

# Toll 样受体在辐射防护中的作用

张超, 蔡建明\*

第二军医大学海军医学系防原医学教研室, 上海 200433

**[摘要]** Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是近年来发现的在宿主抗病原微生物免疫应答中发挥重要作用的受体分子,它在天然免疫中可识别病原微生物相关分子模式,激活先天性免疫应答。本文阐述了部分 Toll 样受体(TLR4、TLR5、TLR9)在辐射防护中的作用及其相关机制,为进一步研究 Toll 样受体在辐射防护中的作用提供理论依据。

**[关键词]** Toll 样受体;干扰素 I 型; NF-κB;造血干细胞

**[中图分类号]** R 818 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)02-0204-03

## Role of toll-like receptors in radioprotection

ZHANG Chao, CAI Jian-ming\*

Department of Radiation Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** Toll-like-receptors (TLRs) have been found to play a critical role in immune response of hosts. They can trigger innate immune responses by detecting pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). This paper reviews the roles of several toll-like receptors(TLR4, TLR5, and TLR9) in radioprotection and the related mechanisms, so as to provide theoretical evidences for further studying their roles in radioprotection.

**[Key words]** Toll-like receptors; interferon type I; hematopoietic stem cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(2):204-206]

电离辐射致机体损伤是一种涉及多器官、多组织、多细胞,乃至多机制之间,相互作用而又复杂的生物学过程。当前大多数辐射防护剂研究和开发仅滞留在清除辐射所产生的自由基这一层面上,忽略了从多方面系统地抑制或减轻辐射损伤。近年来免疫学家发现在天然免疫系统里存在着一个重要的组成部分,即 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)。研究表明除了 TLR3 外,其他的 TLRs 的信号通路均可依赖 MyD88/TIRAP(髓样分化因子 88)通路激活 NF-κB、上调 I 型干扰素的表达<sup>[1]</sup>,从而抑制细胞凋亡<sup>[2]</sup>,促进细胞增殖,清除自由基,诱导处于 G<sub>0</sub> 期的造血干细胞进入细胞分裂期等。因此 TLRs 在辐射防护方面有着广泛的研究前景。

### 1 TLRs 的特点

TLRs 在天然免疫应答中可通过识别病原微生物的相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、脂蛋白(lipoprotein)、病原微生物遗传物质核酸等,激活先天性免疫应答,引起细胞因子的释放,上调共刺激分子表达,为获得性免疫应答的启动提供必要的活化信号<sup>[3]</sup>。迄今为止,已经发现的 TLRs 在人类体内共表达 11 种,小鼠体内 13 种<sup>[4-5]</sup>。根据识别不同种类 PAMPs, TLRs 一般可以分为 3 类:(1)识别病原体脂类分

子模式的 TLRs,包括 TLR1、TLR2、TLR4、TLR6。其中 TLR4 主要的配体是脂多糖(LPS)。TLR2 与 TLR1、TLR2 与 TLR6、TLR2 与其他受体分子等相互作用所形成的异二聚体能够识别肽聚糖、脂肽、脂蛋白等。(2)识别病原体蛋白分子模式的 TLRs,主要是 TLR5,其配体为细菌鞭毛蛋白。(3)识别病毒体内核酸分子模式的 TLRs,包括 TLR3、TLR7、TLR8、TLR9。TLR3 配体是某些病毒在增殖过程中形成的双链 RNA,TLR7 主要识别来自病毒的单链 RNA 和小干扰 RNA,TLR8 与 TLR7 具有很高的同源性,也可参加识别单链 RNA。TLR9 配体是细菌和病毒内未甲基化的 GPG-ODN<sup>[4-5]</sup>。TLRs 广泛分布于各组织中且具有细胞分布特异性及表达部位特异性。细胞分布特异性表现为 TLR1、TLR6、TLR9 广泛分布于各类免疫细胞,TLR2、TLR4、TLR5 主要分布于除 T 细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞外的免疫细胞,TLR3 特异分布于树突状细胞,TLR7、TLR9 分布于外周血细胞中。表达部位特异性表现为 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 分布于细胞表面,TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 定位于细胞内体上。

### 2 TLRs 的辐射防护作用

TLR4 配体 LPS 的辐射防护作用早在 20 世纪 50 年代就被发现,但抗辐射损伤机制尚未完全明确。随着对 TLRs 的

**[收稿日期]** 2009-10-21 **[接受日期]** 2009-12-03

**[作者简介]** 张超,硕士. E-mail:river198410@yahoo.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81871150, E-mail:cjm882003@yahoo.com.cn

深入研究,人们发现TLR4及LPS通路在辐射防护中起到了关键性的作用<sup>[6]</sup>。我实验室观察发现,BALB/c小鼠腹腔注射LPS 50  $\mu$ l,6 h后全身6 Gy(剂量率为0.8 Gy/min)照射,30 d存活率为100%,而对照组为20%。使用抗生素清除小鼠肠道内源性LPS后,小鼠开始死亡时间从以前的第9天提前到第4天,且存活时间也明显缩短,这些观察结果与早期Riehl等<sup>[6]</sup>的报道相一致。文献也报道小鼠14 Gy及16 Gy全身照射后LPS处理组的小肠上皮隐窝细胞凋亡率降低,表明LPS及其配体对小肠的辐射损伤具有一定的缓解作用<sup>[6]</sup>。

Burdelya等<sup>[7]</sup>发现NIH-Swiss小鼠在照前30 min腹腔注射人工合成的细菌鞭毛蛋白衍生物(CBLB502)之后10 Gy、13 Gy高剂量照射,与对照组比较其30 d存活率显著提高。镜下观察小肠绒毛上皮细胞坏死脱落减少,隐窝细胞凋亡数下降。血液中一些具有抗辐射作用的细胞因子,如粒细胞集落刺激因子、白介素6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 含量也明显增加。因此,表明TLR5及其配体CBLB502有可能通过缓解辐射对机体组织的损伤、上调某些抗辐射作用细胞因子表达或其他机制从而提高整体辐射动物的存活率,对机体发挥积极的辐射防护作用。TLR9配体CpG-ODN是细菌或病毒DNA片段中具有免疫激活作用的特定碱基序列,是由大量胞嘧啶、鸟嘌呤和两者相连的磷酸酯键组成。作为佐剂或DNA疫苗,CpG-ODN已广泛应用于治疗非霍奇金淋巴瘤、黑色素瘤<sup>[8]</sup>、脓毒血症和增强炭疽疫苗活性<sup>[9]</sup>。但目前关于CpG-ODN在辐射防护方面的研究国内外学者主要关注于细胞水平,尤其是免疫细胞相关的辐射防护研究。有文献报道CpG-ODN孵育CD4<sup>+</sup>T细胞后0.3 Gy照射细胞,发现细胞凋亡率从59%下降到35%,单细胞凝胶电泳实验观察发现细胞拖尾长度和宽度都变小<sup>[10]</sup>。10 Gy照射后B细胞凋亡率从30.1%下降到21.6%,而存活率明显上升<sup>[11]</sup>。这些研究均揭示TLR9及其配体CpG-ODN可能会提高CD4<sup>+</sup>T细胞和B细胞的辐射抗性,减少辐射所致DNA断裂等对机体发挥一定的辐射防护作用。我们实验室研究发现,CpG-ODN孵育小鼠腹腔巨噬细胞(RAW264.7)和树突状细胞(DC)后,给予不同剂量射线照射后,发现细胞存活率均上升,凋亡率下降,与先前的报道一致<sup>[11]</sup>。之后我们开展了CpG-ODN整体动物水平辐射保护作用的研究。BALB/c小鼠全身6 Gy受照前30 min腹腔注射CpG-ODN(2.5  $\mu$ g/g 体质量),于照射后2、4、7 d时检测小鼠全血谷胱甘肽(GSH)、血浆超氧化物歧化酶(SOD)、脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量变化,发现CpG-ODN组与对照组相比其GSH及SOD均明显提高而MDA含量则显著下降。6 Gy照射后4~20 d外周血白细胞计数发现白细胞水平较对照组下降缓慢,恢复期时间提前。这些结果提示TLR9/CpG-ODN通路或许在清除辐射自由基,缓解氧胁迫损伤,减轻造血系统损伤等方面发挥着重要的作用。

### 3 TLRs辐射防护的相关机制

3.1 TLRs及其配体通过MyD88/TIRAP依赖通路活化下游NF- $\kappa$ B NF- $\kappa$ B是一种重要的核转录调节因子,参与调控多种基因的转录表达及与细胞增殖、凋亡密切相关。NF- $\kappa$ B

位于TLRs下游信号通路的枢纽位置,TLRs及其配体(除TLR3外)以MyD88/TIRAP依赖方式使I $\kappa$ B磷酸化、泛素化,解除其对NF- $\kappa$ B核定位的控制,从而激活核内NF- $\kappa$ B。NF- $\kappa$ B被激活后,一方面参与细胞增殖和分化,抑制细胞凋亡,从而增强细胞及组织的辐射适应性<sup>[12]</sup>。另一方面可启动下游多种靶基因转录表达,合成多种具有抗辐射作用的蛋白,如细胞生长因子(IL-3<sup>[13]</sup>、TNF- $\alpha$ 、G-CSF、M-CSF、GM-CSF等),细胞黏附因子(ICAM-1、VCAM-1、MMP-9<sup>[14]</sup>等)。

TLRs识别配体后活化NF- $\kappa$ B,如果在辐射之前NF- $\kappa$ B激活,可以先上调促炎症基因,活化抗氧化保护基因的表达,如r-GCS(参与谷胱甘肽合成)、编码MnSOD、GP和金属硫蛋白的基因均表达上调<sup>[7,15]</sup>,这是细胞自我保护的重要途径之一,从而拮抗辐射产生的氧化自由基所引起的氧胁迫损伤,减轻氧化应激所导致的损伤,在适应性防御过程中起着重要作用<sup>[16]</sup>。

3.2 TLRs及其配体通过MyD88/TIRAP依赖通路上调I型干扰素表达 TLRs(除TLR3)与配体结合后,可调节MyD88、TRAF6、IRAK4、IRF-7形成复合物,IRAK4再激活IRAK1,激活的IRAK1与IRF-7结合使其活化并转移到核内诱导IFN- $\alpha/\beta$ 表达。典型代表为TLR9,如果TLR9的配体CpG-ODN在细胞内体上滞留时间较长时,TLR9可与表达在内体上的MyD88持续作用,促进I型IFN(主要是IFN- $\alpha$ )大量分泌<sup>[1]</sup>,通过内源或外源性途径提高IFN- $\alpha$ 水平能介导STAT1、PKB/Akt磷酸化和提高Sca-1表达刺激处于休眠期的造血干细胞从G<sub>0</sub>期进入细胞分裂期,刺激骨髓细胞增殖、分化,从而维持机体正常造血功能<sup>[17-18]</sup>。Sato等<sup>[18]</sup>发现将化疗药物5-氟尿嘧啶注射入小鼠体内用来降低骨髓中活跃期造血细胞含量,然后再注射IFN- $\alpha$ 或聚胞苷酸上调小鼠体内IFN- $\alpha$ 水平,结果发现大量处于休眠期的造血干细胞转化为Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>细胞,其在骨髓细胞中的比例从10%上升到90%,说明IFN- $\alpha$ 上调有利于加速造血系统恢复。由此可以推测机体受到电离辐射后,辐射敏感性高的造血干细胞会大量坏死、凋亡,而有较高辐射耐受性的休眠期造血干细胞则仍能够存活。因此,TLR9及其配体CpG-ODN在辐射损伤的病理进展中可能会通过上调体内IFN- $\alpha$ 的表达水平,刺激处于休眠期造血干细胞转化成有增殖分化能力的活跃期造血干细胞,从而促进辐射所致造血功能损伤的尽快恢复。

### 4 展望

鉴于TLRs及其配体信号通路在调节生物体抗氧化防御,诱导抗辐射蛋白分泌,抑制细胞凋亡及促进机体造血系统的损伤修复等方面的重要作用,可尝试将TLRs及其配体广泛应用于辐射损伤防护方面的研究。然而,涉及TLRs辐射防护的生物学机制由于受多方面因素影响,很多调控机制目前尚未完全清楚。因此进一步探讨TLRs在辐射损伤防护中的具体机制并将其发展成为新型辐射损伤防护方法可成为辐射研究领域的一个新的研究方向。

### [参考文献]

[1] Jurk M, Schulte B, Kritzler A, Noll B, Uhlmann E, Wader T, et

- al. C-Class CpG ODN; sequence requirements and characterization of immunostimulatory activities on mRNA level[J]. Immunology, 2004, 209(1-2): 141-154.
- [2] Kuo C C, Liang S M, Liang C M. CpG-B oligodeoxynucleotide promotes cell survival *via* up-regulation of Hsp70 to increase Bcl-x<sub>L</sub> and to decrease apoptosis-inducing factor translocation [J]. J Biol Chem, 2006, 281: 38200-38207.
- [3] Valiante N, De Gregorio E, Rappuoli R. Toll-free immunity[J]? Nat Med, 2008, 14: 1318-1319.
- [4] Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6: 823-835.
- [5] Kawai T, Akira S. TLR signaling[J]. Semin Immunol, 2007, 19: 24-32.
- [6] Riehl T, Cohn S, Tessner T, Schloemann S, Stenson W F. Lipopolysaccharide is radioprotective in the mouse intestine through a prostaglandin mediated mechanism[J]. Gastroenterology, 2000, 118: 1106-1116.
- [7] Burdelya L G, Krivokrysenko V I, Tallant T C, Strom E, Gleiberman A S, Gupta D, et al. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models[J]. Science, 2008, 320: 226-230.
- [8] 何 维. 医学免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 404-405.
- [9] Xie H, Gursel I, Ivins B E, Singh M, O' Hagan D T, Ulmer J B, et al. CpG oligodeoxynucleotides adsorbed onto polylactide-co-glycolide microparticles improve the immunogenicity and protective activity of the licensed anthrax vaccine[J]. Infect Immun, 2005, 73: 828-833.
- [10] Zheng L, Asprodites N, Keene A H, Rodriguez P, Brown K D, Davila E. TLR9 engagement on CD4 T lymphocytes represses r-radiation-induced apoptosis through activation of checkpoint kinase response elements[J]. Blood, 2008, 111: 2704-2713.
- [11] Sohn W J, Lee K W, Choi S Y, Chung E, Lee Y, Kim T Y, et al. CpG-oligodeoxynucleotide protects immune cells from gamma-irradiation-induced cell death[J]. Mol Immunol, 2006, 43: 1163-1171.
- [12] Cao N, Li S, Wang Z, Ahmed K M, Degnan M E, Fan M, et al. NF- $\kappa$ B-mediated HER2 overexpression in radiation-adaptive resistance[J]. Radiat Res, 2009, 171: 9-21.
- [13] Zhao Y, Zhan Y, Burke K A, Anderson W F. Soluble factor(s) from bone marrow cells can rescue lethally irradiated mice by protecting endogenous hematopoietic stem cells[J]. Exp Hematol, 2005, 33: 428-434.
- [14] Berbée M, Fu Q, Boerma M, Wang J, Kumar K S, Hauer-jensen M.  $\gamma$ -Tocotrienol ameliorates intestinal radiation injury and reduces vascular oxidative stress after total-body irradiation by an HMG-CoA reductase-dependent mechanism [J]. Radiat Res, 2009, 171: 596-605.
- [15] Yang K, Puel A, Zhang S, Eidenschenk C, Ku C L, Casrouge A, et al. Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and-lambda is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses [J]. Immunity, 2005, 23: 465-478.
- [16] 郑荣梁, 黄中洋. 自由基生物学[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 105-106.
- [17] Essers M A, Offner S, Blanco-Bose W E, Waibler Z, Kalinke U, Duchosal M A, et al. IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells *in vivo* [J]. Nature, 2009, 458: 904-908.
- [18] Sato T, Onai N, Yoshihara H, Arai F, Suda T, Ohteki T. Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion [J]. Nat Med, 2009, 15: 696-700.

[本文编辑] 尹 茶

## • 书 讯 •

## 《名医谈腰腿痛》已出版

本书由李广智主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-848-0,32开,定价:16.00元。

本书详细介绍了腰腿痛的基本知识、发病原因、症状、诊断与鉴别诊断,怎样科学预防和保健,腰腿痛的非手术治疗和手术治疗。内容系统、详尽、实用,适合广大腰腿痛患者及其家属阅读,同时对临床医师和护理人员也具有参考价值,也是防治腰腿痛科普宣传的好教材。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>