

结核病的细胞免疫研究进展

蒋 毅 万康林 阚 飏

结核病一直是人们关注的全球性健康问题。目前,全球已有 20 亿人感染结核菌,活动性结核患者达 1500 万,每年新发结核患者达 800 ~ 1000 万,有 180 万人因结核病死亡。结核病的感染、发生、发展及转归都依赖于机体细胞免疫反应的不同作用机制。本文就近年来结核杆菌的细胞免疫研究做一综述,以期对结核病的预防、诊断和治疗提供参考。

一、细胞免疫反应的开始

机体在感染结核菌后引起细胞免疫已研究多年。最近的分析表明,在原发感染 5 天后,全身性感染刺激的淋巴细胞可以通过转移产生调节保护作用。这种保护性策略最初在 L3T4(CD₄)T 细胞中发现,然后在 Ly2(CD₈)T 细胞中出现,然后两种细胞都会对气溶胶产生保护性作用。研究表明在感染气溶胶后的 25 天内起保护性作用的 T 细胞为即效应 T 细胞。Chackerian 等^[1]研究表明结核菌感染肺部后,引流淋巴结是产生获得性细胞免疫反应的最初部位,进而引发全身反应,但是却没有直接阐述初始 T 细胞反应。利用 T 细胞受体转基因小鼠的研究进一步证实了 Chackerian 等的结果即抗原特异性 T 细胞最初是在肺的引流淋巴结激活的,并且这个激活要迟滞一段时间。因此,不论以何种方式激活的初始 T 细胞反应,都是于气溶胶感染 9 天后发生,而最初的部位是引流淋巴结。在所有研究中,产生细胞免疫应答的时间与活菌到达淋巴结的时间是一致的,这表明细菌的播散对于细胞免疫应答起着重要作用。

那为何播散如此之慢呢?研究表明结核菌到达肺部定居于肺实质而不是气管的黏膜组织,而这两种细胞在表型和功能上也有明显的不同。有关低剂量的活菌进行感染后的情况还没有确定。然而,在 9 天后结核菌大量增加,最初在引流淋巴结,然后进入淋

巴^[1-3]。如果在这之前,即使使用可动员和感染细胞至淋巴结的外部炎性介质,也不能加速结核菌的播散及免疫反应的启动^[2]。大于 10 倍的剂量可加速播散,但也仅仅是提前了 1 ~ 2 天。这说明结核菌的定居部位也是产生细胞免疫反应延迟的重要作用之一^[3]。

树突状细胞(DC)参与的结核菌的迁移被认为对应答的启动有着重要作用。因此,这些细胞在气管的不同功能和不同部位决定应答的动力学。结核菌感染的 DC 通过气管到达肺部可以迁移到引流淋巴结并进而引起细胞免疫应答^[4-6]。这并不能说明这些细胞是定居在肺泡内,而且我们也不能确定这些细胞代表了所有在这一环境的所有 DC 的功能。气管内的 DC 是位于黏膜的环境中并迁移至引流淋巴结。相反,在肺泡组织中的 DC 是处于一个有表面活性剂蛋白和肺泡巨噬细胞的可调节的环境中,这就限制了这些细胞对感染进行应答并迁移。结核菌播散的延迟和细胞应答的启动可能因此反应出肺泡巨噬细胞(包括吞噬细胞和 DC)的感染,而这些细胞可抵抗迁移和炎症的发展。这一抵抗作用对于将肺泡作为一进行对抗炎性作用的空气交换的表面起着重要作用。结核菌引起的获得性细胞反应的慢启动可能与结核菌的生长缓慢和肺泡组织的相对免疫豁免特性有关。

二、细胞免疫应答的发展

目前,DC 被认为是最有效的 T 细胞免疫反应启动者。它们不仅产生抗原特异性刺激,还产生二级和三级的信号刺激,从而引起效应性 T 细胞产生有效作用。大量研究是有关结核菌感染对 DC 功能的影响。实际上,经典的表现是未成熟 DC 可以吞噬有害颗粒并成为有效抗原呈递细胞,而后者使用 BCG 作为成熟佐剂。然而最近有研究表明在体内被感染的 DC 比等量的未感染 DC 刺激抗原特异的 T 细胞效率更低^[7]。

我们还不能确定 T 细胞反应的启动是由肺部来源的结核菌感染的 DC 间直接相互作用引起的。然而,在抗原刺激的 DC 通过气管注射到肺部的模型

基金项目:国家“十一五”传染病防治科技重大专项基金资助项目(2008ZX100/03-010-02)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所/传染病预防控制国家重点实验室

通讯作者:阚飏,研究员,博士生导师,电子信箱:kanbiao@icdc.cn

中,这些细胞迁移到引流淋巴结和启动 T 细胞反应的能力更强^[4-6]。此外,IL-12p40 促进这种迁移,IL-10 限制它^[4,6,8]。这些数据都表明简单的暴露于结核菌并不足以限制感染的 DC 引起 T 细胞反应。被感染的肺部 DC 从肺迁移至引流淋巴结,但这种迁移在感染发生的前 14 天很难看到^[7]。尽管我们不能确定进入淋巴结的确切的菌株数量,当 T 细胞反应启动时结核菌是在淋巴结中,因此结核菌可阻止 T 细胞反应。更为重要的是初始 T 细胞活化后增殖,上调 CD44,下调 CD62L,然后以预期的动力学在肺部聚集^[3]。这表明结核菌在淋巴结的出现并不影响初始 T 细胞反应。然而,我们并不知道新的活化 T 细胞的扩增和存活是最佳的。我们观察到结核菌感染淋巴结后会导致 T 细胞区的化学动力学的改变,而这也影响新抗原特异性反应的产生^[9,10]。这些都表明结核菌在淋巴结的感染可能影响初始 T 细胞活化。

细胞一旦活化,在感染后的 15~18 天它们就迁移到主要的感染部位^[3]。我们还不能确定这种募集是否延迟和它是由抗原或炎症决定的。新的实时成像技术使我们更了解影响调节炎症部位产生的因素。有篇文章报道的是有关 T 细胞和巨噬细胞如何在肉芽肿中相互作用。在这篇报道中,使用 BCG 进行系统感染,肝巨噬细胞吞噬结核菌,迁移至该部位的未感染巨噬细胞和从血中的单核细胞形成肉芽肿^[11]。在用实时成像技术研究斑马鱼的模型的研究同样提供了结核菌感染后产生细胞免疫反应的动力学和发展及转归,尤其是经基因修饰的结核菌和宿主的模型使我们更了解影响肉芽肿发展的因素。

三、效应 T 细胞的新子集

我们知道淋巴细胞聚集在炎症损伤部位并可能通过活化感染的吞噬细胞调节保护性免疫,但仍不能完全确定它们在体内的功能。实际上,大家都认为 CD4 T 细胞产生 IFN- γ ,这是产生保护性免疫需要的,但这种假设是建立在大量的相关性研究的基础上的。有研究表明产生 IFN- γ 的 CD4T 细胞的到来与结核菌的增长停止相关^[12-15],而失去了 CD4T 细胞更易受到结核菌的损害。然而,我们已了解到 CD4 T 细胞对结核菌增长的保护性作用,我们至今都不能完全确定它们调节保护的能力和它们调节免疫的机制。很明显,不同的 CD4 T 细胞效应子集存在着,包括早期的活化细胞产生 IL-2,产生 IFN- γ 的细胞,表达 IL-2、IFN 和 TNF 的多功能细胞,而这些多功能细胞又与免疫保护相关^[16]。此外,已在小鼠和人中检测

到细胞毒性 CD4 T 细胞^[12,17]。多功能细胞在结核病人、高发病率地区的人群和预防接种过的婴幼儿中常见^[18-20]。所有效应性细胞的发展和功能依赖于在引流淋巴结的 DC 成熟并促进这些细胞有效的存活。这种成熟需要抗原在 MHC 内的表达,共刺激分子和促进 T 细胞极化的必须的细胞因子。IL-12p70 在产生 IFN- γ 的细胞中的作用已经被广泛的论述到。然而,产生和维持多功能和细胞毒性淋巴细胞的环境还没有完全被确定。

最近研究者们已发现了功能性 T 细胞的新子集,如可以产生 IL-17 和 IL-22 的细胞,这些细胞已经在感染结核菌的小鼠和人体内观察到。但我们对其在结核中的保护性作用还不是很了解。然而,最近的研究表明即使是在已经确定好的小鼠模型中我们仍然可以了解到对结核的细胞免疫反应。在进行气溶胶感染后的小鼠,其体内已诱导出可产生 IL-17 的抗原特异细胞,这些细胞和大部分 IL-17 在肺部的反应都依赖于 IL-23 的出现。 $\gamma\delta$ T 细胞是 IL-17 的来源,在鼻内大量注入 BCG 后很快就会产生这种细胞因子。在小鼠模型中 IL-17 的一大部分的反应是在 $\gamma\delta$ T 细胞中。当 IL-17 在高剂量的刺激被阻断后,中性粒细胞募集被阻止,这就可能影响后来炎症的发展。在缺少 IL-23 的小鼠中,大多是 IL-17 引起的反应,这对早期的炎症反应影响不大。这些细胞的作用是保护还是损害还不能确定,但当用结核抗原反复刺激结核菌感染的动物后,伤口就发生坏死并包含大量的粒细胞。这些数据都说明了慢性抗原暴露的炎症反应是依赖于 IL-23 和 IL-17 的。此外,在小鼠体内对结核菌感染产生的细胞反应中,这两种细胞因子可能是有双重作用的,但在人类中的情况还未可知。目前,已在感染结核的人体内检测到可产生 IL-17 和 IL-22 的 CD4 抗原特异细胞,其中 IL-22 仅在肺内发现^[19]。

四、人体内的细胞免疫反应

对细胞应答的分析表明感染和患病的个体表达了大量的多功能细胞^[18]。最近在欧洲的人群研究报道了结核菌特异的 IL-17 特异反应很弱而 IL-17 对真菌的感染却产生了较强的应答。相反的,在对南非人群的研究中,结核菌特异的 IL-17 和 IL-23T 细胞均可在暴露和感染的个体检测到,但在感染人群的外周血中此细胞的浓度较低^[19]。尽管在外周血中的低浓度,IL-22 可以在病人的肺泡盥洗液中检测到,这说明产生 IL-22 的细胞在病人的肺部是起作

用的^[19]。在最近的一项研究中用 Ag85/HLA - A * 0201 五聚物来估计结核患儿在药物治疗前后的抗原特异性细胞的频率,这些患儿在血中抗原特异性 CD8T 细胞频率较低,而在治疗后会提高,可能是由于治疗后减少了对 T 细胞活性的抑制或是因为对肺部病变的处理和因此从血中募集抗原特异的细胞到损害部位也降低了。更为有意义的是,在治疗前,循环中的抗原特异的细胞具有较低的细胞因子水平和溶细胞作用。另一项研究发现在治疗之初抗原特异的产生 IFN - γ 的细胞高于产生 IL - 2 的细胞,在治疗 28 个月后,前者逐渐降低而主要表现为对产生 IL - 2 细胞的免疫应答。进一步的研究应该是对人体内抗原特异的细胞应答的动力学和性质的研究。

南非对新生儿大量的卡介苗接种使得我们可以对新生儿中 BCG 诱导产生特异的细胞免疫反应进行筛查。在最近的一项研究中,从 BCG 接种后的新生儿体内的细胞在体外用 BCG 重新刺激,其细胞免疫应答用流式细胞仪进行检测分析。重要的是,产生 IL - 4 和 IL - 10 的 CD4T 细胞低水平表达,而由活化的 CD4T 细胞会单独或同时产生 IFN - γ , IL - 2 和 TNF。活化的 CD8T 细胞也很少,但一旦出现就表现为 IL - 2 和(或)IFN - γ 阳性。需要说明的是,许多反应性 T 细胞并不产生 IFN - γ 。因此,许多反应性细胞的效应表型还需进一步研究。大多数产生 IFN - γ 的细胞都具有效应细胞表型,而那些只表达 IL - 2 的细胞是中央记忆表型^[20]。

目前对暴露个体产生抗原的确定引起了极大关注。在一项研究中采用免疫优势抗原的合成多肽序列法,表现为大量的 CD8T 细胞克隆的抗原特异性,同时确定了新的抗原表位。另一研究使用结核菌和 BCG 的基因差异区并对病人和接种健康个体的肽特异性反应进行比较。在此研究中,两组人群对 RD1 区的肽都产生了应答,外周血单核细胞对 RD12, RD13 和 RD15 产生 IL - 10 细胞免疫反应,这表明不同的 RD 区的抗原与不同的细胞免疫相关。这类研究使我们更了解了人体对结核菌的 T 细胞反应的特异性。

综上所述,近年来我们对结核菌感染的细胞免疫反应的研究有了很大的提高,但我们始终不能确定介导免疫发生和接种疫苗而产生的获得性细胞免疫的类型,这就大大限制了新疫苗的研制。由于不能将疫苗直接进行人体试验,我们也不能得到确定的保护性相关的证据。然而我们相信随着现代分子生物学技

术的发展、基因组学和蛋白组学研究的深入,越来越多的细胞因子在结核免疫中的作用将被人们清楚认识,可诱导长效保护性免疫应答的疫苗将不断问世,为对抗结核病这一顽疾带来新的希望。

参考文献

- 1 Chackerian AA, Alt JM, Perera TV, *et al.* Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors and precedes the initiation of T - cell immunity [J]. *Infect Immun*, 2002, 70 (8) : 4501 - 4509
- 2 Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, *et al.* Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs [J]. *J Exp Med*, 2008, 205 (1) : 105 - 115
- 3 Reiley WW, Calayag MD, Wittmer ST, *et al.* ESAT - 6 - specific CD4 T cell responses to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection are initiated in the mediastinal lymph nodes [J]. *PNAS*, 2008, 105 (31) : 10961 - 10966
- 4 Demangel C, Bertolino P, Britton WJ. Autocrine IL - 10 impairs dendritic cell (DC) - derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL - 12 production [J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32 (4) : 994 - 1002
- 5 Bhatt K, Hickman SP, Salgame P. Cutting edge: a new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis [J]. *J Immunol*, 2004, 172 (5) : 2748 - 2751
- 6 Khader SA, Partida - Sanchez S, Bell G, *et al.* Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *J Exp Med*, 2006, 203 (7) : 1805 - 1815
- 7 Wolf AJ, Linas B, Trevejo - Nunez GJ, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function *in vivo* [J]. *J Immunol*, 2007, 179 (4) : 2509 - 2519
- 8 McCormick S, Santosuosso M, Small CL, *et al.* Mucosally delivered dendritic cells activate T cells independently of IL - 12 and endogenous APCs [J]. *J Immunol*, 2008, 181 (4) : 2356 - 2367
- 9 Mueller SN, Hosiawa - Meagher KA, Konieczny BT, *et al.* Regulation of homeostatic chemokine expression and cell trafficking during immune responses [J]. *Science*, 2007, 317 (5838) : 670 - 674
- 10 Mueller SN, Matloubian M, Clemens DM, *et al.* Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection [J]. *PNAS*, 2007, 104 (39) : 15430 - 15435
- 11 Egen JG, Rothfuchs AG, Feng CG, *et al.* Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas [J]. *Immunity*, 2008, 28 (2) : 271 - 284
- 12 Orme IM, Miller ES, Roberts AD, *et al.* T lymphocytes mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens [J]. *J Immunol*, 1992, 148 (1) : 189 - 196
- 13 Chackerian AA, Perera TV, Behar SM. Gamma interferon - produ-

- cing CD4 + T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Infect Immun, 2001, 69 (4):2666 - 2674
- 14 Jung YJ, Ryan L, LaCourse R, et al. Properties and protective value of the secondary versus primary T helper type 1 response to airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice [J]. J Exp Med, 2005, 201 (12):1915 - 1924
- 15 Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al. IL - 23 and IL - 17 in the establishment of protective pulmonary CD4 + T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge [J]. Nat Immunol, 2007, 8 (4):369 - 377
- 16 Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine - mediated protection against *Leishmania major* [J]. Nat Med, 2007, 13 (7):843 - 850
- 17 Klucar P, Barnes PF, Kong Y, et al. Characterization of effector functions of human peptide - specific CD4 + T - cell clones for an intracellular pathogen [J]. Hum Immunol, 2008, 69 (8):475 - 483
- 18 Winkler S, Necek M, Winkler H, et al. Increased specific T cell cytokine responses in patients with active pulmonary tuberculosis from Central Africa [J]. Microbes Infect, 2005, 7 (9 - 10):1161 - 1169
- 19 Scriba TJ, Kalsdorf B, Abrahams DA, et al. Distinct, specific IL - 17 - and IL - 22 - producing CD4 + T cell subsets contribute to the human anti - mycobacterial immune response [J]. J Immunol, 2008, 180 (3):1962 - 1970
- 20 Soares AP, Scriba TJ, Joseph S, et al. Bacillus Calmette - Guerin vaccination of human newborns induces T cells with complex cytokine and phenotypic profiles [J]. J Immunol, 2008, 180 (5):3569 - 3577

(收稿:2011 - 10 - 25)

(修回:2011 - 11 - 08)

成体干细胞体外培养的安全性研究进展

张 文 李爱斌

一直以来,干细胞都是医学领域的研究热点,随着对干细胞特性的逐步认识,干细胞技术得到了突飞猛进的发展,在再生医学与组织工程等方面具有不可替代的应用前景。但是,随着研究的深入,人们发现多数肿瘤的发生与干细胞有着一定的关系,肿瘤细胞与干细胞之间存在着一定的相似性。有多数学者提出了肿瘤源于干细胞的假说,近几年也有肿瘤干细胞这一说法。现在,已有研究表明干细胞在体外培养一定时间,即可发生突变。所以,干细胞的安全性已引起人们的高度重视。

一、干细胞

干细胞(stem cells, SC)是一类具有自我更新能力和多向分化潜能的原始细胞,处于未定向分化状态,同时具有增殖的能力。在一定条件下,可以分化成具有特异分子标志、特征性形态和特殊功能的成熟细胞。干细胞具有自我更新的能力是由于通过不对称分裂的子代细胞维持了干细胞的潜能。根据干细胞发生学来源可以将其分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)和成体干细胞(somatic stem cell)两种。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30870638);湖北省自然科学基金资助项目(2006ABA223)

作者单位:430060 武汉大学人民医院生殖医学中心

通讯作者:李爱斌,教授,硕士生导师,电子信箱:wwfreefirst@163.

com

胚胎干细胞属于全能干细胞,发育等级较高,来源于胎盘和胎儿组织,是由受精卵发育而来的具有全能性的干细胞,分化潜能较广^[1]。成体干细胞,来源于成体器官或者成年个体组织,是存在已分化组织中的未分化细胞^[1]。虽然成体干细胞的增殖能力有限,但是依然具有较强的自我更新和分化潜能,可以分化为某种或某几种功能的体细胞,同时具有可塑性,可以打破胚层界限从而横向分化为无关类型的成熟细胞或者在特定的环境下发生逆分化^[2]。

二、肿瘤干细胞

随着对肿瘤发生、发展研究的深入,有多数学者提出了肿瘤干细胞学说,认为肿瘤生长,复发和转移是依靠肿瘤细胞中一定数量的具有干细胞特性的细胞群。1994年,人急性粒细胞白血病干细胞首次得到证实,之后又在乳腺癌瘤体中分离出肿瘤干细胞。2006年,肿瘤干细胞的定义于美国癌症研究协会召开的肿瘤干细胞研讨会上提出,即在肿瘤组织中具有自我更新能力,同时可以产生一系列异质性肿瘤细胞^[3]。之后,肿瘤干细胞受到多领域的关切,陆续有研究证实,在不同的肿瘤组织中均存在肿瘤干细胞,比如脑部、皮肤、白血病、乳房、结肠、头颈部、肾脏、肝脏、前列腺、和胰腺肿瘤,并且证实了肿瘤干细胞在耐药,肿瘤复发和肿瘤转移中起了主要作用^[4-11]。

肿瘤干细胞具有很强的致癌能力,也就是说肿瘤