

DOI: 10.13376/j.cbls/2020045

文章编号: 1004-0374(2020)04-0349-10

免疫检查点阻断在逆转慢性结核病T细胞耗竭中的应用

陈珍妍, 胡志东, 范小勇*

(复旦大学附属公共卫生临床中心, 上海 201058)

摘要: 抗原特异性 T 细胞是机体抗感染和抗肿瘤免疫应答的关键因素。持续的抗原刺激可能导致 T 细胞耗竭, 其特征为效应性 T 细胞应答能力变弱、细胞因子分泌能力降低、抑制性受体持续表达和转录状态改变等。现有研究表明, 免疫检查点阻断可逆转肿瘤和 HIV、HBV 等慢性感染过程中的 T 细胞耗竭, 但是其在逆转慢性结核病 T 细胞耗竭中的作用尚不明确。该综述讨论了持续性结核菌感染诱导 T 细胞耗竭的发生机制, 慢性结核菌感染中表达上调的抑制性受体 CTLA-4、PD-1、TIM-3、LAG-3、KLRG1、2B4 和 BTLA 的研究现状, 预防和扭转 T 细胞耗竭状态以增强结核菌控制的策略等。这些研究将对靶向 T 细胞耗竭的结核病免疫治疗有重要提示。

关键词: 慢性结核病; T 细胞耗竭; 免疫检查点阻断; 免疫治疗

中图分类号: R392; R521 **文献标志码:** A

Reversion of T-cell exhaustion in chronic tuberculosis infection by immune checkpoint blockade

CHEN Zhen-Yan, HU Zhi-Dong, FAN Xiao-Yong*

(Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201058, China)

Abstract: Antigen-specific T cells are crucial for the anti-infective and anti-tumor immunity. Persistent antigen stimulation usually results in the exhaustion of T cells, characterized by poor effector function, decreased cytokine-secretion ability, persistent expression of inhibitory receptors, and altered transcriptional status. It has been observed that immune checkpoint blockade can reverse T-cell exhaustion in tumors and chronic infection models such as HIV, HBV, and so on, but its role in reversing chronic tuberculosis (TB) T-cell exhaustion remains unclear. In this review, we discuss the mechanism of T-cell exhaustion induced by persistent TB infection; the research progress of up-regulated inhibitory receptors such as CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3, KLRG1, 2B4 and BTLA in chronic TB infection; as well as strategies for preventing and reversing exhaustion to favor *Mycobacterium tuberculosis* control. These could provide clues on designing immunotherapies targeting T-cell efficacy reinvigoration to protect patients infected with TB.

Key words: chronic tuberculosis; T-cell exhaustion; checkpoint blockade; immunotherapy

据世界卫生组织报告, 2018 年全球范围内结核病 (tuberculosis, TB) 新发病例 1 000 万, 死亡病例 150 万 (其中包括 25.1 万 HIV 感染者)^[1]。尽管在过去几十年取得了重大进展, 但结核病仍然是全世界首屈一指的传染病杀手, 每天夺走 4 500 多人的生命, 尤其是耐多药结核病的出现对公共卫生构成了重大威胁, 并可能导致过去对结核病的控制成果功亏一篑。

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*) 感染人体后很少直接进展为活动性结核病, 它通常保持在潜伏感染状态, 等到“敌”弱“我”强,

收稿日期: 2019-11-14; 修回日期: 2019-12-25

基金项目: “十三五”传染病重大专项(2018ZX10731301, 2018ZX10302301); 国家自然科学基金项目(31771004);

上海市科委项目(19XD1403100, 17ZR1423900)

*通信作者: E-mail: xyfan008@fudan.edu.cn

它会重新激活并快速增殖,破坏宿主免疫系统,这就是结核病可以治愈但难以根除的真正原因。据估计,世界上大约四分之一的人口为潜伏性结核感染者(latent tuberculosis infection, LTBI),5%~15%的感染者在一生中会进展为活动性结核病^[2]。

T细胞在机体抗*Mtb*感染的适应性免疫反应中发挥关键作用。在急性感染或疫苗接种后,初始T细胞被激活并分化成效应性T细胞。在效应子扩增至峰值之后,大多数活化的T细胞死亡,少量持续存在并转变为记忆性T细胞。然而,在慢性感染中,持续的抗原暴露和(或)炎症会显著改变记忆性T细胞的分化程序^[3],导致特异性T细胞进展到一种被称为“细胞衰竭”的状态,通常表现出若干特征,包括T细胞效应子功能的逐级丧失、多种抑制性受体的持续上调和共表达、关键转录因子的表达改变、代谢紊乱以及未能获得抗原非依赖性记忆T细胞稳态反应性。在*Mtb*慢性感染中,CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞都存在类似功能失调状态,抗原暴露时间过长可能会使T细胞终末分化诱导过程失控并导致功能耗竭,从而可能导致*Mtb*增殖失控^[4]。

T细胞激活和耗竭分别代表了*Mtb*感染不同时期的免疫状态,可通过特异性生物标志物的表达来区分。目前迫切需要结核病特异性的生物标志物作为预测感染再激活和预后水平或疫苗诱导免疫保护的指标,亦可通过T细胞激活或耗竭水平的差异而区分潜伏感染与活动性结核病。T细胞耗竭以多种抑制性受体的持续上调为表征,在癌症和慢性传染病中,阻断抑制受体的免疫检查点以增强T细胞的免疫功能近来受到越来越多的关注。本文在综述*Mtb*引起的T细胞耗竭机制的同时,着重关注了慢性结核感染中几种持续上调的抑制性受体(CTLA-4、PD1、TIM-3、LAG-3、KLRG1、2B4、BTLA)的表达,并展望了预防和扭转耗竭状态以促进*Mtb*控制的策略,有望对抗*Mtb*免疫治疗起到一定的提示作用。

1 持续性结核菌感染诱发T细胞耗竭

感染*Mtb*后,免疫反应的触发起始于抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APCs),如树突状细胞(dendritic cells, DCs)和巨噬细胞(macrophages, M ϕ)等对结核菌的识别。通过模式识别受体的识别,APCs成熟与活化,表现为细胞因子分泌、共刺激分子表达上调、分泌杀菌物质(溶血酶、一氧化氮合酶和活性氧自由基等)。装载抗原的APCs迁移

到次级淋巴器官,将抗原呈递给T细胞。虽然Th1细胞和细胞毒性T淋巴细胞介导的免疫反应能够在感染早期一定程度上控制*Mtb*的传播,但*Mtb*却可通过操纵APCs和T细胞逃避宿主免疫杀伤而以潜伏感染形式持续存在或者发展成慢性感染。得益于检测多种细胞因子表达量能直观地展示功能改变情况,结核感染中T细胞耗竭的研究往往从功能入手。持续性感染往往表现为渐进性损失,诸如最早的白细胞介素2(interleukin-2, IL-2)产生和细胞因子多功能性以及增殖能力削弱;随后是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- α)、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)和趋化因子的产生以及脱颗粒能力的缺陷;同时,诱导Th2型细胞因子,如IL-4的分泌。慢性感染期间,随着抗原和(或)荷菌量的增加,T细胞进入功能障碍阶段,以分层方式丧失效应功能和其他特性,其严重程度与增加的抑制性受体表达、高抗原负荷和持续感染时间等相关^[5]。然而,结核感染中T细胞数量的改变或许是表征T细胞耗竭更为直接的证据,却少有人关注。近期,一项临床队列研究展示了*Mtb*感染不同时期(潜伏期和活动期)外周淋巴细胞的数量变化情况,这对T细胞在不同功能状态的耗竭程度有提示作用^[6-7]。

在病毒感染或肿瘤发展过程中,CD8⁺T细胞的耗竭是一种被广泛接受的现象。然而,2015年的一项研究表明,CD4⁺T细胞也可能耗竭^[8]。在许多慢性病毒感染期间,CD4⁺T细胞在支持CD8⁺T细胞应答中起重要作用。引起T细胞耗竭的因素分为细胞内在因素和细胞外部因素。内部因素,包括T细胞表面抑制性受体的表达和胞内细胞因子及转录因子的调控;外部因素,包括M2细胞及调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)等调节细胞的调控。研究也发现,更高频率的M2型M ϕ 和Tregs的出现,导致机体对病原体的免疫应答被抑制^[10-11]。固有免疫系统是控制结核感染的第一道防线,适应性免疫中T细胞作为第二道防线,在感染过程中其功能受到来自于固有免疫系统,特别是巨噬细胞的影响和调控。自然杀伤细胞(natural killer cells, NK)可在慢性感染期间促进T细胞衰竭,在感染的早期阶段靶向杀伤活化的CD4⁺T细胞,削弱其辅助功能,从而促进CD8⁺T细胞耗竭的发展^[5]。实际上,T细胞受体(T cell receptor, TCR)信号转导的下游分子NFAT和Sprouty-2也与T细胞衰竭有关^[9]。同时,T细胞上某些抑制性受体对应的配体在巨噬细胞或DCs上表达。分枝杆菌抗原,如 α 晶体蛋白,通过

抑制吞噬溶酶体融合、释放抑制性细胞因子、下调共刺激分子的表达和上调共抑制受体的表达来破坏DCs和T细胞介导的杀菌机制^[12-13]。不同于共刺激分子,共抑制受体通过与其在T细胞上表达的受体

结合,传递负信号来抑制T细胞功能,如程序性细胞死亡蛋白-1(programmed cell death 1,PD-1)/程序性细胞死亡配体1(programmed cell death ligand-1,PD-L1)等(图1)。由此可见,这种里应外合(内部

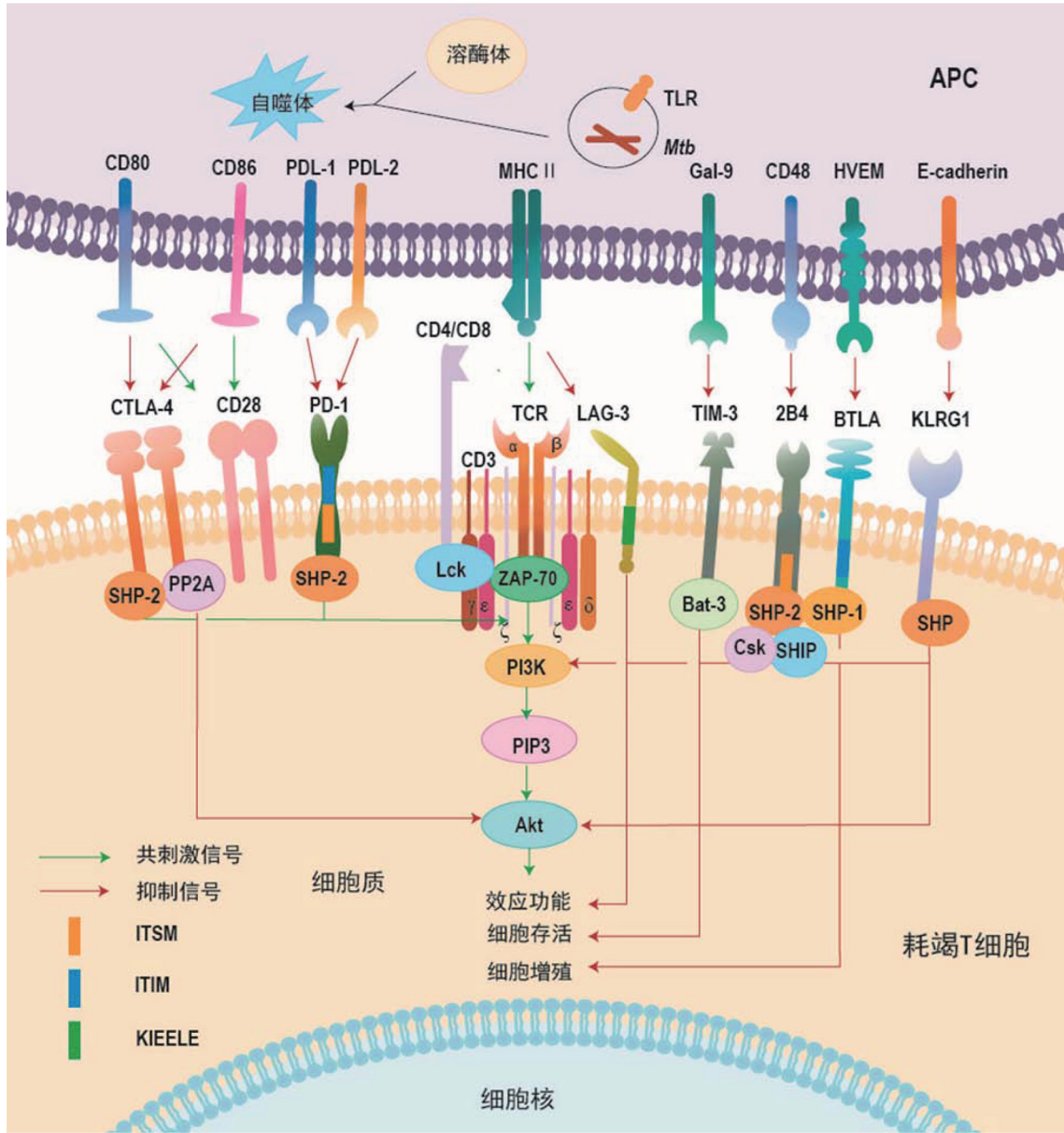


图1描绘了慢性结核感染中持续上调的配体和受体对,展示了促进T细胞耗竭的受体的部分信号通路。以PD-1为例,PD-L1/L2与PD-1的结合募集SHP-2,其通过CD3ζ链去磷酸化抑制TCR信号转导级联抑制了T细胞的存活,增殖和效应功能。缩写:PD-1:程序性细胞死亡蛋白1;PD-L1:程序性死亡配体1;PD-L2:程序性死亡配体2;CTLA-4:细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4;KLRG1:共抑制性受体杀伤细胞凝集素样受体G1;TIM-3:T细胞免疫球蛋白黏液素3;LAG-3:淋巴细胞活化基因3;BTLA:B和T-淋巴细胞衰减剂;HVEM:疱疹病毒进入介质;MHC:主要组织相容性复合体;TCR:T细胞受体;E-cadherin:钙黏蛋白;PI3K:磷酸肌醇3-激酶;PIP3:磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸;PP2A:蛋白磷酸酶2A;SHP:蛋白酪氨酸磷酸酶;SHIP:含有SH2的肌醇磷酸酶;SHP:含有蛋白酪氨酸磷酸酶的Src同源物;Bat-3:HLA-B关联转录因子3;ZAP-70:ζ链相关蛋白激酶70 kDa;Lck:淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶;Csk:Src羧基端激酶;Akt:丝氨酸/苏氨酸激酶;ITIM:免疫受体酪氨酸抑制基序;ITSM:免疫受体酪氨酸开关基序

图1 慢性结核感染中持续上调的抑制性受体/配体对

因子和其他免疫细胞), 前赴后继(固有免疫和适应性免疫)的奋勇杀敌(*Mtb*)最终导致了T细胞耗竭。

2 慢性结核感染中持续表达上调的抑制性受体

2.1 PD-1

PD-1是抑制效应T细胞功能的分子, 细胞内区域由免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine inhibition motif, ITIM)和免疫受体酪氨酸开关基序(immunoreceptor tyrosine switch motif, ITSM)组成。PD-1与其配体PD-L1和PD-L2的结合可诱导CD8⁺T细胞中的转录因子BATF, 其以抑制T细胞增殖和IFN- γ 分泌的方式反馈信号^[14]。

与健康人群相比, 肺结核患者的CD4⁺和CD8⁺T细胞上PD-1表达上调^[15]。*Mtb*感染促进T细胞上抑制性受体PD-1及其配体PD-L1和PD-L2的上调, 导致IFN- γ 产生水平降低并抑制T细胞脱颗粒^[16]。用抗PD-1抗体或其配体的体外阻断增强了IFN- γ 、IL-2^[17]和IL-17^[15]的分泌, 抑制产生IFN- γ 的T细胞的凋亡, 增强*Mtb*刺激的CD8⁺T细胞脱颗粒。阻断抗体可以抑制PD-1和PD-L1的相互作用, 但同时由于双向信号的作用, 会促进固有免疫细胞的杀菌活性^[18]。矛盾的是, 有研究发现, PD-1^{-/-}小鼠的结核病严重程度高于野生型^[19], 这些动物表现出不可控的细菌增殖和中性粒细胞浸润区域的局灶性坏死。另外, *Mtb*感染的PD-1^{-/-}小鼠的肺和血液中的促炎细胞因子, 尤其是IL-6和IL-17显著增加^[20]。在感染*Mtb*的野生型小鼠中, PD-1^{-/-}CD4⁺T细胞的过继免疫进一步证实了这一信息^[19]。两种不同结果的差异可能是由于采用不同策略靶向PD-1, 与PD-1^{-/-}小鼠模型相比, 使用抗体阻断剂并不能完全消除PD-1的作用。与具有PD-1^{hi}表达的亚群相比, PD-1^{lo}的CD4⁺T细胞被认为具有足够的增殖和清除病原体感染的潜力^[21]。

在慢性感染过程中, 病原体的持续感染往往下调免疫细胞上PD-1的表达, 导致免疫应答过度激活、病理反应增强, 并诱导激活T细胞的死亡, 从而表现为慢性疾病^[22]。调控PD-1信号转导可以恢复宿主T细胞应答, 因此可能具有治疗潜力。PD-1还可以作为生物标志物, 用于在治疗和疫苗研究期间监测结核病患者的宿主免疫力^[17]。但是, 在阻断PD-1的操作中, 如何保证免疫平衡是需要关注的问题, 尤其是近年来报道了多例抗PD-1肿瘤治疗导致结核病复发的病例, 提示PD-1对于结核病控制的复杂性^[23-24]。

2.2 KLRG1

共抑制性受体杀伤细胞凝集素样受体G1(killer lectin-like receptors G1, KLRG1)具有ITIM, 可通过减少钙离子内流来抑制亚优势的阳性T细胞受体信号^[25], 并抑制CD95L介导的细胞裂解和NFAT活化^[26]。与这些抑制作用一致, 在T细胞受体激活过程中, 阻断KLRG1信号转导导致Akt磷酸化和CD8⁺T细胞增殖活性的显著增强^[27]。

KLRG1是病毒感染中CD8⁺T细胞终末分化的标志物。病毒感染会导致抗原特异性CD8⁺T细胞上KLRG1表达水平的迅速上升, 并伴随其细胞因子分泌能力的增强以及细胞增殖活性的降低。*Mtb*感染导致T细胞KLRG1表达水平上升, 随着药物治疗的进行, KLRG1⁺T细胞亚群的比例逐渐降低, 提示KLRG1的表达水平与*Mtb*感染和病程进展相关^[28]。而KLRG1表达缺陷小鼠与野生型小鼠相比, 抵抗*Mtb*感染的能力更强, 提示抑制KLRG1的表达能够增强机体抗*Mtb*感染的免疫保护能力^[29]。小鼠过继实验的研究结果则显示, *Mtb*感染后, 抗原特异性KLRG1⁺PD1⁻CD4⁺T细胞亚群分泌细胞因子IFN- γ 和TNF- α 的能力较强, 但细胞增殖活性较弱, 短暂发挥功能后逐渐凋亡, 提示KLRG1也是机体抗结核免疫过程中一种短期效应性CD4⁺T细胞的终末分化标记; 而抗原特异性KLRG1⁻PD1⁺CD4⁺T细胞亚群虽然分泌细胞因子的能力较弱, 但其增殖能力很强, 并可持续不断地转化为细胞因子分泌能力较强的KLRG1⁺CD4⁺T细胞, 从而保持效应性CD4⁺T细胞数目的稳定, 提示KLRG1⁻至KLRG1⁺的分化对维持机体抗*Mtb*感染免疫杀伤的内稳态非常重要^[30]。对小鼠肺组织的研究结果支持以上观点: *Mtb*感染小鼠后, KLRG1⁺CD4⁺T细胞亚群大多聚集在肺间质循环以行使杀伤效应, 而KLRG1⁻CD4⁺T细胞亚群则主要归巢在肺实质中执行记忆功能^[31]。我们团队之前的研究首次证实了KLRG1在人抗*Mtb*感染免疫中的作用: 与健康人群和非结核肺部疾病患者相比, 活动性结核患者CD4⁺T细胞表面表达KLRG1的比例更高。尽管KLRG1⁺CD4⁺T细胞亚群分泌细胞因子的能力更强, 但这部分细胞更易发生凋亡, 其存在依赖于记忆T细胞对其源源不断的分化。由于该群细胞的生命周期较短, 其大量分化会打破机体的免疫平衡, 而KLRG1通路的阻断则能够在不明显改变细胞生命周期的前提下, 显著提高机体抗*Mtb*感染的免疫应答, 且该效应由Akt信号通路介导。因此, *Mtb*感染导致机体的CD4⁺T

细胞更多地分化为保护效力更弱的 KLRG1⁺T 细胞, 而该信号通路的抑制能够通过 Akt 通路提高机体抗结核菌感染的免疫保护效力^[32]。慢性结核感染期间, T 细胞免疫应答的不足可能与 T 细胞终末分化状态的失控相关。尽管这些表达 KLRG1 的 CD4⁺T 细胞在血液中上调, 但基质黏附可能限制它们进入感染部位。靶向 KLRG1/Akt 信号转导途径可以优化 CD4⁺T 细胞对 *Mtb* 感染的活化状态^[33]。

未来的研究应该描述在 *Mtb* 感染的人中, 表达 PD-1 的 T 细胞是否可能分化成表达 KLRG1 的 T 细胞以及这个过程是否需要抗原再暴露^[4]。此外, Day 等^[34]提出, 在结核病治疗后, 一种失调或受损的记忆成分可能会持续存在, 从而增强宿主对复发性疾病的易感性。

2.3 LAG-3

淋巴细胞活化基因-3 (lymphocyte activation gene-3, LAG-3) 在 T 细胞中激活后瞬时表达并在溶酶体区室内化和降解。在细胞表面, LAG-3 与 TCR-CD3 共同分布, 与 MHC II 结合并通过其细胞质 KIEELE 基序抑制 CD4 依赖性下游信号转导^[35]。

免疫调节蛋白 LAG-3 降低 Th1 型细胞免疫应答。在患有活动性结核病的猕猴肺中, LAG-3 表达显著上调, 并且与荷菌量增加相关, 而 LAG-3 不在潜伏性结核感染的动物肺或非 *Mtb* 细菌感染动物肺中表达^[36]。在体外肉芽肿模型中, LAG-3 通过调节线粒体信号转导来增强宿主吞噬细胞中 *Mtb* 的存活^[37]。阻断 LAG-3 信号转导导致抗原呈递增加, 从而增强 Th1 应答, 尤其是 IFN- γ 的分泌^[38]。

LAG-3 可能比 PD-1 更适合作为检查点抑制剂靶标, 因为阻断后者仅导致效应 T 细胞的活化, 而阻断前者还可额外消除 Tregs 的抑制作用^[37]。因此, 研究 LAG-3 在负向调控结核病免疫反应中所起的作用的理论基础已足够支持更加深入的研究。

2.4 TIM-3

T 细胞免疫球蛋白黏液素 3 (T-cell immunoglobulin and mucin-3, TIM-3) 受转录因子 T-bet 调节, 并在各种 T 细胞亚群上表达, 包括 Th1、CD8⁺T、Tregs、DCs 以及巨噬细胞和单核细胞^[39]。虽然 TIM-3 被认为具有抑制功能, 但它的胞内结构域不含 ITIM 基序。

在 *Mtb* 感染期间, TIM-3 在 CD4⁺T 细胞上表达, 且在 *Mtb* 感染的巨噬细胞上与其配体半乳糖素-9 (galectin-9, Gal-9) 结合诱导 IL-1 β 产生和抑制分枝杆菌生长^[40]。TIM-3 在 CD8⁺T 细胞上的升高表达与

CD8⁺T 细胞的功能缺陷和肺结核的疾病严重程度相关^[41]。在慢性 *Mtb* 感染晚期出现的 TIM-3⁺PD1⁺CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞共表达包括 LAG-3 在内的其他抑制性受体, 产生更多的抑制性细胞因子 (IL-10) 和更少的促炎因子 (IFN- γ 、TNF- β 和 IL-2), 并具有类似于耗竭 T 细胞的体内分子特征^[42]。在慢性感染的小鼠中, 用抗 TIM-3 单抗治疗是针对结核病的有效治疗策略^[42]。此外, 阻断 PD-1 和 CTLA-4/LAG-3/TIM-3 或单独阻断 TIM-3 均能在慢性 *Mtb* 感染期间提高免疫功能^[17,42]。

由此可见, 基于阻断 TIM-3 的 *Mtb* 感染的免疫治疗策略已经被证明, 但是, TIM-3 和其他抑制剂联合使用的最佳方案还需要进一步探讨。

2.5 其他

细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) 通过竞争具有更高亲和力的配体 (CD80/CD86) 来削弱 CD28 介导的免疫反应, 并通过在细胞内结合磷酸酶 PP2A 和 SHP-2 来传递信号。*Mtb* 抗原刺激下, QFT (QuantiFERON-TB Gold) 结果显示表达 CTLA-4⁺CD4⁺T 细胞数量增加, 而抗结核药物治疗后, PPD 特异性 CD4 T 细胞表面 PD-1 和 CTLA-4 表达降低^[43]。有研究发现, 抗 CTLA-4 单克隆抗体能够增强并加速免疫反应^[44]。总的来说, CTLA-4 通过降低 APCs 提呈抗原的能力来抑制 T 细胞的活化, 这些研究对于靶向 CTLA-4 的免疫治疗具有提示作用。

CD244 (也称 2B4) 是信号淋巴细胞活化分子 (SLAM) 免疫细胞受体家族的成员。CD244 尾部的磷酸化 ITSM 可与信号转导淋巴细胞活化分子相关蛋白 (SAP) 结合, 也可募集磷酸酶, 如 SHP-1、SHP-2、SHIP 和抑制性激酶 Csk^[45]。研究发现, 2B4 在低表达时表现出活化功能, 而在高表达时产生抑制信号^[46]。肺结核患者 *Mtb* 抗原特异性 CD4⁺T 细胞的 CD244 表达显著高于潜伏感染个体, 通过交联激活 CD244 信号转导途径可抑制 IFN- γ 产生, 提示 CD244 可能对 *Mtb* 抗原特异性 CD4⁺T 细胞功能起抑制作用^[47]。另外, 与健康对照相比, 活动性 TB 患者的 CD3⁺CD244^{hi} 细胞频率更高^[48]。Rozot 等^[49]发现, PD-1、CD160 和 2B4 在结核患者的 *Mtb* 特异性 CD8⁺T 细胞中很少共表达。关于 2B4 在 T 细胞耗竭方面的研究仍有争议, 我们需要更全面的研究设计来描绘其在 *Mtb* 感染时的功能变化, 以及通过抗体阻断等方法实现免疫平衡。

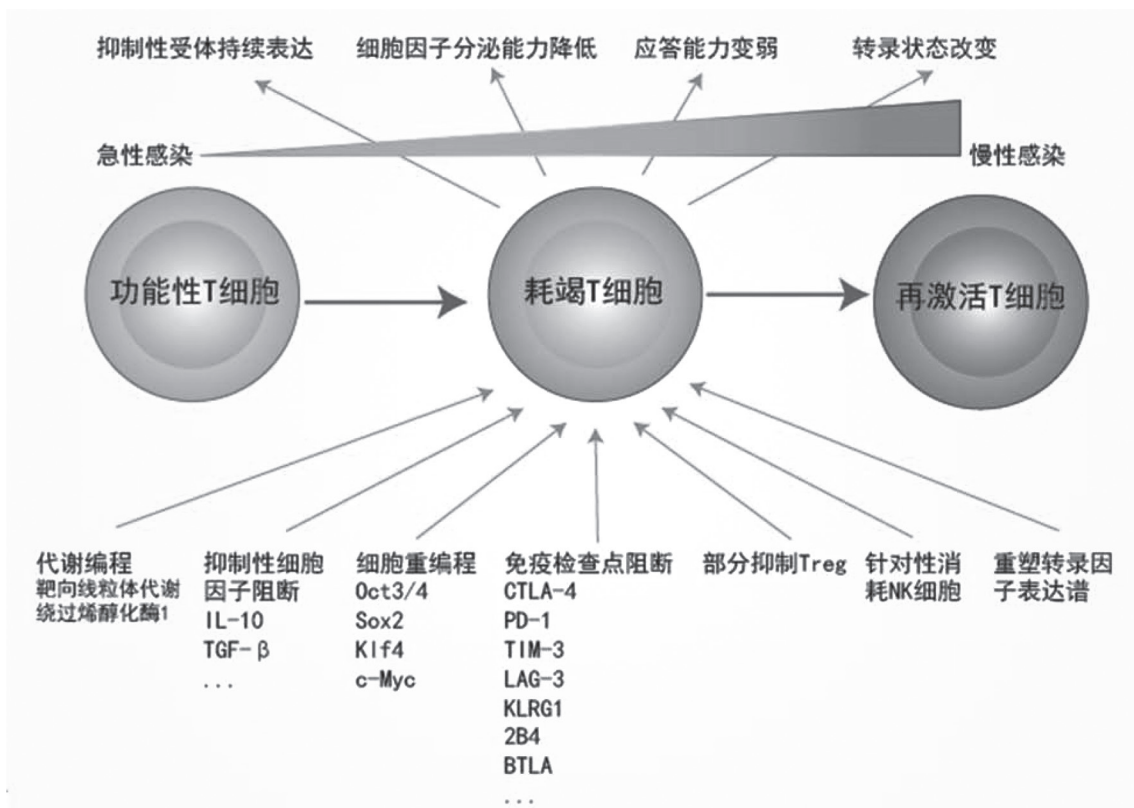
细胞表面蛋白 B 和 T 淋巴细胞弱活化子 (B and T

lymphocyte attenuator, BTLA) 与 PD-1 和 CTLA-4 结构相似, 与 LAG-3 类似, 在与 TCR 共同作用后瞬时上调, 但在保留 PD-1 和 CTLA-4 表达的完全活化的 T 细胞上下调。T 细胞中的 BTLA-HVEM 参与导致保守的细胞内 ITIM 上的酪氨酸磷酸化, 诱导蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP-1 和 SHP-2 的募集, 导致 CD3 诱导的 IL-2 分泌减少和 T 细胞增殖^[51]。BTLA 最早被确定为 T 细胞的抑制受体是由于 BTLA 敲除小鼠的 T 细胞反应增强^[50]。*Mtb* 感染减弱 $\alpha\beta$ T 细胞上的 BTLA 表达, 而抗结核药物处理能诱导 BTLA 表达及细菌清除。表达 BTLA 的 $\alpha\beta$ T 细胞显示出对抗 *Mtb* 感染的中央记忆表型, 表现为更高的增殖能力和细胞因子分泌能力^[52]。表达 BTLA 的 CD11c⁺

APCs 对 T 细胞, 尤其 CD8⁺ T 细胞亚群的刺激能力低, 这可能与活动性结核患者中 HLA-DR 和 IL-6 的下调有关^[53]。BTLA 在 *Mtb* 感染中抑制作用已经被证实, 目前关于 BTLA 阻断再激活 T 细胞的研究尚少, 这可以作为未来研究的方向之一。

3 预防和逆转T细胞耗竭

免疫调节参与 T 细胞耗竭的抑制途径可分为 3 大类: 细胞表面抑制受体 (如 PD-1)、可溶性因子 (如 IL-10) 和免疫调节细胞类型 (如 Tregs 细胞) 等^[54]。我们已知过度的 T 细胞耗竭在机体中产生了诸多不良结果, 本文主要综述细胞表面抑制性受体研究现状及其再激活策略 (图 2)。



T细胞耗竭是一循序渐进的过程, 在慢性感染中尤其明显。逆转T细胞耗竭的策略, 包括免疫检查点阻断、免疫抑制细胞因子阻断、部分抑制调节性T细胞、重塑转录因子表达谱、细胞重编程、针对性消耗NK细胞及代谢编程等。

图2 预防和逆转T细胞耗竭的策略

3.1 免疫检查点阻断

特异性抑制受体被诱导到 T 细胞上, 当 T 细胞与配体结合时传递负信号。如前所述, CTLA-4、PD-1、KLRG1、LAG-3、TIM-3、2B4、BTLA 都是与 T 细胞衰竭相关的抑制受体。作为 T 细胞活性的负调节因子, 这些分子可以防止过度活跃的炎症

和组织损伤。重要的是, 阻断 CTLA-4、PD-1 或 TIM-3 等治疗可能逆转 T 细胞耗竭, 改善 *Mtb* 慢性肉芽肿的 T 细胞反应, 提高 T 细胞生存率; 抑制 *Mtb* 增殖, 提高结核患者免疫功能等。

3.2 免疫抑制细胞因子阻断

除细胞表面抑制受体外, 免疫调节细胞因子也

影响着 T 细胞耗竭。白细胞介素 10 (IL-10) 和转化生长因子 β (TGF- β) 均抑制 Th1 细胞的活化, 相应的细胞因子在活动性 TB 患者中升高, 在治疗期间降低^[55]。在慢性 *Mtb* 感染期间, 可能出现分泌免疫抑制细胞因子 IL-10 的 CD8⁺ T 细胞, 若在 *Mtb* 感染早期抑制 IL-10/TGF- β 途径则可促进 *Mtb* 的清除^[56]。

3.3 部分抑制调节性T细胞

Tregs 是维持免疫耐受性至关重要的细胞, 被认为可抑制针对病原体的有效保护性免疫应答, 阻碍其有效清除^[57]。现已发现 Tregs 表达水平在活动性 TB 中升高^[58], 在治疗期间下降^[59]。Tregs 细胞在体内抑制免疫的机制尚不完全清楚, 尽管 IL-10、TGF- β 和抑制性受体等途径与此有关^[54]。也有研究表明, Tregs 在结核病患者体内的扩增抑制了抗结核免疫功能^[60], 提示 Tregs 细胞的消耗可以更好地控制慢性结核感染。

3.4 T细胞耗竭的代谢编程

研究指出, 代谢不足和营养物质传感信号通路的解除是导致 T 细胞耗竭的原因^[61-62]。其中, 线粒体生物发生对 T 细胞耗竭的影响已经在淋巴细胞性脉络丛脑膜炎 (LCMV)、HIV、HBV 中得到证实^[3]。至关重要, 要考虑线粒体生物发生对 T 细胞耗竭的贡献以及如何在治疗慢性结核感染的同时靶向 T 细胞的线粒体代谢。另外, Gemta 等^[63] 研究发现, T 细胞耗竭或许是因为烯醇化酶 1 水平的下降, 若绕过烯醇化酶 1, 直接给予 T 细胞丙酮酸盐, 细胞的葡萄糖代谢和氧化磷酸化水平将提高, 并且联用免疫检查点抑制剂类的混合制剂后能明显增加活性 T 细胞的水平, 并能有效减缓肿瘤的生长。

3.5 其他

T 细胞耗竭的一个新兴特征是关键转录因子作用过程的改变^[64]。耗竭 T 细胞是否代表着 T 细胞的终末分化状态, 或是仍保持有活性, 并可再度成为功能完善的效应细胞或记忆 T 细胞, 这个问题仍有待于未来进一步明确^[54]。再者, 细胞重编程研究表明, 如果回到胚胎干细胞, 耗竭的 CD8⁺ T 细胞可产生新的幼稚 T 细胞^[65]。虽然这对于证明重编程的概念很重要, 但这种方法在临床上实施可能具有非常大的挑战性。因此, 重要的是明确终末分化的性质及在表观遗传水平上耗竭的 T 细胞可能发生的重编程^[64]。另外, NK 细胞可直接靶向抗病毒的 CD8⁺ T 细胞, 降低其控制感染的能力, 从而也促进其耗竭^[5]。活动性结核病和分枝杆菌刺激导致 NK 细胞上 PD-1 的更高表达, 导致其效应功能受到抑

制^[66], 说明针对性地消耗 NK 细胞可以减少抗感染的 T 细胞反应, 有望逆转 T 细胞耗竭状态。

4 展望

T 细胞识别突变 (表位逃逸突变) 的存在表明, 慢性感染期间 T 细胞反应继续对滞留的病原体施加免疫压力。在这些环境中, (部分) 耗竭可能是机体在控制外来抗原的感染能力和延缓自身免疫病理损伤之间取得的平衡, 所以我们要做的不是过度地逆转耗竭, 而是引导这种“平衡”走向更好的方向^[54]。当同时靶向多种途径以逆转 T 细胞耗竭时, 我们仍缺乏对其协同作用的分子理解。此外, 尚不清楚 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞功能障碍的潜在机制是否在慢性感染期间是相同的。一般来说, CD8⁺ T 细胞功能耗竭方面的研究存在更大的争议。是否可以完全逆转耗竭, 获得高功能、抗原非依赖性的长久 T 细胞记忆, 该核心问题可能与耗竭的效应细胞和记忆 T 细胞之间的谱系关系有关, 也可能与耗竭的 T 细胞反应重新激活后的种群动态有关^[54]。有趣的是, 慢性病毒感染存在表达 PD-1^{lo} 和 PD-1^{hi} 的耗竭 CD8⁺ T 细胞, 不过阻断 PD-1 并不能完全恢复 PD-1^{hi} 的 CD8⁺ T 细胞功能。彻底逆转耗竭可能需要多个因素协同, 同时阻断其他抑制通路可能是充分拯救 PD-1^{hi} CD8⁺ T 细胞免于耗竭的策略之一^[67]。结核菌感染分为潜伏期和活动期, 如前所述, 更多的研究以健康人为对照, 表征了发病状态下的耗竭表型; 也有一部分研究对比了健康人、潜伏感染者和活动性结核患者的耗竭情况^[47,70]。然而, 三者之间是一种进阶式地耗竭, 还是在感染的某一状态耗竭更严重, 这将成为未来探索的方向。

总而言之, T 细胞耗竭在诸多慢性感染模型和肿瘤中的研究已经比较广泛, 不过对于慢性结核感染还有很大的空间等待去描绘。虽然来自传染病临床试验的数据仍然很少, 但这些逆转 T 细胞耗竭的策略在治疗慢性感染方面可能具有巨大的潜力, 尤其是当其与治疗性疫苗联合使用时。广泛探索固有免疫和适应性免疫的其他表面和分泌分子, 对在慢性结核病期间预防或逆转 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞的耗竭意义重大。例如, 可针对活动性结核患者开发新型免疫疗法; 或在活动性疾病患者的密切接触者中通过新疫苗的接种实现对结核病的防护; 此外, 研究 5%~10% 的结核潜伏感染人群是否因为保护性 T 细胞的耗竭而发展为活动性结核等方面都会非常有趣。

[参 考 文 献]

- [1] WHO. 2018 Global Tuberculosis Report[R]. 2019
- [2] WHO. Tuberculosis[R]. 2018
- [3] Saeidi A, Zandi K, Cheok YY, et al. T-cell exhaustion in chronic infections: reversing the state of exhaustion and reinvigorating optimal protective immune responses. *Front Immunol*, 2018, 9: 2569
- [4] Boer MC, van Meijgaarden KE, Goletti D, et al. KLRG1 and PD-1 expression are increased on T-cells following tuberculosis-treatment and identify cells with different proliferative capacities in BCG-vaccinated adults. *Tuberculosis*, 2016, 97: 163-71
- [5] Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology*, 2015, 479-480: 180-93
- [6] Roy Chowdhury R, Vallania F, Yang Q, et al. A multi-cohort study of the immune factors associated with *M. tuberculosis* infection outcomes. *Nature*, 2018, 560: 644-8
- [7] Roy Chowdhury R, Vallania F, Yang Q, et al. Author correction: a multi-cohort study of the immune factors associated with *M. tuberculosis* infection outcomes. *Nature*, 2018, 564: E5
- [8] Chodiseti SB, Gowthaman U, Rai PK, et al. Triggering through Toll-like receptor 2 limits chronically stimulated T-helper type 1 cells from undergoing exhaustion. *J Infect Dis*, 2015, 211: 486-96
- [9] Kurachi M. CD8⁺ T cell exhaustion. *Semin Immunopathol*, 2019, 41: 327-37
- [10] Shafiani S, Dinh C, Ertelt JM, et al. Pathogen-specific Treg cells expand early during *Mycobacterium tuberculosis* infection but are later eliminated in response to interleukin-12. *Immunity*, 2013, 38: 1261-70
- [11] Huang Z, Luo Q, Guo Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-induced polarization of human macrophage orchestrates the formation and development of tuberculous granulomas *in vitro*. *PLoS One*, 2015, 10: e129744
- [12] Siddiqui KF, Amir M, Gurram RK, et al. Latency-associated protein Acr1 impairs dendritic cell maturation and functionality: a possible mechanism of immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, 2014, 209: 1436-45
- [13] Sreejit G, Ahmed A, Parveen N, et al. The ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with β -2-microglobulin (β 2M) affecting antigen presentation function of macrophage. *PLoS Pathogens*, 2014, 10: e1004446
- [14] Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, et al. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8⁺ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med*, 2010, 16: 1147-51
- [15] Bandaru A, Devalraju K P, Paidipally P, et al. Phosphorylated STAT3 and PD-1 regulate IL-17 production and IL-23 receptor expression in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol*, 2014, 44: 2013-24
- [16] Lázár-Molnár E, Chen B, Sweeney KA, et al. Programmed death-1 (PD-1)-deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 13402-7
- [17] Singh A, Mohan A, Dey AB, et al. Inhibiting the programmed death 1 pathway rescues *Mycobacterium tuberculosis*-specific interferon γ -producing T cells from apoptosis in patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*, 2013, 208: 603-15
- [18] Rui Y, Honjo T, Chikuma S. Programmed cell death 1 inhibits inflammatory helper T-cell development through controlling the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 16073-8
- [19] Barber DL, Mayer-Barber KD, Feng CG, et al. CD4 T cells promote rather than control tuberculosis in the absence of PD-1-mediated inhibition. *J Immunol*, 2011, 186: 1598-607
- [20] Chen Y, Wu S, Guo G, et al. Programmed death (PD)-1-deficient mice are extremely sensitive to murine hepatitis virus strain-3 (MHV-3) infection. *PLoS Pathogens*, 2011, 7: e1001347
- [21] Reiley WW, Shafiani S, Wittmer ST, et al. Distinct functions of antigen-specific CD4 T cells during murine *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 19408-13
- [22] Khan N, Vidyarthi A, Amir M, et al. T-cell exhaustion in tuberculosis: pitfalls and prospects. *Crit Rev Microbiol*, 2017, 43: 133-41
- [23] Chu Y, Fang K, Chen H, et al. Pericardial tamponade caused by a hypersensitivity response to tuberculosis reactivation after anti-PD-1 treatment in a patient with advanced pulmonary adenocarcinoma. *J Thoracic Oncol*, 2017, 12: e111-4
- [24] Tanvetyanov T, Gray JE, Antonia SJ. PD-1 checkpoint blockade alone or combined PD-1 and CTLA-4 blockade as immunotherapy for lung cancer? *Expert Opin Biol Therapy*, 2017, 17: 305-12
- [25] Tessmer MS, Fugere C, Stevenaert F, et al. KLRG1 binds cadherins and preferentially associates with SHIP-1. *Int Immunol*, 2007, 19: 391-400
- [26] Rosshart S, Hofmann M, Schweier O, et al. Interaction of KLRG1 with E-cadherin: new functional and structural insights. *Eur J Immunol*, 2008, 38: 3354-64
- [27] Henson SM, Franzese O, Macaulay R, et al. KLRG1 signaling induces defective Akt (ser473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8⁺T cells. *Blood*, 2009, 113: 6619-28
- [28] 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. *Tuberculosis: Edinb*, 2011, 91: 308-13
- [29] Cyktor JC, Carruthers B, Stromberg P, et al. Killer cell lectin-like receptor G1 deficiency significantly enhances survival after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun*, 2013, 81: 1090-9
- [30] Reiley WW, Shafiani S, Wittmer ST, et al. Distinct functions of antigen-specific CD4⁺ T cells during murine *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 19408-13

- [31] Sakai S, Kauffman KD, Schenkel JM, et al. Cutting edge: control of *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subset of lung parenchyma-homing CD4⁺ T cells. *J Immunol*, 2014, 192: 2965-9
- [32] Hu Z, Zhao H, Li C, et al. The role of KLRG1 in human CD4⁺ T-cell immunity against tuberculosis. *J Infect Dis*, 2018, 217: 1491-503
- [33] Hu Z, Lowrie DB, Fan X. Reply to mahla. *J Infect Dis*, 2018, 218: 1348-9
- [34] Day CL, Moshi ND, Abrahams DA, et al. Patients with tuberculosis disease have *Mycobacterium tuberculosis*-Specific CD8⁺ T Cells with a pro-apoptotic phenotype and Impaired proliferative capacity, which is not restored following treatment. *PLoS One*, 2014, 9: e94949
- [35] Workman CJ, Dugger KJ, Vignali DA. Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. *J Immunol*, 2002, 169: 5392-5
- [36] Phillips BL, Mehra S, Ahsan MH, et al. LAG3 expression in active *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Am J Pathol*, 2015, 185: 820-33
- [37] 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. *PLoS One*, 2017, 12: e180413
- [38] Andreae S, Piras F, Burdin N, et al. Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol*, 2002, 168: 3874-80
- [39] Anderson AC, Lord GM, Dardalhon V, et al. T-bet, a Th1 transcription factor regulates the expression of Tim-3. *Eur J Immunol*, 2010, 40: 859-66
- [40] Jayaraman P, Sada-Ovalle I, Nishimura T, et al. IL-1 β promotes antimicrobial immunity in macrophages by regulating TNFR signaling and caspase-3 activation. *J Immunol*, 2013, 190: 4196-204
- [41] 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 Infect*, 2011, 62: 292-300
- [42] Jayaraman P, Jacques MK, Zhu C, et al. TIM3 mediates T cell exhaustion during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *PLoS Pathogens*, 2016, 12: e1005490
- [43] 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. *PLoS One*, 2016, 11: e158262
- [44] Kirman J, McCoy K, Hook S, et al. CTLA-4 blockade enhances the immune response induced by mycobacterial infection but does not lead to increased protection. *Infect Immun*, 1999, 67: 3786-92
- [45] Eissmann P, Beauchamp L, Wooters J, et al. Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood*, 2005, 105: 4722-9
- [46] Chlewicki LK, Velikovskiy CA, Balakrishnan V, et al. Molecular basis of the dual functions of 2B4 (CD244). *J Immunol*, 2008, 180: 8159-67
- [47] Yang B, Wang X, Jiang J, et al. Involvement of CD244 in regulating CD4⁺ T cell immunity in patients with active tuberculosis. *PLoS One*, 2013, 8: e63261
- [48] Yang B, Wang X, Jiang J, et al. Identification of CD244-expressing myeloid-derived suppressor cells in patients with active tuberculosis. *Immunol Lett*, 2014, 158: 66-72
- [49] Rozot V, Vigano S, Mazza-Stalder J, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8⁺ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. *Eur J Immunol*, 2013, 43: 1568-77
- [50] Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol*, 2003, 4: 670-9
- [51] Gonzalez LC, Loyet KM, Calemine-Fenau J, et al. A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 1116-21
- [52] Zeng J, Lin D, Yi L, et al. BTLA exhibits immune memory for $\alpha\beta$ T cells in patients with active pulmonary tuberculosis. *Am J Transl Res*, 2014, 6: 494-506
- [53] Wang W, Gao Y, Lu Y, et al. BTLA-expressing CD11c antigen presenting cells in patients with active tuberculosis exhibit low capacity to stimulate T cell proliferation. *Cell Immunol*, 2017, 311: 28-35
- [54] Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 2011, 12: 492-9
- [55] Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, et al. Depressed T-cell interferon- γ responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J Infect Dis*, 1999, 180: 2069-73
- [56] Feruglio SL, Kvale D, Dyrhol-Riise AM. T cell responses and regulation and the impact of *in vitro* IL-10 and TGF- β modulation during treatment of active tuberculosis. *Scand J Immunol*, 2016, 85: 138-46
- [57] Shafiani S, Tucker-Heard G, Kariyone A, et al. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *J Exp Med*, 2010, 207: 1409-20
- [58] Wergeland I, Assmus J, Dyrhol-Riise AM. T regulatory cells and immune activation in *Mycobacterium tuberculosis* infection and the effect of preventive therapy. *Scand J Immunol*, 2011, 73: 234-42
- [59] Singh A, Dey AB, Mohan A, et al. Foxp3⁺ regulatory T cells among tuberculosis patients: impact on prognosis and restoration of antigen specific IFN- γ producing T cells. *PLoS One*, 2012, 7: e44728
- [60] Chen X, Zhou B, Li M, et al. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. *Clin Immunol*, 2007, 123: 50-9
- [61] Assmann N, Finlay DK. Metabolic regulation of immune responses: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*, 2016, 126: 2031-9
- [62] West EE, Youngblood B, Tan WG, et al. Tight regulation of memory CD8⁺ T cells limits their effectiveness during

- sustained high viral load. *Immunity*, 2011, 35: 285-98
- [63] Gemta LF, Siska PJ, Nelson ME, et al. Impaired enolase 1 glycolytic activity restrains effector functions of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells. *Sci Immunol*, 2019, 4: eaap9520
- [64] Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Res Immunol*, 2015, 15: 486-99
- [65] Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, et al. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 114-26
- [66] Hassan SS, Akram M, King EC, et al. PD-1, PD-L1 and PD-L2 gene expression on T-cells and natural killer cells declines in conjunction with a reduction in PD-1 protein during the intensive phase of tuberculosis Treatment. *PLoS One*, 2015, 10: e137646
- [67] Khan N, Vidyarthi A, Amir M, et al. T-cell exhaustion in tuberculosis: pitfalls and prospects. *Crit Rev Microbiol*, 2017, 43: 133-41
- [68] Boer MC, van Meijgaarden KE, Goletti D, et al. KLRG1 and PD-1 expression are increased on T-cells following tuberculosis-treatment and identify cells with different proliferative capacities in BCG-vaccinated adults. *Tuberculosis (Edinb)*, 2016, 97: 163-71