

细胞凋亡在肝移植免疫耐受中的研究进展

冯继峰, 刘 静

冯继峰, 刘静, 厦门大学附属东南医院(中国人民解放军第175医院)普外科 福建省漳州市 363000
福建省青年人才基金资助项目, No. 2006F3147
作者贡献分布: 冯继峰与刘静对此文所作贡献均等; 本综述由冯继峰撰写完成, 刘静审核。
通讯作者: 刘静, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 363000, 福建省漳州市华中路269号, 厦门大学附属东南医院(中国人民解放军第175医院)普外科. ljdoctor@hotmail.com
电话: 0596-2975769
收稿日期: 2009-07-08 修回日期: 2009-09-03
接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-09-28

Recent advances in understanding the role of apoptosis in induction of immune tolerance in liver transplantation

Ji-Feng Feng, Jing Liu

Ji-Feng Feng, Jing Liu, Department of General Surgery, the 175th Hospital of Chinese PLA, Southeast Hospital, Xiamen University, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China
Supported by: the Young Talent Foundation of Fujian Province, No. 2006F3147
Correspondence to: Professor Jing Liu, Department of General Surgery, the 175th Hospital of Chinese PLA, Southeast Hospital, Xiamen University, 269 Huazhong Road, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China. ljdoctor@hotmail.com
Received: 2009-07-08 Revised: 2009-09-03
Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-09-28

Abstract

Apoptosis is a widespread physiological or pathological phenomenon that is of great significance to life process. It plays an important role not only in the development of autoimmune diseases, tumors, aging and degeneration, but also in many pathological processes central to organ transplantation. In recent years, numerous studies have shown that apoptosis may be an important cause of immune tolerance in liver transplantation. In this article, we will review the mechanisms underlying apoptosis-induced immune tolerance in liver transplantation and its clinical significance during the evolution of allogeneic tolerance.

Key Words: Apoptosis; Liver transplantation; Immune tolerance

Feng JF, Liu J. Recent advances in understanding the role of apoptosis in induction of immune tolerance in liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2803-2810

摘要

细胞凋亡是机体内普遍存在的一种生理和病理现象, 在生命过程中具有重要的意义。他不仅在自身免疫性疾病、肿瘤、衰老及变性等过程中起着重要作用, 而且在器官移植领域, 尤其是与移植免疫耐受的诱导密切相关。近年来, 大量的研究表明, 细胞凋亡可能是肝移植免疫耐受的重要原因。本文就细胞凋亡的现象、类型、作用与诱导肝移植免疫耐受形成的发生机制以及临床意义作一综述, 以期对临床肝移植术后免疫耐受的成功产生提供帮助。

关键词: 细胞凋亡; 肝移植; 免疫耐受

冯继峰, 刘静. 细胞凋亡在肝移植免疫耐受中的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2803-2810
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2803.asp>

0 引言

细胞凋亡(apoptosis)也称程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD), 是机体内普遍存在的一种生理和病理现象, 在生命过程中具有重要的意义。细胞凋亡不仅可以清除携带外来抗原的细胞, 也可以消除自身免疫活性细胞。细胞凋亡在许多领域均有十分重要的作用, 尤其在器官移植领域, 尤其是肝移植中的作用研究正成为现代移植免疫学的热点之一。

1 T细胞凋亡

对于机体免疫系统而言, 凋亡或程序性死亡是调节T细胞成熟和免疫平衡的一种关键机制。在机体的免疫反应中, 当宿主遭受的威胁降低后, 就通过凋亡来清除外周T细胞以维持有效的免疫反应; 而中止外周T细胞反应失败, 将导致自身免疫性疾病。有研究表明^[1-3], 外周T细胞凋亡在诱导T细胞耐受和延长移植生物生存方面有重要作用。因此, 对细胞凋亡诱导的调节, 尤其是

背景资料

目前, 肝移植被认为是治疗终末期肝病最有效的措施。但是, 肝移植术后排斥反应是目前肝移植领域面临的重大难题。细胞凋亡在许多领域均有十分重要的作用, 尤其在器官移植, 尤其是肝移植中的作用研究正成为现代移植免疫学的热点之一。

同行评议者
管世鹤, 副教授, 安徽医科大学第一附属医院检验科

研发前沿
目前肝移植面临的问题是如何诱导稳定而持久的免疫耐受, 以及如何确定已形成的免疫耐受, 从细胞凋亡入手将为临床肝移植开拓新的思路。

对于移植激活的T细胞逃避凋亡的机制的研究, 为通过耗竭经移植活化的T细胞来延长移植物的生存提供了潜在的策略。

1.1 T细胞凋亡的类型 T细胞凋亡广义上分为2种类型: 即活化诱导的细胞死亡(activation induced cell death, AICD)和被动性或忽略性细胞死亡(passive cell death, PCD). AICD是指活化的、被反复刺激的T细胞发生凋亡. 最先报道而且最重要的介导因子是Fas, 活化的T细胞被诱导表达Fas分子, 当与表达FasL的细胞接触后便发生细胞凋亡^[4]. 最新研究表明^[5-6], Fas介导的细胞凋亡在控制外周自体激活的T细胞方面起到非常重要的作用. 除此之外, T细胞也能通过肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)家族成员, 如死亡受体(death receptor, DR)3, 4, 5介导而发生凋亡^[7].

PCD指当细胞被抗原刺激进入细胞周期后, 撤去其依赖的细胞因子(如IL-2)而导致Bcl-2家族的抗细胞凋亡分子的快速下调而发生的凋亡. IL-2和大量相关的细胞因子, 无论在体内或体外, 均能促进T细胞的生存. 这一类细胞因子家族之所以能够促进T细胞的生存, 主要与他们各自受体中存在相同的 γ 链有关^[8]. 然而, 在某种意义上自相矛盾的是, IL-2也可能通过细胞周期S期细胞型Fas相关死亡域样IL-1 β 转换酶抑制蛋白(cellular FLICE-like inhibitor protein, c-FLIP)的下调引起T细胞对死亡受体介导的细胞死亡更敏感^[9]. 尽管IL-2原本是一种T细胞生长因子, 但有关IL-2或CD25(IL-2受体 α 链)的研究表明, IL-2在促进对凋亡的敏感性方面起到了某种作用, 进而提高了对自身免疫的易感性^[10-11].

1.2 T细胞凋亡的保护效应 尽管凋亡对于中止免疫反应和维持机体免疫平衡的重要性不言而喻, 但是T细胞保持持久的活力以便有效地行使功能也殊为重要. 细胞内大量特殊的生物学机制, 使T细胞得以避免上述2种细胞死亡的主要方式诱导的凋亡, 从而发挥保护效应.

最具特征性的活化T细胞生存信号很可能是通过大量的共刺激分子与他们在抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)表面上的同源配体相互作用而获得的. CD28是具有最广泛特征性的共刺激分子, CD28在与APC上的同源配体CD80(B7-1)和CD86(B7-2)结合后, 即启动细胞内信号通路, 这些信号与TCR介导的信号协同, 调节大量能促进T细胞生存的蛋白质的活性. 有

研究表明^[12], T细胞之所以暂时能逃避DR诱导的凋亡, 是因为与c-FLIP的高水平的表达有关, 而c-FLIP的表达受到CD28介导的共刺激的调节. 除了维持c-FLIP的表达水平, CD28共刺激尚能短暂地诱导抗凋亡的Bcl-2家族成员的表达, 导致NF- κ B介导的信号激活, 这两者都能促进T细胞的生存^[13].

此外, 对APC上的CD40的刺激, 通过增加APC表面上的CD80和CD86表达, 间接促进T细胞的活化. 对CD40的刺激亦可诱导黏附分子和炎性细胞因子的表达, 参与T细胞的活化, 并可能最终有助于T细胞的存活. 研究表明^[14-15], 几种其他的TNFR超家族成员能直接转导生存信号到活化T细胞, 主要是因为他们能够活化NF- κ B介导的信号, 以及可能诱导抗凋亡的Bcl-2家族成员的表达.

2 细胞凋亡在移植耐受中的作用

2.1 细胞凋亡能够诱导移植免疫耐受 如何能更好地诱导机体对移植产生免疫耐受, 一直是移植学界研究的热点. 虽然对于移植免疫耐受的机制提出了多种学说和理论, 但至今尚无一种理论体系能够系统地解释免疫耐受的所有现象. 近年来, 有关细胞凋亡诱导免疫耐受的研究给我们带来了新的观点和方法: 细胞凋亡可以主动调节免疫系统^[16-18].

为了证实细胞凋亡和移植免疫耐受之间的关系, 研究者们进行了大量的研究工作. Voll *et al*^[19]早在1997年就发现, 在细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激人外周血淋巴细胞反应体系中加入凋亡细胞, 可抑制IL-12, IL-1 β 和TNF- α 的分泌, 促进IL-10的产生, 从而认为细胞凋亡可以诱导耐受产生. Tamada *et al*^[20]报道, 地塞米松(dexamethasone, DEX)能够诱导细胞凋亡, 通过IL-4打破Th1/Th2之间的平衡诱导免疫耐受. Schwarz *et al*^[21]报道, 紫外线能够通过Fas/FasL途径促使细胞凋亡, 从而诱导免疫耐受的产生. Aubin *et al*^[22]进一步研究发现, 紫外线照射能够上调T细胞的表达, 促进抑制性细胞因子IL-4和IL-10的释放, 从而能够诱导移植物的免疫耐受.

2.2 细胞凋亡在移植耐受中的作用 Sayegh *et al*^[23]首先在啮齿目动物模型中发现有协同刺激途径能保护T细胞避免凋亡, 阻断这些途径后成功诱导T细胞耐受和延长移植存活时间, 由此推断T细胞凋亡在移植耐受方面的作用. Li

*et al*进一步研究发现自身依赖性T细胞对凋亡的易感性在外周免疫耐受方面的诱导起到轴心的作用, 对于共刺激信号的阻断能通过各种机制来抑制T细胞反应, 但更深入的研究表明, 同种异体移植时反应性T细胞对凋亡诱导是否敏感对于诱导外周性免疫耐受至关重要^[24-25]。在一个全淋巴照射诱导的肝移植免疫耐受模型中, 发现其免疫耐受的机制主要在于移植物浸润白细胞的凋亡以及在移植物和外周血中调节性T细胞Fox P3(+)CD4(+)CD25(+) Treg增加引起的免疫调节^[26]。最近有研究表明^[27], T细胞具有重要的免疫效应, 打破效应性T细胞和调节性T细胞之间的平衡, 选择性地针对特定的T细胞的共刺激途径, 对于诱导免疫耐受是及其重要的。

此外, 对IL-2缺陷小鼠移植模型的研究也提示, DR介导的凋亡对于诱导移植免疫耐受也起到了某种作用。有研究表明, IL-2缺陷小鼠对共刺激信号的阻断所诱导的免疫耐受能够产生抵抗, 这种抵抗与同种异体抗原介导的T细胞的凋亡机制受损有关^[28]。在IL-2或功能性IL-2受体缺陷型小鼠, T细胞耗竭机制有缺陷, 结果在外周堆积的活化T细胞越来越多, 于是就增加了这种小鼠对自体免疫性疾病的易感性^[29]。Zheng *et al*^[30]进一步研究表明, 源于IL-2基因敲除小鼠的T细胞在体外对Fas介导的细胞凋亡不敏感, 即IL-2除了在功能上作为T细胞的一种生长因子以外, 其在体内的主要作用是使活化T细胞对于Fas介导的凋亡变得更敏感。所有上述这些都说明了细胞凋亡在诱导免疫耐受中的重要作用。

3 细胞凋亡与肝移植免疫耐受

3.1 肝移植特异性免疫耐受现象 众所周知, 肝脏易于诱导免疫耐受。肝脏不仅可以诱导对外来抗原的免疫耐受, 大量研究表明, 肝脏在移植耐受方面也表现了特殊的作用。在一些同种异基因肝移植动物模型中, 受试者可不用任何免疫抑制剂, 而移植物长期存活, 因此肝脏被称为“免疫特惠器官”。然而, 体外试验表明, 肝细胞可以刺激脾细胞产生杀伤性T淋巴细胞。有人认为肝细胞虽可表达MHC-I类抗原, 但肝细胞与肝血窦之间有肝血窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cell, LSEC)和库普弗细胞(Kupffer cell, KC)所阻隔使其难以接触到淋巴细胞。但是无论从抗原提呈能力和细胞数量, 如果没有受到其他某种因素的控制, 这2种细胞本身足以诱发排斥反应^[31-32]。Knolle *et al*^[33]研究认为, 肝脏的

免疫特性与凋亡细胞有关。Shi *et al*^[34]研究发现, 中性粒细胞在体内代谢速度很快, 每天约有 1.4×10^{10} 的中性粒细胞凋亡, 从而需要及时清除, 而肝脏正是清除凋亡中性粒细胞的场所。

3.2 肝移植中存在细胞凋亡现象 研究表明, 肝移植免疫耐受特性与细胞凋亡有关。Krams *et al*^[35]于1995年首次报道大鼠同种肝移植中凋亡细胞数量随时间而增加, 发现细胞凋亡与排斥时的病理学改变, 单核细胞浸润和肝酶升高相一致, 且TGF- β 1表达增加可致细胞凋亡。Qian *et al*^[36]发现移植肝内的供体T细胞于移植后2-4 d即被受体T细胞所替代, 而且浸润至移植肝内的细胞具有强烈的抗供体细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)活性, 但移植后14 d CTL活性降低。Li *et al*^[37]用抗CD25 mAb对受体大鼠进行预处理后显示, 抗CD25 mAb抑制调节性T细胞对肝移植受体大鼠中T细胞的活化, 从而阻止肝移植免疫耐受的产生。认为是通过增加受体的免疫反应, 下调调节性T细胞的表达, 并且降低T细胞的凋亡实现的。

上述研究显示, 在同种肝移植急性或慢性排斥时均有细胞凋亡。Krams *et al*^[38]进一步用RT-PCR发现人正常肝细胞表达大量可溶性Fas, 这种Fas表达也存在于无排斥反应的移植肝细胞中; 但在排斥移植肝活检标本中仅50%表达, 其表达水平在同种异体肝移植患者中也有降低。Yamaguchi *et al*^[39]研究发现, 大鼠同种肝移植发生排斥时受体胸腺皮质的凋亡细胞增多, 受体血清中TNF- β 显著升高。

4 细胞凋亡诱导肝移植耐受的机制

4.1 抑制T细胞的活化 细胞凋亡能够诱导免疫耐受, 其主要机制是细胞凋亡后产生的凋亡细胞可以直接抑制T细胞活化, 从而可以使移植物逃避宿主的攻击。Sun *et al*^[40]以ConA刺激小鼠脾细胞增殖, 观察凋亡细胞预处理后对脾细胞CD69(一种早期T细胞活化标记)表达的影响。结果发现CD69的表达明显下调, 表明凋亡细胞可以主动抑制T细胞的活化, 抑制效果与凋亡细胞种类、凋亡诱导方式无关, 而与凋亡细胞数量密切相关。这种抑制作用缘于细胞凋亡所共有的特异性改变, 凋亡所产生的凋亡细胞快速被APC吞噬, 短时间递呈大量供者MHC抗原; 而凋亡细胞被吞噬后, 不能提供T细胞活化所需要的共刺激因子, 使APC共刺激信号表达被抑制, 抑制了APC的激活, 使相应的T细胞克隆灭能, 从

相关报道

Klugewitz *et al*研究表明Th2细胞能促使IL-4不断表达, 从而诱导免疫耐受的产生。Mariotti *et al*研究表明, 细胞凋亡能够促使Th2细胞分化, 表达IL-4, IL-10, 穿孔素, Fas配体等, 抑制了细胞性免疫应答, 防止急性排斥反应的发生而诱导免疫耐受产生。

创新盘点

本文就近年来细胞凋亡在肝移植免疫耐受中的研究进展进行综述,介绍了细胞凋亡的类型特点,并系统地阐述了细胞凋亡诱导肝移植免疫耐受的机制。

而诱发供体特异性的免疫耐受^[41]。

另一方面,细胞凋亡能促使Th1细胞向Th2细胞转化,而后者则能使相应T细胞无能,从而产生免疫耐受^[42-43]。Klugewitz *et al*^[44]研究CD4⁺ T细胞在免疫耐受中的作用,通过过继转移检测Th1和Th2是诱导免疫反应还是免疫耐受的研究,表明Th1细胞失去分泌细胞因子的能力,而Th2细胞能促使IL-4不断表达,从而诱导免疫耐受的产生。此外, Mariotti *et al*^[45]研究表明,细胞凋亡能够促使Th2细胞分化,表达IL-4, IL-10, 穿孔素, Fas配体等,抑制了细胞性免疫应答,防止急性排斥反应的发生而诱导免疫耐受产生。

4.2 肝脏抗原递呈细胞(liver antigen-presenting cell, LAPC)的作用 APC的功能状态是影响T细胞反应方向的决定性因素。APC在递呈抗原时,如有共刺激信号即发生免疫应答反应,若无共刺激信号或低表达共刺激信号则发生T细胞无能而产生免疫耐受。有研究表明^[46],在IL-10等细胞因子的作用下,APC共刺激信号弱表达并能诱导免疫耐受的产生。凋亡细胞能快速被APC吞噬,凋亡细胞上的MHC抗原将被浓集在APC内,因而能够短时提供大量供者MHC抗原,有效地被递呈;同时,凋亡细胞通过其主动的调节免疫反应的作用,使APC调节细胞因子由TH1型向TH2型转化,形成局部的高浓度,使相应T细胞无能,产生免疫耐受^[47]。此外, Wang *et al*^[43]报道,凋亡细胞造成局部的免疫抑制环境,使受体APC共刺激信号表达被抑制,抑制了APC的激活,使相应的T细胞克隆灭能,从而诱发供体特异性的免疫耐受。

因此, LAPC可以作为着重研究的对象。可以说,在与各种淋巴细胞的接触与协助的过程中, LAPC可能是肝脏内部免疫调节走向的“指挥员”。Kita *et al*^[48]报道,肝脏中占细胞总数70%-80%的肝细胞组成了肝实质,肝脏非实质细胞占20%-30%,组成分别为:淋巴细胞占25%, KC占接近20%, LSEC占50%, 其他还有少量的树突状细胞(dendritic cell, DC)、肝星形细胞、胆管细胞等。因此,了解LAPC有关作用机制,对移植免疫耐受能力具有重要的意义。

4.2.1 凋亡细胞的吞噬: 肝脏是处理凋亡细胞的主要场所,肝脏的微环境对其免疫调节作用至关重要。细胞凋亡在移植免疫耐受中的作用主要是凋亡细胞本身产生免疫抑制性细胞因子,或者通过被吞噬细胞吞噬,吞噬了凋亡细胞的吞噬细胞可以分泌免疫抑制性细胞因子,这些

吞噬细胞同时又是APC,其中LSEC和KC对凋亡细胞的吞噬及其对局部免疫调节作用有助于理解肝移植的免疫耐受现象。

LSEC是构成肝窦壁的主要细胞成分,他通过吞噬、呈递和分泌抑制性因子等方式,参与对肝脏内日常抗原免疫原性的处理。LSEC是肝脏独有的APC,表面有丰富的吞噬受体,如清道夫(scavenger)受体,甘露糖(mannose)受体, Toll样受体, Fcγ受体等,可以吞噬肝窦血液中的大分子、病原体,对凋亡细胞也有吞噬作用^[49]。LSEC还能够表达FasL,通过Fas和FasL结合在体外实验中表现出介导淋巴细胞凋亡的能力^[50]。Tokita *et al*^[51]通过对LSEC作用机制继续研究后发现, LSEC能够通过Fas/FasL的方式直接调节T细胞发生免疫耐受。该研究组在经门脉输入供体细胞模型中,又证明了LSEC能够通过对移植抗原的间接识别模式诱导抗原反应性T细胞产生免疫耐受。Ge *et al*^[52]研究对肝移植受体使用抗LSEC抗体,发现肝组织中TGF-β水平显著下降,此处理方法明显增强了免疫排斥反应。Ge *et al*^[32]进一步在肝移植大鼠体内研究LSEC的免疫效应,通过荧光素标记检测后发现,与排斥组相比,在移植耐受组有大量的CD8⁺ T细胞的减少,从而使其诱导免疫耐受的作用更甚于免疫排斥。

KC是肝脏特有的吞噬细胞之一,大约占全身常驻型巨噬细胞总数的80%-90%。有关KC在移植免疫反应中作用的相关研究认为^[53-54], KC通过表达Fas配体,诱导激活的T细胞发生凋亡,而参与肝脏移植耐受的实现。当肝脏本身既作为外来抗原,又作为有潜在免疫调节能力的器官进入机体时,首先面临受体免疫系统的打击,表现为各组成细胞群不同程度的功能受损以及局部强烈炎症症状;其后急性炎症逐渐消失,肝脏各组成细胞群和功能逐渐恢复;最终可能产生免疫调节作用造成免疫耐受,这其中是一个复杂多变的过程。正常水平情况下, KC可以通过吞噬凋亡细胞分泌免疫抑制活性因子,如IL-10, TGF-β, PGE2, PAF等,维持肝内的免疫平衡^[55]。氯化钆(GdCl₃)是KC吞噬阻断剂,研究表明,用氯化钆特异性阻断KC的吞噬作用,则其诱导机体免疫耐受的能力丧失^[56-57]。

4.2.2 抑制DC的成熟: DC是控制免疫反应的决定性因素,作为目前普遍公认的一种专业APC,对凋亡细胞的提呈也具有重要的意义,因为DC是目前唯一确定能激活初始T淋巴细胞转化为

效应和调节性T淋巴细胞的APC, 其活化与成熟作为免疫应答发生的控制环节也受到周围环境的影响和控制^[16]. 当机体受到侵害, 细胞发生变性坏死, 释放“危险信号”, DC被激活分化成熟而发生一系列改变, 细胞膜表面MHC分子表达增多、半衰期延长以及“共刺激信号”表达增多并与相应的T细胞结合产生免疫反应^[58]. 细胞凋亡作为生物体内常见的生物现象, 没有危险信号的释放, DC吞噬凋亡细胞后保持非成熟的稳定安息状态, 即使这些凋亡细胞发生了继发性坏死也不发生活化反应^[59]. 关于DC对于吞噬凋亡细胞所起的作用不尽相同, 一些报道认为DC吞噬凋亡细胞能够诱导免疫耐受^[60], 另一些报道却认为引起免疫应答^[61-62]. Steinman *et al*^[63]则认为, DC提呈凋亡细胞的后果与DC的成熟度有关, 未成熟DC吞噬凋亡细胞后诱导免疫耐受, 成熟DC则诱导免疫应答反应.

未成熟DC含有磷脂酰丝氨酸受体, 非常适合摄取凋亡小体, 被报道在自身抗原转换和自身免疫调节的中起到了关键的作用^[64]. 最近有研究表明, 致耐受性的DC处于未成熟状态, 能增加吡啶胺2, 3-二氧化酶(indoleamine 2, 3-dioxygenase)的表达, 后者能诱导同种异体移植后反应性T细胞凋亡, 能增加CD4(+)CD25(+)CTLA4(+) Treg细胞的数量, 进而能够延长移植物生存时间^[65]. 因此, 由未成熟的DC摄取凋亡细胞所进行的抗原转换通过清除或调节特异性T细胞, 成为一种重要的维持自身免疫耐受的机制.

4.3 分泌抑制性细胞因子 TGF- β 是一种广泛存在、具有免疫抑制作用的淋巴因子, 是由3个异构体构成的家族, 包括TGF- β 1, TGF- β 2和TGF- β 3, 其中对于TGF- β 1的研究较清楚, 他可以从多方面抑制免疫反应, 诱导免疫耐受. Chen *et al*^[66]在体内注射凋亡细胞后, 炎症因子分泌减少炎症反应减轻, 从炎症部位分离的巨噬细胞可分泌TGF- β 1, 而注射活细胞则没有此作用. Huynh *et al*^[67]研究磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)依赖的凋亡细胞发现, 不表达PS的凋亡细胞不能诱导巨噬细胞TGF- β 1的产生, 而转染后则可以诱导TGF- β 1产生, 提示PS介导的吞噬作用对诱导巨噬细胞产生TGF- β 1至关重要. Jiang *et al*^[68]体外实验在凋亡细胞培养液发现TGF- β 1明显增多, 而且注射凋亡细胞能减少移植后炎症因子的表达, 从而增加了TGF- β 1的分泌. 最新研究表明^[69-71], 在体内吞噬凋亡细胞的巨噬细胞比那些吞噬坏死细胞或未处理细

胞能分泌更多的TGF- β 1, 其中主要是吞噬坏死细胞的巨噬细胞能利用短暂的CD40上调更有效提呈抗原给T细胞, 然而那些吞噬了凋亡细胞的巨噬细胞则因为所分泌的抑制性细胞因子的影响而成为“无能”的APC, 从而诱导免疫耐受的产生.

IL-10为目前研究较多的Th2细胞因子. IL-10最初被称为T辅助细胞的细胞因子合成抑制因子, 是巨噬细胞及T细胞来源细胞因子, 具有负向免疫调节作用. IL-10主要通过改变APC的功能而抑制IL-2、IFN- γ 等Th1细胞因子的产生, 还能抑制B7协同刺激分子的配体表达, 抑制MHC-II类抗原及细胞黏附分子的表达, 并抑制巨噬细胞的活性. Byrne *et al*^[72]和Tassioulas *et al*^[73]研究发现, 在LPS中加入凋亡细胞, 吞噬细胞在吞噬凋亡细胞过程中, 可抑制IL-12, IL-1 β 和TNF- α 的分泌, 促进IL-10的产生. 因此认为, IL-10在吞噬凋亡细胞过程中具有重要的作用, 从而诱导免疫耐受的产生. 总之, 一系列有力的证据显示^[74-75], 吞噬凋亡细胞的单核吞噬细胞释放抗炎因子, 包括IL-10和TGF- β 1, 从而诱导免疫耐受的产生.

5 细胞凋亡在肝移植的临床意义

细胞凋亡在诱导肝移植免疫耐受过程中具有十分重要的意义. 在肝移植免疫中, 细胞凋亡发挥双刃剑作用. 当宿主T细胞凋亡, 可诱导免疫耐受的产生; 另一方面, 免疫排斥反应发生时, 移植细胞发生凋亡. 所以可从2方面着手为移植排斥反应防治提供新的策略: (1)预防移植细胞凋亡, 减少移植损伤; (2)促进受体反应性T淋巴细胞凋亡, 诱导移植耐受. 因此, 越来越多的研究者们尝试在肝移植术前通过预输注供体的凋亡细胞来降低移植排斥反应的发生.

Dresske *et al*^[76]在大鼠肝移植模型中研究凋亡细胞对肝移植中的影响, 免疫组织化学显示在移植耐受组有大量的细胞增殖, 肝实质细胞的凋亡在排斥组和耐受组都有发生, 但是只有在耐受组才有大量的上调的FasL的表达, 从而表明凋亡细胞对肝移植免疫耐受的诱导具有重要的作用. Liu *et al*^[77]通过输注供者地塞米松诱导凋亡脾细胞观察对肝移植的影响. 研究表明, 肝移植预输注地塞米松体内诱导的凋亡脾细胞能够诱导受体大鼠对肝移植的免疫耐受; 同期输注凋亡脾细胞则促进受体对肝移植的排斥反应, 认为凋亡细胞未被及时吞噬是引起排斥反

应用要点
本文提示通过细胞凋亡诱导肝移植免疫耐受, 不但具有重要的理论意义, 而且具有重要的临床意义和巨大的社会价值.

同行评价
本文选题明确, 具有一定的创新性, 归纳总结了该领域的某些研究热点问题, 具有一定的借鉴参考价值。

应的重要原因. Nagasaki *et al*^[26]研究全身淋巴照射对大鼠肝移植免疫的影响, 在移植术后进行受体全身淋巴照射, 研究显示可明显延长受体大鼠的存活而没有其他的慢性疾病. 此外, 应用供体来源的单核细胞进行输注也明显延长受体生存, 可使超过70%的受体存活超过100 d而没有慢性排斥反应。

6 结论

细胞凋亡对机体具有重要的免疫调节作用, 其作用过程直接影响到机体对外来抗原的反应如何-发生免疫应答或是产生免疫耐受. 虽然, 对其作用机制的研究中还存在许多疑问, 这一方面体现了肝脏为适应其内部复杂的免疫学变化而进化形成的免疫活动多面性, 另一方面也向我们展示了众多有益的提示和理念, 甚至研究的新方向. 因此, 对细胞凋亡的研究不仅对于移植医学有重要意义, 对于免疫学研究的整体发展都会有重要价值. 随着人们对该领域的不断深入研究, 在器官移植, 尤其是肝移植排斥反应的防治、免疫耐受的诱导等方面前景广阔。

7 参考文献

- Woodside KJ, Hu M, Liu Y, Song W, Hunter GC, Daller JA. Apoptosis of allospecifically activated human helper T cells is blocked by calcineurin inhibition. *Transpl Immunol* 2006; 15: 229-234
- Yolcu ES, Ash S, Kaminitz A, Sagiv Y, Askenasy N, Yarkoni S. Apoptosis as a mechanism of T-regulatory cell homeostasis and suppression. *Immunol Cell Biol* 2008; 86: 650-658
- Agarwal A, Newell KA. The role of positive costimulatory molecules in transplantation and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 366-372
- Carroll HP, Ali S, Kirby JA. Accelerating the induction of Fas-mediated T cell apoptosis: a strategy for transplant tolerance? *Clin Exp Immunol* 2001; 126: 589-597
- Klemke CD, Brenner D, Weiss EM, Schmidt M, Leverkus M, Gülow K, Krammer PH. Lack of T-cell receptor-induced signaling is crucial for CD95 ligand up-regulation and protects cutaneous T-cell lymphoma cells from activation-induced cell death. *Cancer Res* 2009; 69: 4175-4183
- Magerus-Chatinet A, Stolzenberg MC, Loffredo MS, Neven B, Schaffner C, Ducrot N, Arkwright PD, Bader-Meunier B, Barbot J, Blanche S, Casanova JL, Debré M, Ferster A, Fieschi C, Florkin B, Galambrun C, Hermine O, Lambotte O, Solary E, Thomas C, Le Deist F, Picard C, Fischer A, Rieux-Laucat F. FAS-L, IL-10, and double-negative CD4-CD8- TCR alpha/beta+ T cells are reliable markers of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) associated with FAS loss of function. *Blood* 2009; 113: 3027-3030
- Byun HS, Park KA, Won M, Yang KJ, Shin S, Piao L, Kwak JY, Lee ZW, Park J, Seok JH, Liu ZG, Hur GM. Phorbol 12-myristate 13-acetate protects against tumor necrosis factor (TNF)-induced necrotic cell death by modulating the recruitment of TNF receptor 1-associated death domain and receptor-interacting protein into the TNF receptor 1 signaling complex: Implication for the regulatory role of protein kinase C. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1099-1108
- Crawley AM, Katz T, Parato K, Angel JB. IL-2 receptor gamma chain cytokines differentially regulate human CD8+CD127+ and CD8+CD127-T cell division and susceptibility to apoptosis. *Int Immunol* 2009; 21: 29-42
- Kirchhoff S, Müller WW, Krueger A, Schmitz I, Krammer PH. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* 2000; 165: 6293-6300
- Falk M, Ussat S, Reiling N, Wesch D, Kabelitz D, Adam-Klages S. Caspase inhibition blocks human T cell proliferation by suppressing appropriate regulation of IL-2, CD25, and cell cycle-associated proteins. *J Immunol* 2004; 173: 5077-5085
- Inaba H, Geiger TL. Defective cell cycle induction by IL-2 in naive T-cells antigen stimulated in the presence of refractory T-lymphocytes. *Int Immunol* 2006; 18: 1043-1054
- Kirchhoff S, Müller WW, Li-Weber M, Krammer PH. Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2765-2774
- Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacsics M, Tschopp J. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* 2000; 10: 640-648
- Suna S, Sakata Y, Shimizu M, Nakatani D, Usami M, Matsumoto S, Mizuno H, Ozaki K, Takashima S, Takeda H, Tanaka T, Hori M, Sato H. Lymphotoxin-alpha3 mediates monocyte-endothelial interaction by TNFR I/NF-kappaB signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379: 374-378
- Onizawa M, Nagaishi T, Kanai T, Nagano K, Oshima S, Nemoto Y, Yoshioka A, Totsuka T, Okamoto R, Nakamura T, Sakamoto N, Tsuchiya K, Aoki K, Ohya K, Yagita H, Watanabe M. Signaling pathway via TNF-alpha/NF-kappaB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G850-G859
- Li A, Ojogho O, Escher A. Saving death: apoptosis for intervention in transplantation and autoimmunity. *Clin Dev Immunol* 2006; 13: 273-282
- Karrar A, Broomé U, Uzunel M, Qureshi AR, Sumitran-Holgersson S. Human liver sinusoidal endothelial cells induce apoptosis in activated T cells: a role in tolerance induction. *Gut* 2007; 56: 243-252
- Yang XF. Factors regulating apoptosis and homeostasis of CD4+ CD25(high) FOXP3+ regulatory T cells are new therapeutic targets. *Front Biosci* 2008; 13: 1472-1499
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997; 390: 350-351
- Tamada K, Harada M, Abe K, Li T, Nomoto K.

- IL-4-producing NK1.1+ T cells are resistant to glucocorticoid-induced apoptosis: implications for the Th1/Th2 balance. *J Immunol* 1998; 161: 1239-1247
- 21 Schwarz A, Grabbe S, Grosse-Heitmeyer K, Roters B, Riemann H, Luger TA, Trinchieri G, Schwarz T. Ultraviolet light-induced immune tolerance is mediated via the Fas/Fas-ligand system. *J Immunol* 1998; 160: 4262-4270
 - 22 Aubin F, Mousson C. Ultraviolet light-induced regulatory (suppressor) T cells: an approach for promoting induction of operational allograft tolerance? *Transplantation* 2004; 77: S29-S31
 - 23 Sayegh MH, Turka LA. T cell costimulatory pathways: promising novel targets for immunosuppression and tolerance induction. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 1143-1150
 - 24 Li XC, Wells AD, Strom TB, Turka LA. The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 522-527
 - 25 Li XC, Strom TB, Turka LA, Wells AD. T cell death and transplantation tolerance. *Immunity* 2001; 14: 407-416
 - 26 Nagasaki K, Obara H, Xiong A, Kambham N, Strober S, Esquivel CO, Millan MT. Liver allografts are toleragenic in rats conditioned with posttransplant total lymphoid irradiation. *Transplantation* 2007; 84: 619-628
 - 27 Li XC, Rothstein DM, Sayegh MH. Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new developments. *Immunol Rev* 2009; 229: 271-293
 - 28 Dai Z, Konieczny BT, Baddoura FK, Lakkis FG. Impaired alloantigen-mediated T cell apoptosis and failure to induce long-term allograft survival in IL-2-deficient mice. *J Immunol* 1998; 161: 1659-1663
 - 29 Choi Y, Simon-Stoos K, Puck JM. Hypo-active variant of IL-2 and associated decreased T cell activation contribute to impaired apoptosis in autoimmune prone MRL mice. *Eur J Immunol* 2002; 32: 677-685
 - 30 Zheng L, Sharma R, Gaskin F, Fu SM, Ju ST. A novel role of IL-2 in organ-specific autoimmune inflammation beyond regulatory T cell checkpoint: both IL-2 knockout and Fas mutation prolong lifespan of Scurfy mice but by different mechanisms. *J Immunol* 2007; 179: 8035-8041
 - 31 Rentsch M, Puellmann K, Sirek S, Iesalnieks I, Kienle K, Mueller T, Bolder U, Geissler E, Jauch KW, Beham A. Benefit of Kupffer cell modulation with glycine versus Kupffer cell depletion after liver transplantation in the rat: effects on postischemic reperfusion injury, apoptotic cell death graft regeneration and survival. *Transpl Int* 2005; 18: 1079-1089
 - 32 Ge X, Nowak G, Ericzon BG, Sumitran-Holgersson S. Liver sinusoidal endothelial cell function in rejected and spontaneously accepted rat liver allografts. *Transpl Int* 2008; 21: 49-56
 - 33 Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000; 174: 21-34
 - 34 Shi J, Gilbert GE, Kokubo Y, Ohashi T. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood* 2001; 98: 1226-1230
 - 35 Krams SM, Egawa H, Quinn MB, Villanueva JC, Garcia-Kennedy R, Martinez OM. Apoptosis as a mechanism of cell death in liver allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59: 621-625
 - 36 Qian S, Lu L, Fu F, Li Y, Li W, Starzl TE, Fung JJ, Thomson AW. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction. *J Immunol* 1997; 158: 4654-4661
 - 37 Li W, Carper K, Liang Y, Zheng XX, Kuhr CS, Reyes JD, Perkins DL, Thomson AW, Perkins JD. Anti-CD25 mAb administration prevents spontaneous liver transplant tolerance. *Transplant Proc* 2006; 38: 3207-3208
 - 38 Krams SM, Fox CK, Beatty PR, Cao S, Villanueva JC, Esquivel CO, Martinez OM. Human hepatocytes produce an isoform of FAS that inhibits apoptosis. *Transplantation* 1998; 65: 713-721
 - 39 Yamaguchi Y, Okabe K, Miyanari N, Matsumura F, Ichiguchi O, Akizuki E, Matsuda T, Liang J, Ohshiro H, Miyayama Y, Yamada S, Mori K, Ogawa M. Tumor necrosis factor-beta is associated with thymic apoptosis during acute rejection. *Transplantation* 1998; 66: 894-902
 - 40 Sun E, Zhang L, Zeng Y, Ge Q, Zhao M, Gao W. Apoptotic cells actively inhibit the expression of CD69 on Con A activated T lymphocytes. *Scand J Immunol* 2000; 51: 231-236
 - 41 Strauss G, Osen W, Knape I, Jacobsen EM, Müller SM, Debatin KM. Membrane-bound CD95 ligand expressed on human antigen-presenting cells prevents alloantigen-specific T cell response without impairment of viral and third-party T cell immunity. *Cell Death Differ* 2007; 14: 480-488
 - 42 Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Zahorchak AF, Logar AJ, Papworth GD, Wang Z, Watkins SC, Falo LD Jr, Thomson AW. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 2003; 101: 611-620
 - 43 Wang Y, Gao Y, Yuan X, Xia W, Luo Y, Sun E, Chen ZK. The liver mediates apoptotic cell-induced immune regulation. *Scand J Immunol* 2008; 68: 297-305
 - 44 Klugewitz K, Blumenthal-Barby F, Schrage A, Knolle PA, Hamann A, Crispe IN. Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4+ effector cells and suppression of IFN-gamma-producing cells after intravenous protein immunization. *J Immunol* 2002; 169: 2407-2413
 - 45 Mariotti J, Foley J, Jung U, Borenstein T, Kantardzic N, Han S, Hanson JT, Wong E, Buxhoeveden N, Trepel JB, Fojo AT, Telford W, Fowler DH. Ex vivo rapamycin generates apoptosis-resistant donor Th2 cells that persist in vivo and prevent hemopoietic stem cell graft rejection. *J Immunol* 2008; 180: 89-105
 - 46 André S, Tough DF, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. Surveillance of antigen-presenting cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. *Am J Pathol* 2009; 174: 1575-1587
 - 47 Umeshappa CS, Huang H, Xie Y, Wei Y, Mulligan SJ, Deng Y, Xiang J. CD4+ Th-APC with acquired peptide/MHC class I and II complexes stimulate type 1 helper CD4+ and central memory CD8+ T cell responses. *J Immunol* 2009; 182: 193-206
 - 48 Kita H, Mackay IR, Van De Water J, Gershwin ME. The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology* 2001; 120: 1485-1501
 - 49 Dini L, Carla EC. Hepatic sinusoidal endothelium

- heterogeneity with respect to the recognition of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 1998; 240: 388-393
- 50 Müschen M, Warskulat U, Douillard P, Gilbert E, Häussinger D. Regulation of CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand expression by lipopolysaccharide and dexamethasone in parenchymal and nonparenchymal rat liver cells. *Hepatology* 1998; 27: 200-208
- 51 Tokita D, Ohdan H, Onoe T, Hara H, Tanaka Y, Asahara T. Liver sinusoidal endothelial cells contribute to alloreactive T-cell tolerance induced by portal venous injection of donor splenocytes. *Transpl Int* 2005; 18: 237-245
- 52 Ge X, Karrar A, Ericzon BG, Broomé U, Sumitran-Holgersson S. Antibodies to liver sinusoidal endothelial cells modulate immune responses in liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3335-3337
- 53 Sun Z, Wada T, Maemura K, Uchikura K, Hoshino S, Diehl AM, Klein AS. Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Transpl* 2003; 9: 489-497
- 54 Sun Z, Wada T, Hoshino S, Uchikura K, Klein AS. Immunomodulatory Role of Kupffer Cell in Liver Allografts. *Comp Hepatol* 2004; 3 Suppl 1: S32
- 55 Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998; 101: 890-898
- 56 von Frankenberg M, Golling M, Mehrabi A, Nentwich H, Klar E, Kraus TW. Donor pretreatment with gadolinium chloride improves early graft function and survival after porcine liver transplantation. *Transpl Int* 2003; 16: 806-813
- 57 Zhu H, Marco C, Gianfranco F. Early changes of graft function, cytokines and superoxide dismutase serum levels after donor liver denervation and Kupffer cell depletion in a rat-to-rat liver transplantation model. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 152-156
- 58 Wu W, Zheng N, Wang Y, Fung JJ, Lu L, Qian S. Immune regulatory activity of liver-derived dendritic cells generated in vivo. *Microsurgery* 2006; 26: 17-20
- 59 Newton PJ, Weller IV, Katz DR, Chain BM. Autologous apoptotic T cells interact with dendritic cells, but do not affect their surface phenotype or their ability to induce recall immune responses. *Clin Exp Immunol* 2003; 133: 50-58
- 60 Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23: 445-449
- 61 Steinman RM. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol (Paris)* 2003; 51: 59-60
- 62 Münz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2005; 202: 203-207
- 63 Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685-711
- 64 Sun E. Cell death recognition model for the immune system. *Med Hypotheses* 2008; 70: 585-596
- 65 Li M, Zhang X, Zheng X, Lian D, Zhang ZX, Sun H, Suzuki M, Vladau C, Huang X, Xia X, Zhong R, Garcia B, Min WP. Tolerogenic dendritic cells transferring hyporesponsiveness and synergizing T regulatory cells in transplant tolerance. *Int Immunol* 2008; 20: 285-293
- 66 Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 2001; 14: 715-725
- 67 Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 2002; 109: 41-50
- 68 Jiang H, Lu Z, Pan S, Sun B, Meng F, Tan H, Meng Q, Sun X. Opposite effects of donor apoptotic versus necrotic splenocytes on splenic allograft tolerance. *J Surg Res* 2006; 136: 247-254
- 69 Ablin J, Verbovetski I, Trahtemberg U, Metzger S, Mevorach D. Quinidine and procainamide inhibit murine macrophage uptake of apoptotic and necrotic cells: a novel contributing mechanism of drug-induced-lupus. *Apoptosis* 2005; 10: 1009-1018
- 70 Khera TK, Martin J, Riley SG, Steadman R, Phillips AO. Glucose modulates handling of apoptotic cells by mesangial cells: involvement of TGF-beta1. *Lab Invest* 2007; 87: 690-701
- 71 Wan YY, Flavell RA. TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J Clin Immunol* 2008; 28: 647-659
- 72 Byrne A, Reen DJ. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol* 2002; 168: 1968-1977
- 73 Tassioulas I, Park-Min KH, Hu Y, Kellerman L, Mevorach D, Ivashkiv LB. Apoptotic cells inhibit LPS-induced cytokine and chemokine production and IFN responses in macrophages. *Hum Immunol* 2007; 68: 156-164
- 74 Chung EY, Kim SJ, Ma XJ. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Res* 2006; 16: 154-161
- 75 Michlewska S, Dransfield I, Megson IL, Rossi AG. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha. *FASEB J* 2009; 23: 844-854
- 76 Dresske B, Lin X, Huang DS, Zhou X, Fändrich F. Spontaneous tolerance: experience with the rat liver transplant model. *Hum Immunol* 2002; 63: 853-861
- 77 Liu J, Gao Y, Wang S, Sun EW, Wang Y, Zhang Z, Shan YQ, Zhong SZ. Effect of operation-synchronizing transfusion of apoptotic spleen cells from donor rats on acute rejection of recipient rats after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1161-1166

编辑 李军亮 电编 何基才