

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.05.002

· 研究快报 ·

CD11b⁺ NKT 细胞抑制 Poly I:C 诱导小鼠肝损伤中 CD8⁺ T 细胞增殖反应

刘音¹, 陈朱波¹, 韩岩梅² (1. 中国医学科学院 基础医学研究所 免疫学系, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005; 2. 第二军医大学 免疫学研究所 医学免疫学国家重点实验室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 研究 Poly I:C 诱导的肝损伤模型中肝脏内上调的 CD11b⁺ NKT 细胞对 CD8⁺ T 细胞增殖反应的作用。 **方法:** 经腹腔注射 Poly I:C (20 μg/g) 制备 Poly I:C 诱导小鼠肝损伤模型, 流式细胞术检测 CD11b⁺ NKT 细胞的比例、T 细胞增殖反应和 CD8⁺ T 细胞的杀伤功能, ELISA 法检测细胞培养上清中的细胞因子浓度。 **结果:** Poly I:C 诱导的肝损伤模型小鼠的肝脏中 CD11b⁺ NKT 细胞的比例显著上升 [(71.7 ± 5.3)% vs (12.4 ± 3.6)% , P < 0.01]。细胞因子表达谱分析发现, CD11b⁺ NKT 细胞分泌 IFN-γ、IL-4 和 IL-10 的能力显著低于 CD11b⁻ NKT 细胞。功能分析发现, CD11b⁺ NKT 细胞能够显著抑制 anti-CD3/CD28 单抗诱导非特异性的和 OVA 特异性的 CD8⁺ T 细胞增殖反应, 而 CD11b⁻ NKT 细胞没有此抑制功能; 进一步分析发现, CD11b⁺ NKT 细胞并不影响 CD8⁺ T 细胞的杀伤功能。 **结论:** Poly I:C 诱导的肝损伤模型小鼠肝脏中 CD11b⁺ NKT 细胞比例升高, 该细胞能够负反馈抑制 CD8⁺ T 细胞的增殖反应, 但是并不影响 CD8⁺ T 细胞的杀伤功能。

[关键词] NKT 细胞; CD11b; CD8⁺ T 细胞; 免疫调节; 肝损伤; Poly I:C

[中图分类号] R735.7; R730.2; R730.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)05-0493-06

Effects of CD11b⁺ NKT cells derived from poly-I:C-challenged mice on CD8⁺ T cell proliferation and cytotoxicity

Liu Yin¹, Cheng Zhubo¹, Han Yanmei² (1. National Key Laboratory of Medical Molecular Biology & Faculty of Immunology, Institute of Basic Medical Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China; 2. National Key Laboratory of Medical Immunology & Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of expanded CD11b⁺ NKT cells isolated from the injured murine liver following poly-I:C challenge on the proliferation and function of normal murine CD8⁺ T cells *in vitro*. **Methods:** Male C57BL/6 mice were treated with poly-I:C at 20 μg/g. CD11b⁺ and CD11b⁻ NKT cells were isolated from the liver 24 h after poly-I:C-treatment. CD8⁺ T cells were isolated from normal male OT-I mice and co-cultured with the isolated hepatic CD11b⁺ and CD11b⁻ NKT cells, respectively. The proliferation and cytotoxic ability of CD8⁺ T cells in the co-culture were both assessed by flow cytometry. The concentration of major immunoregulatory cytokines was determined by ELISA. **Results:** Poly-I:C treatment significantly increased the proportion of CD11b⁺ NKT cells in the liver. After stimulation, CD11b⁺ hepatic NKT cells produced less IFN-γ, IL-4 and IL-10 than CD11b⁻ hepatic NKT cells. CD11b⁺ hepatic NKT cells significantly inhibited both antigen-specific and nonspecific immune responses of CD8⁺ T cells, while CD11b⁻ hepatic NKT cells showed no inhibitory effect. CD11b⁺ hepatic NKT cells did not significantly alter the cytotoxic ability of activated CD8⁺ T cells. **Conclusion:** Poly-I:C-induced liver injury is associated with the expansion of CD11b⁺ hepatic NKT cells. While these CD11b⁺ hepatic NKT cells have little effect on the cytotoxic activity of activated CD8⁺ T cells, they significantly inhibit CD8⁺ T cell proliferation.

[Key words] NKT cell; CD11b; CD8⁺ T cell; immune regulation; liver injury; Poly I:C

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(5): 493-498]

[基金项目] 国家(重点)实验室专项经费资助(No. 2060204)。Project supported by the National Laboratory Special Fund (No. 2060204)

[作者简介] 刘音(1973-),女,北京市人,主管技师,主要从事免疫学的基础及临床研究,E-mail:liuyinbj@sina.com

[通信作者] 韩岩梅(Han Yanmei, corresponding author),E-mail:hanyanmei@immunol.org

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140928.1508.002.html>

NKT 细胞是一群表达 NK 细胞受体的特殊的 T 细胞,同时表达有限多态性的 CD1d 限制性的 $\alpha\beta$ T 细胞受体(TCR)和部分 NK 细胞受体(如 C57BL/6 背景小鼠的 NK1.1 等),NKT 细胞是非特异性免疫细胞体系的重要组成部分^[1-2]。NKT 细胞在肝脏中的比例最高,占小鼠肝脏浸润淋巴细胞的 20% ~ 35%,占大鼠和人肝脏浸润淋巴细胞的 10% ~ 15%,其在肝脏炎症和免疫反应中发挥着重要的作用^[3-4]。NKT 细胞主要通过分泌各种促炎性细胞因子和抑炎性细胞因子发挥作用,包括 IFN- γ 、IL-4、IL-13、IL-10、IL-17、IL-21 和 TNF- α 等,因此,NKT 细胞可通过分泌不同的细胞因子,既能发挥免疫促进功能,也能发挥免疫抑制功能^[5-6]。研究^[7-10]发现,NKT 细胞能够抑制包括系统性红斑狼疮、1 型糖尿病和实验性新月体性肾小球肾炎在内的自身免疫反应。但是,在这些疾病模型中,NKT 细胞发挥免疫调节功能均是通过分泌免疫抑制性细胞因子实现的。NKT 细胞群体中是否存在着表型明确的调节性 NKT 细胞亚群,调节性 NKT 细胞是否存在着分泌细胞因子之外的免疫调节机制,目前尚不清楚。

本实验室在之前的研究^[11]中已经发现李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)感染模型小鼠的肝脏内,CD11b⁺ NKT 细胞的比例显著上升,该细胞具有抑制 CD4 和 CD8⁺ T 细胞反应的功能,因此能够负反馈性下调肝脏内抗李斯特菌感染免疫反应,避免过强的免疫反应对自身组织造成的损伤。为进一步了解这个调节性 NKT 细胞亚群的特性,本研究制备了 Poly I:C 诱导的肝损伤小鼠模型,检测该模型小鼠内这一新型的 NKT 细胞亚群的比例是否上升了,这个新亚群是否仍具有免疫调节功能,其是否在自身免疫性疾病中具有普遍意义。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

C57BL/6(H-2Kb)小鼠,6~8 周,雄性,购自上海必凯实验动物有限公司。OT-I 小鼠(MHC I 类分子限制的、OVA257-264 抗原肽特异性的 TCR 转基因小鼠),6~8 周,雄性,购自 Jackson Laboratory(Bar Harbor,ME),饲养于 SPF 级的动物房中且自行繁殖培育。

1.2 细胞株及主要试剂

淋巴瘤细胞株 EG7 购自 AATC(Rockville,MD),由本实验室保种和传代。Poly I:C 购自 Sigma Chemical Co,培养基 RPMI 1640、胎牛血清购自 PAA Laboratories,大鼠血清购自 Hyclone 公司,Percoll 购

自 Amersham Biosciences 公司。PMA、离子霉素、 α -GC(α -galactosylceramide)、LPS、DNA 酶、胶原酶 IV(collagenase IV)等试剂均购自 Sigma 公司,荧光素标记的抗 TCR- β 、NK1.1、CD11b 和 CD8 单抗以及各自的同型对照抗体均购自 BD PharMingen 公司,IFN- γ 、IL-4 和 IL-10 的 ELISA 试剂盒购自 R&D 公司,7-AAD 购自 INVITROGEN 公司,ALT 和 AST 检测试剂购自上海源叶生物科技有限公司。所有试剂均按说明书要求保存和使用。

1.3 Poly I:C 诱导的小鼠肝损伤模型的制备

将 Poly I:C 溶解到 PBS 中,总体积控制为 0.25 ml,经小鼠腹腔注射 20 μ g/g Poly I:C,注射 24 h 后小鼠血清中 ALT 和 AST 的含量显著上升,提示 Poly I:C 诱导的肝损伤小鼠模型制备成功。

1.4 肝脏浸润单个核细胞的制备及收集细胞

25% 乌拉坦溶液腹腔注射麻醉小鼠,仰卧位固定,切开腹部,暴露肝脏和门静脉,经门静脉插管,剪开下腔静脉,先用灌注液(D-Hank's + 肝素 100 IU/ml)50 ml 行门静脉灌注,再以灌注液(D-Hank's + 胶原酶 IV 0.163 U/ml)25 ml 灌注。摘取肝脏,剪成小块,加入 5 ml PBS(内含 2 μ g/ml DNA 酶 + 5 mmol/L EDTA + 0.163 U/ml 胶原酶 IV)孵育 1 h,经 300 目钢网轻轻碾碎、过滤,破除红细胞,PBS 洗涤 2 次,然后加入 40% Percoll(含肝素 100 IU/ml),充分混匀,轻柔铺于 70% Percoll 之上,750 \times g 离心 20 min,收集界面细胞,10 ml PBS 洗涤 2 次,预冷的 PBS 重悬即为肝脏浸润单个核细胞。收集细胞,用预冷的流式 PBS 洗涤 1 次,流式 PBS 100 μ l 重悬,加入大鼠血清封闭,加入相应的荧光素标记的抗体或者对应的同型对照抗体,终质量浓度为 1 μ g/ml,混匀后 4 $^{\circ}$ C 静置 30 min。然后加入 500 μ l 流式 PBS,洗涤 2 次,最后用 200 μ l 流式 PBS 重悬,LSR II 流式细胞仪上样检测,使用流式 FACSDiva 软件进行分析^[12]。

1.5 分离纯化 CD11b⁺ NKT 细胞和 CD11b⁻ NKT 细胞

取经 Poly I:C 诱导的肝损伤模型小鼠(注射 24 h 后),制备肝脏浸润单个核细胞,标记 anti-TCR β FITC、anti-NK1.1 PE 和 anti-CD11b APC,然后用 MoFlo 高速流式分选仪分选 CD11b⁺ NKT 细胞(TCR β + NK1.1 + CD11b⁺)和 CD11b⁻ NKT 细胞(TCR β + NK1.1 + CD11b⁻)。分选得到的细胞经流式分析鉴定纯度大于 97%。

1.6 CD8⁺ T 细胞体外增殖实验

检测抗原非特异性 CD8⁺ T 细胞反应时,磁性分

选纯化正常 C57BL/6 小鼠脾脏内的 CD8⁺ T 细胞作为反应细胞,然后加入 anti-CD3 单抗(10 μg/ml)和 anti-CD28 单抗(2 μg/ml)体外培养 5 d,200 μl 培养基/孔,2 × 10⁵ 个 T 细胞/孔。检测 OVA 抗原特异性 CD8⁺ T 细胞反应时,磁性分选纯化正常 OT-I 小鼠脾脏内的 CD8⁺ T 细胞作为反应细胞,然后加入体外培养的成熟的 DC 和 OVA257-264 抗原肽(2 × 10⁻⁴ mmol/L)体外培养 5 d,200 μl 培养基/孔,2 × 10⁵ 个 T 细胞/孔。为了检测 CD11b⁺ NKT 细胞的功能,在增殖反应系统中加入了纯化的 CD11b⁺ NKT 细胞或者作为对照的 CD11b⁻ NKT 细胞,NKT 细胞与 CD8⁺ T 细胞的比例为 10:1。5 d 后收集细胞,标记 anti-CD8-FITC 抗体和 7-AAD,LSRII 流式细胞仪上样 70 s 计数活的 CD8⁺ T 细胞的数量(标记前加入 1 × 10⁵ 个 PE 标记的珠子作为内参以计算绝对数量^[13])。

1.7 CD8⁺ T 细胞体外杀伤实验

实验分为三组,第一组为常规增殖反应后的 CD8⁺ T 细胞(在增殖反应体系中不加 NKT 细胞),第二组为在增殖反应过程中加了 CD11b⁺ NKT 细胞的 CD8⁺ T 细胞,第三组为在增殖反应过程中加了 CD11b⁻ NKT 细胞的 CD8⁺ T 细胞。纯化不同增殖反应体系中的 CD8⁺ T 细胞,计数后以 5 × 10⁵ 个/孔加入圆底 96 孔板中。以 EG7 细胞为靶细胞,以纯化后的 CD8⁺ T 细胞为杀伤效应细胞,分别以 40:1、20:1、

10:1 和 5:1 的效靶比共培养 6h,然后收集细胞,标记 7-AAD,LSRII 流式仪上样分析。CD8⁻ 7-AAD⁺ 细胞为被杀伤的靶细胞,CD8⁺ T 细胞的杀伤率(%) = CD8⁻ 7-AAD⁺ 细胞/CD8⁻ 细胞 × 100%^[14]。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件,所有实验均至少重复 3 次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Poly I:C 诱导的肝损伤模型小鼠肝脏浸润 CD11b⁺ NKT 细胞比例显著上升

通过经腹腔注射 Poly I:C 制备肝损伤小鼠模型,注射 24 h 后,Poly I:C 组小鼠血清中 ALT 和 AST 含量显著上升(图 1A),而 Control 组(注射 PBS)基本没有变化,说明 Poly I:C 诱导的肝损伤小鼠模型制备成功。然后,提取该模型小鼠的肝脏浸润单个核细胞,用流式细胞术检测 CD11b⁺ NKT 细胞的比例变化,结果(图 1B)显示,注射 Poly I:C 24h 后,肝脏内 CD11b⁺ NKT 细胞占总 NKT 细胞的比例由原来的(12.4 ± 3.6)% 显著上升到了(71.7 ± 5.3)%,与实验预期相符,提示这个新型的 NKT 亚群在肝损伤反应中可能发挥重要的作用。

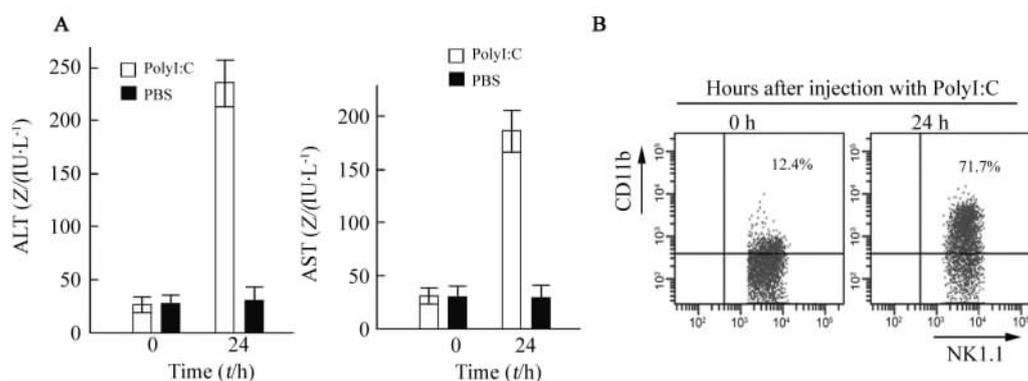


图 1 Poly I:C 诱导的肝损伤模型小鼠肝脏浸润 CD11b⁺ NKT 细胞比例显著上升

Fig. 1 The proportion of liver CD11b⁺ NKT cells in Poly I:C-induced liver injury model mice was significantly increased

A: Serum ALT and AST concentrations in Poly I:C-induced liver injury mice model; B: The data of flow cytometry detection

2.2 CD11b⁺ NKT 细胞分泌细胞因子的能力降低

首先流式分选了 Poly I:C 诱导的肝损伤模型小鼠肝脏内的 CD11b⁺ NKT 细胞和 CD11b⁻ NKT 细胞,在体外分别用 PMA/离子霉素(ionomycin)或者 α-GC 刺激 24 h,收集培养上清,ELISA 法检测结果(图 2)显示,α-GC 的刺激效果要优于 PMA/离子酶

素;不管是用 PMA/离子酶素刺激,还是用 α-GC 刺激,CD11b⁺ NKT 细胞分泌 IFN-γ、IL-4 和 IL-10 的能力显著低于 CD11b⁻ NKT 细胞。提示 CD11b⁺ NKT 细胞可能具有不同于 CD11b⁻ NKT 细胞的较为特殊的功能,而此功能的发挥可能并不依赖于其分泌的细胞因子。

2.3 CD11b⁺ NKT 细胞显著抑制 CD8⁺ T 细胞的增殖反应

通过检测 CD11b⁺ NKT 细胞的功能, 以了解在肝损伤过程中诱导的该群细胞与李斯特菌感染的小鼠肝脏是否也同样具有负反馈的免疫调节功能。首先检测了 CD11b⁺ NKT 细胞对 anti-CD3/CD28 单抗刺激的 CD8⁺ T 细胞抗原非特异性反应的影响, 流式细胞术检测结果(图 3A)显示, CD11b⁺ NKT 细胞能够显著抑制此 CD8⁺ T 细胞反应($P < 0.05$), 而加

入的 CD11b⁻ NKT 细胞对 CD8⁺ T 细胞的增殖反应基本无影响。然后, 检测了这群细胞对抗原特异性 CD8⁺ T 细胞反应是否也有相同的调节作用, 结果(图 3B)显示, 在 OVA 特异性 CD8⁺ T 细胞增殖反应体系中加入 CD11b⁺ NKT 细胞后, CD8⁺ T 细胞反应被显著抑制($P < 0.01$), 而加入 CD11b⁻ NKT 细胞并无此抑制作用。结果说明, CD11b⁺ NKT 细胞能够同时抑制抗原非特异性和 OVA 抗原特异性 CD8⁺ T 细胞反应。

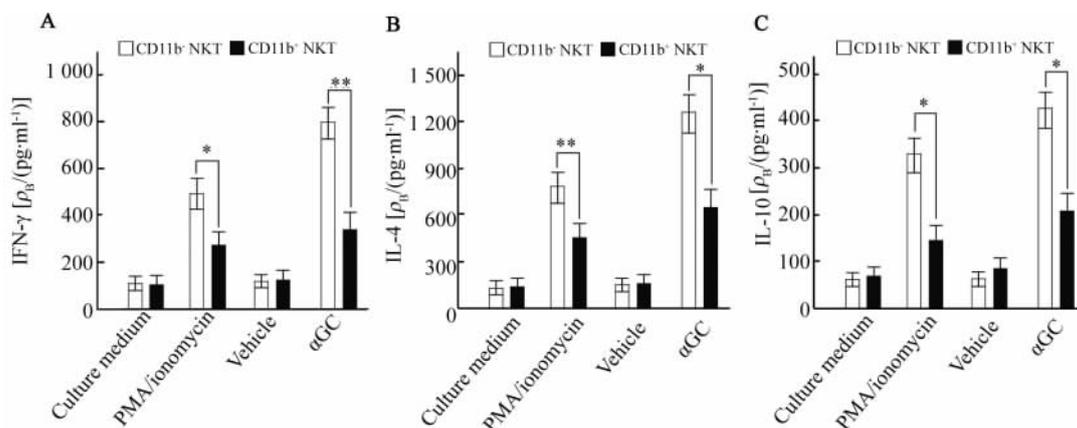


图 2 刺激后 CD11b⁺ NKT 细胞的细胞因子表达能力

Fig. 2 The cytokine production ability of liver CD11b⁺ NKT cells after stimulation

A: IFN- γ production; B: IL-4 production; C: IL-10 production

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 CD11b⁺ NKT 细胞不影响 CD8⁺ T 细胞的杀伤功能

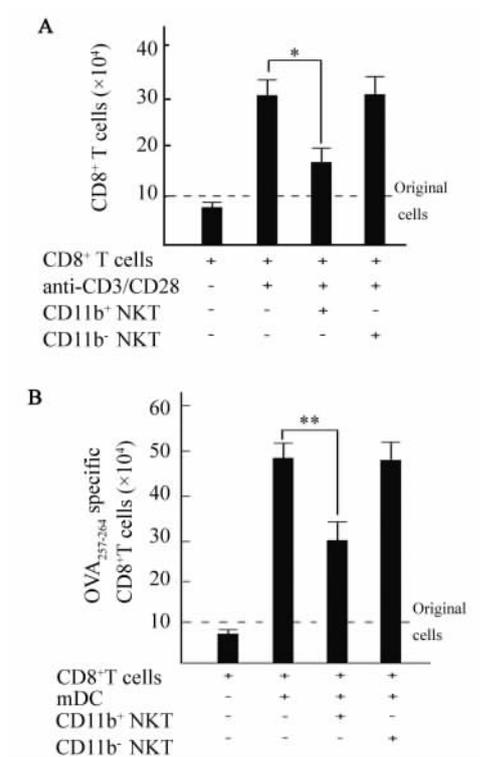
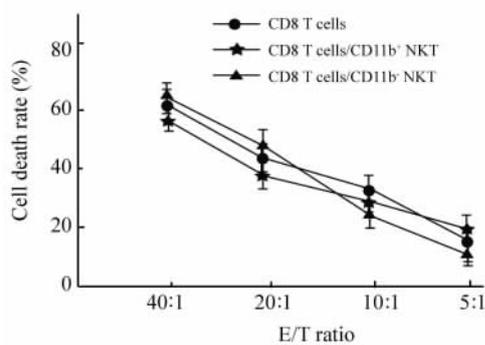
纯化 OVA 特异性 CD8⁺ T 细胞增殖反应 5 d 之后的 CD8⁺ T 细胞, 用于检测了解 CD11b⁺ NKT 细胞在抑制 CD8⁺ T 细胞增殖反应的同时是否也抑制了该细胞的杀伤功能。将纯化后的 CD8⁺ T 细胞与 EG7 靶细胞(转染了 OVA 抗原的 EL4 淋巴瘤细胞株)以不同的效靶比共培养 6 h, 流式细胞术检测 EG7 细胞的死亡率, 以间接反应 CD8⁺ T 细胞的杀伤功能。结果(图 4)显示, 三组 CD8⁺ T 细胞在不同的效靶比时杀伤 EG7 的能力均没有明显差异, 说明 CD11b⁺ NKT 细胞虽然能够抑制 CD8⁺ T 细胞的增殖反应, 但并不影响增殖活化后的 CD8⁺ T 细胞的杀伤能力。

3 讨论

本研究发现, Poly I:C 诱导的肝损伤模型小鼠肝脏内的 CD11b⁺ NKT 细胞亚群的比例显著上升, 提示该细胞亚群在此模型小鼠中可能发挥着重要的

作用。细胞因子表达谱检测发现, 与 CD11b⁻ NKT 细胞相比, CD11b⁺ NKT 细胞分泌 IFN- γ 、IL-4 和 IL-10 的能力均较低, 提示该细胞亚群可能不是通过分泌细胞因子发挥功能的。进一步的功能检测发现, CD11b⁺ NKT 细胞能够显著抑制抗原非特异性的和 OVA 抗原特异性的 CD8⁺ T 细胞增殖反应, 但是并不影响增殖活化后的 CD8⁺ T 细胞杀伤 EG7 靶细胞的功能, 此结果与李斯特菌感染模型中在肝脏中比例上升的 CD11b⁺ NKT 细胞的功能特征^[11]一致。此结果说明, 调节性 CD11b⁺ NKT 细胞亚群并不是李斯特菌感染模型特异的, 而是具有一定的疾病普遍性。CD11b⁺ NKT 细胞分泌细胞因子的能力较低, 也进一步提示 Poly I:C 诱导的 CD11b⁺ NKT 细胞亚群很可能与李斯特菌感染诱导的一样是通过细胞膜表面的膜结合型 TGF- β 起作用的。

免疫学家们早就认识到肝脏不仅是一个免疫器官, 更是一个重要的免疫耐受器官^[15]。肝脏针对自身或者外来抗原的免疫耐受通常是由肝脏内浸润的各种免疫细胞介导的, 这些细胞包括 DC、库普弗

图3 CD11b⁺ NKT 细胞抑制 CD8⁺ T 细胞增殖反应Fig. 3 Liver CD11b⁺ NKT cells inhibited CD8⁺ T cell proliferationA: Antigen-nonspecific CD8⁺ T cell proliferation inhibition;B: OVA-specific CD8⁺ T cell proliferation inhibition* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 图4 CD11b⁺ NKT 细胞不会抑制 CD8⁺ T 细胞的细胞毒性Fig. 4 Liver CD11b⁺ NKT cells did not suppress CD8⁺ T cell cytotoxicity

(Kupffer)细胞、肝星形细胞、肝窦内皮细胞和调节性T细胞等^[16-17]。而NKT细胞在肝脏内的比例相当高,因此推测NKT细胞也可能参与介导肝脏的免疫耐受。的确,研究中发现了在李斯特菌感染模型和Poly I:C诱导肝损伤模型小鼠的肝脏内具有免疫调节功能的CD11b⁺ NKT细胞亚群比例均上升了。

而且,更重要的是,在正常小鼠体内,也存在着一定比例的CD11b⁺ NKT细胞,提示这群细胞在正常生理条件下也很可能参与肝脏免疫耐受的维持。本研究还发现,CD11b⁺ NKT细胞是一群温和的免疫调节细胞,它们能够抑制T细胞的增殖,但是并不影响增殖后T细胞的杀伤功能,提示该群细胞存在的目的并不是完全抑制肝脏内的免疫反应或者炎症反应,而是适当地下调反应的强度,避免过强的反应对自身组织造成损伤。

CD11b是 $\alpha M\beta 2$ 整合素的 αM 亚单位,主要表达于DC、粒细胞、单核巨噬细胞和NK细胞等,CD11b参与了多种生理和病理过程,包括细胞的活化、趋化、细胞毒性、吞噬和炎症性损伤等^[18]。近年来的研究发现,CD11b与免疫调节有关,经常作为调节性免疫细胞的标志分子之一。本室以往研究^[19-21]已发现,肝脏、脾脏或者肺脏的基质环境能够诱导产生新型的高表达CD11b的调节性DC和调节性B细胞,这些细胞能够反馈性地抑制T细胞反应、介导免疫耐受、减弱肝炎或者哮喘的损伤。肿瘤也能够诱导CD11b^{high}Ia^{low}调节性DC,该细胞能够通过表达精氨酸酶I抑制T细胞反应^[22]。而且,研究^[23]还发现,CD11b直接参与了免疫调控信号,在人系统性炎症过程中诱导产生的CD11c^{bright}CD62L^{dim}CD11b^{bright}CD16^{bright}成熟的中性粒细胞亚群直接通过 $\alpha M\beta 2$ 整合素抑制T细胞反应;本实验室^[12]也发现,CD11b能够通过负向调节NK细胞的功能减弱Poly I:C诱导的肝损伤。本研究发现,调节性NKT细胞亚群也表达CD11b,进一步证明了CD11b这一整合素分子与免疫调节的密切相关性,但CD11b这一分子是否直接参与了此调节性NKT细胞亚群的免疫调节功能还有待进一步研究证实。

综上所述,本研究发现了一个新型的表达CD11b的调节性NKT细胞亚群,Poly I:C诱导的小鼠肝损伤模型中该群细胞的比例显著上升了,该群细胞能够显著抑制CD8⁺ T细胞增殖反应,但并不影响增殖活化后的CD8⁺ T细胞的细胞毒性,是一温和的调节性细胞。因此,可以说本研究首次鉴定到了具有特定表型的调节性NKT细胞亚群。

[参考文献]

- [1] Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells [J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25: 297-336.
- [2] Rossjohn J, Pellicci DG, Patel O, et al. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells [J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(12): 845-857.
- [3] Exley MA, Koziel MJ. To be or not to be NKT: Natural killer T

- cells in the liver [J]. *Hepatology*, 2004, 40(5): 1033-1040.
- [4] Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity [J]. *Hepatology*, 2008, 47(2): 729-736.
- [5] Gapin L, Godfrey DI, Rossjohn J. Natural killer T cell obsession with self-antigens [J]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25(2): 168-173.
- [6] Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(3): 197-206.
- [7] Wermeling F, Lind SM, Jordo ED, et al. Invariant NKT cells limit activation of autoreactive CD1d-positive B cells [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(5): 943-952.
- [8] Ly D, Mi QS, Hussain S, et al. Protection from type 1 diabetes by invariant NK T cells requires the activity of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2006, 177(6): 3695-3704.
- [9] Sharif S, Arrenza GA, Zucker P, et al. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes [J]. *Nat Med*, 2001, 7(9): 1057-1062.
- [10] Yang SH, Kim SJ, Kim N, et al. NKT cells inhibit the development of experimental crescentic glomerulonephritis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(9): 1663-1671.
- [11] Han Y, Jiang Z, Gu Y, et al. Pathogen-expanded CD11b⁺ invariant NKT cells feedback inhibit T cell proliferation via membrane-bound TGF- β 1 [J]. *J Autoimmun*, 2014, 53 (In publishing).
- [12] Zhang M, Han Y, Han C, et al. The beta2 integrin CD11b attenuates polyinosinic: Polycytidylic acid-induced hepatitis by negatively regulating natural killer cell functions [J]. *Hepatology*, 2009, 50(5): 1606-1616.
- [13] Han Y, Guo Q, Zhang M, et al. CD69⁺ CD4⁺ CD25⁻ T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF- β 1 [J]. *J Immunol*, 2009, 182(1): 111-120.
- [14] Chen Z, Han Y, Gu Y, et al. CD11c^{high} CD8⁺ regulatory T cell feedback inhibits CD4 T cell immune response via Fas ligand-Fas pathway [J]. *J Immunol*, 2013, 190(12): 6145-6154.
- [15] Crispe IN. The liver as a lymphoid organ [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 147-163.
- [16] Tiegs G, Lohse AW. Immune tolerance: What is unique about the liver [J]. *J Autoimmun*, 2010, 34(1): 1-6.
- [17] Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(11): 753-766.
- [18] Pribila JT, Quale AC, Mueller KL, et al. Integrins and T cell-mediated immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22: 157-180.
- [19] Zhang M, Tang H, Guo Z, et al. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(11): 1124-1133.
- [20] Xia S, Guo Z, Xu X, et al. Hepatic microenvironment programs hematopoietic progenitor differentiation into regulatory dendritic cells, maintaining liver tolerance [J]. *Blood*, 2008, 112(8): 3175-3185.
- [21] Qian L, Qian C, Chen Y, et al. Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19^{hi} Fc γ II b^{hi} regulatory B cells through IFN- β and CD40L [J]. *Blood*, 2012, 120(3): 581-591.
- [22] Liu Q, Zhang C, Sun A, et al. Tumor-educated CD11b^{high} Ia^{low} regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I [J]. *J Immunol*, 2009, 182(10): 6207-6216.
- [23] Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1 [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(1): 327-336.
- [收稿日期] 2014 - 06 - 10 [修回日期] 2014 - 08 - 27
- [本文编辑] 阮芳铭

· 科技动态 ·

乙型肝炎病毒细胞核内 cccDNA 的无肝脏毒性的特异降解机制

全球有超过 3.5 亿慢性乙型肝炎患者, 尽管接种预防性乙型肝炎病毒(hepatitis B vaccine, HBV)疫苗近 30 年, HBV 感染依然是全世界严重的公共卫生问题, 慢性乙型肝炎患者将面临着发展成肝硬化甚或肝癌的高风险。

HBV 是小包膜 DNA 病毒, 通过 RNA 中间体进行复制。核衣壳内的病毒基因组 DNA 由 3.2 kb 局部开环双链 DNA(rcDNA)组成, 入核后形成共价闭合环 DNA(cccDNA)。当前的抗病毒方式可以清除 HBV 病毒颗粒及其颗粒成分, 但不能清除存在于细胞核内的 cccDNA。当停药后, cccDNA 可作为病毒转录模板, 使得 HBV 重新出现并持续存在。因此, cccDNA 的降解与否标志着 HBV 能否被彻底清除。德国慕尼黑工业大学病毒学研究所 Ulrike 教授和 Mathias 教授所领导的国际研究小组发现了一种新机制, 可选择性地破坏及清除肝细胞核中的病毒遗传信息, 并且在此过程中不会伤及宿主细胞基因组。该研究成果发表在 2014 年 2 月出版的 *Science* 上。

论文揭示了无肝脏毒性的 cccDNA 特异降解机制。在 HBV 感染细胞、原代肝细胞和人肝脏活检样品中, IFN- α 和激活淋巴细胞毒素 β 受体(lymphotoxin- β -receptor, LT β R)分别上调了 APOB3A 和 3B 胞苷脱氨酶, 导致胞苷脱氨基、无嘌呤嘧啶位点(AP site)的形成, 最终 cccDNA 降解, 从而阻止了 HBV 再激活。HBV 核心抗原(HbcAg)介导了 APOB3A 对 cccDNA 的作用。这个脱氨基反应具病毒特异性, 未发现对细胞基因组有任何作用。

激活 LT β R 等方式诱导产生的脱氨基作用机制的发现, 提出了一个非常有前景的治疗概念, 结合现有抗病毒药物, 将有望研发出治愈人类乙型肝炎的新疗法。

[王蕾 摘译. Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, et al. *Science* 2014, 343(6176): 1221-1228.]