DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.038

综述

文章编号: 1000-5404(1999)11-0866-03

内毒素激活效应细胞的分子机制

The molecular mechanism of LPS activities

陈 建 综述,罗向东,杨宗城 审校 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

内毒素是 G⁻细菌细胞壁中的脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS),由亲水性的多糖(O-特异性多糖、核心多糖)及疏水性的类脂 Lipid A构成。其中 Lipid A是 LPS结构中最保守的部分,无种属特异性,是 LPS的主要生物活性成分。LPS在细菌生长繁殖、死亡破裂或人工方法裂解后释放,一旦进入人或其它敏感动物体内,将对宿主各系统、器官产生广泛的影响。由于其作用机制广泛而复杂,在过去近 20年里尽管针对性抗生素不断问世,G⁻细菌败血症的死亡率仍持续在 30%左右居高不下。目前,关于 LPS作用机制的研究尚在进行中,大多数学者均已肯定 CD14 LBP在介导 LPS的细胞反应中起重要作用,除此之外,其它膜结构、体液成分也被认为与 LPS的作用机制有关。

1 LPS与效应细胞

小鼠 B淋巴细胞在 LPS的作用下可产生强烈的多克隆反应,包括增生和抗体的产生,这种抗 LPS的反应不依赖辅助性 T细胞的参与。巨噬细胞在 LPS的刺激下可增强吞噬功能、活化细胞膜表面的酶及补体包被的红细胞、产生杀肿瘤的细胞毒性、促进细胞的增殖与分化、刺激 TF IL-1aβ(LAF)、IL-6 8 12 interferonαβ、TNFα、NO IL-6、GSF PAF的合成及释放,通过对脂加氧酶和环氧化酶的激活,影响花生四烯酸代谢产生白三烯、前列腺素、血栓素[1]等。LPS还可刺激中性粒细胞产生活性氧自由基、与纤维蛋白原(Fibrinogen)粘附(由 CD11b/CD18介导)。PMN也可在 LPS下产生氧自由基、分泌蛋白酶、增强细胞的粘附等。

人类外周血树突状细胞 DC(Dendritic cell)为 CD14阴性细胞,是专职的抗原递呈细胞,在免疫反应中起重要作用,成熟的 DC存在于非淋巴组织中,通过它们强大的吞噬和抗原处理能力捕获抗原,然后移入淋巴结、脾脏等 T细胞区而失去处理抗原的能力,成为具有潜在免疫刺激能力的细胞。DC对病原体相关分子结构的识别和活化是它发挥抗原递呈功能的关键。LPS可作用于 DC,促其成熟并移出非淋巴器官,产生高水平的 TNF IL-6 IL-8 IL-12,上调 HDL-DR B7-1 B7-2 CD40的表达[2]。

LPS作用于内皮细胞(有血清情况下),可产生 ICAM-1、VCAM-1、ELAM-1 TF及 Thrombomodulin等生物活性因子[3],在介导白细胞与血管内皮粘附所致的血管损伤、血管内凝血的发生发展中起到了关键的作用。

作者简介: 陈 建,女,27岁,住院医师,硕士
收稿日期: 1999-08-13;修回日期: 1999-10-20

2 CD14

1985年,Maliszewski用单克隆抗体发现了单核细胞表面、髓样细胞(Myeloid cell)的培养上清及正常人血浆中一种 55KD的蛋白质 My23,后来这种蛋白质在 International Workshops on Leukocyte Antigens上被命名为 CD14,成为髓样细胞表面分化抗原中的一员。1986年,Bazil等测定了正常人血浆中 sCD14的浓度是 2~6μg/ml。1988年前后,人们已对人、小鼠的 CD14基因进行了克隆测序,推测 CD14的蛋白结构中有富含亮氨酸片段的重复序列,由 375个氨基酸组成。人 CD14的基因定位于 5号染色体 q23-q31,小鼠 CD14基因定位于 18号染色体[4]。1988年 Haziot等证实 mCD14由糖酰磷脂酰肌醇链(Glycosylphosphatidyl-inositol linkage, GPI)锚着于细胞表面[5],是一个非跨膜的蛋白质,并提出了 sCD14产生的可能机制——由细胞表面脱落,失去 GPI锚进入血液。

1990年,Samuel D. Wright发现 CD14单抗可极大的下调 LBP-LPS复合物与巨噬细胞的结合并减少 TNFα的分泌[6],这一发现使 CD14成为第一个被公认的 LPS在单核、巨噬细胞上的受体。Wurfel[7]提出了 CD14是介导 LPS反应中心的依据:① LPS可与 CD14有比例的结合;② 抗 CD14的抗体可抑制 LPS刺激吞噬细胞的能力;③ sCD14可介导 mCD14阴性细胞的反应;④ mCD14阴性细胞转染 CD14基因后可使其对 LPS的反应增强 1 000倍,而 CD14阴性小鼠(CD14 knock-out mice)对 LPS的敏感性下降 10 000倍。

现已知道,mCD14在人和多种动物的单核细胞上有大量表达,粒细胞上有少量表达,在大多数组织巨噬细胞中也有表达,这些能在细胞膜表面表达 CD14的细胞,被称为 CD14阳性细胞[7]。mCD14的表达与细胞的功能状态有关,当单核细胞的吞噬活性增强时,mCD14数目增加。无细胞情况下,LPS可与 CD14直接结合,LBP的加入可加速 LPS的结合,LPS与 CD14的具体结合部位尚不清楚,Ulevitch Netea认为 Lipid A是 LPS与 CD14的结合部位; Todd S C Juan则发现 CD14 N末端的 152个氨基酸具有结合 LPS刺激细胞活化的能力。

典型的 CD14阳性细胞对 LPS的反应模型是 LPS先与 LBP形成复合物,然后与 mCD14结合,引起细胞内信号转导及细胞效应的产生[6]。但 CD14是非跨膜分子,不直接参与信号转导,GPI锚在 CD14阳性细胞的活化中也不是必需的,引起信号转导的部分可能是一个包含跨膜蛋白酪氨酸激酶或受 LPS/LPS-CD14刺激的蛋白质,它可活化细胞内蛋白酪氨酸激酶[8]。

机体内另一类细胞如上皮细胞、内皮细胞、星状细胞、树突

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

状细胞、血管平滑肌细胞等均不能在细胞膜上表达 CD14,称为 CD14阴性细胞[9]。目前大多学者认为它们对 LPS的反应需 sCD14的介导。

sCD14与 LPS的结合不论有无 LBP均可,但 LBP可加速 LPS与 sCD14的结合[9]。sCD14与 LPS先形成复合物,然后与 CD14阴性细胞上一种膜结构结合才能使细胞活化,这种膜结构可能是一种跨膜信号受体,也可能是与信号转导亚单位相连的结构,目前这一模式已为大多数人公认。Natalio Vita提出了这一膜结构存在的依据[9]:① 它可与 125I-sCD14特异性、可饱和性的结合;② 只有 LPS存在时有特异性结合,IL-6的产生也须 LPS、sCD14同时存在;③ sCD14-LPS与受体以高亲合力结合;④ 细胞对 LPS的快速反应有赖于 LPS-sCD14复合物的形成。

3 内毒素结合蛋白 LBP

1986年,Tobias[10]等在研究 HDL与 LPS的关系时成功地从家兔急性期血清中分离出一种可与 LPS结合的糖蛋白,分子量分为 60.5/58KD,被正式命名为内毒素结合蛋白 LBP(Lipopolysaccharide-binding protein),后来证实 LBP由肝脏合成,并且与 LPS之间存在着直接作用。因为 LPS与 HDL的结合可改变 LPS的生物活性,提示 LPS与血浆蛋白的结合可修饰 LPS的理化特性及生理功能,故提出 LBP可能调节 LPS活性的推论。

1990年,Schumann等测定了多种属动物 LBP在血清中的含量小于 0.5μg/ml,但各家报道稍有差别。Tobias证实 LBP有 Lipid A的结合位点,可与多种 LPS(R/S型)以高亲合力结合,急性期反应时 LBP可在 24 h后上升到 50μg/ml,而血浆中 0.2~0.5μg/ml的 LBP可完全结合直至 5ng/ml的 LPS[6]。

编码人 LBP的基因约 1.7 kb,定位于 20号染色体的 q11.23-q12区,成熟 LBP蛋白含 452个氨基酸,其中有 4个半胱氨酸和 5个潜在的糖基化位点。兔 LBP基因约 1.8 kb,蛋白的一级结构由 456个氨基酸残基组成,包括 2个半胱氨酸和 3个糖基化位点。比较人、家兔 LBP与 BPI发现:人与兔 LBP有 69%的氨基酸残基、78%核苷酸序列同源;人 BPI与人 LBP、兔 LBP与人 BPI分别有 44%、40%氨基酸序列同源[4]。

除此之外,人 LBP与人胆固醇脂转运蛋白(Cholesterol ester transport protein)有 23%氨基酸残基相同,提示 LBP可与脂质结合并将脂质转送至配基起作用,进一步推测 LBP可作为血浆中 LPS的载体蛋白并控制 LPS依赖的单核细胞反应。S Wright等首次对 LBP的功能进行了定义:LBP可调理含 LPS的颗粒和完整的 G⁻细菌,介导包被的颗粒与巨噬细胞粘附,诱导 TNF等细胞因子的产生和释放。

由于识别 LPS在宿主抵抗 G⁻细菌的感染中占重要地位,推测 LBP的主要功能是加强宿主在早期感染时识别 LPS的能力,促进细胞释放细胞因子,由此增强宿主抵抗感染的能力。在急性期反应中 LBP的含量升高,血管外的 LBP随之升高,升高的 LBP可依靠其调理活性提供其它防御机制。LBP与 LPS在急性期血清(Acute-phase serum,APS)及单纯 LBP与 LPS在体外混合后可以高亲合力结合[10],而 LBP-LPS复合物又可与巨噬细胞结合,因此 LBP可能作为一个载体将 LPS带到细胞表面,并极大限度的降低 LPS刺激单核细胞/巨噬细胞的阈值[4]。

Wurfel的研究证实在 LBP knock-out小鼠,其全血在体外接受 LPS刺激后产生 TNF-α的能力下降,需较正常小鼠高 1000倍的 LPS方可引起相同的反应,而在反应体系中加入 LBP后产生 TNF-α的能力恢复[7]。

4 其它与 LPS结合的细胞膜表面结构

除了 CD14是大家公认的 LPS细胞表面受体外,因观察到无论 CD14阳性还是阴性细胞均可在抗 CD14抗体存在情况下对 LPS发生反应,推测 CD14不是 LPS藉以反应的唯一细胞表面结构。许多学者的研究也证实了这些受体存在的可能性,他们在红细胞、血小板和粒细胞、淋巴细胞、肥大细胞、肝细胞等细胞膜上均发现了可与 LPS结合的成分。

Schletter用免疫沉淀法在 sCD14和 LBP存在下,检测到单核细胞和红细胞表面一种可与 Lipid A结合的 80KD的蛋白质,认为这个 80KD的蛋白质与 CD59、CD55有关,可能介导 LPS-sCD14复合物对 CD14阳性及阴性细胞的反应[11],相同分子量的蛋白也在其他学者的研究中发现。

Vassellon描述了一种蛋白酶敏感的白细胞膜上结构,它可将 LPS从 CD14转移到细胞膜上[7]。Acton等也发现了一种膜蛋白(The Class B Scavenger Receptor,SR-B1)可将脂质从 HDL转运到肝细胞膜上,这一过程可能是体内导致 LPS吞噬与失活的重要途径。除此之外,与 LPS结合的膜结构还有:β-integrin、L-selectin、macrophage scavenger receptor、21 000 MW的膜结构等。

Kirikae对巨噬细胞上的 LPS膜受体作了总结,它包括 CD14、73KD、40/45KD、55/65KD、97KD膜蛋白等。Weersink发现在白细胞上还有 CD11/CD18、scavenger receptor;巨噬细胞样细胞 Raw 264.7上还有 73-80KD的膜蛋白发现。

以上这些蛋白与 LPS的结合位点尚未明确。Couturier认为存在如此之多的 LPS结合成分,可能反映 LPS通过不同理化形式与细胞发生作用,如活菌体表的 LPS、不同浓度下 LPS的不同聚集形式、Lipid A从 R型到 S型含不同长度多糖链的 LPS等等。

在研究 LPS与不同受体的相互作用中还发现,与不同受体结合决定了 LPS的不同结局。LPS与 CD14的结合导致效应细胞的激活,产生多种生物活性物质;LPS与 CR3(β₂ integrin家族,主要是 CD11b/CD18)结合主要介导病原的吞噬而很少或不引起吞噬细胞的呼吸爆发(Respiratory burst);而 LPS与 scavenger receptor的结合则导致 LPS的吞噬和清除。LPS与各种膜结构之间究竟如何结合,这种结合是否有倾向性,以及结合后如何导致不同的后果尚不明确。

5 LPS激活细胞的信号转导机制

虽然机体最先识别 LPS的是 LBP和 CD14,但它们本身与信号跨膜转导无关,还需将 LPS提供给可引发信号转导的受体,它需要特定的蛋白——激酶的链式反应、蛋白激酶 G、NF-κB等转录因子的活化以及产生细胞因子基因的转录等。

LPS与血清中 LBP结合转运至 CD14(或其它受体),CD14与未知信号分子作用,产生一些蛋白酪氨酸激酶的活化,这些激酶包括 Syk、Src家族的三个成员 Hck、Fgr、Lyn 在单核细胞,LPS可活化 Ras,由 Ras活化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Raf(巨噬细胞中也发现 Raf的激活),由此导致 MEK1(Erk1/2 MAP Kinase)的活化,而 Raf/MEK/Erk通路的活化与 TNF-α

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的产生有关。LPS还可以活化哺乳动物巨噬细胞另两条MAPK通路: P38和 JNK;另外, LPS活化巨噬细胞 PI3-Kinase/P70^{s6kinase}的信号通路也被发现,关于这些信号通路活化的意义目前尚未明确。

近两年,在对动物和人类天然免疫的研究中倍受关注的是关于 Toll的研究进展[12,14]。信号受体 Toll最初是在研究果蝇(Drosophila)胚胎发育时发现的,但不久人们发现 Toll与其配体结合可快速诱导产生多种抗微生物肽,在果蝇防御反应中起重要的作用。在人类,已发现 5种果蝇 Toll的类似物,被称为 Toll-like receptors(TLRs),尽管它们的天然配体尚不清楚,但似乎所有的 TLRs均可参与天然免疫反应。TLR4可介导抗原递呈细胞活化 NF-κB途径、诱导炎症因子的表达。TLR2 mRNA在 CD14阳性细胞富集, LPS的刺激可使离体单核、巨噬细胞 TLR2 mRNA表达增强。人类上皮细胞通过 LBP/CD14的参与也可表达 TLR2,并导致 NF-κB的激活。甚至有证据指出 TLR2可直接与 LPS结合[13]。

Toll和 TLRs是一类跨膜蛋白,由胞外富含亮氨酸的重复序列(Leucine-rich repeat, LRR)、跨膜区和胞内负责信号转导的作用域构成,其胞内部分与 IL-1受体家族(IL-1R)的胞内作用域具有相当高的同源性,被称为 Toll/IL-1R同源作用域。这种同源作用域也在髓样细胞分化因子(Myeloid differentiation factor) MyD88和植物抗病蛋白(Plant disease-resistance proteins)中发现,由于它们在结构上的高度同源性,一个新的信号受体家族—— Toll/IL-1R受体家族正被越来越多的学者所认识。它们可活化胞内信号分子,主要是 NF-κB途径的活化,导致包括细胞粘附分子、细胞因子(IL-2, 6, 8, TNF-α等)、血细胞生长因子、急性期反应蛋白、转录因子及其亚单位、NO合成酶等基因的表达。

Kopp和 Medzhitov对 Toll介导的信号通路作了初步的推测。它由两个阶段组成,第一阶段是 MyD88的羧基末端与 Toll的胞浆作用域相互作用, MyD88用它的死亡作用域(Death domain)募集下游同样含死亡作用域的丝/苏氨酸蛋白激酶(Serine/threonine-kinase) IRAK(IL-1R associated kinase),导致 IRAK自身磷酸化;第二阶段是磷酸化的 IRAK脱离 MyD88与 TRAF6(TNFR-associated factor, TRAF家族中的一员)结合,而 TRAF可活化 MPKKK(mitogen-activated protein kinase kinase kinase,或称 MAP3K)家族成员 NIK(NF-κB-inducing kinase),后者的磷酸化可激活 IκB激酶(IκB kinases, IKKs),导致 IκB的泛素化而从 IκB/NF-κB复合物释放, NF-κB由此活化转位进核,导致一系列特定基因的表达。

结合以往研究,推测 TLRs在自然免疫中极可能起哨兵的作用,作为机体对抗病原微生物的第一道防线;通过 LBP/CD14将解聚 LPS的递呈, TRLs以细胞外富含亮氨酸片段的重复序列识别 LPS,将 LPS的刺激信号跨膜转导,激活 NF-κB信号途径,导致效应基因的表达。由此我们似乎可以将 LPS激活效应细胞的全过程连结起来,解答了 CD14作为非跨膜蛋白质不能介导进一步信号转导的问题,对于今后来说,如何证实 TLRs全部或部分参与了 LPS的信号转导、了解 CD14怎样将 LPS的刺激信号传递给 TLR对揭示 LPS的作用机制具有重要意义。

关键词 内毒素;效应细胞
中图法分类号 R392.11 文献标识码 B

参考文献

[1] Davies M G, Hagen P O. Systemic inflammatory response syndrome[J]. Br J Surg, 1997, 84(7): 920-935.

[2] Verhasselt V, Buelens C, Willems F, *et al*. Bacterial LPS stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells[J]. J Immunol, 1997, 158(6): 2919-2925.

[3] Haziot A, Rong G W, Silver J, *et al*. Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by LPS[J]. J Immunol, 1993, 151(3): 1500-1507.

[4] Maliszewski C R. CD14 and immune response to lipopolysaccharide[J]. Science, 1991, 252(5010): 1321-1322.

[5] Haziot A, Chen S, Ferrero E, *et al*. The monocyte differen-tiation Ag CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. J Immunol, 1988, 141(2): 547-552.

[6] Wright S D, Ramos R A, Tobias P S, *et al*. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide and LPS binding protein[J]. Science, 1990, 249(4975): 1431-1433.

[7] Wurfel M M, Monks B G, Ingalls R R, *et al*. Targeted deletion of the lipopolysaccharide-binding protein gene leads to profound suppression of LPS receptors *in vivo*, whereas *in vivo* responses remain intact[J]. J Exp Med, 1997, 186(12): 2051-2056.

[8] Schletter J, Heine H, Ulmer A J, *et al*. Molecular mechanism of endotoxin activies[J]. Arch Micobiol, 1995, 164(6): 383-389.

[9] Vita N, Lefort S, Sozzani P, *et al*. Detection and biochemical characteristics of the receptor for complexes of soluble CD14 and bacterical LPS[J]. J Immunol, 1997, 158(7): 3457-3462.

[10] Tobias P S, Soldau K, Ulevitch R J. Isolation of a LPS-binding acute phase reactant from rabbit serum[J]. J Exp Med, 1986, 164(3): 777-793.

[11] Schletter J, Brade H, Brade L, *et al*. Binding of LPS to an 80-KD membrane protein of human cells is mediated by soluble CD14 and LPS-binding protein[J]. Infect and Immun, 1995, 63(7): 2576-2580.

[12] Gerard C. For whom the bell tolls[J]. Nature, 1998, 395(6699): 217, 219.

[13] Yang R B, Mark M R, Gray A, *et al*. Toll-like receptor-2 mediates LPS-induced cellular signalling[J]. Nature, 1998, 395(6699): 284-288.

[14] Kopp E B, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. Curr Opin Immunol, 1999, 11(1): 13-18.

(编辑 刘 鹏)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net