

协同刺激因子 B7 家族成员的抑制性受体与 负向免疫调节

焦志军 周光炎*

(上海第二医科大学, 上海市免疫学研究所, 上海 200025)

摘要 维持淋巴细胞的正常功能需要正负向协同刺激信号的同时参与。两种信号决定了 T、B 细胞对抗原特异性刺激的敏感性和应答方式。二者的平衡使机体在避免对自身抗原产生不适当反应的同时, 又能对外来抗原显示足够强的应答能力。多年来有关协同信号的研究, 对相关分子结构和功能的认识已大大深化, 特别是其中的 B7 分子及其受体家族。该家族的负向调控作用是通过其抑制性受体来实现的。目前已发现 3 种抑制性受体: 细胞毒性 T 细胞相关分子 (CTLA-4)、程序性死亡分子 (PD-1) 和 B、T 细胞弱化因子 (BTLA)。对其效应机制的研究, 将对免疫调节以及自身免疫、肿瘤免疫和移植免疫产生深远影响。

关键词 协同刺激因子; 抑制性受体; CTLA-4; PD-1; BTLA

T 细胞活化的双信号模式认为, T 细胞活化不仅需要抗原特异性 T 细胞受体 (TCR) 与抗原递呈细胞 (APC) 上的抗原肽-MHC 分子复合物的相互作用, 同时还需要协同刺激信号。如果只有 TCR 介导的抗原特异性信号, 而没有协同刺激信号, T 细胞不但不能有效活化, 而且会处于无能状态。协同刺激信号是通过 T 细胞上的协同刺激受体与相应配体相互作用而介导的。B7-CD28 是迄今为止公认的最基本的协同刺激信号, 由表达在 T 细胞上的 CD28 和表达在抗原递呈细胞表面的 B7-1 和 B7-2 相互作用产生共刺激信号。经过多年的研究, B7-CD28 协同信号的内容已得到极大的丰富, 组成了含有数个结构和功能相似的配体和受体的 B7-CD28 家族, B7 分子的主要成员有 B7-1、B7-2、B7h、B7-H1、B7-H2、B7-H3 等, 受体包括 CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1 和 BTLA。所有这些协同信号分子不仅提供促进 T 细胞生长、分化和产生细胞因子的正向信号 (CD28 和 ICOS), 同时还能通过提供负向信号来限制、终止和/或减弱 T 细胞应答 (CTLA-4、PD-1 和 BTLA)。改变这些协同分子的表达可以调控免疫的强度和方向, 如在抗病毒和肿瘤中提高免疫应答, 而在免疫排斥和自身免疫性疾病中降低免疫应答。B7-CD28 家族提供负向信号是通过其抑制性受体来实现的。目前共发现了 3 种抑制性受体, 分别为: CTLA-4、PD-1 和新发现的 BTLA。

1 CTLA-4

CTLA-4 是研究得最为透彻的识别 B7 家族成员的抑制性受体, 属 CD28 超家族成员, 在氨基酸水平与 CD28 有 31% 的同源性, 其胞外区具有高保守的 MYPPPY 氨基酸模体 (motif), 胞内区带有传递抑制信号的免疫受体酪氨酸抑制模体 (ITIM)。但其表达量只有 CD28 的 2%~3%, 其表达的调节和功能的发挥都需要 CD28 的参与。人 CTLA-4 基因启动子中发现了多态性现象, 对人 CTLA-4 胞浆区的研究表明, 人、鼠、鸡结构高度相似, 种族发育的保守性提示其功能的重要性。CTLA-4 与 CD28 的配体同为表达在 APC 上的 B7 分子 (B7-1 和 B7-2), 但二者介导的免疫效应不同。CD28 与 B7-1/B7-2 结合, 起增强或放大免疫应答的作用, 而 CTLA-4 与 B7-1/B7-2 结合, 则在 T 细胞应答过程中起负性调节作用^[1]。

CD28 和 CTLA-4 组成了一个具有正、负向调节作用的系统, 然而 CTLA-4 与 B7-1/B7-2 分子的亲和力远远超过了 CD28, 只有通过 CD28 和 CTLA-4 在时间和空间上差异性表达才能保证正、负向信号共同参与某一过程。CD28 在 T 细胞表面为组成性表达, 而 CTLA-4 在 T 细胞活化之后, 其表达才迅

收稿日期: 2004-07-30 接受日期: 2004-11-08

国家自然科学基金 (No.30170864) 和国家高技术研究发展计划项目 (863 计划) (No.2003AA205009) 资助

* 通讯作者。Tel: 021-63846590-776207, E-mail: my@shsmu.edu.cn

速上调,且2~3天到达最高峰^[2]。最初认为CD28在T细胞活化的早期发挥作用,而CTLA-4则在免疫应答的终末阶段发挥作用,但后来发现CTLA-4的mRNA可在T细胞活化后1h左右检测到,且CTLA-4共同参与对配体的结合(coligation),在T细胞活化4h即可影响到IL-2 mRNA的累积,提示CTLA-4可能更早地参与到细胞活化的过程。而且初始T细胞接受到抗原信号后需数小时才能完全活化并进一步增殖,其间CTLA-4有足够的时间完成转录、翻译和处理^[3]。蛋白质的稳定性也决定了CD28和CTLA-4功能的协调,CD28相当稳定,因此即使其蛋白质的合成减少甚至停止,也能保证有足够的分子发挥作用。而活化T细胞表达的CTLA-4因为溶酶体的存在而迅速降解(半衰期只有2h),从而减少了抑制性信号的进一步传递,保证免疫应答的延续性。

CTLA-4通过降低细胞因子IL-2和IL-2R的表达及使细胞阻滞于G1期来抑制T细胞的活化^[4]。CTLA-4遗传性缺陷的小鼠引发淋巴细胞增殖性疾病,表现为外周淋巴器官及实体器官如心脏、肝和胰腺等中T细胞进行性累积,因此这种小鼠常在3~5周后死亡^[5]。CTLA-4缺陷小鼠引发的自身免疫性疾病也表现为T细胞依赖性,因为当这种小鼠与无T细胞的Rag(recombinase-activating gene)缺陷小鼠进行杂交所得的子代可以不表现出自身免疫性疾病。另外,通过转基因在CTLA-4^{-/-}/Rag^{-/-}小鼠体内引入一固定的TCR基因,也不能引发自身免疫性疾病,说明CTLA-4^{-/-}小鼠T细胞的多克隆群增殖过程中有特异抗原的参与。研究发现如在小鼠出生时即剔除CD4⁺T细胞保留CD8⁺T细胞或应用CD28依赖的共刺激干预,可阻止CTLA-4^{-/-}小鼠淋巴细胞累积。后者可通过两种方式实现,即应用CTLA-4Ig(可阻止B7-1/B7-2分子与CD28结合)处理CTLA-4^{-/-}小鼠或将CTLA-4^{-/-}小鼠与B7-1/B7-2^{-/-}小鼠杂交。以上研究表明CD4⁺T细胞初始活化需要特异的TCR和CD28传递的信号。其次,对CD8⁺T细胞而言,CTLA-4的作用在于细胞活化后使细胞增殖停止。尽管CTLA-4在初始T细胞活化后即有表达,但其最大抑制效应作用于致敏T细胞而不是初始T细胞,尤其是对CD8⁺T细胞而言。说明在CTLA-4^{-/-}小鼠引发的疾病中CD4⁺T细胞发挥了主要的作用。在细胞水平,CTLA-4的作用可能在于减少增殖性和分泌细胞因子的细胞群,而不是广泛的减少参与免疫应答的细胞数量^[6]。在CTLA-4存在的情况下,需要更多的APC

才能产生能够检测到的细胞因子。总之,CTLA-4和CD28二者发挥相反的作用,CTLA-4参与提高了T细胞应答的阈值而CD28使之降低,共同参与免疫应答的调节。

2 PD-1

PD-1是B7家族的第2个抑制性受体,最初是从发生凋亡的T细胞株中分离得到的一种跨膜蛋白,分子量为55 kDa,胞外区含有一IgV样的结构域,胞内区有97个氨基酸,含有一个免疫受体酪氨酸抑制模体(ITIM)及一个免疫酪氨酸转换模体(ITSM)。PD-1表达于活化的T细胞、B细胞及巨噬细胞表面,具有两个配体,分别为B7-H1(PD-L1)和B7-DC(PD-L2)。PD-1与相应的配体结合后,使得胞内区的ITIM发生磷酸化,从而产生SHP-2依赖的抑制性信号^[7,8]。在一定的情况下,PD-1的配体可提供正向的共刺激信号,但近来的数据表明,这种正向调节机制其实并不依赖于PD-1,也就是说可能存在能与同一配体结合的受体,以提供正向信号^[9,10]。

PD-1在结构和功能上均与CTLA-4相似,但表达的细胞范围更广。尽管PD-1无MYPPPY模体(CTLA-4与B7-1/B7-2结合的关键模体),但其胞外与CTLA-4一样都含有单一的IgV样结构域(二者有23%的同源性)和胞内区的免疫受体酪氨酸抑制模体。另外,二者都提供T细胞活化的抑制信号,PD-1^{-/-}小鼠产生的自身免疫性淋巴细胞增殖性疾病与CTLA-4^{-/-}小鼠类似,只是时间进程慢于后者。

PD-1^{-/-}小鼠可引发自身免疫性疾病,但疾病的类型和严重程度与小鼠的遗传背景密切相关,C57BL/6 PD-1^{-/-}小鼠表现出免疫系统的高反应性,如脾肿大、体外B细胞和髓细胞对刺激的高敏感性等,于14个月时50%的C57BL/6PD-1^{-/-}小鼠产生肾小球肾炎和关节炎,并伴有肾小球IgG3和C3的堆积。而Balb/c PD-1^{-/-}小鼠产生B细胞主导的自身免疫性疾病,出生3个月后30%的这种小鼠死于扩张性心肌病(该病对人类来说也是致命的,只有通过心脏的移植来治疗),原因在于产生了一种针对心脏特异性蛋白的自身抗体,因为PD-1配体在心脏呈现高表达,同时这种自身抗体也与心脏组织特异性结合,所以推测心脏组织可以与活化的B细胞通过PD-1/PD-1配体途径相互作用,在抑制自身反应性B细胞原位活化中发挥重要的作用^[11-13]。

不同遗传背景的 PD-1^{-/-} 小鼠产生不同的自身免疫病这一现象提供了一个很好的实验模型, 可用于研究其他影响自身免疫病的遗传因素^[6]。近年来的研究还发现, PD-1 可以调节 NOD 小鼠自身免疫性糖尿病和实验性自身免疫性脑脊髓炎模型小鼠疾病的发生和发展。有意义的是最近发现 PD-1 的多态性与系统性红斑狼疮(SLE)和 I 型糖尿病的发生相关。PD-1 的配体可高表达于某些肿瘤细胞表面, 可能与肿瘤的免疫逃避有关, 治疗性阻断 B7-H1 可使得肿瘤生长受抑, 但这一作用不一定依赖于 PD-1 的作用。最后, PD-1 参与抗病毒免疫的调节, 阻断 PD-1 途径可增加抗病毒免疫应答的强度。综上所述, PD-1 在外周耐受和抑制抗肿瘤和抗病毒免疫中发挥重要的作用^[6]。

3 BTLA

3.1 BTLA 分布及结构特征

作为一个新的 B7 家族抑制性受体, BTLA 也属于免疫球蛋白超家族成员。其 mRNA 的组织分布较局限, 高表达于脾脏和淋巴结, 但胸腺、肝、肾、肺、心脏、脑及肌肉等组织不表达。可表达于脾脏 B 细胞, 但初始 T 细胞不表达。表达于活化但未分化的 T 细胞, T 细胞分化后, 只有 Th1 细胞高表达^[14]。最近的研究发现 BTLA 蛋白的表达方式较 mRNA 有较大的差异。BTLA 蛋白表达于骨髓发育中的 B 细胞和胸腺发育中的 T 细胞; 所有成熟的淋巴细胞、脾脏巨噬细胞及成熟的骨髓来源的 DC 细胞, 而未成熟 DC 则不表达^[15]。

Th1 细胞表达 BTLA 并不依赖于 IL-12 或 IFN- γ 信号, 表明 BTLA 在 Th1 细胞起着特殊的作用。同时在初始 B 细胞和 B 细胞株也可检测到 BTLA 的 mRNA, 说明 BTLA 也参与调控 B 细胞应答。其表达的广泛性高于 CTLA-4(仅表达于 T 细胞), 但又不如下 PD-1(T、B 和髓样细胞)。三者共同特征是, 只在细胞活化后才表达。T 细胞活化 48 h 即可检测到 BTLA 的存在^[14]。

鼠与人的 BTLA 具有 48% 的同源性。尽管 BTLA 与 B7 家族的其他受体相比同源性很低, 仅有 9%~13%, 但其结构上与 CTLA-4 和 PD-1 相似。BTLA 也是一种 I 型跨膜糖蛋白, 胞外区含有一 IgV 样结构域, 一个跨膜区和一个胞内区。可以看出 IgV 样结构域是 B7 家族受体的特征性结构。另外, BTLA 的胞内区含有 3 个酪氨酸位点, 分布于 3 个模

体内, 即: Grb2 结合位点、免疫受体酪氨酸抑制模体(ITIM)和免疫受体酪氨酸转换模体。应用一系列人和鼠 BTLA 的突变型研究了这 3 种模体是否均参与了 BTLA 受体与下游蛋白酪氨酸磷酸酯酶 SHP-1 和 SHP-2 的作用, 结果发现鼠的 274、299 位酪氨酸和人的 257、282 位酪氨酸突变阻断了这种作用, 而鼠 245 和人 226 位酪氨酸突变无此效应, 表明 BTLA 与 SHP-1、SHP-2 的结合需要两个保守的 ITIM, 而不需要 Grb2^[16]。进化上, 这类模体在人和鼠间为保守序列, 且 PD-1 分子也含有此类模体。ITIM 的存在说明 BTLA 可作为一个抑制性受体发挥作用。在 CD150 家族成员中, ITSM 的作用是通过招募不同的下游分子产生不同的信号途径, 发挥转换模体的作用。BTLA 和 PD-1 分子中含有的 ITSM 的作用值得进一步研究。值得注意的是 PD-1 介导的抑制信号需要 ITSM 基序中的酪氨酸位点的参与。所以, BTLA 具有的 B7 家族受体的典型结构特征, 结合其配体为 B7x 也是 B7 家族成员, 可以认为 BTLA 是 B7 家族成员新的抑制性受体。

3.2 BTLA 的配体: B7x

B7x 又称 B7S1 或 B7-H4, 具有其他 B7 家族成员的结构特征, 即含信号序列、一个 IgV 样结构域。B7x 的氨基酸序列与 B 家族其他配体的同源性最高可达到 25%, 而人和鼠进化上的同源性达到 87%。通过对人和鼠 B7 家族肽序列聚类分析发现 B7x 与 PD-L1、PD-L2 和 B7-H3 的相关程度高于 B7-1、B7-2 或 ICOS。在淋巴组织或非淋巴组织中均检测到 B7x 的转录本, 这种表达方式类似于 ICOS-L、PD-L1、PD-L2 和 B7-H3^[17]。B7x 可在鼠 B 细胞表面组成性表达, 而一旦 B 细胞通过 B 细胞受体或其他受体活化后, B7x 表达量可下降 50%~70%。活化的小鼠腹膜巨噬细胞及少部分骨髓来源的树突状细胞(DC)也表达 B7x。因其含有疏水性末端且对磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C 处理敏感, Prasad 等^[18]推测 B7x 是通过 GPI(glycosylphosphatidyl inositol)结合于细胞表面, 这一点有别于 B7 家族的其他分子。

B7x 不能与 ICOS、CTLA-4、PD-1 及其他已知的能与 BTLA 结合的 B7 家族分子结合。同时也发现 B7-H3 和 B7xIg 融合蛋白并不能相互竞争活化 T 细胞上存在的结合位点, 说明 BTLA 并不是 B7-H3 的受体。之所以认为 B7x 为 BTLA 的配体是基于 B7x-Ig 融合蛋白可结合活化的野生型 T 细胞而非 BTLA 缺陷的 T 细胞, 但也有可能 B7x 真正的受体在 BTLA 缺陷

的T细胞中表达受抑,目前尚没有直接的证据说明二者的结合,需要进一步的实验来证实这一结果。

3.3 BTLA 的功能

连接有Myc的BTLA分子与TCR交联转染鼠T细胞杂交瘤细胞可导致IL-2产生受抑,同样用CD3单抗/B7x-Ig处理鼠T细胞可引起细胞周期阻滞、细胞增殖下调和IL-2产生受抑,即使加入CD28共刺激信号也不能改变这种抑制作用。说明在B7x-Ig存在的情况下,BTLA传递的信号与T细胞活化的信号二者之间存在功能上的相关性。BTLA与TCR交联使得BTLA胞内区酪氨酸位点发生磷酸化,从而招募Src-H-2蛋白酪氨酸磷酸酶SHP-1、SHP-2,这可能是BTLA弱化T细胞应答的一种潜在机制^[14]。体外实验表明,BTLA缺陷的T细胞和B细胞的初次应答与野生型相比有所提高,表现出中等程度的增殖。而BTLA缺陷的Th1细胞增殖远高于野生型的Th1细胞。同样,当加B7x抗体阻断后,T细胞增殖增强和IL-2分泌增加。可以看出,BTLA缺失和阻断B7x与相应受体结合所产生的效应是一致的。这些表明BTLA和B7x作用可以抑制T细胞活化,同时这种抑制作用又主要集中于具有Th1表型的细胞。CTLA-4和PD-1和TCR交联同样可引起受体的磷酸化、招募磷酸酶和下调T细胞应答。提示三者可能在功能上使用相同的抑制信号途径,其中由磷酸酶抵消TCR和共刺激信号产生的下游激酶的作用。

用不同抗原免疫BTLA缺陷小鼠和正常小鼠(用B7x单抗阻断处理),发现两种小鼠体内针对T细胞依赖抗原的抗体水平显著增高,表明B7x可能参与调节T-B细胞的相互作用。因此引入B细胞活化的信号可使得B7x表达下调,从而去除了抑制T细胞活化的信号。通过对小鼠实验性自身免疫性脑髓炎模型(EAE)研究发现,BTLA缺陷小鼠表现出较高的发病率和严重程度^[14]。体内实验发现,应用B7x单抗处理可加重EAE,而B7x-Ig融合蛋白则能够抑制T细胞的增殖。另外,B7x-Ig处理可抑制CD8⁺细胞毒性T细胞的成熟和增殖,在移植抗宿主病模型中延长移植物的存活时间。这些结果均证明BTLA和B7x参与了体内免疫应答的调节。

BTLA缺失小鼠可导致进程性、致命性的淋巴细胞增殖紊乱。尽管这类小鼠未表现淋巴细胞发育障碍,但其T细胞对CD3单抗刺激的敏感性更高^[14]。而PD-1缺失小鼠会发生B细胞紊乱,所引起的相

应疾病的发病率及发病特征取决于小鼠的遗传背景。另外,具有自身高反应性的小鼠如PD-1缺失会导致自身反应性T细胞的大量扩增,引发GVHD样疾病。从这些结果可以推测CTLA-4/B7和PD-1/PDL1-PDL2途径转导的是调节外周耐受和抗自身免疫的信号。尽管BTLA缺失小鼠仅表现出较轻的症状,根据现有结果及BTLA在已分化的Th1细胞表面的高表达,仍可以认为BTLA-B7x在减弱Th1应答中发挥不可或缺的作用^[19,20]。

4 小结

维持淋巴细胞正常的功能需要正向信号和负向信号同时参与,两种信号决定了T、B细胞对抗原特异性刺激的敏感性。二者的平衡保证机体保持外周耐受和避免对自身抗原的不适当应答的同时,具有对外来抗原足够的应答能力。其中传递负向信号的分子受到越来越多的重视,也不断发现一些新的成员。BTLA及其配体B7x的发现对深入了解机体如何选择性活化效应细胞,也为肿瘤的免疫治疗提供了新的思路,因为许多肿瘤的免疫原性很低,以此来逃避T细胞介导的免疫监视。因而调节BTLA的表达可用于B7x阳性的肿瘤免疫治疗。除此之外,深入研究BTLA及其配体的功能以及与另外两种抑制性受体CTLA-4和PD-1的协同作用,必将加深对认识自身免疫应答、肿瘤免疫和移植排斥的机制产生深远的影响。

参考文献 (References)

- [1] Green JM. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, **22**: 261
- [2] Egen JG *et al.* *Nat Immunol*, 2002, **3**: 611
- [3] Lee KH *et al.* *Science*, 2002, **295**: 1539
- [4] Walunas TL *et al.* *Immunity*, 1994, **1**: 405
- [5] Waterhouse P *et al.* *Science*, 1995, **270**: 985
- [6] Leibson PJ. *Curr Opin Immunol*, 2004, **16**: 328
- [7] Okazaki T *et al.* *Curr Opin Immunol*, 2002, **14**: 779
- [8] Okazaki T *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 13866
- [9] Shin T *et al.* *J Exp Med*, 2003, **198**: 31
- [10] Liu X *et al.* *J Exp Med*, 2003, **197**: 1721
- [11] Nishimura H *et al.* *Immunity*, 1999, **11**: 141
- [12] Nishimura H *et al.* *Science*, 2001, **291**: 319
- [13] Okazaki T *et al.* *Nat Med*, 2003, **9**: 1477
- [14] Watanabe N *et al.* *Nat Immunol*, 2003, **4**: 670
- [15] Han P *et al.* *J Immunol*, 2004, **172**: 5931
- [16] Gavrieli M *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **312**: 1236
- [17] Sica GL *et al.* *Immunity*, 2003, **18**: 849
- [18] Prasad DV *et al.* *Immunity*, 2003, **18**: 863
- [19] Carreno BM *et al.* *Trends Immunol*, 2003, **24**: 524
- [20] Wang S *et al.* *Microbes Infect*, 2004, **6**: 759

Inhibitory Receptors for the Molecules of B7 Family and the Negative Immune Regulation

Zhi-Jun Jiao, Guang-Yan Zhou*

(*Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China*)

Abstract Maintenance of lymphocyte homeostasis is regulated by a number of positive and negative costimulatory signals, which determine the thresholds for antigen-specific stimulation of T and B cells. The balance between two kinds of signals ensures an effective response to foreign antigens for host protection, while avoiding inappropriate reaction to self antigens. Intensive investigations on the structure and function of the costimulation-related molecules revealed that important roles are played by the members of B7 family. The negative control activity exerted by the family is tightly dependent on the inhibitory receptors. Three kinds of B7-ligating receptors with down regulatory activity have been identified, including CTLA-4, PD-1 and BTLA. Studies on the inhibitory receptors have provided a better understanding of the mechanisms for immune regulation, which would help to lay a basis for therapeutic applications to human diseases like cancers, autoimmune disorders and transplantation rejection.

Key words costimulation molecule; inhibitory receptor; CTLA-4; PD-1; BTLA

Received: July 30, 2004 Accepted: November 8, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170864) and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program)(No.2003AA205009)

*Corresponding author. Tel: 86-21-63846590-776207, E-mail: my@shsmu.edu.cn