

Toll 样受体通路调节 Tregs 功能的研究进展

郭鹏^{1,2}, 张含^{1,2}, 李长菲^{1,2}, 孟颂东^{1,2}

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

郭鹏, 张含, 李长菲, 等. Toll 样受体通路调节 Tregs 功能的研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1701-1712.

Guo P, Zhang H, Li CF, et al. Research progress on Toll-like receptors pathways regulating function of regulatory T cells. Chin J Biotech, 2020, 36(9): 1701-1712.

摘要: 模式识别受体 Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs) 是固有免疫中免疫受体的代表, 进化上十分保守, 对生物体的生存极为重要。TLRs 通过内源或外源的配体启动信号转导, 激活下游一系列重要的基因表达与活化。研究表明调节性 T 细胞 (Regulatory T cell, Treg) 在维持机体外周免疫耐受和阻止移植排斥反应等方面发挥核心作用。Treg 细胞表达某些 TLRs, 包括 TLR2、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8、TLR9 等。TLRs 的活化可能直接或间接地影响 (主要是活化) Treg 的增殖和免疫抑制功能, 这种调节与感染、自身免疫病和癌症的发生密切相关。其中热休克蛋白作为 TLRs 配体分子对于 Treg 的调节发挥了重要的作用。因此, 了解 TLRs 通路对研究 Treg 免疫调控机制、新药物研发和靶向治疗有重大意义。文中简要介绍了 TLRs 通路调节 Treg 免疫功能的相关研究进展。

关键词: Toll 样受体, 调节性 T 细胞, 增殖, 免疫抑制, 热休克蛋白

Research progress on Toll-like receptors pathways regulating function of regulatory T cells

Peng Guo^{1,2}, Han Zhang^{1,2}, Changfei Li^{1,2}, and Songdong Meng^{1,2}

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Toll like receptors (TLRs) are pattern recognition receptors and represent immune receptors in innate immunity. They are very conservative in evolution and extremely important for the survival of organisms. TLRs initiate signal transduction through binding of endogenous or exogenous ligands to activate a series of downstream important gene

Received: January 16, 2020; **Accepted:** March 24, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81761128002, 81621091, 81871297, 81672815), Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. XDB29040000), One Belt and One Road International Science and Technology Cooperation of Chinese Academy of Sciences (No. 153211KYSB20170001).

Corresponding author: Songdong Meng. Tel: +86-10-64807350; E-mail: mengsd@im.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81761128002, 81621091, 81871297, 81672815), 中国科学院 B 类先导项目 (No. XDB29040000), 中国科学院“一带一路”科技合作专项 (No. 153211KYSB20170001) 资助。

网络出版时间: 2020-04-08

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200407.1637.005.html>

expression and activation. Studies have shown that regulatory T cells (Tregs) play a central role in maintaining peripheral immune tolerance and preventing transplant rejection. Tregs express certain TLRs, including TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, and TLR9. Activation of TLRs may directly or indirectly affect (mainly activate) Treg proliferation and immunosuppressive functions, and this regulation is closely related to the occurrence of infection, autoimmune disease and cancer. The heat shock proteins as TLRs ligand molecules play important roles in the regulation of Treg. Therefore, understanding regulatory mechanisms of TLR pathways on Tregs is of great significance for new drug development and targeted therapy. This review introduces how TLR-mediated pathways regulate Tregs' immune function.

Keywords: TLRs, Tregs, proliferation, immunosuppression, heat shock proteins

1 Toll 样受体

1.1 Toll 样受体及其配体

Toll 是果蝇中决定胚胎背腹轴线发育、参与抗感染的一组基因。通过数据库搜寻同源物, 科学家们很快在哺乳动物中发现结构相似的一个跨膜分子家族, 主要包括 IL-1R 和 Toll 类似物, 后者又被称为 Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs)。TLRs 是 I 型跨膜蛋白, 细胞外结构域含有形似马鞍状的亮氨酸富集重复序列 (Leucine rich repeat, LRR), 该重复区域构成配体结合区。细胞质结构域为 TIR(Toll/IL-1R), 是所有 TLRs 及 IL-1R 分子胞内段所特有的。TIR 结构域与细胞内其他带有相同 TIR 结构域分子相互作用, 由后者启动下游信号传递。TLRs 主要表达于免疫细胞, 包括巨噬细胞、树突状细胞 (Dendritic cell, DC)、B 细胞和 T 细胞。在一些非免疫细胞如上皮细胞、内皮细胞^[1]和成纤维细胞中也有表达。目前在哺乳动物中已发现 13 种 TLRs, 其中小鼠和人均表达 TLR1-9, TLR10 仅存在于人体内, TLR11-13 仅在小鼠体内被发现^[2]。TLRs 是一种模式识别受体, 不同的 TLRs 识别不同的病原相关分子模式 (Pathogen-associated molecular pattern, PAMP)^[3]。TLRs 与 PAMPs 相互作用主要表现为两个特点: 1) 在细胞中因表达部位、蛋白组成等差异, 不同的 TLRs 分子识别不同的 PAMPs。2) 胞膜 TLRs 通常以二聚体形式发挥作用, 相组合的 TLRs 一般识别同类配体分子。在体内除了外源性配体外, 一些 TLRs 结合内源性

配体, 如 TLR2 和 TLR4 可以与细胞内高表达的热休克蛋白 70、热休克蛋白 gp96 和 HMGB1 相互作用, 这与坏死细胞释放内容物作为危险相关分子 (Damage-associated molecular patterns, DAMP) 有关^[4]。此外, 有研究报道 TLR4 还与体内纤连蛋白、纤维蛋白原、肺表面活性蛋白 A、肝素、透明质酸和鼠的 β 防御素相互作用^[2]。在系统性红斑狼疮 (Systemic lupus erythematosus, SLE) 中, TLR9 通过与染色质免疫球蛋白 G 复合物结合被激活。这些内源性配体的存在, 增加了 TLRs 参与自我耐受和免疫检测的可能性, 提示 TLRs 对于自身免疫病和癌症的治疗至关重要。

1.2 Toll 样受体信号通路

TLRs 是连接天然免疫和获得性免疫的桥梁, 它对于 PAMPs 的识别及下游信号通路的激活是机体免疫应答的重要途径之一。TLRs 介导的信号通路激活需要衔接蛋白的参与, 衔接蛋白主要包括髓样分化因子 88 (Myeloid differentiation factor 88, MyD88)、MyD88 样衔接蛋白 (MyD88 adapter-like, MAL)、诱导 β 干扰素的 TIR 结构域衔接蛋白 (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β , TRIF)、TRIF 相关衔接分子 (TRIF-related adaptor molecule, TRAM) 和含不育 α 和犰狳基序的蛋白 (Sterile alpha and armadillo-motif-containing protein, SARM)^[5]。TLRs 信号通路可分为 MyD88 依赖和非依赖途径 (图 1)。TLR5、TLR7 和 TLR9 等分子直接与 MyD88 作用激活下游信号通路, 而 TLR2 和 TLR4 则需

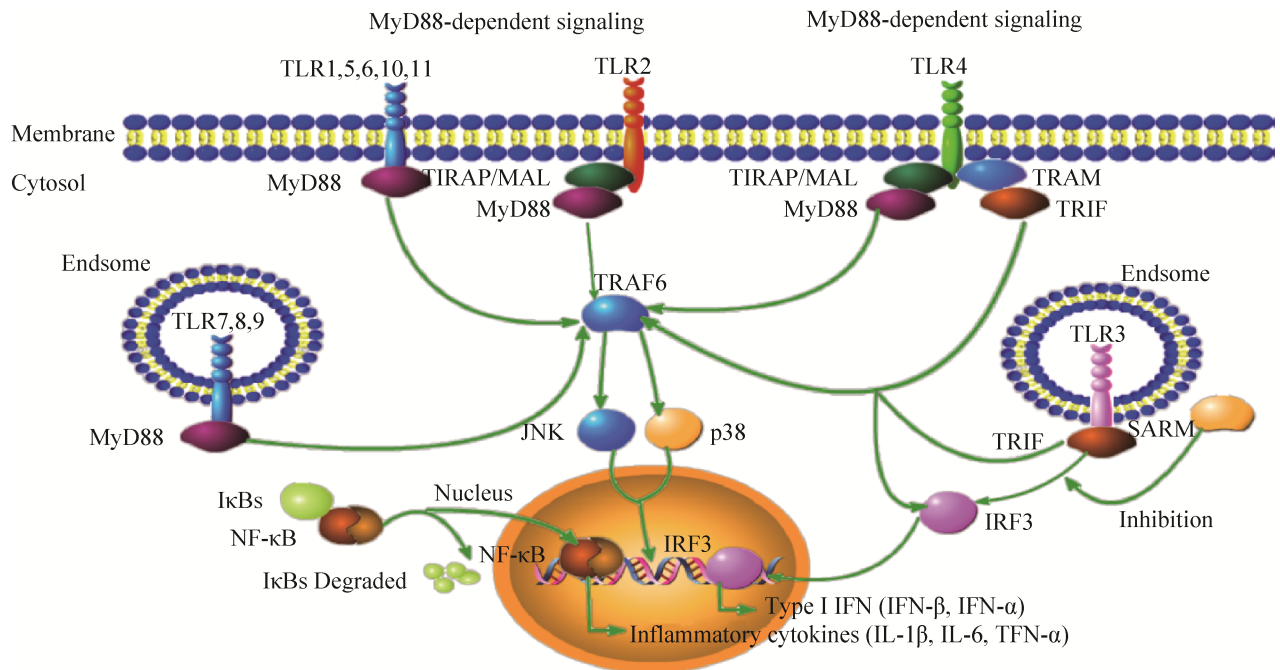


图 1 Toll 样受体介导的信号通路

Fig. 1 Toll like receptors mediated signaling pathway. TLRs signaling pathways can be divided into MyD88-dependent and MyD88-independent pathways. Different from TLR5, TLR7, and TLR9, which can directly interact with MyD88, TLR2 and TLR4 require coordination of MyD88 and TIRAP/Mal for downstream signaling. TLR3 and TLR4 mediate signal transduction in a MyD88-independent pathway, of which TLR3 solely utilize this pathway. TLRs signaling mainly causes activation of NF- κ B that induces the secretion of inflammatory cytokines including IL-1 β , IL-6, TNF- α and the expression of type I interferon. In addition, TLRs can also activate p38 and JNK.

要 MyD88 和含 TIR 结构域的衔接蛋白 (也称 MAL, TIR domain containing adaptor protein, TIRAP/Mal) 的共同作用, 促进下游通路的激活。此外, TLR3 和 TLR4 都可介导非 MyD88 依赖途径的信号转导, 其中 TLR3 只能利用该途径。TLRs 信号通路激活主要引起 NF- κ B (核转录因子) 活化, 诱导 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎性细胞因子的分泌和 I 型干扰素的表达, 参与炎症反应或炎症病理反应^[6], 同时调节免疫反应。除此之外, TLRs 还能通过激活丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPKs)、胞外信号调节激酶(Extracellular regulated protein kinases, ERK)、p38 和 c-JUN N 端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 等调节细胞的增殖、转化和死亡^[7]。

2 Treg 细胞

调节性 T 细胞 (Treg) 又称抑制性 T 细胞,

是一类负反馈性 T 细胞亚群。Treg 主要分成两类: 一类是源自胸腺的自然调节性 T 细胞 (Natural Treg, nTreg), 代表亚群为 CD4⁺CD25⁺Treg, 占 CD4⁺T 细胞亚群的 5%–15%。CD4⁺CD25⁺Tregs 激活后能够抑制 T 细胞增殖、细胞因子的分泌和抗原呈递细胞 (Antigen presentation cell, APC) 的功能^[8]。它们可以识别自身和非自身的抗原肽表位。这类 Tregs 通过 TGF- β 诱导, 表达转录因子叉头框蛋白 3 (Forkhead box protein 3, Foxp3)^[9], Foxp3 是 Treg 的标志性分子。除此之外小鼠和人的 CD4⁺CD25⁺Treg 还表达很多标志分子, 如细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4)^[10]、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor, GITR)^[11]、CD103^[12]、CCR8、淋巴细胞活化基因-3 分子 (Lymphocyte activation gene-3,

LAG-3)、神经纤毛蛋白-1 (Neuropilin-1, Nrp1)、高表达 CD5 分子和低表达 IL-7 受体分子 CD127。第二类 Treg 是分布在外周中的 Treg, 也被称为诱导型调节性 T 细胞 (Inducible Treg, iTreg), 可在外周通过 TGF- β 或 IFN- γ 单独诱导初始 T 细胞产生, 这类细胞也称为适应性调节 T 细胞 (Adaptive Treg, aTreg), 主要产生 IL-10 和 TGF- β 。aTreg 有两种类型: Tr1 和 Th3 细胞。Tr1 细胞可以在 IL-10、不成熟 DC 反复刺激或抗 CD3 和 CD46 单抗联合刺激等条件下产生^[13]。Tr1 细胞可以大量分泌 IL-10 和 IFN- γ , 并且通过 IL-10 来发挥负调节作用^[14]; Th3 是由自然的 CD4⁺ T 细胞在抗原和 TGF- β 刺激下分化而来, 同时 Th3 通过分泌 TGF- β 抑制免疫反应, 在诱导外周耐受和黏膜免疫中发挥作用^[15-16]。Tr1 和 Th3 等诱导型调节性 T 细胞主要通过分泌可溶性细胞因子或细胞接触依赖机制发挥免疫抑制功能, 而自然调节 T 细胞主要通过细胞接触依赖机制发挥抑制功能。

Treg 在免疫系统中扮演了重要角色, 正常生理条件下, Treg 可以维持细胞外周耐受和调节自身免疫反应^[17]。但在急性感染期和肿瘤消除期, Treg 会抑制效应 T 细胞的活力, 阻碍免疫反应^[18-19]。因此, 研究如何调节 Treg 的功能对于维持机体自身免疫平衡、改善疾病治疗效果具有重要意义。近年来研究者们发现 Treg 表达不同种类的 TLRs 分子^[20], TLRs 介导的信号转导显著影响 Treg 的分化、增殖与功能, 接下来重点介绍一下 TLRs 和 Treg 之间的联系。

3 TLRs 和 Treg

TLRs 信号通路以直接或间接的方式调控 CD4⁺CD25⁺Treg 的功能。间接调控主要通过 APC 介导的 TLRs 信号通路调节 Treg 功能。而 Treg 上的 TLRs 也可以通过与相应配体的结合直接影响自身的功能。相比于其他 CD4⁺ T 细胞, Treg 细胞中的 TLRs 表达水平更高^[21-22], 这提示 Treg 细胞更容易受到 TLR 配体的调控。Caramalho 等比

较分析了 C57BL/6 小鼠 Treg 和 Tconv (Conventional T) 细胞中 TLRs 的表达情况, 结果表明两者均表达 TLR1、TLR2 和 TLR6, 而 TLR4、TLR5、TLR7 和 TLR8 在 Treg 细胞中选择性表达, TLR3 和 TLR9 mRNA 在 CD4⁺ T 细胞亚群中没有检测到^[20]。Gelman 等发现在 BALB/c 小鼠中活化的 CD4⁺ T 细胞表达 TLR3、TLR5 和 TLR9, 但不表达 TLR2 和 TLR4^[23]。这种差异可能是由于使用的检测方法、T 细胞纯度或者小鼠的亚系不同所造成的。Chiffolleau 等发现 TLR9 mRNA 在大鼠 CD4⁺T 细胞中表达, TLR5 mRNA 在 CD4⁺CD25⁺ T 细胞中高度表达^[24]。人类 CD4⁺CD25⁺Treg 表达更高水平的 TLR2、TLR5 和 TLR8^[25]。不同的 TLRs 对 Treg 的影响不同, 作用方式也不同。

3.1 TLR2 对 Treg 细胞的调节

近来很多研究表明, TLR2 在调节 Treg 功能方面发挥了关键作用。TLR2 是 T 细胞的共调控受体^[1], 在体外, 天然免疫细胞 TLR2 分子的活化可以促进细胞分泌 IL-10^[26], 而且与体内抑制炎症反应有直接的关系^[27]。APC 和 Treg 细胞上的 TLR2 都会调控 Treg 的功能。APC 上的 TLR2 活化后会促进细胞分泌 IL-1 和 IL-6, 逆转 CD4⁺CD25⁺ Treg 的低反应性^[28]。Treg 上的 TLR2 激活后直接调控 Treg 功能。研究表明 TLR2 基因缺陷小鼠的 Treg 数目与 TLR4 基因缺陷小鼠相比明显减少^[22], 并且用 TLR2 配体 Pam3Cys 刺激野生小鼠, 不但会使 Treg 数目增加、CD25 分子表达上调, 而且在此期间 Treg 的抑制显型也会短暂消除^[29]。随后的研究表明小鼠 Treg 细胞中的 TLR2 信号激活会增加 Treg 糖酵解和增殖并降低其抑制能力^[30]。而且 Lal 等发现肽聚糖 (Peptidoglycan, PGN) 能够激活 TLR2-MyD88-IRF1 (Interferon regulatory factor 1, 干扰素调节因子 1) 信号通路。IRF1 活化后与 Foxp3 基因座的近端启动子、内含子、增强子区域中存在的 IRF1 反应元件结合, 负调控 Foxp3 的转录, 以抑制 Treg 的功能^[31]。此外, 不同的 TLR2 配体对 Tregs 功能有不同的影响。研

究表明 HSP60 可以通过 Treg 上的 TLR2, 活化信号分子 PKC、PI3K 和 P38 上调 Treg 的抑制功能^[32]。然而人工合成的脂肽 Pam3Cys、FSL-1 和 Pam2Cys 通过增强 AKT/PKB (Protein kinase B, 蛋白激酶 B) 磷酸化减弱 Treg 的抑制功能^[33]。Treg 在受到 TLR2 配体刺激后, 会促使自身分泌 IL-6 和 TGF- β , 不仅会使 Treg 细胞的抑制功能减弱, 还会促进 Treg 细胞向分泌 IL-17 的表型 Th17 分化^[34]。人体内存在 IL-17⁺Foxp3⁺循环记忆样 Treg 细胞, 当机体受到外界病原体感染时, 会激活这类细胞, 增强免疫反应, 更有效地应对感染^[35]。因此 TLR2 活化是一把双刃剑, 一方面限制 Treg 抑制活力, 促进免疫反应的开始; 另一方面增加 Treg 的数量, 阻碍病原体和癌细胞的最终消除。

TLR2 在很多自身免疫病中发挥着重要的作用, TLR2 信号活化提高 Treg 的免疫调节功能进而预防 I 型糖尿病^[36]; 在类风湿性关节炎小鼠模型中, TLR2 敲除鼠 Treg 的抑制功能降低, T 细胞的 IFN- γ 产生大大增加, 显示出更严重的关节炎^[37]。这些研究表明 TLR2 介导的通路在活化 Treg 抑制功能方面起重要作用。

3.2 TLR4 对 Treg 细胞的调节

目前, TLR4 分子对 Treg 细胞功能的影响仍未完全确定。Caramalho 等的研究表明 TLR4 配体脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 可以直接促进 Treg 的生存和增殖, 使 Treg 的免疫抑制功能增强 10 倍。此外 LPS 还能上调如 CD69、CD44、CD38 等 Treg 活性标记分子的表达水平^[20]。随后他们发现用 LPS 处理非肥胖性糖尿病小鼠可以增加 Foxp3⁺和 CD103⁺Treg 的数量和活力, 有助于糖尿病病的防护^[38]。此外, 用不同剂量的 LPS 预先处理小鼠, 会诱发小鼠出现迟发型超敏反应、移植物抗宿主反应、移植排斥反应, 并且显著降低正常免疫应答的水平, 这可能也是由于 LPS 活化 Treg 导致的。随后研究发现在小鼠肠炎模型中, TLR4 和 IL-2 缺陷小鼠的 Treg 表达高水平的炎性细胞因子, 包括 GM-CSF、IFN- γ 和 IL-17, 并且其抑

制活力也有所降低^[39]。这些研究都提示 TLR4 通过与配体的作用直接介导 Treg 的增殖与活化。

TLR4 分子还可以通过间接作用的方式调控 Treg 的功能。Cao 等在肠炎模型中发现 TLR4 以 MyD88 依赖的方式负调节 Treg 的产生^[40], Treg 减少的原因是在受到肠内配体刺激后, 会促进 Foxp3⁺Treg 向 IL-17⁺和 IFN- γ ⁺Foxp3⁺细胞分化。然而 2018 年有研究发现热休克蛋白 HSP60 通过激活 TLR4-Mal (MyD88 衔接样蛋白) 信号转导通路, 促进巨噬细胞中 TGF- β 的表达, 进而诱导 Treg 的产生^[41]。先前也有报道称, LPS 能够通过 TLR4 刺激树突状细胞产生 IL-6, IL-6 直接作用于效应 T 细胞, 使其对于 Treg 的抑制功能产生抗性^[28]。还有研究提示高度纯化的 LPS 并不影响小鼠 Treg 功能^[42]。上述不同的实验结果可能是由于采用的动物模型、实验方法等差异导致的, 同时也提示了 TLR4 对 Treg 功能影响可能还受其他免疫细胞和微环境的制约, 因此, TLR4 介导的 Treg 细胞调控机制还需进一步研究。

3.3 TLR5 对 Treg 细胞的调节

Crellin 等证明人类 CD4⁺CD25⁻ T 细胞和 CD4⁺CD25⁺ T 细胞均表达 TLR5, 在 CD4⁺CD25⁺ T 细胞中 TLR5mRNA 水平明显高于 CD4⁺CD25⁻ T 细胞, 但二者 TLR5 分子蛋白水平无明显差异, 其具体机制还有待探索^[21]。TLR5 配体鞭毛蛋白 (Flagellin)^[43]会直接影响人类 CD4⁺CD25⁺ T 细胞和 CD4⁺CD25⁻ T 细胞的功能, 在黏膜免疫调控中发挥重要作用。多克隆刺激低反应性是 Treg 细胞的主要特征。研究表明 TLR5 配体鞭毛蛋白不改变 Treg 的低反应性。相反, 它作为共刺激分子促进 CD4⁺CD25⁻效应 T 细胞的增殖和 IL-2 的产生。然而鞭毛蛋白在不存在 APC 的情况下, 会增强 Treg 细胞的免疫抑制功能和 Foxp3 的表达, 这种 TLR5 介导的 Treg 的抑制功能增强可能与 Foxp3 表达升高有关^[44]。在小鼠移植肿瘤模型中, 使用鞭毛蛋白处理小鼠会加速肿瘤的生长, 这主要与 IFN- γ 和 IL-4 比率降低以及 Treg 细胞频率增加有

关。但是在肿瘤移植 8–10 d 后,再用鞭毛蛋白处理会抑制肿瘤的生长,此时小鼠 IFN- γ 和 IL-4 比率增加,但 Treg 细胞频率却降低^[45]。这种 TLR5 配体对于 Treg 细胞和效应 T 细胞的影响差异机制还需要进一步的研究。另有研究报道重组鞭毛蛋白 rFliC 给药可延长同种异体移植物的存活时间,这可能与 TLR5 激活 Treg 有关^[46]。综上所述,TLR5 对 Treg 的调节功能主要以激活为主。

3.4 TLR7 对 Treg 细胞的调节

TLR7 在抗病毒防御^[47]和几种系统性红斑狼疮小鼠模型自身免疫中起着重要作用^[48-49]。TLR7 激活可能破坏由 Treg 介导的外周耐受。有研究表明 TLR7 通过促进 APC 分泌 IL-6 的方式使得应答性 T 细胞对 Treg 产生抗性^[50]。Hackl 等发现在小鼠 DC 存在的情况下,TLR7 配体咪喹莫特类似物 S-27609、CL-076 和 R848 可以活化 DC 上的 TLR7,减少分化的 Treg 数目,这一过程依赖于 DC 细胞分泌的 IL-6,它可能诱导 Treg 分化成促炎性辅助性 T 细胞^[51]。因此通过干扰 TLR7 激活或阻断下游效应细胞因子(如 IL-6)来逆转 Foxp3 下调可能是治疗 SLE 的有效策略。Van 等发现在 OVA 诱导的过敏性哮喘小鼠模型中,TLR7 激动剂 R848 能够靶向肺部 Treg,使其数目增加,减缓哮喘症状,TGF- β 在这一过程发挥主要作用^[52]。上述研究提示 TLR7 配体如果直接作用于 Treg 上的 TLR7 可能增强其功能,但如果作用于其他免疫细胞则可能抑制 Treg 的功能。

3.5 TLR8 对 Treg 细胞的调节

近来,Peng 等发现人类 Treg 表达高水平的 TLR8。Poly-G10 寡聚核苷酸和类似的 TLR8 配体 ssRNA40、ssRNA33 与阳离子脂质的复合物都能直接逆转 Treg 的抑制功能,促进初始 CD4⁺ T 细胞的增殖。应用 siRNA 技术敲除 TLR8、MyD88 和白介素-1 受体相关激酶 4 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 4, IRAK4) 后,Treg 的免疫抑制功能不再被 Poly-G10 逆转,该实验进一

步表明 TLR8 对于 Treg 抑制功能的逆转直接依赖于上述效应分子。在 T、B 细胞都缺陷的 Rag1^{-/-} 小鼠肿瘤模型中,转输 TLR8 配体刺激的 Treg 实验发现 TLR8 介导的 Treg 抑制功能的逆转对于抗肿瘤免疫应答有很大的影响^[22],提示通过 TLR8 信号通路抑制 Treg,改变其与效应 T 细胞之间的功能平衡,可能有助于增强针对肿瘤的免疫治疗效果。最近研究表明,人 Treg 细胞和肿瘤细胞中 TLR8 信号的激活可以预防细胞衰老^[53-54]。不仅如此,TLR8 信号对 Treg 的能量代谢也有调节作用,它能选择性地抑制人 Tregs 细胞中葡萄糖摄取和糖酵解过程,逆转 Treg 的抑制作用。在黑色素瘤过继转移 T 细胞治疗模型中,TLR8 信号介导的人 Treg 细胞内葡萄糖代谢和功能的重编程可以增强体内的抗肿瘤免疫力^[55-57]。这些结果均表明 TLR8 介导的信号通路主要抑制 Treg 的功能。

3.6 TLR9 对 Treg 细胞的调节

大鼠 T 细胞与 TLR9 配体预培养实验证实相比于 CD4⁺CD25⁺ T (Treg) 细胞,CD4⁺CD25⁻ T (Tconv) 细胞对 TLR9 配体更敏感。并且经 CPG-ODN2006 处理的 Tconv 对 Treg 细胞的抑制作用产生抵抗,从而间接消除了 Treg 细胞的抑制活力^[58]。在小鼠模型中,TLR9 与自身免疫病 SLE 密切相关,TLR9 缺失导致 SLE 病情加重,这主要与 Treg 抑制能力受损、效应 T 细胞活化有关^[59]。Hall 等发现固有层树突状细胞 (Lamina propria dendritic cell, LpDC) 中 TLR9 激活后通过抑制 Treg 细胞来促进肠道炎症。肠道菌群 DNA 激活 TLR9 可以破坏肠道稳态,促进 Th1 和 Th17 反应,同时抑制 CD4⁺Foxp3⁻ T 细胞向 CD4⁺Foxp3⁺ T 细胞的转化并完全激活 LpDC^[60],该结果可以作为治疗肠炎的新型疗法,并且对于口服疫苗的发展也提供了启示^[61]。通过共生 DNA 或合成的 TLR9 激动剂抑制 Treg 细胞转化可能改善通过口服途径递送的疫苗的免疫原性。这提示 TLR9 对 Treg 的作用受其他免疫细胞和免疫微环境的影响。

4 热休克蛋白直接调节 Treg 的增殖和抑制功能

热休克蛋白家族通过 TLRs 信号通路对于 Treg 的功能有着显著的影响,除了 HSP60 和 HSP70 家族成员^[62]外, HSP90 家族成员 gp96 (Glycoprotein 96), 即 GRP94 (Glucose-regulated protein 94)^[63]也能够直接增强 Treg 的功能。首先, 内源 gp96 是 Treg 谱系维持和抑制功能所必需分子, gp96 缺失会导致 Treg 谱系不稳定性 and 体内抑制功能降低。在 gp96 缺失条件下, Treg 无法维持 Foxp3 的表达水平, 导致产生 IFN- γ 和 IL-17 的 T 细胞数量增加^[64]。其次, 研究表明 gp96 能够通过 TLRs 信号通路影响 Treg 的功能, Dai 等发现将转基因小鼠细胞表面的 gp96 表达量提高, 赋予了其对 LPS 的高反应性, 并通过 TLR4 增强了 Treg 的抑制功能^[65]。更重要的是, gp96 作为分子伴侣蛋白, 在天然免疫和获得性免疫中都发挥着重要的作用。Brent 等发现 gp96 能够选择性地结合细胞表面的 TLR2 和 TLR4^[66]。笔者发现

用低剂量 (20 μg) 的 gp96 免疫小鼠能同时激活效应 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞和 Treg, 但整体以活化效应 T 细胞为主。随着免疫剂量的提高, gp96 介导的免疫活化逐渐向免疫抑制方向转化, 小鼠体内 IL-10 与 TNF- α 比值逐渐升高。高剂量 (100–200 μg) 的 gp96 免疫主要以活化 Treg 细胞为主, Treg 的活化最终抵消了 gp96 诱导的效应 T 细胞活性的增强。进一步发现 gp96 通过与 Treg 细胞表面 TLR2 和 TLR4 作用活化 NF- κB 通路, 诱导 Foxp3 以及 IL-10、TGF- β 1 表达^[67–69]。同时, Binder 等研究发现高剂量的 gp96 通过上调 CD91⁺pDC (Plasmacytoid dendritic cells) 细胞的 Neuropilin-1 (Nrp-1), 促进 pDC 与 Treg 细胞相互作用的稳定性, 进而促进 Treg 细胞的活化^[70](图 2)。

在上述研究基础上, 笔者通过小鼠模型进一步验证高剂量 gp96 免疫活化 Treg, 可有效治疗因免疫过度活化引发的肝衰竭和自身免疫系统引发的 I 型糖尿病^[71], 这些研究提示高剂量 gp96 在治疗自身免疫性疾病中具有广泛的应用潜力。

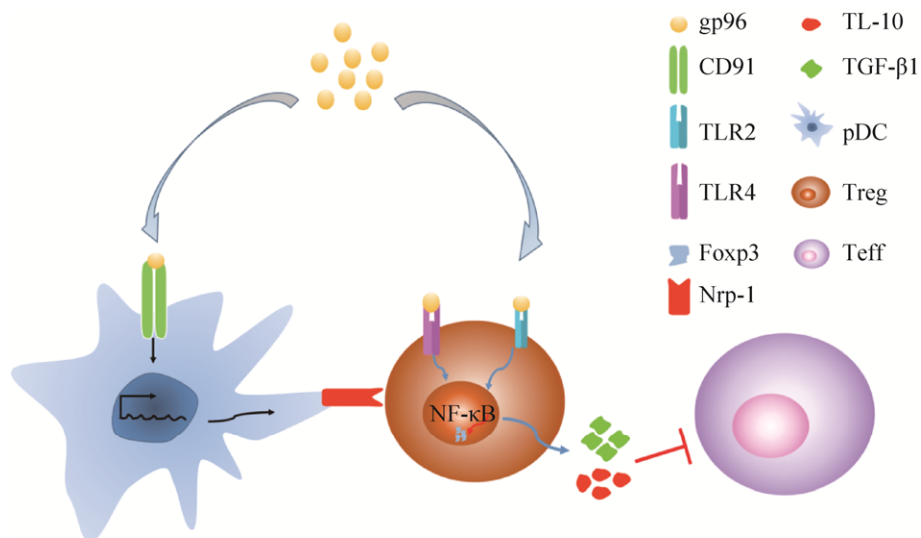


图 2 高剂量 gp96 免疫调节 Treg 的功能

Fig. 2 High-dose gp96 immunization regulates Treg function. High-dose gp96 activates Treg by two aspects. On the one hand, CD91 on the surface of plasma DC cells binds to gp96 to upregulate neuropilin-1 and stabilize the interaction between pDC and Treg. On the other hand, gp96 interacts with TLR2 / 4 to activate the NF- κB signaling pathway. Thus, high dose gp96 enhances immunosuppressive functions of Treg and can treat autoimmune diseases.

5 总结

大量研究表明 TLRs 激动剂可以通过直接或间接的方式调节 Treg 增殖和免疫抑制功能 (图 3)。就直接调节作用而言, 有研究表明 TLR2、TLR4 和 TLR5 等分子活化后可以直接增强 Treg 细胞的免疫抑制活性, 另有研究则表明 TLR2、TLR8 和 TLR9 可以消除或逆转 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的免疫抑制功能, 而 TLR2、TLR4 分子对 Tregs 功能的具体影响至今仍未有明确定论, 需要进一步深入的研究。同时, 除了影响 Treg 的功能外, TLR2、TLR4、TLR7 和 TLR9 在配体的刺激下可促进 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的增殖, 提高 CD4⁺CD25⁺Treg 数量。造成以上研究结果不一致的原因可能有: 首先不同 TLRs 在 Treg 表面或细胞内的表达水平存在很大差异, 细胞中其他分子如 SOCS1、IRAK1、NFκB、TRAF3 也会参与调节 TLR 下游通路^[72], 因此对这些 TLRs 定量分析、细胞内其他调节分子的检测将有助于分析激动剂对 TLRs 介导下游通路激活的强度和对 Treg 功能

的影响; 其次, Treg 表型的不稳定性以及效应 Tregs 不同的亚型^[73]都可能影响 TLRs 下游通路对其抑制功能的作用, 因此有必要深入研究 TLRs 配体或激动剂对不同表型和不同亚型的 Tregs 的影响。就间接调节作用而言, APC 上的 TLR2、TLR7 和 TLR9 活化后通过分泌促炎性细胞因子增强效应细胞的功能, 进而间接减弱 Treg 的抑制功能, 这说明应当在 Tregs 所处的具体免疫环境下了解 TLR 介导的通路对其功能的影响。此外, Foxp3 作为 Treg 标志性转录因子对 Treg 的功能和分化具有重要影响, 但是 TLRs 活化对 Foxp3 表达的调节机制还有待深入研究。热休克蛋白家族多个成员可以通过 TLR2、TLR4 等作用进而增强 Treg 的功能, 可作为潜在新型 TLRs 激动剂治疗自身免疫性疾病, 由于多个以热休克蛋白为基础的药物或疫苗已经用于临床治疗, 其安全性有保障, 因此具有良好的应用前景。综上所述, TLRs 配体或激动剂在调节 Treg 的功能、增殖方面发挥重要作用, 鉴于 Treg 在维持机体免疫稳态和引发免疫耐

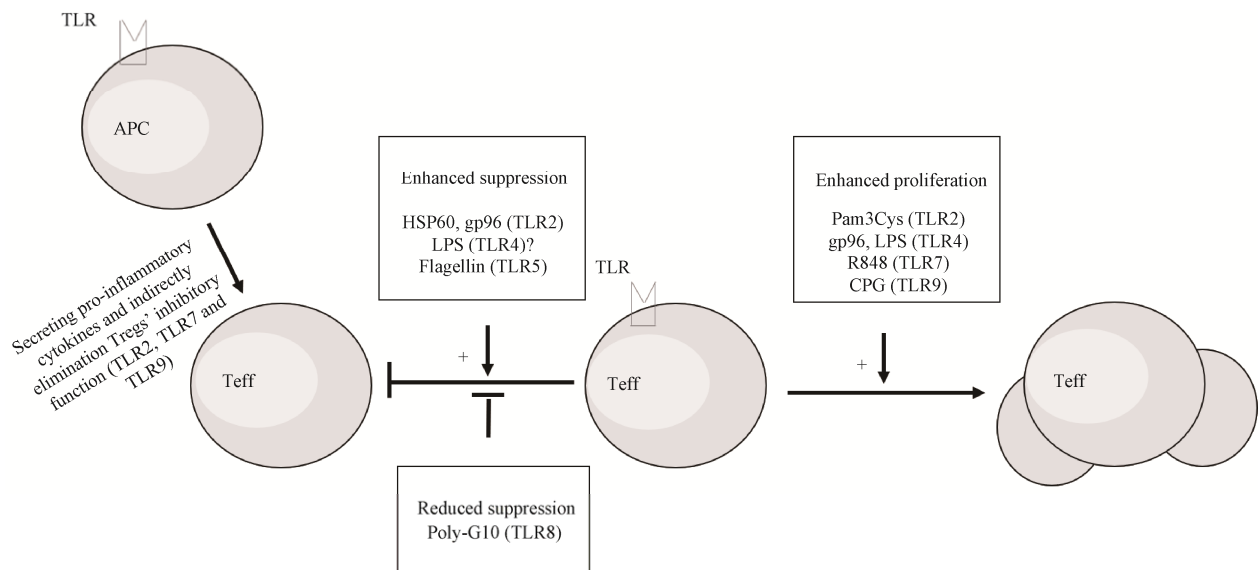


图 3 TLR 活化对 Treg 增殖与功能的调节

Fig. 3 Regulation of proliferation and function of Treg by TLR activation. The activation of TLR2, TLR4 and TLR5 on the surface of Treg directly enhances its immunosuppressive function, while TLR8 ligand reverses its immunosuppressive function. TLR not only affects Treg function, but also its proliferation. Activation of TLR2, TLR4, TLR7 and TLR9 directly promotes Treg proliferation.

受中均发挥关键作用, 因此深入探究不同 TLRs 分子活化和下游通路对于 Treg 免疫功能的影响及作用机制, 开发新型 TLRs 激动剂用于自身免疫病、抗感染免疫和抗肿瘤免疫研究, 不仅具有理论价值, 而且具有实际应用潜力。

REFERENCES

- [1] Jun JC, Jones MB, Oswald DM, et al. T cell-intrinsic TLR2 stimulation promotes IL-10 expression and suppressive activity by CD45RBhi T cells. *PLoS ONE*, 2017, 12(7): e0180688.
- [2] Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, et al. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual Review of Immunology*, 2015, 33: 257–290.
- [3] Franz KM, Kagan JC. Innate immune receptors as competitive determinants of cell fate. *Mol Cell*, 2017, 66(6): 750–760.
- [4] Braza F, Brouard S, Chadban S, et al. Role of TLRs and DAMPs in allograft inflammation and transplant outcomes. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(5): 281–290.
- [5] O'Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(5): 353–364.
- [6] Zhang DK, Zhang GL, Hayden MS, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 2004, 303(5663): 1522–1526.
- [7] Kang YJ, Seit-Nebi A, Davis RJ, et al. Multiple activation mechanisms of p38 α mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2006, 281(36): 26225–26234.
- [8] Deliyanti D, Talia DM, Zhu T, et al. Foxp3⁺ Tregs are recruited to the retina to repair pathological angiogenesis. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 748.
- [9] Shevach EM. Foxp3⁺ T regulatory cells: still many unanswered questions—a perspective after 20 years of study. *Front Immunol*, 2018, 9: 1048.
- [10] Ferrara R, Susini S, Marabelle A. Anti-CTLA-4 immunotherapy does not deplete FOXP3⁺ regulatory T Cells (Tregs) in Human cancers—letter. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(11): 3468–3468.
- [11] Holland CV, Kehoe J, Hailey J, et al. Abstract 3813: development of JNJ-64164711, a low fucose anti-GITR antibody for enhanced depletion of tumor regulatory T cells (Tregs). *Cancer Res*, 2018, 78(13): 3813.
- [12] Doebbler M, Koenig C, Krzyzak L, et al. CD83 expression is essential for Treg cell differentiation and stability. *JCI Insight*, 2018, 3(11): e99712.
- [13] Wakkach A, Fournier N, Brun V, et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*, 2003, 18(5): 605–617.
- [14] Zeng HY, Zhang R, Jin BQ, et al. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell Mol Immunol*, 2015, 12(5): 566–571.
- [15] Fantini MC, Becker C, Monteleone G, et al. Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*, 2004, 172(9): 5149–5153.
- [16] Cai BN, Wan P, Sun HL, et al. Protective effects of enteral nutrition supplemented with crassostrea hongkongensis polysaccharides against 5-fluorouracil-induced intestinal mucosal damage in rats. *J Med Food*, 2018, 21(4): 348–355.
- [17] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, et al. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(7): 490–500.
- [18] Matoba T, Imai M, Ohkura N, et al. Regulatory T cells expressing abundant CTLA-4 on the cell surface with a proliferative gene profile are key features of human head and neck cancer. *Int J Cancer*, 2019, 144(11): 2811–2822.
- [19] Vargas FA, Furness AJS, Solomon I, et al. Fc-optimized anti-CD25 depletes tumor-infiltrating regulatory T cells and synergizes with PD-1 blockade to eradicate established tumors. *Immunity*, 2017, 46(4): 577–586.
- [20] Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J*

- Exp Med, 2003, 197(4): 403–411.
- [21] Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, et al. Human CD4⁺ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J Immunol*, 2005, 175(12): 8051–8059.
- [22] Suttmuller RPM, Den Brok MHMG, Kramer M, et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest*, 2006, 116(2): 485–494.
- [23] Gelman AE, Zhang JD, Choi Y, et al. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4⁺ T cell survival. *J Immunol*, 2004, 172(10): 6065–6073.
- [24] Chiffolleau E, Heslan JM, Heslan M, et al. TLR9 ligand enhances proliferation of rat CD4⁺ T cell and modulates suppressive activity mediated by CD4⁺ CD25⁺ T cell. *Int Immunol*, 2007, 19(2): 193–201.
- [25] Vijay KJ. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: past, present, and future. *Int Immunopharmacol*, 2018, 59: 391–412.
- [26] Re F, Strominger JL. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol*, 2004, 173(12): 7548–7555.
- [27] Wietzorrek G, Drexel M, Trieb M, et al. Anti-inflammatory activity of small-molecule antagonists of Toll-like receptor 2 (TLR2) in mice. *Immunobiology*, 2019, 224(1): 1–9.
- [28] Kubo T, Hatton RD, Oliver J, et al. Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J Immunol*, 2004, 173(12): 7249–7258.
- [29] Hossain MJ, Tanasescu R, Gran B. Innate immune regulation of autoimmunity in multiple sclerosis: Focus on the role of Toll-like receptor 2. *J Neuroimmunol*, 2017, 304: 11–20.
- [30] Gerriets VA, Kishton RJ, Johnson MO, et al. Foxp3 and toll-like receptor signaling balance T_{reg} cell anabolic metabolism for suppression. *Nat Immunol*, 2016, 17(12): 1459–1466.
- [31] Lal G, Yin N, Xu J, et al. Distinct inflammatory signals have physiologically divergent effects on epigenetic regulation of Foxp3 expression and treg function. *Am J Transplant*, 2011, 11(2): 203–214.
- [32] Garib FY, Rizopulu AP. T-regulatory cells as part of strategy of immune evasion by pathogens. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, 80(8): 957–971.
- [33] Oberg HH, Ly TT, Ussat S, et al. Differential but direct abolishment of human regulatory T cell suppressive capacity by various TLR2 ligands. *J Immunol*, 2010, 184(9): 4733–4740.
- [34] Nyirenda MH, Sanvito L, Darlington PJ, et al. TLR2 stimulation drives human naive and effector regulatory T cells into a Th17-like phenotype with reduced suppressive function. *J Immunol*, 2011, 187(5): 2278–2290.
- [35] Ayyoub M, Deknuydt F, Raimbaud I, et al. Human memory FOXP3⁺ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the TH17 lineage-specific transcription factor ROR γ t. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(21): 8635–8640.
- [36] Filippi CM, Ehrhardt K, Estes EA, et al. TLR2 signaling improves immunoregulation to prevent type 1 diabetes. *Eur J Immunol*, 2011, 41(5): 1399–1409.
- [37] Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LAB, Koenders MI, et al. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest*, 2008, 118(1): 205–216.
- [38] Caramalho I, Rodrigues-Duarte L, Perez A, et al. Regulatory T cells contribute to diabetes protection in lipopolysaccharide-treated non-obese diabetic mice. *Scand J Immunol*, 2011, 74(6): 585–595.
- [39] Matharu KS, Mizoguchi E, Cotoner CA, et al. Toll-like receptor 4-mediated regulation of spontaneous *Helicobacter*-dependent colitis in IL-10-deficient mice. *Gastroenterology*, 2009, 137(4): 1380–1390.e3.
- [40] Cao AT, Yao SX, Stefka AT, et al. TLR4 regulates IFN- γ and IL-17 production by both thymic and induced Foxp3⁺ Tregs during intestinal inflammation. *J Leukocyte Biol*, 2014, 96(5): 895–905.
- [41] Zhou S, Qi QQ, Wang XF, et al. Sj HSP 60 induces CD4⁺ CD 25⁺ Foxp3⁺ Tregs via TLR 4-Mal-driven

- production of TGF- β in macrophages. *Immunol Cell Biol*, 2018, 96(9): 958–968.
- [42] Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, et al. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 3029–3034.
- [43] Song WS, Jeon YJ, Namgung B, et al. A conserved TLR5 binding and activation hot spot on flagellin. 2017, 7: 40878.
- [44] Ellenbroek GHJM, Van Puijvelde GHM, Anas AA, et al. Leukocyte TLR5 deficiency inhibits atherosclerosis by reduced macrophage recruitment and defective T-cell responsiveness. *Sci Rep*, 2017, 7: 42688.
- [45] Sfondrini L, Rossini A, Besusso D, et al. Antitumor activity of the TLR-5 ligand flagellin in mouse models of cancer. *J Immunol*, 2006, 176(11): 6624–6630.
- [46] Hao J, Zhang C, Liang T, et al. rFliC prolongs allograft survival in association with the activation of recipient Tregs in a TLR5-dependent manner. *Cell Mol Immunol*, 2014, 11(2): 206–214.
- [47] Buschow SI, Biesta PJ, Groothuismink ZMA, et al. TLR7 polymorphism, sex and chronic HBV infection influence plasmacytoid DC maturation by TLR7 ligands. *Antiviral Res*, 2018, 157: 27–37.
- [48] Kazazian NH, Wang YW, Roussel-Queval A, et al. Lupus autoimmunity and metabolic parameters are exacerbated upon high fat diet-induced obesity due to TLR7 signaling. *Front Immunol*, 2019, 10: 2015.
- [49] Panda SK, Facchinetti V, Voynova E, et al. Galectin-9 inhibits TLR7-mediated autoimmunity in murine lupus models. *J Clin Invest*, 2018, 128(5): 1873–1887.
- [50] Anz D, Koelzer VH, Moder S, et al. Immunostimulatory RNA blocks suppression by regulatory T cells. *J Immunol*, 2010, 184(2): 939–946.
- [51] Hackl D, Loschko J, Sparwasser T, et al. Activation of dendritic cells via TLR7 reduces Foxp3 expression and suppressive function in induced Tregs. *Eur J Immunol*, 2011, 41(5): 1334–1343.
- [52] Van LP, Bardel E, Gregoire S, et al. Treatment with the TLR7 agonist R848 induces regulatory T-cell-mediated suppression of established asthma symptoms. *Eur J Immunol*, 2011, 41(7): 1992–1999.
- [53] Ye J, Huang XX, Hsueh EC, et al. Human regulatory T cells induce T-lymphocyte senescence. *Blood*, 2012, 120(10): 2021–2031.
- [54] Ye J, Ma CL, Hsueh EC, et al. TLR8 signaling enhances tumor immunity by preventing tumor-induced T-cell senescence. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(10): 1294–1311.
- [55] Xia LY, Liu X, Sanders KL, et al. TLR8-mediated metabolic control of human treg function: a mechanistic target for cancer immunotherapy. *Cell Metab*, 2019, 29(1): 103–123.e5.
- [56] Liu X, Li LY, Peng GY. TLR8 reprograms human Treg metabolism and function. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(17): 6614–6615.
- [57] Zeng H. Exploiting human T_{regs}' sweet tooth to improve cancer immunotherapy. *Sci Translat Med*, 2018, 10(466): eaav6058.
- [58] Urry Z, Xystrakis E, Richards DF, et al. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. *J Clin Invest*, 2009, 119(2): 387–398.
- [59] La Cava A. T-regulatory cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2008, 17(5): 421–425.
- [60] Hall JA, Bouladoux N, Sun CM, et al. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. *Immunity*, 2008, 29(4): 637–649.
- [61] Mills KHG. TLR9 turns the tide on Treg cells. *Immunity*, 2008, 29(4): 518–520.
- [62] Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, et al. Heat shock protein 60 enhances CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest*, 2006, 116(7): 2022–2032.
- [63] Cala SE, Jones LR. Grp94 Resides within cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles and is phosphorylated by casein kinase II. *J Biol Chem*, 1994, 269(8): 5926–5931.
- [64] Zhang YL, Wu BX, Metelli A, et al. GP96 is a GARP chaperone and controls regulatory T cell functions. *J*

- Clin Invest, 2015, 125(2): 859–869.
- [65] Dai J, Liu B, Ngoi SM, et al. TLR4 hyperresponsiveness via cell surface expression of heat shock protein gp96 potentiates suppressive function of regulatory T cells. *J Immunol*, 2007, 178(5): 3219–3225.
- [66] Randow F, Seed B. Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(10): 891–896.
- [67] Li XH, Liu Z, Yan XL, et al. Induction of regulatory T cells by high-dose gp96 Suppresses murine liver immune hyperactivation. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e68997.
- [68] Liu Z, Li XH, Qiu LP, et al. Treg suppress CTL responses upon immunization with HSP gp96. *Eur J Immunol*, 2009, 39(11): 3110–3120.
- [69] Liu WW, Chen M, Li XH, et al. Interaction of toll-like receptors with the molecular chaperone Gp96 is essential for its activation of cytotoxic T lymphocyte response. *PLoS ONE*, 2016, 11(5): e0155202.
- [70] Kinner-Bibeau LB, Sedlacek AL, Messmer MN, et al. HSPs drive dichotomous T-cell immune responses via DNA methylome remodelling in antigen presenting cells. *Nat Commun*, 2017, 8: 15648.
- [71] Chen M, Li XH, Zheng HG, et al. High-dose heat shock protein gp96 immunization prevents type 1 diabetes via inducing regulatory T cells. *Chin J Biotechnol*, 2016, 32(12): 1685–1693 (in Chinese). 陈密, 李星辉, 郑华国, 等. 高剂量热休克蛋白 gp96 通过激活调节性 T 细胞预防 I 型糖尿病. *生物工程学报*, 2016, 32(12): 1685–1693.
- [72] Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, et al. Toll-like receptors: significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int Rev Immunol*, 2018, 37(1): 20–36.
- [73] Zhang ZM, Zhou XY. Foxp3 instability helps tTregs distinguish self and non-self. *Front Immunol*, 2019, 10: 2226.

(本文责编 郝丽芳)