

病原真菌感染与 TOLL 样受体

韩 黎¹ 纪 蕾² 孟玉芬² 陈世平³

(中国人民解放军疾病预防控制中心医院感染监督中心 北京 100071)¹

(苏州大学医学院微生物教研室 苏州 215006)² (中国人民解放军总医院感染管理研究科 北京 100853)³

摘要: TOLL 样受体 (TLR) 是参与天然免疫的主要模式识别受体之一, 与许多微生物病原体及其产物的病原相关分子模式 PAMP 结合后通过 MyD88 依赖性或非依赖性途径启动宿主胞内信号传导途径, 引发一系列生物学效应。白色念珠菌表面的特征性糖磷脂甘露聚糖可被 TLR2、TLR4 识别, 诱导前炎性细胞因子的释放及促进中性粒细胞的聚集等来介导宿主的抗真菌免疫反应。烟曲霉则可能利用表型转换 (酵母样与菌丝态), 通过不同 TLRs 逃避宿主天然免疫系统的识别。新型隐球菌的多糖荚膜成分葡糖醛氧化甘露聚糖 GXM 可与 TLR2、TLR4、CD14 结合, 在单核细胞、巨噬细胞对 GXM 的内化、吞噬中起重要作用, 而不是诱导细胞因子的分泌; 酿酒酵母胞壁成分酵母多糖则可激活 TLR2、TLR6 异源二聚体。总之, TLR 与真菌配体相互作用的具体机制及其活化后胞内信号传导调控机制的深入研究与分析, 对临床真菌病的免疫调节及治疗具有重要意义。

关键词: 病原真菌, 感染, TOLL 样受体

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0158-05

Infection of Pathogenic Fungi and Toll-like Receptors

HAN Li¹ JI Lei² MENG Yu-Fen² CHEN Shi-Ping³

(Center for Hospital Infection Control, Chinese PLA Center for Disease Control & Prevention, Beijing 100071)¹

(Department of Microbiology, College of Medicine, Suzhou University, Suzhou 215006)²

(Institute of Hospital Infection Control & Research, PLA General Hospital, Beijing 100853)³

Abstract: Toll-like receptors as the main pattern recognition receptor involved in innate immunity can respond to the PAMPs of many microorganisms. After binding with its agonists, TLRs can trigger the intracellular signaling transduction and induce a series of physiological processes in MyD88-dependent or -independent way. PAMPs on the cell surface of common fungal pathogens are diverse, such as glucan, mannoproteins, the binding of fungal PAMPs to TLRs and TLRs-mediated regulation of immunological defence and tolerance of each fungi are distinct as well. The unique glycolipid present in the cell surface of *Candida albicans* phospholipomannan can be recognized by TLR2, TLR4, which induced the release of proinflammatory cytokines and promoted the recruitment of neutrophil cells. The major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* was able to bind TLR2, TLR4 and CD14, which might have a crucial role in mediating the cellular internalization and phagocytosis by monocytes and neutrophils, instead of inducing secretion of cytokines. *Aspergillus fumigatus* may escape the recognition of innate immunity by taking advantage of phenotypic switching (yeast and hyphae) through TLRs. Yeast zymosan, a cell wall component of *Saccharomyces cerevisiae*, has been shown to activate heterodimers consisting of TLR2 and TLR6. In summary, further studies on the interaction between TLRs and its fungal ligands as well as the regulation of intracellular signaling transduction will contribute significantly to our understanding of immunoregulation of fungicidal disease, eventually provide some way to cure the fungal infection.

Key words: Pathogenic fungi, Infection, Toll-like receptor

* 通讯作者 Tel: 010-66933338, E-mail: hawklihan@yahoo.com

收稿日期: 2005-10-08, 修回日期: 2006-02-16

医院内真菌感染,特别是系统性真菌感染,是免疫缺陷患者或老年人中常见的严重感染。尽管目前抗真菌药物不断发展,但由于其较为严重的毒副作用以及耐药问题,真菌感染仍伴有较高的病死率,因此人们强烈期待一些能够攻克真菌感染的新方法。近期研究发现,TOLL样受体(TOLL-like receptors, TLR)在宿主抗真菌感染免疫反应中发挥重要作用,对该信号转导系统进行调控将有可能成为一项很有前途的真菌感染的治疗策略。

1 TLR 简介

1.1 TLR 的来源、结构与分布 TOLL蛋白最早在果蝇中发现,是一种I型跨膜受体,可介导真菌和G⁺细菌对果蝇的感染免疫反应。到目前为止,在哺乳动物细胞中已发现10种与TOLL蛋白同源的蛋白,命名为TOLL样受体(TLR),分别是TLR1~10。TLR的胞外区为富含亮氨酸重复序列结构域(leucinerich repeats domain, LRR domain),参与配体的识别;而胞内区含一段与IL-1受体的胞内区高度同源的序列区,被称为TOLL/IL-1R(TIR)区域,负责TLR下游信号的转导^[1]。TLRs在不同组织(淋巴/非淋巴)中均有表达^[2]。TLR1主要在单核细胞、中性粒细胞、B细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)上表达;TLR2、TLR4和TLR5主要表达于除T、B、NK细胞以外的免疫细胞;TLR3主要表达于幼稚的树突状细胞(DC);TLR6-9广泛表达于多种细胞;TLR10主要表达于淋巴样组织中和脾脏细胞^[3]。

1.2 TLR 的模式识别、信号转导及其介导的生物学效应 TLR是识别微生物病原体(及其产物)的病原相关分子模式PAMP(pathogen associated molecular pattern)并参与天然免疫反应的模式识别受体PRR(pattern-recognition receptors)之一。它能够识别革兰阳性菌的磷壁酸(LTA)、肽聚糖(PGN),革兰阴性菌、钩端螺旋体的脂多糖(LPS),细菌脂蛋白,真菌、分枝杆菌的胞壁成分,病毒复制时产生的双链RNA以及细菌体内的非甲基化CpG DNA序列等,在多种微生物所致的急慢性感染中均发挥重要调控作用^[4]。与PAMP相结合并被活化的TLR,通过胞内功能区及信号蛋白,激活NF- κ B等转录因子,引起多种免疫相关细胞因子的表达分泌,如IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18和TNF- α 等,进而募集单核/巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞至感染发生部位,并激活天然免疫细胞杀伤病原微生物。另外,TLR还可激活抗原提呈细胞,促进其表达B7等协同刺激分子和细胞因子的分泌,从而参予T细胞的活化和增殖^[5]。

TLR的生物学效应基本由两条胞内信号传导途径介导。一是髓样分化蛋白MyD88依赖型。即活化的TLR的胞内TIR结构域与MyD88羧基端相互作用而使后者活化。活化的MyD88可诱导IRAK激酶磷酸化。后者进而激活胞浆内的肿瘤坏死因子受体相关因子TRAF6(TNF receptor associated factor 6)。活化后的TRAF6通过转化生长因子TGF β 活化激酶(TGF- β activated kinase, TAK1)和IKK(I κ B激酶)信号级联,使NF- κ B抑制蛋白(I κ B)磷酸化而降解,最终使MyD88的核定位信号(NLS)暴露,促使NF- κ B转迁到核内,激活相应基因的转录^[6]。二是MyD88非依赖型^[7]。目前有3种含有TIR结构域的非MyD88转接蛋白已经得到鉴定,分别为TIRAP/MAL、TRIF/TICAM-1以及TICAM-2/TRAM蛋白^[8]。野生小鼠体内TIRAP/MAL蛋白的封闭可阻止LPS诱导的树突状细胞的成熟,而TRIF/TICAM-1则参与了TLR4、TLR3介导的NF- κ B激活和干

扰素调节因子3 (IRF3) 的产生^[9]。TICAM-2/TRAM 也可激活 IRF-3、IRF7 和 NF- κ B, 但似乎它的功能仅表现在 TLR4 介导的信号转导通路中^[10]。最新研究发现, 针对这 3 种转接蛋白 TLR 结构域的封闭蛋白, 可完全抑制 LPS-TLR4 介导的转录因子及 MAPK 的激活, 但对 TLR2 介导的 MAPK 激活无明显抑制作用^[11]。

2 TLR 在病原真菌识别及感染免疫中的作用

2.1 刺激 TLR 的真菌 PAMP 真菌的细胞壁构成成份很复杂, 包括葡聚糖、角质素、甘露糖蛋白及其他各种各样的细胞壁成分, 它们都是潜在的 PAMP^[12]。酵母多糖是酿酒酵母的一种胞壁成分, 可激活 TLR2、TLR6 组成的异源二聚体^[13]。磷脂甘露糖 PLM (phospholipomannan) 是白色念珠菌细胞表面的一种独特的糖脂^[14], 可以 TLR 依赖的方式激活鼠巨噬细胞 NF- κ B 和 TNF- α , 缺乏 TLR2 的细胞几乎不能产生 TNF- α , 而 TLR4 和 TLR6 缺陷的巨噬细胞产生细胞因子水平也下降, 这说明针对一种 PLM 可以有几种不同 TLR 参与对其的识别^[14]。葡糖醛氧化甘露聚糖 GXM (glucuronoxylomannan), 是新型隐球菌多糖荚膜的主要成分。Shoham 组^[15]通过体外实验研究发现, GXM 可以刺激外周血单核细胞、巨噬细胞中的 NF- κ B 向核移位, 并能激活有 TLR4 和 CD14 共表达的纤维原细胞中依赖 NF- κ B 的目的基因。这说明 GXM 可被 TLR4 识别。此外, 占真菌细胞壁组成一半以上的线性 (1, 3) - β -D-葡聚糖可以激活巨噬细胞中的 NF- κ B, MyD88 是激活途径中的重要调控分子^[16]。

2.2 TLR 与常见病原真菌感染免疫

2.2.1 白色念珠菌感染: 参与抗念珠菌感染的 TLR 主要是 TLR2 和 TLR4。Netea 组首先发现, 白色念珠菌在 TLR4 基因缺陷 (TLR4^{-/-}) 小鼠内的生长与在野生型小鼠内相比明显加快, 鼠巨噬细胞的趋化性细胞因子 KC 和抑制蛋白 MIP-2 的表达水平下降, 但白色念珠菌刺激下鼠巨噬细胞产生 TNF- α 、IL-1 β 的水平却未受影响^[17]。在体外实验中, 外周血单核细胞产生的 TNF 和 IL-1 β 明显被抗-TLR2 抗体所抑制。但 TLR2 基因缺陷的小鼠和野生型相比, 其对念珠菌的抵抗力却有增强趋势; 而且这种小鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-1 α 这些致炎细胞因子的水平正常, 但对免疫反应有负调节作用的 IL-10 和 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的水平明显减少^[18]。而 Villamon 等^[19]发现, 与野生型相比, TLR2 基因缺陷的小鼠巨噬细胞 TNF- α 、MIP-2 的产生减少, 生存能力下降; 但其有能力启动针对白色念珠菌的防御反应和获得性体液免疫^[20]。虽然各组实验结果并不统一, 造成差异的原因也尚不清楚, 但可以肯定的是 TLR 可以通过诱导致炎性细胞因子的释放及促进中性粒细胞的聚集等来介导宿主的抗白色念珠菌免疫反应。另外, Roeder 等发现^[21], 正常的白色念珠菌对野生型小鼠的巨噬细胞以 TLR2、TLR4 介导的方式激活 NF- κ B, 而对用抗真菌药处理过的白色念珠菌仅以 TLR2 介导的方式。这表明抗真菌药除了直接药效反应外, 还可能引起 PAMP 的隐蔽或暴露而导致 TLR2 介导的巨噬细胞激活的增强。此外, 抗真菌药处理后的白色念珠菌刺激野生型巨噬细胞可诱发 MAP 激酶、JNK, ERK 和转录因子 C-Jun/AP-1、NF- κ B 的激活, 而正常白色念珠菌刺激的 HeLa 细胞中只有 NF- κ B、MAP 激酶、P38 的激活^[22]。造成实验结果差异的原因可能是由于白色念珠菌的制备方法不同或所用的细胞不同所导致, 人们推测白色念珠菌感染过程中, 各个信号转导途径之间可能存在交叉。

2.2.2 烟曲霉感染: 首先, TLR4 和 CD14 可能共同参与了宿主细胞对烟曲霉的防御反

应, 因为封闭 TLR4 和 CD14 后, 烟曲霉菌丝刺激人单核细胞释放的 TNF- α 会减少^[23]。相反, Mambula 等却发现是 TLR2 和 MyD88 参与了烟曲霉分生孢子和菌丝刺激的人和鼠细胞中 TNF- α 的产生, 而 TLR4 基因缺陷的小鼠和野生型相比, 烟曲霉菌丝和孢子刺激下 TNF- α 分泌无差别^[24]。有趣的是, TLR2 和 TLR4 在宿主识别致病性和非致病性烟曲霉的分生孢子、菌丝时均起了关键作用, 这说明烟曲霉的致病特异性与天然免疫系统对其的识别机制无关^[25]。Netea 等发现, 烟曲霉的分生孢子和菌丝都能刺激 TLR2, 介导细胞因子的产生, 但只有分生孢子能够通过 TLR4 刺激 TNF- α 、IL-1 的产生。因此, 由于 TLR4 信号缺失, 烟曲霉菌丝可以单独以 TLR2 介导的方式加强 IL-10 的释放, 这就提示烟曲霉菌丝可能通过 TLRs 逃避天然免疫系统的识别, 烟曲霉在感染时的表型转换可能是它的一种逃避机制^[26]。

另外, MyD88 缺陷的小鼠对烟曲霉和白色念珠菌的易感性增强, Th1 反应缺陷(很可能与 DC 激活不足有关); 同时中性粒细胞 (PMN) 的吞噬活性受损^[27]。这说明 MyD88 信号在对这两种真菌的天然免疫中至关重要。然而, MyD88 基因缺陷的小鼠可在烟曲霉感染中存活, 这暗示, 可能有 MyD88 非依赖性的 TLR 途径的存在。Bellocchio 还指出, 针对不同真菌的 TLRs 在天然免疫和适应性 Th1 免疫应答中的作用大小不同, 其激活 PMN 和 DC 特异性抗真菌免疫的能力大小也不同。和野生型相比, MyD88 基因缺陷小鼠在白色念珠菌酵母和菌丝的感染中, 巨噬细胞吞噬能力和胞内杀伤力下降, TNF- α 的产生也下降; 而针对抵抗烟曲霉分生孢子和菌丝, 其吞噬细胞的摄取杀伤能力及细胞因子的释放却未受到影响^[28,29]。这种不同机制的原因有待进一步研究探索。

2.2.3 新生隐球菌感染: 体外研究显示, 新生隐球菌表面多糖 GXM 可与 TLR4 和 CD14 结合, 因此, CD14、TLR4 可能在介导单核细胞、巨噬细胞对 GXM 进行内化、吞噬中起了重要作用。与野生型相比, MyD88 基因缺陷的小鼠对经静脉和鼻腔途径的新型隐球菌感染的敏感性提高, 存活能力下降, 且血清、肺部的 GXM 浓度较高; 但与正常小鼠相比, 感染新生隐球菌的小鼠的大脑和肺部的炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-1 变化不大, 这暗示在新型隐球菌感染中 TLRs 可能没有参与细胞因子的分泌^[30]。另外, 新生隐球菌经鼻腔感染 TLR2 基因缺陷小鼠的致死率较高, 但对 TLR4 基因缺陷小鼠影响不大^[31]。另有研究也支持在宿主对新生隐球菌的感染防御中, TLR2 与 MyD88 起主要作用, 而非 TLR4^[32]。另外, GXM 可诱导鼠巨噬细胞 Fas 蛋白配体表达上调, 但 TLR 信号是否参与 Fas 信号系统仍不清楚^[33]。

2.2.4 其它真菌感染: TLR2 可与 Dectin-1 协同作用, 对卡氏肺囊虫细胞壁的 β -葡聚糖进行识别, 诱导致炎性化学介素 MIP-2 (巨噬细胞炎性蛋白-2) 的产生及释放, 以及 TNF- α 、IL-12 的释放, 调节肺泡巨噬细胞对卡氏肺囊虫的非调理性吞噬及杀伤作用^[34]。另外, MyD88 也在 TLR 应对卡氏肺囊虫的天然免疫中发挥重要作用^[35]。重要致病真菌粗球孢子菌菌丝小球攻击野生型及 TLR2、TLR4 及 MyD88 等不同基因缺陷的小鼠腹膜巨噬细胞的研究表明, 巨噬细胞 TNF- α 、IL-6、MIP-2 的产生及释放, 与 TLR2 及 MyD88 功能有关, 而不受 TLR4 的调控; 如用抗体封闭 Dectin-1 可抑制上述炎症效应因子的表达, 也证明了 Dectin-1 在粗球孢子菌感染的天然免疫过程中发挥重要作用^[36]。

3 存在的问题与展望

综上所述, 参与宿主对病原真菌的天然及获得性免疫反应的 TLRs 主要为 TLR2、

TLR4 亚型, 其调控的细胞炎症因子释放、重要信号传递蛋白 MyD88 的上下游转导机制是当前研究的热点, 但对 TLR 与其配体 (真菌 PAMPs) 作用的具体机制, 以及 TLR 活化信号与宿主细胞内的其他信号转导系统的相互作用仍不清楚。从研究的病原真菌范围看, 大部分研究集中于白色念珠菌和烟曲霉, 对许多其它病原真菌, 如球孢子菌、组织胞浆菌、卡氏肺囊虫、根毛霉等的 PAMPs, 以及它们刺激 TLR 并参与天然免疫反应的机制的研究仍处于起步阶段。另外, 实验材料的不同 (基因缺陷鼠、真菌菌株等)、分离制备 PAMP 过程中的可能污染、以及人和鼠 TLRs 在功能及分布上的特异性, 可能是造成目前研究结果出现偏差的原因之一。总而言之, 对 TLR 及其信号转导通路的研究, 将为有效治疗病原真菌感染和真菌病的免疫调节奠定基础。

参考文献

- [1] Takeda K. *J Endotoxin Res*, 2005, **11**: 51 ~ 55.
- [2] 王梁华, 司宇红, 焦炳华. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28**: 304 ~ 308.
- [3] Zarembek K A, Godowski P J. *J Immunol*, 2002, **168** (2): 554 ~ 561.
- [4] Pasare C, Medzhitov R. *Adv Exp Med Bio*, 2005, **560**: 11 ~ 18.
- [5] Schwartz D A, Cook D N. *Clin Infect Dis*, 2005, **41**: S403 ~ 407.
- [6] Barton G M, Medzhitov R. *Science*, 2003, **300**: 1524 ~ 1525.
- [7] Kawai T, Adachi O, Ogawa T, *et al.* *Immunity*, 1999, **11**: 115 ~ 122.
- [8] Li X, Qin J. *J Mol Med*, 2005, **83**: 258 ~ 66.
- [9] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, *et al.* *Science*, 2003, **301**: 640 ~ 643.
- [10] Fitzgerald K A, Rowe D C, Barnes B J, *et al.* *J Exp Med*, 2003, **198**: 1043 ~ 1055.
- [11] Toshchakov V U, Basu S, Fenton M J, *et al.* *J Immunol*, 2005, **175**: 494 ~ 500.
- [12] Roeder A, Carsten J, *et al.* *Medical Mycology*, 2004, **42**: 485 ~ 498.
- [13] Ozinsky A, Underhill D M, Fontenot J D, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 13766 ~ 13771.
- [14] Jouault T, Ibatu-Ombetta S, Takeuchi O, *et al.* *J Infect Dis*, 2003, **188**: 165 ~ 172.
- [15] Shoham S, Huang C, Chen J M, *et al.* *J Immunol*, 2001, **166**: 4620 ~ 4626.
- [16] Kataoka K, Muta T, Yamazaki S, *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 36825 ~ 36831.
- [17] Netea M G, Van der Graaf C A, Vonk A G, *et al.* *J Infect Dis*, 2002, **185**: 1483 ~ 1489.
- [18] Netea M G, Sutmoller R, Hermann C, *et al.* *J Immunol*, 2004, **172**: 3712 ~ 3718.
- [19] Villamon E, Gozalbo D, Roig P, *et al.* *Microb Infect*, 2004, **6**: 1 ~ 7.
- [20] Villamon E, Gozalbo D, Roig P, *et al.* *Microb Infect*, 2004, **6**: 542 ~ 548.
- [21] Roeder A, Kirschning C J, Schaller M, *et al.* *J Infect Dis*, 2004, **190**: 1318 ~ 1326.
- [22] Deva R, Shankaranarayanan P, Ciccoli R, *et al.* *J Immunol*, 2003, **171**: 3047 ~ 3055.
- [23] Wang J E, Warris A, Ellingsen E A, *et al.* *Infect Immun*, 2001, **69**: 2402 ~ 2406.
- [24] Mambula S S, Sau K, Henneke P, *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 39320 ~ 39326.
- [25] Meier A, Kirschning C J, Nikolaus T, *et al.* *Cell Microbiol*, 2003, **5**: 561 ~ 570.
- [26] Netea M G, Warris A, Van Der Meer J W, *et al.* *J Infect Dis*, 2003, **188**: 320 ~ 326.
- [27] Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, *et al.* *J Immunol*, 2004, **172**: 3059 ~ 3069.
- [28] Marr K A, Balajee S A, Hawn T R, *et al.* *Infect Immun*, 2003, **71**: 5280 ~ 5286.
- [29] Rementeria A, Lopez-Molina N, Ludwig A, *et al.* *Rev Iberoam Micol*, 2005, **22** (1): 1 ~ 23.
- [30] Ellerbroek P M, Ulfman L H, Hoepelman A I, *et al.* *Cell Microbiol*, 2004, **6**: 581 ~ 592.
- [31] Yauch L E, Mansour M K, Shoham S, *et al.* *Infect Immun*, 2004, **72**: 5373 ~ 5382.
- [32] Biondo C, Midiri A, Messina L, *et al.* *Eur J Immunol*, 2005, **35**: 870 ~ 878.
- [33] Monari C, Pericolini E, Bistoni G, *et al.* *J Immunol*, 2005, **174**: 3461 ~ 3468.
- [34] Steele C, Marrero L, Swain S, *et al.* *J Exp Med*, 2003, **198**: 1677 ~ 1688.
- [35] Lebron F, Vassallo R, Puri V, *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 25001 ~ 25008.
- [36] Vinyakosol S, Fierer J, Brown G D, *et al.* *Infect Immun*, 2005, **73**: 1553 ~ 1560.