

固有免疫和适应性免疫与慢性丙肝的研究进展^{*}

王方平,张平安,牛志立 (武汉大学人民医院检验科,武汉 430060)

摘要:固有免疫应答是抵抗病毒入侵的第一道防线,启动后产生一系列的细胞因子如干扰素等发挥作用,6~8周后,适应性免疫应答才被检测到。经过抗原刺激后,活化、增殖的效应细胞如CD4⁺和CD8⁺T细胞、调节性T细胞和自然杀伤细胞,产生效应分子如抗体和细胞因子而发挥作用。虽然有固有免疫和适应性免疫应答机制,大多数丙型肝炎病毒感染者仍不能清除病毒,会发展为慢性持续性感染。该文就固有免疫和适应性免疫在慢性丙型肝炎发病机制中的作用进行综述。

关键词:慢性丙型肝炎;固有免疫;适应性免疫

中图分类号:R392.11;R512.63 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2015)06-006-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.06.002

Studies about Innate and Adaptive Immune Responses on Chronic Hepatitis C

^{*} 作者简介:王方平(1989—),女,在读研究生,主要从事临床免疫学研究。

通讯作者:张平安,E-mail:zhangpingan@aliyun.com。

WANG Fang-ping, ZHANG Ping-an, NIU Zhi-li

(Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: Innate immune responses are the first line of defense against viral infections and after activated it would produce a series of cytokines such as interferon (IFN) to function. 6~8 weeks later, the adaptive immune response can be detected. After being antigen stimulated, the effectors cells are activated and proliferated, such as CD4+ and CD8+ T cells, Regulatory T cell, and generate effector molecules (such as antibodies, cytokines) to function. Although there are innate and adaptive immune responses mechanisms, most HCV-infected patients are still unable to clear the virus and develop viral persistence. In this review, summarize the role of innate immunity and adaptive immunity in chronic hepatitis C pathogenesis.

Keywords: chronic hepatitis C; innate immune; adaptive immune

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 是一种单链 RNA (single strand RNA, ssRNA) 病毒, 是慢性丙型肝炎 (chronic hepatitis C, CHC) 感染的主要原因, 最终可导致肝硬化和肝癌。世界卫生组织 (WHO) 估计全球约有 1.85 亿人感染 HCV^[1]。急性 HCV 感染 (acute HCV infections, AHC) 经常是无症状的^[2], 其中 70%~80% 感染者体内该病毒持续存在并最后发展为慢性感染。大多数 CHC 患者常常伴有一定程度的肝纤维化, 其中一部分患者经过 10~40 年的时间会发展为肝硬化^[2], 只有少数患者能通过 T 细胞介导的抗病毒机制清除 HCV。研究表明, 尽管固有免疫和适应性免疫在 HCV 感染中发挥重要作用, 但 HCV 仍通过建立多种有效的逃避机制来抵抗宿主的免疫反应和干扰素的抗病毒活性。

1 固有免疫与慢性丙型肝炎 在肝细胞中, Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR)、核酸结合寡聚化结构域 NOD 样受体 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor, NLR) 和视黄酸诱导基因 I (retinoic acid-inducible gene I, RIG-I) 是主要的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRR), 能识别 HCV。病毒进入宿主后被 PRRs 识别, 通过激活一系列信号通路, 激发干扰素分泌发挥抗病毒效应。进入胞质的病毒 RNA 结合至 RNA 解旋酶 RIG-1 和黑色素瘤分化抗原 5 (melanoma differentiation-associated gene 5, MDA5) 激发相应信号通路^[3], 通过分子 N 端半胱天冬酶招募结构域 (caspase recruitment domains, CARD) 的适同作用, 招募共同的适配蛋白线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS) 的 CARD 结构域, 进而导致信号复合物在线粒体表面组装, 从而激活干扰素调节因子-3 (interferon regulatory factor 3, IRF-3) 和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B), 活化的 IRF-3 和 NF- κ B 进入细胞核激发 I 型干扰素的分泌^[3]。

干扰素 (interferon, IFN) 家族是病毒感染产生的一种细胞因子, 是连接固有免疫和适应性免疫的桥梁。固有免疫中的抗原提呈细胞如巨噬细胞以及树突状细胞 (dendritic cells, DC) 等均能分泌 I 型干扰素 (包括干扰素- α 和干扰素- β) 和 III 型干扰素 (干扰素- λ 1, 干扰素- λ 2 和干扰素- λ 3), 而 NK 细胞、抗原特异性 T 细胞 (包括 CD4+ Th1 细胞和 CD8+ 细胞毒性 T 淋巴细胞) 能分泌 II 型干扰素 (干扰素- γ)。有报道称, 感染 HCV 原代人肝细胞 (primary human hepatocytes, PHH) 能诱导产生 IFN- λ ^[4]。然而, 也有人提出, 浆细胞样树突细胞是通过与感染肝细胞接触并且受到刺激后产生干扰素, 这是干扰素的主要来源^[5]。I 型和 II 型干扰素在抵御病毒方面至关重要, III 型干扰素作用很有

限, 在呼吸道和胃肠道上皮细胞表面对病毒起防御作用^[6]。干扰素- α 和干扰素- β 通过自分泌和旁分泌的方式与其受体结合并激活 JAK-STAT 信号传导通路从而诱导各种 ISG 表达, 如具有抗病毒效果的蛋白 IFIT1, 以及另一些促进 HCV 体外复制的蛋白 ISG15 和 USP18, 最终起到限制 HCV RNA 在肝脏中复制和传播的作用^[7]。泛素化的特异性肽酶 18 (Ubiquitin-specific protease 18, USP18, 也指定 UBP43) 在 I 型干扰素信号传导中是一个重要的负性调节因子^[8], 能负向调节 JAK-STAT 信号通路。JAK-STAT 信号通路受到细胞因子信号抑制物 (Suppressor of cytokine signaling, SOCS), USP18 和活化 STAT 的转录活性抑制蛋白 (protein inhibitor of activated STAT, PIAS) 等抑制剂的调节。活化的 STAT 可迅速地诱导 SOCS 蛋白的表达, 并提供早期的负反馈环路^[9]。连续用 IFN- α 刺激, 不会影响肝细胞内 USP18 的表达水平^[10], 这说明持续的干扰素治疗不会抑制 JAK-STAT 信号通路。IFN- γ 受体激活 JAK-STAT 途径中的 STAT1 蛋白, 进入到细胞核与干扰素诱导基因 (IFN stimulated gene, ISG) 的 γ 活化序列 (gamma-activated sequence, GAS) 元件结合^[11] 发挥抗病毒作用。I 型和 III 型干扰素还可诱导产生转录因子干扰素刺激因子 3 (IFN stimulated gene factor 3, ISGF3), 它是由 STAT1, STAT2 和 IRF9 组装并结合到干扰素反应元件 (INF-stimulated response element, ISRE) 上发挥作用的^[12]。有关研究表明, IFN λ s 可能最早参与免疫应答, 其与 I 型干扰素共同诱导 ISG 基因的表达^[13]。虽然 I 和 III 型干扰素能够诱导类型相似的 ISG, 但它们是通过两条不同的信号途径诱导的, 即细胞类型特异性途径^[14] 和 IFN λ 等位基因依赖性途径^[15]。尽管 III 型干扰素抗病毒作用有限, 但 IFN- λ 受体 1 在慢性 HCV 感染者中却显著增加^[16]。

在急性丙型肝炎 (acute viral hepatitis C, AHC) 早期阶段会出现病毒载量呈指数增加, 但是随后病毒的复制会得到抑制, 这说明固有免疫系统具有抑制 HCV 的作用。然而, 在感染的细胞中, HCV 能抑制抗病毒效应蛋白的功能或表达, 并且其细胞内高水平的病毒载量和 ISG 共存^[16], 说明干扰素诱导的抗 HCV 作用减弱或病毒发生了逃逸突变^[17]。为了逃避固有免疫, HCV NS3/4A 蛋白酶能够有效地切割和灭活通路中两个重要信号分子即 MAVS 和 TIR 结构域适配子诱导 IFN- β (Toll-IL-1 receptor-domain-containing adaptor-inducing IFN- β , TRIF), 从而抑制机体产生 IFN, 这是造成 HCV 持续感染的重要原因之一。

2 适应性免疫与慢性肝炎 固有免疫在感染后的几个小时到几天内就会产生, 而适应性免疫与此相反, 约 6~8 周

才能被检测到。这种延迟反应可以归因于肝脏环境的耐受性和抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC)通过淋巴液提呈病毒抗原较慢。大多数 HCV 急性感染者产生了针对抗原决定簇,以及非结构蛋白的抗体。但只有一小部分抗体具有抗病毒活性,这些抗体被称为“中和抗体”^[18]。大多数急性感染患者感染早期阶段产生中和抗体,而慢性感染的患者表现出延迟诱导中和抗体的现象^[18]。

众所周知,HCV 的清除与强烈而持续的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞应答相关,T 细胞亚群在控制 HCV 感染中具有重要作用,外周血和肝内病毒特异性 T 细胞应答与 HCV 清除之间存在明显的时间关联。在 HCV 感染机体的过程中,CD4⁺和 CD8⁺T 细胞耗竭对机体清除病毒产生显著影响^[19,20]。实验研究表明,CD4⁺和 CD8⁺T 细胞具有抗感染的作用,一旦其耗尽会导致 HCV 持久存在^[21]。最近另一项研究表明,病毒清除还和 IL-17,IL-21 的产生以及 CD161⁺,CCR6⁺,CD26⁺,CD4⁺T 细胞应答的急剧增加相关^[20],这也证明了 CD4⁺T 细胞应答的重要作用。在感染的早期阶段,特异性 CD8⁺T 细胞并不产生 IFN- γ ,在感染后期才开始分泌 IFN- γ ,并导致病毒滴度的降低和肝损伤的恢复。一项使用能转导出含有 MHC I 类等位基因 HLA-A2 的细胞系的研究表明,CD8⁺T 细胞是主要通过 IFN- γ 发挥抗病毒效应的^[20]。总的来说,这些结果表明,CD4⁺T 细胞是中央调节器,而病毒特异性 CD8⁺T 细胞主要充当关键效应物的作用。另一方面,调节性 T 细胞(Regulatory cell, Treg)被证实在清除 HCV 的免疫系统也起着重要的作用。CHC 感染患者外周血及肝脏内 Treg 数量是健康人的 3 倍,这些 Treg 能以细胞与细胞间直接作用的方式抑制 CD8⁺T 细胞的增殖和 IFN- γ 的分泌^[22]。尽管 Treg 降低了免疫反应的强度,但同时也降低了免疫反应过程中的病理损伤,对肝脏起到了保护作用。

慢性 HCV 感染的一个特点是病毒特异性 CD8⁺T 细胞在功能上受损,它们无法增殖或无法分泌抗病毒细胞因子,如 IFN- γ 。T 细胞耗竭主要是由于抑制性受体的上调,如程序性死亡受体 1(PD-1)和抑制分子 CD127 表达。高表达的 PD-1 易促使细胞凋亡,当 CD127-PD-1 和 HCV 特异性 T 细胞受到抗原刺激时,因 PD-1 靶向抗体被阻断,其增殖反应受损程度更严重^[23]。而且肝脏环境本身也能影响病毒特异性 CD8⁺T 细胞上的抑制性受体的表达^[22]。因此,T 细胞耗竭不是由单一因素介导,而是几种不同的抑制性受体共同作用的结果。同样在急性 HCV 感染期,PD-1 的表达不能预测感染的结局,这表明至少在急性感染,PD-1 更可能是 CD8⁺T 细胞活化的标志物而不是耗竭的标志物^[24]。另外,抑制性 CD4⁺,CD25⁺T 细胞常常出现在慢性 HCV 感染患者体内^[25],它们可能通过细胞与细胞间直接接触抑制 CD8⁺T,从而限制 HCV 进入慢性感染阶段。与 HCV 感染相关的另一类调节性 T 细胞是 CD8⁺效应 T 细胞,它能够表达高水平的 IL-10 并且可在 HCV 感染者肝脏中检出,中和 IL-10 的抗体可以阻断其对病毒特异性 CD8⁺T 细胞的抑制作用^[26]。

T 细胞抗病毒能力下降主要与 T 细胞数量耗竭和病毒突变逃避免疫有关。有报道称在慢性感染患者以及急性感染的患者体内存在病毒逃逸突变^[17]。病毒突变与疾病

的慢性化和病毒清除相关^[27]。实际上病毒逃逸的发生可能是由于 CD4⁺T 辅助细胞减少,或 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)的多样性,或者 CD8⁺T 细胞的功能改变。大多数 CHC 感染患者体内尽管有特异性中和抗体和 T 细胞应答,但 HCV 仍然可以持续存在,这可能与 HCV 通过多种机制导致适应性免疫耐受有关。HCV 通过利用高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)和清道夫受体 B1(scavenger receptor class B member 1, SCARB1)伪装来逃脱中和抗体的作用^[28],病毒抗原决定簇内的变异可能会使其逃避中和抗体和 T 细胞的识别^[28],以及特定的 E2 上的聚糖可通过调节出入胞和病毒间相互交流保护其免受中和抗体的攻击^[28],HCV 可直接通过细胞与细胞间转移病毒来逃避中和抗体等^[29]。

上述研究表明,几种不同的机制共同导致了 HCV 特异性 T 细胞的功能障碍。早期聚乙二醇干扰素能成功治疗急性 HCV 感染期者,并能促进病毒特异性 CD8⁺T 细胞功能的恢复^[30],然而聚乙二醇干扰素治疗慢性 HCV 感染患者效果较差,且不能促进病毒特异性 CD8⁺T 细胞功能的恢复,这提示慢性持续的 HCV 感染加剧了 HCV 特异性 CD8⁺T 细胞的衰竭。

3 结语 有关 HCV 逃避固有免疫和适应性免疫的可能机制报道很多,但对于 HCV 与 TLR3, RIG-1 通路、干扰素信号通路以及 ISG 间相互作用的细节内容仍不清楚。研究 HCV 感染患者体内宿主与病毒相互作用的关系,不仅增强了全球对丙型肝炎发病机制的认识,而且有利于慢性病毒性疾病中固有免疫和适应性免疫机制的研究,深入理解免疫逃避机制和 HCV 持续性慢性感染的分子机制,最终将改善目前乙二醇干扰素联合利巴韦林的治疗效果,更为重要的是为发现和开发新型的治疗途径打下基础,对 HCV 感染免疫过程中各种细胞因子的深入研究,为发现和开发新的病毒感染检测指标提供指导思想,如 PD-1 可能是 CD8⁺T 细胞活化的标志物^[24],未来可作为检测机体固有免疫启动以及免疫功能强弱的标志。同时阐明中和抗体在 HCV 感染早期和中期中的作用,可为疫苗研发和其他领域的研究提供理论基础,比如黄热病病毒和艾滋病病毒疫苗的研究等。

参考文献:

- [1] Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence[J]. Hepatology, 2013, 57(4): 1333-1342.
- [2] Aman W, Mousa S, Shiha G, et al. Current status and future directions in the management of chronic hepatitis C[J]. Virology Journal, 2012(9): 57.
- [3] Yang L, Seki E. Toll-Like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms[J]. Front Physiol, 2012(3): 138.
- [4] Park H, Serti E, Eke O, et al. IL-29 is the dominant type III interferon produced by hepatocytes during acute hepatitis C virus infection[J]. Hepatology, 2012, 56(6): 2060-2070.
- [5] Takahashi K, Asabe S, Wieland S, et al. Plasmacytoid

- dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(16):7431-7436.
- [6] Mordstein M, Neugebauer E, Ditt V, et al. Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections[J]. *J Virol*, 2010, 84(11):5670-5677.
- [7] Gale M, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus[J]. *Nature*, 2005, 436(7053):939-945.
- [8] Ketscher L, Hann BR, Morales DJ, et al. Selective inactivation of USP18 isopeptidase activity in vivo enhances ISG15 conjugation and viral resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(5):1577-1582.
- [9] Colonne PM, Sahni A, Sahni SK. Suppressor of cytokine signalling protein SOCS1 and UBP43 regulate the expression of type I interferon-stimulated genes in human microvascular endothelial cells infected with *Rickettsia conorii*[J]. *J Med Microbiol*, 2013, 62(Pt 7):968-979.
- [10] Sarasin-Filipowicz M, Wang XY, Yan M, et al. Alpha interferon induces long-lasting refractoriness of JAK-STAT signalling in the mouse liver through induction of USP18/UBP43[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(17):4841-4851.
- [11] Qi YF, Huang YX, Wang HY, et al. Elucidating the crosstalk mechanism between IFN- γ and IL-6 via mathematical modelling[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013(14):41.
- [12] Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses[J]. *Annu Rev Immunol*, 2014(32):513-545.
- [13] Thomas E, Gonzalez VD, Li Q, et al. HCV infection induces a unique hepatic innate immune response associated with robust production of type III interferons[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4):978-988.
- [14] McGilvray I, Feld JJ, Chen L, et al. Hepatic cell-type specific gene expression better predicts HCV treatment outcome than IL28B genotype[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(5):1122-1131.
- [15] Sheahan T, Imanaka N, Marukian S, et al. Interferon lambda alleles predict innate antiviral immune responses and hepatitis C virus permissiveness[J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 15(2):190-202.
- [16] Duong FH, Trincucci G, Boldanova T, et al. IFN- λ receptor 1 expression is induced in chronic hepatitis C and correlates with the IFN- λ 3 genotype and with nonresponsiveness to IFN- α therapies[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(5):857-868.
- [17] Cox AL, Mosbrugger T, Lauer GM, et al. Comprehensive analyses of CD8 $^{+}$ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C[J]. *Hepatology*, 2005, 42(1):104-112.
- [18] Wahid A, Dubuisson J. Virus-neutralizing antibodies to hepatitis C virus[J]. *J Viral Hepat*, 2013, 20(6):369-376.
- [19] Neumann-Haefelin C, Thimme R. Adaptive immune responses in hepatitis C virus infection[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 369:243-262.
- [20] Kared H, Fabre T, Bedard N, et al. Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C[J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(6):e1003422.
- [21] Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help[J]. *Science*, 2003, 302(5645):659-662.
- [22] Kroy DC, Ciuffreda D, Cooperrider JH, et al. Liver environment and HCV replication affect human T-cell phenotype and expression of inhibitory receptors[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(2):550-561.
- [23] Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, et al. Up-regulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8 $^{+}$ T cells associated with reversible immune dysfunction[J]. *J Virol*, 2007, 81(17):9249-9258.
- [24] Shin EC, Park SH, Nascimbeni M, et al. The frequency of CD127(+) hepatitis C virus (HCV)-specific T cells but not the expression of exhaustion markers predicts the outcome of acute HCV infection[J]. *J Virol*, 2013, 87(8):4772-4777.
- [25] Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, et al. T cells with a CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8 $^{+}$ T cells during chronic hepatitis C virus infection[J]. *J Virol*, 2005, 79(12):7860-7867.
- [26] Abel M, Sene D, Pol S, et al. Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection[J]. *Hepatology*, 2006, 44(6):1607-1616.
- [27] Honegger JR, Kim S, Price AA, et al. Loss of immune escape mutations during persistent HCV infection in pregnancy enhances replication of vertically transmitted viruses[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11):1529-1533.
- [28] Falkowska E, Kajumo F, Garcia E, et al. Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization[J]. *J Virol*, 2007, 81(15):8072-8079.
- [29] Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, et al. Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission[J]. *J Virol*, 2011, 85(1):596-605.
- [30] Seigel B, Bengsch B, Lohmann V, et al. Factors that determine the antiviral efficacy of HCV-specific CD8(+) T cells ex vivo[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(2):426-436.

收稿日期:2015-06-11

修回日期:2015-06-23