

负性共刺激分子在结核病中的表达

宋华峰 胥萍

苏州市第五人民医院检验中心, 苏州 215131

通信作者: 胥萍, Email: 573311485@qq.com

【摘要】 结核病的发生发展与机体的免疫功能密切相关。负性共刺激分子是一类表达在多种细胞表面的信号分子, 对免疫细胞正常功能的发挥具有负性调控作用。在结核分枝杆菌感染过程中, 很多免疫细胞表面的负性共刺激分子发生了显著改变, 与机体疾病的临床诊断以及病程进展具有一定关系。因此, 负性共刺激分子的异常表达能够为结核病的临床诊断和治疗提供新的方向。

【关键词】 结核分枝杆菌; 负性共刺激分子; PD-1; 免疫调控

基金项目: 苏州市卫生青年骨干人才培养项目 (Qngg2021028)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20211220-00248

Expression of negative costimulatory molecules in tuberculosis

Song Huafeng, Xu Ping

Medical Laboratory of the Fifth People's Hospital of Suzhou, Suzhou 215131, China

Corresponding author: Xu Ping, Email: 573311485@qq.com

【Abstract】 The progression of tuberculosis is closely related to immune function. Negative costimulatory molecules are signal molecules expressed on a variety of cell surfaces, which have negative regulatory effects on the normal function of immune cells. It is found that negative costimulatory molecules on the surfaces of many immune cells are significantly changed during *Mycobacterium tuberculosis* infection, which was related to the clinical diagnosis and progression of the disease. Therefore, abnormal expression of negative costimulatory molecules could provide a new direction for clinical diagnosis and treatment of tuberculosis.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Negative costimulatory molecule; PD-1; Immunoregulation

Fund program: Young Health Talents Program of Suzhou (Qngg2021028)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20211220-00248

结核病是一种由感染结核分枝杆菌 (MTB) 所引起的疾病, 它的病程发展与机体的免疫功能有关。负性共刺激分子在调控免疫细胞功能时发挥着重要作用, 其能够负性调控免疫细胞的增殖以及细胞因子的分泌, 从而抑制免疫细胞对外来病原体的免疫应答^[1-3]。因此, 结核病患者中免疫细胞表面负性共刺激分子的异常表达对于机体有效清除 MTB 感染具有重要的调控作用。本文对负性共刺激分子在结核病中的表达进行了综述。

一、主要的负性共刺激分子与结核

负性共刺激分子所传递的第二信号负责对免疫细胞进行负面调控, 当其表达量增加时会抑制细胞的部分免疫功能^[4]。研究显示, 负性共刺激分子的异常表达与慢性感染性疾病以

及肿瘤的发病有密切关系。关于结核病与负性共刺激分子, 研究最多的是 PD-1 分子, 随着研究的逐渐深入, BTLA、T 细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构域 3 (Tim-3) 等分子研究也越来越被关注。

1. PD-1 与结核

PD-1 负性共刺激分子是一类相对分子质量约 55 000 的 I 型跨膜糖蛋白, 它属于免疫球蛋白超家族成员。结核患者中部分免疫细胞上调表达 PD-1 分子, 从而导致免疫细胞对于结核菌的清除能力减弱。Shen 等^[4]探讨 PD-1/PD-L 通路在活动性肺结核患者中对 CD4⁺T 淋巴细胞的调节作用及其机制, 结果显示在活动性结核组中 PD-1⁺CD4⁺和 PD-L1⁺CD4⁺T 细胞比例均明显高于健康组。活动性结核患者 CD14⁺单核细

胞上 PD-1、PD-L1、PD-L2 表达也明显高于健康组；当阻断 PD-1/PD-L 信号通路后,可显著促进 CD4⁺T 细胞增殖、增强巨噬细胞吞噬以及细胞内杀伤活性。Li 等^[9]发现结核性胸膜炎患者胸水中的单核细胞(PFMC)中 PD-1 表达的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞数量显著增加。进一步通过 CD45RO 和 CCR7/CD62L 表面标志物的标记分析发现,PD-1 表达的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞主要表现为 CD45RO⁺CCR7⁻CD62L⁻表型,说明了 PD-1 的表达有利于 T 细胞向着效应记忆性表型分化。进一步的分析发现,随着结核抗原的刺激后 PD-1 的表达情况会改变 T 细胞的 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 等 Th1 型细胞因子分泌能力。总体上这些 PD-1⁺细胞并没有表现出耗竭的状态,而是维持在对于抗原特异性的效应状态。还有研究发现 PD-1/PD-L1 信号途径与 MTB 特异性 CD8⁺T 细胞杀伤功能有关。Suarez 等^[6]研究发现,在结核性胸膜炎患者积液样本(PEMC)中,CD14⁺细胞上的 PD-L1 和 CD8⁺T 细胞上的 PD-1 均有高表达。上调的 PD-1/PD-L1 途径阻碍了 MTB 特异性的 CD8⁺T 对巨噬细胞的特异性杀伤作用,而将 PEMC 中的 CD14⁺巨噬细胞分离出来,并与用 γ 射线辐照过的 MTB 抗原刺激和自体 CD8⁺T 细胞进行共培养可发现,阻断 PD-1/PD-L1 途径能显著增强 MTB 特异性 CD8⁺T 细胞对 CD14⁺巨噬细胞的杀伤作用,可作为结核病治疗的新辅助治疗方法。

PD-1 作为负性共刺激分子对细胞的免疫功能起到负性调控作用,但若将其完全敲除对机体的免疫应答也有不利后果。Lázár-Molnár 等^[7]研究发现 PD-1 敲除后的小鼠控制体内 MTB 清除的能力下降,小鼠肺部的 MTB 含量显著升高,最终导致其存活期显著降低。细胞因子分泌检测显示,在感染后 28 天,PD-1 敲除小鼠的 TNF- α 、IL-1、IL-6 及 IL-17 的表达量均显著升高,可见 PD-1 途径是控制 MTB 感染后肺部过度炎症反应所必需的。Kauffman 等^[8]采用恒河猴实验对 PD-1 阻断抗体在 MTB 感染中的效果进行了研究,结果显示与对照组比较,抗 PD-1 单克隆抗体处理过的试验组表现出更严重的疾病状态以及更高的细菌负荷量,表明 PD-1 介导的共抑制作用在控制恒河猴 MTB 感染中发挥重要作用,很可能降低有害的炎症反应以及允许正常的 CD4⁺T 细胞免疫应答。

2.B、T 淋巴细胞弱化因子(BTLA)与结核

BTLA 属于免疫球蛋白超家族成员^[9],广泛表达于造血细胞和非造血细胞,如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、DC 和自然杀伤细胞(NK 细胞)等。BTLA 作为负性共刺激分子当与其配体 HVEM 结合后会向细胞传递负性信号,从而抑制免疫细胞的部分功能^[9]。异常表达的 BTLA 能够影响免疫细胞表型的分化方向以及对 MTB 的清除能力,并反映患者的疾病病程进展。Shen 等^[11]研究发现痰涂片阳性结核病患者外周血 CD4⁺、

CD8⁺T 细胞 BTLA 表达均较健康对照组显著上调;复治患者 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞上 BTLA 表达均要显著高于初次治疗患者,并且 BTLA 表达量与痰样本中细菌负荷量呈现出正相关性;肺部有空洞的患者 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞上 BTLA 表达水平高于无空洞的患者,由此表明结核患者 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞上 BTLA 表达水平上调与疾病进展相关。Zhang 等^[12]研究发现与健康对照组相比,活动性肺结核患者中髓样 DC(mDC)和浆细胞样 DC(pDC)上 BTLA 的表达显著上调;BTLA⁺mDC 更加倾向于诱导促进免疫细胞向 Th2 和 Foxp3⁺Treg 的方向极化,而抑制向抗击 MTB 的 Th17 和 Th22 方向极化。

另外,BTLA 能通过增强细胞自噬促进宿主对 MTB 的防御,这可能为结核病的治疗提供新思路。Liu 等^[13]通过体外实验发现,沉默 BTLA 的信号通路后将会抑制巨噬细胞自噬从而促进牛型减毒结核杆菌(BCG)和 MTB 标准株 H37Rv 在胞内存活,但不影响巨噬细胞的吞噬、活性氧(ROS)和凋亡功能的发挥;通过在体内加入 BTLA 激动剂可改善 MTB 感染过程中的肺部病理,促进巨噬细胞的自噬和病菌清除。Zeng 等^[14]研究发现,活动性结核患者的 $\alpha\beta$ T 细胞上 BTLA 表达显著降低,尤其是那些接受初级治疗的患者,其 BTLA^{high} $\alpha\beta$ T 细胞在细菌清除过程中表现为中央记忆表型,对抗 MTB 感染十分重要,且 BTLA^{high} $\alpha\beta$ T 细胞相比较 BTLA^{low} $\alpha\beta$ T 细胞在细胞增殖方面表现出更好的潜能。这些结果表明了上调表达的 BTLA 也会在 $\alpha\beta$ T 细胞免疫应答中发挥正向调控作用。

3. Tim-3 与结核

Tim-3 是 I 型跨膜蛋白, Tim-3 膜蛋白特异性地表达于活化的 Th1 细胞表面,是区分 Th1 和 Th2 细胞的表面标记分子^[15-16]。Tim-3 的配体是 Galectin9,属于半乳糖凝集素家族,具有调节生物学功能的多样性,如细胞的聚集与黏附、肿瘤细胞的凋亡等^[17]。有研究显示,与结核菌素试验阳性对照组相比较,肺结核患者组总 CD8⁺T 细胞以及抗原特异性的 CD8⁺T 细胞上 Tim-3 的表达都显著升高;在涂片/培养阳性的结核组中 CD8⁺T 细胞上 Tim-3 的表达要显著高于涂片/培养阴性的结核组;在结核特异性抗原的刺激下,CD8⁺Tim-3⁺T 细胞的 IFN- γ 分泌量降低,细胞脱颗粒功能和增殖能力也都出现了下降^[18]。Qiu 等^[19]研究发现,活动性肺结核患者外周血中的 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞上的 Tim-3 分子以及其配体 Gal-9 都比健康对照组显著升高,且 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞主要表现为效应记忆型。Tim-3 上调表达的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞表现出更强的效应功能,能够增加 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 和 IL-22 等细胞因子的分泌量。

Tim-3 除了调控 T 细胞免疫功能,也能调控 NK 细胞的免疫应答。Wang 等^[20]发现在活动性结核病患者中 NK 细胞

上 Tim-3 表达增加,且其表达量与 IL-12 刺激诱导产生的 IFN- γ 呈负相关,阻断这一信号途径增加了 NK 细胞对 K562 靶细胞的细胞毒性,提高了 NK 细胞控制单核细胞源巨噬细胞中 MTB 生长的能力。Huang 等^[20]研究发现 CD56^{dim}CD16⁺ NK 细胞上 Tim-3 的表达在较严重结核患者中要显著高于病情较轻和中等度的患者,这表明了 Tim-3 的表达与结核病严重程度相关。

二、其它负性共刺激分子与结核

细胞毒 T 细胞抗原 4 (CTLA-4),属于免疫球蛋白超家族成员。一旦 CTLA-4 优先与 APC 上的 B7-1 和 B7-2 分子结合,就会阻断了 CD28 介导的激活 T 细胞的共刺激信号,使 T 细胞处于免疫功能失能状态,参与免疫反应的负性调节^[22-23]。目前关于 CTLA-4 与结核的研究不多。有研究发现在 HIV-结核共感染患者组中,绝大多数的 PPD 特异性 CD4⁺T 细胞高表达 CTLA-4,当接受过抗病毒和抗结核治疗后,细胞表面的 CTLA-4 表达能够降低约 40%,在单结核感染组中,经过抗结核治疗后 PPD 特异性 CD4⁺T 细胞表面的 CTLA-4 能够下降 60%,但 PD-1 的降低只观察到下降趋势,并无统计学差异,表明了 CTLA-4 能够反映结核治疗的进程^[24]。还有研究发现 CTLA-4 在鉴别诊断活动性肺结核和潜伏感染者中具有很好的应用价值。该研究分析了外周血中 CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ 上 CTLA-4 的表达情况,结果显示相比较潜伏感染患者组 CTLA-4 在活动性结核组中的表达显著上调,敏感度和特异性分别为 86.7%和 94.4%^[25]。

淋巴细胞激活基因 3 (LAG-3)是一种跨膜受体,在活化的 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞以及自然杀伤细胞亚群上表达,它与 PD-1 一样也是一种负性共刺激分子^[26]。Phillips 等^[27]研究发现,对于感染 MTB 的恒河猴血液来源的 CD4⁺T 细胞内 LAG-3 的沉默,导致共培养体系中巨噬细胞的细菌负荷显著降低,而对来源于肺部的 CD4⁺T 细胞的 LAG-3 沉默却没有显著的统计学差异。这一结果很可能是因为相比较血液中 CD4⁺T 细胞,MTB 感染后 LAG-3 在肺部 CD4⁺T 细胞上的表达要高得多,并且 RNAi 对于 LAG-3 转录的影响在肺部来源 CD4⁺T 细胞中不那么明显。进一步分析发现恒河猴 CD4⁺T 细胞中的 LAG-3 信号通路沉默后,IFN- γ 、IL-6 以及 CXCL11 促炎细胞因子分泌增加,从而显著增强对巨噬细胞内 MTB 的杀伤作用,因此,LAG-3 的异常表达在调节 MTB 感染时发挥着重要作用。但是也有研究发现无论是敏感还是耐药结核患者其 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞上 LAG-3 的表达与健康对照组相比较都没有显著差异,但是 PD-1 和 Tim-3 的表达却显著升高,对于这一差异性结果该研究者认为可能是其纳入的样本数量不多而导致的^[28]。

三、结语

结核病的发生以及病程进展与机体的免疫应答能力密切相关,负性共刺激分子在调控免疫细胞功能中发挥着重要作用。大部分的研究表明结核病患者免疫细胞高表达的负性共刺激分子会抑制免疫功能,从而影响机体对 MTB 的清除,但也有部分研究发现一些负性共刺激分子的存在以及过量表达对于免疫细胞功能的发挥必不可少。临床诊断方面,虽然已有研究表明部分负性共刺激分子的表达情况能够区分活动性结核和潜伏感染者,并且部分共刺激分子的表达与疾病的病程以及治疗效果相关,但将其应用到实际临床中有待进一步研究。相信随着后续研究的逐渐深入,负性共刺激分子在结核病中的临床诊断以及后期的治疗应用价值将会得到进一步的发展和推广,从而有效遏制结核病的发生。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, et al. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis[J]. Braz J Med Biol Res, 2006,39(11):1387-1397. DOI: 10.1590/s0100-879x2006001100002.
- [2] Henao-Tamayo M, Irwin SM, Shang S, et al. T lymphocyte surface expression of exhaustion markers as biomarkers of the efficacy of chemotherapy for tuberculosis[J]. Tuberculosis (Edinb), 2011,91(4):308-313. DOI: 10.1016/j.tube.2011.04.001.
- [3] Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion[J]. Immunology, 2010,129(4):474-481. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2010.03255.x.
- [4] Shen L, Gao Y, Liu Y, et al. PD-1/PD-L pathway inhibits *M.tb*-specific CD4⁺T-cell functions and phagocytosis of macrophages in active tuberculosis[J]. Sci Rep, 2016,6:38362. DOI: 10.1038/srep38362.
- [5] Li J, Jin C, Wu C, et al. PD-1 modulating *Mycobacterium tuberculosis*-specific polarized effector memory T cells response in tuberculosis pleurisy[J]. J Leukoc Biol, 2019,106(3):733-747. DOI: 10.1002/JLB.MA1118-450RR.
- [6] Suarez GV, Melucci Ganzarain C, Vecchione MB, et al. PD-1/PD-L1 pathway modulates macrophage susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* specific CD8⁺ T cell induced death[J]. Sci Rep,2019,9(1):187. DOI: 10.1038/s41598-018-36403-2.
- [7] Lázár-Molnár E, Chen B, Sweeney KA, et al. Programmed death-1 (PD-1)-deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(30):13402-13407. DOI: 10.1073/pnas.1007394107.
- [8] Kauffman KD, Sakai S, Lora NE, et al. PD-1 blockade exacerbates *Mycobacterium tuberculosis* infection in rhesus macaques[J]. Sci Immunol, 2021,6(55): eabf3861.DOI: 10.1126/sciimmunol.abf3861.
- [9] Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1[J]. Nat

- Immunol, 2003,4(7):670-679. DOI: 10.1038/ni944.
- [10] Jones A, Bourque J, Kuehm L, et al. Immunomodulatory functions of BTLA and HVEM govern induction of extrathymic regulatory T cells and tolerance by dendritic cells[J]. *Immunity*, 2016,45(5): 1066-1077. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.10.008.
- [11] Shen X, Zhang J, Tang P, et al. Expression and clinical significance of B and T lymphocyte attenuator on CD4⁺ and CD8⁺ T cells from patients with pulmonary tuberculosis [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2019,62(2):232-238. DOI: 10.4103/IJPM.IJPM_727_17.
- [12] Zhang JA, Lu YB, Wang WD, et al. BTLA-expressing dendritic cells in patients with tuberculosis exhibit reduced production of IL-12/IFN- α and increased production of IL-4 and TGF- β , favoring Th2 and Foxp3⁺ Treg polarization[J]. *Front Immunol*, 2020,11:518. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00518.
- [13] Liu J, Ming S, Song W, et al. B and T lymphocyte attenuator regulates autophagy in mycobacterial infection via the AKT/mTOR signal pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021,91:107215. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107215.
- [14] Zeng JC, Lin DZ, Yi LL, et al. BTLA exhibits immune memory for $\alpha\beta$ T cells in patients with active pulmonary tuberculosis[J]. *Am J Transl Res*, 2014,6(5):494-506.
- [15] Sakuishi K, Jayaraman P, Behar SM, et al. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity[J]. *Trends Immunol*, 2011,32(8):345-349. DOI: 10.1016/j.it.2011.05.003.
- [16] Anderson AC, Lord GM, Dardalhon V, et al. T-bet, a Th1 transcription factor regulates the expression of Tim-3[J]. *Eur J Immunol*, 2010,40(3):859-866. DOI: 10.1002/eji.200939842.
- [17] Hirashima M, Kashio Y, Nishi N, et al. Galectin-9 in physiological and pathological conditions[J]. *Glycoconj J*, 2002,19(7-9):593-600. DOI: 10.1023/B:GLYC.0000014090.63206.2f.
- [18] Wang X, Cao Z, Jiang J, et al. Elevated expression of Tim-3 on CD8⁺ T cells correlates with disease severity of pulmonary tuberculosis[J]. *J Infect*, 2011,62(4):292-300. DOI: 10.1016/j.jinf.2011.02.013.
- [19] Qiu Y, Chen J, Liao H, et al. Tim-3-expressing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in human tuberculosis(TB) exhibit polarized effector memory phenotypes and stronger anti-TB effector functions[J]. *PLoS Pathog*, 2012,8(11):e1002984. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002984.
- [20] Wang F, Hou H, Wu S, et al. Tim-3 pathway affects NK cell impairment in patients with active tuberculosis[J]. *Cytokine*, 2015, 76(2):270-279. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.05.012.
- [21] Huang Z, Yao F, Deng Z, et al. Elevated expression of Tim-3 in CD56^{dim}CD16⁺ NK cells correlates with disease severity of pulmonary tuberculosis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10(5):5031-5038. DOI:10.1039.c8sc05198d.
- [22] Linsley PS, Nadler SG, Bajorath J, et al. Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules[J]. *J Biol Chem*, 1995,270(25):15417-15424. DOI: 10.1074/jbc.270.25.15417.
- [23] Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy[J]. *Blood*, 2018,131(1):58-67. DOI: 10.1182/blood-2017-06-741033.
- [24] Saharia KK, Petrovas C, Ferrando-Martinez S, et al. Tuberculosis therapy modifies the cytokine profile, maturation state, and expression of inhibitory molecules on *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4⁺ T-cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158262. DOI: 10.1371/journal.pone.0158262.
- [25] 高岩, 刘倩倩, 张冰琰, 等. 细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原-4 对活动与潜伏结核感染的鉴别诊断价值评估[J]. *中华传染病杂志*, 2018,36(7):397-400. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2018.07.003.
- [26] Maeda TK, Sugiura D, Okazaki IM, et al. Atypical motifs in the cytoplasmic region of the inhibitory immune co-receptor LAG-3 inhibit T cell activation[J]. *J Biol Chem*, 2019,294(15):6017-6026. DOI: 10.1074/jbc.RA119.007455.
- [27] Phillips BL, Gautam US, Bucsan AN, et al. LAG-3 potentiates the survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host phagocytes by modulating mitochondrial signaling in an in-vitro granuloma model [J]. *PLoS One*, 2017,12(9):e0180413. DOI: 10.1371/journal.pone.0180413.
- [28] 王丽, 熊坤龙, 朱长太, 等. T 淋巴细胞耗竭在耐多药肺结核患者免疫表达中的初步研究[J]. *中国防痨杂志*, 2021,43(8):808-812. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6621.2021.08.010.

(收稿日期:2021-12-20)