

## · 综述 ·

## IL-12 细胞因子家族的新成员——IL-35

石银月 武桂萍 颜学兵

IL-35 是最新发现的 IL-12 细胞因子家族成员,由两个亚基组成的异二聚体,即 EBI3 和 IL-12p35。EBI3 由 EB 病毒感染的 B 淋巴细胞诱导产生,是编码为 34 kDa 的糖蛋白,27% 的氨基酸与 IL-12p40 相同;IL-12p35 与其他单链细胞因子如 IL-6 同源。1997 年 Devergne 等发现 EBI3 和 IL-12p35 可以聚合为新的造血因子,且在体内形成异二聚体,但未对其功能进行研究。直到 2002 年,Planz 等将 EBI3 和 IL-12p28 偶联形成异二聚体 IL-27,才激发了人们对 EBI3-IL-12p35 的重新研究,并将其正式命名为 IL-35。2007 年, Niedbala 等<sup>[1]</sup> 和 Collison 等<sup>[2]</sup> 两个研究小组分别在《European Journal of Immunology》和《Nature》杂志上发表了 IL-35 的生物学功能,使 IL-35 成为近期研究的热点。

## 一、IL-35 的结构和受体

IL-35 是 IL-12 细胞因子家族的新成员,到目前为止,IL-12 家族还包括 IL-12、IL-23 和 IL-27,均是由两条链构成的异二聚体。IL-12 是最早发现的该家族成员,由 IL-12p35 和 IL-12p40 共价结合而成。IL-12p35 属于 I 型细胞因子,表达无处不在,而 IL-12p40 的表达则是诱导性的。IL-12p35 和 IL-12p40 基因调节的分离提示二者可分别与其他成分结合,IL-12p40 与 IL-23p19 共价结合组成 IL-23,EBI3 与 IL-27p28 结合形成 IL-27,但与 IL-12 和 IL-23 的不同之处在于其并非由双硫键共价结合而成。

下面对 IL-12 细胞因子家族成员的受体做一介绍。

1. 对 IL-12 而言,功能性 IL-12R 与 gp130 同源,是由 IL-12R $\beta_1$  和 IL-12R $\beta_2$  组成的异二聚体,结构上属于 I 型细胞因子受体超家族。IL-12R $\beta_1$  是一种含有二硫键的 I 型跨膜蛋白,可与 IL-12 结合<sup>[3]</sup>。IL-12R $\beta_1$  表达于 T 细胞, NK 细胞和 DC 细胞上,而 IL-12R $\beta_2$  表达于 NK 细胞和活化的 T 细胞,促 Th1 分化的细胞因子同样可促进其表达,而促 Th2 分化的细胞因子则对其起到抑制作用,与 IL-12R $\beta_1$  不同,IL-12R $\beta_2$  主要发挥信号转导作用<sup>[4]</sup>。IL-12 的信号通路包括 Jak2、Tyk2 和一些信号转导蛋白和转录激活蛋白(STAT)家族成员,包括 STAT1、STAT4 和 STAT5,其中,STAT4 发挥主要作用。研究发现,缺乏 IL-12R $\beta_1$ /IL-12R $\beta_2$ 、Tyk2/Jak2 或 STAT4 的小鼠在 T 细胞和 NK 细胞上 IL-12 信号转导受损。

2. IL-23 受体由 IL-12R $\beta_1$  和 IL-23R 两个亚基组成,IL-23R 主要表达于活化和记忆性 T 细胞,也少量表达于 NK

细胞,单核/巨噬细胞和树突状细胞(DC)中<sup>[4-5]</sup>,IL-23R 与配体结合后使胞内区酪氨酸发生磷酸化,通过 Tyk2/Jak2 和 STAT 家族尤其是 STAT3 发挥信号转导作用;同 IL-12R $\beta_2$  一样,IL-23R 主要发挥 IL-23 的信号转导作用。

3. IL-27 受体由 WSX-1 和 gp130 两个亚基组成,其中 WSX-1 主要结合配体, gp130 发挥信号转导作用。WSX1 胞浆区具有酪氨酸磷酸化残基,可使 STAT 家族成员胞内区酪氨酸发生磷酸化,但 WSX1 单独与 IL-27 结合时却不能转导信号,只有两个亚基同时存在才能发挥信号转导作用<sup>[6]</sup>。

4. IL-35 的受体和信号通路目前尚不明确,鉴于 IL-35 同其他家族成员的相似性,推测 IL-35 受体也是由两个亚基构成。IL-35 由 EBI3 和 IL-12p35 组成,考虑 IL-35 受体可能分别与 IL-12 和 IL-27 的 1 个亚基结合而发挥信号转导作用,IL-12 的亚基 p35 与 IL-12R $\beta_2$  结合,推测 IL-12R $\beta_2$  组成 IL-35 受体的 1 条链,但 IL-27R 通过 WSX-1 和 gp130 共同发挥作用,且 IL-27 的两个亚基分别与哪条链结合目前尚不明确,只能推测 WSX-1 或 gp130 可能组成 IL-35 受体的另一条链。根据已知的 IL-12 和 IL-27 活化信号通路考虑 STAT4,或许还有 STAT1 和 STAT3 参与 IL-35 的信号转导<sup>[6]</sup>。令人费解的是,虽然拥有相同的信号通路,在下游区转录后却发挥完全相反的功能,即 IL-12 和 IL-27 具有刺激功能而 IL-35 则发挥抑制作用。另有一种解释为 IL-35 拥有自己独特的受体,但尚需进一步证实。

IL-12、IL-23 和 IL-27 最初均被认为是促炎性或刺激性细胞因子,可促进 T 细胞增殖和细胞因子分泌。T 细胞和 DC 细胞可通过 CD40L 和 CD40 结合来增强 IL-12、IL-23 和 IL-27 的分泌<sup>[7]</sup>。IL-27 发现之初,认为其协同 IL-12 促进 T-bet 和 IL-12R $\beta_2$  表达以使得初始 T 细胞和 NK 细胞分泌 IFN- $\gamma$  增多。这一发现说明 IL-27 可使 T 细胞增殖以发挥 IL-12 的作用,对 Th1 细胞早期分化发挥重要作用。但近期研究发现,IL-27 除促进 Th1 细胞增殖外还具有宿主调节活性<sup>[8]</sup>。同抗-IL-12p40 一样,IL-27p28 也可使 Th1 致病的实验性自发性脑脊髓膜炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)病情减轻<sup>[9]</sup>。即 IL-27 可抑制 EAE 的进展,此功能部分依赖于 IL-10。最新报道称 IL-27 可抑制 Th1 源性感染,限制 Th2 活性,阻断 Th17 细胞分化及 TGF- $\beta$  诱导的 Treg 细胞形成<sup>[10]</sup>。另外,同健康成人血相比,脐带血中 EBI3 和 p28 mRNA 表达显著升高<sup>[11]</sup>,说明 IL-27 可能在母胎免疫耐受中发挥重要作用。IL-27 是 IL-12 家族成员中第一个既有促炎又有免疫调节作用的成员。

IL-35 作为该家族的新成员,表达于 CD4<sup>+</sup> T 细胞群中静息和活化的调节性 T(Treg)细胞,而不表达于效应性 T(Teff)细胞,Treg 细胞要产生并表达大量的 IL-35 需要与 Teff 细胞结合,可使 Treg 细胞发挥抑制活性<sup>[2]</sup>。早期研究发现,EBI3

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.02.020

基金项目:2011 年江苏省“科教兴卫”医学重点人才培养基金(RC2011117);2011 年江苏省“333 高层次人才培养工程”第三层次培养对象;2011 年江苏省“六大人才高峰”项目

作者单位:221002 徐州市,徐州医学院附属医院感染病科

通讯作者:颜学兵,Email:yxbxuzhou@126.com

和 p35 在胎盘滋养层中表达量较高,提示 IL-35 可同 IL-27 一样在胎盘屏障中发挥免疫调节。此作用是源于 Treg 细胞介导的母体对胎儿应答的抑制,还是分泌 IL-35 的其他细胞亚群发挥的抑制作用尚不明确。

## 二、IL-35 的生物学功能

1. IL-35 为 Treg 细胞发挥功能所需:Treg 细胞是 CD4<sup>+</sup> T 细胞中的关键亚群之一,在机体免疫稳态、移植耐受和肿瘤免疫逃逸等过程中均发挥着重要作用。但其免疫抑制功能尚不明确,IL-35 在 Treg 细胞中的组成性表达为这一疑问提供了新的线索。

早期研究报道指出,Treg 细胞通过 T 细胞抗原受体(TCR)发挥免疫抑制作用。后来,研究者分析活化的 Treg 细胞中 EBI3 和 IL-12a mRNA 表达是否会受 Teff 细胞的影响<sup>[2]</sup>,结果显示,经过抗-CD3 和抗-CD28 共刺激培养 Teff 细胞后,EBI3 和 IL-12a mRNA 的表达水平显著降低,但从体外环境恢复的 Treg 细胞中 EBI3 和 IL-12a mRNA 的表达水平却显著升高,且与其抑制过程相一致。在 EBI3<sup>-/-</sup> 和 IL-12a<sup>-/-</sup> 小鼠中,EBI3-IL-12a(IL-35)缺失可导致负性调节丧失,同时促炎性细胞因子 IL-27 和 IL-12 分别在 EBI3<sup>-/-</sup> 和 IL-12a<sup>-/-</sup> 小鼠中缺失,但 EBI3<sup>-/-</sup> 小鼠中最终以促炎作用占主导,使得其对利什曼病更易感。与 IL-12<sup>-/-</sup> 小鼠不同,IL-12a<sup>-/-</sup> 小鼠对螺旋菌属所诱导的大肠炎、硕大利什曼原虫感染,EAE 和胶原诱导的关节炎(collagen induced arthritis,CIA)更易感。研究已证实 Treg 细胞在淋巴细胞减少、重组活化因子缺失(Rag<sup>-/-</sup>)的环境中可控制 Teff 细胞的自身稳定扩散。此外,体外实验中也分析了 EBI3<sup>-/-</sup> 和 IL-12a<sup>-/-</sup> Treg 细胞抑制野生型 Teff 细胞增殖的能力,结果显示其抑制能力显著降低,与 Teff 细胞的数量无关<sup>[2]</sup>。有研究分别将纯化的野生型 Teff 细胞与野生型 Treg 或 EBI3<sup>-/-</sup> 或 IL-12a<sup>-/-</sup> Treg 细胞一起过继转移入 Rag1<sup>-/-</sup> 小鼠中,结果证实 EBI3<sup>-/-</sup> 或 IL-12a<sup>-/-</sup> Treg 细胞组中 Teff 细胞扩增基本上无变化,而野生型 Treg 细胞组 Teff 细胞扩增则显著减少,说明 EBI3 与 p35 结合组成的异二聚体细胞因子 IL-35 可发挥免疫抑制作用。但近期研究表明,与小鼠 Treg 细胞不同,离体人 Treg 细胞不表达显著的 EBI3 mRNA,Treg 细胞和 Teff 细胞之间 p35 mRNA 的表达无显著区别,即人体内 EBI3 mRNA 和 p35 mRNA 均不受 Treg 细胞 Foxp3 过表达的影响,与小鼠相反,IL-35 可能并不能促成人 Treg 细胞发挥抑制 Teff 细胞增殖的作用<sup>[12]</sup>。慢性丙型肝炎(CHC)和自限性丙型肝炎病毒感染研究中发现,在 Treg 细胞和效应细胞共培养体系中加入中和抗-IL-35 能有效阻断 Treg 细胞介导的抑制效应细胞增殖的作用<sup>[13]</sup>。IL-35 是否在人体内对 Treg 细胞的免疫抑制效应发挥作用尚待进一步研究。

2. IL-35 为抗炎应答所需:鉴于 Treg 细胞在临床上对治疗类风湿性关节炎起着重要作用,有研究在 DBA/1 小鼠中建立胶原诱导的关节炎(CIA)模型来研究 IL-35 的作用,PBS 处理的对照组小鼠按预期的病程进展,而 IL-35 处理的小鼠在手掌关节炎发生率和数量方面均显著降低;同 PBS 处理的小鼠相比,IL-35 处理组小鼠组织学改变明显好转,表明 IL-35 能有效抑制 CIA 的进展,同时阻止关节破坏的进展<sup>[1]</sup>。IL-35 处理组小鼠血清中 IL-10 浓度明显升高,IL-10 通过抑

制 IkBs 激酶(IKK)和核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)DNA 的结合来阻止 NF- $\kappa$ B 激活编码促炎细胞因子的基因转录,从而减少促炎性细胞因子的产生。但 Collison 等<sup>[14]</sup>发现 Teff 分泌的 IL-10 也可能发挥相同的调节作用,当 Treg 细胞与 IL-10<sup>-/-</sup> Teff 细胞共培养时,所发挥的抑制效应较与野生型 Teff 细胞共培养时降低。另外,炎症性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)模型中,Treg 敲除组可发生严重的病理改变,包括杯状细胞分泌黏液能力丧失,黏膜增生,大面积溃疡或 CD3<sup>+</sup> T 细胞浸润,显著的透壁性淋巴组织细胞炎症及炎症浸润引起的正常生理功能破坏,而野生型 Treg 组中发现炎症和 CD3<sup>+</sup> T 细胞浸润明显减轻且杯状细胞再生,黏液再分泌。在 IL-12 家族成员中,IL-27 可通过活化 STAT 1 和下游效应细胞因子信号抑制物 3(Socs-3)而发挥免疫抑制功能。然而,IL-35 的抗炎机制尚不清楚。

3. IL-35 为 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 和 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Teff 细胞表达所需:Niedbala 等<sup>[1]</sup>从 BALB/c 小鼠的脾和淋巴结中纯化 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞并用含抗-CD3 和抗-CD28 培养基进行培养,T 细胞可最大程度的被活化。结果表明,IL-35 可明显扩增 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞并伴有 IL-10 合成增加,同时也明显诱导 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Teff 细胞的扩增并伴有 IFN- $\gamma$  浓度升高,此与 IL-35 在 Treg 细胞中的免疫抑制功能相矛盾。此外,Lund 等<sup>[15]</sup>报道了相似的发现,感染部位的早期抗病毒免疫应答事实上是由 Treg 细胞首先发起的,Treg 和 Teff 细胞同步扩增,甚至比例保持相对固定。研究发现 Treg 细胞受损后可导致 DC、NK 细胞和淋巴结间质细胞分泌的趋化因子(CCL2、CXCL9 和 CXCL10)过度聚集,这些趋化因子能进一步招募周围的 DC、NK 和 T 细胞到淋巴结,并在此扩大免疫应答,导致真正的感染部位抗病毒应答失活,使病毒有足够的时间加重感染<sup>[16]</sup>。即 Treg 细胞能扩增并将免疫 Teff 细胞从淋巴结移位至病毒感染部位。EBI3-p35(IL-35)主要为 Treg 细胞发挥免疫刺激活性所需,因为 EBI3 可以诱导巨噬细胞合成巨噬细胞炎性蛋白 1(MIP-1),后者可进一步招募 B 和 T 淋巴细胞到炎症部位<sup>[17]</sup>。但是,Treg 和 Teff 细胞之间的 T 细胞抗原受体(TCR)不同,Treg 细胞对外源性抗原的应答情况以及 IL-35 是否对此发挥作用尚需进一步研究。另外,有研究提示 Treg 细胞可被 Teff 细胞分泌的 IL-2 同步触发。

4. IL-35 抑制 Th17 细胞的分化:近期研究表明,与对照组相比 IL-35 处理组可明显抑制 Th17 的分化<sup>[1]</sup>。研究发现 TGF- $\beta$  可通过加速 Th17 分化来增强促炎性应答的作用。IL-35 可上调 IFN- $\gamma$ ,后者可抑制 TGF- $\beta$  受体下游效应器 Smad-3 磷酸化,以此来阻断 TGF- $\beta$  和其受体结合,使 Th17 细胞分化受阻<sup>[18]</sup>,说明 IL-35 可抑制 Th17 细胞的分化。Th17 细胞以分泌 IL-17 和 IL-22 为特征,其中 IL-17 具有宿主和免疫防御作用;IL-22 介导 IL-23 诱导的 Th17 细胞增殖;孤儿受体  $\gamma$ t(ROR $\gamma$ t)是 Th17 细胞分化的重要转录因子。EBI3 缺失可上调 IL-17、IL-22 和 ROR $\gamma$ t 的表达,也证实了 IL-35 在 Th17 分化中所起的免疫抑制作用<sup>[19]</sup>。

## 三、结论和瞻望

综上,IL-35 作为 IL-12 细胞因子家族的一个新成员,具有免疫抑制功能;既能扩增 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞,又能扩



增 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T<sub>H</sub>17 细胞。在急性感染期, IL-35 可诱导 Th1 细胞增殖来清除病原体, 同时通过抑制 Th17 细胞分化来阻止过度的自身免疫反应, 还可扩增 Treg 和 T<sub>H</sub>17 细胞, 但 Treg 细胞在随后的慢性感染阶段却发挥抑制 T<sub>H</sub>17 细胞的作用, 以阻止对机体的免疫损伤<sup>[1]</sup>。Collison 等<sup>[20]</sup>研究发现, 经 IL-35 预处理的传统 T 细胞可诱导分化为一类新型 iTreg 细胞, 被称为“iT<sub>R</sub>35 细胞”, 抗体阻断实验结果证实其是通过 IL-35, 而非 IL-10 或 TGF- $\beta$  来发挥免疫抑制作用的。此发现证明 IL-35 是除 TGF- $\beta$  和 IL-10 之外又一类介导 Treg 细胞发挥抑制作用的重要细胞因子。目前认为 Treg 细胞及其分泌的细胞因子具有持久的免疫耐受效应, 从而推断 IL-35 在病毒感染的免疫耐受期发挥重要的作用。

据法国学者报道, 尽管 CD3/CD28 刺激可诱导人各种 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群少量表达 EB13, 但在人类 Treg 细胞中却未能检测到 EB13<sup>[21]</sup>; 另外, p35 mRNA 在 Treg 和 T<sub>H</sub>17 细胞中均可检测到, 而 EB13 mRNA 仅在活化的 T<sub>H</sub>17 细胞中表达, 在静息或活化的 Treg 细胞中不表达, 这与小鼠体内情况是不同的, 说明 IL-35 在人类 T 细胞中的作用尚不明确。因此, IL-35 受体、IL-35 相关的信号通路、人类和小鼠 T 细胞中 IL-35 的表达形式及发挥生物学功能的分子机制均需要进一步的探讨。随着对 IL-35 研究的增多和不断变化, 或许可以提供给临床一种新的顽固性免疫性疾病的治疗方案, 如 1 型糖尿病和系统性红斑狼疮等。

### 参 考 文 献

- Niedbala W, Wei XQ, Cai B, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol*, 2007, 37(11):3021-3029.
- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 2007, 450(169):566-569.
- Zhang GX, Yu S, Gran B, et al. Role of IL-12 receptor beta 1 in regulation of T cell response by APC in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 2003, 171(9):4485-4492.
- Wu C, Wang X, Gadina M, et al. IL-12 receptor beta 2 (IL-12R beta 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites. *J Immunol*, 2000, 165(11):6221-6228.
- vande Vosse E, van Dissel JT, Ottenhoff TH. Genetic deficiencies of innate immune signaling in human infectious disease. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9(11):688-698.
- Collison LW, Vignali DA. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol Rev*, 2008, 226(6):248-262.
- Nagai T, Devergne O, van Seventer GA, et al. Interferon-beta mediates opposing effects on interferon-gamma-dependent Interleukin-12 p70 secretion by human monocyte-derived dendritic cells. *Scand J Immunol*, 2007, 65(2):107-117.
- Stumhofer JS, Hunter CA. Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27. *Immunol Lett*, 2008, 117(2):123-130.
- Goldberg R, Zohar Y, Wildbaum G, et al. Suppression of ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J Immunol*, 2004, 173(10):6465-6471.
- Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, et al. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol*, 2007, 8(12):1372-1379.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, 2007, 448(7152):484-487.
- Allan SE, Song-Zhao GX, Abraham T, et al. Inducible reprogramming of human T cells into Treg cells by a conditionally active form of FOXP3. *Eur J Immunol*, 2008, 38(12):3282-3289.
- Langhans B, Braunschweiler I, Arndt S, et al. Core-specific adaptive regulatory T-cells in different outcomes of hepatitis C. *Clinical Science*, 2010, 119(2):97-109.
- Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, et al. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35 and IL-10-dependent manner. *J Immunol*, 2009, 182(10):6121-6128.
- Lund JM, Hsing L, Pham TT, et al. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science*, 2008, 320(5880):1220-1224.
- Kassiotis G, O'Garra A. Immunology. Immunity benefits from a little suppression. *Science*, 2008, 320(5880):1168-1169.
- Kempe S, Heinz P, Kokai E, et al. Epstein-barr virus-induced gene-3 is expressed in human atheroma plaques. *Am J Pathol*, 2009, 175(1):440-447.
- Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 2005, 6(11):1133-1141.
- Yang J, Yang M, Htut TM, et al. Epstein-Barr virus-induced gene 3 negatively regulates IL-17, IL-22 and ROR $\gamma$ t. *Eur J Immunol*, 2008, 38(5):1204-1214.
- Collison LW, Abigail VC, Paul LH, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*, 2010, 11(12):1093-1101.
- Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, et al. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol*, 2008, 181(10):6898-6905.

(收稿日期:2011-04-29)

(本文编辑:孙荣华)

石银月, 武桂萍, 颜学兵. IL-12 细胞因子家族的新成员——IL-35 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6(2):159-161.