

鱼类和哺乳类 *TLR4* 基因结构和功能的保守与进化

裴永艳^{1,2} 黄容¹ 李勇明¹ 廖兰杰¹ 朱作言¹ 汪亚平¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 先天性免疫是生物体第一道免疫防线, 存在于各种多细胞生物中。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是介导机体对病原体相关的分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)识别的一类模式识别受体(pattern recognition receptors, PPRs), 在先天性免疫中发挥重要作用。TLR4 是 toll 家族成员之一, 哺乳类中主要负责识别细菌的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)。文章就 TLR4 的发现历史, TLR4 在鱼类和哺乳类中的结构特点, TLR4 的分布特征, 鱼类和哺乳类中 TLR4 识别配体的差异, TLR4 的信号传导以及 TLR4 的进化进行了综述。综述将对 TLR 相关研究提供借鉴和参考。

关键词: TLR4; 信号通路; 脂多糖; 进化

中图分类号: Q342⁺.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2015)03-0590-08

生物体每时每刻都受到各种病原微生物的感染, 在一般情况下生物体的免疫系统可以发挥作用清除这些病原微生物。生物的免疫系统包括两种类型, 即先天性免疫和获得性免疫。先天性免疫是生物体第一道免疫防线, 存在于各种多细胞生物中^[1]。当病原体侵入生物体后, 先天性免疫系统可以通过多种模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRRs)识别病原体的一些非特异性的、高度保守且对生存和致病性必要的分子结构, 比如内毒素脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、未甲基化的多聚 CpG 核苷酸、鞭毛、双链 RNA 和肽聚糖等。这种来自细菌或病毒的特定的结构被称为病原体相关的分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)^[2-4]。然后, 生物体产生迅速有效的免疫反应, 清除病原体, 同时也会导致炎症反应的发生。Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)是介导机体对 PAMPs 识别的一类 PRRs, 在先天性免疫中发挥了重要的作用^[5,6]。Toll 样受体最先在果蝇中被发现, 并且在果蝇早期胚胎的背腹极性的形成中起重要作用^[7]。不同的生物中至少存在 15 种 TLRs, 包括 TLR1、2、3、4、5、

6、7、8、9、10、11/12、13、14、21 和 TLR22/23^[7]。其中, 人类的 TLR4 是哺乳动物中第一个被鉴定的 TLR 受体, 同时是果蝇 TLR1 的直系同源基因^[8]。在哺乳动物中, TLR4 是 LPS 主要识别受体, 在机体炎症反应的信号传导中发挥了重要作用。TLR4 是研究较为深入的 TLR 家族成员。本文就其从哺乳类 TLR4 到鱼类 TLR4 发现历史及结构特点、TLR4 的配体识别及信号通路和 TLR4 的功能进化研究等方面综述如下。

1 TLR4 的发现

1980 年, Nusslein-Volhard 等首先命名了 *Toll* 基因^[9], 1984 年 Steward 等研究黑腹果蝇胚胎极性形成时发现一种 Toll 蛋白能够影响背腹轴极性的形成^[10], 1985 年, Anderson 等在果蝇中克隆了 *Toll* 基因^[11]。1991 年, Gay 等发现, Toll 蛋白在结构上与哺乳动物中一种天然免疫功能分子—白细胞介素受体(Interleukon-1, IL-1)具有同源性, 二者的胞内区部分结构上相似^[12], 暗示了 Toll 可能和免疫有关。1994 年, Nomura 等报道了人类的第一个 TLR^[13]。

收稿日期: 2014-01-24; 修订日期: 2014-12-07

基金项目: 国家自然科学基金(31130055, 31123001)资助

作者简介: 裴永艳(1989—), 女, 江苏省宿迁人; 博士; 主要从事鱼类抗病基因的功能研究。E-mail: callmepyy@126.com

通信作者: 汪亚平(1963—), 男, 研究员; 研究方向为鱼类功能基因组学、鱼类分子育种等。E-mail: wangyp@ihb.ac.cn

1996 年, Taguchi 等将其定位在 4 号染色体上^[14]。Lemaitre 等发现果蝇中的 Toll 在抗真菌免疫反应中发挥重要作用, 它能促进抗菌肽的合成^[15]。1997 年, Medzhitov 等首次发现与果蝇 Toll 蛋白同源的人 Toll 蛋白基因及其编码的 Toll 样受体蛋白, 即如今的 TLR4 蛋白。TLR4 与配体结合后, 能诱导一些关键基因的表达, 从而激活获得性免疫反应^[8]。对 TLR4 突变和缺失的小鼠研究发现 TLR4 是 LPS 的主要识别受体^[16—18]。Leveque 等克隆了鸡的 TLR4, 发现其对沙门氏菌有抵制作用^[19]。研究发现斑马鱼 13 号染色体上存在 3 个 TLR4 同源基因^[20—22]。Huang 等发现草鱼中存在一个 TLR4 基因簇, 其包含 4 个 TLR4 基因, 它们对 LPS 没有明显的响应而对病毒具有一定程度的响应^[23]。

2 TLR4 在不同物种中的结构特点

TLRs 家族为 I 型跨膜蛋白, 家族中各个成员的蛋白结构基本相似, 均包括 3 个主要结构域: (1)胞外区, (2)跨膜区, (3)胞内 Toll/IL-1 受体同源区 (Toll/IL-1 receptor homologous region, TIR)。胞外区由 19—25 个富含亮氨酸的重复序列 (Leucine-rich repeat, LRR) 组成, 每个 LRR 有 24—29 个氨基酸, 包含一个保守的 XLXXLXLXX 模块和一个保守的 XØXXØXXXXFXLX 模块 (X 为任意氨基酸, Ø 为疏水性氨基酸), 折叠形成马蹄形结构。同时, 这个区包含一个配体结合区域 (Ligand Binding Region, LBR) 可以直接识别 PAMPs。该区域受到进化的选择, 具有较大的变异性, 从而适应不同的配体分子^[24]。胞内 TIR 结构域序列与白细胞介素 1 受体 IL-1R 家族的胞质区序列有高度同源性, 两者的分子构象也很相似^[25, 26], TIR 结构域高度保守, 功能是信号传导^[27]。

TLR4 在哺乳动物中同样具有这三个结构域, 然而在鱼类中却发生了变化。在草鱼中, 存在的 4 个 TLR4s (CiTLR4.1、CiTLR4.2、CiTLR4.3、CiTLR4.4), 其中 CiTLR4.2、CiTLR4.3、CiTLR4.4 是典型的 TLRs, 包含 LRR 结构域、跨膜区和 TIR 结构域。但是, 与这 3 个基因相比, CiTLR4.1 的 DNA 序列有 207 bp 的缺失, 导致翻译的蛋白只有 LRR 结构域, 没有跨膜区和胞内 TIR 结构域。此外几乎所有的哺乳类和鸟类的 TLRs 都有完整的信号肽区域, 然而斑马鱼和草鱼的 TLR4s 则有所不同。斑马鱼的 DrTLR4ba1 以及草鱼的 CiTLR4.1、CiTLR4.2 没有

信号肽序列^[23]。

3 TLR4 的分布特征

TLRs 家族广泛分布于各种免疫细胞中, 包括巨噬细胞、树突状细胞、B 淋巴细胞、特定类型的 T 淋巴细胞, 此外还分布在一些非免疫细胞中如上皮细胞及成纤维细胞中。TLR4 同样存在于各种免疫细胞中, 在部分组织细胞如人角膜上皮细胞中也有表达^[28, 29]。斑马鱼的 3 个 TLR4 基因中, 有两个 (DrTLR4ba1、DrTLR4bb) 表达模式已报道过, DrTLR4ba1 在血液、肠、精巢、皮肤、脑、肝脏、心脏中均有表达, 而 DrTLR4bb 仅仅在皮肤和心脏中表达^[20]。草鱼中四个 TLR4s 分布于多个组织中, 如脑、心脏、肌肉、肝脏、肾脏等^[23]。

4 TLR4 的配体识别差异

在 TLRs 家族中, 根据识别的配体不同将 TLRs 分为两个亚类, 第一个亚类包括 TLR1、2、4、5、6 和 TLR10, 这些 TLRs 存在于细胞膜的表面, 主要结合细菌表面的 PAMPs, 如肽聚糖、脂多糖和鞭毛等, 它们被称作识别细菌的 TLRs^[30—36]。第二个亚类包括 TLR3、7、8 和 TLR9, 它们存在于细胞内体上, 主要识别病毒相关的 PAMPs, 如未甲基化的多聚 CpG 核苷酸、双链 RNA 等, 它们被称作识别病毒的 TLRs^[30—36]。

在哺乳动物中 TLR4 识别的配体包括外源性配体如 LPS 和由于细胞损伤生成的内源性物质如高迁移率族蛋白 B1 (High mobility group protein B1, HMGB1)、透明质酸和二聚糖等^[37, 38]。LPS 是 G-细菌细胞壁主要成分, 结构上由类脂 A、核心多糖和 O-特异侧链 3 部分组成。类脂 A 主要激活哺乳动物先天性免疫反应及赋予 LPS 内毒素毒性^[39]。此外, 在鱼类中有些种类的 LPS 对机体起到免疫保护作用^[40]。

由于 TLR2 和 TLR4 在对 LPS 响应的细胞中如外周血白细胞, 巨噬细胞和单核细胞的高度表达, TLR2 一度被认为是识别 LPS 的主要受体^[41]。后经研究发现 TLR4 才是 LPS 主要识别受体。Poltorak 等报道了 LPS 耐受的 C3H/HeJ 小鼠是由于 TLR4 基因突变引起的; LPS 耐受的 C57BL/10ScCr 小鼠中不存在 TLR4 mRNA 的表达^[16]。Hoshino 等发现 TLR4 缺陷的小鼠对 LPS 没有反应^[18]。此外, Kawata 等发现一种脂多糖抑制剂阻止外源导入 TLR4 的细胞对

LPS 的响应^[42]。Chow 等通过 NF- κ B 双荧光素酶报告系统指出 TLR4 介导了 LPS 的信号传导^[17]。

TLR4 不能像大部分 TLRs 那样能够直接识别相应配体^[43, 44]。在哺乳动物中, TLR4 识别 LPS 需要 LBP、CD14 和 MD-2 的辅助。LBP 是一种可溶性的蛋白, 能直接结合 LPS, 从而促进 LPS 与 CD14 的结合。CD14 是糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白, 也可以以可溶性的形式存在, 它的功能是把 LPS 转移给 TLR4/MD-2 受体复合物^[45]。LPS 与 TLR4 相互作用之前需要先结合辅助受体 MD-2, 即 LPS 结合 MD-2 的疏水区, 诱导 TLR4/MD-2 二聚化, 最终激活信号通路^[43, 44]。MD-2 是可溶性的糖蛋白, 与 TLR4 非共价结合, 它还具有单独同 LPS 结合的能力^[45]。总而言之, LBP 与 LPS 结合, 并将其运输到细胞表面, 与 CD14 形成三元复合物, 然后将 LPS 传递给 TLR4/MD-2 受体复合物从而诱导下游的信号通路^[46]。TLR4 不能直接与 LPS 接合, 必须依赖于 MD-2。

较低等的脊椎动物特别是鱼类和两栖类对 LPS 的毒性反应有耐受力^[47]。相对于哺乳动物而言, 在体外实验中需要使用极高浓度的 LPS 刺激不同鱼类的白细胞才能达到预期的效果^[48—52]。用 LPS 刺激斑马鱼, 其 *TLR4* 基因的表达没有响应, 推测斑马鱼体内识别 LPS 不是通过 TLR4 介导的。另外, 斑马鱼的 *TLR4s* 对热灭活大肠埃希氏菌和热灭活的嗜肺军团菌也没有响应。然而将斑马鱼 TLR4 的跨膜区及胞内区融合到小鼠 TLR4 的胞外区后的嵌合分子可以激活 NF- κ B 的反应, 证明斑马鱼 TLR4 缺乏识别 LPS 的能力是由于斑马鱼 *TLR4s* 胞外区没有识别 LPS 的能力, 而不是由于其 TIR 结构域转导信号能力的改变。这同时反驳了之前报道的斑马鱼 *TLR4s* 的 TIR 区负调节 NF- κ B 的说法, 证实了鱼类中的 TLR4 与 LPS 的识别无关并且可能存在另一种 LPS 识别途径的假说^[53]。后来研究发现斑马鱼对 LPS 具有耐受性, 可能由于斑马鱼 TLR4 信号传导中 MyD88 上游的接头分子 TIRAP 蛋白 N 端比哺乳动物多了 105 个氨基酸的原因^[54]。然而, 在河豚中的研究显示了清道夫受体 SR 代替了 TLR4 识别 LPS, 同时参与 NF- κ B 的负调节, 鱼类中是否普遍存在这样的现象, 有待深入研究^[55]。

哺乳动物的呼吸道合胞体病毒 (Respiratory syncytial virus, RSV) 的融合蛋白和 LPS 一样, 能通过 TLR4 途径激活细胞免疫反应^[56, 57]。小鼠乳腺肿

瘤病毒 (Mouse mammary tumor virus, MMTV) 则能与小鼠 TLR4 免疫共沉淀, 它们的结合能激活 B 细胞免疫反应^[58]。

用草鱼呼肠孤病毒 (Grass carp reovirus, GCRV) 攻毒处理稀有鮠鲫 36h 后, 稀有鮠鲫 *TLR4b* 基因 mRNA 表达水平上调了 5 倍^[59]。GCRV 感染草鱼后, *CiTLR4.3* 和 *CiTLR4.4* 在肝脏和肌肉中的表达量都逐渐增加, 并且 4 个 *TLR4* 基因 mRNA 表达水平都有明显上调的趋势^[23]。以上结果暗示了 TLR4 在鱼类中可能与病毒的识别相关。

5 TLR4 的信号传导

TLRs 识别受体后并与之结合, 同时自身二聚化, 并通过其胞内 TIR 结构域募集其他含 TIR 结构域的接头分子, 如 MyD88、TIRAP (也称为 Mal)、TRIF (也称为 TICAM1) 和 TRAM (也称为 TICAM2)。TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9 和 TLR11 能够募集 MyD88。除了募集 MyD88 外, TLR1、TLR2、TLR4 和 TLR6 还能够募集 TIRAP, TIRAP 的功能是介导 TLRs 与 MyD88 的连接。TLR3 和 TLR4 能够募集 TRIF, 另外, TLR4 还能够募集 TRAM, TRAM 的功能是介导 TLR4 与 TRIF 的连接^[60]。上述的这些募集分子归到两条信号通路中, 一条信号通路是依赖 MyD88 的信号通路, 即依赖于 MyD88 和 TIRAP 诱导炎症反应因子 IL-1 和 TNF α 的表达^[61, 62]。另一条是非依赖于 MyD88 的信号通路, 即依赖于 TRIF 和 TRAM 来激活 NF- κ B 和抗病毒的 I 型 IFN 的反应^[62, 63]。在 TLRs 家族中, 大部分 TLRs 成员是依赖于 MyD88 的信号通路, 而 TLR3 只有非依赖于 MyD88 的信号通路, TLR4 是唯一拥有两条信号通路的 TLRs 成员^[63, 64]。

在哺乳动物中, 对于依赖于 MyD88 的途径, 当 LPS 的信号作用于 TLR4 时, TLR4 的胞内区与一个接头分子 MyD88 的同源结构域相结合。MyD88 包含两个结构域, 与 Toll 受体同源结构域结合的羧基末端和包含死亡结构域的氨基末端^[63—65]。该死亡结构域与白细胞介素-1 受体相关激酶 4 (IL-1 receptor-associated kinase, IRAK) 的死亡结构域相互作用引起 IRAK4 磷酸化下游的激酶 IRAK1。磷酸化的 IRAK1 募集并激活肿瘤坏死因子受体相关因子-6 (TNF-receptor-associated factor 6, TRAF-6)^[66]。这一因子反过来又结合并激活 TAB1/TAK1/TAB2 复合

物。TAK1 磷酸化 NF- κ B 抑制剂(I κ B)的激酶(IKK), 然后活化的 IKK 再磷酸化 I κ B, 最终导致 I κ B 泛素化而降解^[67], 从而使 NF- κ B 从抑制状态下被激活。细胞质中游离的 NF- κ B 转位到细胞核, 其活性二聚体启动细胞因子如 IL-1 的转录。对于非依赖于 MyD88 的途径, 当 LPS 的信号作用于 TLR4 时, TLR4 募集 TRIF、TRAM 两个接头分子, TBK1 磷酸化 IKK, 激活干扰素调节因子 IRF3, 使其二聚化并移位到细胞核, 诱导 I 型 IFN, IFN- β 的表达^[64, 68—70]。总之, TLR4 信号级联反应主要激活转录因子 NF- κ B、IRF3 等, 最后诱导免疫相关基因的转录和表达(图 1)。

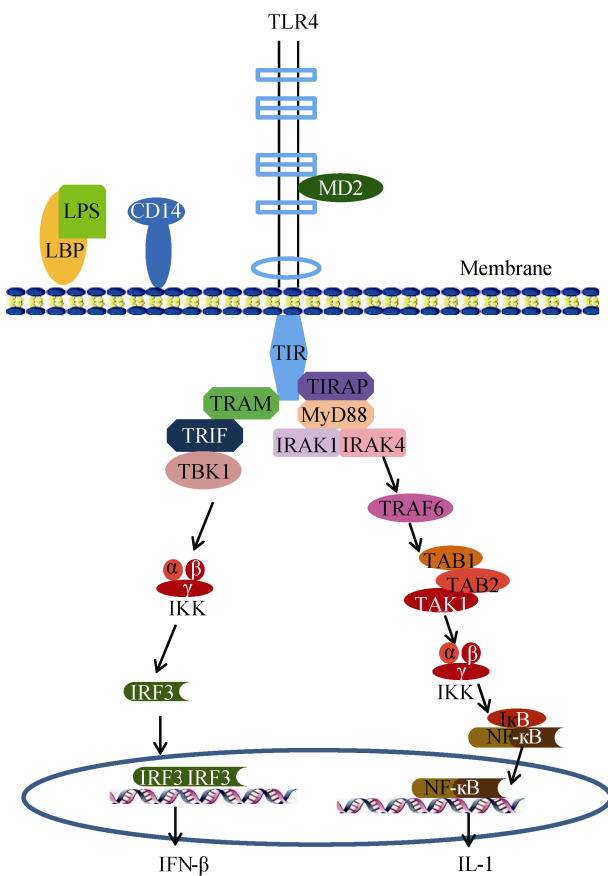


图 1 哺乳动物中 TLR4 信号通路

Fig. 1 TLR4 signal transduction pathway

6 TLR4 的功能进化研究

虽然之前认为脊椎动物 TLRs 在进化上很保守^[31], 然而一些物种如鸟类和鱼类中的 TLRs 并不如预期的保守, 它们经历了一定的进化上的正向选择^[71, 72]。一般情况下, TLRs 的 LRR 区比 TIR 区进化速率要快。在 TLRs 家族中, TLR3 和 TLR7 的 LRR 区进化

速率最低, 它们可能代表了先天性免疫系统中一种保守的机制和结构。然而, 在 TLR10 中, LRR 区进化速率却低于 TIR 区, 这说明它的信号传导功能可能不同于其他 TLRs^[73]。此外, 啮齿目 TLR4 和 TLR7 经历了正向选择, 并且 TLR4 比 TLR7 的进化速度要快, TLR4 的胞外区的 LBR 具有可变性, 这与其识别的配体种类的多样性有关^[74]。

TLRs 家族的成员随着脊椎动物的产生而不断增加, 然而多样性随着脊椎动物免疫系统的完善而逐渐降低。线虫中有 1 个 TLR^[75], 海葵中有 1 个 TLRs^[76], 海胆中有 2 个 TLRs^[77], 海鞘中有 3 个 TLRs^[78], 而作为圆口类七鳃鳗的 TLRs 成员却高达 16 个^[79]。硬骨鱼类的 TLRs 则具有更高的多态性, 硬骨鱼中总共发现 18 种类型的 TLRs(TLR1、2、3、4、5、7、8、9、14、16、18、19、20、21、22、23、25、26)^[80]。鱼类中的 TLRs 还存在旁系同源基因, 如斑马鱼共有 21 个 TLRs 成员, 其中的 TLR4 有 3 个旁系同源基因, TLR5 有 2 个, TLR8 有 2 个, TLR20 有 6 个^[21], 其他鱼类中也有相类似的报道。而在人和小鼠中仅发现了 13 个 TLRs^[31]。以上现象说明随着获得性免疫系统的不断完善并在免疫系统中逐渐占据核心地位, 作为模式识别受体的 TLRs 因为功能上的冗余而逐渐丢失。

脊椎动物的 TLRs 主要分为 14 个分支, 各个物种拥有的不同的 TLRs 分支, 但每种 TLRs 分支只有一个拷贝^[7]。TLR4 在人和小鼠中只有一个拷贝。然而鱼类中 TLR4 的现象比较复杂, 在稀有鮎鲫中现已报道了一个 TLR4^[59], 斑点叉尾鲷中存在两个 TLR4(TLR4/TLR4S)^[80], 在斑马鱼基因组中却发现了三个 TLR4(DrTLR4ba1、DrTLR4ba2 和 DrTLR4bb), 草鱼基因组中存在 4 个 TLR4(CiTLR4.1、CiTLR4.2、CiTLR4.3 和 CiTLR4.4)^[23]。在河豚、东方红鳍豚、淡水豚和刺鱼基因组中却没检测到 TLR4^[81, 82]。以上现象都说明了鱼类 *TLR4* 基因在进化上非常活跃^[23]。共线性和进化树分析显示斑马鱼的 TLR4 与人的 TLR4 是旁系同源, 而非直系同源^[81], 这说明鱼类和哺乳动物分支后, TLR4 发生了变化。系统进化分析表明, 斑马鱼 TLR4s 与小鼠、人和鸡 TLR4s 聚为一支而与其他 TLR4s 分开。草鱼和斑马鱼的 TLR4s 首先聚在一起, 再与哺乳类、鸟类的 TLR4s 聚在一起^[23]。斑马鱼和草鱼共同的祖先很可能是 2 个 *TLR4* 基因, 其中一个分化成斑马鱼的 DrTLR4bb 和草鱼

的 CiTLR4.4, 另一个则通过 1 次复制分化成斑马鱼的 DrTLR4ba 和 LOC795671, 通过 2 次复制分化成草鱼的 CiTLR4.1、CiTLR4.2、CiTLR4.3^[23]。研究显示河豚中的 *TLR4* 基因的丢失是由于清道夫受体 SR 代替了 TLR4 基因识别 LPS^[55]。斑马鱼基因组 *TLR4* 基因的保留可能是由于通过 TLR4 或其他 TLR 的亚功能化和新功能化使得 *TLR4* 基因的存在是不可或缺的^[22]。

斑马鱼 TLR4 对 LPS 的刺激没有反应, Sepulcre 等基于双荧光素酶报告系统分析斑马鱼的整个胚胎, 指出了 TLR4 在 LPS 信号传导中作用的另一种观点: TLR4 负调控 MyD88 依赖性的 TLR 途径^[83]。后来研究反驳了这个观点并证实斑马鱼 TLR4 缺乏识别 LPS 的能力是由于斑马鱼 TLR4s 胞外区没有识别 LPS 的能力^[82]。较低等的脊椎动物特别是鱼类和两栖类对 LPS 的毒性反应有耐受力^[47]。相对于哺乳动物而言, 在体外实验中需要使用极高浓度的 LPS 刺激不同鱼类的白细胞才能达到预期的效果^[48—52], 似乎只有高等的脊椎动物对低剂量的 LPS 才有典型的 TLR4 依赖的免疫反应^[84]。这支持了 TLR4 识别 LPS 发生在鱼类和四足动物分支之后这个假说^[83]。

7 小结与展望

在哺乳动物特别是人类中, 由于 TLR4 可以识别 LPS, 参与 LPS 诱导的炎症反应并和许多疾病如肿瘤、动脉粥样硬化及哮喘关系密切, 有关 TLR4 的功能研究的很透彻。然而, 由于鱼类中 TLR4 发现比较晚, 存在 TLR4 的物种也比较少, 所以 TLR4 的功能目前还不是很确定。

在哺乳动物中 TLR4 是 LPS 的主要受体, 可以通过 CD14 和 MD-2 的协同作用介导 LPS 诱导的炎症反应^[45, 46]。TLR4 或 MD-2 缺失的小鼠巨噬细胞对 LPS 的刺激无响应, TLR4/MD-2 复合物是识别 LPS 的唯一受体^[85]。在鱼类中发现 LPS 并没有诱导 TLR4 的高表达, 鱼类现有的基因组类和 EST 序列中均不存在 CD14 和 MD-2^[22, 84]。这说明鱼中 TLR4 可能无法识别 LPS 或依赖于另一种受体识别 LPS。在草鱼和稀有鮡鲫中, 发现病毒诱导了 TLR4 的表达^[23, 59], 这说明在鱼类中 TLR4 的功能可能是识别病毒而不是 LPS, 其识别的配体还需要进一步的研究验证。TLR4 对 LPS 的识别可能是在鱼类和四足动物分支以后形成的。此外, 鱼类与哺乳动物的 TLR4 结构

也存在差异。鱼类中不同 TLR4 拷贝的功能比较研究也将为其他 TLR 在物种进化过程中的功能进化研究提供更多线索。

参考文献:

- [1] Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition [J]. *Annual Review of Immunology*, 2002, **20**: 197—216
- [2] Horng T, Barton G M, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway [J]. *Nature Immunology*, 2001, **2**(9): 835—841
- [3] Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response [J]. *Current Opinion in Immunology*, 1997, **9**(1): 4—9
- [4] Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition [J]. *Cell*, 1997, **91**(3): 295—298
- [5] Rutz M, Metzger J, Gellert T, *et al.* Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner [J]. *European Journal of Immunology*, 2004, **34**(9): 2541—2550
- [6] Takeda K, Akira S. Toll receptors and pathogen resistance [J]. *Cellular Microbiology*, 2003, **5**(3): 143—153
- [7] Temperley N D, Berlin S, Paton I R, *et al.* Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss [J]. *BMC Genomics*, 2008, **9**: 62
- [8] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. *Nature*, 1997, **388**(6640): 394—397
- [9] Nüsslein-Volhard C, Lohs-Schardin M, Sander K, *et al.* A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of dorsophil [J]. *Nature*, 1980, **283**(5746): 474—476
- [10] Steward R, McNally F J, Schedl P, *et al.* Isolation of the dorsal locus of drosophila [J]. *Nature*, 1984, **311**(5983): 262—265
- [11] Anderson K V, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: Genetic studies on the role of the Toll gene product [J]. *Cell*, 1985, **42**(3): 779—789
- [12] Gay N J, Keith F J. Drosophila toll and IL-1 receptor [J]. *Nature*, 1991, **351**(6325): 355—356
- [13] Nomura N, Miyajima N, Sazuka T, *et al.* Prediction of the coding sequences of unidentified human genes [J]. *DNA Research*, 1994, **1**(1): 27—35
- [14] Taguchi T, Mitcham J L, Dower S K, *et al.* Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14 [J]. *Genomics*, 1996, **32**(3): 486—488
- [15] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults [J]. *Cell*,

- 1996, **86**(6): 973—983
- [16] Poltorak A, He X, Smirnova I, *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene [J]. *Science*, 1998, **282**(5396): 2085—2088
- [17] Chow J C, Young D W, Golenbock D T. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(16): 10689—10692
- [18] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, *et al.* Cutting edge: toll-like receptor4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product [J]. *The Journal of Immunology*, 1999, **162**(7): 3749—3752
- [19] Leveque G, Forgetta V, Morroll S, *et al.* Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to salmonella enteric serovar typhimurium infection in chickens [J]. *Infection and Immunity*, 2003, **71**(3): 1116—1124
- [20] Jault C, Pichon L, Chluba J. Toll-like receptor gene family and TIR-domainadapters in *Danio rerio* [J]. *Molecular Immunology*, 2004, **40**(11): 759—771
- [21] Meijer A H, Gabby Krens S F, Medina Rodriguez I A, *et al.* Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish [J]. *Molecular Immunology*, 2004, **40**(11): 773—783
- [22] Sullivan C, Charette J, Catchen J, *et al.* The gene history of zebrafish tlr4a and tlr4b is predictive of their divergent functions [J]. *The Journal of Immunology*, 2009, **183**(9): 5896—5908
- [23] Huang R, Dong F, Jang S, *et al.* Isolation and analysis of a novel grass carp toll-like receptor 4 (tlr4) gene cluster involved in the response to grass carp reovirus [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, **38**(2): 383—388
- [24] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. *Cell*, 2006, **124**(4): 783—801
- [25] Bowie A, O'Neill L A. The interleukin-1 receptor/ Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2000, **67**(4): 508—514
- [26] Martin M U, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, **1592**(3): 265—280
- [27] Choe J, Kelker M S, Wilson I A. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain [J]. *Science*, 2005, **309**(5734): 581—585
- [28] Song P I, Abraham T A, Park Y, *et al.* The expression of functional LPS receptor proteins CD14 and toll-like receptor 4 in human corneal cells [J]. *Ophthalmology & Visual*, 2001, **42**(12): 2867—2877
- [29] Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, *et al.* Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells [J]. *The Journal of Immunology*, 2000, **164**(11): 5998—6004
- [30] Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, **16**(4): 637—646
- [31] Roach J C, Glusman G, Rowen L, *et al.* The evolution of vertebrate Toll-like receptors [J]. *Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(27): 9577—9582
- [32] Hughes A L, Piontkivska H. Functional diversification of the toll-like receptor gene family [J]. *Immunogenetics*, 2008, **60**(5): 249—256
- [33] Leulier F, Lemaitre B. Toll-like receptors-taking an evolutionary approach [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2008, **9**(3): 165—178
- [34] Temperley N D, Berlin S, Paton I R, *et al.* Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss [J]. *BMC Genomics*, 2008, **9**: 62
- [35] Huang Y, Temperley N D, Ren L, *et al.* Molecular evolution of the vertebrate TLR1 gene family-a complex history of gene duplication, gene conversion, positive selection and co-evolution [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2011, **11**: 149
- [36] Barreiro L B, Ben-Ali M, Quach H, *et al.* Evolutionary dynamics of human Toll-like receptors and their different contributions to host defense [J]. *PLoS Genet*, 2009, **5**(7): e1000562
- [37] Beg A A. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses [J]. *Trends in Immunology*, 2002, **23**(11): 509—512
- [38] Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2006, **6**(11): 823—835
- [39] Huber M, Kalis C, Keck S, *et al.* R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells [J]. *European Journal of Immunology*, 2006, **36**(3): 701—711
- [40] Wang K Y, Huang J L, Xiao D, *et al.* The immunoprotection of stenotrophomonas maltophilia lipopolysaccharide in channel catfish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(3): 433—440 [汪开毓, 黄锦炉, 肖丹, 等. 嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖对斑点叉尾鲷免疫保护作用. 水生生物学报, 2012, **36**(3): 433—440]
- [41] Yang R B, Mark M R, Gray A, *et al.* Toll-like receptor-2mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling [J]. *Nature*, 1998, **395**(6699): 284—288
- [42] Kawata T, Bristol J R, Rose J R, *et al.* Anti-endotoxin activity of a novel synthetic lipid A analog [J]. *Progress in Clinical and Biological Research*, 1995, **392**: 499—509
- [43] Park B S, Song D H, Kim H M, *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex [J]. *Nature*, 2009, **458**: 1191—1195

- [44] Shimazu R, Akashi S, Ogata H, *et al.* MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4 [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1999, **189**(11): 1777—1782
- [45] Lu Y C, Ye W C, Ohashi P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. *Cytokine*, 2008, **42**(2): 145—151
- [46] Dauphinee S M, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells [J]. *Laboratory Investigation*, 2006, **86**(1): 9—22
- [47] Berczi I, Bertok L, Bereznaï T. Comparative studies on the toxicity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin in various animal species [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1966, **12**(5): 1070—1071
- [48] Sepulcre M P, López-Castejón G, Meseguer J, *et al.* The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish [J]. *Molecular Immunology*, 2007, **44**(8): 2009—2016
- [49] Pelegrín P, García-Castillo J, Mulero V, *et al.* Interleukin-1 isolated from a marine fish reveals up-regulated expression in macrophages following activation with lipopolysaccharide and lymphokines [J]. *Cytokine*, 2001, **16**(2): 67—72
- [50] MacKenzie S, Planas J V, Goetz F W. LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor mRNA in primary trout monocytes and in vitro differentiated macrophages [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2003, **27**(5): 393—400
- [51] Stafford J L, Ellestad K K, Magor K E, *et al.* A Toll-like receptor (TLR) gene that is up-regulated in activated goldfish macrophages [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2003, **27**(8): 685—698
- [52] Zou J, Tafalla C, Truckle J. Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates [J]. *The Journal of Immunology*, 2007, **179**(6): 3859—3871
- [53] Sullivan C, Charette J, Catchen J, *et al.* The gene history of zebrafish *tlr4a* and *tlr4b* is predictive of their divergent functions [J]. *The Journal of Immunology*, 2009, **183**(9): 5896—5908
- [54] Liu Y, Li M, Fan S, *et al.* A unique feature of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein is partially responsible for lipopolysaccharide insensitivity in zebrafish with a highly conserved function of MyD88 [J]. *The Journal of Immunology*, 2010, **185**(6): 3391—3400
- [55] Meng Z, Zhang X Y, Guo J, *et al.* Scavenger receptor in fish is a lipopolysaccharide recognition molecule involved in negative regulation of NF- κ B activation by competing with TNF receptor-associated factor 2 recruitment into the TNF- α signaling pathway [J]. *The Journal of Immunology*, 2012, **189**(8): 4024—4039
- [56] Kurt-Jones E A, Popova L, Kwinn L, *et al.* Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus [J]. *Nature Immunology*, 2000, **1**: 398—401
- [57] Haynes L M, Moore D D, Kurt-Jones E A, *et al.* Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus [J]. *Journal of Virology*, 2001, **75**(22): 10730—10737
- [58] Rassa J C, Meyers J L, Zhang Y M, *et al.* Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4 [J]. *PNAS*, 2002, **99**(4): 2281—2286
- [59] Su J G, Yang C R, Xiong F, *et al.* Toll-like receptor 4 signaling pathway can be triggered by grass carp reovirus and *Aeromonas hydrophila* infection in rare minnow *Gobiocypris rarus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, **27**(1): 33—39
- [60] Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, **388**(4): 621—762
- [61] Sharma S, TenOever B R, Grandvaux N, *et al.* Triggering the interferon antiviral response through an ikk-related pathway [J]. *Science*, 2003, **300**(5622): 11482—11451
- [62] Yamamoto M, Takeda K. Current views of toll-like receptor signaling pathways [J]. *Gastroenterology Research and Practice*, 2010, **2010**: 240365
- [63] Fitzgerald K A, Rowe D C, Barnes D J, *et al.* LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- κ B involves the toll adapters TRAM and TRIF [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2003, **198**(7): 1043—1055
- [64] Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, *et al.* TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor3-mediated interferon-beta induction [J]. *Nature Immunology*, 2003, **4**(2): 161—167
- [65] Ashley M, Elizabeth B, Jodee A, *et al.* Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF- κ B activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(36): 37227—37230
- [66] Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, *et al.* TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1 [J]. *Nature*, 1996, **383**(6599): 443—446
- [67] Doyle S L, O'Neill L A. Toll-like receptors: from the discovery of NF- κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2006, **72**(9): 1102—1113
- [68] Brikos C, O'Neill L A. Signalling of toll-like receptors [J]. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2008, **183**: 21—50
- [69] Fitzgerald K A, Palsson-McDermott E M, Bowie A G, *et al.* Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction [J]. *Nature*, 2001, **413**(6851): 78—83
- [70] Oshiumi H, Sasai M, Shida K, *et al.* TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to

- toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(50): 49751—49762
- [71] Chen J S, Wang T Y, Wang D, *et al.* Evidence for positive selection in the TLR9 gene of teleosts [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, **24**(2): 234—242
- [72] Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, *et al.* Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution [J]. *Immunogenetics*, 2008, **60**(12): 727—735
- [73] Mikami T, Miyashita H, Takatsuka S, *et al.* Molecular evolution of vertebrate Toll-like receptors: Evolutionary rate difference between their leucine-rich repeats and their TIR domains [J]. *Gene*, 2012, **503**(2): 235—243
- [74] Fornůsková A, Vinkler M, Pagès M, *et al.* Contrasted evolutionary histories of two Toll-like receptors (Tlr4 and Tlr7) in wild rodents (MURINAE) [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2013, **13**: 194
- [75] Pujol N, Link E M, Liu L K, *et al.* A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Current Biology*, 2001, **11**: 809—821
- [76] Putnam N H, Putnam N H, Srivastava M, *et al.* Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization [J]. *Science*, 2007, **317**(5834): 86—94
- [77] Zheng L, Zhang L, Lin H, *et al.* Toll-like receptors in invertebrate innate immunity [J]. *Invertebrate Survival Journal*, 2005, **2**: 105—113
- [78] Azumi K, Santis R D, Tomaso A D, *et al.* Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: “waiting for Godot” [J]. *Immunogenetics*, 2003, **55**(8): 570—581
- [79] Kasamatsua J, Oshiumi H, Matsumoto M, *et al.* Phylogenetic and expression analysis of lamprey toll-like receptors [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, **34**(8): 855—865
- [80] Zhang J, Liu S, Rajendran K V, *et al.* Pathogen recognition receptors in channel catfish: III Phylogeny and expression analysis of Toll-like receptors [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, **40**(2): 185—194
- [81] Oshiumi H, Tsujita T, Shida K, *et al.* Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome [J]. *Immunogenetics*, 2003, **54**(11): 791—800
- [82] Baoprasertkul P, Xu P, Peatman E, *et al.* Divergent Toll-like receptors in catfish (*Ictalurus punctatus*): TLR5S, TLR20, TLR21 [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, **23**(6): 1218—1230
- [83] Sepulcre M P, Alcaraz-Pérez F, López-Muñoz A, *et al.* Evolution of lipopolysaccharide (lps) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize lps and negatively regulates NF-kappaB activation [J]. *The Journal of Immunology*, 2009, **182**(4): 1836—1845
- [84] Rebl A, Goldammer T, Seyfert H M. Toll-like receptor signaling in bony fish [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, **134**(3—4): 139—150
- [85] Meng J, Gong M, Björkbacka H, *et al.* Genome-wide expression profiling and mutagenesis studies reveal that lipopolysaccharide responsiveness appears to be absolutely dependent on TLR4 and MD-2 expression and is dependent upon intermolecular ionic interactions [J]. *The Journal of Immunology*, 2011, **187**(7): 3683—3693

CONSERVATIVE AND EVOLUTION OF TLR4'S GENE STRUCTURE AND FUNCTION IN FISH AND MAMMALIAN

PEI Yong-Yan^{1,2}, HUANG Rong¹, LI Yong-Ming¹, LIAO Lan-Jie¹, ZHU Zuo-Yan¹ and WANG Ya-Ping¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

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

Abstract: Innate immunity is the first defense of organisms, which exist in all kinds of multicellular organism. Toll-like receptors (TLRs) is a class of Pattern recognition receptors (PRRs) that involved in the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and played an important role in innate immunity. In regard to TLR4, which is a member of TLRs and could recognize the lipopolysaccharide (LPS) in bacterial. In the study, the found history of TLR4, structural features of TLR4 in mammals and fish, distribution of TLR4, difference of TLR4 in mammals and fish, signaling transmission, and the evolution of TLR4 were reviewed. This summary in the study would provide a reference for the research of TLR.

Key words: TLR4; Signal transduction pathway; LPS; Evolution