

抗病毒免疫研究进展*

韩雪清 刘湘涛

(中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州 730046)

摘要: 抗病毒免疫的机制极其复杂, 宿主的免疫系统需要经过抗原肽的加工提纯、淋巴细胞活化、抗体和细胞因子的产生等一系列步骤才能最终清除病毒的感染。从蛋白酶体在病毒肽抗原加工中的作用、免疫支配效应的意义、CTL 杀伤病毒感染细胞的机制、细胞因子的作用和免疫逃逸机制等方面阐述了抗病毒免疫机制, 对于病毒的防治将是十分重要的。

关键词: 抗病毒免疫, 进展

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0094-06

病毒是严格寄生于宿主细胞的一种传染性因子, 由于缺乏完整的酶系统, 因此必须利用宿主细胞的酶系统和其他成分来复制自身, 产生子代病毒, 以维系种系的生存和发展。病毒在宿主细胞内复制会影响宿主细胞合成、代谢及其他的正常生理功能, 甚至导致宿主细胞的死亡, 最终可引起宿主发病甚至死亡。为了抵抗和消除病毒感染给机体可能造成的这种不利后果, 宿主在与病毒的长期进化中逐渐建立和形成了完善而复杂的抗病毒免疫机制, 而病毒为了逃脱被清除和消灭的命运也在不断形成新的免疫逃逸策略。病毒与宿主之间的这种相互作用机制使得它们能够长期共同存在并促进了彼此的共同进化。对宿主抗病毒免疫机制的研究在病毒病的预防和控制方面具有重要的意义。

1 蛋白酶体与病毒肽抗原加工

病毒在复制和装配期间隐藏于细胞内。病毒肽抗原只有在细胞内被加工成适当长度的肽段并与主要组织相容性抗原复合物 (MHC) I 或 II 类分子结合后, 被递呈到细胞表面, 才能为 T 细胞所识别。病毒肽抗原在细胞内是如何被加工的? 现已明确, 病毒蛋白首先在胞质溶胶中被降解为肽片段, 其中长 7~13 个氨基酸的肽段被一种与抗原加工有关的异二聚体肽转运子 (TAP) 运送到内质网 (ER) 中。在 ER 或 Cis 高尔基体中, 肽与一个新合成的 MHC I 类分子的重链和 β_2 微球蛋白 (β_2 -m) 结合形成一种稳定的三分子复合体, 随后被转运到细胞表面。如果在识别所给出的携带单一病毒肽的 MHC I 类分子的等位基因的 T 细胞中有细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL), 那么 CTL 将增生并被活化以破坏感染的细胞, 籍此来阻止病毒的传播。由于病毒肽必须与那些来自不断代谢产生的大量细胞蛋白肽竞争地与 MHC I 类分子结合, 而且必须满足严格的结合条件, 以适于结合到 MHC I 类分子的沟槽内形成三分子复合体, 因此病毒的抗原加工必须精确且有效。近年来的研究表明, ER 加工抗原的能力是相当有限的, 大多数的 MHC 肽配体或配体前体不是在 ER 内或其它早期分泌性腔室中产生的, 而是胞质溶胶

* 国家重点基础研究专项经费资助

Project Granted by Chinese National major fundamental research

收稿日期: 2000-11-22, 修回日期: 2000-12-14

中加工后输入的。在 ER 中长肽段的 N 端残基能够被有效剪切, 长的肽段从 ER 中释放到胞质溶胶中, C 端几乎无一例外地在胞质溶胶内经蛋白水解作用产生, 最终的或具有短末端的肽段被转运到 ER 中进行进一步加工, 以便获得最佳的 MHC I 类分子配体。20S 蛋白酶体是一种筒状的具有蛋白水解作用的核心颗粒, 在其末端可结合两个激活子复合物, 即 19S 调节子和 11S 调节子 (或 PA28)。有足够的证据表明, 蛋白酶体在抗原加工中发挥着很重要的作用。LMP₂ 和 LMP₇ 基因编码蛋白酶体的两个亚单位, 与 TAP 和 MHC I 类蛋白的作用相似, LMP₂ 和 LMP₇ 也可通过 T 细胞源的抗病毒细胞因子、 γ 干扰素 (IFN- γ) 被诱导表达。在 20S 蛋白酶体装配期间, MHC 编码的 LMP₂ 和 LMP₇ 经 IFN- γ 诱导表达, 替换同源亚单位 δ 和 MB1。LMP₂ 和 LMP₇ 对 MHC I 类分子在细胞表面的最大量表达和一些病毒抗原的最佳抗原提呈似乎是必需的, 用多肽底物进行的体外研究证实 LMP₂ 和 LMP₇ 对于 20S 蛋白酶体产生的肽产物的质和量有着极大的影响, 这种影响程度取决于 LMP₂ 和 LMP₇ 单独或是共同发挥作用。IFN- γ 刺激将为细胞装配一套具有不同 LMP₂ 和 LMP₇ 的 20S 蛋白酶体颗粒, 这将增加由病毒蛋白产生的九聚体的范围, 激发 T 细胞发生免疫应答。显然, 免疫系统形成 IFN- γ 诱导的亚单位 LMP₂ 和 LMP₇ 及推测的蛋白酶体基因 MECL-1, 使这 3 个活性中心补充免疫调节, 以使抗原肽的产生灵活且有效。蛋白酶体调节子 PA28 是一种抗原提呈的增强子, 它可以大大增强蛋白酶体提呈抗原的能力^[1]。

2 T 细胞识别抗原表位与免疫支配效应

在自身 MHC 提呈的众多的肽表位中, T 细胞通常只对其中种类有限的肽表位发生应答, 这些肽表位的免疫原性由 4 个参数决定: (1) 肽表位的加工速率 (蛋白水解和运输); (2) 肽表位与 MHC 结合的亲和力; (3) 特异的 T 细胞前体的存在; (4) T 细胞通过支配性表位对非支配性表位的抑制, 即免疫支配效应。那么在众多的免疫原性表位中, 为什么 T 细胞的应答范围被限制在几个决定簇, 这一限制意味着什么? 现已发现免疫支配调节着 CTL 对病毒等的应答。支配效应起着两个作用。首先, 在激发 T 细胞的应答期间通过使抗原提呈细胞 (APC) 表面仅提呈 CTL 特异的最佳 TCR 配体, 支配效应将有助于使达到保护性免疫反应所需的时间缩至最短, 这可能对 CTL 介导的早期体内控制微生物感染是极其重要的。其次, 限制 T 细胞反应的范围可以减少自身免疫的危险。免疫支配现象实际上代表着免疫系统的一种明智的“低危险高效率”的策略。即对免疫反应的多样性的约束限制了潜在的对自身免疫的识别, 从而使之集中于最佳的抗原表位, 为快速消除病原提供了极好的机会。免疫支配效应源于对 APC 表面的竞争, 因此, 推断支配性表位是那些最能激发 CTL TCR 信号的表位。有效激发 T 细胞应答需要持续性的信号, 与参与的 TCR 的数量有关, 并取决于 TCR 与肽/MHC 复合体反应的最佳动力学。抗原的剂量对同源 T 细胞的增殖水平有着决定性的影响, 表位密度在免疫支配效应中起着十分关键的作用, 高的表位密度甚至无须另一刺激条件 (信号 2) 同时存在, 即能激发 T 细胞的应答。然而, TCR 亲合力与激发 T 细胞应答之间的关系更为复杂, 因为最佳亲合力与最大的亲合力并不一致, 而是与“中等的”亲合力一致。TCR/配体复合物的加速分离使一系列 TCR 被激发, 并增加了 CTL 识别抗原的效率, 使之达到一个关键阈限, 高亲合力的配体由于它们不能解离不能激发一系列的 TCRs, 因而是无效的。但解离太快则产生极差的 TCR 信号并导致 TCRs 之间的产生拮

抗, 只有在最佳解离率的表位才能激发一系列的 TCRs^[2]。

3 CTL 杀伤和清除病毒感染细胞的机制

哺乳动物具有非常发达的免疫系统, 能够识别和清除藏匿病毒和胞内细菌的宿主细胞。根据特定的病毒、感染的部位和感染后的时间, 可动员不同的免疫机制。在一些有细胞病变的病毒感染中, CTL 介导的凋亡可能发生得太慢而不能阻止病毒的传播。这些感染的特征明显的组织损伤可能有助于细胞因子的分泌。相比之下, CTL 引起的依赖接触的细胞死亡可能对于许多非致细胞病变的病毒感染的恢复特别重要。病毒感染的复杂性使病原的最理想的反应类型甚至在同一感染中可能不同器官之间各不相同。例如 CD8⁺ T 细胞 NK 细胞对于乙型肝炎的恢复是重要的, 而控制病毒在肝脏中复制则与 IFN— γ 介导有关^[3]; NK 细胞在病毒感染早期被活化, 几天后诱导的 CTL 利用不同的受体识别靶细胞, 从而利用很相似的效应分子来激发凋亡。淋巴细胞通过两种主要的接触依赖机制来杀死感染细胞。第一种机制通过效应细胞上的 Fas 受体 (CD95); 第二种 CTL 介导的细胞溶解作用的机制, 特异的致密核心的胞浆细胞器 (分泌性溶酶体) 含有一种成孔蛋白, 即穿孔素, 和命名为粒酶的一组丝氨酸蛋白酶, 它们一起促使细胞死亡。穿孔素对于 NK 细胞、辅助 T 淋巴细胞 (Th2) 的大部分 CD8⁺ CTLs 和 CD4⁺ T 细胞诱导凋亡是必要的, 其主要功能是使粒酶可以接近靶细胞内关键的底物。不同的死亡途径的组织学意义有以下几个方面: 首先, 现已弄清颗粒体细胞排粒作用是抗病毒 CTL 免疫和 NK 细胞毒作用的主要机制。其次, 粒酶 B (grB) 缺陷能很容易得到补偿, 而不需要第二种 Caspase 粒酶, 说明在颗粒体中蛋白酶功能极其过剩。第三, 粒酶作为抗病毒成分显然具有重要的功能, 而不是通过凋亡的诱导。以前所观察的粒酶 A (grA) 能诱导旁观的吞噬细胞分泌趋化因子进一步证明了后一观点。颗粒体介导的细胞溶解作用在病毒感染的致病作用中的重要性促使对颗粒体结合的凋亡机制进行详细研究和分析, 揭示包裹这种小但有效的颗粒体外层的复杂性。研究的结果显示, 其最基本的机制涉及通过 grB 和穿孔素诱导内在的 Caspase 活化激发细胞自杀途径, 还有 Caspase 依赖的死亡, grB 提供了更进一步“保险”程度, 也通过在细胞浆中激活死亡, 经不依赖于 Caspase 的机制 (途径 2), 提供了一种绕过病毒阻碍 Caspase 功能的策略。然而, 这一途径也能被 Bc12 样的病毒抑制子抑制, 颗粒体存在别的至少一种依赖穿孔素的途径 (途径 3), 以确保 CTL 能够在病毒感染细胞的“生”与“死”上具有最后发言权。grB 是主要的促凋亡粒酶, 许多类型的细胞当暴露于两种分子纯化的 grB 和穿孔素时, 在几分钟内即发生凋亡。有足够的证据表明, grB 在体内和体外可以活化大部分的促 Caspase, 引起这一通常途径的大规模扩大。重要的是, grB 不是唯一诱导凋亡的粒酶, 类胰蛋白酶 grA 和类胰蛋白酶 2 也诱导凋亡, 虽然速度要比 grB 慢。grA 的促凋亡效果可能就在于一些丝氨酸蛋白酶能在靠近关键 Asp 残基的非典型剪切点剪切促 Caspase 的能力, 或通过活化其它途径间接发挥作用, 然后激发 Caspase 途径。进入一细胞并准备利用细胞代谢功能的任何病毒, 迫切需要使细胞能快速“利他地”死亡, 因此, 许多病毒编码以 Caspase 活化为动力的凋亡机制的抑制子, 这些病毒抑制子利用了对 Caspase 的这种依赖, 几乎 Caspase 途径的每一步骤都能被破坏。尽管 CTL 可通过 Fas 途径杀死一些靶细胞, 但颗粒体介导的细胞溶解作用是体内抗细胞内病原的最主要的武器, 因为通过 Fas 杀伤靶细胞是依赖 Caspase, 能推迟程序性细胞死亡的病毒

也将能抵抗 Fas 介导的死亡。当细胞死亡进行时, 尽管不出现凋亡细胞的核的特征, 但 Caspase 能够绕过病毒阻断来活化一种胞浆内凋亡途径。核的凋亡效果是依赖 Caspase 的, 但胞浆内的凋亡事件不依赖于 Caspase 而进行。GrB 足以杀死表达病毒 serpin 细胞, 然而 grB 不能克服 Bcl2 介导对凋亡的阻断, 是颗粒体的成分而不是 grB 能绕过 Bcl2 阻断依赖 grB 的途径, 从而提供了第三条途径, 通过这条途径, 溶细胞颗粒体可以杀死它们的靶细胞。目前, 尚未发现能有效阻断颗粒体介导的死亡的病毒抑制子。一种有效阻断颗粒体的溶细胞作用将意味着宿主的死亡, 这对病毒来说是一种不理想的后果, 只有具内在抵抗力的个体才能很快留在群体中。对病毒来说, 最好能使宿主存活并将被清除的时间拖延到一合适时间。CTL 和 NK 细胞藏有多种病毒抗凋亡策略斗争方式, 对这些途径进行全面的分子水平的分析终将被证明是治疗一些病毒感染的新的方法。

4 细胞因子与抗病毒感染

有效的抗病毒免疫需要一个调节白细胞运输, 具有以局部或整体方式对外来抗原迅速和特异应答的能力。为了能够介导这些功能, 两个特性是必需的: (1) 以一种自发的不受限制的方式识别外源抗原的能力。(2) 将遭受外源抗原的信号传递给相关的效应细胞和分子的能力^[4]。现在已清楚细胞因子调节着免疫应答的启动与维持, 以及决定着免疫反应和介导抵抗病原的效应机制的类型。IL-12 在 Th1 细胞的发育和控制感染方面有着重要的作用, 巨噬细胞和 NK1.1⁺、肥大细胞早期分泌的细胞因子与 T 细胞极化有关^[5]。CTL 作为抗病毒免疫介质的关键作用已经明确, 其效应机制除通过颗粒体介导感染宿主细胞的溶解外, 还能释放如肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和 γ 干扰素 (IFN- γ) 等具有广谱抗病毒效应的可溶性因子。此外, 与其调节免疫细胞相互作用功能相一致, 当遇到同源抗原时, CTL 还可分泌多种趋化因子, 但其主要的来源之一是 CD8⁺ 淋巴细胞。近年来才将趋化因子与细胞溶解功能直接联系起来。CTL 识别抗原并导致感染部位趋化因子的直接释放和再次诱导, 这样当遇到它们的靶抗原时, CTL 可以迅速地建立起趋化梯度。在被病毒抗原特异激发后, CTL 释放趋化因子可能对通过提供以局部方式快速扩大反应, 产生必要条件的白细胞的涌入的直接迁移信号的有效抗病毒免疫是必要的。的确, 由于对病原免疫应答的动力学和分布决定着应答的后果, CTL 分泌的趋化因子征集适当效应细胞的能力可能在病毒感染的外周组织特别重要。尽管 T 细胞特异识别抗原是核心, 但所产生的反应却取决于抗原的特性、传播动力学和提呈的解剖学, 局部分泌的因子如趋化因子似乎在淋巴系统自身内发挥着作用, 并可能起着以一种增强对新抗原特异反应的最佳方式征集细胞的作用。或许更重要的是, 一旦效应 CTL 产生, 它们的分泌功能可能在超出淋巴组织的特定环境之外发挥定位、扩大和控制免疫应答的作用, 这种调控功能可能在非致细胞病变的病毒感染方面特别重要。在非致细胞病变的感染中, 缺少直接的组织损伤可能限制了炎性介质的非特异反应的产生。CTL 是唯一具有特意识别病毒感染细胞潜能的细胞。CTL 产生的趋化因子的不同趋化特性要求选择性地转内皮迁移和白细胞亚群的组织趋化性, 特别是淋巴细胞和单核巨噬细胞, 因此通过 TCR 特异识别病毒抗原可能导致细胞涌入感染部位, 吸引处于迁移中的抗原提呈细胞可能确保经 CTL 溶解或直接的病毒致病效应释放的病毒碎片或淋巴器官有效提呈抗原的快速运输, 以此达到最佳产生进一步的效应 CTL。趋化因子吸引的细胞组成功能单位, 推测 CTL 的这种可溶性因子环境可能使具有协同

作用的白细胞在感染部位聚集,并利用这种机制快速消除病原。活化的 $CD8^+$ 淋巴细胞可能包括抗原特异的 CTL,最初 CTL 识别抗原的归巢信号可能进一步召集效应 CTL 到感染组织。当感染细胞中抗原的量有限时,特别是在召集效应细胞速度差异很小而产生的结果差异很大的情况下,这一系统可能就显得特别重要。这可能就是能够提供抗感染保护的和不能提供保护的记忆性 CTL 之间的差别之一。在感染的后期,当一个病原群落已大部分被清除时,趋化因子的释放可能起着将留下来的 CTL 召集起来消除残余的感染细胞的作用。因此趋化因子和 CTL 均是针对病毒免疫的重要成员,现在已经证实它们与病毒抗原的关系始终是一致的。许多病毒编码具有潜在破坏趋化因子途径的蛋白,从另一方面也表明这些分子在控制病毒感染方面的重要作用。

5 病毒逃逸免疫的机制

病毒与宿主的长期共同进化不仅使得这些病原形成了自身传代的有效策略,而且能够选择效应分子来破坏宿主细胞免疫反应的机制,已鉴定的具有独一无二的适应或抵抗宿主免疫反应的病毒蛋白就是例证。这些病毒蛋白包括:细胞因子和细胞因子受体;能与补体因子或 MHC I 类分子反应的产物;结合并修饰转录因子活性的蛋白和干扰正常细胞功能的其它几种蛋白^[7,8]。对这些病毒产物的研究增进了对病毒-宿主相互作用的认知,并意外的提供了病毒致病机制和治疗性阻断的可能性及正常免疫反应方面的信息,几种病毒都编码具有内在蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 活性的或能够与细胞的 PTKs 作用的蛋白,如致癌反转录病毒编码的 V-src 和 V-Yes 等激酶;哺乳动物疱疹病毒的 γ 亚科的病毒编码潜在的膜蛋白 2A (LMP2A) 和酪氨酸激酶作用蛋白 (Tip) 等^[9,10]。非细胞受体蛋白酪氨酸激酶 (NRPTKs) 的关键作用在于参与调节细胞生长、分化和成熟细胞功能的信号传导途径。对 NRPTKs 的研究增强了这样的观念,即彼此无关的病毒均在进化中形成以 NRPTKs 结合蛋白作为一种共同的致病因子的策略。疱疹病毒科和反转录病毒科的病毒均利用细胞的 NRPTKs 作为关键的中间信号,在病毒的生活周期中发挥着多种功能。这是感染期间病毒系统模仿和破坏宿主分子的一个典型的例子。对已鉴定的能与 NRPTKs 反应的病毒蛋白进行比较分析发现:所有这些病毒产物为完整的膜蛋白和膜结合蛋白。这些病毒产物与其靶 NRPTKs 作用后, NRPTKs 或者不与它们正常的信号级联配对或它们的催化活性被破坏。反过来,激酶可能不适当地被活化,导致持续地激发信号级联和设法逃避所需的外部信号。病毒通过在原来的蛋白序列内进行形成或获得蛋白质-蛋白质反应的基元,从而获得与 NRPTKs 反应的能力^[11]。此外,病毒逃逸免疫的策略还主要瞄准宿主抗病毒防御的关键的决定步骤。病毒在感染的细胞中直接阻断抗原加工的途径可破坏原发 TCR 识别,或遗传上不稳定的 RNA 病毒通过抗原变异等,这些策略抑制了所有 CTL 的功能活性。如果 CTL 识别已经发生,则可利用进一步的机制破坏效应功能,这样二级水平的逃逸策略可能有助于病毒在活化的宿主 CTL 应答存在下持续存在。可拮抗宿主细胞因子配体/受体反应的病毒蛋白,被认为在打断诱导特异的效应细胞和破坏原发的免疫应答途径,如补体级联方面是重要的。

病毒与宿主的相互作用机制的研究始终是病毒学和抗病毒免疫研究的核心之一,在病毒的预防和控制方面具有重要的意义。相信随着对病毒和抗病毒免疫研究的进一步深入,许多尚不清楚的方面如病毒致病的机制、宿主抗病毒的机理等都将逐步得到

阐明, 并在此基础上开发出高效、安全的新型疫苗, 进一步提高人类认识和控制病毒感染的能力。

参考文献

- [1] Marcus G, Andrea S, Ulrike K, *et al.* Immunol Today, 1996, 17 (9): 429 ~ 435.
- [2] Stephane P, Gregory J C, Pierre F, *et al.* Blood, 1999, 93 (3): 952 ~ 962.
- [3] Joseph A, Trapani, Vivien R S. Immunol Today, 1999, 20 (8): 351 ~ 355.
- [4] David A P, Paul K, Bruce L B, *et al.* Immunol Today, 1999, 20 (5): 212 ~ 216.
- [5] Manuel F, Manfred k, Luis R, *et al.* Immunol Today, 1997, 18 (2): 56 ~ 58.
- [6] Feldmann M, Basten A. J. Exp Med, 1971, 103 ~ 119, 134.
- [7] Gooding L R. Cell, 1992, 71: 5 ~ 7.
- [8] Spriggs M K Annu. Rev Immunol, 1996, 14: 101 ~ 130.
- [9] Felic G, Horvath A R, Kellie S. Biochem Soc Trans, 1990, 18: 69 ~ 72.
- [10] Leader D P. Pharmacol. Ther, 1993, 59: 343 ~ 389.
- [11] Yves C, Daniel O. Immunol, Today, 1997, 18 (8): 393 ~ 400.