

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.01.022

· 综 述 ·

CMRF35 样分子对 Toll 样受体信号通路的影响及其机制的研究进展

Effect of CMRF-35-like molecules on Toll-like receptor signal pathway and its mechanisms: A progress

朱旭辉, 杨明金 综述; 陈涛涌 审阅(第二军医大学免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室, 上海 200433)

[摘要] Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)是人体天然免疫系统的主要参与者,TLR 在免疫细胞中广泛表达,通过识别病原体相关分子模式(pathogen-associated molecule pattern, PAMP)来触发免疫应答,而对于 TLR 信号的调节机制的研究仍然是免疫学及其相关学科的热点领域。CMRF35 样分子(CMRF-35-like molecules, CLMs)作为免疫细胞表面受体分子可能参与 TLR 信号的调节,其中 CLM-1 和 CLM-8 通过自身含有的免疫受体酪氨酸抑制基序触发对 TLR 信号的负向调控作用,而 CLM-4 通过与带有免疫受体酪氨酸活化基序的接头分子结合,促进 TLR 信号转导,调节免疫细胞对病原体的应答。对 CLMs 的深入研究将丰富人们对 TLR 信号调节分子机制的认识。

[关键词] 天然免疫;Toll 样受体;CMRF35 样分子;免疫调节

[中图分类号] R392.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)01-0101-04

天然免疫系统是机体抵抗外来入侵病原体的第一道屏障,而 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)作为重要的模式识别受体在天然免疫过程中发挥着重要的作用。TLR 的效应具有“双刃剑”的特点,因此对于 TLR 信号通路的调节机制需要进行深入广泛的研究^[1]。CMRF35 样分子(CMRF-35-like molecule, CLM)作为免疫细胞表面受体分子,是免疫球蛋白超家族中的一类,能够通过自身带有的免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM)或者与带有免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)的接头分子结合进而转导信号^[2]。本文就 CLM 分子对 TLR 信号通路调节的研究进展作一综述。

1 CLMs 成员及分类

CLMs 共有九个成员,即 CLM1 ~ 9,其中 CLM1 ~ 8 主要分布于小鼠 11 号染色体 E2 区上的约 250 000 bp 的区域内,而 CLM-9 则位于 11 号染色体上的 D 区,靠近 11E1 区^[3]。CLMs 根据其功能可以分为两大类:抑制性受体(包括 CLM-1、CLM-8)和活化性受体(包括 CLM-2、CLM-3、CLM-4、CLM-5、CLM-6、CLM-7 和 CLM-9)。抑制性受体的特点是其分子跨膜的胞内段含有 ITIM,在配体交联抑制性受体后,能够结合含有 SH2 结构域的胞内磷酸酶(如 SHP-1、SHP-2、SHIP),进而通过底物的去磷酸化终止活化信号^[4]。通常,活化性受体的胞内段较短,不含有功能性的结构域,但是它们能够通过自身的跨膜结构域处带负电荷的氨基酸残基来和相关跨膜

接头分子结合,这些分子(如 FcR、DAPI2、DAPI10)的跨膜区域含有带正电荷的精氨酸残基,且这种接头分子的胞内段带有 ITAM,能够招募含有 SH2 结构域的酪氨酸激酶(如 Syk、ZAP70),进而转导下游活化信号^[5-6]。

2 CLMs 对 TLR 信号通路的调控

TLR 在宿主早期防御入侵病原体中发挥着至关重要的作用,研究^[1]显示,天然免疫系统的活化是诱导获得性免疫的前提条件,尤其是 Th1 型 CD4⁺ T 细胞的免疫应答。对于 TLR 信号通路调节的研究已经成为目前研究的热点,这种调节可以分为两大类:可溶性 TLR 和胞内的负向调控分子。可溶性 TLR 能够竞争性地与膜型 TLR 的配体结合,从而阻断膜型 TLR 的信号通路活化,目前发现的可溶性 TLR 包括可溶性 TLR4 和 TLR2^[7-8];胞内调节 TLR 信号的负向调控分子主要包括 MyD88s、IRAKM、SOCS-1、Tollip、A20 和 Nrdp1 等^[9-13]。CLMs 家族作为 IgSF 的成员,能够通过自身的胞内段 ITIM 或者通过携带 ITAM 基序的接头分子,进行抑制性或活化性信号的转导^[2],因而 CLMs 对 TLR 的信号通路

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30571844)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30571844)

[作者简介] 朱旭辉(1986-),男,浙江省桐乡市人,硕士生,主要从事天然免疫方面的研究

[通信作者] 陈涛涌(CHEN Tao-yong, corresponding author), E-mail: sigma00cn@yahoo.com.cn

[网络出版] 2011-01-25; <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110125.1122.029.html>

调节也可以分为正向调节和负向调节两个方面。

2.1 CLM-1 和 CLM-8 对 TLR 信号的负向调节

CLMs 中只有 CLM-1 和 CLM-8 的胞内段较长, 带有 ITIM, 能通过结合酪氨酸磷酸酶(如 SHP-1、SHP-2 或 SHIP)对 TLR 信号通路进行负向调控。

2.1.1 CLM-1 CLM-1 根据不同实验室的发现而具有多种命名: CD300f、IgSF13、Dlgr2 和 LMIR3。Daws 等^[14]利用 TREM-2 的 Ig 结构域, 在 Gene Bank 小鼠 EST 数据库中同源比对发现一个 EST 与 TREM-2 有 21% 的同源性, 但是与人的 CMRF-35 受体有 31% 的同源性, 因而将该 EST 命名为 CMRF35 样分子-1(CMRF-35-like molecule 1, CLM-1)。CLM-1 为 I 型膜整合分子, 具有 N 端信号肽, 胞外结构域为单个 Ig 结构域, 还有跨膜结构域和较长的胞内段。胞内段含有多个酪氨酸残基, 其中两个酪氨酸残基位于 ITIM 中, 第 3 个酪氨酸残基位于 YxxM 基序中, 有可能通过 PI3K 转导信号, 第 4 个酪氨酸残基位于能结合 SLAM 相关蛋白的 TxYxxI 基序中。研究^[14]发现, CLM-1 主要表达于髓系来源的细胞, 且能够结合 SHP-1, 抑制破骨细胞的形成, 而不结合 SHP-2 或 SHIP 分子。有研究^[15]早在 1998 年利用大规模测序技术, 在人的树突状细胞(dendritic cell, DC)中发现了 CD300f/IgSF13, 接着又在小鼠的 DC 中找到对应的分子, 并命名为 DC 来源的免疫球蛋白样受体 2(DC-derived Ig-like receptor 2, Dlgr2)。在硫酸钠作用于 DC 后, CLM-1 的胞内段酪氨酸发生磷酸化, 并能够与 SHP-1、SHIP 结合, 但没有检测到与 SHP-2 的结合。进一步研究^[16]发现, CLM-1 作为抑制性受体能够负向调控 DC 介导的抗原特异性 T 细胞应答。Kitamura 等^[17]从小鼠抗原刺激的骨髓来源肥大细胞中也克隆出了 CLM-1, 并命名为 LMIR3(leukocyte mono-Ig-like receptor 3)。研究^[15]发现, CLM-1 能够抑制 CLM-5 交联后引起的 IL-6 等细胞因子的产生, 而且 LPS 刺激 TLR4 能够上调 CLM-1 的表达。虽然 CLM-1 的交联能够增强 LPS 刺激骨髓来源的肥大细胞产生细胞因子, 但是对于其他 TLR 配体(如 TLR2、TLR9)引起的细胞因子产生却起抑制性作用。通过免疫共沉淀发现 CLM-1 能够和磷酸酶如 SHP-1、SHP-2 结合, 进而转导抑制性信号。作为抑制性受体的 CLM-1, 其之所以能够促进 TLR4 配体产生的细胞效应, 是由于 CLM-1 能够和活化性 FcR γ 结合进而转导协同活化信号^[18]。

2.1.2 CLM-8 CLM-8 由不同实验室的发现也具有多种命名: MAIR-I、LMIR1。Shibuya 等^[19]在 2003 年首先报道了 CLM-8 的结构和功能, CLM-8 表达于

大多数的髓系来源细胞包括巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞及 DC, 在其胞内段具有 ITIM 样序列, 能够介导受体的内吞和抑制 IgE 引起的肥大细胞脱颗粒。通过免疫共沉淀研究^[17]发现, CLM-8 能够和 SHIP 结合, 却不能与 SHP-1 或 SHP-2 相互作用, 提示 CLM-8 可能是通过某些磷酸酶的去磷酸化发挥抑制性作用。该小组近期的研究^[20]发现, 在大鼠的嗜碱性粒细胞系 RBL-2H3 中转染 CLM-8 表达质粒后, 用抗体交联后能够引起 CLM-8 的酪氨酸发生磷酸化, 进而招募 SHP-1 和 SHIP 这两个磷酸酶发挥负向调控作用。这与他们前期发现的 CLM-8 只能和 SHIP 结合有一定的不同, 可能是由于使用不同的细胞系所致。Kitamura 等^[3]利用信号序列捕获(signal sequence trap, SST)方法在肥大细胞中克隆了 CLM-8。该研究发现, CLM-8 的胞内段含有多个 ITIMs, 当 CLM-8 的胞外 Ig 结构域在与配体发生交联之后能够引起 CLM-8 的酪氨酸发生磷酸化, 继而招募酪氨酸磷酸酶如 SHP-1、SHP-2 及 SHIP。这与 Shibuya 等^[20]的研究发现 CLM-8 能与 SHP-1 和 SHIP 结合也有不同, 这可能是由不同的实验方法引起的, 但是也提示 CLM-8 募集的磷酸酶在不同细胞系内和不同激活条件下可能存在差异。

2.2 CLMs 对 TLR 信号的正向调节作用

带有 ITAM 的分子能够正向调控 TLR 信号通路^[21], 而一些 CLMs 能够和带有 ITAM 的接头分子(如 DAP12、FcR γ 、DAP10 等)结合, 正向调控 TLR 信号通路, 其潜在的机制需要进一步的探讨。

2.2.1 CLM-4 CLM-4 根据不同实验室的发现具有多种命名: DIgR1、LMIR2、MAIR2。有研究^[22]报道了小鼠 DC 中发现的 CLM-4, 当时命名其为 DC 来源的免疫球蛋白样受体 1(DC-derived Ig-like receptor 1, DIgR1)。CLM-4 在小鼠的脾脏中表达极为丰富, 主要表达于抗原递呈细胞包括 DC、单核巨噬细胞及 B 淋巴细胞。尽管 CLM-4 表达于 DC 表面, 但是 LPS 刺激 DC 之后 CLM-4 mRNA 水平并没有显著的改变。提示 CLM-4 可能对于 TLR4 信号通路的调控没有明显作用, 然而对于 TLR3 以及 TLR9 是否有调节作用有待于进一步的验证。Shibuya 等^[23]研究发现, CLM-4 主要表达于腹腔巨噬细胞和 B 细胞表面, 能够和带有 ITAM 的接头分子 DAP12 结合, 进而促进炎症因子和趋化因子的分泌。该研究在 HEK293T 细胞中同时转染 CLM-4、FcR γ 或 DAP12 表达质粒, 用抗体交联 CLM-4 之后, 通过免疫共沉淀检测发现 CLM-4 只能跟 DAP12 相结合, 不能与 FcR γ 相互作用, 提示 CLM-4 可能在生理状态下只

和 DAP12 相互作用。该研究发现, LPS 作用于巨噬细胞或 B 淋巴细胞 48 h 后能够上调 CLM-4 的表达水平。最近研究^[23]发现, CLM-4 不仅能够和 DAP12 结合, 而且还能够结合 FcR γ 。该研究分别取来源于 DAP12 缺陷小鼠和野生型小鼠的腹腔巨噬细胞, 用单克隆抗体交联巨噬细胞表面的 CLM-4 后, 发现产生的炎症因子 TNF- α 和 IL-6 没有显著性差异, 提示 DAP12 的存在与否对于 CLM-4 信号通路的影响不大。在进一步研究后发现, CLM-4 能够和 FcR γ 结合, 从而转导活化信号; LPS 能够增强 FcR γ 和 CLM-4 的表达, 同时对于单克隆抗体交联 CLM-4 引起的细胞因子产生具有叠加效应。因而, 可以推断 CLM-4 可以通过某种途径增强 LPS 引起的 TLR4 信号通路活化。Kitamura 等^[24]发现, CLM-4 作为一个具有较短胞内段和特征性的带有正电荷氨基酸残基的跨膜结构域分子, 能够和 3 种带有 ITAM 的接头分子(DAP10、DAP12 及 FcR γ)结合, 进而通过尚未明确的机制调节细胞的炎症应答。

3 CLMs 对 TLR 信号的调节作用在疾病中的意义

CLMs 对于 TLR 的影响主要是通过起负向调控作用的酪氨酸磷酸酶(如 SHP-1、SHP-2 或 SHIP), 或者是通过起正向调控的接头分子 DAP12、DAP10 或 FcR γ 。目前对于 CLMs 在疾病中作用的研究资料还很少, 这里仅对 CLM-1 在疾病模型中的作用进行综述。

Campagne 等^[24]在近期报道了 CLM-1 在多发性硬化症的小鼠模型, 即实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental allergic encephalomyelopathy, EAE)中的作用。该研究发现, CLM-1 能负向调控自身免疫性脱髓鞘。CLM-1 主要表达在 MOG35-55 免疫小鼠的脊髓脱髓鞘区域的炎性细胞上。CLM-1 缺失能够显著增强 NO 和炎症因子的产生, 同时伴随着脱髓鞘和 EAE 临床评分的增加。但是这个过程中无论是外周的还是脊髓中的 T 细胞应答均不受影响。CLM-1 通过其磷酸化的酪氨酸与 SHP-1、SHP-2、SHIP-1 的 SH2 结构域结合, 介导抑制性信号的转导。该研究通过构建 CLM-1 敲除小鼠来观察这个分子在 EAE 小鼠模型中的作用, 在通过 MOG33-55 诱导 EAE 后发现, CLM-1 的敲除并不影响 EAE 的诱导率, 但是明显增加疾病的严重性。该研究也构建了 CLM-1-Fc 融合蛋白(即 CLM-1 的可溶性胞外段和 Fc 融合), 该融合蛋白能够和可能存在的 CLM-1 配体结合, 从而阻断了 CLM-1 通路的活化, 其效果和 CLM-1 缺失的相似。同时该研究排除了小胶质

细胞的作用, 从而证实了骨髓来源的髓系炎性细胞上 CLM-1 的缺失能够增加 EAE 疾病的严重程度。文献^[25]报道, CD4⁺ T 细胞可能参与 EAE 模型发病, 接着该研究又通过体内(CD4⁺ T 细胞过继回输)和体外(脾脏来源和骨髓来源的 DCs 和 CD4⁺ T 细胞共培养的增殖实验)实验发现, T 细胞上的 CLM-1 缺失与否并不影响 EAE 的严重程度, 提示 CLM-1 调节 MOG35-55 诱导 EAE 疾病的严重程度主要作用在效应阶段, 而不是 T 细胞介导的起始阶段。最后该研究通过筛选髓鞘液中浸润的白细胞发现, CLM-1 主要通过骨髓来源的 CD11c⁺ 细胞来发挥抑制功能, CLM-1 缺失后, 该群细胞通过增加 NO 和 TNF- α 的释放来增加疾病的严重程度。该研究主要发现了 CLM-1 在 EAE 动物模型中的抑制性作用, 为临床治疗多发性硬化症提供了实验依据。

4 结 语

CLMs 这一类膜分子作为细胞表面带有 Ig 结构域的受体分子, 主要参与调节髓系来源细胞的免疫应答, CLMs 在和其配体结合后既能够触发抑制性信号, 也能够触发活化性信号。由于 CLMs 主要表达于抗原递呈细胞, 因此研究 CLMs 对抗原递呈细胞的影响将是未来关注的重点。含有 ITIM 的抑制性免疫分子主要负向调节 TLR 信号通路^[5], 而含有 ITAM 的免疫分子主要转导正向调控信号。但是最近也有报道^[26]指出, ITAM 能够转导抑制性信号, 如 DAP12 缺陷的小鼠能够抵抗 LPS 诱导的细菌性腹膜炎。因此, 对于像 CLM-4、CLM-3 和 CLM-5^[27]这些能够结合接头分子 DAP12 的分子是否也能够传递抑制性信号需要进行深入的研究。CLMs 作为膜受体, 其天然的配体目前还没有发现, 也将成为下一步的研究热点。对 CLMs 信号通路的了解能够让我们更好的了解机体应对外界病原体入侵产生的免疫调控, 从而为免疫相关疾病的治疗提供理论依据。

【参考文献】

- [1] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors [J]. Nat Immunol, 2010, 11(5): 373-384.
- [2] Clark GJ, Ju X, Hart DN, et al. The CD300 family of molecules are evolutionarily significant regulators of leukocyte functions [J]. Trends Immunol, 2009, 30(5): 209-217.
- [3] Kumagai H, Oki T, Kitamura T, et al. Identification and characterization of a new pair of immunoglobulin-like receptors LMIR1 and 2 derived from murine bone marrow-derived mast cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 307(3): 719-729.
- [4] An H, Hou J, Zhou J, et al. Phosphatase SHP-1 promotes TLR-

- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1 [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(5): 542-550.
- [5] Yang P, An H, Liu X, et al. The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(6): 487-494.
- [6] Abram CL, Lowell CA. Convergence of immunoreceptor and integrin signaling [J]. *Immunol Rev*, 2007, 218(1): 29-44.
- [7] Roger T, Froidevaux C, Le Roy D, et al. Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(7): 2348-2352.
- [8] Raby AC, Le Boudier E, Colmont C, et al. Soluble TLR2 reduces inflammation without compromising bacterial clearance by disrupting TLR2 triggering [J]. *J Immunol*, 2009, 183(1): 506-517.
- [9] Coll RC, O'Neill LA. New insights into the regulation of signalling by toll-like receptors and nod-like receptors [J]. *J Innate Immun*, 2010, 2(5): 406-421.
- [10] Liu Y, Stewart KN, Bishop E, et al. Unique expression of suppressor of cytokine signaling 3 is essential for classical macrophage activation in rodents *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Immunol*, 2008, 180(9): 6270-6278.
- [11] Hymowitz SG, Wertz IE. A20: from ubiquitin editing to tumour suppression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(5): 332-341.
- [12] Ciarrocchi A, D'Angelo R, Cordiglieri C, et al. Tollip is a mediator of protein sumoylation [J]. *PLoS One*, 2009, 4(2): e4404.
- [13] Wang C, Chen T, Zhang J, et al. The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 preferentially promotes TLR-mediated production of type I interferon [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(7): 744-752.
- [14] Chung DH, Humphrey MB, Daws MR, et al. CMRF-35-like molecule-1, a novel mouse myeloid receptor, can inhibit osteoclast formation [J]. *J Immunol*, 2003, 171(12): 6541-6548.
- [15] Sui L, Li N, Liu Q, et al. IgSF13, a novel human inhibitory receptor of the immunoglobulin superfamily, is preferentially expressed in dendritic cells and monocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319(3): 920-928.
- [16] Shi L, Luo K, Xia D, et al. DlgR2, dendritic cell-derived immunoglobulin receptor 2, is one representative of a family of IgSF inhibitory receptors and mediates negative regulation of dendritic cell-initiated antigen-specific T-cell responses [J]. *Blood*, 2006, 108(8): 2678-2686.
- [17] Izawa K, Kitaura J, Kitamura T, et al. Functional analysis of activating receptor LMIR4 as a counterpart of inhibitory receptor LMIR3 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(25): 17997-18008.
- [18] Izawa K, Kitaura J, Kitamura T, et al. An activating and inhibitory signal from an inhibitory receptor LMIR3/CLMs-1: LMIR3 augments lipopolysaccharide response through association with FcR gamma in mast cells [J]. *J Immunol*, 2009, 183(2): 925-936.
- [19] Yotsumoto K, Okoshi Y, Shibuya A, et al. Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and MAIR-II, regulate mast cell and macrophage activation [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(2): 223-233.
- [20] Okoshi Y, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A, et al. Requirement of the tyrosines at residues 258 and 270 of MAIR-I in inhibitory effect on degranulation from basophilic leukemia RBL-2H3 [J]. *Int Immunol*, 2005, 17(1): 65-72.
- [21] Ivashkiv LB. Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(4): 340-347.
- [22] Luo K, Zhang W, Sui L, et al. DlgR1, a novel membrane receptor of the immunoglobulin gene superfamily, is preferentially expressed by antigen-presenting cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287(1): 35-41.
- [23] Nakahashi C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A, et al. Dual assemblies of an activating immune receptor, MAIR-II, with ITAM-bearing adapters DAP12 and FcR gamma chain on peritoneal macrophages [J]. *J Immunol*, 2007, 178(2): 765-770.
- [24] Xi H, Katschke KJ Jr, Helmy KY, et al. Negative regulation of autoimmune demyelination by the inhibitory receptor CLMs-1 [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(1): 7-16.
- [25] Fisher Y, Nemirovsky A, Monsonego A, et al. T cells specifically targeted to amyloid plaques enhance plaque clearance in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10830.
- [26] Turnbull IR, McDunn JE, Colonna M, et al. DAP12 (KARAP) amplifies inflammation and increases mortality from endotoxemia and septic peritonitis [J]. *J Exp Med*, 2005, 202(3): 363-369.
- [27] Nakano T, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A, et al. Activation of neutrophils by a novel triggering immunoglobulin-like receptor MAIR-IV [J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(1): 289-294.
- [收稿日期] 2010-10-13 [修回日期] 2010-12-15
[本文编辑] 韩丹

• 读者 • 作者 • 编者 •

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358-93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 $\bar{x}$,不用大写 X ,也不用 Mean 或 M ;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 $\bar{x}$ 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)