

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720091152166

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

环氧二烯 Mycoepoxydiene 对泡沫细胞形成的抑制作用的研究

The inhibitory effect of Mycoepoxydiene on the formation of foam cells

李 洋

指导教师姓名: 俞春东 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2012 年 4 月 27 日

论文答辩时间: 2012 年 月 日

学位授予日期: 2012 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	II
第一章 前言	1
1.1 动脉粥样硬化	3
1.1.1 动脉粥样硬化, 泡沫细胞与炎症.....	1
1.1.2 固有免疫.....	2
1.1.2.1 机体免疫.....	2
1.1.2.2 固有免疫识别系统.....	3
1.1.2.3 Toll 样受体家族及功能.....	3
1.1.2.4 TLR 信号通路	5
1.1.2.4.1 MyD88 依赖型信号通路	6
1.1.2.4.2 MyD88 非依赖型信号通路/TRIF 依赖型信号通路	7
1.2 脂类在动脉粥样硬化中的作用	8
1.3 抗动脉粥样硬化药物的研发及应用	10
1.4 本文立题背景、内容和意义	10
第二章 材料和方法	12
2.1 材料	12
2.1.1 细胞与小鼠	12
2.1.1.1 细胞.....	12
2.1.1.2 小鼠.....	12
2.1.2 主要试剂.....	12
2.1.3 主要仪器.....	13
2.2 方法	14
2.2.1 RNA 相关实验及方法	14
2.2.1.1 RNA 的提取	14
2.2.1.2 反转录合成 cDNA	15

2.2.1.3 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)	15
2.2.2 蛋白质相关实验及方法.....	16
2.2.2.1 蛋白质样品制备.....	16
2.2.2.2 蛋白质浓度测定 (BCA 法)	16
2.2.2.3 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 分析.....	17
2.2.3 细胞相关实验及方法.....	18
2.2.3.1 细胞培养及传代.....	18
2.2.3.2 小鼠腹腔巨噬细胞的提取.....	18
2.2.3.3 泡沫细胞形成的检测.....	19
2.2.3.4 细胞内 ROS 水平的测定.....	19
2.2.4 其他实验及方法.....	20
2.2.4.1 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等细胞因子的测定 (ELISA 法)	20
2.2.4.2 低密度脂蛋白的提取.....	21
第三章 结果与讨论	22
3.1 实验结果	22
3.1.1 MED 强烈抑制 RAW264.7 细胞和原代巨噬细胞转化为泡沫细胞	22
3.1.2 MED 抑制泡沫细胞形成的时间范围.....	25
3.1.3 MED 可有效抑制 ROS 的表达水平	26
3.1.4 MED 明显抑制 LPS 诱导 NOX-1 的 mRNA 水平	27
3.1.5 MED 显著抑制 ox-LDL 诱导的泡沫细胞的形成.....	28
3.1.6 MED 显著抑制前炎症细胞因子的分泌.....	30
3.1.7 MED 有效抑制 ox-LDL 诱导的前炎症因子 mRNA 的表达	31
3.1.8 MED 显著抑制 ox-LDL 诱导的 NF- κ B 信号通路途径	32
3.2 分析与讨论	33
参考文献	34
致谢.....	41

CONTENTS

ABSTRACT (CHINESE)	I
ABSTRACT (ENGLISH)	II
1 INTRODUCTION	1
1.1 ATHEROSCLEROSIS	1
1.1.1 ATHEROSCLEROSIS, FOAM CELLS AND INFLAMMATORY	1
1.1.2 INNATE IMMUNE SYSTEM	2
1.1.2.1 IMMUNE SYSTEM	2
1.1.2.2 PATHOGEN RECOGNITION IN INNATE IMMUNE SYSTEM.....	3
1.1.2.3 TOLL LIKE RECEPTOR FAMILY MEMBERS AND FUNCTION ...	3
1.1.2.4 TOLL LIKE RECEPTORS SIGNALING	5
1.1.2.4.1 MYD88-DEPENDENT SIGNALING	6
1.1.2.4.2 MYD88-INDEPENDENT/TRIF-DEPENDENT SIGNALING.....	7
1.2 THE FUNCTION OF LIPIDS IN ATHEROSCLEROSIS	8
1.3 EXPLORATION AND APPLICATION OF ANTI- ATHEROSCLEROSIS DRUGS	10
1.4 BACKGROUND, CONTENT AND SIGNIFICANCE OF THIS THESIS	10
2 MATERIALS AND METHODS	12
2.1 MATERIALS	12
2.1.1 CELLS AND MICE.....	12
2.1.1.1 CELLS	12
2.1.1.2 MICE.....	12
2.1.2 MAJOR REAGENTS	12
2.1.3 MAJOR EQUIPMENTS.....	13
2.2 METHODS	14
2.2.1 RNA EXPERIMENTS.....	14
2.2.1.1 EXTRACTION OF RNA	14
2.2.1.2 REVERSE TRANSCRIPTION	15
2.2.1.3 REAL-TIME PCR	15

2.2.2 PROTEIN EXPERIMENTS	16
2.2.2.1 PREPARATION OF PROTEIN SAMPLES	16
2.2.2.2 MEASUREMENT OF PROTEIN CONCENTRATIONS	16
2.2.2.3 SDS-PAGE AND WESTM BLOTTING	17
2.2.3 CELL EXPERIMENTS	18
2.2.3.1 CELL CULTURE AND GENERATION	18
2.2.3.2 ISOLATION OF PERITONEAL MACROPHAGES	18
2.2.3.3 OIL RED O STAINING	19
2.2.3.4 DETECTION OF INTRACELLULAR ROS	19
2.2.4 OTHER EXPERIMENTS	20
2.2.4.1 MEASUREMENT OF TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 (ELISA)	20
2.2.4.2 EXTRACTION OF LOW-DENSITY LIPOPROTEIN	21
3 RESULTS AND DISCUSSION	22
3.1 RESULTS	22
3.1.1 MED STRONGLY INHIBITS THE FORMATION OF FOAM CELLS DIFFERENTIATED FROM RAW 264.7 AND MACROPHAGES	22
3.1.2 THE SPAN OF TIME THAT MED CAN INHIBIT FOAM CELL FORMATION	25
3.1.3 MED EFFECTIVELY DECREASES THE LEVEL OF ROS	26
3.1.4 MED MARKEDLY REPRESSES THE EXPRESSION OF NOX-1 STIMULATED BY LPS	27
3.1.5 MED SIGNIFICANTLY INHIBITS OX-LDL INDUCED FOAM CELLS FORMATION	28
3.1.6 MED EFFECTIVELY INHIBITS THE SECRETION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES	30
3.1.7 MED NOTABLY REDUCES THE MRNA LEVEL OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES INDUCED BY OX-LDL	31
3.1.8 MED SIGNIFICANTLY DOWNREGULATES NF- κ B SIGNALING STIMULATED BY OX-LDL	32
3.2 DISCUSSION	33
4 REFERENCES	34
5 ACKNOWLEDGEMENT	41

摘要

环氧二烯 (MED) 是海洋木栖真菌菜豆间坐壳菌 (*Diaporthe phaseolorum*) 的次级代谢产物, 是一个以含有氧桥的八元环二烯为骨架的化合物。在早期研究中发现 MED 具有良好的抗肿瘤和抗炎活性, 但是该化合物是否能在动脉粥样硬化的发生过程中起作用还不清楚。我们应用脂多糖 (LPS) 和低密度脂蛋白 (LDL) 或者氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导动脉粥样硬化早期特征性病理细胞泡沫细胞, 通过细胞水平的实验来揭示 MED 在动脉粥样硬化发展中的缓解作用。

首先, 我们通过对脂滴的染色确定 MED 对巨噬细胞分化为泡沫细胞是有抑制作用的。由于动脉粥样硬化早期与过激的炎症反应密切相关, 会促使活性氧簇 (ROS) 大量释放, 而 ROS 的水平也可以被 MED 通过对 NADPH 氧化酶-1 (NOX-1) 的调节有效地控制。修饰型低密度脂蛋白对机体刺激后会产生大量的前炎症细胞因子, 如 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β , 我们发现 MED 通过下调其 mRNA 的转录, 从而下调了其蛋白的合成。接着我们进一步研究了 MED 的作用机理, 对于 ox-LDL 引起的 NF- κ B 信号通路的激活, MED 表现出极为明显的抑制作用。

综上所述, MED 通过抑制修饰型低密度脂蛋白进入巨噬细胞中引起的 NF- κ B 信号通路的激活, 下调其下游的前炎症因子的表达水平, 对活性氧的释放, 从而达到控制泡沫细胞形成, 进而控制动脉粥样硬化发展的目的。本研究为进一步将 MED 开发成为一种可能的抗动脉粥样硬化药物提供了一定的理论依据。

关键词: 环氧二烯; 泡沫细胞; 动脉粥样硬化; 炎症反应

Abstract

Mycoepoxydiene (MED) is a compound which was extracted from *Diaporthe phaseolorum* as a secondary metabolic product. Early study has revealed that MED has a notable effect on anti-cancer and anti-inflammatory. However, it is still not clear about whether it would affect the process of atherosclerosis. Therefore, we use lipopolysaccharide (LPS) and low-density lipoprotein (LDL) or oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) to induce differentiation from macrophages to foam cells, which are the characteristic pathological cells of atherosclerosis, and investigate the mechanism of MED during this process through cellular experiments.

First of all, through Oil Red O staining, we observed that MED can inhibit the formation of foam cells differentiated from macrophages. It is clearly understood that early atherosclerosis is closely connected with intense inflammatory and the abnormal level of ROS. MED effectively ameliorates the change of ROS via regulating the expression of NADPH oxidase-1 (NOX-1). Modified LDL can stimulate the organism to secrete large amounts of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-6 and IL-1 β . We detected that MED significantly attenuates their protein levels through inhibiting their mRNA transcription. Moreover, we found that MED shows marked inhibition on ox-LDL induced activation of NF- κ B signaling pathway.

In sum, MED inhibits activation of NF- κ B signaling pathway induced by modified LDL, and down-regulates the expression of pro-inflammatory cytokines and the release of ROS. In such way, MED plays a distinctive role in controlling the formation of foam cells, and defending atherosclerosis. Our data suggests that MED could be explored as a new anti-atherosclerosis drug.

Key words: MED; foam cells; atherosclerosis; inflammation;

第一章 前言

1.1 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化为一种慢性疾病,是由脂类堆积及发生在动脉内膜的炎症反应引发的,早期表现为巨噬细胞通过吞噬大量修饰型的低密度脂蛋白分化为泡沫细胞^[1]。动脉粥样硬化形成中最重要的是固有免疫系统所起的作用,包括模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs)的激活及炎症的产生。PRRs 其中一种为胞吞作用受体,如清道夫受体(scavenge receptors)介导抗原的摄取和脂蛋白的清除,促进泡沫细胞的形成^[2]。而另一种为信号通路受体,如 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)与 PRRs 的相互作用,通过下游信号传递,从而诱导动脉粥样硬化。

1.1.1 动脉粥样硬化, 泡沫细胞与炎症

动脉粥样硬化是发生在动脉壁的炎症反应^[3],固有免疫系统在其发生发展的整个过程中都发挥着重要的角色,从早期的脂质条纹的产生到后期的由于脆弱的斑块断裂引起的急性冠状动脉阻塞^[4]。炎症反应在细胞水平(如巨噬细胞、神经细胞和淋巴细胞),或者亚细胞水平(如分泌到细胞外的和细胞内的酶,膜联蛋白)都可发生^[5]。在动脉粥样硬化形成的过程中,炎症使内膜系统的紊乱更加恶化。另外,在组织损伤的过程中,疾病感染和内源危险信号都会加剧,从而也加重了组织的炎症反应。

内皮细胞被堆积的修饰型低密度脂蛋白激活,而刺激粘附分子,主要是血管细胞粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule, VCAM-1)的表达^[6,7],同时一氧化氮水平减弱,而活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)大量产生^[8]。激活的内皮细胞主要存在于动脉粥样硬化容易发生的部位。伴随着血压的升高,单核细胞和 T 细胞向血管壁迁移^[9,10],并与 VCAM-1 结合。这种形式的白细胞常发现于动脉粥样硬化的早期斑块中^[11]。

免疫细胞的募集是动脉粥样硬化早期的重要步骤,并随着趋化因子的释放而加剧。之后,多种细胞因子的大量产生加速了免疫细胞的募集,从而引发炎症。

内皮细胞和平滑肌细胞的损伤处释放出巨噬细胞集落刺激因子（macrophage colony-stimulation factor, M-CSF），刺激了单核细胞分化为巨噬细胞^[12]。这一步骤是动脉粥样硬化形成的关键，并伴随着在吞噬作用中和炎症过程中起作用的固有免疫受体水平的升高。紧接着，修饰型低密度脂蛋白被巨噬细胞吞噬，伴随着胞浆内的胆固醇的积累，巨噬细胞转变为泡沫细胞，而泡沫细胞即为动脉粥样硬化斑块内出现的特征性病理细胞，当它们死亡时，它们的残骸和胆固醇形成不能被移除的细胞外的空泡。随着疾病的进一步进展，损伤加剧，坏死钙化。而这种斑块是不稳定的，斑块内的炎症细胞可使斑块的断裂加剧并达到顶峰^[13, 14]，而造成血栓，从而引发急性动脉栓塞和心肌梗塞或中风^[2]。

在动脉粥样硬化形成的过程中，固有免疫激活从而诱发的炎症反应是其最基本的特征^[4]，同时有赖于模式识别受体和 Toll 样受体共同发挥用来检测和清除体内有害物质。

1.1.2 固有免疫

1.1.2.1 机体免疫

人类抵抗微生物入侵的免疫系统可分为三道防线：（1）皮肤和粘膜等构成的生理学屏障，（2）固有免疫，（3）获得性免疫。其中任何一道防线出现问题都会提高人体对微生物感染的易感性。

生理学或解剖学屏障是人体抵抗病原体入侵的至关重要的第一道防线。这道防线包括皮肤，粘膜，唾液，溶菌酶等。其重要性在于即使拥有完善的固有免疫和获得性免疫，都不能弥补生理学或解剖学屏障缺失导致的机体极高的病原体易感性^[15]。

固有免疫强化了机体对自身的保护。固有免疫系统仅拥有有限的识别受体，但却能识别多种有保守组成成分的病原体，在短短几分钟内，固有免疫即可产生保护性的炎症反应。它通过造血细胞和非造血细胞来完成保护功能，造血细胞免疫应答包括巨噬细胞、树突细胞、肥大细胞、中性粒细胞、酸性粒细胞、自然杀伤细胞（Natural kill cells, NK cells）、NK T 细胞。固有免疫还通过体液成分来加强免疫反应，如补体蛋白，LPS 结合蛋白，C-反应蛋白和其他的穿透素，胶原凝集素，抵御素等。此外，固有免疫还在接下来的获得性免疫应答中发挥着重要

作用。T 细胞和 B 细胞是获得性免疫中主要的免疫细胞。与固有免疫系统不同的是，获得性免疫会产生极丰富的，多种多样的识别受体，来识别任何抗原。但这也可能由于基因表达的紊乱而使 T 细胞和 B 细胞产生不需要的受体，从而增加自身免疫病等发生的风险。

1.1.2.2 固有免疫识别系统

固有免疫中的炎症反应在对抗外来病原入侵时，组织内的巨噬细胞、成纤维细胞、肥大细胞、和树突细胞，以及白细胞、单核细胞和中性粒细胞等都能够通过细胞内或者细胞表面表达的模式识别受体（PRRs）识别病原体的侵袭和细胞损伤。PRRs 能够直接或间接地检测到微生物病原体分泌的可被免疫系统识别的特异的分子模式，即病原体偶联分子模式（pathogen associated molecular patterns, PAMPs）^[16]，包括微生物核酸、脂蛋白和糖类，或者损伤偶连分子模式（damage-associated molecular patterns, DAMPs），从而被激活。激活的 PRRs 寡聚体化并组装成多亚基的大型复合体，启动下游信号通路^[17]。

PRRs 有两种主要分类：一种是主要吞噬抗原的胞吞受体，另一种是前炎症信号通路受体，包括 Toll 样受体（TLRs）和胞浆受体^[18]，配体与这些受体结合会刺激多种前炎症基因的表达。而胞吞受体则介导血液内脂蛋白、细胞碎片等的清除，并呈递给抗原呈递细胞（antigen-presenting cells, APCs）。这一环节涉及多种多样的受体，如清道夫受体（SRs）、C 类血凝素和调理素受体。配体与此类受体结合时，并不能引起前炎症细胞因子的表达。在动脉粥样硬化中，胞吞受体，主要是 SR-A 和 CD36 参与氧化型低密度脂蛋白（oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL）的清除和泡沫细胞的形成。

1.1.2.3 Toll 样受体家族及功能

Toll 样受体（TLRs）是一种重要的前炎症信号通路受体 PRRs，协调固有免疫和获得性免疫^[18]。TLRs 被认为在从线虫到哺乳动物体内都是保守的^[19-21]。TLR 家族最早被认为在果蝇胚胎背腹极性的形成中起着重要的作用，之后发现在苍蝇抵抗真菌的应答中也发挥着核心的功能^[22]。至今为止，在哺乳动物中发现 TLR 家族含有 12 个成员，可以识别广谱的微生物结构。TLRs 的激活可通过诱导抗原呈递所必需的炎症因子、趋化因子和共激活分子引发急性的炎症反应应答。另外，

TLR 的激活会上调内皮细胞粘附分子的水平，释放趋化因子以吸引更多的效应细胞到达靶位点^[2]。

TLRs 可以被分成多个亚家族。TLR1、TLR2 和 TLR6 构成的亚家族可识别革兰氏阳性菌细胞壁的脂质和糖类复合物。TLR2 在识别肽聚糖、磷脂壁酸和脂蛋白方面发挥着重要功能^[23]，它与 TLR1 或 TLR6 形成的异二聚体可识别多种脂蛋白的脂类部分^[24, 25]。研究表明，TLR1-TLR2 异二聚体可以识别脂蛋白三酯^[25]，而 TLR2-TLR6 异二聚体可识别脂蛋白二酯和磷脂壁酸^[24]。TLR2 同时可参与真菌病原体的识别，如念珠菌^[26]。另外，Dectin-1，一种细胞内结构域含有 ITAM 结构域的 C 类血凝素可以与 TLR2 相互作用来识别酵母病原体^[27]。

TLR4 可以识别脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)，一种革兰氏阴性菌细胞壁的成分^[28, 29]。LPS 的脂质部分 lipid A 负责 LPS 的免疫激活。TLR4 识别 LPS 还需要 MD-2^[30]，CD14^[31]和 LPS 结合蛋白 (LPS-binding protein, LBP)^[32]等分子的协同作用。研究表明，LPS 诱导形成的 MD-2 和 TLR4 的异源二聚体在信号转到中发挥着关键的作用^[33]。

另外一些 TLRs 可以识别蛋白。如 TLR5 是在小肠固有层树突细胞 (DCs of the lamina propria, LPDCs) 中高表达的受体，它可识别鞭毛蛋白^[34, 35]。在对鞭毛蛋白的应答中，LPDCs 诱导 B 细胞分化为产生 IgA 的胞浆细胞，使 T 细胞分化为抗原特异性的 Th17 和 Th1 细胞^[36]。TLR11 只在小鼠中而不在人体中表达，与 TLR5 有很高的同源性，可识别寄生虫带有的肌动蛋白^[37]。TLR11 还参与大肠埃希菌的识别，虽然识别的位置至今还不确定^[38]。

TLR3, 7, 8 和 9 是核酸及其衍生物的受体^[39-41]。这些 TLRs 定位于胞浆膜系统如内涵体和内核溶酶体等，反之，之前提到的 TLRs 都定位于细胞表面^[42]。TLR3 识别聚肌胞苷酸 (polyinosine-polycytidylic acid, poly [I:C])，一种双链 RNA 类似物，可以在单链 RNA 复制时模拟病毒双链 RNA。鼠源的 TLR7 和人源的 TLR8 都可识别抗病毒咪唑并喹啉复合物，一些鸟嘌呤核酸类似物和病毒单链 RNA^[42]。另一方面，TLR9 是非甲基化 CpG 结构域 DNA (DNA with an unmethylated CpG-motif, CpG-DNA) 的受体^[40]。非甲基化的 CpG 结构域大量存在于细菌 DNA 中，而哺乳动物基因组 DNA 中的 CpG 结构域含量较低而且它们大多是甲基化的^[43]。在 TLR9 依赖型模式中，CpG-DNA 可以诱导强烈的 I 型助

体 T 反应。病毒 DNA 也可以激活依赖 TLR9 的宿主免疫反应。

很多证据表明 TLRs 在细胞中的位置决定了它们对配体识别的功能^[44]。由于自身核苷酸是 TLRs 重要的配体并可导致自身免疫反应，因此 TLRs 对自身核苷酸的识别被认为需要尽量避免。虽然 TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 和 TLR6 位于细胞质膜，而 TLR3, TLR7 和 TLR9 主要定位于线粒体膜，但自身核苷酸在被 TLRs 识别之前会由细胞外和细胞核内的 DNA 酶降解，识别核苷酸的 TLRs 再被从 ER 募集到内核溶酶体内。研究表明，UNC93B1（一种含有 12 个跨膜结构域的线粒体蛋白）负责 TLR3, TLR7 和 TLR9 等 TLRs 从 ER 转运到内核溶酶体^[45, 46]。当 TLR9 被从线粒体募集到内核溶酶体时，它会遇到内核溶酶体的组织蛋白酶，而例如组织蛋白酶 B, K 和 L 都是 TLR9 识别 CpG-DNA 所必需的^[47]。虽然 TLR7 是胞内呈酸性所必需的，但是否 TLR7 也在内核溶酶体内被切割还不清楚。

TLR7 和 TLR9 都对胞浆树突细胞（plasmacytoid DCs, pDCs）中由病毒诱导产生的 I 型 IFN 非常重要^[48]。病毒核苷酸在其被吞噬后，可与 pDCs 中的 TLR7 和 TLR9 相互作用。另一方面，一旦病毒入侵 pDCs，即被呈递到胞浆，接着运送到内核溶酶体，在这里 TLR7 和 TLR9 被募集并识别病毒激活下游信号。pDCs 利用内吞作用使自体蛋白和损坏的细胞器在自噬体中被降解^[49]。在没有自吞作用相关蛋白 ATG5 存在的条件下，pDCs 在病毒感染后不能产生一型 IFN，证明病毒是在胞浆被内噬体吞噬，然后才被溶酶体降解。同时，在对 CpG-DNA 的识别中 ATG5 也是必需的。因此，自吞作用可以分别调控与 CpG-DNA 相关的信号通路以及 TLR9 介导的 pDCs 内的信号通路。

TLR 介导的微生物识别是非常重要的自体抵抗病原的反应，但过度的反应却可能引起有害的感染性休克综合症。

1.1.2.4 TLR 信号通路

TLRs 由多个亮氨酸重复体（leucin-rich repeats, LRRs）和一个 Toll 白细胞介素（interleukin, IL）-1 受体同源体（Toll-interleukin-1 receptor homology, TIR）结构域组成^[18]。TLR1, 2, 4, 5 和 6 的 LRRs 位于细胞外部，而 TLR3, 7, 8 和 9 的 LRRs 位于细胞内薄膜系统。而所有的 TLRs 的 TIR 结构域都位于胞浆。

TLRs 识别 PAMPs 引发多种基因转录水平的上调，与 TLRs 和细胞的种类都

密切相关, TLRs 激活诱导的不同的信号通路又根据 TIR 结构域含有的衔接分子不同会募集相应的 TLRs^[50]。一共有 5 种 TIR 结构域的衔接分子, 其中包括 MyD88, 还有 TRIF, TIRAP/Mal, TRAM (TRIF-related adaptor molecule) 和 SARM (Sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein)。TLR 信号通路可依据衔接分子是 MyD88 还是 TRIF 大致分为两种^[51], MyD88 参与了除 TLR3 以外的 TLR1, 2, 4, 5, 6, 7 和 9 介导的信号通路^[39, 52, 53], 而 TRIF 则参与了 TLR3 和 MyD88 非依赖型 TLR4 信号通路^[54] (图 1)。

1.1.2.4.1 MyD88 依赖型信号通路

MyD88, 是由其自身的 TIR 结构域和死亡结构域 (death domain, DD) 构成的分子结构, 它可以与 TLRs 的 TIR 结构域相互结合^[55]。

TLR2 和 TLR4 信号通路需要 TIRAP/Mal 来桥接 TLR 和 MyD88, MyD88 与 IRAK (IL-1R-associated kinase, IRAK) -4 相互作用, 使 IRAK-4 激活 IRAK 家族的其他成员, IRAK-1 和 IRAK-2^[56], 而 IRAK-1 和 IRAK-4 与 MyD88 通过一个 DD-DD 偶联而发生相互作用^[57, 58]。紧接着, IRAKs 与 MyD88 解离, 而与 TRAF6 (TNFR-associated factor 6, TRAF6) (一种 E3 泛素蛋白连接酶) 结合, 一起与 E2 泛素连接酶复合物的组成成分 Ubc13 和 Uev1A 相互作用^[59]。TRAF6 催化赖氨酸 63 (K63) 连接聚泛素化链的形成, 并产生一个非结合的自由聚泛素化链^[60]。从而诱导复合体 TAK1 (TGF- β -activated kinase 1), TAB1 (TAK1-binding protein 1), TAB2 和 TAB3 通过自由的赖氨酸 63 聚泛素化链激活^[61, 62]和磷酸化 I κ B 激酶 (I κ B kinase, IKK) - β 和 MAP 激酶 6。然后, 由 IKK- α , IKK- β 和 NF- κ B 重要调节子 (NF- κ B essential modulator, NEMO) 构成的 IKK 复合体, 磷酸化 NF- κ B 的抑制剂 I κ B α , 磷酸化的 I κ B α 被泛素蛋白酶系统降解, 从而释放 NF- κ B 转运至细胞核而激活前炎症细胞因子的表达。激活的 MAPK 信号通路还对另一个转录因子诱导转录因子激活子蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 的形成十分重要, AP-1 靶点于细胞因子基因。

TLR7 和 TLR9 信号通路诱导 I 型 IFNs 的产生是通过另一条 MyD88 依赖性途径所介导的。在胞浆树突细胞内, MyD88 与 IRAK-1, TRAF6, TRAF3, IKK- α 和 IRF7 形成一个复合体, 磷酸化 IRF7, 使其转录入核并激活编码 I 型 IFNs 的基因表达。在常规树突细胞中, IRF1, 而不是 IRF7 激活 TLR7 和 TLR7 的下游

信号通路，引起 IFN- β 的基因表达^[63]。

1.1.2.4.2 MyD88 非依赖型信号通路/TRIF 依赖型信号通路

在应答双链 RNA 的反应中, TLR3 募集的是另一种衔接分子蛋白 TRIF。TLR4 可以引发 MyD88 依赖型和 TRIF 依赖型的信号通路, 但是需要另一种衔接分子 TRAM 来激活 TRIF。一种在连接处变种的 TRAM: TAG (TRAM adaptor with GOLD domain) 是 TRIF 依赖型信号通路的负调节子^[64]。TRIF 通过 TRAF N 端的结合结构域偶联 TRAF3 和 TRAF6。TRAF 通过其 C 端的受体结合蛋白 (receptor-interacting protein, RIP) 相互作用的结构域 (receptor-interacting protein homotypic interaction motif, RHIM) 来与 RIP1 和 RIP3 结合。在人体中, SARM 是 TRIF 依赖型信号通路的抑制剂。TNFR 偶联死亡结构域蛋白 (TNFR-associated death domain protein, TRADD) 与 FAS 偶联死亡结构域 (FAS-associated death domain, FADD) 包含蛋白以及 RIP1 形成一个复合体, TRADD 介导 RIP1 的泛素化, 激活 NF- κ B, 而 FADD 激活 caspase-8 或者 caspase-10 应答 poly I:C, 被切割的 caspase 则可激活 NF- κ B^[65]。

TRAF3 在激活 IKK 相关激酶 TBK1 (TANK-binding kinase 1) 和 IKK-*i* 中至关重要^[66, 67]。TRAF3 作为一个 E3 泛素连接酶参与 K63 连接的自体泛素化来应答 TLR3, 且 TRAF 的激活可由去泛素化酶 DUBA 实行负调控^[68], 而 MyD88 依赖型的信号通路则引发的是通过 K48 的连接自体泛素化。蛋白酶介导的 TRAF3 的降解对 MAPK 的激活和前炎症细胞因子的产生至关重要。E2 泛素连接酶 Ubc5 通过催化 K63 型聚泛素化链的形成激活 IRF3^[69], TBK1 和 IKK-*i* 磷酸化 IRF3 和 IRF7, IRF3 和 IRF7 则二聚化而转运至细胞核, 诱导 I 型 IFNs 和其诱导基因的表达^[70, 71]。IKK-*i* 还可以磷酸化 STAT1 来诱导一系列 IFN 诱导基因如 Adar1, Ifit3 和 Irf7 的表达^[72]。

TBK1 和 IKK-*i* 的激活是通过多种蛋白调节的。TBK1 和 IKK-*i* 与 TRAF 家族偶联 NF- κ B 激活子 (TRAF family member-associated NF- κ B preotien 1, TANK) (或者 I-TRAF), NAK 偶联蛋白 1 (NAK-associated protein 1, NAP1) 和与 NAP1 相似的 TBK1 衔接子 (SINTBAD) 相互作用。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库