·综**述**·

未成熟树突状细胞诱导皮肤移植免疫耐受的 研究进展

王永权 彭毅志

树突状细胞(dendritic cell, DC)是一类重要的 专职抗原呈递细胞、虽然在体内的数量较少,但是其 强大的抗原呈递和处理功能在机体的免疫反应中起 重要的作用。DC 的发育分化过程伴随着其由未成 熟的前体细胞向成熟细胞的转变,未成熟的 DC(immature dendritic cell, imDC) 与成熟 DC (mature dendritic cell, mDC) 在表型特征以及生物学功能上都有 区别,而 imDC 最大的特点就是在体外可以诱导 T 淋巴细胞特异性低应答。临床上同种异体皮肤移植 是目前大面积深度烧伤患者早期创面覆盖最直接、 最有效的治疗方法。但是由于皮肤的强烈抗原特 性,使外源皮肤在移植后3周左右发生不可逆的排 斥反应,极大程度抑制了自体微粒皮混合大张异体 皮的移植效果。利用 imDC 的特殊作用,可以在皮 肤移植前后给受者体内输入用基因工程技术制备的 imDC,以减轻皮肤移植后的免疫排斥反应、延长异 体皮的成活时间,从而提高大面积深度烧伤患者的 手术治疗效果。

一、imDC 的免疫特性

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究 所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信(讯)作者:彭毅志, Email: yizhipen@ mail. tmmu. com. cn,电话:023-68754175

因子(TNF-α、IL-1等)和抗原物质以及内毒素/脂多糖(LPS)等的刺激下逐渐成熟,并通过输出淋巴管和血液循环进入引流淋巴结。mDC 具有以下特征:可以激活 T 淋巴细胞发生免疫反应;表达重要的共刺激分子,如 CD80、CD86、CD83、CD54 和 CD40等;电镜下观察可见细胞有 DC 的形态学特征(树枝样突起)^[3]。

2. imDC 的表型特征。DC 的发育成熟过程伴随着其表面标志的变化。典型的 mDC 通常表达大量的主要组织相容性复合物 II (MHC-II)类分子,以及与刺激 T 淋巴细胞反应相关的各种共刺激分子。研究表明,mDC 表面表达 CD1a、CD54、CD40、CD83、CD80 和 CD86;而 imDC 前体的表面标志特征与mDC 却是相反的,即: MHC-II 类分子表达较少,CD80 和 CD86 等共刺激分子阴性或者弱阳性[1.4]。因此 imDC 摄取和处理抗原的能力较强,而抗原呈递能力较弱。

二、imDC 诱导的 T 淋巴细胞免疫耐受

11. T 淋巴细胞与 DC 的关系。DC 作为重要的 胸腺间质细胞,对T淋巴细胞在胸腺中的选择过程 起着重要的作用。DC 表面高表达 MHC-Ⅱ类分子、 双阳性 胸腺 细胞 经 T 淋 巴 细 胞 抗 原 识 别 受 体 (TCR)重排后识别 DC 表面自身 MHC 分子,通过阳 性选择而成活;而在阴性选择中,识别 DC 表面的自 身肽---MHC 的 T 淋巴细胞.通过凋亡机制而被淘 汰。DC 还可在外周对 T 淋巴细胞的分化发挥重要 作用。mDC 分泌的 IL-12, 可诱导辅助性 T 淋巴细 胞(Th)1的分化;在缺乏 CD8⁺T 淋巴细胞时,DC 可 诱导CD4⁺T淋巴细胞发育为CD8⁺细胞毒性T淋 巴细胞(CTL)^[5]。生理状态下,仍然有少量 T 淋巴 细胞逃避了胸腺的阳性和阴性选择被释放到外周循 环。因此,为防止有害的自体免疫反应,机体内存在 一定的调控机制,而 imDC 在这一机制中起着重要 的作用。骨髓源的 imDC 一般位于病原体侵入机体 的门户,如皮肤黏膜组织等,在稳定的生理环境下, 这种 imDC 搜集和清除各种自体抗原和凋亡细胞。 没有炎性反应发生时,它们以未成熟状态存在于淋 巴结内,大量的未致敏 T 淋巴细胞亦同时存在,使结

合了自体抗原的 imDC 能够诱导 T 淋巴细胞发生自体耐受^[6]。不难看出,在这里,骨髓源的 imDC 扮演了免疫系统"警察"的角色^[7]。血液细胞来源的 imDC 位于外周循环和淋巴组织中,同骨髓源的 imDC 一样,在稳定的生理状态下搜集各种自体抗原和凋亡细胞,并参与诱导外周循环的自体反应 T 淋巴细胞的凋亡^[8]。

2. imDC 诱导 T 淋巴细胞耐受的机制。(1) mDC 表面高表达多种共刺激分子(尤其是 CD80 和 CD86),可通过与 T 淋巴细胞表面相应的配体结合, 提供T淋巴细胞激活的协同刺激信号。正是由于 imDC 表面缺乏这些共刺激分子的表达,因而可以诱 导 T 淋巴细胞发生免疫耐受[3]。实验证明,外周血 来源的 imDC 可以诱导人抗原特异性 CD4 T 淋巴 细胞的免疫无能^[9]。将破伤风毒素特异性的 CD4⁺ T淋巴细胞与自体 imDC 共同孵育,结果在理想的 抗原刺激下 T 淋巴细胞并未增生[7]。从硬皮病患 者体内提取的拓扑异构酶 I 特异性的自反应 CD4 * T淋巴细胞克隆,以及从抗磷脂综合征患者体内提 取的β,糖蛋白 I 特异性 T 淋巴细胞克隆,在与相应 的自体 imDC 混合培养后,均可诱导 T 淋巴细胞的 不反应状态,其结果是不能诱导 T 淋巴细胞的增生 或不能有效协助 B 淋巴细胞产生自身抗体^[9]。im-DC 介导的 T 淋巴细胞的无应答状态与缺乏 IL-2 产 物以及 CD4 T 淋巴细胞的活性状态等相关。CD4 * T淋巴细胞与自体 imDC 混合后不能上调 CD40 配 体的表达,也不能通过 TCR 识别抗原肽分子[10]。 用 imDC 处理的 Th1 克隆在丝裂原的刺激下产生示 踪量的干扰素(IFN)γ,但是不产生 IL-2,而用 imDC 处理的 Th2 克隆则可以产生IL-10,像调控型 T 淋巴 细胞那样,这些产生 IL-10 的 CD4 T 淋巴细胞可以 抑制自身抗体的产生。(2)虽然已经知道 T 淋巴细 胞的无应答是在 imDC 表面的 MHC 分子呈递的抗 原肽与 CD4⁺T 淋巴细胞表面 TCR 结合过程中诱导 的,但是其具体细节仍不清楚。T 淋巴细胞的激活 需要2个重要的"信号":TCR与 MHC 分子呈递的 抗原肽结合;抗原呈递细胞上的共刺激分子结合 T 淋巴细胞上的相应配体[11]。这就是著名的"双信号 理论"。根据该理论,imDC诱导的T淋巴细胞耐受 可以简单地解释为其表面缺乏共刺激分子,因此不 能满足双信号的条件所致[12]。但仅仅是双信号的 缺乏诱导了T淋巴细胞的特异性不应答吗?目前 还有观点认为,imDC 介导的 T 淋巴细胞无应答的 机制并非只是缺乏表面共刺激分子,其他一些因素 也起着重要的作用。在T淋巴细胞不应答过程中 有一个重要的环节,就是 T 淋巴细胞表面 CD40 配

体的上调受到抑制[9]。免疫球蛋白样抑制型受体 免疫球蛋白样转录物(ILT)3和 ILT4,作为 imDC 表 面的一种免疫受体酪氨酸抑制基序[13.14],通过恢复 酪氨酸磷酸(酯)酶(SHP-1)的活性和干扰 CD40-CD40 配体的结合,进而抑制 T 淋巴细胞的激活[15]。 另外、CD8⁺、CD28⁺可以上调imDC表面的 ILT3 和 ILT4 表达,从而间接调节 imDC 对 CD4 T 淋巴细胞 的免疫无应答[16]。imDC 与未致敏 CD8 T 淋巴细 胞共同培养还可以诱导 CD8 T 淋巴细胞的分化,其 特点也是抑制增生和减弱溶细胞作用,并且产生大 量 IL-10 及少量 IFN-y。这种 CD8 T 淋巴细胞与上 述的 CD8⁺、CD28⁺ T 淋巴细胞不同, 它从未致敏 CD8 T 淋巴细胞中分化,只需imDC的单次刺激。而 CD8⁺、CD28⁺T 淋巴细胞发挥其耐受作用时,则需 要 imDC 的反复刺激转化为终末 CTL 细胞; CD8 +、 CD28 T 淋巴细胞通过上调 mDC 表面的 ILT3 和 ILT4 表达发挥作用,而这种 CD8 T 淋巴细胞是通 过产生大量的 IL-10 诱导增生抑制和免疫耐受 的[17]。

三、imDC 诱导免疫耐受在皮肤移植中的应用 DC 在表皮中被称为朗格尔汉斯细胞(LC),是 免疫反应介导起始的至关重要的一类抗原呈递细 胞。在同种异体皮肤移植中,供体皮肤中的 LC 迁 移到受体的引流淋巴结中,在对供体皮肤的排斥反 应中起到十分重要的作用[18,19]。临床上同种异体 皮肤移植是大面积烧伤患者早期创面覆盖的良好方 法,但是皮肤移植较其他的器官移植具有更强烈的 急性排斥反应,而且免疫抑制疗法对于大面积深度 烧伤患者有极大的副作用。根据 imDC 诱导 T 淋巴 细胞发生免疫耐受的原理,将 DC 介导的排斥反应 特异性阻断或者减弱,是目前同种异体皮肤移植的 研究热点。Toby 等[20] 将人的全厚皮片移植到免疫 缺陷的小鼠身上,然后在小鼠腹膜内注射供者同源 的单核细胞诱导免疫反应的发生,并且注射供者 imDC,观察排斥反应的情况。结果注射imDC的小鼠 发生的免疫排斥反应轻微,移植的皮肤表面红润,真 皮-表皮界限明显,表皮下有小血管形成,并且可以 成活 100 d 以上; 而对照组的小鼠术后 7 d 开始出现 排斥反应,21 d达高峰,表现为移植物坏死,真皮下 大量淋巴细胞浸润、增生。有研究结果表明,利用基 因转染的方法,将人 IL-10 基因用腺病毒作为载体 转入人骨髓源的 DC,这些转基因 DC 在混合淋巴细 胞反应中比一般的 DC 甚至 imDC 更加不敏感,而且 其表型特征与 imDC 很相像[20]。IL-10 抑制 DC 的功 能很有可能是通过抑制 DC 产生有生物活性的

IL-12 p70 介导的^[21]。另外,除了将 IL-10 基因导入 DC 外,还可导入转化生长因子(TGF)β、细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原(CTLA)4 甚至 fas 配体的基因,诱导同种异体抗原耐受,在体内和体外的实验中都有一定的效果^[20]。但是转基因 DC 能否延长大动物的器官移植成活时间,还有待进一步的实验证明。

imDC 能够在体内介导供体特异性的免疫耐受, 但是当 imDC 输入受者体内后,很快就成熟,便失去 了这一能力[22],这无疑是一对矛盾。根据"双信号 理论",imDC 介导的免疫耐受是由于缺乏细胞表面 的共刺激分子。Wang 等[22] 用抗细胞间黏附分子 1 (ICAM-1)的单克隆抗体和 CTLA-4Ig 联合处理 BALB/c 小鼠,以阻止 DC 表面主要的共刺激分子和 黏附分子与 T 淋巴细胞相结合。结果观察到,同种 异体小鼠(C₅₇BL/6)实体脏器和皮肤移植的成活时 间可达到100 d以上,较仅用 imDC 处理或者单用抗 ICAM-1 的单克隆抗体处理的供者全厚皮片成活时 间(<20 d)或单用 CTLA-4Ig 处理的皮片成活时间 (<50 d) 均明显延长。并且在第三方 C₃H 小鼠的 皮肤移植对照中并没有观察到成活时间的延长,这 说明此种免疫耐受是抗原特异性的。而且用抗 ICAM-1 的单克隆抗体以及用 CTLA-4Ig 处理过的 mDC 诱导的移植物成活时间也大大延长了(>100 d) [20]。另有报道, Flt3 配体处理 BALB/c 小鼠能够 诱导 DC 的增生,增生的 DC 有 imDC 的性质,并且 和抗 CD154 的特异性抗体同时输入 Cs, BL/6 小鼠 体内可以诱导 BALB/c 小鼠供体皮肤的耐受。全厚 皮片成活时间达 61 d^[23]。

无论是直接使用 imDC、IL-10 基因转染的 mDC,还是用抗 ICAM-1 的单克隆抗体和 CTLA-4Ig 阻止共刺激分子与 T 淋巴细胞结合, 均可在一定程 度上抑制皮肤移植的排斥反应发生。然而,迄今为 止的各种异基因皮肤移植实验都是在动物模型上进 行的,尚缺乏临床实际应用方面的经验。受动物实 验的局限性以及人体内环境的复杂性影响,在人体 的给药途径、剂量选择、不良反应等方面的研究亦有 待进一步深入。由于皮肤来源的特殊性,导致供体 皮肤同基因的 imDC 不可得,即使得到了供者源的 imDC,在人体复杂的内环境影响下,是否能有效地 迁移至效应器官,达到诱导耐受的目的亦不清楚。 因此,利用基因工程技术,使 imDC 具有供者皮肤的 抗原特异性,解决临床上皮源与 imDC 源不一致的 矛盾;或者用基因工程技术构建能表达特异性趋化 因子的受体,使 imDC 能更有效地从归巢至引流淋 巴结和中枢淋巴器官,增强其诱导移植耐受的效果 等途径,可能会是今后深入研究 imDC 的方向。

参考文献

- 1 Christophe C, Yong JL. Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells. Immuol Today, 1995,16;2-5.
- 2 Stingl G, Bergstresser PR. Dendritic cells: a major story unfolds. Immuol Today, 1995,16:330 - 333.
- 3 Yide J, Laphalle F, Gaetano C, et al. Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature-enriched antigen presenting (dendritic) cells derived from human bone marrow. Hum Immunol. 2004, 65:93 103.
- 4 王强,彭毅志. 小鼠骨髓未成熟树突状细胞体外扩增及鉴定. 中 华烧伤杂志,2003,19;332-335.
- 5 van Schooten WC, Strang G, Palathumpat V. Biological properties of dendritic cells; implications to their use in the treatment of cancer. Mol Med Today, 1997,3:254-260.
- 6 Steinman RM, Turley S, Mellman I, et al. The induction of tolerance by dendritic cells that have capturedapoptotic cells. J Exp Med, 2000, 101:4-11.
- 7 Masataka K. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. Hum Immunol, 2002, 12: 1156 - 1163.
- 8 Patterson S. Flexibility and cooperation among dendriticcells. Nat Immunol, 2000, 1;273 284.
- 9 Masataka K, Kaburaki J, Wright TM, et al. Induction of antigenspecific human CD4 * T-cell anergyby peripheral blood DC precursors. Eur J Immunol, 2001,31;25 - 47.
- Sanjaya BA, Ann KL, Ritva P, et al. Dendritic cells activate autologous T cells and induce IL-4 and IL-10 production in myasthenia gravis. J Neuroimmunol, 2004, 156; 163 170.
- 11 David U. Dendritic cells and the immunity/tolerance decision. Med Hypotheses, 2005,64: 112 113.
- 12 Tiao MM, Lu L, Tao R, et al. Application of recipient-derived dendritic cells to induce donor-specific T-cell hyporesponsiveness. Transplant Pro, 2004, 36:1592 - 1594.
- 13 John S, Manavalan GV, Seunghee KS, et al. Generation of tolerogenic antigen presenting cells; crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. Hum Immunol, 2003, 64; 21 32.
- 14 John S, Manavalan PC, Rossi GV, et al. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. Transplant Immunol, 2003, 11:245-258.
- 15 Nicole SF, John S, Manavalan LS, et al. Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells International. Int Immunopharmacol, 2005, 5; 7-11.
- 16 Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, et al. Tolerization of dendritic cells by Ts cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. Nat Immunol, 2002, 3:237 243.
- 17 Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T-regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med, 2002, 195: 695-704.
- 18 Richters CD, Van Gelderop JS, Du P, et al. Migratory properties of skin dendritic cells of the rat. Transplant Pro, 1997, 29: 1745 – 1747.
- 19 郑峻松,吴军,肖光夏. 树突状细胞与移植免疫耐受的研究.中华烧伤杂志,2003,19;382-384.
- 20 Toby PH, Coates R, Krishnan S, et al. Human myeloid dendritic cells transduced with an adenoviral interleukin 10 gene construct inhibit human skin graft rejection in humanized NOD-scid chimeric mice. Gene Therapy, 2001, 8:1224-1233.
- 21 De ST. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturationand function. Eur J lmmunol, 1997,27;1229 - 1235.

Wang QX, Zhang M, Guoshan D. Anti-ICAM-1 antibody and CT-LA-4Ig synergistically enhance immature dendritic cells to induce donor-specific immune tolerance in vivo. Immunol Lett, 2003, 90: 33-42.

23 Galina V, Shurin G, Gurkamal S. Regulation of dendritic cell expansion in aged athymic nude mice by FLT3 ligand Experimental. Gerontology, 2004, 39:339 - 348.

(收稿日期:2005-06-08) (本文编辑:张红)

Toll 样受体 4 研究进展

华荣 荣新洲

Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)是近几年发 现的一类天然免疫受体,其分布十分广泛,主要表达 于单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、多形核细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞及自然杀伤细胞等表面,属于 模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR),可 对病原体相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMP)进行识别、结合,并引发一系列 信号转导,进而导致炎性介质的释放,在天然免疫防 御中起着重要作用,并最终激活获得性免疫系统。 自从 1997 年 Medzhitov 等[1] 率先报道了人类 TLR 以来,目前其家族成员至少有 11 个(TLR1~ TLR11),它们可针对不同的病原体成分诱导精细的 抗感染天然免疫。如 TLR2 介导对微生物脂蛋白 (BLP)应答;TLR5 介导对细菌鞭毛蛋白的免疫应 答;TLR9 对细菌的胞嘧啶核苷磷酸鸟苷(CpG)DNA 应答:TLR3 对病毒的双链 RNA 应答:TLR7 对咪唑 喹啉家族的低分子质量成分 1-异丁基-4-氨基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉(商品名咪唑莫特)等应答; TLR4 除了介导对内毒素/脂多糖(LPS)的应答外, 还与许多临床疾病如大面积烧伤后引发的全身性炎 性反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、动脉粥样硬化、牙周炎等有关[2]。因 此深入了解 TLR4 不仅有重要的理论意义,且具有 非常重要的现实意义。现就近年对 TLR4 的研究进 展作如下综述。

一、TLR4 的分布与结构特点

TLR4 是人类发现的第 1 个 TLR 相关蛋白,它表达于所有的细胞系,在骨髓单核细胞中表达尤其多^[3]。广泛分布于 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、白细胞、单核巨噬细胞、肥大细胞、小肠上皮细胞、表皮微血管和脐静脉内皮细胞、人齿龈纤维母细胞、人子宫颈平滑肌细胞等等。

基金项目:广州市科技攻关计划资助项目(200373-E0371) 作者单位:510180 广州医学院广州市第一人民医院烧伤科 通信(讯)作者:荣新洲, Email;xinzhouro@yahoo.com.cn,电话: 020-81048263 TLR4 分子由胞外区、穿膜区及胞内区3部分组成,其中胞外区富含亮氨酸重复序列(LRR)结构域,可与CD14 分子中的LRR 结合而介导蛋白质之间的相互作用。胞内区存在一段序列保守区,该序列与白细胞介素(IL)1 受体胞内区的保守序列有高度同源性,被称之为TIR 区域^[4]。因此,TLR4 分子也属于IL-1 受体超家族的成员。TIR 区域是TLR4与其下游相关的信号转导分子,如髓样分化蛋白88(MyD88)、IL-1 相关蛋白激酶(IRAK)、肿瘤坏死因子受体活化因子6(TRAF-6)等,以及蛋白激酶相互作用的关键部位。

二、TLR4 对 PAMP 的识别

PAMP主要是指广泛存在于病原体细胞表面的分子结构,包括革兰阴性(G⁻)菌的 LPS、肽聚糖、BLP、脂磷壁酸、未甲基化的 CpG DNA、分枝杆菌的脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)、酵母菌的甘露聚糖^[5]。此外还包括一些真菌、病毒等等。

1. TLR4 对细菌 LPS 的识别及其信号转导:在 寻找细菌 LPS 受体过程中, TLR4 是生物医学工作 者的一个极其重要的发现。LPS 首先与血清的 LPS 结合蛋白(LBP)结合,然后再与细胞表面的 CD14 分子结合, CD14 又通过糖基磷脂酰肌醇(glycosyl phos-phatidyl inositol, GPI) 锚定于细胞膜,然而 CD14 缺少跨膜区,那么 LPS 如何完成胞内信号转 导的呢? 直到近期才明确了 TLR4 是负责将 LPS 信 号转导入细胞内的膜内受体,但却未能充分说明 LPS-LBP-CD14 三体复合物是直接还是间接活化 TLR4 的。有学者发现一种被称为髓样分化蛋白 2 (MD2)的蛋白,在 LPS 信号转导过程中发挥重要作 用^[6]。MD2 是一种分泌性蛋白,能与 TLR4 的胞外 区结合,从而提高其对 LPS 的敏感性并增强受体结 构的稳定性。TLR4 与 LPS 结合后引发一系列的胞 内信号转导[7],主要包括:(1) MyD88 通过 C 端的 TIR 区域与 TLR4 胞内的 TIR 区域结合,作为接头 蛋白招募的 IRAK。(2) IRAK 结合 TRAF6 从而活 化转化生长因子β激酶1(TAK1)。(3) TAK1 引发