

• 综 述 •

树突状细胞及调节性 T 细胞与慢性丙型肝炎发病机制的关系

牛志立, 魏新素 综述, 张平安[△] 审校

(武汉大学人民医院检验科, 湖北武汉 430060)

关键词: 肝炎, 丙型, 慢性; 树突状细胞; 调节性 T 细胞; 综述**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.03.026**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2014)03-0315-03

全球大约有 1.7 亿人发生慢性丙型肝炎病毒(HCV)感染。HCV 感染自发性清除受到多种因素的影响,包括年龄、种族、性别、HBV 或 HIV 共感染,以及宿主的遗传学(如 HLA 单体型和 IL28B 基因变异)。尽管在 HCV 感染初期都检测到一系列免疫反应,但最终发展为慢性感染的个体都存在免疫抑制的情况。自发性清除 HCV 感染的个体持续呈现出对 HLA I 类(CD8⁺)和 II 类(CD4⁺)限制性 T 细胞的增殖反应,而慢性感染者仅有少量增殖反应。对于慢性感染者,多种因素可导致 T 细胞反应的降低,如病毒突变,逃逸 CD4 和 CD8 T 细胞的识别、CD4⁺ T 细胞的无反应、CD8⁺ T 细胞的耗竭、转录因子叉头框蛋白(FoxP3⁺)调节性 T(reg)细胞的诱导和(或)树突状细胞功能的损害。

1 树突状细胞(DCs)及其免疫调节

DCs 是专职抗原递呈细胞,具有潜在诱导原始 T 细胞反应的能力。人外周血主要包括两类 DCs,即浆细胞样树突状细胞(pDCs)和髓样树突状细胞(mDCs)。每一种类占健康者外周血单个核细胞的 0.3%~0.5%。pDCs 和 mDCs 分别来源于骨髓和淋巴前体细胞,主要贮存在骨髓。人 pDCs 和 mDC 可根据细胞表面表达的 CD45R/B220⁺ CD123^{bright} CD303⁺ 和 CD11c⁺ CD1a⁺ CD1c⁺ 进一步区分。

mDCs 和 pDCs 在捕获、处理和提呈抗原,表达共刺激分子,以及产生细胞因子等方面能力差异较大。新鲜分离的 pDCs 表达中度、水平不均的 HLA-DR,摄取抗原能力较弱,在混合淋巴细胞反应中表现出较低的同种异体 T 细胞刺激活性。相反,mDCs 在捕获、处理、递呈 HLA I 类和 II 类分子(表位)给 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞的能力较 pDCs 强 10~50 倍^[1]。mDCs 和 pDCs 本质上的差别在于 Toll 样受体(TLR)的表达。pDC 在胞内小室大量表达 TLR7 和 TLR9,分别识别单链 RNA 和未甲基化的 CpG-DNA 配体,因此,pDCs 在病毒感染后能潜在地调节抗病毒免疫和分泌大量的 I 型干扰素(I-IFN)的能力。增加 TLR 配体,pDCs 可上调 HLA-DR 和细胞表面共刺激分子(如 CD80 和 CD86)的表达,分泌大量 IFN- α / β ,从而获得 T 细胞刺激活性,诱导 Th1 细胞极化和 IFN- γ 产生。mDCs 则通过 TLR2 识别病毒配体(如 HCV 核心和 NS3 蛋白),上调 HLA-DR 水平,尤其是 IL-12 的产生,使 CD4⁺ 分化为 Th1,从而增强同种异体 T 细胞反应活性。此外,mDCs 还通过 TLR3 识别双链 RNA 病毒,刺激 IL-1、IL-6 和 IL-12 的大量释放,以及 I-IFN 的少量分泌^[2]。

2 树突状细胞与慢性丙型肝炎

HCV 感染对 DCs 功能的影响目前仍没有定论。急性

HCV 感染期,大部分患者即使没有临床症状,但其 DCs 功能是正常的。慢性 HCV 感染者外周血 pDCs 和 mDCs 数量减少,且循环 DCs 数量与 ALT 水平及肝脏疾病严重程度有关^[3]。虽然慢性 HCV 感染者外周血 mDCs 和 pDCs 数目减少,但在肝脏中的数目是增加的,且肝脏 mDCs/pDCs 高于外周血,提示 mDCs 优先迁移至肝脏炎症区域。这一结果可以解释为,慢性 HCV 感染者 DCs 主动交换和肝内分布不均是导致循环 DCs 减少的主要原因,确切机制有待进一步阐明。血循环中未成熟 DCs 主要表达炎症趋化因子受体,如 CC 类受体(CCR);受到 HCV 感染后迁移至肝内的 DCs 能上调趋化因子,如细胞表达和分泌因子(RANTES)、巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1 α)和 MIP-1 β 的产生。正常情况下,随着健康组织的改变,DCs 主要下调 CCR5 和上调 CCR7 表达,使细胞对同源 CCR7 趋化因子做出反应,导致淋巴组织中 T 细胞的聚集。近来的研究表明,与健康对照者相比,HCV 感染者血液循环中 pDCs 和 mDCs 表达的是 CCR5,而不是 CCR7。而且,HCV E2 蛋白能使表达 CCR7 的 DCs 对 CC 类配体(CCL21)无反应。因此,慢性 HCV 感染者出现抗病毒反应减弱,可能与部分 DCs 困于肝脏而不能返回到淋巴结节有关。

目前,慢性 HCV 感染对 pDCs 和 mDCs 存在功能损害的观点,主要包括:IFN- α 和 IL-12 分泌降低,IL-10 的产生增加,同时,HLA-DR 和共刺激分子(如 CD86)的表达也降低,最终导致共刺激活性降低和初始 Treg 细胞能力增加。从慢性 HCV 感染者获得 DCs,具有不成熟的表型,且受到刺激后不能上调表达成熟的共刺激标记物(如 TNF- α)。循环 pDCs 检测显示,HLA-DR 表达减少,分泌 IFN- α 的能力显著下降,导致抗病毒效能降低^[4]。慢性 HCV 感染者中,mDCs 分泌 IL-12 水平下降,而 IL-10 分泌水平增加,从而导致免疫耐受的出现,降低 T 细胞的诱导增殖和 Th1 的极化^[5]。因此,mDCs 功能在急性 HCV 感染中受到限制,而且那些 mDC 同种异体刺激能力降低的患者有可能发展为病毒慢感染。然而,与慢性 HCV 感染者 DCs 受到损害相比,健康对照者和自发性清除 HCV 感染者,外周血来源的 DCs 表型一致,功能也是正常的。因此,HCV 感染慢性化与 DCs 数量减少和功能降低有关。

HCV 感染致 DCs 紊乱的机制有部分相关研究。HCV 核心蛋白 NS3、NS4 和 NS5 可通过下调 HLA 和共刺激分子的表达,减少细胞因子的生成,抑制 TLR 信号途径和降低协调刺激因子的活性等方式损伤 DCs 的功能^[6]。其中 HCV 核心蛋白还可诱导单核细胞 IL-10/TNF- α 分泌,促进 pDC 细胞的凋亡;

而且,单核细胞受到 HCV 核心蛋白 NS3、NS4 刺激后,产生的 IL-10 还可影响 DC 的成熟,降低同种异体刺激能力,进而干扰 Th1 细胞的分化。然而,对 HCV 感染与 DCs 功能影响的研究结果也存在矛盾之处。在慢性 HCV 感染者中,也存在既不损伤 DCs 功能,也不损伤 DCs 表型,并且显示出正常活性的现象,主要表现在慢性 HCV 感染者 DCs 典型成熟标志物 CD83、CD86、CD54 和 HLA-DR 的表达水平与健康对照者差异没有统计学意义^[7]。此外,两组人群 DCs 对主要同种异体 T 细胞的刺激,表达相同的功能。而且,慢性 HCV 感染者分泌 IL-12 和 IFN- α 的水平与健康对照者相似。慢性 HCV 感染者 DCs 抗原摄取和 MHC-肽复合物形成功能均正常,这些抗原处理过程表明,在 HCV 感染过程中抗原提呈功能没有受到影响。因此,有关 DCs 与慢性丙型肝炎发病机制的关系有待进一步探讨。

3 调节性 T 细胞及其免疫调节

CD4⁺ 调节 Treg 细胞是以 FoxP3 的表达为特征,细胞表面表达 IL-2 受体 α 链(CD25),主要作用是参与免疫的自我耐受和机体平衡。Treg 细胞在维持人和微生物共生关系中起着重要的免疫调节作用,当有外界的病原微生物入侵机体时,效应性 T 细胞和天然免疫系统会采取一系列的免疫反应来清除病原体,如果产生的免疫反应过强,在清除病原体的同时也可能会导致组织损伤。除了维护免疫内环境稳定,Treg 细胞也对自体肿瘤有效的免疫反应产生抑制作用,以及由多种人类病原体引起的持续感染。

Treg 细胞按照来源位置的不同分为天然型(n)Treg 细胞和诱导性(i)Treg 细胞两类。nTreg 细胞诱导感染耐受,通过调节细胞因子(IL-10、TGF- β 、IL-35)依赖性机制或非依赖机制,将传统 T 细胞转变为 iTreg 细胞,这一过程的调节与 DCs 相互作用有关。同时,nTreg 细胞和 iTreg 细胞表达具有互补性,两者在免疫功能上分别致力于防止自身免疫性疾病和维持非炎症的内环境。目前,没有明确限定的标记物来鉴别 Treg 细胞,或者区分 nTreg 细胞和 iTreg 细胞亚类。FoxP3 是上述两个亚类共有的转录因子,激活后出现短暂表达,传统的人免疫 T 细胞并没有免疫抑制活性。Treg 细胞一旦被激活,可以抑制多种免疫细胞的活性,如 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞、B 细胞、NK 细胞、NKT 细胞、巨噬细胞和 DCs,也被称之为旁路抑制的现象^[8]。这种抑制普遍认为是 nTreg 细胞最初通过直接和细胞与细胞间的接触实现,但仍然存在多种调节机制。抑制性细胞因子与 Treg 细胞抑制 Teff 细胞活性的接触-非依赖机制密不可分,如可溶性的和膜表面转化生长因子(TGF- β),在诱导维持 iTreg 和 nTreg 细胞,以及抑制 Teff 细胞激活等方面具有重要作用。同样,Treg 细胞依赖性产生的 IL-10,在抑制 CD4⁺ Teff 细胞对抗动物模型和人类疾病中的病原体反应上起重要作用。

4 Treg 细胞与慢性丙型肝炎

Treg 细胞在慢性 HCV 感染发病机制中具有非常重要的作用。首先,与未感染或自发清除病毒者相比,慢性感染者肝脏和外周血循环中 Treg 细胞的比例是增加的^[9]。而且,从 HCV 感染者血液中分离出的 CD4⁺CD25⁺ T 细胞能够抑制病毒特异性 CD8⁺ T 细胞反应,即使剔除 CD25⁺ T 细胞,增强细

胞增殖的能力仍然存在。至于 Treg 细胞的增加是一种 HCV 抗原特异性反应,还是慢性炎症和肝脏疾病的一种非特异性结果,仍不清楚。HCV 编码 Treg 细胞的表位目前存在 HCV 结构(核心)和非结构(NS3、NS4 和 SN5b)蛋白。通过染料结合法,可以使 HCV 表位和 MHC II 的四聚物在细胞内着色,Ebinuma 等^[10]首次报道慢性 HCV 感染者外周血单个核细胞中 FoxP3⁺ 能够特异性识别 HCV 抗原。一项全基因表达分析比较 FACS-分类 CD4⁺/CD25^{high} T 细胞(nTreg 表型)试验发现,HCV 感染和非感染者 CD4⁺/CD25^{high} T 细胞数只有较小的差异。然而,其他研究者观察到,HCV 抗原特异 Treg 细胞表型的增加和 iTreg 细胞一致,iTreg 细胞通过 IL-10 或 TGF- β 的产生诱导抑制^[11]。目前达成共识的是,慢性 HCV 感染者中增加的 Treg 细胞数是不均一的,包括 nTreg 和 iTreg 细胞,其中 nTreg 细胞感染早期 HCV 表位特异性反应,可以诱导 iTreg 细胞的产生(感染耐受)和随后的抑制。

nTreg 细胞抑制自身免疫的正常功能反应表明,HCV 编码肽(表位)序列与自身抗原同源。经 BLAST 搜索发现,Treg 细胞表位相关病毒基因组与人类抗原具有广泛的同源性。而且,这些表位通过慢性 HCV 感染者血液 Treg 细胞能够诱发反应,而健康对照者 Treg 细胞则不能诱发反应,表明慢性 HCV 感染中 HCV 特异性 nTreg 细胞,在体内被激活。因此,HCV 特异性 Treg 细胞识别表位和 Teff 细胞的表位临近或重叠,与病毒清除有关^[12]。另外 Treg 细胞数与慢性 HCV 感染密切相关。与自发 HCV 清除者相比,持续性病毒血症者 Treg 细胞在体外具有更强的抑制性,作者推测 Treg 细胞数量的增加能够抑制 Teff 细胞反应和促进慢性化进程。最近,Cusick 等^[13]报道,在持续性 HCV 感染的过程中出现多种免疫显性 HCV 表位的改变。这些表位的改变诱导 Foxp3⁺ CD4⁺ Treg 细胞抑制 Teff 细胞对同类不相关表位的反应。因此,在一些慢性感染中,Treg 细胞抑制病毒-特异性 CD4⁺ T 细胞活性,损害 Teff 细胞的功能,影响对病毒感染的清除,促进病毒持续存在。

5 DCs 和 Treg 细胞的损害与慢性丙型肝炎的发病机制

目前尚不清楚 HCV 影响 Treg 细胞对感染的反应是直接的还是间接依赖一些其他细胞的调节作用。然而,在慢性 HCV 感染中,DCs 细胞对 Treg 细胞的增殖起着关键作用。HCV 蛋白(核心、NS3、NS4 和 NS5)对来源于健康个体的 DCs,在表达 HLA 和细胞表面共刺激分子,分泌促炎性细胞因子,以及诱导同种异体 T 细胞增殖等方面具有明显的抑制作用。这些病毒蛋白不能直接影响 T 细胞的增殖,因此 HCV 对 Teff 细胞功能的影响依赖于 DCs 的调节作用。近来的研究表明,DCs 和 Teff 细胞均对 HCV 易感^[14],结合及随后被吞噬的病毒颗粒的调节是通过包膜糖蛋白 E1、E2,与 DCs 表达的一种细胞表面受体-DCs 特异性 C 型外源凝集素(DC-SIGN)相互作用完成。即使缺乏持续感染,HCV E1 和 E2 与 DC-SIGN 连接后,转移信号促进耐受和 Treg 细胞的形成。对于 CD4⁺ T 细胞,Dominguez 等^[15]报道将 HCV 核心蛋白表达的质粒转染至 T 淋巴细胞系,可以上调 FoxP3 和 CTLA-4,获得抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞非特异增殖反应的能力,表明 HCV 感染能够单独诱导 Treg 细胞的形成。

HCV 可以直接感染 T 细胞和 DCs,造成 DCs 功能的损伤在诱导和维持 HCV 特异性 Treg 细胞反应上起重要作用。已有明确证据表明,DCs 对外来物和自身抗原建立和维持的免疫耐受发挥重要作用^[15]。尤其是肝脏,提供了一个典型的致耐受环境,在这里 DCs 和 Treg 细胞相互作用,极易形成慢性感染性疾病,然而确切的机制仍不清楚,普遍认同未成熟 DCs 诱导了 Treg 细胞的功能^[16]。值得注意的是,人类肝组织来源的 DCs,最初表现为不成熟的、髓样表型,以表达低水平或少量细胞表面共刺激分子(如 CD40、CD80、CD83 和 CD86)为特征。与外周血来源的 DCs 相比,当 TLR4 拮抗后,肝脏 DCs 能产生高水平 IL-10 和低水平前炎性细胞因子(IL-1、IL-6 和 TNF- α)。此外,肝脏 DCs 在处女和同种异体 CD4⁺T 细胞共培养的环境中,能刺激 IL-10 依赖性 CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ Treg 细胞的大量形成。在健康对照者和慢性 HCV 感染者来源的同种异体 T 细胞和 mDCs 共培养,也观察到相似的结果。与对照组相比,感染者 mDCs 能刺激更多 Treg 细胞增殖。

6 总 结

慢性 HCV 感染者存在外周血循环 DC 功能的受损,pDCs 和 mDCs 数量减少,同时细胞因子的分泌,细胞表面的共刺激分子的表达或刺激活性都会下降,导致处女 Teff 细胞失活,引起机体抗病毒活性降低。另一方面,随着病毒持续感染,慢丙肝患者血中 Treg 细胞数量增加和功能增强。Treg 细胞可以抑制其他免疫细胞的活性,包括直接接触依赖和非依赖的机制,或间接通过抑制树突状细胞的成熟和免疫能力,来抑制 Teff 细胞活性,从而造成慢性 HCV 感染。而且,最新研究表明,未成熟 DCs 通过对处女 Teff 细胞功能的影响和 Treg 细胞活性的改变,在慢性丙型肝炎的致病中发挥关键作用。

参考文献

[1] Averill L, Lee WM, Karandikar NJ. Differential dysfunction in dendritic cell subsets during chronic HCV infection[J]. Clin Immunol, 2007, 123(1): 40-49.

[2] Bohnenkamp HR, Papazisis KT, Burchell JM, et al. Synergism of toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of t-helper cell type 1 responses[J]. Cell Immunol, 2007, 247(2): 72-84.

[3] Ryan EJ, O'Farrelly C. The affect of chronic hepatitis C infection on dendritic cell function: a summary of the experimental evidence [J]. J Viral Hepat, 2011, 18(1): 601-607.

[4] Amjad M, Abdel-Haq N, Faisal M, et al. Decreased interferon-alpha production and impaired regulatory function of plasmacytoid

dendritic cells induced by the hepatitis C virus NS 5 protein[J]. Microbiol Immunol, 2008, 52(10): 499-507.

[5] Pachiadakis I, Chokshi S, Cooksley H, et al. Early viraemia clearance during antiviral therapy of chronic hepatitis C improves dendritic cell functions[J]. Clin Immunol, 2009, 131(3): 415-425.

[6] Krishnadas DK, Ahn JS, Han J, et al. Immunomodulation by hepatitis C virus-derived proteins: targeting human dendritic cells by multiple mechanisms[J]. Int Immunol, 2010, 22(6): 491-502.

[7] Landi A, Yu H, Babiuk LA, et al. Human dendritic cells expressing hepatitis C virus core protein display transcriptional and functional changes consistent with maturation [J]. J Viral Hepat, 2011, 18(10): 700-713.

[8] Shevach EM. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cellmediated suppression[J]. Immunity, 2009, 30(1): 636-645.

[9] Smyk-Pearson S, Golden-Mason L, Klarquist J, et al. Functional suppression by FoxP3⁺CD4⁺CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection [J]. J Infect Dis, 2008, 197(1): 46-57.

[10] Ebinuma H, Nakamoto N, Li Y, et al. Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells in hepatitis C virus infection [J]. J Virol, 2008, 82(10): 5043-5053.

[11] Langhans B, Braunschweiger I, Arndt S, et al. Core-specific adaptive regulatory T-cells in different outcomes of hepatitis C [J]. Clin Sci (Lond), 2010, 119(2): 97-109.

[12] Heeg MH, Ulsenheimer A, Grüner NH, et al. FOXP3 expression in hepatitis C virus-specific CD4⁺ T cells during acute hepatitis C [J]. Gastroenterology, 2009, 137(4): 1280-1288.

[13] Cusick MF, Schiller JJ, Gill JC, et al. Hepatitis C virus induces regulatory T cells by naturally occurring viral variants to suppress T cell responses [J]. Clin Dev Immunol, 2011, 2011: 806061.

[14] Kondo Y, Sung VM, Machida K, et al. Hepatitis C virus infects T cells and affects interferon-gamma signaling in T cell lines [J]. Virology, 2007, 361(1): 161-173.

[15] Dominguez-Villar M, Fernandez-Ponce C, Munoz-Suano A, et al. Up-regulation of FOXP3 and induction of suppressive function in CD4⁺ Jurkat T-cells expressing hepatitis C virus core protein [J]. Clin Sci (Lond), 2012, 123(1): 15-27.

[16] Cobbold SP, Adams E, Nolan KF, et al. Connecting the mechanisms of T-cell regulation: dendritic cells as the missing link [J]. Immunol Rev, 2010, 236(1): 203-218.

(收稿日期:2013-12-02)

总体与样本

根据研究目的确定的同质研究对象的全体(集合)称为总体,包括有限总体和无限总体。从总体中随机抽取的部分观察单位称为样本,样本包含的观察单位数量称为样本含量或样本大小。如为了解某地区 10~15 岁儿童血钙水平,随机选取该地区 3 000 名 10~15 岁儿童并进行血钙检测,则总体为该地区所有 10~15 岁儿童的血钙检测值,样本为所选取 3 000 名儿童的血钙检测值,样本含量为 3 000 例。类似的研究需满足随机抽样原则,即需要采用随机的抽样方法,保证总体中每个个体被选取的机会相同。