

肠道树突状细胞的特性及功能研究

张中伟, 秦环龙

张中伟, 秦环龙,

通讯作者:

深入, 肠道内DC的功能及其作用机制已有初步揭示, 本文就此相关内容作一综述.

背景资料
(DC)

摘要

(DC)

DC

: 树突状细胞; 免疫屏障

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2229.asp>

O

肠道免疫屏障包含2方面的内容: (1)对各类致病微生物产生免疫应答, 消除病原体; (2)对肠道内正常定植的共生菌和日常大量食物蛋白产生免疫耐受(oral tolerance). 在这一过程中, 作为体内功能最强的抗原递呈细胞, 树突状细胞(dendritic cell, DC)起到了关键的作用. 肠道内各类抗原主要是经DC传递后, 作用于T, B淋巴细胞, 其产生的效应取决于DC的类型、接受到的信号分子以及局部微环境的影响. 肠道不同组织内DC的表型有很大区别, 但主要是CD11c⁺的DC. 在Peyer's淋巴结(Peyer's patch, PP), 根据是否表达CD11b和CD8 α 可将CD11c⁺表型的DC分为CD11b⁺CD8 α ⁻, CD11b⁻CD8 α ⁺, CD11b⁻CD8 α ⁻和CD11c^{int}CD8 α ⁺B220⁺4组. 而在肠系膜淋巴结(mesenteric lymph nodes, MLN), 除上述4类外, 发现有另外2种DC(CD11b⁺CD4⁺DC和CD4⁺CD8⁺DEC205^{int}). 确定DC的亚群种类对于研究DC的功能至关重要^[1]. 随着近年来研究的

1 DC

DC起源于体内的多能造血干细胞, 正常情况下处于未成熟状态. 当受到外来刺激, 如肿瘤坏死因子(TNF- α)、细菌产物脂多糖(LPS)等影响时, DC发生迁移经外周血循环进入各淋巴组织. DC摄取抗原物质后, 在一系列信号分子如CD40/CD40L, TNF/TNFR, RANK/RANKL等作用下, DC发育成熟并刺激T, B淋巴细胞产生免疫反应. 因此, DC的迁移实际上是其成熟的过程, 且有利于促进免疫系统的发育. 肠道内DC主要定植于PP和MLN, 少量散布于肠道上皮黏膜固有层(lamia propria, LP). 其中, PP是肠道重要的免疫器官, 由大量初始型B淋巴细胞集合及其外周少量T淋巴细胞构成. PP顶部由特殊的上皮细胞覆盖, 能摄取特殊类抗原如细菌, 称为M细胞(microfold cell). PP内DC大部分位于M细胞下方, 呈递抗原并刺激B淋巴细胞分泌IgA或诱导T细胞产生免疫或耐受.

已知DC的迁移是在各类细胞因子及其受体的控制下进行, 因此研究肠道组织内不同DC亚群上信号分子和相应受体的表达具有十分重要的意义. 其中, MIP-3 α (CCL20)是肠道DC重要的趋化因子, 在肠道上皮细胞和PP顶部的滤泡上皮呈高表达, 能诱导表达CCR6的未成熟DC从血循环迁移至肠道组织内. 体外实验已证实, 位于PP内滤泡上皮下方的CD11b⁺DC, 其表面存在CCR6分子, 能受到MIP-3 α 的趋化作用发生迁移. 而在CCR6表达缺陷的大鼠体内, 相应区域的CD11b⁺DC含量明显减少. 因此, MIP-3 α 被认为是控制DC在PP和肠道固有层内定位的主要信号分子^[2]. 最近的研究报道, 用更敏感的荧光技术发现, 即使是CCR6缺陷的大鼠, 在PP的滤泡上皮下方也存在CD11b⁺DC. 进一步研究发现, 这些CD11b⁺DC具有CCL9的趋化活性, CCL9的受体CCR1在CD11b⁺DC上高度表达; 阻断CCL9的活性能减少PP内CD11b⁺DC的数

应用要点
DC

: DC

, DC

量;但是,CCR1缺陷的大鼠并未出现CD11b⁺DC的显著减少.说明CCL9在DC表面可能还有另外的受体或者CCR1存在独立的活性^[3].目前还不清楚是否CD11b⁺DC迁移至PP需要同时表达CCR6和CCR1. MIP-3 β (ELC)能诱导表达CCR7的CD8 α ⁺DC发生迁移,进入PP内的T细胞富集区.同时,DC通过高表达CCR7与MIP-3 β , 6Ckine (SLC)的反应,可从PP迁移进入淋巴管内皮小静脉和输出淋巴结的T细胞富集区.一旦接触到T细胞,成熟DC能接收到另外的成熟信号(如TNFR 家族分子 CD40L, RANKL, 4-1BBL和OX40L)来进一步提高T细胞触发的免疫反应^[4].

通过摄入荧光聚苯乙烯微粒的研究发现,CD11b⁺CD8 α ⁺DC亚群主要存在于PP的圆顶区和滤泡间区,占此处DC数量的大部分^[2].值得注意的是,这些DC并不随着摄入颗粒直接迁移到滤泡间区而是先在PP内滤泡上皮下停留较长的一段时间.只有当大鼠给予外来刺激(如感染沙门菌或给予霍乱毒素)时,DC才迁移至T淋巴细胞区和B细胞滤泡内发育成熟.这说明DC的迁移和成熟除了各类信号分子相互作用外,还需要外来的刺激因素^[4].

2 DC

肠腔内的抗原物质主要经由3条途径吸收:(1)DC途径:肠道DC能直接从上皮细胞之间伸出轴突摄取抗原或细菌;(2)M细胞途径:特殊抗原(如细菌)经由PP顶部的M细胞吸收,传递给PP内的DC,直接激活T淋巴细胞或促使B淋巴细胞分泌IgA;(3)上皮细胞途径:可溶性抗原可直接由肠上皮细胞通过囊泡摄取或经细胞旁途径进入黏膜固有层,进而与T细胞或巨噬细胞反应^[5].

2.1 可溶性抗原主要是指各类食物蛋白经消化后进入肠道内吸收的小分子蛋白质.此类抗原主要经由肠上皮细胞和细胞旁途径吸收.早期的研究已证实,肠道内可溶性抗原的摄取可诱发DC的增殖,从而提高肠道相关淋巴组织参与的免疫耐受^[6],但其机制未阐明.最近, Kunkel *et al*^[7]通过对PP和MLN内DC参与抗原递呈的可视化研究结合流式细胞计数发现,虽然PP内的DC首先递呈肠道来源的可溶性抗原,但是MLN内的初始型T淋巴细胞却优先激活并分组表达;在PP缺陷的大鼠体内,参与可溶性抗原递呈的DC出现的数量和频率与正常大鼠受同等刺激后的表现相似.因此,PP内DC可能并不是诱导免疫耐受所必须,有学者研究认为MLN可能才是真正诱导免疫反应的关键部位.用荧光

标记的抗原鉴定递呈可溶性抗原的DC亚群时发现,标记抗原可出现在外周淋巴结CD8 α ⁺DC和CD8 α ⁺DC上,而在MLN内仅有CD8 α ⁺DC.与此相比,在致免疫应答的条件下,标记抗原仅在外周淋巴结CD8 α ⁺DC上发现^[8].上述研究表明,相同DC亚群可同时在免疫应答和免疫耐受的条件下递呈抗原,但是其应答或耐受功能可能取决于DC的定植部位和组织微环境的影响.

2.2 DC

特殊抗原(细菌及不溶性颗粒)进入肠道黏膜免疫系统一般是通过PP肠腔面特殊的M细胞的吞饮作用来完成.早期研究发现,在PP内DC与M细胞相邻而居.用伤寒沙门氏菌感染肠道黏膜数小时后,即可发现PP内DC与沙门菌共存,表明DC是肠道内细菌类抗原的主要递呈细胞^[9].通过DC吞入荧光聚苯乙烯微粒的实验表明,此类大部分为CD11c⁺CD11b⁺CD8 α ⁺DC,定位于滤泡上皮下区域^[10].除了经由PP内M细胞途径摄取细菌类抗原外,散布于整个肠道LP的DC也可直接与细菌接触.LP内DC可以从肠腔上皮细胞间伸出突触来与细菌接触,与此同时通过表达和调节紧密连接蛋白(如JAM, occluding, claudin, ZO-1等)来维持肠道屏障的完整性,目前认为此机制与DC诱导肠道对共生菌的免疫耐受有关^[11].

鉴别肠道内的致病菌与共生菌是维持肠道稳态的基础条件.目前假设机制是DC利用其表面的Toll样受体(TLR)和C型lectin来辨别两类细菌固有的特征性相关分子,从而将其区分^[12].TLR是细胞表面的跨膜蛋白,能与特定的配体(通常是细菌产物)结合,从而诱导免疫反应.例如TLR4能识别*E.coli*来源的LPS;TLR2主要识别G⁺菌细胞壁成份;TLR5能识别G⁻菌来源的鞭毛素;TLR9可识别细菌DNA内GpG结构^[13].但是,目前还不清楚肠道不同组织内DC亚群表面TLR表达情况及其与各类细菌识别的具体机制.C型lectin能结合糖基抗原,与多种微生物(如病毒、细菌、酵母、寄生虫等)的抗原递呈有关.同时,C型lectin在DC的迁移过程中也起重要作用.目前研究较深入的C型lectin分子如DC-SIGN,他能与血管内皮表面ICAM-2结合促进未成熟DC从血管内渗出;通过与T细胞表面ICAM-3结合即可激活免疫反应^[14].

3 DC

3.1 外来致病菌主要由肠道上皮M细胞吞噬后传递给PP内DC,继而刺激肠道内淋巴

细胞产生免疫反应. 通过刺激DC表面TNFR分子来研究DC诱导的免疫发现, 脾脏来源DC经刺激后可诱导 IL-1, IL-6和IL-12表达增多, 从而激发免疫应答, 但在PP却诱导IL-10复制增多^[4]. 其中, IL-12是一个重要的免疫应激因子. 在体内, T细胞是主要的刺激因素, DC通过CD40与T细胞表面CD40L接触后刺激分泌大量IL-12, 使辅助性T细胞变成Th1细胞, 并诱导NK细胞分泌IFN- γ . 在体外, IL-12与携带抗原成分的DC一起可增强抗原特异性细胞毒性T细胞(CTL)反应.

DC还能对进入上皮内的异位细菌产生免疫抑制, 最近研究发现, IL-23可能起到关键作用, 但机制未阐明. IL-23由2个亚单位构成: IL-23p19和IL-12p40. 用表达荧光素酶的动物实验发现, IL-12p40与IL-23p19在小肠内共同表达, 肠道黏膜固有层CD11⁺CD8⁺CD11b⁺DC也可表达IL-p40^[15]. 在正常定植的肠道内, 肠道黏膜对细菌的免疫并不激烈, 而且这种免疫反应有助于局部免疫系统的发育. 最近研究发现, 肠道内不同部位的DC亚群对同一刺激反应完全不同, 因此DC诱导免疫或耐受, 其结果可能更依赖于局部组织内DC亚群种类以及他们与T细胞的接触^[1].

3.2 肠道黏膜免疫耐受的诱导途径有很多, 涉及一系列的细胞与体液因子参与. 通过对荧光标记的抗原研究及动态分析发现, DC参与免疫耐受的诱导过程, 并存在T淋巴细胞的激活表达. 尽管研究显示, T细胞被激活的部位不同, 但可以肯定免疫耐受的诱导是一个活化的过程, 伴随着抗原反应性T细胞增殖^[16-17]. 目前很难通过实验鉴别诱导免疫耐受的DC亚群. 肠道DC参与的免疫耐受机制包括功能性T细胞不应/缺失、诱导调节性T细胞分泌TGF- β (Th3细胞)或IL-1(Tr1细胞)产生免疫抑制. 其相关途径包括^[1]: (1)酶和前列腺素(PGE₂)途径: 胸腺起源的CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在CTLA-4-B7和IFN- γ 的诱导下能分泌吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2, 3 dioxygenase, IDO). IDO通过分解色氨酸(细胞增殖必需)来抑制T细胞的免疫调节活性. 同时, IDO也受到IFN- γ 和DC来源的IFN- α 的调节^[18]. PGE₂能增加IL-10的产生而抑制DC的免疫刺激功能; 同时, PGE₂也能减少DC表面白三烯B4(LTB4), IL-12和 MHC II类分子的产生来降低免疫反应. (2)信号途径: DC表面Serrate1分子与外周初始型 CD4⁺T细胞的Notch1结合, 诱导其分化为调节性T细胞, 通过减少IL-2, IFN- γ 的分泌来抑制细胞增殖^[18]. (3)结

合抑制途径: 研究发现, 用异源性不成熟DC反复刺激初始型CD4⁺T细胞能导致T细胞增殖抑制并大量分泌IL-10, 但这种抑制严格依赖于DC与T细胞间的接触. (4)细胞因子途径: DC可分泌IL-10, TGF- β , IFN- α 等分子直接调节T细胞的免疫功能.

在上述机制中, IL-10和TGF- β 是重要的免疫抑制分子, 起到关键作用. 与免疫应答一样, 在免疫耐受过程中不同组织来源的DC对于同一种刺激, 也可表现出不同的功能. 例如, 在PP内CD11c⁺CD11b⁺ DC在CD40L刺激下可特异性分泌IL-10, 而CD11c⁺CD8 α ⁺DC和CD11c⁺CD11b⁺CD8 α ⁺DC则分泌IL-12p70.

4 DC

DC是目前所知机体内功能最强的抗原递呈细胞, 无论是生理或者病理状态下, DC都参与免疫反应的启动和调节过程, 在多种疾病的发生和发展中具有重要作用. 目前认为, 与DC相关的疾病包括自身免疫性疾病、过敏反应、移植排斥、感染、肿瘤等. 肠道内DC由于其特殊的部位和功能, 主要参与肠道炎性疾病、肠道肿瘤、感染、移植排斥反应等的病理过程. 目前认为, DC的功能紊乱是引起肠道炎性疾病如Crohn's病、溃疡性结肠炎等发生的重要病因. 研究发现, 在炎性肠病发生的早期, 转移的T细胞即可引起CD11c⁺DC在LP的聚集, 其中涉及一系列信号分子如OX40/OX40L^[19], B7-H1/程序性死亡-1受体(PD-1)^[20]的结合, 但具体机制还未阐明.

近来, 有关DC与各种肿瘤的临床病理特征及预后的关系和以DC为基础的免疫治疗方面已成为国内外研究的热点, 并且已取得初步成效. 有学者研究发现, DC的数量和肠癌的组织学类型、浸润、转移及分期有关. DC在肠癌组织中与淋巴细胞相伴浸润; 癌周淋巴细胞反应明显者, 癌组织内DC数量明显增多; 肿瘤侵至浆膜或淋巴结转移时, 癌组织内DC数量明显减少; 术后生存时间>5 a者癌组织内DC数量明显多于生存时间<5 a者, 提示癌组织内DC可作为估计预后的一项指标.

当肠道发生感染后, 肠道相应组织内DC的数量明显增多, 同时存在DC表面共刺激分子的高表达. 肠道内DC可将细菌产物递呈T, B细胞, 从而诱导免疫应答, 此为肠道免疫系统的正常反应. 目前临床上小肠移植很难取得成功, 很重要

同行评价

的原因就是移植排斥反应, 相信与肠道内DC密切相关. 而有关外科病理状态下, 肠道DC改变以及引起肠免疫功能的影响鲜有报道.

总之, 肠道内DC可同时诱导免疫应答和耐受, 在肠道免疫屏障的构成中起到决定性作用. 但是, DC及其亚群在肠道免疫系统中的功能受多种因素影响, 包括抗原浓度; T细胞的相互作用; 局部细胞因子、趋化因子或代谢产物; 致病菌产物; 局部组织微环境等. 实际上, 这些因素均参与肠道屏障的构成, 因此, DC的功能及相互影响因素的研究对完善肠道肠屏障功能概念具有重要临床意义.

5

- 1 Bilborough J, Viney JL. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 300-309
- 2 Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3 α , MIP-3 β , and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 2000; 191: 1381-1394
- 3 Zhao X, Sato A, Dela Cruz CS, Linehan M, Luegering A, Kucharzik T, Shirakawa AK, Marquez G, Farber JM, Williams I, Iwasaki A. CCL9 is secreted by the follicle-associated epithelium and recruits dome region Peyer's patch CD11b⁺ dendritic cells. *J Immunol* 2003; 171: 2797-2803
- 4 Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811
- 5 Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 3-12; quiz 13
- 6 Williamson E, O'Malley JM, Viney JL. Visualizing the T-cell response elicited by oral administration of soluble protein antigen. *Immunology* 1999; 97: 565-572
- 7 Kunkel D, Kirchhoff D, Nishikawa S, Radbruch A, Scheffold A. Visualization of peptide presentation following oral application of antigen in normal and Peyer's patches-deficient mice. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1292-1301
- 8 Kobets N, Kennedy K, Garside P. An investigation of the distribution of antigen fed in tolerogenic or immunogenic forms. *Immunol Lett* 2003; 88: 147-155
- 9 Hopkins SA, Niedergang F, Cortesy-Theulaz IE,

Kraehenbuhl JP. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cell Microbiol* 2000; 2: 59-68

- 10 Shreedhar VK, Kelsall BL, Neutra MR. Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches. *Infect Immun* 2003; 71: 504-509
- 11 Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001; 2: 361-367
- 12 Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Interactions of bacterial pathogens with dendritic cells during invasion of mucosal surfaces. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 72-76
- 13 Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675-680
- 14 Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. Microbial-gut interactions in health and disease. Interactions between dendritic cells and bacteria in the regulation of intestinal immunity. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 255-270
- 15 Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, Frick J, Galle PR, Autenrieth I, Neurath MF. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 2003; 112: 693-706
- 16 Gutgemann I, Fahrner AM, Altman JD, Davis MM, Chien YH. Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity* 1998; 8: 667-673
- 17 Sun J, Dirden-Kramer B, Ito K, Ernst PB, Van Houten N. Antigen-specific T cell activation and proliferation during oral tolerance induction. *J Immunol* 1999; 162: 5868-5875
- 18 Hoyne GF, Le Roux I, Corsin-Jimenez M, Tan K, Dunne J, Forsyth LM, Dallman MJ, Owen MJ, Ish-Horowicz D, Lamb JR. Serrate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4(+) T cells. *Int Immunol* 2000; 12: 177-185
- 19 Malmstrom V, Shipton D, Singh B, Al-Shamkhani A, Puklavec MJ, Barclay AN, Powrie F. CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *J Immunol* 2001; 166: 6972-6981
- 20 Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Makita S, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Machida U, Iwai H, Azuma M, Chen L, Watanabe M. Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 2003; 171: 4156-4163