达水平明显减少。TLR9缺失对JNK的磷酸化表达水平没有影响,但通过SP600125抑制JNK后TLR9的表达水平明显降低,提示JNK作为TLR9信号通路的上游分子,参与诱导过敏性气道炎症^[13]。褪黑素属于胺类激素,具有抗炎和免疫调节功能,由色氨酸合成,其合成途径涉及2种关键酶,分别是N-乙酰基转移酶和羟基吲哚-氧-甲基转移酶(HIOMT)。研究表明,哮喘患者的唾液或血清褪黑素表达水平明显低于健康对照组,外源性和内源性褪黑素均可抑制气道炎症。当OVA刺激小鼠后,肺组织中HIOMT蛋白表达减少,在支气管肺泡灌洗液和血清中,褪黑素的表达水平降低;但在TLR9缺失后,这种作用消除。SP600125升高了OVA诱导小鼠模型中HIOMT蛋白表达和褪黑素表达水平,但这种影响在TLR9缺失后消除。以上结果表明OVA刺激可激活JNK/TLR9信号通路,该信号通路可作为负信号调节HIOMT蛋白的表达和褪黑素的产生,从而诱导过敏性气道炎症反应^[13-14]。也有研究报道,MyD88缺失小鼠在OVA诱导下产生气道炎症,提示OVA通过激活非MyD88依赖性的TLR9信号通路,导致气道炎症^[13]。

但在多种OVA诱导的过敏性疾病的动物模型中,CpG ODN可抑制过敏性气道炎症反应,这是由于纯化的CpG ODN可通过TLR9/MyD88信号通路,促进IL-10等产生,从而改善气道炎症^[14-15]。目前TLR9作为过敏性气道疾病新的治疗靶点仍存在争议,因此需要更多的研究进一步探索TLR9在哮喘等过敏性疾病中的机制。

2. TLR9与肺癌

肺癌是人体常见肿瘤之一。炎症是肿瘤的标志性反应之一,在肿瘤微环境中存在的TLR在识别特异性配体后激活,并诱导宿主产生适应性免疫反应。TLR就像一把双刃剑,一方面识别肿瘤特异性抗原并激活天然免疫反应,另一方面通过诱导持续的适应性反应来促进潜伏的慢性炎症,从而促进肿瘤的发生发展。目前已发现TLR9在肺癌进展中发挥了重要作用,但其相关机制有待进一步阐明^[2]。

有研究者通过体外实验发现肺腺癌细胞中激活的TLR9可诱导神经酰胺酶活化,导致1磷酸鞘氨醇(S1P)形成甚至过表达,从而介导NF- κ B通路释放TNF- α 等,表明TLR9/S1P轴依赖性的炎症信号通路通过诱导有利于S1P的神经酰胺/S1P的失衡,在炎性呼吸疾病的恶化中发挥重要作用^[16]。

程序性死亡受体1(PD-1)及其配体作为靶点的免疫疗法,是临床上针对非小细胞肺癌等恶性肿瘤的一个重要的治疗方案。但当抗PD-1抗体单独用于治疗非小细胞肺癌时,仅对约20%患者有效,这表明需要进一步联合治疗^[9,17]。Perry等^[4]在肺腺癌和肺鳞癌的小鼠原位癌转移模型中,以非润湿模板粒子复制技术生产的纳米颗粒作为载体,经口气管滴注,将CpG递送到小鼠肺脏中,明显促进了肿瘤的消退,并限制了与可溶性CpG相关的全身毒性反应,证明局部CpG可以协调天然免疫和获得性免疫反应的活化,加强机体抗肿瘤免疫反应。研究表明,吸入雾化TLR9激动剂联合抗PD-1治疗可增强机体免疫细胞对肺内、肺外肿瘤的杀伤作用,这与肿瘤微环境中功能性效应CD8⁺T淋巴细胞的增多有关^[9]。IMO-2055是一种CpG ODN,属于TLR9激动剂,目前已在I期和II期试验中证实其可联合靶向免疫药物治疗肺癌。一项晚期非小细胞肺癌的I期临床试验证明,IMO-2055与厄洛替尼和贝伐珠单抗联合治疗具有良好的耐受性和抗肿瘤活性^[8]。以上研究提示,TLR9能否成为肺癌免疫治疗的新靶点仍需进一步的探索研究。

3. TLR9与肺炎

3.1 TLR9与非感染性肺炎

TLR9可加重矽肺小鼠的肺部炎症和纤维化的程度。在矽肺动物模型中,WT小鼠暴露于二氧化硅(SiO₂)颗粒后出现肺部炎症、形成肉芽肿和纤维化。暴露于SiO₂颗粒的TLR9缺失小鼠的肺部炎症和纤维化程度相对较低,且肺功能得到改善。接触SiO₂颗粒会导致线粒体损伤、DNA释放和线粒体自噬,释放的游离线粒体DNA(mtDNA)可激活TLR9,进而加重肺部炎症反应。以上证据表明,TLR9与矽肺的疾病进展密切相关^[18]。

游离mtDNA是线粒体损伤相关分子模式(DAMP)的主要成分,在病理状态下释放增加,并参与各种炎症性疾病的发生发展。游离

mtDNA含有大量未甲基化的CpG二核苷酸,通过TLR9激发促炎信号,导致严重的炎症反应^[7,19]。红细胞内的TLR9可清除游离mtDNA,从而减轻肺损伤^[19]。Hotz等^[19]通过研究发现红细胞可表达TLR9,DNA与红细胞的结合是由TLR9介导的,红细胞可从循环中清除CpG-DNA,红细胞的DNA清除功能缺陷可增强CpG-DNA介导的肺损伤,表明红细胞上TLR9介导的游离mtDNA清除对减轻肺损伤是必要的。

3.2 TLR9与感染性肺炎

TLR9可增强流行性感冒(流感)患者继发耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染的易感性。流感病毒属于单链RNA病毒。人流感病毒分为甲型、乙型及丙型。流感可引起季节性流行,并可继发细菌性肺炎,如肺炎链球菌肺炎和金黄色葡萄球菌肺炎,增加流感患者的病死率^[20,21]。流感病毒感染可诱导IFN-I介导的免疫信号,抑制中性粒细胞的募集及IL-17的免疫反应,从而导致宿主继发细菌感染的易感性增加。在流感病毒感染继发细菌感染后,机体代偿性募集中性粒细胞,提高宿主对细菌感染的抵抗力^[20]。甲型流感病毒(IAV)感染可增加人单核细胞和DC中TLR9的表达水平。与WT小鼠相比,TLR9缺失小鼠对IAV或MRSA感染的易感性未见差异;但在IAV继发MRSA感染后,TLR9缺失小鼠存活率提高,肺部细菌清除能力增强,而病毒载量未见差异。另外,在IAV继发肺炎链球菌感染后,细菌清除作用没有改善。以上结果表明,TLR9可增强流感继发MRSA的易感性,但对继发性肺炎链球菌肺炎的易感性无影响^[20,21]。

在鲍曼不动杆菌肺炎的小鼠模型中,TLR9缺失小鼠的肺部细菌负荷明显增加,肺外细菌播散增多,肺损伤加重,证明TLR9介导的信号通路对于宿主防御鲍曼不动杆菌具有重要意义^[22]。在肺炎克雷伯菌和肺炎链球菌感染的动物模型中,TLR9缺失小鼠的病死率升高,细菌负荷增多^[23,24]。与WT小鼠相比,TLR9缺失小鼠更易感染隐球菌,且IFN- γ 和IL-17的生成减少,感染后的肺损伤加重,病死率升高,证明在宿主抵御隐球菌感染的过程中TLR9发挥了重要作用^[25]。以上研究均表明,TLR9与肺部炎症的发生发展相关,但TLR9能否作为治疗靶点尚不能下定论,还需要更深入的研究探讨。

三、结 论

TLR9 在免疫细胞和非免疫细胞的内体膜上均有大量表达, 其与配体结合活化后, 通过激活天然和适应性免疫系统, 在哮喘、肺癌和肺炎等呼吸系统疾病中发挥重要作用。TLR9 的配体有可能是预防及治疗呼吸系统上述疾病的潜在治疗靶点^[12,6,8]。目前需要更多的研究来深入了解 TLR9 与呼吸系统疾病的相关致病机制, 为呼吸系统疾病的治疗开拓新思路。

参 考 文 献

- [1] Zheng C, Chen J, Chu F, et al. Inflammatory role of TLR-MyD88 signaling in multiple sclerosis. *Front Mol Neurosci*, 2020, 12 : 314.
- [2] Arora S, Ahmad S, Irshad R, et al. TLRs in pulmonary diseases. *Life Sci*, 2019, 233 : 116671.
- [3] Negishi H, Taniguchi T, Yanai H. The interferon (IFN) class of cytokines and the IFN regulatory factor (IRF) transcription factor family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10 (11) : a028423.
- [4] Perry J L, Tian S, Sengottuvel N, et al. Pulmonary delivery of nanoparticle-bound toll-like receptor 9 agonist for the treatment of metastatic lung cancer. *ACS Nano*, 2020, 14 (6) : 7200-7215.
- [5] Marongiu L, Gornati L, Artuso I, et al. Below the surface: the inner lives of TLR4 and TLR9. *J Leukoc Biol*, 2019, 106 (1) : 147-160.
- [6] Farrokhi S, Abbasirad N, Movahed A, et al. TLR9-based immunotherapy for the treatment of allergic diseases. *Immunotherapy*, 2017, 9 (4) : 339-346.
- [7] Wu G, Zhu Q, Zeng J, et al. Extracellular mitochondrial DNA promote NLRP3 inflammasome activation and induce acute lung injury through TLR9 and NF- κ B. *J Thorac Dis*, 2019, 11(11) : 4816-4828.
- [8] Keshavarz A, Pourbagheri-Sigaroodi A, Zafari P, et al. Toll-like receptors (TLRs) in cancer; with an extensive focus on TLR agonists and antagonists. *IUBMB Life*, 2021, 73 (1) : 10-25.
- [9] Kell S A, Kachura M A, Renn A, et al. Preclinical development of the TLR9 agonist DV281 as an inhaled aerosolized immunotherapeutic for lung cancer: pharmacological profile in mice, non-human primates, and human primary cells. *Int Immunopharmacol*, 2019, 66 : 296-308.
- [10] 张颖丽, 黄花荣. IL-23/Th17 通路与支气管哮喘的关系. *新医学*, 2018, 49 (10) : 705-709.
- [11] Papaioannou A I, Spathis A, Kostikas K, et al. The role of endosomal toll-like receptors in asthma. *Eur J Pharmacol*, 2017, 808 : 14-20.
- [12] Murakami Y, Ishii T, Nunokawa H, et al. TLR9-IL-2 axis exacerbates allergic asthma by preventing IL-17A hyperproduction. *Sci Rep*, 2020, 10 (1) : 18110.
- [13] Wu H M, Shen Q Y, Fang L, et al. JNK-TLR9 signal pathway mediates allergic airway inflammation through suppressing melatonin biosynthesis. *J Pineal Res*, 2016, 60 (4) : 415-423.
- [14] Wu H M, Xie Q M, Zhao C C, et al. Melatonin biosynthesis restored by CpG oligodeoxynucleotides attenuates allergic airway inflammation via regulating NLRP3 inflammasome. *Life Sci*, 2019, 239 : 117067.
- [15] Zhao C C, Xie Q M, Xu J, et al. TLR9 mediates the activation of NLRP3 inflammasome and oxidative stress in murine allergic airway inflammation. *Mol Immunol*, 2020, 125 : 24-31.
- [16] Terlizzi M, Colarusso C, Ferraro G, et al. Sphingosine-1-phosphate contributes to TLR9-induced TNF- α release in lung tumor cells. *Cell Physiol Biochem*, 2021, 55 (2) : 222-234.
- [17] Gong J, Chehraz-Raffle A, Reddi S, et al. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer*, 2018, 6 (1) : 8.
- [18] Lima B H F, Marques P E, Gomides L F, et al. Converging TLR9 and PI3K gamma signaling induces sterile inflammation and organ damage. *Sci Rep*, 2019, 9 (1) : 19085.
- [19] Hotz M J, Qing D, Shashaty M G S, et al. Red blood cells homeostatically bind mitochondrial DNA through TLR9 to maintain quiescence and to prevent lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 197 (4) : 470-480.
- [20] Sun K, Metzger D W. Influenza and *Staphylococcus aureus* coinfection: TLR9 at play. *Trends Microbiol*, 2019, 27 (5) : 383-384.
- [21] Martínez-Colón G J, Warheit-Niemi H, Gurczynski S J, et al. Influenza-induced immune suppression to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is mediated by TLR9. *PLoS Pathog*, 2019, 15 (1) : e1007560.
- [22] Chen W. Host innate immune responses to *Acinetobacter baumannii* infection. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10 : 486.
- [23] Zhang H, He F, Li P, et al. The role of innate immunity in pulmonary infections. *Biomed Res Int*, 2021, 2021 : 6646071.
- [24] Bengoechea J A, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev*, 2019, 43 (2) : 123-144.
- [25] da Silva-Junior E B, Firmino-Cruz L, Guimarães-de-Oliveira J C, et al. The role of toll-like receptor 9 in a murine model of *Cryptococcus gattii* infection. *Sci Rep*, 2021, 11 (1) : 1407.

(收稿日期: 2022-01-26)

(本文编辑: 林燕薇)