

TLRs调节中性粒细胞抗菌免疫功能研究现状

陆姗姗¹ 陈益国² 闵卫平^{1*}¹南昌大学医学院药理学系, 南昌 330006; ²江西省人民医院检验科, 南昌 330006)

摘要 病原微生物入侵人体时, 机体将会发生炎症反应, 募集更多免疫细胞聚集到炎症部位, 以抵抗微生物的入侵。其中, Toll样受体作为识别病原微生物的主要受体, 在非特异性免疫中起着重要作用。而中性粒细胞是非特异性免疫反应的主要效应细胞之一, 并可以调节炎症反应强度。因此, 在细菌感染的炎症反应中, 对中性粒细胞及其Toll样受体进行研究, 这有助于探索有效对抗细菌感染的免疫疗法。

关键词 TLRs; 中性粒细胞; 炎症反应

Progress of TLRs in Regulating Neutrophil Immune Function Against Bacterial Infection

Lu Shanshan¹, Chen Yiguo², Min Weiping^{1*}¹Department of Pharmacy, Nanchang University Medical College, Nanchang 330006, China;²Clinical Laboratory, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, China)

Abstract When the pathogenic microorganisms invade the human body, the body will produce inflammation and recruit more immune cells in the inflammatory site to resist the invasion of microorganisms. Toll-like receptors (TLRs), as the main receptors of the pathogens, play an important role in innate immunity. And neutrophil is the main effector cell in the nonspecific reaction and can be adjusted the intensity of bacteria inflammatory reaction. Therefore, in the inflammatory response of bacterial infection, neutrophils and Toll-like receptors are expected to find effective immunotherapy against bacterial infection.

Keywords TLRs; neutrophil; inflammatory reaction

细菌感染一直威胁着人类的健康, 也是危急重患者死亡的主要原因之一。特别是近年来, 由于抗菌药物的广泛使用和滥用导致多重耐药甚至广泛耐药菌株的不断涌现, 对临床抗感染治疗具有巨大挑战^[1-2]。化学药物及抗生素已经无法完全满足治疗需求, 因此, 免疫学防治被寄予厚望。在病原体侵入机体后, 机体首先启动以细胞吞噬与炎症反应为主的非特异性免疫抵抗, 随后启动特异性免疫。作为

抗感染的一线细胞——中性粒细胞占有极其重要的作用。在正常人体骨髓中, 近60%的白细胞都是中性粒细胞的前体, 当有炎症发生或微生物入侵时, 中性粒细胞迅速被激活, 同时, 造血系统产生大量的中性粒细胞释放入血, 发挥吞噬杀菌作用^[3]。此外, 中性粒细胞通过调节T细胞的激活增殖以及促进B细胞的存活和抗体的产生, 连接非特异性免疫与特异性免疫, 以拮抗病原菌感染^[4]。Toll样受体(Toll-like

收稿日期: 2017-03-29 接受日期: 2017-05-15

国家自然科学基金(批准号: 81360454)和南昌大学研究生创新专项资金(批准号: cx2016303)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0791-86360562, E-mail: weipingmin163@163.com

Received: March 29, 2017 Accepted: May 15, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81360454) and Nanchang University Graduate Innovation Fund (Grant No.cx2016303)

*Corresponding author. Tel: +86-791-86360562, E-mail: weipingmin163@163.com

网络出版时间: 2017-07-19 10:13:57 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170719.1013.002.html>

receptors, TLRs)作为中性粒细胞识别病原体的重要受体,影响着中性粒细胞的吞噬杀菌等相关免疫功能,因此,本文就近年来Toll样受体调节中性粒细胞参与抗菌免疫的研究现状作一综述。

1 TLRs与中性粒细胞的杀菌功能

Toll样受体是中性粒细胞识别病原体的重要受体,TLRs可通过亮氨酸富集结构域(leucine-rich repeats, LRRs)识别病原体相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs),刺激炎症因子的生成,启动中性粒细胞对病原体的杀伤^[5]。迄今为止,已鉴定的人TLRs有十余种,人类的中性粒细胞均可表达除了TLR3以外的其他TLRs。每一种TLRs负责识别某一种特定的PAMP分子并进行相应的免疫反应,不同细菌成分被不同的TLR识别并引起相应免疫应答。例如,TLR5的配基鞭毛蛋白刺激后,中性粒细胞向促炎型极化(如IL-10、IL-12^{*}),有助于严重创伤及脓毒症患者对抗铜绿假单胞菌感染^[6]。本课题组前期研究表明,TLR2的配基Pam3CSK4预处理小鼠的骨髓中性粒细胞后能显著增强其对耐甲氧西林金葡菌(methicillin resistant staphylococcus aureus, MRSA)的拮抗作用,提高小鼠生存时间和存活率^[7]。

1.1 TLRs对中性粒细胞趋化作用的影响

CXCL1(C-X-C chemokine ligand 1)、CXCL2、CXCL8等趋化因子是中性粒细胞趋化到炎症部位重要的趋化因子。中性粒细胞表面主要表达CXCR1(C-X-C chemokine receptor 1)与CXCR2两种趋化因子受体。早期有报道称,败血症患者中性粒细胞表面CXCR2的表达降低是导致其中性粒细胞趋化功能低下的主要原因之一^[8]。Jose等^[9]研究认为,TLR2配基LTA(lipoteichoic acid)下调脓毒症小鼠中性粒细胞CXCR2的表达,以降低中性粒细胞对CXCL2的趋化性而抑制其趋化迁移功能,并提出抑制TLR2的激活可能有利于缓解脓毒症带来的危害。但对健康人中性粒细胞的研究表明,在TLR2配基(如Pam3CSK4)和TLR4配基[如LPS(lipopolysaccharide)]刺激后,虽然其表面CXCR1与CXCR2的表达均降低,并且时间上来看CXCR2降低表现得更为迅速,但剩下的趋化因子受体仍然可以维持其功能,使中性粒细胞对CXCL8等趋化因子的迁移聚集能力不受影响^[10]。Kelly等^[11]用嗜热多胞菌诱导的过敏

性肺炎小鼠模型实验证明,TLR2和TLR9(主要是TLR2)参与体内中性粒细胞募集,增加CXCL2及TNF α (tumor necrosis factor alpha)等相关细胞因子的产生,并用TLR2基因敲除的小鼠证明了TLR2是中性粒细胞募集到炎症部位不可缺少的受体。Elizabeth等^[12]研究了LTA降低中性粒细胞趋化募集的机制,并提出双酰基脂肽类的TLR2配基是通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPAR γ)来抑制体内中性粒细胞的募集的。所以,当炎症发生时,中性粒细胞在体内的募集不只是依靠TLR2的激活,还需要PPAR γ 的共同参与来控制机体的免疫反应,这对于炎症反应中调控中性粒细胞发挥最佳免疫效应、减少过度炎症反应具有重要价值。

1.2 TLRs对中性粒细胞吞噬作用的影响

中性粒细胞吞噬作用是其在非特异性免疫中最基本的一种杀菌方式。在炎症反应的激活过程中,TLRs调节着中性粒细胞的吞噬作用。TLR2和TLR4是目前研究较多的两种受体,分别调节着中性粒细胞对革兰阳性菌和革兰阴性菌的吞噬杀伤作用^[5]。人类从出生起,中性粒细胞上TLR2和TLR4的表达即与成年人相当,已经具备了识别病原体的能力,但是其吞噬呼、吸爆发等功能还不够完善,不能有效清除病原体,造成新生儿机体免疫的失衡而较容易感染^[13]。TLR2和TLR4除了调节细菌感染,对衣原体和真菌等其他病原体也有重要作用,Emma等^[14]用TLR2或TLR4基因敲除的小鼠骨髓中性粒细胞证明,与正常小鼠相比,中性粒细胞缺乏TLR2会导致其对衣原体的吞噬功能明显降低,而中性粒细胞缺乏TLR4却对衣原体的吞噬作用没有明显差异。Hongnga等^[15]在白色念珠菌所致的炎症感染中发现,IL-33(interleukin-33)通过激活中性粒细胞TLR信号通路,使其表面CR3(complement 3)及CXCR2表达升高,促进中性粒细胞迁移到炎症部位,而CR3表达升高则直接增强中性粒细胞对抗原的吞噬作用,因此,TLR信号通路对中性粒细胞在非特异性免疫中的吞噬功能有着重要作用。

1.3 TLRs对中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular trap, NET)形成的影响

NET是中性粒细胞特有的一种不同于细胞凋亡和坏死的死亡方式,其释放到胞外的染色体DNA、抗菌肽以及髓过氧化物酶等物质可以彻底杀灭病原

微生物。研究表明, ERK的活化、组蛋白甘氨酸化、细胞内神经酰胺的累积等方式都能促进中性粒细胞NET的形成^[16]。此外, NET还与中性粒细胞表面众多种类的TLRs相关, 如革兰阳性菌引起的小鼠或人感染时, TLR2及补体介导的调理素作用与中性粒细胞NET的形成密切相关^[17]。TLR7与TLR8通过识别病毒核酸诱发中性粒细胞产生活性氧类(reactive oxygen, ROS)并促发NET形成^[18]。TLR2、TLR4调节金黄色葡萄球菌引起的中性粒细胞NET的形成^[19]。还有大量实验证明, TLR4与NET的发生有着密切关系。Ahmed等^[20]用基因敲除小鼠实验证明, TLR4通路和NADPH氧化酶在过氧化物诱导的中性粒细胞胞外NET的形成中是必不可少的。Giselle等^[21]研究也证明, 呼吸道合胞体病毒(respiratory syncytial virus, RSV)蛋白质所导致的中性粒细胞NET的产生依赖于中性粒细胞TLR4的激活、NADPH氧化酶趋化的ROS的产生、ERK及P38MAPK的磷酸化。所以, TLR可能成为调控中性粒细胞NET产生及过量所致相关炎症治疗的靶标。

1.4 TLRs可激活中性粒细胞产生细胞因子参与免疫调节

近年来, 有研究发现, TLRs除直接参与中性粒细胞杀菌作用调节外, 在被激活后还会通过促进某些细胞因子的分泌而调动其他免疫细胞参与免疫应答^[22]。TLRs分泌的细胞因子虽然不能直接促进T、B细胞的迁移, 但可以募集更多的中性粒细胞, 增强其吞噬作用, 并且促进树突状细胞的成熟、转运并交叉提呈抗原给记忆性CD4⁺ T细胞和初始CD8⁺ T细胞^[22]。Rebecca等^[23]研究表明, TLRs配基刺激中性粒细胞后, 影响自然杀伤细胞对内源性及外源性IL-12的应答, 促进树突状细胞(dendritic cell, DC)成熟和T细胞增殖, 增强特异性免疫应答。TLRs配基刺激中性粒细胞促进中性粒细胞浸润到炎症组织后其产生的TNF- α 刺激皮肤朗格汉斯细胞激活抗原特异性免疫应答^[24]。Haselmar等^[25]也用实验证明, 中性粒细胞上TNF超家族受体的配基 疱疹病毒侵入介质(herpes virus entry mediator, HVEM)与TLR配基协同刺激中性粒细胞呼吸爆发及脱颗粒, 激活T淋巴细胞, 参与非特异性免疫与特异性免疫应答。中性粒细胞在胞外产生的NET同样也可以引发机体产生特异性免疫反应, 中性粒细胞染色质DNA形成的NET作为自身抗原激活DC的TLR9受体和B细胞, 进一步

发挥一系列的免疫作用^[26]。

2 中性粒细胞对T细胞特异性免疫应答的影响

由于中性粒细胞从骨髓释放入血后一般在8~12 h就会凋亡从而被机体清除, 以往认为, 中性粒细胞作为一种短时效应细胞不足以维持其作用而引起特异性免疫^[27]。但随着近年来研究的深入, 发现中性粒细胞不仅可以吞噬、杀伤微生物, 发挥非特异性免疫作用, 还可以作为抗原提呈细胞, 将抗原提呈并激活T细胞, 从而启动特异性免疫。Delbert等^[28]证明, 中性粒细胞用抗原预处理后, 与抗原特异性T细胞共培养, 中性粒细胞表面MHC-II(major histocompatibility complex class-II)、CD80、CD86表达升高, 并诱导T细胞分化为Th1(helper T cell 1)和Th17细胞。但通过Transwell实验却发现, 在中性粒细胞与T细胞不直接接触的条件下共培养时, 并不能激活T细胞, 首次证实了中性粒细胞也是一种专职的抗原提呈细胞。Henry等^[29]证明, 在金黄色葡萄球菌感染后, 中性粒细胞从病源部位随淋巴管迁移至淋巴结(主要是引流淋巴结), 促进CD4⁺、CD8⁺ T细胞(特别是后者)的增殖, 增强机体特异性免疫应答, 进一步发挥抗感染作用。虽然先前研究已经证明, TLRs作为一种抗原识别受体, 在DC、巨噬细胞、T细胞以及B细胞发挥特异性免疫的过程中发挥着重要作用^[30-31], 但中性粒细胞在专职抗原提呈过程中TLRs具体发挥着怎样的作用少有报道, 还需要进一步深入研究。

3 结语与展望

中性粒细胞作为免疫反应中重要的吞噬细胞, 在机体发生炎症反应时, 以其巨大的数量、较快的生成速度, 迅速地成熟并聚集在炎症部位, 在炎症反应的消除中发挥了重要作用。同时, 中性粒细胞一旦成熟就较快发生程序性凋亡的特点, 对其体外长期观察培养以及功能学研究造成了一定的困难。TLRs作为一种重要的模式识别受体是近几十年的研究热点, TLRs识别抗原调节中性粒细胞作出免疫应答如图1所示。虽然中性粒细胞表达众多的TLRs, 但在研究病原微生物所致的炎症反应方面, 特别是特异性免疫的研究却没有深入。目前, 随着多种人工合成的TLRs配基的出现, 不仅方便了中性粒细胞

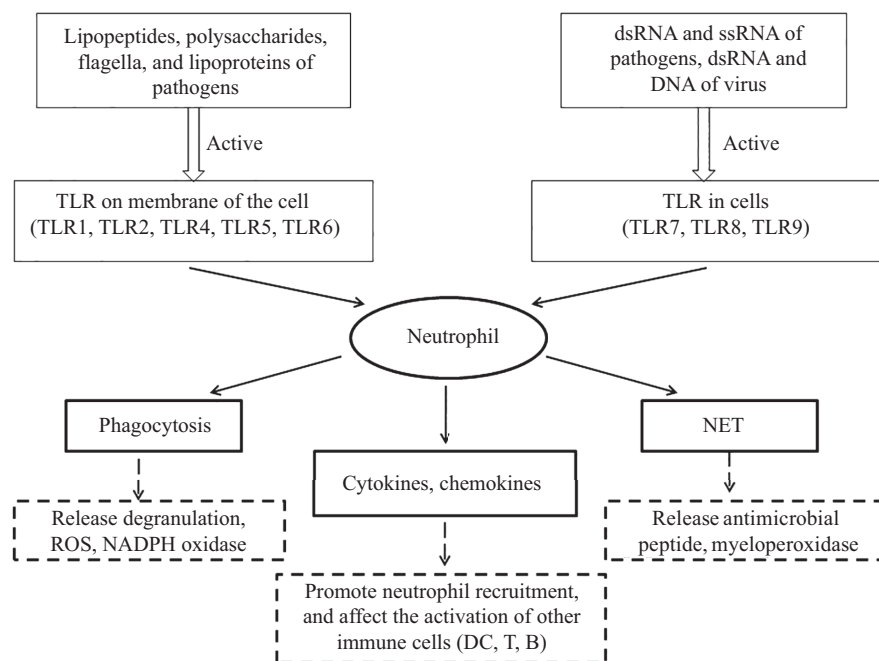


图1 中性粒细胞吞噬杀伤功能及调节免疫应答示意图

Fig.1 Neutrophil phagocytosis and regulation of immune response

免疫相关的功能学研究,也更有利于今后人工合成的TLR配基成为治疗药物走向工业化生产以及临床应用。所以,若能找到适合的TLR配基,增强中性粒细胞对外来病原微生物的杀伤功能,减少过度炎症损伤,充分发挥机体非特异性与特异性免疫作用,对细菌感染所致炎症的治疗以及相关疫苗的研究具有重要意义。此外,现有研究发现,中性粒细胞与肿瘤、自身免疫疾病的发生都有关^[32-33],但这还需要进一步研究其机制及明确对应靶标,为肿瘤和自身免疫性疾病的防治提供新的思路与策略。

参考文献 (References)

- 1 邓呈亮,詹日兴,刘洋,郭小伟,吴军,彭毅志,等.成年大面积烧伤死亡患者的细菌感染及耐药情况分析.中华烧伤杂志(Deng Chengliang, Zhan Rixing, Liu Yang, Guo Xiaowei, Wu Jun, Peng Yizhi, *et al.* Chinese Journal of Burns) 2016; 32(11): 688-91.
- 2 胡付品,朱德妹,汪复,蒋晓飞,徐英春,张小江,等.2015年CHINET细菌耐药性监测.中国感染与化疗杂志(Hu Fupin, Zhu Demei, Wang Fu, Jiang Xiaofei, Xu Yingchun, Zhang Xiaojiang, *et al.* Report of CHINET antimicrobial resistance surveillance program in 2015. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy) 2016; 16(6): 685-94.
- 3 van Kessel KP, Bestebroer J, van Strijp JA. Neutrophil-mediated phagocytosis of staphylococcus aureus. Front Immunol 2014; 5: 467.
- 4 Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. J Exp Med 2013; 210(7): 1283-99.
- 5 Prince LR, Whyte MK, Sabroe I, Parker LC. The role of TLRs in neutrophil activation. Curr Opin Pharmacol 2011; 11(4): 397-403.
- 6 Neely CJ, Kartchner LB, Mendoza AE, Linz BM, Frelinger JA, Wolfgang MC, *et al.* Flagellin treatment prevents increased susceptibility to systemic bacterial infection after injury by inhibiting anti-inflammatory IL-10⁺ IL-12⁻ neutrophil polarization. PLoS One 2014; 9(1): e85623.
- 7 Chen YG, Zhang Y, Deng LQ, Chen H, Zhang YJ, Zhou NJ, *et al.* Control of methicillin-resistant staphylococcus aureus pneumonia utilizing TLR2 agonist pam3CSK4. PLoS One 2016; 11(3): e0149233.
- 8 Goodman R, Cummings C, Frevert C, Quan J, Martin T. Functional significance of CXCR2 downregulation on neutrophils from patients with severe sepsis. Chest 1999; 116(1 Suppl): 111S-2S.
- 9 Alves-Filho JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto H, Silva JS, *et al.* Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106(10): 4018-23.
- 10 Sabroe I, Jones EC, Whyte MK, Dower SK. Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. Immunology 2005; 115(1): 90-8.
- 11 Andrews K, Abdelsamed H, Yi AK, Miller MA, Fitzpatrick EA. TLR2 regulates neutrophil recruitment and cytokine production with minor contributions from TLR9 during hypersensitivity pneumonitis. PLoS One 2013; 8(8): e73143.
- 12 Long EM, Klimowicz AC, Paula-Neto HA, Millen B, McCafferty DM, Kuberski P, *et al.* A subclass of acylated anti-inflammatory mediators usurp Toll-like receptor 2 to inhibit neutrophil

- recruitment through peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(39): 16357-62.
- 13 Silveira-Lessa AL, Quinello C, Lima L, Redondo AC, Ceccon ME, Carneiro-Sampaio M, *et al.* TLR expression, phagocytosis and oxidative burst in healthy and septic newborns in response to Gram-negative and Gram-positive rods. *Hum Immunol* 2016; 77(10): 972-80.
- 14 Beckett EL, Phipps S, Starkey MR, Horvat JC, Beagley KW, Foster PS, *et al.* TLR2, but not TLR4, is required for effective host defence against Chlamydia respiratory tract infection in early life. *PLoS One* 2012; 7(6): e39460.
- 15 Le HT, Tran VG, Kim W, Kim J, Cho HR, Kwon B. IL-33 priming regulates multiple steps of the neutrophil-mediated anti-Candida albicans response by modulating TLR and dectin-1 signals. *J Immunol* 2012; 189(1): 287-95.
- 16 Flores R, Dohrmann S, Schaal C, Hakkim A, Nizet V, Corriden R. The selective estrogen receptor modulator raloxifene inhibits neutrophil extracellular trap formation. *Front Immunol* 2016; 7: 566.
- 17 Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytniuk LD, *et al.* Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking *in vivo*. *Nat Med* 2012; 18(9): 1386-93.
- 18 Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* 2012; 12(1): 109-16.
- 19 Wan T, Zhao Y, Fan F, Hu R, Jin X. Dexamethasone inhibits S. aureus-induced neutrophil extracellular pathogen-killing mechanism, possibly through Toll-like receptor regulation. *Front Immunol* 2017; 8: 60.
- 20 Al-Khafaji AB, Tohme S, Yazdani HO, Miller D, Huang H, Tsung A. Superoxide induces neutrophil extracellular rrap formation in a TLR-4 and NOX-dependent mechanism. *Mol Med* 2016; 22: 621-31.
- 21 Funchal GA, Jaeger N, Czepielewski RS, Machado MS, Muraro SP, Stein RT, *et al.* Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils. *PLoS One* 2015; 10(4): e0124082.
- 22 Lee SK, Goh SY, Wong YQ, Ding JL. Response of neutrophils to extracellular haemoglobin and LTA in human blood system. *EBioMedicine* 2015; 2(3): 225-33.
- 23 Riise RE, Bernson E, Aurelius J, Martner A, Pesce S, Della Chiesa M, *et al.* TLR-stimulated neutrophils instruct NK cells to trigger dendritic cell maturation and promote adaptive T cell responses. *J Immunol* 2015; 195(3): 1121-8.
- 24 Epaulard O, Adam L, Poux C, Zurawski G, Salabert N, Rosenbaum P, *et al.* Macrophage- and neutrophil-derived TNF-alpha instructs skin langerhans cells to prime antiviral immune responses. *J Immunol* 2014; 193(5): 2416-26.
- 25 Haselmayer P, Tenzer S, Kwon BS, Jung G, Schild H, Radsak MP. Herpes virus entry mediator synergizes with Toll-like receptor mediated neutrophil inflammatory responses. *Immunology* 2006; 119(3): 404-11.
- 26 Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, *et al.* Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011; 3(73): 73ra19.
- 27 Nathan C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(3): 173-82.
- 28 Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol* 2011; 23(5): 317-26.
- 29 Hampton HR, Bailey J, Tomura M, Brink R, Chtanova T. Microbe-dependent lymphatic migration of neutrophils modulates lymphocyte proliferation in lymph nodes. *Nat Commun* 2015; 6: 7139.
- 30 Arias MA, Santiago L, Costas-Ramon S, Jaime-Sanchez P, Freudenberg M, Jimenez De Bagues MP, *et al.* Toll-like receptors 2 and 4 cooperate in the control of the emerging pathogen brucella microti. *Front Cell Infect Microbiol* 2016; 6: 205.
- 31 Loures FV, Araujo EF, Feriotti C, Bazan SB, Calich VL. TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. *Front Microbiol* 2015; 6: 261.
- 32 Saha S, Biswas SK. Tumor-associated neutrophils show phenotypic and functional divergence in human lung cancer. *Cancer Cell* 2016; 30 (1): 11-3.
- 33 Thieblemont N, Wright HL, Edwards SW, Witko-Sarsat V. Human neutrophils in auto-immunity. *Semin Immunol* 2016; 28(2): 159-73.