

## · 综述 ·

# T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3 及其配体在慢性病毒感染中的作用研究进展

刘琼 谢冬英

病毒感染后的清除主要依赖于细胞免疫和体液免疫组成的免疫反应,其中,病毒特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞是主要的效应细胞。在急性病毒感染中,特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞通过杀伤病毒感染的细胞,分泌抗病毒细胞因子从而有效清除病毒;在慢性病毒感染过程中,病毒特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞发生克隆耗竭,细胞数量减少,细胞功能受损,分泌细胞因子能力下降<sup>[1]</sup>。病毒感染的持续和慢性化与效应和记忆性 T 细胞的功能缺陷密切相关<sup>[2]</sup>。而慢性病毒感染中抑制性受体在调节 T 细胞的功能起着重要的作用。

T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3(T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3, Tim-3)是近年来发现的一种与 T 细胞功能有关的表面分子,主要表达在 Th1 和 Tc1 细胞上,与其配体半乳糖素 9(galectin-9)结合,产生抑制性信号,诱导 Th1 和 Tc1 细胞凋亡,在免疫应答中起到负性调节的作用<sup>[3]</sup>。因此, Tim-3 及其配体通路可能参与病毒感染的清除过程。

## 一、Tim 基因家族概况

Tim 基因家族是 2001 年 McIntire 等<sup>[4]</sup>在研究哮喘基因过程中在小鼠 11 号染色体上发现的一个新的基因家族,包括 8 个基因(Tim-1~8)。人类的 Tim 基因家族定位于染色体 5q32.2,包括 3 个基因:Tim-1、Tim-3 及 Tim-4。Tim 基因编码的蛋白是一类具有共同基序的跨膜糖蛋白,其基本结构包括一个信号肽、免疫球蛋白(Ig)样区、黏蛋白样区、跨膜区和有磷酸化位点的胞内区<sup>[5]</sup>。现已发现, Tim 家族参与 Th 细胞的分化及免疫应答调节,在一些自身免疫性疾病的发生发展及诱导外周免疫耐受和移植耐受中起着重要作用。其中 Tim-1 是哮喘和变态反应性疾病的易感基因,主要表达在 Th2 细胞表面,是 T 细胞活化的有效刺激分子<sup>[6]</sup>; Tim-3 主要表达 T 细胞和巨噬细胞,通过与 Tim-3 配体(Tim-3L)相互作用调节 T 细胞凋亡和免疫耐受<sup>[3]</sup>。Tim-4 不表达在 T 细胞上,而是稳定地表达在抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)上,调节凋亡细胞的吞噬作用,在维持免疫耐受中起重要作用<sup>[7]</sup>。

## 二、Tim-3 及其配体 Tim-3L 的基本结构及表达

1. Tim-3: Tim-3 基因编码含有 281 个氨基酸的 I 型膜蛋白,其蛋白分子的细胞外区含有 1 个免疫球蛋白 V 区以及 1 个富含丝氨酸和苏氨酸残基的黏蛋白区,胞浆区具有 6 个酪氨酸,其中 1 个属于酪氨酸磷酸化基序部分(即 RSEENIY)。Tim-3 蛋白的细胞外区具有 4 个 N-连接位点和 5 个 O-糖基化连接位点。人与小鼠 Tim-3 氨基酸序列有 63% 的同源性,其中胞浆区部分的同源性为 77% (包括保守的酪氨酸磷酸化基序结构)。Tim-3 结构上与黏膜黏着素细胞黏附分子-1(mucosal addressin cell adhesion molecule-1, MACAM-1)相似,后者含有 2 个免疫球蛋白区和 1 个黏蛋白区<sup>[8]</sup>。Sabatos 等<sup>[9]</sup>通过 cDNA 测序确定了 Tim-3 基因的两种同功型,一是全长的胞膜锚着形式(full-length membrane-anchored form of Tim-3, flTim-3),长度为 1 kb,含有信号肽、免疫球蛋白 V 区、黏蛋白区、跨膜区和胞浆区;一是可溶性形式(soluble form of Tim-3, sTim-3),长度为 800 bp,仅含有信号肽、免疫球蛋白 V 区和胞浆区。

起初认为 Tim-3 特异性表达在分化成熟的 Th1 细胞上而不表达在 Th2 细胞上,可作为新的区分 Th1 和 Th2 的重要标志<sup>[8,10]</sup>,但是近来研究显示 Tim-3 亦可表达在其他许多细胞表面,包括适应性免疫细胞和固有免疫细胞,如细胞毒性 CD8<sup>+</sup> T 细胞、Th17 细胞、调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)、单核细胞、树突状细胞(dendritic cell, DC)、小神经胶质细胞和肥大细胞<sup>[11]</sup>。

2. Tim-3 配体: Zhu 等<sup>[12]</sup>的研究发现了 Tim-3 配体(Tim-3L)高表达在 TK-1(一种 CD8<sup>+</sup> 小鼠淋巴瘤细胞)上,并鉴定为半乳糖凝集素-9(galectin-9),其广泛表达在人和小鼠的脾脏和淋巴组织中,在小鼠主要表达在 CD4<sup>+</sup> T 细胞表面。Tim-3 与其配体 galectin-9 结合,给 T 细胞提供一种负性刺激信号,可诱导胸腺细胞和外周的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞凋亡,在调节免疫细胞的动态平衡和炎症反应中起着重要作用。

## 三、Tim-3 及其配体 galectin-9 的生物学功能

Tim-3 可表达于多种适应性免疫和自然免疫细胞表面,参与对淋巴细胞的免疫调节,在自身免疫性疾病、变态反应性哮喘等疾病的发病机制以及免疫耐受、肿瘤免疫逃逸中发挥重要的作用<sup>[13]</sup>。Kuchroo 等<sup>[14]</sup>用小鼠 Th1 和 Th2 细胞分别免疫大鼠,从 2 万个克隆中筛选出抗鼠 Tim-3 单抗,发现 Tim-3 只表达在分化的 Th1 细胞上,并且可以调控 Th1 细胞介导的免疫应答。Monney 等<sup>[8]</sup>在实验性变应性脑脊髓膜炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)小鼠模型中发现, Tim-3 特异性抗体

可加速 EAE 疾病的发作,增加疾病的严重性和死亡率;在免疫反应中引入 Tim-3-Ig 可促进 Th1 细胞的高增殖并诱导 IFN- $\gamma$  产生增加<sup>[9]</sup>。在 I 型糖尿病小鼠体内引入 Tim-3-Ig 或抗 Tim-3 抗体同样可促进病情的恶化<sup>[10]</sup>。Wang 等<sup>[15]</sup>研究表明,在同种异体皮肤移植小鼠给予重组 galectin-9,能选择性删除 Tim-3<sup>+</sup> Th1 细胞,使 IFN- $\gamma$  分泌下降,显著抑制同种异体移植排斥反应,增加同种异体移植皮肤的存活率。另外, Tim-3-Tim-3L 通路已经被证明在诱导外周耐受中发挥极其重要的作用<sup>[9]</sup>,将此通路封闭后,可以促进 Th1 细胞的增殖及细胞因子的产生,并导致外周耐受的丧失。以上研究均证明 Tim-3 对免疫应答的负调节作用,能诱导 Th1 细胞的凋亡,从而下调 Th1 细胞反应,且 Tim-3 及其配体(Tim-3L)途径一旦被阻断,将导致 Th1 介导的疾病恶化。

#### 四、Tim-3 及其配体 galectin-9 在慢性病毒感染中的作用

在慢性活动性病毒感染的发病机制过程中, Tim-3 可能在固有免疫和适应性免疫系统中发挥抑制作用<sup>[16]</sup>。病毒特异性 T 淋巴细胞是控制病毒性病原体的重要细胞,在慢性感染中处于功能耗竭状态,表现为细胞增殖能力下降、分泌细胞因子减少、细胞毒性降低<sup>[17]</sup>。Tim-3 作为 T 细胞反应的一种负性调节因子,与病毒特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞的功能衰竭有着密切的关系,阻断 Tim-3 信号途径可以使耗竭的 CD8<sup>+</sup> T 细胞恢复免疫效应功能,这将为慢性病毒感染性疾病的治疗提供一个新的免疫策略。

研究显示,在 HIV 感染过程中, Tim-3 高表达在约 50% 的 CD8<sup>+</sup> T 细胞上,而健康对照组只有 28% 表达,且在 CD4<sup>+</sup> T 细胞上表达低水平。Tim-3 亦表达在病毒特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞上,部分 Tim-3<sup>+</sup> 细胞重叠表达细胞程序性死亡受体 1 (programmed death 1, PD-1)。高水平 Tim-3 与病毒载量呈正相关,而与 CD4<sup>+</sup> T 细胞数量呈负相关。与 Tim-3<sup>-</sup> 细胞相比,高表达 Tim-3 的病毒特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖能力减弱,产生的细胞因子减少。阻断 Tim-3 通路后 HIV 特异性 CD4<sup>+</sup> T 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞功能都可得到部分提高,包括细胞增殖能力和细胞因子的分泌量<sup>[18]</sup>。

对慢性 HCV 感染的研究也发现, HCV 持续感染的原因主要是病毒特异性 T 细胞功能缺陷所致,且其功能缺陷与 T 细胞上的 Tim-3 表达有关。Golden-Mason 等<sup>[16]</sup>发现,在慢性丙型肝炎患者, Tim-3 在 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞上表达均增加,最高表达在 HCV 特异性细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T cell, CTL)上,且大部分重叠表达 PD-1。高比例的 Tim-3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 细胞表达记忆性 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚型,少部分表达效应性细胞亚型,而 Tim-3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 细胞没有此种区别。与 Tim-3<sup>-</sup> 细胞相比, Tim-3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞产生较少 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ 。用 TIM-3 单克隆抗体阻断 Tim-3 通路可有效增强 HCV 核心抗原介导的 T 细胞免疫细胞的增殖和 IFN- $\gamma$  的产生,并减少 IL-10 等生成。这些结果表明, Tim-3 在 T 细胞活化过程中表达上调,作为一种负性调节因子抑制免疫病理反应。

近年来人们认识到 T 细胞调节的细胞免疫应答和体液免疫在乙型肝炎的发病和转归中起重要作用。乙型肝炎的发病主要是机体清除 HBV 引发的细胞免疫病理损害<sup>[19]</sup>。已有文献报道 Tim-1、Tim-3 在慢性乙型肝炎患者体内表达升高,且 Tim-3 与丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)呈正相关,提示 Tim 可能参与了 HBV 感染的发病和发展过程,并在其中发挥重要的作用。在感染 HBV 的小鼠模型中, Tim-3 显著表达在肝脏 T 淋巴细胞,特别是 CD8<sup>+</sup> T 细胞上,通过特异性阻断 Tim-3 途径能显著促进肝特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞分泌 IFN- $\gamma$ ,提示 Tim-3 在 HBV 感染的 T 细胞免疫应答中可能是一个有效的调控者<sup>[20]</sup>。在 HBV 感染的自然性免疫反应中, Ju 等<sup>[21]</sup>发现自然杀伤细胞(natural killer, NK)上的 Tim-3 表达上调, NK 细胞的毒性在慢性乙型肝炎患者和健康对照组中的不同与 Tim-3 的表达水平不同相关,且表达在 NK 上的 Tim-3 与 ALT 水平呈显著正相关。他们认为,慢性 HBV 感染通过增加 Tim-3 的表达抑制 NK 细胞毒性,从而抑制 HBV 自然性免疫反应并最终导致 HBV 感染的持续。目前, Tim-3 与慢性 HBV 感染状态、病情严重程度、抗病毒疗效间的关系有待于进一步研究。

#### 五、展望

在抗病毒免疫反应中,有效而强大的 T 细胞免疫应答是清除病毒的关键,病毒感染的持续和慢性化与效应和记忆性 T 细胞的功能缺陷密切相关。许多研究表明 Tim-3-galectin-9 途径参与了 T 细胞效应耐受的诱导,阻断 Tim-3-galectin-9 途径有利于抗病毒免疫。在目前抗病毒药物治疗效果不理想的情况下,通过调节共刺激分子的表达有助于提高病毒特异性淋巴细胞的免疫功能以清除病毒感染,因此, Tim-3 阻断剂有望成为慢性病毒感染者免疫调控治疗的新方法之一。但目前还存在一些问题,如病毒具有多种生物学特征,可以采取多种方法逃避机体的免疫清除,不同病毒感染过程中 Tim-3-galectin-9 途径发挥的作用可能不同;在抗病毒治疗过程中何时阻断 Tim-3-galectin-9 途径及其能否达到预期的治疗效果还不清楚。尽管很多重要问题有待解决,但阻断 Tim-3-galectin-9 途径对病毒特异性 T 淋巴细胞功能提高以及由此导致的病毒清除,仍可能使其成为将来治疗慢性病毒感染的有效方法。另一方面,对于肝衰竭患者,病理改变明显,可能存在 Tim-3-galectin-9 表达的不平衡,认识 Tim-3-galectin-9 通路在肝衰竭发病机制中的重要作用,可能通过免疫调控手段减慢病情进展,改善预后,也是值得探讨的课题。

#### 参 考 文 献

- [1] Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, et al. Molecular signature of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion during viral infection. *Immunity*, 2007, 27: 670-684.
- [2] Klenerman P, Hill A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infection. *Nat Immunol*, 2005, 6: 873-879.
- [3] Rodriguez-Manzanet R, DeKruyff R, Kuchroo VK, et al. The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol Rev*, 2009, 229: 259-270.
- [4] McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, et al. Identification of Tapr (an airway hyper reactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat*

- Immunol, 2001, 2:1109-1116.
- [5] Mariat C, Sanchez-Fueyo A, Alexopoulos SP, et al. Regulation of T cell dependent immune responses by TIM family members. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360:1681-1685.
- [6] McIntire JJ, Umetsu DT, DeKruyff RH, et al. TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Springer Semin Immunopathol*, 2004, 25: 335-348.
- [7] Mizui M, Shikina T, Arase H, et al. Bimodal regulation of T cell mediated immune responses by TIM-4. *Int Immunol*, 2008, 20:695-708.
- [8] Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*, 2002, 415:536-541.
- [9] Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol*, 2003, 4:1102-1110.
- [10] Sanchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol*, 2003, 4:1093-1101.
- [11] Su EW, Lin JY, Kane LP, et al. TIM-1 and TIM-3 proteins in immune regulation. *Cytokine*, 2008, 44:9-13.
- [12] Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol*, 2005, 6: 1245-1252.
- [13] Simmons WJ, Koneru M, Mohindru M, et al. Tim-3<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> tumor-specific Th1 cells colocalize with and inhibit development and growth of murine neoplasma. *J Immunol*, 2005, 174:1405-1415.
- [14] Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH, et al. The Tim gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3:454-462.
- [15] Wang F, He W, Yuan J, et al. Activation of Tim-3-galectin-9 pathway improves survival of fully allogenic skin grafts. *Transpl Immunol*, 2008, 19: 12-19.
- [16] Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J Virol*, 2009, 83:9122-9130.
- [17] Freeman GJ, Wherry EJ, Ahmed R, et al. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med*, 2006, 203: 2223-2227.
- [18] Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med*, 2008, 205:2763-2779.
- [19] Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13:29-60.
- [20] Ju Y, Hou N, Zhang XN, et al. Blockade of Tim-3 Pathway Ameliorates Interferon- $\gamma$  Production from Hepatic CD8<sup>+</sup> T Cells in a Mouse Model of Hepatitis B Virus Infection. *Cellular & Molecular Immunology*, 2009, 6:35-43.
- [21] Ju Y, Hou N, Meng J, et al. T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2010, 52:322-329.

(收稿日期:2011-02-21)

(本文编辑:巨娟梅)

刘琼, 谢冬英. T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子3及其配体在慢性病毒感染中的作用研究进展[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2011, 5(8):2347-2349.