

调节性 T 细胞与脓毒症关系的研究进展

张莹(综述) 姚咏明(审校)

【关键词】 T 淋巴细胞, 调节性; 细胞免疫; 脓毒症

从某种程度上讲,任何感染都可以引起炎症和组织损伤。但由于病原体数量、毒力及机体防御能力等诸多因素的不同,一些感染者表现为炎症局限并消散吸收,而部分感染者则诱发剧烈的具有破坏性的全身炎症反应,最终导致炎症扩散,直至发生脓毒症(sepsis)^[1]。之所以出现截然不同的结局,其分叉点在哪些环节上,造成其不同结局的影响因素又是什么,这是许多研究者都关心的问题。近年来研究发现,调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tr)在感染性疾病中犹如一把“双刃剑”,在对抗入侵微生物的同时,对自身的正常细胞也会造成损伤。因此,对其在感染免疫中作用机制的研究已成为揭示感染演变规律的一条可能途径。目前,Tr 在感染免疫中的作用受到越来越多的关注,但多集中在慢性感染性疾病^[2],而急性感染诱发脓毒症方面的报道相对较少,现就 Tr 与脓毒症关系的研究进展作一综述。

1 Tr 的生物学效应

目前 Tr 的分类标准并不统一。较早的一种分类方法是依据细胞表型和所分泌的细胞因子将 Tr 分为 3 类:①细胞因子依赖性 Tr[例如 Tr1、辅助性 T 细胞 3(Th3)等],它所分泌的细胞因子主要为转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素-10(IL-10)等;②细胞因子非依赖性 Tr(CD4⁺CD25⁺Tr),它的 T 细胞受体(TCR)在受到刺激后不能增殖和分泌 IL-2,却能抑制免疫应答;③其他 Tr(如 $\gamma\delta$ -T 和 NKT 细胞等)。但随着分

子机制研究的不断深入,这种分类方法正不断被修正。

目前最常采用的分类方法是将 Tr 依据其发育、特异性及作用机制等差异而分为天然 Tr(natural Tr)和获得性 Tr(adaptive Tr)。天然 Tr 主要是指那些在胸腺发育成熟后进入外周淋巴组织的 Tr,CD4⁺CD25⁺Tr 即属于天然 Tr;获得性 Tr 是由成熟 T 细胞(CD4⁺CD25⁺T 细胞)在外周血淋巴组织中接触特异性抗原或在免疫抑制因子(如 IL-10、TGF- β)作用下活化而诱导产生的,Tr1、Th3 则属获得性 Tr^[3]。

近年来,许多具有免疫调节作用的淋巴细胞也都被称为“Tr”,例如小鼠皮肤上皮的 $\gamma\delta$ 细胞、CD8⁺T 细胞和 NKT 细胞等^[4]。与 CD4⁺CD25⁺Tr 不同的是,这些细胞只通过分泌细胞因子来发挥免疫调节作用。它们类似于 Th 细胞的功能亚群,而非独立的调节性细胞系。CD4⁺CD25⁺Tr 是目前研究较为深入的 Tr,属于天然 Tr。它主要由胸腺 T 细胞发育而来,在人和小鼠的外周血及脾脏 T 细胞中占 5%~10%^[5],具有免疫无反应性及免疫抑制性两大特性。主要通过细胞接触机制及分泌抑制性细胞因子等方式实现对 CD4⁺/CD8⁺T 细胞的非特异性抑制效应。细胞接触抑制需膜结合分子介导,主要涉及如 T 细胞毒性相关抗原-4(CTLA-4)、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(TNFR)等,而抑制性细胞因子则主要包括如 IL-10、TGF- β 等^[6]。其中,叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)特异性表达于 CD4⁺CD25⁺上,其基因及蛋白产物的表达状况直接影响着 Tr 表型及功能活性的发挥^[7],关于 Foxp3 确切的调节机制尚未阐明。

目前关于 Tr 在自身免疫稳态维持、移植耐受、肿瘤免疫、变态反应性疾病及感染免疫等方面的作用都得到了深入探讨。由于 Tr 最终介导了 Th1/Th2 漂移,从而影响着炎症反应的结局,因此

其在脓毒症及脓毒性休克中的作用日益受到关注。

2 Tr 在脓毒症免疫紊乱中的作用及其机制

尽管目前脓毒症的研究已经取得了很大的进展,但其根本的分子机制仍不清楚。脓毒症的本质是机体对细菌感染出现的过度反应,可见脓毒症并非单纯与病原体及其毒素造成的炎症损害有关,机体的免疫功能状态也起着至关重要的作用。Tr 作为免疫系统的重要调节细胞之一,在脓毒症复杂的免疫调节网络中主要发挥着对细胞免疫的抑制作用,这些提示,Tr 可能与脓毒症早期细胞免疫抑制有关。关于 CD4⁺CD25⁺Tr 与脓毒症关系的相关报道日渐增多,深入了解 Tr 在脓毒症中的作用及其调节机制,将有助于预见炎症的发展方向,为实施有效的干预提供新思路。

2.1 Tr 与内毒素诱导脓毒症及脓毒性休克:研究表明,Tr 具有广泛的 Toll 样受体(TLRs),包括脂多糖(LPS)受体 TLR4 及 TLR5、7 和 8 等^[8]。据报道,细胞因子、细菌及其产物(如 LPS)的刺激在体内外均可上调 Tr 表面活性物质,从而促进 Tr 增殖及存活,并增强 Tr 的抑制功能^[9]。近年来一些流行病学研究表明,变态反应性疾病发生率增高的原因可能是感染性疾病发生率的下降。因为细菌成分及其产物,如 LPS 或细菌 DNA 可以诱导 Tr 生成,这意味着 Tr 在 LPS 诱导的炎症及脓毒症发生、发展中可能发挥着重要作用。

Monneret 等^[10]通过对脓毒性休克患者 CD45、CD69 及 CTLA-4 的检测,证实 CD4⁺CD25⁺Tr 产生明显增多,而且在因脓毒症死亡、人白细胞 DR 抗原(HLA-DR)低表达患者中,10 d 后仍存在 Tr 的持续升高。但对脓毒性休克患者与健康人 Tr 在 CD4⁺T 细胞中所占比例进行比较时发现,脓毒性休克开始即存在 CD4⁺CD25⁺/CD25⁻T 细胞绝对数下降,但随之 CD4⁺CD25⁺Tr 很快恢

基金项目:国家“973”重点基础研究发展规划项目(2005CB522602);国家杰出青年科学基金资助项目(30125020)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院(原解放军第三〇四医院)烧伤研究所基础部

通讯作者:姚咏明,教授,博士研究生导师 (Email: c_ff@sina.com)

作者简介:张莹(1973-),女(汉族),河北人,医学硕士,主治医师。

复至正常对照范围,而 CD4⁺CD25⁻T 细胞则出现显著下降。对 Foxp3 mRNA 的检测结果显示脓毒性休克后其表达增加,而是与 CD4⁺CD25⁺Tr 的变化规律一致,因此他们认为,CD4⁺CD25⁺Tr 比例的增高并不是该细胞增殖的结果,而是由于对 CD4⁺CD25⁻T 细胞选择性清除造成的。这可能源于细胞受凋亡机制影响程度不同,但这一设想有待于进一步证实^[11]。Heuer 等^[12]采取盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备鼠的脓毒症模型,观察到与 CD4⁺T 细胞相比,过继转移 Tr 后细菌的清除率显著增高,生存曲线显示存活率显著提高。新近研究表明,烧伤后机体免疫功能受到抑制,导致对机会感染的抵抗力降低,并出现 CD4⁺T 细胞向 Th2 极化,其中 CD4⁺CD25⁺Tr 活性增强,12 h 即出现了淋巴结细胞表面 CTLA-4 表达增强^[13]。这些研究结果有力地说明了 Tr 在脓毒症及脓毒性休克中所起的重要调节作用。

业已证明,机体炎症反应失调的主要原因系病原体感染所致促炎因子产生过度 and 抗炎介质生成不足,从而造成炎症平衡失调。Tr 抑制功能增强也正是介导了 Th1/Th2 漂移。Tr 通过识别能与自身抗原发生交叉反应的微生物抗原及其产物,从而激活 T 细胞。除 LPS 以外,随炎症发生部位及进展阶段的不同、宿主与病原体间相互作用的改变,Tr 所识别的外来抗原特征也将随之发生变化。许多病原相关分子模式或模式识别受体及炎症因子均有助于 Tr 发挥功能^[9],它们可刺激单核细胞表面的 CD14 等受体,经过 TLRs 将信号传入细胞内启动相关基因的转录。

2.2 脓毒症 T 细胞免疫功能失调的发生机制:既往认为,机体对感染的原发反应是失控性过度炎症反应,但目前的观点认为,在脓毒症中机体启动致炎反应的同时也启动了抗炎反应,只是在炎症发展的不同阶段二者作用主次不同,表现为早期以炎症反应为主,晚期则以抗炎反应为主或表现为混合抗炎反应^[14]。这种抗炎/促炎反应此消彼长的变化规律,与 Tr 所介导的 Th1/Th2 漂移密切相关。

2.2.1 Tr 对 Th 极化的调节作用:Tr 的免疫抑制效应表现为经 TCR 介导的信号刺激活化后,能抑制 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞活化和增殖。CD4⁺T 细胞活化后

分泌两类相互拮抗的细胞因子,其中分泌致炎细胞因子,包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰素 (IFN- γ)、IL-2 的 CD4⁺T 细胞为 Th1;分泌抗炎细胞因子如 IL-4、IL-10 的 CD4⁺T 细胞为 Th2。Th1 介导保护性免疫反应,活化巨噬细胞,杀灭病原体;Th2 介导非保护性免疫反应。有资料证实,LPS 刺激后 CD4⁺CD25⁺T 细胞升高且抑制功能增强,导致倾向于 Th2 型的免疫反应。意味着移除 CD4⁺CD25⁺T 细胞必将增强效应性 CD4⁺T 细胞向 Th1 的极化,从而强化这些效应细胞引起的免疫应答。可见 Tr 的增减决定着 Th1/Th2 作用主次关系的转换,同时决定着炎症反应的发展方向。

在脓毒症患者的外周血中,亦存在着单核细胞 Th1 类细胞因子减少、Th2 类细胞因子增加的情况^[15],如果单核细胞 Th2 类细胞因子出现逆转,说明保护性免疫增强,则脓症患者生存率增加。Hotchkiss 等^[16]研究发现,脓症患者发病初始阶段就出现明显 T 细胞免疫功能抑制现象,不仅抗炎反应而且致炎功能均存在缺陷,这说明脓症患者生存的关键在于炎症反应,即 Th1 反应的恢复。上述结果提示,机体通过 CD4⁺T 细胞 Th1/Th2 极化来实现免疫应答的平衡及转换,但对 CD4⁺CD25⁺T 细胞调节 CD4⁺T 细胞发生 Th1 或 Th2 极化反应的决定因素的了解目前尚不清楚,可能受病原体的种类、炎症发展的不同阶段及感染部位细胞因子微环境等多种因素影响。

2.2.2 树突状细胞 (DC) 对 Th 细胞极化的调节:当不同 DC 亚群识别不同类型、剂量的细菌产物或炎症介质后,将其转译为不同配体信号,继而启动不同的 T 细胞分化程序。这其中必然要涉及到多种细胞因子的释放及相互作用,因为细胞因子微环境在 Th 细胞极化中起着尤为重要的作用^[17]。大量证据表明,人和小鼠 DC 中均有 IL-12 表达和分泌,IL-12 是诱导 Th1 应答的主要细胞因子。一些特异性细胞因子(如 IL-10)是与 DC 诱导 Th2 反应密切相关的因子,甚至是一种必需因子。在人和小鼠中,IL-10 可通过抑制 DC 中 IL-12 的产生而有利于 Th2 反应。由于感染后 DC 迅速产生 IL-12,其后才生成 IL-10;一旦 DC 分泌 IL-12,IL-10 对 DC 诱导

Th1 反应就不再产生影响,因此 IL-10 的作用时机非常重要^[18]。

而 DC 的某些表面分子也可以促进 Th2 应答。Amsen 等^[19]研究发现,DC 表面的凹槽配体 δ 和凹槽可以影响 Th1 和 Th2 分化。IL-4 也是诱导 Th2 反应的主要因子,IL-4 并非由 DC 直接产生,但 DC 可促进未成熟 T 细胞、嗜酸性细胞或 NKT 细胞合成 IL-4。

2.3 Tr 诱导的脓毒症细胞凋亡与免疫无反应性:脓毒症免疫功能紊乱的机制一方面是 T 细胞功能失调,即炎症介质向抗炎反应(Th2 反应)的漂移,Th2 类因子增加,而这也正是 Tr 的功能体现;另一方面则表现为细胞凋亡与免疫无反应性^[20]。脓毒症时,机体表现为 Tr 水平持续增高,从而加剧免疫无反应状态,表现为对抗原刺激不发生反应性增殖并且也不分泌细胞因子 IL-2。即使在 TCR 介导信号刺激并有高浓度外源性 IL-2 存在的情况下,CD4⁺CD25⁺T 细胞仍可活化并增殖,但其增殖程度较 CD4⁺CD25⁻T 细胞弱很多。同时,Tr 可以通过下调 DC 膜表面共刺激分子的表达,从而继发影响 T 细胞增殖,而且 Tr 还可通过 Fas/FasL 诱导 T 细胞凋亡。这些作用机制的发挥最终都将导致机体免疫功能紊乱^[20]。

3 Tr 介导的免疫调节机制在脓毒症防治中的应用

在脓毒症及脓毒性休克病理过程中,T 细胞反应的启动同样意味着 3 种不同类型细胞[抗原呈递细胞 (APC)、Tr、Th]的反应。APC 提供的共刺激信号影响 Tr 和 Th 的“行为”,3 种(或更多种)细胞的反应将决定免疫反应的启动和表型。尽管 TLRs 刺激 DC 亦可以引起可溶性 IL-6 的释放,通过诱导产生的其他细胞因子共同作用封阻 Tr 对效应 T 细胞的抑制效应^[21],但一般情况下,APC 识别病原体抗原后是增强而不是消除 Tr 抑制功能^[22]。APC 在 T 细胞反应中起着关键作用,它可以通过影响 Tr 活性的发挥实现对效应 T 细胞的精细调节,最终达到调控免疫反应的共同目的。因此,一定程度上任何影响 DC 及 Tr 发育、成熟及激活的物理、化学及生物因素都可能影响 Th1/Th2 反应的方向,从而使炎症走向不同的结局。这些也正是目前对炎症性疾病乃至脓毒症干预治疗的焦点所在。尽管干预环节和应用

方法不同, Tr 在脓毒症防治中的应用研究取得了一些进展。

Fehervari 等^[23]研究证实, 在诸多 APC 中, LPS 刺激成熟的 DC 是目前解除 CD4⁺CD25⁺Tr 无反应性并激发其增殖和产生 IL-2 最有效的细胞。通过细胞因子 IL-10 的表达, 诱导 DC 成熟, 并调节 LPS/抗 CD40 诱导的 Th1/Th2 反应。并且在急性、致死性感染, 如脓毒症动物模型中, 过继转移 IL-10 转染的 DC 可明显降低致死率。同其他一些抗细胞因子抗体一样, 将表达 IL-10 的 DC 在 LPS 感染引起脓毒症之前注射, 可改变机体对 LPS 的反应^[24]。如前所述, 在临床患者或动物实验中均已证实, Tr 的移除或过继转移可直接影响脓毒症的结局。脓毒症免疫抑制作用是由于淋巴细胞(包括 B 细胞和 T 细胞, 特别是 CD4 细胞)及 DC 凋亡加速的结果^[25]。因此, 对 DC 及 Tr 活性、功能状态及相关细胞因子进行有效调节, 减少淋巴细胞凋亡, 提高机体免疫能力将为肿瘤、炎症、感染、自身免疫及其他免疫疾病的治疗开辟一条新途径^[26]。

4 小结

目前, 关于 Tr 在脓毒症中的研究尤其是临床观察还很有限, 其对脓毒症发生与发展的意义如何, 对疾病转归起着怎样的作用, 通过何种途径实现对炎症反应的调节, 及其确切的调控机制等诸多问题都有待于更深入的探讨。由于脓毒症的研究牵涉到大量细胞因子及炎性介质, 且与神经、内分泌因素等形成复杂的网络调节效应, 故任何单纯致力于某几种或某几类细胞或细胞因子的研究, 都不可能揭示其根本发病机制, 这正是动物实验与临床应用不相符甚至矛盾的症结所在^[27]。随着对 APC、Tr 及效应 T 细胞相互作用研究的深入, 对机体免疫状态及调节机制认识的日益深化, 许多作用环节都可能成为临床干预的切入点, 从而为防治脓毒症及其他感染性疾病提供新策略。

参考文献:

- 1 姚咏明, 柴家科, 林洪远. 现代脓毒症理论与实践[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 1182-1212.
- 2 Belkaid Y, Rouse B T. Natural regulatory T cells in infectious disease [J]. Nat Immunol, 2005, 6: 353-360.
- 3 Chatila T A. Role of regulatory T cells in human diseases [J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 116: 949-959.
- 4 Allez M, Mayer L. Regulatory T cells peace keepers in the gut [J]. Inflamm Bowel Dis, 2004, 10: 666-676.
- 5 Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler D A. Inhibition of human CD4⁺ CD25⁺ high regulatory T cell function [J]. J Immunol, 2002, 169: 6210-6217.
- 6 von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells [J]. Nat Immunol, 2005, 6: 338-344.
- 7 Fontenot J D, Rudensky A Y. A well adapted regulatory contrivance; regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3 [J]. Nat Immunol, 2005, 6: 331-337.
- 8 Cook D N, Hollingsworth J W Jr, Schwartz D A. Toll-like receptors and the genetics of innate immunity [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2003, 3: 523-529.
- 9 Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide [J]. J Exp Med, 2003, 197: 403-411.
- 10 Monneret G, Debard A L, Venet F, et al. Marked elevation of human circulating CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in sepsis induced immunoparalysis [J]. Crit Care Med, 2003, 31: 2068-2071.
- 11 Venet F, Pachot A, Debard A L, et al. Increased percentage of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4⁺ CD25⁻ lymphocytes [J]. Crit Care Med, 2004, 32: 2329-2331.
- 12 Heuer J G, Zhang T, Zhao J, et al. Adoptive transfer of in vitro-stimulated CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells increases bacterial clearance and improves survival in polymicrobial sepsis [J]. J Immunol, 2005, 174: 7141-7146.
- 13 Purcell E M, Dolan S M, Kriynovich S, et al. Burn injury induces an early activation response by lymph node CD4⁺ T cells [J]. Shock, 2006, 25: 135-140.
- 14 Jones-Carson J, Fantuzzi G, Siegmund B, et al. Suppressor alphabeta T lymphocytes control innate resistance to endotoxin shock [J]. J Infect Dis, 2005, 192: 1039-1046.
- 15 Venet F, Lepape A, Debard A L, et al. The Th2 response as monitored by CRTH2 or CCR3 expression is severely decreased during septic shock [J]. Clin Immunol, 2004, 113: 278-284.
- 16 Hotchkiss R S, Karl I E. The pathophysiology and treatment of sepsis [J]. N Engl J Med, 2003, 348: 138-150.
- 17 Mahnke K, Enk A H. Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells [J]? Curr Top Microbiol Immunol, 2005, 293: 133-150.
- 18 徐姗, 姚咏明. 树突状细胞及其与脓毒症关系的研究进展 [J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18: 121-124.
- 19 Amsen D, Blander J M, Lee G R, et al. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen presenting cells [J]. Cell, 2004, 117: 515-526.
- 20 姚咏明, 盛志勇. 重视对脓毒症本质的探讨 [J]. 中华急诊医学杂志, 2005, 14: 185-186.
- 21 Capron A, Dombrowicz D, Capron M. Helminth infections and allergic diseases: from the Th2 paradigm to regulatory networks [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2004, 26: 25-34.
- 22 Vigouroux S, Yvon E, Biagi E, et al. Antigen-induced regulatory T cells [J]. Blood, 2004, 104: 26-33.
- 23 Fehervari Z, Sakaguchi S. Control of Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory cell activation and function by dendritic cells [J]. Int Immunol, 2004, 16: 1769-1780.
- 24 Oberholzer A, Oberholzer C, Efron P A, et al. Functional modification of dendritic cells with recombinant adenovirus encoding interleukin 10 for the treatment of sepsis [J]. Shock, 2005, 23: 507-515.
- 25 林洪远, 盛志勇. 脓毒症免疫调节治疗的新思路 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 67-69.
- 26 董月青, 姚咏明. 脓毒症中细胞免疫紊乱的机制 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 636-638.
- 27 姚咏明, 盛志勇. MODS 抗炎治疗研究的反思 [J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11: 456-458.

(收稿日期: 2006-04-17)

(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ① 珠海丽珠: 丽珠血液灌流器…………… (封二)
- ② 深圳迈瑞: 监护仪…………… (插页)
- ③ 天津红日药业股份有限公司:
川威盐酸法舒地尔注射液
博璞青低分子肝素钙注射液…………… (插页)
- ④ 天津红日药业: 血必净注射液…………… (封底)