

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240141

· 论 著 ·

基于 TLR4-Ig 融合蛋白探究 TLR4 信号在溃疡性结肠炎中的关键作用

钱珂文¹, 王楚棋², 张淑怡³, 李光耀³, 邹宜章¹, 郑欣亚¹, 艾泓如¹, 傅文燕⁴, 雷长海³, 胡适^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)基础医学院生物医学工程教研室, 上海 200433

2. 新加坡国立大学药理学系, 新加坡 119077

3. 海军军医大学(第二军医大学)基础医学院生物物理学教研室, 上海 200433

4. 上海交通大学医学院附属第九人民医院辅助生殖科, 上海 200011

[摘要] **目的** 探究 Toll 样受体 4 (TLR4) 信号与溃疡性结肠炎 (UC) 发生、发展的关系。**方法** 收集 UC 患者结肠活组织检查样本 ($n=63$), 根据 Matts 组织病理学分级标准分为 1~5 级, 利用免疫组织化学染色检测 TLR4 表达情况。利用 FreeStyle 293 表达系统制备 TLR4-Ig 融合蛋白。体外培养健康者来源的外周血单个核细胞 (PBMC), 在培养基中添加 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖诱导炎症模型, 并加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TLR4-Ig 阻断 TLR4, 检测粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、干扰素 γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 的分泌水平。以葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导小鼠急性结肠炎模型, 分别采用 20 mg/kg TLR4-Ig、40 mg/kg TLR4-Ig、抗生素+40 mg/kg TLR4-Ig 进行干预, 取小鼠结肠组织测量结肠长度并进行组织病理学评估。**结果** UC 患者结肠组织 Matts 分级越高 TLR4 高表达的样本比例越高 ($P<0.001$)。TLR4-Ig 融合蛋白能够以高亲和力结合 TLR4 配体, 阻断 TLR4 信号介导的 PBMC 活化和炎症因子分泌。TLR4-Ig 融合蛋白对 TLR4 信号的阻断加重了 DSS 诱导的小鼠急性结肠炎, 而抗生素处理则对 TLR4 信号阻断造成的小鼠急性结肠炎加重有缓解作用。**结论** TLR4 信号与肠道菌群的信号交流是 UC 发生早期的重要保护机制, TLR4 信号的缺失不利于缓解急性炎症和修复肠黏膜。

[关键词] Toll 样受体 4; 溃疡性结肠炎; 抗体融合蛋白; 免疫组织化学; 葡聚糖硫酸钠

[引用本文] 钱珂文, 王楚棋, 张淑怡, 等. 基于 TLR4-Ig 融合蛋白探究 TLR4 信号在溃疡性结肠炎中的关键作用[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(5): 535-543. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240141.

To study the key role of TLR4 signal in ulcerative colitis using TLR4-Ig fusion protein

QIAN Kewen¹, WANG Chuqi², ZHANG Shuyi³, LI Guangyao³, ZOU Yitan¹, ZHENG Xinya¹, AI Hongru¹, FU Wenyan⁴, LEI Changhai³, HU Shi^{1*}

1. Department of Biomedical Engineering, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmacy, National University of Singapore, Singapore 119077, Singapore

3. Department of Biophysics, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

4. Department of Assisted Reproduction, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between Toll-like receptor 4 (TLR4) signal and the development and progression of ulcerative colitis (UC). **Methods** The colon biopsy samples ($n=63$) were collected from UC patients and were divided into Matts' histological grade 1-5. The TLR4 expression level was detected by immunohistochemistry. TLR4-immunoglobulin (Ig) fusion protein was prepared using FreeStyle 293 expression system. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy individuals were cultured *in vitro*, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lipopolysaccharide was added to induce inflammation, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TLR4-Ig was added to block TLR4. Then the secretion levels of 10 different inflammatory cytokines, including granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interferon γ , interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, and

[收稿日期] 2024-02-28 **[接受日期]** 2024-03-28

[基金项目] 国家自然科学基金(82322055, 82272792, 81903140, 92169115). Supported by National Natural Science Foundation of China (82322055, 82272792, 81903140, 92169115).

[作者简介] 钱珂文, 硕士生. E-mail: 1476794512@qq.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81870925, E-mail: hus@smmu.edu.cn

tumor necrosis factor α , were detected. The acute colitis mouse model was induced by dextran sulfate sodium (DSS), and was intervened with 20 mg/kg TLR4-Ig, 40 mg/kg TLR4-Ig or antibiotics+40 mg/kg TLR4-Ig, respectively. Then the colon length of mice was measured and histopathological evaluation was performed. **Results** The expression level of TLR4 in colon tissues of UC patients was positively correlated with Matts' histological grades ($P < 0.001$). TLR4-Ig fusion protein could bind TLR4 ligands with high affinity, blocking the activation of PBMCs and the secretion of inflammatory cytokines mediated by TLR4 signal. The blocking of TLR4 signal by TLR4-Ig fusion protein aggravated DSS-induced acute colitis in mice, and treatment with antibiotics alleviated the aggravation of the colitis caused by TLR4 signal blocking. **Conclusion** The communication between TLR4 signal and intestinal flora is an important protective mechanism at the early stage of UC. The absence of TLR4 signal is not conducive to relieving acute inflammation and repairing intestinal mucosa.

[**Key words**] Toll-like receptor 4; ulcerative colitis; antibody fusion protein; immunohistochemistry; dextran sulfate sodium

[**Citation**] QIAN K, WANG C, ZHANG S, et al. To study the key role of TLR4 signal in ulcerative colitis using TLR4-Ig fusion protein[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(5): 535-543. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240141.

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性炎症性胃肠道疾病, 临床表现为腹泻、腹痛、黏液脓血便等, 往往反复发作, 病程迁延, 目前仍无法治愈。Toll样受体 (Toll-like receptor, TLR) 4能够识别来自肠道菌群的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), 通过髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 激活 NF- κ B 等炎症信号通路^[1]。TLR4 在正常黏膜原代肠上皮细胞中表达量极低, 而在 UC 患者肠上皮细胞和固有层细胞中表达明显上调^[2-5]。干预 TLR4 信号能够在一定程度上缓解肠道炎症^[6-13]。然而, 相对野生型小鼠, 肠上皮细胞 TLR4 或 MyD88 基因敲除小鼠在葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导下表现出更高的急性结肠炎发病率和死亡率^[14-17]。在肠上皮细胞和多种固有免疫细胞表面表达的 TLR4 是肠道病原体入侵的第一道防线, 是肠道在遗传和环境因素作用下发生损伤时机体维持肠上皮屏障和肠黏膜免疫稳态不可缺少的保护因子^[18]。本研究通过制备 TLR4-Ig 融合蛋白竞争性阻断 TLR4, 验证 TLR4 信号在 UC 发生早期调节肠道固有免疫反应和修复肠黏膜损伤中的关键作用。

1 材料和方法

1.1 UC 患者样本收集和检测 收集 UC 患者结肠活组织检查样本 63 例 (来自 22 例 UC 患者, 年龄 15~66 岁, 平均 35.6 岁), 其中 4 例取自直肠, 7 例取自盲肠, 8 例取自升结肠, 8 例取自横结肠, 9 例取自降结肠, 27 例取自乙状结肠。样本用

4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 后, 脱水, 石蜡包埋, 制成厚 5~6 μ m 的切片。切片进行常规 H-E 染色, 于光学显微镜下观察肠组织炎症细胞浸润情况。按照 Matts 组织病理学分级标准^[19]分为 5 级, 代表不同炎症程度。1 级: 外观正常; 2 级: 黏膜或固有层细胞浸润, 呈圆形或多态形; 3 级: 黏膜、固有层和黏膜下层均有细胞浸润; 4 级: 黏膜、固有层和黏膜下层均有细胞浸润, 存在隐窝脓肿; 5 级: 黏膜溃疡、糜烂或坏死, 部分或全部黏膜层均有细胞浸润。

采用免疫组织化学染色检测 TLR4 的表达。组织切片室温脱蜡和水化, 热修复抗原, 并灭活内源性过氧化物酶和生物素。加入山羊血清进行非特异性封闭, 加入鼠源 TLR4 抗体 (货号 ab22048, 英国 Abcam 公司) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 再用二抗 (HRP 标记山羊抗小鼠 IgG, 上海碧云天生物技术股份有限公司) 室温孵育 10 min, DAB 显色和复染后, 于光学显微镜下观察。根据细胞染色强度, 将无阳性着色 (阴性) 和淡黄色 (弱阳性) 视为 TLR4 低表达, 棕黄色 (阳性) 和棕褐色 (强阳性) 视为 TLR4 高表达。

1.2 TLR4-Ig 融合蛋白的制备及体外中和活性评估 参照既往研究报道的方法^[20]制备 TLR4-Ig 融合蛋白。将编码小鼠 TLR4 细胞外结构域的 DNA 序列与编码小鼠 IgG2a 铰链 CH2-CH3 片段的 DNA 序列相连, 插入 pcDNA3.4 表达载体, 用 FreeStyle 293 表达系统 (美国 Invitrogen 公司) 表达 TLR4-Ig 融合蛋白, 用 A-Sepharose (英国 Abcam 公司) 纯化蛋白。使用紫外分光光度计和 PAGE 测

定蛋白质浓度和纯度。

以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 和实验室前期制备储存的 T 细胞免疫受体 (T cell Ig and ITIM domain, TIGIT)-Ig 融合蛋白作为阴性对照, 参照既往研究报道的方法^[21]将抗鼠 Fc 多克隆抗体固定在 CM5 芯片上, 目标偶联量为 150 响应值 (response unit, RU), 利用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 或 BSA (12.5~200 nmol/L) 捕获 TLR4-Ig 或 TIGIT-Ig。使用 Biacore-T200 (美国 Cytiva 公司) 测定融合蛋白的单价亲和力。

体外培养健康者来源的外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 细胞稳定传代后用于实验。设置空白对照组、LPS 刺激组 (LPS 组) 和 TLR4-Ig 干预组 (LPS+TLR4-Ig 组), 后两组分别向培养基中加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 或 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS+100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TLR4-Ig, 培养 12 h。收集培养基, 使用细胞因子分析仪 Human Cytokine 10-Plex Panel (美国 ThermoScientific 公司) 检测粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ)、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 的分泌水平。

1.3 TLR4-Ig 融合蛋白抗小鼠急性结肠炎作用评估

1.3.1 DSS 诱导小鼠急性结肠炎模型的构建 选用 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 [购自上海吉辉实验动物饲养有限公司, 实验动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2022-0009], 在相对湿度 40%~60%、室温 20~22 $^{\circ}\text{C}$ 的 SPF 级动物房饲养。用小鼠饮用水配制浓度为 3% 的 DSS (分子量 36 000~50 000, 美国 MP Biomedicals 公司) 溶液, 装入小鼠饲养笼的水瓶中, 小鼠通过自由饮水摄入 DSS, 每 2 d 更换新鲜的 3% DSS 溶液。

1.3.2 实验分组和处理 第一阶段实验探索不同浓度 TLR4-Ig 对 DSS 诱导急性结肠炎的影响。将 75 只小鼠随机分为 5 组 ($n=12$), 其中空白组小鼠仅饮普通饮用水; DSS+生理盐水 (normal saline, NS) 组、DSS+IgG 组、DSS+20 mg/kg TLR4-Ig 组、DSS+40 mg/kg TLR4-Ig 组小鼠均饮 3% DSS 溶液, 并分别于实验第 1、3、5、7 天腹腔注射 NS、40 mg/kg 小鼠 IgG、20 mg/kg TLR4-Ig 融合蛋白或 40 mg/kg TLR4-Ig 融合蛋白。所有小鼠均于第 9 天

停止给药及饮水, 并采用颈椎脱臼法处死。

第二阶段实验探索肠道菌群对 DSS 诱导急性结肠炎的影响。将 60 只小鼠随机分为 6 组 ($n=10$)。参照既往报道的方法^[22], 用小鼠饮用水配制含 1 g/L 氨基青霉素、1 g/L 新霉素、0.25 g/L 甲硝唑、0.5 g/L 万古霉素的“抗生素鸡尾酒”(antibiotic cocktail, AC)。AC+DSS+IgG 组、AC+DSS+TLR4-Ig 组小鼠均于 DSS 诱导前连续 4 周饮用 AC。随后, 除空白组小鼠仅饮普通饮用水外, 其余各组均饮 3% DSS 溶液, 并分别于实验第 1、3、5、7 天腹腔注射 NS (DSS+NS 组)、40 mg/kg 小鼠 IgG (DSS+IgG 组、AC+DSS+IgG 组) 或 40 mg/kg TLR4-Ig 融合蛋白 (DSS+TLR4-Ig 组、AC+DSS+TLR4-Ig 组)。所有小鼠均于第 7 天停止给药及饮水, 并采用颈椎脱臼法处死。

1.3.3 体重、疾病活动和生存情况观察 每日固定时间称取小鼠体重, 收集小鼠粪便观察粪便形态, 使用粪便隐血检测试剂盒 (氨基比林法, 北京伊塔生物科技有限公司) 检测粪便隐血情况。根据公式计算疾病活动指数 (disease activity index, DAI)^[19]: $\text{DAI} = (\text{S1} + \text{S2} + \text{S3}) / 3$ 。其中, S1 为体重下降率, <1% 计 0 分, 1%~5% 计 1 分, 6%~10% 计 2 分, 11%~15% 计 3 分, >15% 计 4 分; S2 为粪便形态, 颗粒状计 0 分, 疏松稀软计 2 分, 水样便计 4 分; S3 为便血情况, 粪便隐血阴性计 0 分, 粪便隐血阳性计 2 分, 肉眼可见便血计 4 分。记录小鼠存活情况, 以体重下降率达 30% 作为处死标准。

1.3.4 结肠长度测量和组织病理学检测 处死小鼠后, 取完整结肠组织测量长度。取肛门向上 1 cm 处长约 5 mm 的结肠组织, 用 4% 多聚甲醛溶液固定, 进行石蜡包埋、切片、H-E 染色, 在光学显微镜下观察。根据公式计算病理学评分^[23]: 病理学评分 = $(\text{A1} + \text{A2} + \text{A3}) / 3$ 。其中, A1 为损伤深度, 无损伤计 0 分, 黏膜层损伤计 1 分, 黏膜下层损伤计 2 分, 穿透性损伤计 3 分; A2 为隐窝损伤, 无损伤计 0 分, 1/3 隐窝缺失计 1 分, 2/3 隐窝缺失计 2 分, 仅上皮完整计 3 分, 上皮损伤计 4 分; A3 为损伤面积, <1% 计 0 分, 1%~25% 计 1 分, 26%~50% 计 2 分, 51%~75% 计 3 分, 76%~100% 计 4 分。

1.4 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.0 软件分析实验数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采

用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析; 计数资料以例数和百分数表示, 组间比较采用 Fisher 确切概率法。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 UC 患者肠组织 TLR4 表达水平与炎症程度相关 对 UC 患者结直肠组织样本进行免疫组织化学染色, 63 例样本中有 35 例 (55.6%) 检测到 TLR4 高表达。当肠组织炎症程度较轻时, 肠上皮细胞和间质细胞中 TLR4 低表达 (图 1A); 而当炎症十分严重时, TLR4 表达明显上调 (图 1B)。根据 Matts 组织病理学分级标准分为 5 级, 1~5 级病变样本中 TLR4 高表达比例分别为 0 (0/7)、26.7% (4/15)、62.5% (10/16)、82.4% (14/17)、87.5% (7/8), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。以上结果表明, Matts 组织病理学分级越高 TLR4 高表达的样本比例越高, TLR4 表达水平与肠组织的炎症程度相关。

2.2 TLR4-Ig 融合蛋白对 TLR4 有竞争性阻断作用 选取来源于 2 株不同大肠埃希菌 (*E. coli* O111:B4 和 *E. coli* O128:B12) 的 LPS, 用 Biacore-T200

实验评估 TLR4-Ig 对 LPS 的亲合力, 结果表明 2 种 LPS 和 TLR4-Ig 均能够以高亲和力结合, 而对照 TIGIT-Ig 不与 LPS 结合 (图 2A)。体外培养的 PBMC 在 LPS 刺激下分泌的 GM-CSF、IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平均上调 (均 $P < 0.01$), 在培养基中添加 TLR4-Ig 时 PBMC 的活化和炎症细胞因子的分泌被阻断 (图 2B)。以上结果表明, TLR4-Ig 融合蛋白具有良好的配体中和活性, 能够竞争性阻断细胞表面的 TLR4 激活。

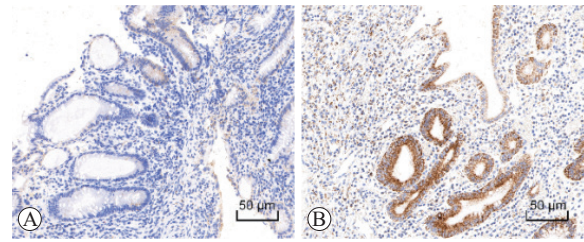


图 1 溃疡性结肠炎患者肠组织 TLR4 免疫组织化学染色
Fig 1 Immunohistochemical staining of TLR4 in colon tissues of patients with ulcerative colitis

A: TLR4 was stained weakly either in epithelium and stroma with mild inflammation (Matts grade 2); B: TLR4 was stained strongly in the epithelial cells with severe inflammation (Matts grade 4). TLR4: Toll-like receptor 4.

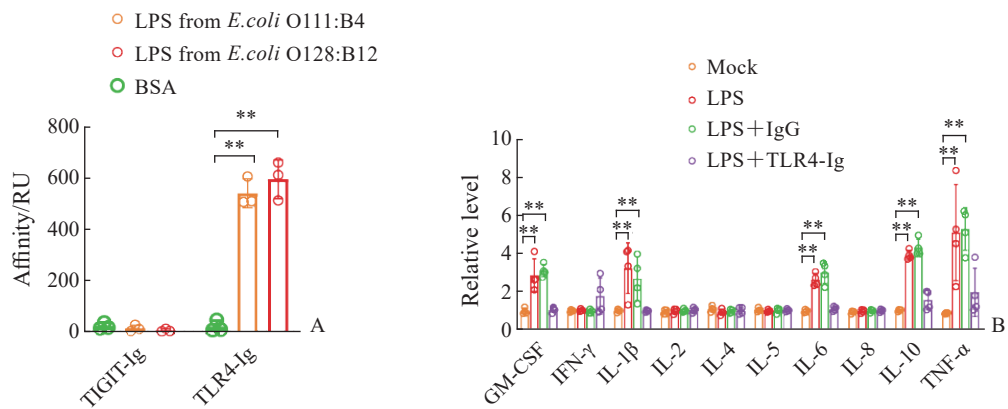


图 2 TLR4-Ig 融合蛋白的体外中和活性

Fig 2 Neutralizing activity *in vitro* of TLR4-Ig fusion protein

A: The affinity of the TLR4-Ig fusion protein detected using Biacore-T200; B: The effect of TLR4-Ig fusion protein on the secretion levels of inflammatory factors of PMBCs when stimulating by LPS. $**P < 0.01$. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. TLR4: Toll-like receptor 4; Ig: Immunoglobulin; LPS: Lipopolysaccharide; TIGIT: T cell Ig and ITIM domain; BSA: Bovine serum albumin; RU: Response unit; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN- γ : Interferon γ ; IL: Interleukin; TNF- α : Tumor necrosis factor α ; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell.

2.3 TLR4-Ig 融合蛋白加重 DSS 诱导的小鼠急性结肠炎 相比于 DSS+NS 和 DSS+40 mg/kg IgG 组, DSS+20 mg/kg TLR4-Ig 和 DSS+40 mg/kg TLR4-Ig 组小鼠体重下降更严重 ($P < 0.01$, 图 3A), DAI 更

高 ($P < 0.01$, 图 3B), 总生存率更低 (图 3C), 结肠组织表现出水肿、充血 (图 3D), 平均结肠长度更短 (图 3E), 结肠组织可见杯状细胞缺失、隐窝肿胀破坏及上皮细胞损伤 (图 3F), 结肠组

织病理学评分更高 ($P < 0.01$, 图 3G)。DSS+20 mg/kg TLR4-Ig 组和 DSS+40 mg/kg TLR4-Ig 组间上述指标均无明显差异, 表明 20 mg/kg TLR4-Ig

融合蛋白即能够有效阻断 TLR4。以上结果初步表明, TLR4-Ig 融合蛋白对 TLR4 信号的阻断加重了 DSS 诱导的小鼠急性结肠炎。

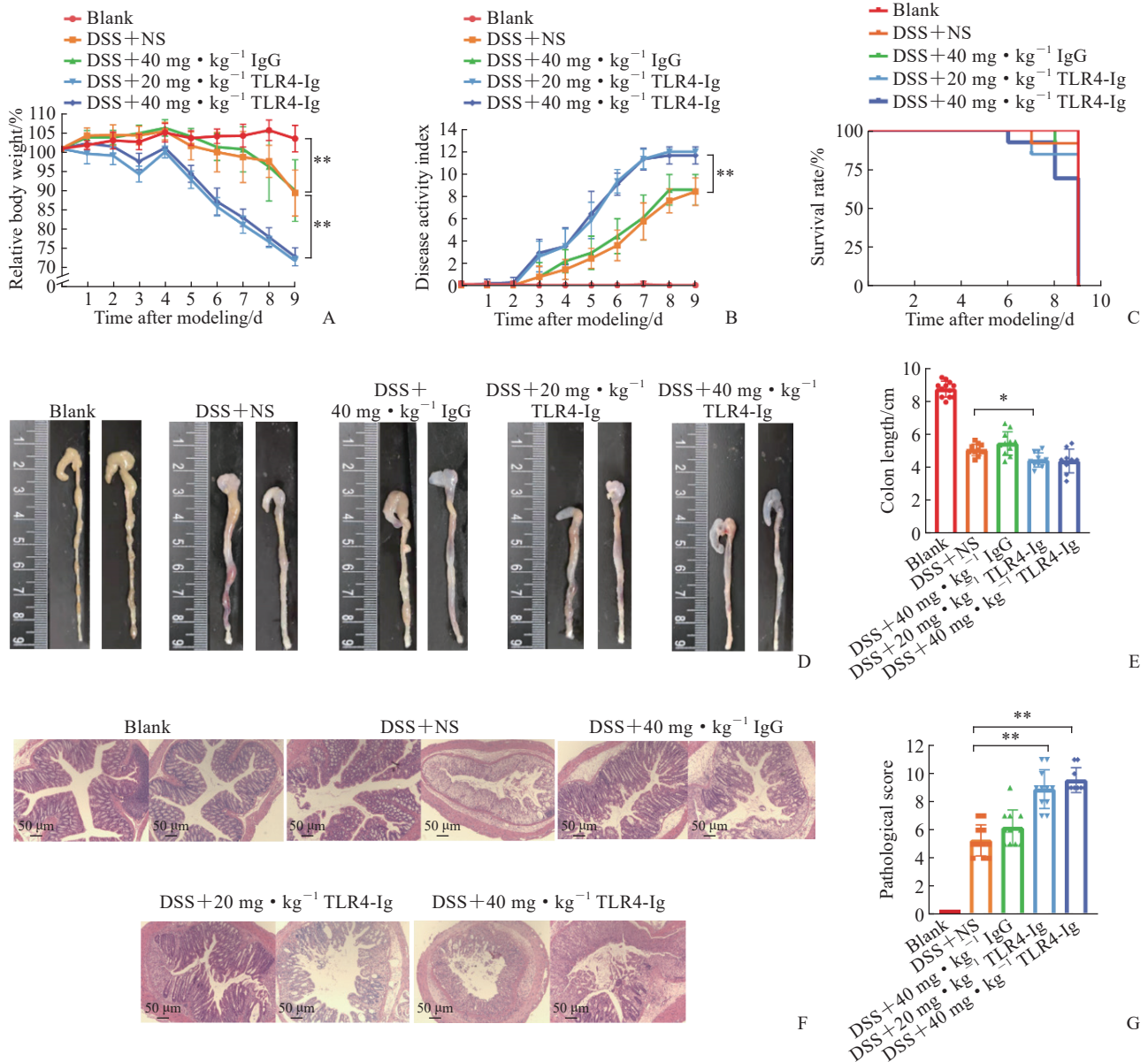


图 3 不同浓度 TLR4-Ig 融合蛋白干预下 DSS 诱导的小鼠急性结肠炎表现

Fig 3 DSS-induced acute colitis in mice after treatment with different concentrations of TLR4-Ig fusion protein

A: Body weight loss analysis; B: Disease activity index analysis; C: Survival rate analysis; D: Colonic morphology; E: Colon length analysis; F: Hematoxylin-eosin staining of colon tissue; G: Colonic pathological score analysis. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. $n = 8-12$, $\bar{x} \pm s$. TLR4: Toll-like receptor 4; Ig: Immunoglobulin; DSS: Dextran sulfate sodium; NS: Normal saline.

2.4 抗生素干预能够缓解 TLR4 信号阻断造成的小鼠急性结肠炎加重 相比于 DSS+TLR4-Ig 组, AC+DSS+TLR4-Ig 组小鼠体重下降较轻 ($P < 0.05$, 图 4A), DAI 更低 ($P < 0.01$, 图 4B), 总体生存率更高 (图 4C), 结肠水肿充血情况有所缓解 (图 4D), 结肠长度更长 ($P < 0.05$, 图 4E),

结肠组织中杯状细胞缺失、隐窝肿胀破坏及上皮细胞损伤情况有所缓解 (图 4F), 结肠组织病理学评分更低 ($P < 0.05$, 图 4G)。以上结果表明, TLR4 信号缺失时肠道菌群的入侵是造成肠道急性炎症的重要因素, 而在急性结肠炎早期给予抗生素能够缓解 DSS 引起的肠上皮损伤。

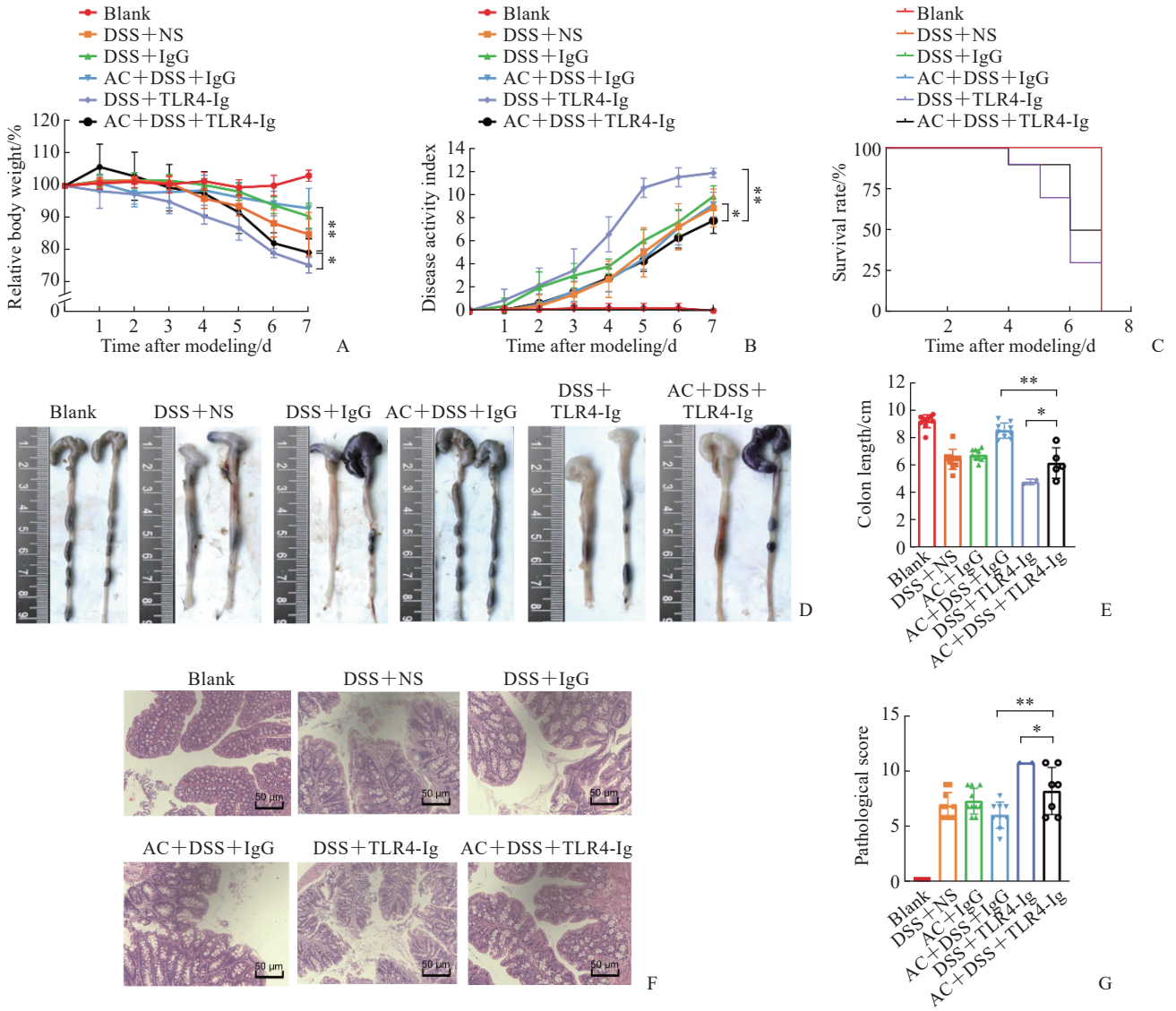


图 4 抗生素和 TLR4-Ig 融合蛋白共同干预下 DSS 诱导的小鼠急性结肠炎表现

Fig 4 DSS-induced acute colitis in mice after combined intervention with antibiotics and TLR4-Ig fusion protein

A: Body weight loss analysis; B: Disease activity index analysis; C: Survival rate analysis; D: Colonic morphology; E: Colon length analysis; F: Hematoxylin-eosin staining of colon tissue; G: Colonic pathological score analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 3-10$, $\bar{x} \pm s$. TLR4: Toll-like receptor 4; Ig: Immunoglobulin; DSS: Dextran sulfate sodium; NS: Normal saline; AC: Antibiotic cocktail.

3 讨论

UC 和克罗恩病 (Crohn disease, CD) 是炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的 2 种类型。一直以来, TLR4 表达水平与 IBD 发生、发展的相关性被广泛研究。TLR4 在正常的肠上皮细胞和固有层细胞中低表达, 而在 UC 和 CD 患者体内表达水平显著升高^[2,24-28]。在小鼠模型中, 肠上皮细胞组成型表达 TLR4 的转基因小鼠更容易发生化学诱导的结肠炎^[29-31]。因此, 大量研究以 TLR4 作为 IBD 的治疗靶点, 通过干预 TLR4 及其信号通路缓解 IBD 相关炎症^[7-9,11-13]。

然而, 研究发现 TLR4 信号缺失对肠道炎症的发生、发展具有完全相反的作用, 且与肠道菌群有关。例如, 靶向敲除肠上皮细胞 *TLR4* 基因的小鼠表现出肠道菌群多样性降低、细菌聚集性改变和炎症基因表达差异^[32], 靶向敲除肠上皮细胞 *MyD88* 基因的小鼠体内具有肠道保护作用的抗菌肽表达下调^[33-34], 当利用这些基因缺陷小鼠构建化学诱导的结肠炎模型时, 其表现出比野生型小鼠更高的易感性和死亡率。

实际上, TLR4 信号通过多种机制在肠黏膜稳态中发挥保护作用。有研究表明, 肠上皮不同部位的 TLR4 发挥不同的生物学功能, 肠上皮基底外侧

区域的TLR4能够识别来自于肠道的LPS等致病物质,引发炎症反应,而顶端膜的TLR4促进免疫耐受,TLR4介导的免疫活化和免疫耐受平衡维持肠黏膜稳态^[35]。TLR4信号通过调控环氧合酶表达^[34,36-37]、维持细胞间紧密连接^[18,38]、调控IgA的合成、增强树突状细胞的抗原呈递功能及介导抗菌肽和凝集素的分泌等机制^[30,39-41]促进肠道损伤修复。此外,TLR4还是多种固有免疫细胞与肠道菌群之间信号交流的重要媒介,TLR4和TLR7/8的协同激活可以诱导未成熟的树突状细胞分化为成熟的树突状细胞,并促进活化T细胞分化为具有记忆细胞功能的CD8⁺T细胞^[42],而在TLR4基因缺失的小鼠体内树突状细胞无法被病原体活化^[43]。总的来说,TLR4信号在IBD发生、发展中起到“双刃剑”作用,一方面TLR4过度激活会导致免疫反应过度活化、肠道炎症反应加重,另一方面TLR4又在肠黏膜修复中发挥重要作用。

在此前的研究中,虽然敲除小鼠的TLR4基因实现了TLR4信号的完全阻断,但不符合临床UC患者的实际情况,此外,也无法确定TLR4信号缺失对免疫系统发育的影响。本研究创新性地利用了TLR4-Ig融合蛋白,其能够在不激活免疫反应的基础上竞争性地阻断TLR4信号,并通过与IgG的Fc段相融合有效延长TLR4的体内半衰期,发挥持续的阻断作用。自1989年有研究者首次将CD4细胞外结构域与人IgG1的Fc结构域相融合构建CD4-Ig融合蛋白并用于HIV感染的治疗^[44]以来,抗体融合蛋白的治疗潜力得到了广泛的探索。Fc结构域能够与吞噬细胞表面的新生儿Fc受体(neonatal Fc receptor, FcRn)结合,避免被体循环快速清除,从而使多种生物活性分子包括蛋白质和多肽药物的半衰期得到有效延长^[45]。目前美国FDA已经批准了13种抗体融合蛋白药物,用于治疗包括癌症、自身免疫病、血液病、急慢性炎症和移植排斥在内的多种疾病^[46]。

本研究分析了UC患者结肠组织样本中TLR4的表达水平,发现TLR4表达量越高结肠组织炎症程度越高,表明TLR4表达上调在UC的发生、发展中发挥重要作用;成功制备了TLR4胞外段和人IgG Fc段相融合的TLR4-Ig重组蛋白,其能够在体外有效阻断LPS诱导的PMBC活化和细胞因子分泌;利用3% DSS溶液构建小鼠急性结肠炎模

型,发现TLR4-Ig融合蛋白给药组小鼠的急性结肠炎严重程度更高,这一结果与另一项利用TLR4特异性单克隆抗体干预TLR4信号的实验结果一致,该研究发现给予小鼠TLR4抗体可导致肠黏膜修复受损^[47]。此外,提前给予小鼠抗生素处理能够有效减缓TLR4-Ig导致的结肠损伤加重。实际上,随着微生物组和代谢组分析技术的发展,已明确肠道微生物亚群能通过TLR4与肠上皮细胞进行信号交流^[48-49],因此,在肠黏膜发生损伤时,肠道菌群中的病原体通过与肠黏膜上皮细胞表面TLR4间的信号交流激活肠黏膜的固有免疫反应,清除病原体并进行损伤组织的快速修复。在本研究中,TLR4-Ig融合蛋白对TLR4的竞争性阻断使DSS诱导的肠黏膜急性损伤更严重,表明TLR4表达上调是肠上皮发生急性损伤时的重要保护机制,TLR4信号在UC发生、发展中起着重要作用。

[参 考 文 献]

- [1] GRIBAR S C, RICHARDSON W M, SODHI C P, et al. No longer an innocent bystander: epithelial Toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation[J]. *Mol Med*, 2008, 14(9/10): 645-659. DOI: 10.2119/2008-00035.Gribar.
- [2] CARIO E, PODOLSKY D K. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(12): 7010-7017. DOI: 10.1128/IAI.68.12.7010-7017.2000.
- [3] BANK S, SKYTT ANDERSEN P, BURISCH J, et al. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *LY96*, *NFKBIA*, *NFKB1*, *TNFA*, *TNFRSF1A*, *IL6R*, *IL10*, *IL23R*, *PTPN22*, and *PPARG* are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98815. DOI: 10.1371/journal.pone.0098815.
- [4] FROLOVA L, DRASTICH P, ROSSMANN P, et al. Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis[J]. *J Histochem Cytochem*, 2008, 56(3): 267-274. DOI: 10.1369/jhc.7a7303.2007.
- [5] SZEBENI B, VERES G, DEZSÖFI A, et al. Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease[J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 151(1): 34-41. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2007.03531.x.
- [6] LIU B, PIAO X, NIU W, et al. *Kuijiyuan* decoction improved intestinal barrier injury of ulcerative colitis by

- affecting TLR4-dependent PI3K/AKT/NF- κ B oxidative and inflammatory signaling and gut microbiota[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1036. DOI: 10.3389/fphar.2020.01036.
- [7] LI C, AI G, WANG Y, et al. Oxyberberine, a novel gut microbiota-mediated metabolite of berberine, possesses superior anti-colitis effect: impact on intestinal epithelial barrier, gut microbiota profile and TLR4-MyD88-NF- κ B pathway[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 152: 104603. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104603.
- [8] CHEN Y, LU Y, PEI C, et al. Monotropine alleviates secondary liver injury in chronic colitis by regulating TLR4/NF- κ B signaling and NLRP3 inflammasome[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 883: 173358. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173358.
- [9] LUO X, YU Z, DENG C, et al. Baicalein ameliorates TNBS-induced colitis by suppressing TLR4/MyD88 signaling cascade and NLRP3 inflammasome activation in mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16374. DOI: 10.1038/s41598-017-12562-6.
- [10] YOUSEFI-MANESH H, DEJBAN P, MUMTAZ F, et al. Risperidone attenuates acetic acid-induced colitis in rats through inhibition of TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42(5): 464-472. DOI: 10.1080/08923973.2020.1808987.
- [11] DEJBAN P, SAHRAEI M, CHAMANARA M, et al. Anti-inflammatory effect of amitriptyline in a rat model of acetic acid-induced colitis: the involvement of the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2021, 35(5): 843-851. DOI: 10.1111/fcp.12642.
- [12] 刘凯丽, 都新新, 张文琴, 等. 过表达miR-31对结肠炎模型小鼠TLR4/NF- κ B信号通路及凋亡蛋白的调控[J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(3): 211-215, 239, 289-191.
- [13] WANG J P, DONG L N, WANG M, et al. MiR-146a regulates the development of ulcerative colitis via mediating the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(5): 2151-2157. DOI: 10.26355/eurrev_201903_17260.
- [14] RAKOFF-NAHOUM S, PAGLINO J, ESLAMI-VARZANEH F, et al. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis[J]. *Cell*, 2004, 118(2): 229-241. DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.002.
- [15] FUKATA M, MICHELSEN K S, ERI R, et al. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 288(5): G1055-G1065. DOI: 10.1152/ajpgi.00328.2004.
- [16] ARAKI A, KANAI T, ISHIKURA T, et al. MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis[J]. *J Gastroenterol*, 2005, 40(1): 16-23. DOI: 10.1007/s00535-004-1492-9.
- [17] BROWN S L, RIEHL T E, WALKER M R, et al. MyD88-dependent positioning of PTGS2-expressing stromal cells maintains colonic epithelial proliferation during injury[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 258-269. DOI: 10.1172/JCI29159.
- [18] ABREU M T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(2): 131-144. DOI: 10.1038/nri2707.
- [19] JEENGAR M K, THUMMURI D, MAGNUSSON M, et al. Uridine ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 3924. DOI: 10.1038/s41598-017-04041-9.
- [20] SHEN X, FU W, WEI Y, et al. TIGIT-Fc promotes antitumor immunity[J]. *Cancer Immunol Res*, 2021, 9(9): 1088-1097. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-20-0986.
- [21] FU W, WANG Y, ZHANG Y, et al. Insights into HER2 signaling from step-by-step optimization of anti-HER2 antibodies[J]. *mAbs*, 2014, 6(4): 978-990. DOI: 10.4161/mabs.28786.
- [22] HERNÁNDEZ-CHIRLAQUE C, ARANDA C J, OCÓN B, et al. Germ-free and antibiotic-treated mice are highly susceptible to epithelial injury in DSS colitis[J]. *J Crohns Colitis*, 2016, 10(11): 1324-1335. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjw096.
- [23] MOSLI M H, FEAGAN B G, SANDBORN W J, et al. Histologic evaluation of ulcerative colitis: a systematic review of disease activity indices[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(3): 564-575. DOI: 10.1097/01.MIB.0000437986.00190.71.
- [24] ABREU M T, ARNOLD E T, THOMAS L S, et al. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(23): 20431-20437. DOI: 10.1074/jbc.M110333200.
- [25] PEDERSEN G, ANDRESEN L, MATTHIESSEN M W, et al. Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium[J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 141(2): 298-306. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2005.02848.x.
- [26] ECKMANN L, NEBELSIEK T, FINGERLE A A, et al. Opposing functions of IKK β during acute and chronic intestinal inflammation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(39): 15058-15063. DOI: 10.1073/pnas.0808216105.
- [27] ABREU M T, VORA P, FAURE E, et al. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide[J]. *J Immunol*, 2001, 167(3): 1609-1616. DOI: 10.4049/jimmunol.167.3.1609.
- [28] OTTE J M, CARIO E, PODOLSKY D K. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells[J].

- Gastroenterology, 2004, 126(4): 1054-1070. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.01.007.
- [29] FUKATA M, SHANG L, SANTAOLALLA R, et al. Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(7): 1464-1473. DOI: 10.1002/ibd.21527.
- [30] SHANG L, FUKATA M, THIRUNARAYANAN N, et al. Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria[J]. *Gastroenterology*, 2008, 135(2): 529-538. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.04.020.
- [31] DHEER R, SANTAOLALLA R, DAVIES J M, et al. Intestinal epithelial Toll-like receptor 4 signaling affects epithelial function and colonic microbiota and promotes a risk for transmissible colitis[J]. *Infect Immun*, 2016, 84(3): 798-810. DOI: 10.1128/IAI.01374-15.
- [32] LU P, SODHI C P, YAMAGUCHI Y, et al. Intestinal epithelial Toll-like receptor 4 prevents metabolic syndrome by regulating interactions between microbes and intestinal epithelial cells in mice[J]. *Mucosal Immunol*, 2018, 11(3): 727-740. DOI: 10.1038/mi.2017.114.
- [33] FRANTZ A L, ROGIER E W, WEBER C R, et al. Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides[J]. *Mucosal Immunol*, 2012, 5(5): 501-512. DOI: 10.1038/mi.2012.23.
- [34] BRANDL K, SUN L, NEPPL C, et al. MyD88 signaling in nonhematopoietic cells protects mice against induced colitis by regulating specific EGF receptor ligands[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(46): 19967-19972. DOI: 10.1073/pnas.1014669107.
- [35] VAMADEVAN A S, FUKATA M, ARNOLD E T, et al. Regulation of Toll-like receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis[J]. *Innate Immun*, 2010, 16(2): 93-103. DOI: 10.1177/1753425909339231.
- [36] STENSON W F, CIORBA M A. Nonmicrobial activation of TLRs controls intestinal growth, wound repair, and radioprotection[J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 617510. DOI: 10.3389/fimmu.2020.617510.
- [37] FUKATA M, CHEN A, KLEPPER A, et al. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: role in proliferation and apoptosis in the intestine[J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(3): 862-877. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.06.017.
- [38] BRUNING E E, COLLIER J K, WARDILL H R, et al. Site-specific contribution of Toll-like receptor 4 to intestinal homeostasis and inflammatory disease[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(2): 877-888. DOI: 10.1002/jcp.29976.
- [39] LU P, SODHI C P, HACKAM D J. Toll-like receptor regulation of intestinal development and inflammation in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis[J]. *Pathophysiology*, 2014, 21(1): 81-93. DOI: 10.1016/j.pathophys.2013.11.007.
- [40] MENG D, ZHU W, SHI H N, et al. Toll-like receptor-4 in human and mouse colonic epithelium is developmentally regulated: a possible role in necrotizing enterocolitis[J]. *Pediatr Res*, 2015, 77(3): 416-424. DOI: 10.1038/pr.2014.207.
- [41] MALDONADO-CONTRERAS A L, MCCORMICK B A. Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity[J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 343(1): 5-12. DOI: 10.1007/s00441-010-1082-5.
- [42] PUFNOCK J S, CIGAL M, ROLCZYNSKI L S, et al. Priming CD8⁺ T cells with dendritic cells matured using TLR4 and TLR7/8 ligands together enhances generation of CD8⁺ T cells retaining CD28[J]. *Blood*, 2011, 117(24): 6542-6551. DOI: 10.1182/blood-2010-11-317966.
- [43] MICHELSEN K S, AICHER A, MOHAUPT M, et al. The role of Toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs)[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(28): 25680-25686. DOI: 10.1074/jbc.m011615200.
- [44] CAPON D J, CHAMOW S M, MORDENTI J, et al. Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy[J]. *Nature*, 1989, 337(6207): 525-531. DOI: 10.1038/337525a0.
- [45] JAFARI R, ZOLBANIN N M, RAFATPANAH H, et al. Fc-fusion proteins in therapy: an updated view[J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24(12): 1228-1237. DOI: 10.2174/0929867324666170113112759.
- [46] LAGASSÉ H A D, HENGEL H, GOLDING B, et al. Fc-fusion drugs have FcγR/C1q binding and signaling properties that may affect their immunogenicity[J]. *AAPS J*, 2019, 21(4): 62. DOI: 10.1208/s12248-019-0336-8.
- [47] UNGARO R, FUKATA M, HSU D, et al. A novel Toll-like receptor 4 antagonist antibody ameliorates inflammation but impairs mucosal healing in murine colitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(6): G1167-G1179. DOI: 10.1152/ajpgi.90496.2008.
- [48] LIU Y, YANG M, TANG L, et al. TLR4 regulates RORγt⁺ regulatory T-cell responses and susceptibility to colon inflammation through interaction with Akkermansia muciniphila[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 98. DOI: 10.1186/s40168-022-01296-x.
- [49] MEI Q X, FU Y, HUANG Z H, et al. Intestinal TLR4 deletion exacerbates acute pancreatitis through gut microbiota dysbiosis and Paneth cells deficiency[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2112882. DOI: 10.1080/19490976.2022.2112882.