

调节性 T 细胞免疫抑制与类风湿性关节炎发病机制相关研究进展

侯 丽 沈 波

调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 是一种特殊的免疫调节细胞,具有免疫无反应性和免疫抑制性两大功能特征,可通过细胞间直接接触和分泌抑制性细胞因子(如 IL-10、TGF- β) 等途径抑制 B 细胞、T 细胞,以及树突状细胞(DC)等多种免疫细胞的活性和功能,对维持机体免疫自稳,防止自身免疫性疾病具有极其重要的作用。类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节滑膜炎为特征的慢性全身性自身免疫性疾病,滑膜炎持久反复发作,继而侵犯骨组织,造成关节软骨、骨和关节囊的破坏,最终导致关节畸形和功能丧失。其病因和发病机制至今尚未完全清楚,近年越来越多的证据表明,RA 患者体内存在 Treg 细胞数量改变和(或)功能降低,提示 Treg 细胞的异常与 RA 的发生发展密切相关,因此受到人们的广泛关注。本文就 Treg 细胞的分类、功能特征和免疫抑制机制及 Treg 细胞与 RA 的相关关系,结合近几年的研究成果做一综述,以进一步加深对 RA 发病机制的认识,为 RA 的诊断和治疗提供新的思路。

一、Treg 细胞分类、功能特征和免疫抑制机制

免疫调节细胞的研究始于 1970 年,但直到 1995 年 Sakaguchi 等发现将去除 CD4⁺CD25⁺ 的 T 细胞悬浮液接种到无胸腺的裸鼠体内会引发多种自身免疫性疾病,而重新注入 CD4⁺CD25⁺ T 细胞可抑制此类疾病的发展,说明 CD4⁺CD25⁺ T 细胞对调控自身免疫性疾病具有重要作用,并因此将其命名为 Treg 细胞,Treg 细胞的作用才受到越来越多的关注和研究。

1. 根据其来源和分化不同可将 Treg 细胞分为:天然产生的 Treg 细胞(naturally arising Treg cells, nTreg)、诱导型 Treg 细胞(induced Treg cells, iTreg)和其他类型 Treg 细胞。nTreg 细胞是目前研究得最多的

Treg 细胞,主要由未成熟的 T 淋巴细胞在胸腺发育过程中产生,约占人和小鼠外周血 CD4⁺ T 细胞的 5% ~ 10%。其组成性表达 CD25(即 IL-2 受体 α 链)和特异性核转录因子 Foxp3。Foxp3 能够促使 Treg 细胞分化成熟以及维持 Treg 细胞下调免疫应答的功能。nTreg 细胞主要通过细胞间直接接触和分泌免疫抑制性细胞因子发挥抑制作用。iTreg 细胞是在外周的特定免疫环境中,由抗原刺激或免疫抑制因子(如 IL-10)诱导成熟的 CD4⁺CD25⁻ T 细胞转化而来,主要包括 Tr1 和 Th3 两种亚型。Tr1 细胞以产生大量 IL-10 为主要特征,并通过产生免疫抑制性细胞因子如 IL-10 和 TGF- β 抑制机体的免疫反应。Th3 细胞最早是在研究口服耐受机制的过程中发现的,其主要分泌高水平的 TGF- β ,且 Th3 细胞可增强浆细胞分泌 IgA 的能力^[1]。此外,还有部分 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群如 $\gamma\delta$ T 细胞、CD8⁺CD28⁻ Treg、自然杀伤细胞等,它们通过产生抑制性细胞因子如 IL-10、TGF- β 等影响 Th1/Th2 平衡,并进而发挥免疫抑制功能^[2]。

2. Treg 细胞的功能特征:各种 Treg 细胞均具有免疫无反应性和免疫抑制性两大功能特征。免疫无反应性主要表现为对 IL-2、抗 CD3 单抗刺激以及抗 CD3、抗 CD28 单抗联合刺激均呈无应答状态,免疫抑制性主要表现为 Treg 细胞被激活后能以多种方式抑制 T 细胞功能,包括分泌具有免疫抑制功能的转化生长因子- β (TGF- β)、IL-10 及表达 PD-L 和 CTLA-4 等抑制性膜表面分子。以往一直认为,Treg 细胞以抗原非特异性方式发挥抑制 T 细胞的功能,这种抑制作用不具有 MHC 限制性。但近年研究发现,若采用特殊免疫策略,Treg 细胞在其表面 T 细胞受体(TCR)结合抗原及高浓度外源性 IL-2 双信号刺激下,也可活化、增殖并介导抗原特异性免疫抑制或免疫耐受,但 nTreg 细胞增殖程度不如 iTreg 细胞^[3,4]。

3. Treg 细胞的免疫抑制机制:Treg 细胞可以抑制包括 B 细胞、NK 细胞、NKT 细胞、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY12H10002);台州市科委 A 类项目(102KY09)

作者单位:317000 温州医学院附属台州医院检验科

通讯作者:沈波,电子信箱:shenbkz@yahoo.com.cn

胞,以及单核细胞和树突状细胞(DC)等在内的多种免疫细胞的活性和功能,从而参与机体的自身免疫调节。关于 Treg 细胞参与免疫调节的作用机制尚未完全清楚,目前主要认为其通过以下几种方式发挥免疫抑制的作用。

(1)细胞-细胞直接接触:通过细胞-细胞接触,Treg 细胞可直接抑制靶细胞的活化,增殖和分化,该作用主要依赖于 Treg 细胞表面的膜表面抑制分子。研究发现小鼠和人类 Treg 细胞表面都可持续表达细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4,CTLA-4),CTLA-4 通过“trans-endocytosis”作用下调 APC 表面 CD80/CD86 分子的表达,阻断 CD28 介导的激活 T 细胞的共刺激信号,间接抑制 T 细胞的增殖^[5]。另外,CTLA-4 与 CD80/CD86 结合还可诱导人和小鼠致耐受性 DC 细胞产生吡啶胺 2,3-双加氧酶(IDO),IDO 可分解色氨酸,而游离色氨酸含量的降低与效应 T 细胞活性下降和细胞周期阻滞有关^[6]。糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor, GITR)也是调控 Treg 细胞功能的重要参与者,GITR 不仅高表达于 Treg 细胞表面,其在活化的效应 T 细胞上也表达上调。在体内外实验中,抗 GITR 的抗体均可抵消 Treg 细胞介导的抑制作用,但作用机制还不清楚。GITR 连同其他的肿瘤坏死因子受体家族成员如 OX40,4-1BB 和 TNFR II 是效应 T 细胞有效的共刺激和生存分子,且 GITR 活化后似乎更容易加强效应 T 细胞的活化和应答,并有效地逃脱 Treg 细胞介导的抑制作用。GITR 缺乏并不会引起明显免疫自稳和免疫耐受改变,但 GITR 可作为癌症免疫治疗的潜在指标。另外,表达于 Treg 表面的黏附分子 LAG-3,是一种 CD4 分子同源物,表现出与 MHC II 类分子结合的高度亲和力。LAG-3 与未成熟的 DC 表面的 MHC II 类分子结合可抑制 DC 成熟和共刺激的能力^[7]。

此外,Treg 细胞表面还高表达胞外酶 CD39 和 CD73,可将胞外 ATP 或 ADP 水解为 AMP,并产生腺苷,腺苷与效应细胞表面的腺苷受体 A2A 结合而发挥抑制和抗增殖效应。Treg 细胞可产生大量的 cAMP,并通过缝隙连接将大量 cAMP 转移至效应 T 细胞中直接抑制效应 T 细胞的增殖^[8]。研究还表明,通过与 Treg 共培养,小鼠 DC 中 cAMP 表达立即增加是快速下调共刺激分子 CD80 和 CD86 的原因,说明其对 DC 细胞同样具有抑制作用^[9]。

(2)分泌抑制性细胞因子:Treg 细胞可以分泌 IL-10,TGF- β ,IL-35 等具有免疫抑制作用的细胞因子,它们产生的抑制效益非常广泛。IL-10 选择性消融的 Foxp3⁺ Treg 细胞显示了由 Treg 细胞产生的 IL-10 在抑制结肠和肺部等炎症中起着重要作用。IL-10 的基因位点被认定为是溃疡性结肠炎的易感基因位点,且 IL-10RA 或 IL-10RB 突变可导致严重的炎症性肠病的早期发作^[10]。最近的两项研究显示 Treg 细胞和 Th17 细胞需要 IL-10R 信号通路参与从而抑制结肠 Th17 细胞的反应^[11,12]。同时,TGF- β 可以抑制 Th1 细胞介导的免疫应答和炎性反应,TGF- β 信号也与 Treg 细胞数量多少和功能强弱密切相关,有关研究表明先天性缺乏 TGF- β 的转基因小鼠的外周血 Treg 细胞数量会明显减少,且与正常小鼠相比更容易患结肠炎。另外,新近发现的细胞因子 IL-35 也被证明能够维持肠道的免疫耐受,IL-35 结构上由 p35 和 EBI3 亚基组成。Collison 等^[13]报道指出,当 Treg 细胞缺乏产生 IL-35 的 EBI3 及 IL-12a 基因时,就会丧失抑制效应 T 细胞的能力,最终导致炎症性肠病的发展。

(3)竞争性抑制和诱导细胞凋亡:CD25(即 IL-2 受体 α 链)不仅组成性高表达于 Treg 细胞表面,在效应 T 细胞上也表达上调,它是 Treg 细胞维持体内平衡不可缺少的重要因素。而 IL-2 是体内重要的细胞增殖信号,Treg 细胞可竞争性剥削 IL-2,使效应 T 细胞因为得不到充足的 IL-2 而不能增殖,并诱导剥削后细胞凋亡^[14]。但是,Treg 细胞引起的 IL-2 的消耗可能会加强某些效应 T 细胞的反应,如 Th17 细胞的应答反应^[15]。另外,研究发现,经 CD3 和 CD46 共同刺激活化后,人类 Treg 细胞可诱导产生颗粒酶 A 并通过穿孔酶依赖机制诱导效应细胞发生凋亡。但后来的实验表明,颗粒酶 B(而不是颗粒酶 A)在小鼠 Treg 细胞内高度表达上调,且在体外 Treg 细胞激活后可以颗粒酶 B 依赖方式杀伤效应 T 细胞或 APC。进一步的体内研究证实,颗粒酶 B 是维持 Treg 依赖的长期皮肤移植耐受和 Treg 抑制肿瘤清除的关键因素。

二、Treg 细胞与 RA 的发病机制相关关系

RA 是一种慢性炎症性自身免疫性疾病,其发病机制尚未完全清楚。免疫紊乱被认为是其主要的发病机制,各种免疫细胞,如 T 细胞,B 细胞,单核细胞、巨噬细胞、及其调节因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-17 等参与了 RA 发病过程。Treg 细胞能

对自身反应性细胞发挥免疫抑制效应,其在 RA 中的作用已在人类患者和小鼠实验中进行研究。

与正常小鼠相比,通过注射抗 CD25 单抗去除 Treg 细胞的 DBA/1 小鼠胶原诱导性关节炎更重,抗 II 型胶原抗体的浓度更高,细胞免疫和体液免疫应答放大。而过继转移 CD25⁺Treg 细胞可以有效抑制疾病进展。青少年特发性关节炎患者中,病情严重的患者明显提示 CD4⁺CD25⁺^{bright} 细胞计数减少,说明该细胞群在这些疾病中具有有利作用。

Treg 细胞在 RA 发病过程中的作用,目前仍处于不断研究阶段。主要认为 RA 患者体内存在 Treg 细胞的数量改变和或功能降低。研究发现 RA 患者外周血中 Treg 细胞的数量显著低于正常对照组,与外周血情况不同,大多数实验表明 RA 患者关节液中 Treg 细胞的比例较正常人明显升高。重要的是,Treg 细胞数量的改变伴随着 Treg 细胞功能的缺陷。因此,在 RA 患者外周血和关节液中可发现 Treg 细胞表型和抑制效应的改变。RA 患者关节液中 Treg 细胞抑制 CD4⁺T 细胞或巨噬细胞产生 IFN- γ 和 TNF- α 的作用缺陷,效应 T 细胞处于持续增殖状态,且与外周血相比,关节液中的效应 T 细胞对 Treg 细胞抑制作用的敏感性降低。高表达于 RA 患者中的 TNF 与 Treg 细胞表面的 TNF II 型受体结合,抑制 Treg 细胞 Foxp3 的表达。Foxp3 数量的减少可影响 Treg 细胞抑制效应 T 细胞增殖和细胞因子产生的能力。

与健康人体中相比,在 RA 患者中 Treg 细胞抑制效应 T 细胞和 APC 的功能受损。其原因可能有:RA 患者关节液中巨噬细胞过表达共刺激分子,如 HLA II 类分子、CD80、CD86 和 CD40,可降低 Treg 细胞的抑制作用。TNF、IL-7 等促炎性细胞因子大量出现在 RA 患者关节液中,从而影响 Treg 细胞的功能。IL-7 影响 Treg 细胞的功能是通过降低效应 T 细胞对 Treg 细胞抑制作用的敏感性,而不是直接作用于 Treg 细胞,因为 Treg 细胞只表达少量或不表达 IL-7 受体。RA 患者中 CD4⁺CD25⁻效应细胞对 Treg 细胞的敏感性降低也是 Treg 细胞功能缺陷的原因。另外,RA 患者关节液中含有大量活化的促炎性细胞因子,这些促炎性环境可促进对 Treg 细胞作用的抑制。因此,这些都可能是 RA 患者关节液中 Treg 细胞富集却不能有效抑制滑膜炎的原因。

近年来越来越多的研究表明,Th17 细胞以及 Th17 与 Treg 细胞之间的平衡被打破似乎在 RA 发生发展中起更为重要的作用。大多 RA 患者外周血中 T

细胞紊乱以 CD4⁺T 细胞的增加为主,Th17 细胞比率增加和 Treg 细胞比率降低。Th17 和 Treg 细胞起着促进或抑制炎症反应的作用,二者在分化发育和功能的发挥上均表现出相互抑制的作用。Th17 细胞高分分泌 IL-17,通过刺激 FLS 分泌基质金属蛋白酶(MMP)-1、与 IL-1 β 和 TNF- α 协同诱导核因子- κ B 受体激活因子配体等途径参与 RA 关节的骨质破坏及周围组织的炎性损伤,促进自身免疫性或过敏性疾病的进展。研究发现 IL-6 能促进 Th17 分化,却抑制 Treg 细胞生长,而应用 IL-6 拮抗剂抑制 IL-6 功能可纠正 RA 患者中 Th17 / Treg 细胞的失衡^[16],使之成为治疗 RA 的一个新靶点。

以上结果表明,RA 患者体内存在 Treg 细胞的功能缺陷或数量改变和 Treg/Th17 细胞失衡。因此,RA 患者体内的免疫抑制效应减弱和免疫炎性效应增强,二者的共同作用可诱导外周血 T 细胞亚群的紊乱以及外周免疫耐受的破坏,进而促进疾病的发生发展。但 Treg 细胞在 RA 发生发展中的作用机制仍未完全清楚,仍有待进一步研究。而上调 RA 患者 Treg 细胞数量和功能已成为有效缓解关节炎症的方法之一。其中,建立抗原特异性免疫耐受是近年发展起来的自身免疫性疾病治疗新策略。令人关注的是,Song 等报告,鸡 II 型胶原蛋白(CC II)诱导的大鼠 RA 模型中,采用删除 N 端肽片段的鸡 II 型胶原编码序列(CCOL2A1)的 DNA 疫苗与其重组表达多肽片段联合免疫后,大鼠 Treg 细胞数量明显增加,在 Treg 细胞调控下发生 Th1 与 Th2 应答转换,导致 Th1 型细胞因子 TNF- β (以往称之为淋巴毒素 LT)表达下调、Th2 型细胞因子 IL-10 和 Th3 型细胞因子 TGF- β 表达上调,从而产生稳定高效的 CC II 特异性免疫耐受。已有研究表明,瓜氨酸化丝聚蛋白是诱导 RA 发生和发展的主要自身抗原,丝聚蛋白分子中主要抗原表位是瓜氨酸肽(citrullinated peptide,CP)片段,也是其抗丝聚蛋白抗体识别的主要位点,瓜氨酸化丝聚蛋白可强烈地促进 T 细胞增殖并诱导 B 细胞产生抗丝聚蛋白抗体。因此,若采用瓜氨酸化丝聚蛋白中瓜氨酸肽 CP 及其 DNA 片段联合免疫,也极有可能具有上调 Treg 细胞数量及功能的作用,通过 Treg 细胞调节 Th1、Th2 和 Th3 细胞因子表达水平,实现 Treg 细胞依赖的瓜氨酸化丝聚蛋白特异性免疫耐受,从而成为预防或治疗 RA 的有效途径。

三、展 望

Treg 细胞是一种特殊的免疫调节细胞,可通过多

种方式发挥其免疫抑制作用,在维持外周免疫耐受和预防自身免疫性疾病中发挥着重要作用。RA 患者外周血中 Treg 细胞数量减少和(或)功能降低,提示 Treg 细胞的异常与 RA 的发生发展密切相关,但仍需关于该方面的临床调查及相关动物实验的考证,未来有必要加强在此方面以及与临床相关实验室指标密切结合的研究,从而更准确地解释 Treg 细胞在 RA 发病中的免疫机制,得出解决方法,最大程度地减轻 RA 患者的病痛。同时针对 RA 患者体内 Treg 细胞数量减少采取各种体外诱导促使该细胞增殖的方法已成为治疗 RA 的一个新靶点,相信未来治疗 RA 的前景将更加广泛。

参考文献

- 1 Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance and TGF- β producing cells [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2006, 5(3):179-190
- 2 Anderson AE, Isaacs JD. Tregs and rheumatoid arthritis [J]. *Acta Reumatol Port*, 2008, 33(1):17-33
- 3 Chen X, Fang L, Song S, *et al.* Thymic regulation of autoimmune disease by accelerated differentiation of Foxp3⁺ regulatory T cells through IL-7 signaling pathway [J]. *J Immunol*, 2009, 183(10):6135-6144
- 4 Lin SC, Chen KH, Lin CH, *et al.* The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3 expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients [J]. *Eur J Clin Invest*, 2007, 37(12):987-996
- 5 Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4 [J]. *Science*, 2011, 332(6029):600-603
- 6 Yan Z, Garg SK, Banerjee R. Regulatory T cells interfere with glutathione metabolism in dendritic cells and T cells [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(53):41525-41532
- 7 Liang B, Workman C, Lee J, *et al.* Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II [J]. *J Immunol*, 2008, 180(9):5916-5926
- 8 Bopp T, Becket C, Klein M, *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of T cell-mediated suppression [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(6):1303-1310
- 9 Fassbender M, Gerlitzki B, Ullrich N, *et al.* Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to Treg cell-mediated suppression of dendritic cell activation [J]. *Cell Immunol*, 2010, 265(2):91-96
- 10 Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, *et al.* Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(21):2033-2045
- 11 Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, *et al.* Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation [J]. *Immunity*, 2011, 34(4):566-578
- 12 Huber S, Gagliani N, Esplugues E, *et al.* Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10-dependent manner [J]. *Immunity*, 2011, 34(4):554-565
- 13 Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, *et al.* IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population [J]. *Nature*, 2010, 463(7287):1039-1043
- 14 Dai J, Liu B, Li Z. Regulatory T cells and Toll-like receptors: what is the missing link? [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(5):528-533
- 15 Pandiyan P, Conti HR, Zheng L, *et al.* CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model [J]. *Immunity*, 2011, 34(3):422-434
- 16 Samson M, Audia S, Janikashvili N, *et al.* Inhibition of IL-6 function corrects Th17/Treg imbalance in rheumatoid arthritis patients [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(8):2499-2503

(收稿日期:2012-08-30)

(修回日期:2012-10-15)

雌激素受体作用的分子机制及靶向治疗研究进展

黄 卉 许增禄 黄秉仁

雌激素通过雌激素受体- α (estrogen receptor α , ER α) 和雌激素受体- β (estrogen receptor β , ER β) 起作用。此后又发现了一种新的 G 蛋白偶联的雌激素

受体(G protein-coupled receptor 30/G protein-coupled estrogen receptor-1, GPR30/GPER-1)。因此,雌激素的信号转导依赖于这 3 种受体作用的平衡,通过基因组途径或非基因组途径调控细胞的增殖与分化,影响人类的生理、生殖和行为。

一、ER 的结构

1. 雌激素经典受体 ER α 和 ER β ^[1]: ER α 基因

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院人体解剖与组织胚胎学教研室(黄卉、许增禄),生物化学与分子生物学研究室(黄卉、黄秉仁),医学分子生物学国家重点实验室(黄秉仁)